



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101805412 A

(43) 申请公布日 2010.08.18

(21) 申请号 200910070325.6

(22) 申请日 2009.09.03

(71) 申请人 天津科技大学

地址 300222 天津市河西区大沽南路 1038 号

(72) 发明人 朱振元 司传领 钟玥如 原静
刘安军

(51) Int. Cl.

C08B 37/00 (2006.01)

A61K 31/715 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 37/04 (2006.01)

A61K 36/068 (2006.01)

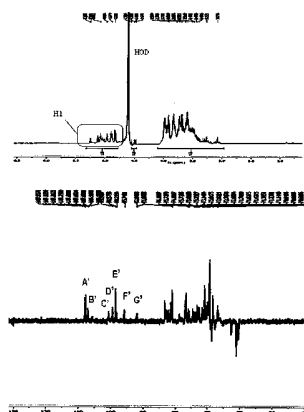
权利要求书 1 页 说明书 2 页 附图 2 页

(54) 发明名称

一种具有抗肿瘤活性的水溶性低分子虫草多糖及其制备方法和用途

(57) 摘要

本发明公开了具有抗肿瘤活性的人工培养的虫草菌丝体水溶性低分子多糖及其制备方法和用途。用 30% 乙醇作提取剂, 最佳提取工艺: 温度为 70℃, 料液比为 1 : 20, 提取时间为 2 小时。经去脂、去蛋白、50%、70% 乙醇沉淀, 冷冻干燥后得到粗多糖。粗多糖经 DEAE SephadexA-25 柱和 Sephadex G-75 柱逐级纯化, 得到一种水溶性低分子多糖。该多糖纯度较高, 其多糖含量为 94.57%, 相对分子质量约为 9874。该水溶性多糖对人肝癌细胞株 Be1-7204 和人胃癌细胞株 SGC-7901 的增殖有显著的抑制效果, 对植入小鼠体内的 S180 肿瘤细胞的生长具有明显的抑制作用。本发明水溶性低分子虫草多糖活性成分明确, 质量可控, 可用作抗肿瘤药物或提高机体免疫功能的保健品。



1. 一种具有抗肿瘤活性的水溶性低分子多糖,由下法制得:用30%乙醇作提取剂,从虫草菌种深层发酵培养出的菌丝体中提取虫草多糖,通过单因素和正交实验确定了古尼虫草多糖的最佳提取工艺:温度为70℃,料液比为1:20,提取时间为2小时。提取液经去脂、去蛋白、50%、70%乙醇沉淀,冷冻干燥后得到粗多糖。经DEAE SephadexA-25柱和SephadexG-75柱逐级纯化,冷冻干燥得到一种水溶性低分子多糖CPS-50-A1。

2. 权利要求1所述水溶性低分子多糖的制备方法,其特征在于:用30%乙醇作提取剂,从虫草菌种深层发酵培养出菌丝体中提取虫草多糖,通过单因素和正交实验确定了古尼虫草多糖的最佳提取工艺:温度为70℃,料液比为1:20,提取时间为2小时。提取液经去脂、去蛋白、50%、70%乙醇沉淀,冷冻干燥后得到粗多糖。经DEAE Sephadex A-25柱和SephadexG-75柱逐级纯化,冷冻干燥得到一种水溶性低分子多糖CPS-50-A1。

3. 权利要求1所述的水溶性低分子多糖在制备抗肿瘤药物中的用途。

4. 权利要求1所述的水溶性低分子多糖在制备提高机体免疫功能的保健品中的用。

一种具有抗肿瘤活性的水溶性低分子虫草多糖及其制备方法和用途

技术领域

[0001] 本发明涉及一种虫草多糖,同时,本发明还涉及一种所述虫草多糖的制备方法及其在抗肿瘤和提高机体免疫力方面的应用。

背景技术

[0002] 虫草多糖是虫草中含量较高的抗肿瘤活性物质,但虫草多糖种类繁多,结构复杂,目前的研究初步认为多糖的生物活性与其结构有关,但目前对虫草多糖的化学组成、链结构、分子大小与抗肿瘤作用之间的关系研究较少,尚缺乏规律性的科学依据。

发明内容

[0003] 本发明的目的在于提供一种虫草多糖,其活性成分明确、结构清晰、分子量大小明确、质量可控,用于抗肿瘤和提高机体免疫力,效果可靠,并且几乎无不良反应。

[0004] 本发明的另一目的在于提供该虫草多糖制备方法,其方法工艺简单,产品收率高。

[0005] 本发明的目的还在于提供该虫草多糖在抗肿瘤和提高机体免疫力方面的应用。

[0006] 本发明提供的虫草多糖,其所含活性多糖成分的含量为 94.57%,平均相对分子量约为 9874。糖链构型为吡喃糖,该多糖由木糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖四种单糖组成,其比例为 0.31 : 0.89 : 0.54 : 1。主要以 1 → 2、1 → 3 位糖苷键连接,还含有少量的 1 → 6 键合的糖基。

