



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113402624 B

(45) 授权公告日 2022.09.30

(21) 申请号 202010185241.3

(51) Int.CI.

(22) 申请日 2020.03.17

C08B 37/00 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

C12P 19/04 (2006.01)

申请公布号 CN 113402624 A

C12R 1/645 (2006.01)

(43) 申请公布日 2021.09.17

审查员 于爱霞

(83) 生物保藏信息

CGMCC No. 6004 2012.04.16

(73) 专利权人 香港理工大学深圳研究院

地址 518057 广东省深圳市南山区高新园  
南区粤兴一道18号香港理工大学产学研  
研大楼205室

(72) 发明人 吴建勇 黄永德 李奎清 宋昂芯

(74) 专利代理机构 深圳中一专利商标事务所

44237

专利代理人 高星

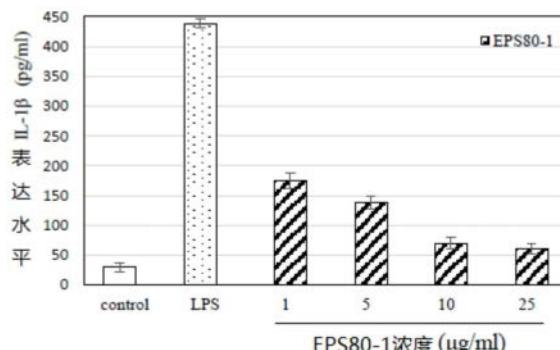
权利要求书2页 说明书8页 附图4页

(54) 发明名称

胞外多糖及其制备方法和应用

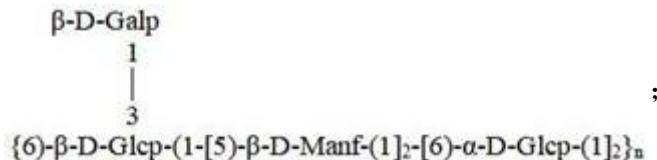
(57) 摘要

本发明属于生物医药技术领域，尤其涉及一种胞外多糖及其制备方法和应用。本发明提供的胞外多糖包括：由葡萄糖和甘露糖形成的主链，由半乳糖连接所述主链形成的侧链；以摩尔比计算，所述甘露糖、葡萄糖和半乳糖的单糖比例为(3.5-4.5):(6.5-7.5):(0.8-1.5)。该胞外多糖的制备方法包括：将菌株Cs-HK1进行液体发酵，收集发酵液；将发酵液进行醇沉处理以及脱蛋白处理，制得多糖粗提物；将多糖粗提物用水溶解，进行凝胶柱层析。该方法简便，操作简单，易于规模化量产。经测试，由上述方法制得的胞外多糖具有良好抗炎活性，显示出很好的药物应用前景。



1. 一种胞外多糖，其特征在于，所述胞外多糖由至少两个结构单元组成，所述结构单元包括：第一葡萄糖、第二葡萄糖、第三葡萄糖、第一甘露糖、第二甘露糖和第一半乳糖，所述第一葡萄糖以1,5-糖苷键连接所述第一甘露糖，所述第一甘露糖以1,5-糖苷键连接所述第二甘露糖，所述第二甘露糖以1,6-糖苷键连接所述第二葡萄糖，所述第二葡萄糖以1,6-糖苷键连接所述第三葡萄糖，且所述第一半乳糖以1,3-糖苷键连接所述第一葡萄糖；

所述胞外多糖的分子结构包括：



其中，n表示所述结构单元的个数，为350-400之间的正整数；

$\beta\text{-D-Galp}$ 为 $\beta\text{-D-半乳糖}$ ；

[6] - $\beta\text{-D-Glcp}$ - (1为C<sub>6</sub>和C<sub>1</sub>分别与相邻单糖形成糖苷键的 $\beta\text{-D-葡萄糖}$ ；

[5] - $\beta\text{-D-Manf}$ - (1)<sub>2</sub>为C<sub>5</sub>和C<sub>1</sub>分别与相邻单糖形成糖苷键的 $\beta\text{-D-甘露糖}$ ，且所述 $\beta\text{-D-甘露糖}$ 的重复次数为2；

[6] - $\alpha\text{-D-Glcp}$ - (1)<sub>2</sub>为C<sub>6</sub>和C<sub>1</sub>分别与相邻单糖形成糖苷键的 $\alpha\text{-D-葡萄糖}$ ，且所述 $\alpha\text{-D-葡萄糖}$ 的重复次数为2；

