



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102813669 A

(43) 申请公布日 2012. 12. 12

(21) 申请号 201210294101. 5

(22) 申请日 2012. 08. 18

(71) 申请人 山西省肿瘤医院

地址 030013 山西省太原市职工新街 3 号

(72) 发明人 杨喜花 任连生 张燕

(74) 专利代理机构 太原科卫专利事务所(普通合伙) 14100

代理人 朱源

(51) Int. Cl.

A61K 31/715(2006. 01)

A61P 35/00(2006. 01)

C08B 37/00(2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 6 页

(54) 发明名称

猫棒束孢粗多糖作为制备抗肿瘤药物的应用

(57) 摘要

本发明涉及真菌提取物的抗肿瘤药物开发,具体为一种猫棒束孢粗多糖在制备抗肿瘤药物中的应用,解决了目前未发现猫棒束孢中抗肿瘤活性成分的问题。本发明采用昆明小鼠、裸鼠进行实验,对昆明小鼠分别接种小鼠 H22 肝癌细胞、小鼠 S180 肉瘤细胞、小鼠 EAC 腹水癌细胞后分别注入多种剂量的 IFP,实验结果说明 IFP 对 H22 移植瘤、S180 移植瘤有很好的抑制效果并对腹水癌 EAC 小鼠有生命延长作用;对裸鼠分别接种人 HepG2 肝癌细胞、人 HeLa 宫颈癌细胞后分别注入多种剂量的 IFP,实验结果说明 IFP 对 HepG2 移植瘤、HeLa 移植瘤有很好的抑制效果。说明 IFP 有显著的抑制肿瘤的作用,可广泛适用于制备肿瘤药物中。

1. 猫棒束孢粗多糖作为制备抗肿瘤药物的应用,其中:所述猫棒束孢粗多糖是由如下步骤制得的:取猫棒束孢菌丝粉,加入3-5倍菌丝粉重量的蒸馏水,沸水浴提取70-110min,3000r/min转速下离心4-6min;于沉淀中继续加入3-5倍菌丝粉重量的蒸馏水,沸水浴提取20-40min,3000r/min转速下离心4-6min;于沉淀中继续加入3-5倍菌丝粉重量的蒸馏水,沸水浴提取20-40min,3000r/min离心4-6min;合并三次提取的上清液,水浴浓缩至800-1000mL,得混合液;加入3-4倍混合液体积的95%乙醇,充分混匀,沉淀过夜;取沉淀,于70℃烘干得猫棒束孢粗多糖。

猫棒束孢粗多糖作为制备抗肿瘤药物的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及真菌提取物的抗肿瘤药物开发,具体为一种猫棒束孢粗多糖(以下简称 IFP)作为制备抗肿瘤药物的应用。

背景技术

[0002] 猫棒束孢(*Isaria felina*)是从天然冬虫夏草子实体中经菌种分离培养获得的一种菌株,在分类上属于半知菌纲、丛梗孢目、棒束孢属。经中国科学院微生物研究所鉴定为 *Isaria felina* (DC. :Fr.) Fr.,该菌种已被中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心保藏(保藏号:CGMCC NO. 0706),并取得国家发明专利(ZL02103669.1)。Deffieux Gerard 等人(J Antibiot (Tokyo). 1981, 34(10): 1261-1265.)从 *Isaria felina* 中提取分离得到环羧酚酸肽结构的杀虫剂 Isariins B、C 和 D,并对 Isariins B、C 和 D 的结构进行了鉴定(J Antibiot (Tokyo). 1981, 34(10): 1266-1270.)。郭永霞从猫棒束孢菌丝体中分离纯化得到具有抗真菌作用的环缩肽 isarfelin,并对 isarfelin 进行了理化性质的分析、结构鉴定,并发现 isarfelin 具有抑制细菌、抵抗真菌的活性(郭永霞关于猫棒束孢菌抗真菌多肽和巨大口蘑抗真菌蛋白的分离纯化及特性的研究:[博士学位论文]北京,中国农业大学,2005)。Ikumoto 等研究发现冬虫夏草、蛹虫草及猫棒束孢的浸出液对离体心房有负收缩效应,同时对电刺激回肠的收缩反应及人血小板的凝集有抑制作用(Journal of the Pharmaceutical Society of Japan,1991,111(9): 504-509)。专利 ZL02103669.1 公开了猫棒束孢的抗肿瘤活性功能,但是目前并没有任何研究从猫棒束孢中发现其抗肿瘤活性成分。