[0007] 本发明提供的虫草多糖的制备方法,以人工发酵培养虫草菌丝体为原料,包括以下步骤:用 30%乙醇作提取剂,提取温度为 70℃,料液比为 1 : 20,提取时间为 2 小时。提取液经去脂、去蛋白、50%乙醇沉淀,经 DEAE Sephadex A-25 柱和 Sephadex G-75 柱逐级纯化,冷冻干燥后即得到该虫草多糖。

[0008] 本发明的体外活性实验证明该水溶性低分子虫草多糖能抑制肿瘤细胞株的生长,在以人肝癌细胞株 Bel-7204 和人胃癌细胞株 SGC-7901 为靶细胞的 MTT 还原法检测抗肿瘤活性试验中,半数致死量 IC_{50} 分别为 3.756 和 5.256 μ g/ml,表明该水溶性低分子虫草多糖具有抗肿瘤活性,可用于制备抗肿瘤药物。体内活性实验表明,该水溶性多糖对植入小鼠体内的 Sarcoma180 肿瘤的生长具有明显的抑制作用,而且无毒副作用。

具体实施方式:

[0009] 实施例 1:水溶性低分子虫草多糖的制备

[0010] 以人工发酵培养虫草菌丝体为原料,古尼虫草菌丝粉 → 30%乙醇溶液 70℃ 热回流提取 → 离心、抽滤 → 保留清液,残渣反复提取 → 合并提取液 → 浓缩 → 冷冻干燥 → 粗多糖 CPS → 脱脂 → sevage 法去蛋白 → 离心 → 保留清液 → 加入乙醇使浓度达到 50% → 离心得沉淀,沉淀经 DEAE-Sephadex A-25 柱层析 → 苯酚硫酸法跟踪检测 → 合并峰值附近洗脱液 → 冷冻干燥 → 得固体 → 经过 Sephadex G-75 柱层析 → 得精制多糖。

[0011] 实施例 2 : MTT 还原法检测水溶性低分子虫草多糖的抗肿瘤活性试验

[0012] 1. 细胞培养

[0013] MFC 细胞培养于含有 10% 胎牛血清, 青、链霉素各 100 μ g/mL 的 RPMI-1640 培养基中, 5% CO₂, 37°C, 饱和湿度的条件下常规培养, 每 48h ~ 72h 更换一次新鲜培养基, 并按 1 : 3 的比例传代培养, 以保证实验所用细胞均处于对数生长期。

[0014] MFC 细胞常规培养, 每 48h 更换一次新鲜培养基, 传代时用 hanks 液 (不含 Ga²⁺、Mg²⁺ 等离子) 洗细胞两次后, 加胰酶 (含 0.05% 胰酶、0.02% EDTA) 1 ~ 2mL 覆盖培养瓶底面, 于培养箱中消化 10 ~ 15min, 加入 3 ~ 4mL 含血清的培养基终止消化, 收集细胞液离心 (1000rpm/min, 7.5min), 离心后倾去上清液加入新鲜培养基进行培养。

[0015] 2 抗肿瘤活性的测定 : MTT 法

[0016] 将 1×10^5 个 /mL 细胞悬液接种于 96 孔板中, 每孔加 100 μ L。实验组同时分别加入不同浓度的测试药物, 每个浓度 6 个平行孔, 另设 6 个不加药物的细胞孔作为阴性对照。37°C, 5% CO₂ 培养箱培养 72h 后 1000rpm/min 离心 10min, 弃去上清。再向每孔加入 0.5mg/mL 的 MTT 与 pH7.4 的 PBS 缓冲液的混合液 100 μ L, 继续培养 4 小时后, 1500rpm/min 离心 15min, 弃去上清液, 每孔加入 150 μ L 二甲基亚砷 (DMSO), 震荡 2min 使细胞中的结晶物充分溶解, 用酶标仪测定 570nm 波长下的吸光度值, 并计算各浓度药物对细胞生长的抑制率 (M)。绘制细胞活力曲线图, 求出 IC₅₀ 值。试验结果如表 1 所示。结果表明, 水溶性低分子虫草多糖具有较强的细胞毒性, 其毒性对正常细胞和癌细胞具有一定的选择性; 水溶性低分子虫草多糖可用于制备抗肿瘤药物。

[0017] 表 1. 水溶性低分子虫草多糖的细胞毒性试验结果

[0018]

试验细胞	正常人肝细胞株	人肝癌细胞株	人胃癌细胞株
	L-02	Bel-7204	SGC-7901
IC ₅₀ (μ g/ml)	13.422	3.756	5.256