所述胞外多糖的制备方法包括以下步骤：

提供菌株Cs-HK1，所述菌株Cs-HK1为中国弯颈霉属，保藏在中国普通微生物菌种保藏管理中心，保藏号为CGMCC No. 6004，保藏时间为2012年4月16日；

将所述菌株Cs-HK1进行液体发酵，收集发酵液；

将所述发酵液进行醇沉处理以及脱蛋白处理，制得多糖粗提物；

将所述多糖粗提物用水溶解，进行凝胶柱层析，制得所述胞外多糖；

其中，将所述发酵液进行醇沉处理以及脱蛋白处理的步骤包括：

按照乙醇的最终体积百分比浓度为35%-40%的比例，将所述发酵液与乙醇混合，进行第一醇沉处理，离心，获得第一上清液；

按照乙醇的最终体积百分比浓度为78%-84%的比例，将所述第一上清液与乙醇混合，进行第二醇沉处理，离心，获得第二上清液；

提供Sevag试剂，将所述第二上清液与所述Sevag试剂混合，进行脱蛋白处理；

进行凝胶柱层析的步骤包括：

配制多糖粗提物水溶液，将所述多糖粗提物水溶液上载于DEAE-SephadexA-25柱上，采用蒸馏水以及氯化钠的摩尔浓度为0.1-1M的氯化钠水溶液进行洗脱，收集馏分；

将所述馏分上载于superdex 200 pg柱上，采用碳酸氢铵的摩尔浓度为 0.1-0.3M碳酸氢铵水溶液进行洗脱。

2. 一种权利要求1所述的胞外多糖的制备方法，其特征在于，包括以下步骤：

提供菌株Cs-HK1，所述菌株Cs-HK1为中国弯颈霉属，保藏在中国普通微生物菌种保藏管理中心，保藏号为CGMCC No. 6004，保藏时间为2012年4月16日；

将所述菌株Cs-HK1进行液体发酵，收集发酵液；

将所述发酵液进行醇沉处理以及脱蛋白处理，制得多糖粗提物；将所述发酵液进行醇

沉处理以及脱蛋白处理的步骤包括：按照乙醇的最终体积百分比浓度为35%-40%的比例，将所述发酵液与乙醇混合，进行第一醇沉处理，离心，获得第一上清液；按照乙醇的最终体积百分比浓度为78%-84%的比例，将所述第一上清液与乙醇混合，进行第二醇沉处理，离心，获得第二上清液；提供Sevag试剂，将所述第二上清液与所述Sevag试剂混合，进行脱蛋白处理；

将所述多糖粗提物用水溶解，进行凝胶柱层析，制得所述胞外多糖；进行凝胶柱层析的步骤包括：配制多糖粗提物水溶液，将所述多糖粗提物水溶液上载于DEAE-SephadexA-25柱上，采用蒸馏水以及氯化钠的摩尔浓度为0.1-1M的氯化钠水溶液进行洗脱，收集馏分；将所述馏分上载于superdex 200 pg柱上，采用碳酸氢铵的摩尔浓度为 0.1-0.3M碳酸氢铵水溶液进行洗脱。

3. 根据权利要求2所述的制备方法，其特征在于，将所述菌株Cs-HK1进行液体发酵的步骤中，将所述菌株Cs-HK1接种到发酵培养基中，在18℃-35℃发酵6-7天。

4. 根据权利要求3所述的制备方法，其特征在于，每1升所述发酵培养基包括：30-40 g葡萄糖、5-10 g蛋白胨、0.8-1.2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.4-0.6 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O和5-15 g酵母提取物，溶剂为水。

5. 如权利要求1所述的胞外多糖或由权利要求2至4任一项所述的制备方法制得的胞外多糖在制备具有抗炎活性的功能制剂中的应用。

## 胞外多糖及其制备方法和应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物医药技术领域,尤其涉及一种胞外多糖及其制备方法和应用。

### 背景技术

[0002] 炎症是机体对体内平衡和精细调节的防御反应,包含对组织损伤、感染或由严格控制的炎症反应引起的其他刺激的复杂的病理保护反应。然而,过度的炎症反应可能造成人体免疫调节系统的异常,从而导致宿主机体产生许多有害的慢性炎症疾病。自从炎症被认为与各种疾病密切相关以来,对炎症潜在机制以及抗炎活性药物的研究成为了本领域技术人员的研究热点。

### 发明内容

[0003] 本发明的主要目的在于筛选具有良好药物应用前景的抗炎活性药物,其具体技术方案如下:

[0004] 为实现该发明目的,第一方面,本发明提供了一种胞外多糖,包括:由葡萄糖和甘露糖形成的主链,由半乳糖连接所述主链形成的侧链;以摩尔比计算,所述甘露糖、葡萄糖和半乳糖的单糖比例为(3.5-4.5):(6.5-7.5):(0.8-1.5)。

[0005] 第二方面,本发明提供了一种胞外多糖的制备方法,包括以下步骤:

[0006] 提供菌株Cs-HK1,所述菌株Cs-HK1为中国弯颈霉属,保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏地址为北京市朝阳区北辰西路1号院3号,保藏号为CGMCC No.6004,保藏时间为2012年4月16日;

[0007] 将所述菌株Cs-HK1进行液体发酵,收集发酵液;

[0008] 将所述发酵液进行醇沉处理以及脱蛋白处理,制得多糖粗提物;

[0009] 将所述多糖粗提物用水溶解,进行凝胶柱层析,制得所述胞外多糖。

[0010] 第三方面,本发明提供了前述胞外多糖或由上述制备方法制得的胞外多糖在制备具有抗炎活性的功能制剂中的应用。

[0011] 本发明提供的胞外多糖,包括具有特定单糖摩尔比例的葡萄糖、甘露糖和半乳糖,由葡萄糖和甘露糖形成主链,由半乳糖连接主链形成侧链,经体外细胞抗炎活性测试,上述胞外多糖具有良好抗炎活性,显示出很好的药物应用前景。

[0012] 本发明提供的上述胞外多糖的制备方法,主要通过以菌株Cs-HK1为发酵菌株进行液体发酵,然后对发酵液的逐级纯化分离获得。该方法简便,操作简单,易于规模化量产。

[0013] 基于上述胞外多糖良好的抗炎活性,前述菌株、上述胞外多糖或由上述制备方法制得的胞外多糖可应用于制备具有抗炎活性的功能制剂,包括但不限于药物、保健食品、化妆品等。

## 附图说明

- [0014] 图1为实施例1中多糖粗提物EPS80采用GPC法检测的结果；
- [0015] 图2为实施例1中DEAE-Sephadex A-25柱的洗脱程序以及洗脱液的吸光度检测结果；
- [0016] 图3为实施例1中superdex 200pg柱的洗脱液的吸光度检测结果；
- [0017] 图4为EPS80-1对经LPS诱导的THO-1细胞表达NF- $\kappa$ B炎症信号激活的抑制效果；
- [0018] 图5为EPS80-1对经LPS诱导的THP-1细胞表达一氧化氮(NO)的抑制效果；
- [0019] 图6为EPS80-1对经LPS诱导的THP-1细胞表达IL-1 $\beta$ 的抑制效果；
- [0020] 图7为EPS80-1对经LPS诱导的THP-1细胞表达IL-10的抑制效果；
- [0021] 图8为EPS80-1的细胞毒活性测试结果。

## 具体实施方式

[0022] 为了使本发明要解决的技术问题、技术方案及有益效果更加清楚明白，以下结合实施例，对本发明进行进一步详细说明。应当理解，此处所描述的具体实施例仅仅用以解释本发明，并不用于限定本发明。

[0023] 本发明实施例说明书中所提到的各组分的质量不仅仅可以指代各组分的具体含量，也可以表示各组分间质量的比例关系，因此，只要是按照本发明实施例说明书组合物各组分的含量按比例放大或缩小均在本发明实施例说明书公开的范围之内。具体地，本发明实施例说明书中所述的质量可以是 $\mu\text{g}$ 、 $\text{mg}$ 、 $\text{g}$ 、 $\text{kg}$ 等医药领域公知的重量单位。

[0024] 在本发明的描述中，需要理解的是，术语“第一”、“第二”、“第三”仅用于描述目的，而不能理解为指示或暗示相对重要性或者隐含指明所指示的技术特征的数量。由此，限定有“第一”、“第二”、“第三”的特征可以明示或者隐含地包括一个或者更多个该特征。在本发明的描述中，“至少两个”的含义是两个或两个以上，除非另有明确具体的限定。