发明内容

[0003] 本发明为了解决目前未发现猫棒束孢中抗肿瘤活性成分的问题,提供了猫棒束孢中的抗肿瘤成分,即猫棒束孢粗多糖作为制备抗肿瘤药物的应用。

[0004] 猫棒束孢粗多糖,其是由如下步骤制得的:取菌丝粉,加入 3-5 倍菌丝粉重量的蒸馏水,沸水浴提取 70-110min,3000r/min 转速下离心 4-6min;于沉淀中继续加入 3-5 倍菌丝粉重量的蒸馏水,沸水浴提取 20-40min,3000r/min 转速下离心 4-6min;于沉淀中继续加入 3-5 倍菌丝粉重量的蒸馏水,沸水浴提取 20-40min,3000r/min 离心 4-6min;合并三次提取的上清液,水浴浓缩至 800-1000mL,得混合液;加入 3-4 倍混合液体积的 95% 乙醇(优选为混合液体积的 3.75 倍)充分混匀,沉淀过夜;取沉淀,于 70℃ 烘干得猫棒束孢粗多糖。上述制得的猫棒束孢粗多糖可应用于制备抗肿瘤药物中。

[0005] 本发明采用 SPF 级昆明小鼠、SPF 级裸鼠进行动物实验,对昆明小鼠分别接种小鼠 H22 肝癌细胞、小鼠 S180 肉瘤细胞、小鼠 EAC 腹水癌细胞后分别注入多种剂量的 IFP、以及注入蒸馏水(阴性对照组)、注射用丝裂霉素、鸦胆子油口服乳液作为对照组,实验结果表明 IFP 与阴性对照组相比具有统计学差异,说明猫棒束孢粗多糖对 H22 移植瘤、S180 移植瘤有很好的抑制效果并对腹水癌 EAC 小鼠有生命延长作用;对裸鼠分别接种人 HepG2 肝癌细

胞、人 HeLa 宫颈癌细胞后分别注入多种剂量的 IFP、以及注入蒸馏水(阴性对照组)、注射用丝裂霉素、鸦胆子油口服乳液作为对照组,实验结果表明 IFP 与阴性对照组相比具有统计学差异,说明猫棒束孢粗多糖对 HepG2 移植瘤、HeLa 移植瘤有很好的抑制效果。综上所述,IFP 有显著的抑制肿瘤的作用,可广泛适用于制备抗肿瘤药物中。

具体实施方式

[0006] 实施例 1:下面对猫棒束孢粗多糖的抗肝癌作用进行实验研究:

1. 材料和方法

1.1 动物

SPF (specific pathogen free) 级昆明小鼠 54 只,体重 20-22g,雄性,由山西省肿瘤研究所动物实验室繁殖,实验动物生产许可证号:SCXK(晋)2007-0001;实验动物使用许可证号:SYXK(晋)2007-0002。

[0007] SPF 级 BALB/c-nu 裸鼠 54 只,体重 16-18g,雄性,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,动物生产许可证号:SCXK(京)2009-0017;实验动物饲养在清洁级屏障环境动物实验室,实验动物使用许可证号 SYXK(晋)2007-0002。