[0019] 实施例 3 : 体内抑瘤活性实验

[0020] 小鼠于接种 Sarcoma 180 肿瘤细胞后第 2 天静脉注射给药, 连续 10 天, 观察小鼠的各种表现、肿瘤生长及死亡情况, 停药后 1 天处死 S180 实体瘤小鼠, 观察药物的抑瘤率, 结果表明 : ① 25、50、100mg/kg 对 S180 肿瘤的生长有抑制作用, 分别是 41.2%、51.5%、70.1%, 提示水溶性低分子虫草多糖具有较强的抗肿瘤作用。

附图说明 :

[0021] 附图 1 为虫草多糖 CPS-50-A1 的 ¹H NMR 谱和 ¹³C NMR 谱 ;

[0022] 附图 2 为虫草多糖 CPS-50-A1 的 HSQC 图谱 ;

[0023] 附图 3 为虫草多糖 CPS-50-A1 提取分离纯化流程。

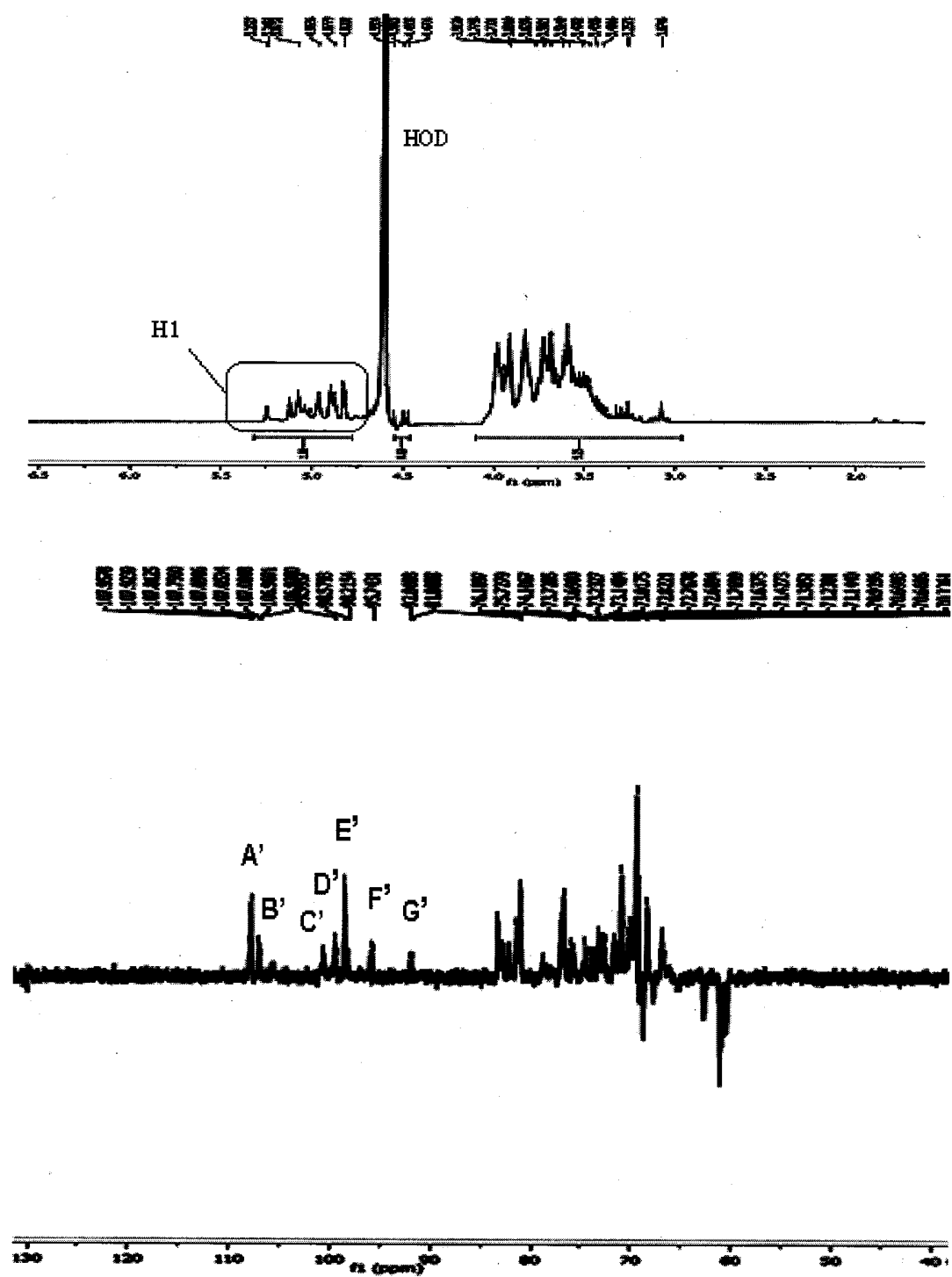


图 1

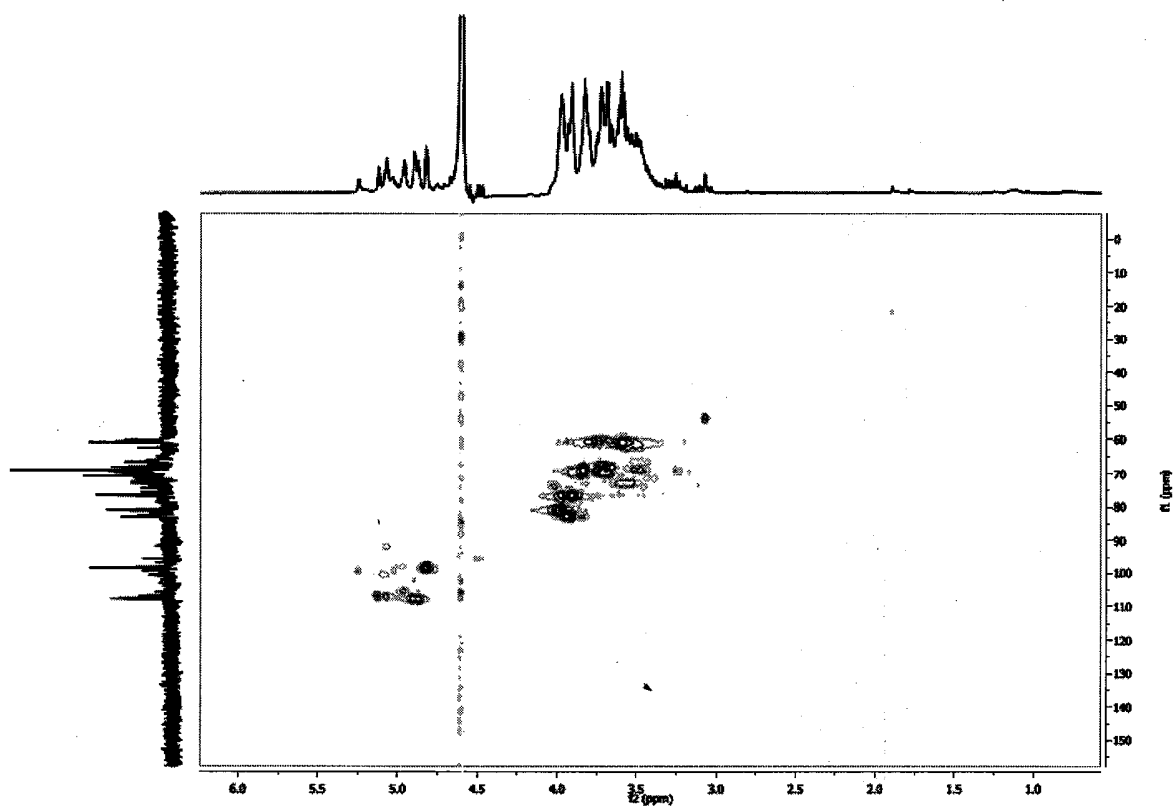


图 2

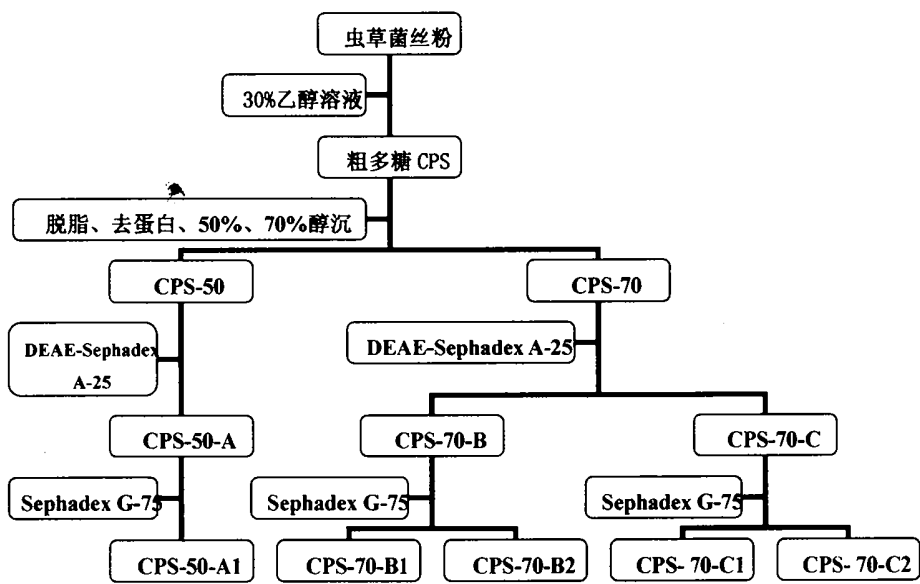


图 3