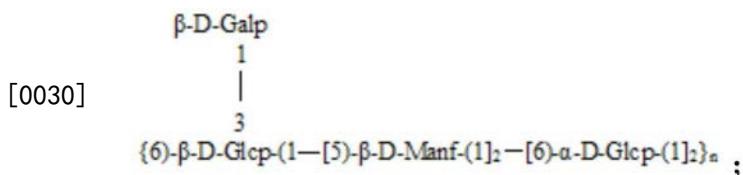
[0025] 一种胞外多糖，包括：由葡萄糖和甘露糖形成的主链，由半乳糖连接所述主链形成的侧链；以摩尔比计算，所述甘露糖、葡萄糖和半乳糖的单糖比例为(3.5-4.5):(6.5-7.5):(0.8-1.5)。

[0026] 本发明实施例提供的胞外多糖，包括具有特定单糖摩尔比例的葡萄糖、甘露糖和半乳糖，由葡萄糖和甘露糖形成主链，由半乳糖连接主链形成侧链，经体外细胞抗炎活性测试，上述胞外多糖具有良好抗炎活性，显示出很好的药物应用前景。

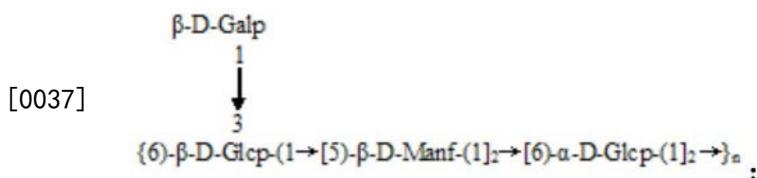
[0027] 作为一种实施方式，所述胞外多糖由至少两个结构单元组成，所述结构单元包括：第一葡萄糖、第二葡萄糖、第三葡萄糖、第一甘露糖、第二甘露糖和第一半乳糖，所述第一葡萄糖以1,5-糖苷键连接所述第一甘露糖，所述第一甘露糖以1,5-糖苷键连接所述第二甘露糖，所述第二甘露糖以1,6-糖苷键连接所述第二葡萄糖，所述第二葡萄糖以1,6-糖苷键连接所述第三葡萄糖，且所述第一半乳糖以1,3-糖苷键连接所述第一葡萄糖。一些具体实施例中，两两相邻的结构单元之间，第三葡萄糖以1,6-糖苷键连接第一葡萄糖。

[0028] 值得注意的，上述第一葡萄糖、第二葡萄糖和第三葡萄糖仅用于描述目的，以区分多个葡萄糖之间的连接关系，第一葡萄糖、第二葡萄糖和第三葡萄糖的构型可相同或不相同，第一甘露糖和第二甘露糖同理。

[0029] 作为一种实施方式，所述胞外多糖的分子结构包括：



- [0031] 其中,n表示所述结构单元的个数,为300-350之间的正整数;
- [0032]  $\beta\text{-D-Galp}$ 为 $\beta\text{-D-半乳糖}$ ;
- [0033]  $6)$ - $\beta\text{-D-Glcp}$ - (1为C<sub>6</sub>和C<sub>1</sub>分别与相邻单糖形成糖苷键的 $\beta\text{-D-葡萄糖}$ ;
- [0034] [5) - $\beta\text{-D-Manf}$ - (1]<sub>2</sub>为C<sub>5</sub>和C<sub>1</sub>分别与相邻单糖形成糖苷键的 $\beta\text{-D-甘露糖}$ ,且 所述 $\beta\text{-D-甘露糖}$ 的重复次数为2;
- [0035] [6) - $\alpha\text{-D-Glcp}$ - (1]<sub>2</sub>为C<sub>6</sub>和C<sub>1</sub>分别与相邻单糖形成糖苷键的 $\alpha\text{-D-葡萄糖}$ ,且 所述 $\alpha\text{-D-葡萄糖}$ 的重复次数为2。
- [0036] 在具体实施例中,上述胞外多糖的分子结构为:



- [0038] 其中,n表示所述结构单元的个数,为350-400之间的正整数; $\rightarrow$ 表示单 糖连接方向。
- [0039] 在进一步实施例中,所述胞外多糖的重均分子量为300-400kDa。具体实 施例中,该胞外多糖的重均分子量为360kDa。
- [0040] 作为一种实施方式,所述胞外多糖由菌株Cs-HK1代谢生成,所述菌株 Cs-HK1为中国弯颈霉属,拉丁文名称为Tolypocladium sinense,保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏地址为北京市朝阳区北辰西路 1号院3号,保藏号为CGMCC No.6004,保藏时间为2012年4月16日。
- [0041] 在一些具体实施例中,菌株Cs-HK1分离筛选自生长在青藏高原的野生冬 虫夏草子实体,该菌种分离筛选的过程可参考本领域的常规操作,本发明实施 例对此不作特别限 定。
- [0042] 基于上述技术方案,本发明实施例还提供了一种胞外多糖的制备方法及其 应用。
- [0043] 相应地,一种胞外多糖的制备方法,包括以下步骤:
- [0044] S01、提供菌株Cs-HK1,所述菌株Cs-HK1为中国弯颈霉属,保藏在中国 微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏地址为北京市朝阳区北辰西 路1号院3号,保藏号为 CGMCC No.6004,保藏时间为2012年4月16日;
- [0045] S02、将所述菌株Cs-HK1进行液体发酵,收集发酵液;
- [0046] S03、将所述发酵液进行醇沉处理以及脱蛋白处理,制得多糖粗提物;
- [0047] S04、将所述多糖粗提物用水溶解,进行凝胶柱层析,制得所述胞外多糖。
- [0048] 本发明实施例提供的上述胞外多糖的制备方法,以菌株Cs-HK1为发酵菌 株进行液体发酵,并通过发酵液的逐级纯化分离而制得。该方法简便,操作 简单,易于规模化量 产。
- [0049] 具体地,步骤S01中,菌株Cs-HK1的种属及其保藏信息同上文所述的菌 株Cs-HK1,

此处不一一赘述。

[0050] 步骤S02中,将菌株Cs-HK1进行液体发酵,使得菌株Cs-HK1在发酵过程中代谢形成上述胞外多糖,并使得胞外多糖富集在发酵液中。

[0051] 作为一种实施方式,将所述菌株Cs-HK1进行液体发酵的步骤中,将所述菌株Cs-HK1接种到发酵培养基中,在18℃-35℃发酵6-7天。在该发酵温度和发酵时间下,有利于菌株Cs-HK1大规模代谢上述胞外多糖,提高生物合成效率。

[0052] 发酵过程中使用的发酵培养基直接影响着代谢产物的合成,作为一种实施方式,每1升所述发酵培养基包括:30-40g葡萄糖、5-10g蛋白胨、0.8-1.2g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.4-0.6g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O和5-15g酵母提取物,溶剂为水。具体实施例中,每1升所述发酵培养基包括:40g葡萄糖、5g蛋白胨、1g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.5g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O和10g酵母提取物,溶剂为水。通过使用该优化培养基,增加了虫草菌丝体CS-HK1的生物量,提升了菌株Cs-HK1合成胞外多糖的效率。

[0053] 发酵的具体过程可参考本领域的常规操作,例如可置于大规格的发酵罐中发酵,也可置于摇床上进行发酵。一些实施例中,所述发酵置于转速设置为200rpm摇床上进行发酵。

[0054] 将所述菌株Cs-HK1进行液体发酵之后,将发酵物进行离心,以收集发酵液。在一些实施例中,将发酵物进行离心时,以12000rpm的转速离心20分钟,有利于将菌株Cs-HK1代谢形成的胞外多糖高效率地富集在发酵液中。

[0055] 步骤S03中,将所述发酵液进行醇沉处理以及脱蛋白处理,使得发酵液中的目标代谢物胞外多糖与其他小分子杂质和蛋白质分开,以获得胞外多糖含量高的多糖粗提物。

[0056] 作为一种实施方式,将所述发酵液进行醇沉处理以及脱蛋白处理的步骤包括:

[0057] S031、按照乙醇的最终体积百分比浓度为35%-40%的比例,将所述发酵液与乙醇混合,进行第一醇沉处理,离心,获得第一上清液;

[0058] S032、按照乙醇的最终体积百分比浓度为78%-84%的比例,将所述第一上清液与乙醇混合,进行第二醇沉处理,离心,获得第二上清液;

[0059] S033、提供Sevag试剂,将所述第二上清液与所述Sevag试剂混合,进行脱蛋白处理。

[0060] 通过上述方法,可最大限度地提高多糖粗提物的胞外多糖含量,有利于提升该胞外多糖的抗炎活性。

[0061] 其中,步骤S031的第一醇沉处理以及步骤S032的第二醇沉处理的具体操作可参考本领域的常规技术,如采用机械搅拌。

[0062] 步骤S033的Sevag试剂以及进行脱蛋白处理的具体过程,可参考本领域的常规操作,如一些实施例中,Sevag试剂为体积比为4:1的氯仿-正丁醇混合液;如一些实施例中,进行脱蛋白处理的步骤包括:将第二上清液与Sevag试剂的混合液充分震摇,待混合液的中间层无浑浊产生后,收集下层的水相溶液,并将水相溶液采用3500mw的半透膜用蒸馏水进行透析48h。