[0008] 药品与试剂

猫棒束孢是从天然冬虫夏草子实体中经菌种分离后培养得到,其培养方法如下:将 500 ml 培养基(蛋白胨 0.6%,酵母膏 1.2%,蔗糖 2.4%, MgSO_4 0.05%,用 0.1% KH_2PO_4 调整 pH 为 6.5-7.0)装于 3000ml 三角瓶中,牛皮纸封口,125℃ 高压灭菌 40min,冷却至室温,接入菌种,置于 $180\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 摇床上,于 23-27℃ 条件下旋转发酵培养 72h,收集发酵液,将发酵液于 $2000\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5min,收集菌丝体,将菌丝体于 80℃ 烘干后粉碎,过 100 目筛。

[0009] 猫棒束孢粗多糖,其是由如下步骤制得的:取 300g 上述菌丝粉,加入 1200ml 蒸馏水,沸水浴提取 90min,3000r/min 离心 5min;于沉淀中继续加入 1200ml 蒸馏水,沸水浴提取 30min,3000r/min 离心 5min;于沉淀中继续加入 1200ml 蒸馏水,沸水浴提取 30min,3000r/min 离心 5min;合并三次提取的上清液,水浴浓缩至 900ml,得混合液;加入 3.75 倍混合液体积的 95% 乙醇,充分混匀,沉淀过夜;取沉淀,于 70℃ 烘干备用。

[0010] 瘤株:小鼠 H22 肝癌细胞,购于河北医科大学实验动物中心;人 HepG2 肝癌细胞,由山西大学生物技术研究所馈赠。

[0011] 注射用丝裂霉素:常用的西药抗癌药物,由浙江海正药业股份有限公司生产,产品批号为 110601。

[0012] 鸦胆子油口服乳液:常用的中药抗癌药物,由沈阳药大药业有限责任公司生产,生产批号为 1103112。

[0013] 实验方法:

将生长良好的小鼠 H22 肝癌组织瘤块,在无菌条件下加生理盐水,用消毒的玻璃研磨器制成浓度为 $1 \times 10^7/\text{mL}$ 的细胞悬液,过滤后分别接种于所有昆明小鼠的右腋下皮下,每只昆明小鼠接种 0.2mL 瘤液。

[0014] 将生长良好的人 HepG2 肝癌组织瘤块,在无菌条件下加生理盐水,用消毒的玻璃研磨器制成浓度为 $5 \times 10^6/\text{mL}$ 的细胞悬液,过滤后分别接种于所有裸鼠的右腋下皮下,每只裸鼠接种 0.2mL 瘤液。

[0015] 昆明小鼠接种小鼠 H22 肝癌细胞 24 h 后,将其随机分为 6 组,分别为阴性对照组、丝裂霉素组、鸦胆子油组、IFP 高剂量组、IFP 中剂量组、IFP 低剂量组,每组 9 只动物。阴性对照组小鼠每天灌胃给予蒸馏水 0.2mL,鸦胆子油组小鼠每天灌胃给予鸦胆子油口服乳液 8mL/kg, IFP 高剂量组小鼠每天灌胃给予 IFP 200 mg/kg, IFP 中剂量组小鼠每天灌胃给予 IFP 100 mg/kg, IFP 低剂量组小鼠每天灌胃给予 IFP 50 mg/kg ;丝裂霉素组小鼠腹腔注射丝裂霉素 1 mg/kg,分别于实验第 2d、第 6d 各注射一次,共注射 2 次。灌胃给药 10d,每 3 天称量一次小鼠体重,末次给药 24 h 后颈椎脱臼法处死小鼠,剖取瘤块并称重,计算瘤重、抑瘤率(%)。

[0016] 裸鼠接种人 HepG2 肝癌细胞 24 h 后,也将其随机分为 6 组,分别为阴性对照组、丝裂霉素组、鸦胆子油组、IFP 高剂量组、IFP 中剂量组、IFP 低剂量组,每组 9 只动物。灌胃给药剂量同上,连续灌胃给药 20d,实验观察 50d,于实验第 51d 称重并处死动物,剥离瘤块称重,计算瘤重、抑瘤率(%)。

[0017] 数据处理方法

采用 SPSS17.0 统计软件进行数据统计分析,采用单因素方差分析(ANOVA),两组间比较采用最小显著差异法(LSD),实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P<0.05$ 表示具有统计学差异。

[0018] 实验结果

2.1 IFP 对小鼠移植性肝癌 H22 的抑制作用

下表 1 是各组昆明小鼠的瘤重、抑瘤率：

表 1 IFP 对小鼠移植性肝癌 H22 的抑制作用

组别	动物数 n	体重 (g)		瘤重 (g)	抑瘤率 (%)
		开始	结束		
阴性对照组	9	21.52±1.46	27.12±2.54	1.73±0.51	—
丝裂霉素组	9	21.85±1.35	24.44±2.41	0.67±0.24*	61.27
鸦胆子油组	9	21.62±1.52	27.12±2.41	1.51±0.73	12.72
IFP 高剂量组	9	21.54±1.33	27.43±2.53	0.91±0.59*	47.40
IFP 中剂量组	9	21.23±1.54	26.56±2.43	1.19±0.50*	31.21
IFP 低剂量组	9	21.54±1.36	26.24±2.54	1.56±0.75	9.83

注 :* 与阴性对照组比较 $P<0.05$

实验结果显示,与阴性对照组相比,丝裂霉素和 IFP 对 H22 移植瘤具有很好的抑制效果,其中丝裂霉素的抑瘤效果最好,抑瘤率达到了 61.27%,与阴性对照组相比具有统计学差异 ;IFP 对 H22 移植瘤也有很好的抑制效果,与阴性对照组相比具有统计学差异,200mg/kg 的 IFP 高剂量组抑瘤率达到了 47.40% 而 100mg/kg 的 IFP 中剂量组和 50mg/kg 的 IFP 低剂量组抑瘤效果分别为 31.21% 和 9.83%,都显示出一定的抑瘤效果,同时说明 IFP 对 H22 移植瘤的抑制作用随着给药剂量的增加,其抑瘤率逐渐增加 ;鸦胆子油对 H22 移植瘤也有一定的抑瘤效果为 12.72%。

[0019] 2.2 IFP 对裸鼠移植性肝癌 HepG2 的抑制作用

下表 2 是各组裸鼠的瘤重、抑瘤率：

表 2 IFP 对裸鼠移植性肝癌 HepG2 的抑制作用

组别	动物数 n	体重 (g)		瘤重 (g)	抑瘤率 (%)
		开始	结束		
阴性对照组	9	17.35±1.51	23.58±2.23	1.48±0.55	—
丝裂霉素组	9	17.54±1.56	20.45±2.63	0.67±0.46*	54.73
鹅胆子油组	9	17.64±1.45	22.54±2.64	1.23±0.56	16.89
IFP 高剂量组	9	17.57±1.52	21.36±2.52	1.04±0.52*	29.73
IFP 中剂量组	9	17.63±1.36	21.78±2.36	1.11±0.26*	25.00
IFP 低剂量组	9	17.58±1.45	22.53±2.42	1.25±0.23	15.54

注：* 与阴性对照组比较 $P < 0.05$

实验结果显示，与阴性对照组相比，丝裂霉素和 IFP 对 HepG2 移植瘤具有很好的抑制效果，其中丝裂霉素的抑瘤效果最好，达到了 54.73%，与阴性对照组相比具有统计学差异；IFP 对 HepG2 移植瘤也有很好的抑制效果，与阴性对照组相比具有统计学差异，200mg/kg 的 IFP 高剂量组抑瘤率达到了 29.73% 而 100mg/kg 的 IFP 中剂量组和 50mg/kg 的 IFP 低剂量组抑瘤效果分别为 25.00% 和 15.54%，都显示出一定的抑瘤效果，同时说明 IFP 对 HepG2 移植瘤的抑制作用随着给药剂量的增加，其抑瘤率逐渐增加。