[0063] 步骤S04中,将所述多糖粗提物用水溶解,进行凝胶柱层析,通过利用凝胶柱层析的分子筛作用实现对目标代谢物的进一步纯化分离,以获得高纯度的上述胞外多糖。

[0064] 作为一种实施方式,进行凝胶柱层析的步骤包括:

[0065] S041、配制多糖粗提物水溶液,将所述多糖粗提物水溶液上载于 DEAE-Sephadex 柱上,采用蒸馏水以及氯化钠水溶液进行洗脱,收集馏分;

[0066] S042、将所述馏分上载于superdex 200pg柱上,采用碳酸氢铵水溶液进行 洗脱。

[0067] 在一些实施例中,步骤S041中,多糖粗提物水溶液中的多糖粗提物的浓 度为200-250mg/mL,所述氯化钠水溶液中的氯化钠的摩尔浓度为0.1-1M,并 以0.3-0.5mL/min的流速进行洗脱。

[0068] 在一些实施例中,步骤S042中,采用碳酸氢铵水溶液进行洗脱时,以0.3-0.5 mL/min的流速进行洗脱,且所述碳酸氢铵水溶液的碳酸氢铵的摩尔浓度为 0.1-0.3M。

[0069] 经细胞体外抗炎活性测试,通过上述制备方法制得的胞外多糖对经LPS诱 导的THO-1细胞表达NF- $\kappa$ B炎症信号激活、表达一氧化氮(NO)和表达IL-1 $\beta$  和IL-10具有显著的抑制效果,显示出很好的药物应用前景,可应用于制备具 有抗炎活性的功能制剂,包括但不限于药物、保健食品、化妆品等。

[0070] 相应地,前述菌株、上述胞外多糖或由上述制备方法制得的胞外多糖在制 备具有抗炎活性的功能制剂中的应用。

[0071] 其中,所述功能制剂包括但不限于药物、保健食品、化妆品等。

[0072] 为使本发明上述实施细节和操作能清楚地被本领域技术人员理解,以及本 发明实施例一种胞外多糖及其制备方法和应用的进步性能显著地体现,以下通 过实施例对本发明的实施进行举例说明。

[0073] 实施例1

[0074] 本实施例提供了一种胞外多糖EPS80-1,其制备过程具体包括以下步骤:

[0075] S11、发酵菌株Cs-HK1

[0076] 1) 取菌株Cs-HK1,其分离筛选自生长在青藏高原的野生冬虫夏草子实体,于2012年4月16日保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心, 保藏地址为北京市朝阳区北辰西路1号院3号,保藏号为CGMCC No.6004;

[0077] 2) 按照40g/L葡萄糖、5g/L蛋白胨、1g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.5g/L MgSO<sub>4</sub> • 7H<sub>2</sub>O 和10g/L酵母提取物的比例,将葡萄糖、蛋白胨、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、MgSO<sub>4</sub> • 7H<sub>2</sub>O和酵 母提取物溶解在水中,制得发酵培养基;

[0078] 3) 将菌株Cs-HK1接种到发酵培养基中,20℃下于摇床上以200rpm的转 速发酵6-7天,将发酵产物12000rpm离心20min,收集发酵液。

[0079] S12、制备多糖粗提物EPS80

[0080] 1) 按照乙醇的最终体积百分比浓度为40%的比例,在步骤S11制得的发 酵液中加入乙醇,进行醇沉,离心,收集上清液;

[0081] 2) 按照乙醇的最终体积百分比浓度为80%的比例,在步骤1)制得的上清 液中加入乙醇,进行醇沉,离心,收集上清液;

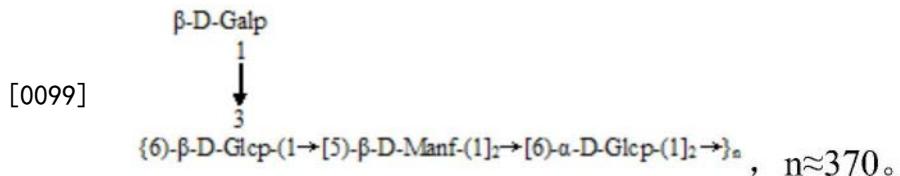
[0082] 3) 配制体积比为4:1的氯仿-正丁醇混合液,在步骤2)制得的上清液中 加入氯仿-正丁醇混合液,充分震摇,离心,去除含有蛋白质等杂质的上层有机 相,收集含有真菌多糖的下层水相;将水相透析48h,冻干,制得多糖粗提物 EPS80。采用GPC法检测多糖粗提物 EPS80的分子量分布情况,结果如图1所 示。