[0020] 实施例 2：观察 IFP 对小鼠 S180 肉瘤的抑制作用：

小鼠 S180 肉瘤细胞：购于中国药品生物制品检定所。

[0021] 猫棒束孢粗多糖，其是由如下步骤制得的：取 300g 实施例 1 制得的菌丝粉，加入 900ml 蒸馏水，沸水浴提取 110min，3000r/min 离心 6min；于沉淀中继续加入 900ml 蒸馏水，沸水浴提取 20min，3000r/min 离心 4min；于沉淀中继续加入 900ml 蒸馏水，沸水浴提取 20min，3000r/min 离心 6min；合并三次提取的上清液，水浴浓缩至 1000mL，得混合液；加入 3 倍混合液体积的 95% 乙醇，充分混匀，沉淀过夜；取沉淀，于 70℃ 烘干备用。

[0022] 其它实验材料、实验方法同实施例 1 中小鼠 H22 肝癌细胞，其实验结果如下表 3 所示：

表 3 IFP 对小鼠移植性肉瘤 S180 的抑制作用

组别	动物数 n	体重 (g)		瘤重 (g)	抑瘤率 (%)
		开始	结束		
阴性对照组	9	21.65±1.52	28.45±2.41	2.73±0.61	—
丝裂霉素组	9	21.45±1.22	24.62±2.58	0.97±0.44*	64.47
鹅胆子油组	9	21.54±1.25	27.41±2.35	2.51±0.94	8.06
IFP 高剂量组	9	21.47±1.44	27.74±2.68	1.52±0.56*	44.32
IFP 中剂量组	9	21.52±1.13	26.85±2.25	1.65±0.45*	39.56
IFP 低剂量组	9	21.63±1.22	26.84±2.11	1.82±0.65	33.33

注：* 与阴性对照组比较 $P < 0.05$

实验结果显示,与阴性对照组相比,丝裂霉素和 IFP 对 S180 移植瘤具有很好的抑制效果,其中丝裂霉素的抑瘤效果最好,达到了 64.47%,与阴性对照组相比具有统计学差异; IFP 对 S180 移植瘤也有很好的抑制效果,与阴性对照组相比具有统计学差异,200mg/kg 的 IFP 高剂量组抑瘤率达到了 44.32% 而 100mg/kg 的 IFP 中剂量组和 50mg/kg 的 IFP 低剂量组抑瘤效果分别为 39.56% 和 33.33%,都显示出一定的抑瘤效果,同时说明 IFP 对 S180 移植瘤的抑制作用随着给药剂量的增加,其抑瘤率逐渐增加。

[0023] 实施例 3:观察 IFP 对人 HeLa 宫颈癌细胞的抑制作用:

人 HeLa 宫颈癌细胞:购于中国协和医科大学。

[0024] 猫棒束孢粗多糖,其是由如下步骤制得的:取 300g 实施例 1 制得的菌丝粉,加入 1500ml 蒸馏水,沸水浴提取 70min,3000r/min 离心 4min;于沉淀中继续加入 1500ml 蒸馏水,沸水浴提取 40min,3000r/min 离心 6min;于沉淀中继续加入 1500ml 蒸馏水,沸水浴提取 40min,3000r/min 离心 4min;合并三次提取的上清液,水浴浓缩至 800mL,得混合液;加入 4 倍混合液体积的 95% 乙醇,充分混匀,沉淀过夜;取沉淀,于 70℃ 烘干备用。

[0025] 其它实验材料、实验方法同实施例 1 中的人 HepG2 肝癌细胞,其结果如下表 4 所示:

表 4 IFP 对裸鼠移植性宫颈癌 HeLa 的抑制作用

组别	动物数 n	体重 (g)		瘤重 (g)	抑瘤率 (%)
		开始	结束		
阴性对照组	9	17.22±1.43	23.42±2.41	1.52±0.96	—
丝裂霉素组	9	17.54±1.31	20.61±2.52	0.62±0.53*	59.21
鹅胆子油组	9	17.36±1.41	22.59±2.55	1.47±0.68	3.29
IFP 高剂量组	9	17.54±1.33	21.35±2.47	0.94±0.55*	38.16
IFP 中剂量组	9	17.42±1.23	21.99±2.12	1.14±0.42*	25.00
IFP 低剂量组	9	17.84±1.56	22.22±2.32	1.23±0.35	19.08

注：* 与阴性对照组比较 $P<0.05$

实验结果显示,与阴性对照组相比,丝裂霉素和 IFP 对 HeLa 移植瘤具有很好的抑制效果,其中丝裂霉素的抑瘤效果最好,抑瘤率达到了 59.21%,与阴性对照组相比具有统计学差异;IFP 对 HeLa 移植瘤也有很好的抑制效果,与阴性对照组相比具有统计学差异,200mg/kg 的 IFP 高剂量组抑瘤率达到了 38.16% 而 100mg/kg 的 IFP 中剂量组和 50mg/kg 的 IFP 低剂量组抑瘤效果分别为 25.00% 和 19.08%,都显示出一定的抑瘤效果,同时说明 IFP 对 HeLa 移植瘤的抑制作用随着给药剂量的增加,其抑瘤率逐渐增加。

[0026] 实施例 4:观察 IFP 对小鼠 EAC 腹水癌细胞的生命延长作用:

实验材料:小鼠 EAC 腹水癌细胞,购于中国药品生物制品检定所。

[0027] 猫棒束孢粗多糖,其是由如下步骤制得的:取 300g 实施例 1 制得的菌丝粉,加入 1100ml 蒸馏水,沸水浴提取 100min,3000r/min 离心 5min;于沉淀中继续加入 1100ml 蒸馏水,沸水浴提取 26min,3000r/min 离心 6min;于沉淀中继续加入 1100ml 蒸馏水,沸水浴提取 35min,3000r/min 离心 4min;合并三次提取的上清液,水浴浓缩至 950mL,得混合液;加入 3.5 倍混合液体积的 95% 乙醇,充分混匀,沉淀过夜;取沉淀,于 70℃ 烘干备用。

[0028] 其它实验材料同实施例 1 中的小鼠 H22 肝癌细胞。

[0029] 实验方法:无菌条件下抽取生长良好的昆明小鼠 EAC 腹水,用生理盐水调节细胞悬液浓度为 5×10^6 /mL,腹腔接种于昆明小鼠的腹部,每只昆明小鼠接种 0.2mL 瘤液。分组方法和灌胃给药剂量同实施例 1 中的小鼠 H22 肝癌细胞,观察 30d,记录动物生存时间,生存时间超过 30d 者按 30d 计,其结果如下表 5 所示:

表 5 IFP 对腹水癌 EAC 小鼠的生命延长作用

组别	动物数(结束 / 开始)	平均生存时间(d)	生命延长率(%)
阴性对照组	0/9	15.20±8.35	-
丝裂霉素组	1/9	19.60±10.36	28.95
鸦胆子油组	0/9	22.50±8.11	48.03
IFP 高剂量组	2/9	27.24±8.24*	79.21
IFP 中剂量组	1/9	24.33±11.45*	60.07
IFP 低剂量组	1/9	20.33±9.12	33.75

注：* 与阴性对照组比较 $P<0.05$

实验结果显示,与阴性对照组相比,鸦胆子油组和 IFP 对腹水癌 EAC 小鼠具有很好的生命延长作用,其中鸦胆子油的生命延长率达到了 48.03%,与阴性对照组相比具有统计学差异;IFP 对腹水癌 EAC 小鼠也有很好的生命延长作用,与阴性对照组相比具有统计学差异,200mg/kg 的 IFP 高剂量组达到了 79.21% 而 100mg/kg 的 IFP 中剂量组和 50mg/kg 的 IFP 低剂量组抑瘤效果分别为 60.07% 和 33.75%,都显示出一定的生命延长效果,同时说明 IFP 对腹水癌 EAC 小鼠的生命延长率随着给药剂量的增加而逐渐增加。