[0083] S13、分离纯化胞外多糖EPS80-1

- [0084] 将多糖粗提物EPS80复溶于水,形成浓度为250mg/mL的多糖粗提物水溶液;
- [0085] 将多糖粗提物水溶液上载于DEAE-Sephadex A-25柱上,以0.5mL/min的流速,依次采用蒸馏水以及浓度为0.1-1M的氯化钠水溶液逐级洗脱,收集洗脱液,并采用蒽酮试剂检测各馏分中的多糖含量,根据多糖含量将洗脱液分为3个馏分,分别标记为EPS80-1、EPS80-2和EPS80-3,如图2所示;
- [0086] 将馏分EPS80-1上载于superdex 200pg柱上,以0.3mL/min的流速,采用浓度为0.3M的碳酸氢铵水溶液进行洗脱,收集洗脱液,并采用蒽酮法分析洗脱液中的糖含量,结果如图3所示;将主要多糖组分进行组合、浓缩、透析和冻干,获得胞外多糖EPS80-1。
- [0087] 取本实施例制得的胞外多糖EPS80-1进行结构表征,具体过程简述如下:
- [0088] (1) 分子量分析
- [0089] 采用高效凝胶渗透色谱法(HPGPC)对EPS80-1的分子量分布和均匀性进行了分析。用Waters-HPGPC仪器、Waters-1515等比例HPLC泵、Waters-2414 折射率(RI)检测器和Waters-2998紫外检测器进行HPGPC。用1-670kDa的葡聚糖标准(Sigma-Aldrich,美国)校准HPGPC(MW与洗脱时间)。
- [0090] (2) 化学成分分析
- [0091] 总碳水化合物含量通过蒽酮试验(以葡萄糖为标准)测定,蛋白质含量通过Lowry方法(以牛血清白蛋白( BSA )为标准)测定。如前所述,采用1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP)-高效液相色谱法对单糖成分进行了分析。简而言之,EPS样品(1-2mg)在110℃下用2M三氟乙酸(TFA)完全水解4h。水解产物在真空下干燥,然后在70℃下用450μl PMP溶液(甲醇中为0.5M)和450μl 0.3M NaOH衍生30min。用450μl的0.3M HCl中和反应停止,然后用氯仿(1mL,3次)提取,提取液用Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C18柱(5μm,4.6×150mm)在Agilent 1100仪器上用G1312A仓泵和紫外检测器进行高效液相色谱分析。
- [0092] (3) 部分酸水解及甲基化分析
- [0093] 将干燥的EPS80-1(5毫克)预溶解在2.5毫升无水二甲基亚砜(DMSO)中,持续搅拌3小时。在氮气中加入无水氢氧化钠(30mg),搅拌30分钟,在氮气保护下,在冰浴中缓慢加入甲基碘(0.8毫升),并在黑暗中搅拌。在室温下放置1h。
- [0094] 通过添加2.5mL蒸馏水停止反应,并在40℃下通过真空蒸发去除过量的甲基碘化物。用二氯甲烷提取部分甲基化样品。用去离子水冲洗二氯甲烷溶液三次,去除杂质。部分甲基化的EPS80-1在室温下在旋转蒸发器中真空蒸干。甲基化过程重复三次以完成。将部分甲基化的EPS80-1在110℃的密封管中用2 M TFA(1mL)进一步水解6h,并在沸水浴中用氮气流除去多余的TFA。将干燥后的水解物重新溶解于1mL氨饱和水中,并在室温下用过量的NaBH4还原12h。过量的NaBH4与乙酸反应(直到没有气泡出现),并用甲醇共蒸馏去除所形成的硼酸。将干燥残渣与1毫升醋酸酐在110℃的密封管中乙酰化2小时,形成部分甲基化的醋酸醛糖醇(PMAA)。将PMAA真空蒸干,再溶于氯仿中,用水冲洗三次。
- [0095] 产物经熔融石英毛细管柱(30mm×0.25mm ID,Agilent HP-5MS)用Agilent 6890N气相色谱和5975v1-MSD进行GC-MS分析。将柱温固定在100℃下3分钟,然后增加到250℃ at 3℃/min,并固定在250℃下10分钟。注射器和检测器分别固定在280℃和250℃。
- [0096] (4) 核磁共振和红外光谱
- [0097] 核磁共振用的是布鲁克AV400仪器。为了进行核磁共振波谱分析,EPS80-1样品

(30mg) 通过冷冻干燥与重水共蒸发两次,然后溶解在600 $\mu$ l重水中。EPS80-1的红外光谱(IR) 在室温下在Avatar 360 FTIR (Thermo Nicolet, Cambridge, UK) 上以4cm<sup>-1</sup>分辨率在4000-500cm<sup>-1</sup>范围内进行。所有光谱 均进行基线校正。

[0098] 测得胞外多糖EPS80-1的分子结构如下:



[0100] 其单糖比例(以摩尔比计算)如表1所示,表明本实施例制得的胞外多糖 EPS80-1由两个以上结构单元组成,每一结构单元包括:3个第一葡萄糖、2个 甘露糖和1个半乳糖;其中,位于结构单元首端的为1个葡萄糖,该葡萄糖以 1,5-糖苷键连接1个甘露糖,该甘露糖继续以1,5-糖苷键连接下一个甘露糖,该 下一个甘露糖以1,6-糖苷键连接1个葡萄糖,该葡萄糖继续以1,6-糖苷键连接 下一个葡萄糖,半乳糖以1,3-糖苷键连接第一葡萄糖形成侧链。

[0101] 表1

[0102]

馏分	分子量	单糖比例
		甘露糖: 3.88
EPS80-1	360kDa	葡萄糖: 6.93
		半乳糖: 1.00

[0103] 以下对实施例1制得的胞外多糖EPS80-1的抗炎活性进行测试,其中,采 用脂多糖 LPS诱导THP-1细胞为炎症细胞,并采用NO试剂盒及ELISA试剂 盒测试例如IL-10、IL-1 $\beta$ 、NO 等炎症因子在细胞中的表达水平,以EPS80-1 对细胞的炎症因子抑制率来综合评价其抗炎效果。

[0104] 炎症因子抑制率,为与无药物介入的炎症细胞组相比,采用EPS80-1介入 的炎症细胞对炎症因子的表达水平降低的比率。

[0105] 1、测试EPS80-1对经LPS诱导的THO-1细胞表达NF- $\kappa$ B炎症信号通路激 活的影响

[0106] 提供THP-1细胞,该细胞负载有NF- $\kappa$ B炎症信号激活指示酶(该酶为一种 碱性磷酸酶SEAP),其活性评估使用Quanti-Blue试剂(InvivoGen);

[0107] 将THP-1细胞在96孔板 ( $2 \times 10^5$ /孔) 中培养48h,加入终浓度为1 $\mu$ g/mL的 脂多糖(LPS) (Sigma-Aldrich, Shanghai, China) 诱导细胞发生炎症反应;然后,在 加入有LPS诱导细胞发生炎症反应的部分培养孔中加入不同浓度的EPS80-1, 其中,对THP-1细胞不作任何处理的为control组,无EPS80-1介入的为LPS 组,加入有EPS80-1的为EPS80-1组,EPS80-1组中的EPS80-1组浓度分别为 1、5、10、25 $\mu$ g/mL;

[0108] 取培养后的细胞上清液,以1:4的比例加入Quanti-Blue试剂,在625nm 处测定吸光度。

[0109] 如图4结果所示,EPS80-1组均能够有效抑制经LPS诱导的THP-1细胞 NF- $\kappa$ B炎症信

号通路的激活,以浓度为 $25\mu\text{g}/\text{mL}$ 的EPS80-1组对经LPS诱导 的THP-1细胞的NF- $\kappa\text{B}$ 炎症通路激活的抑制效果最为显著。

[0110] 2、测试EPS80-1对经LPS诱导的THP-1细胞表达一氧化氮(NO)的影响

[0111] 将THP-1细胞在96孔板 ( $1\times 10^5/\text{孔}$ ) 中,其中,control组的培养基为 RPMI1640培养基,EPS80-1组的培养基为含有LPS以及不同浓度EPS80-1的 RPMI1640培养基,EPS80-1组浓度分别为1、5、10、 $25\mu\text{g}/\text{mL}$ ,LPS组的培养 基为含有LPS的标准培养基;

[0112] 培养48h后,取 $100\mu\text{L}$ 细胞培养的上清液,以 $\text{NaNO}_2$ 为标准品,使用比 色法分析上清液中亚硝酸盐的含量。其中包括:将上清液与Griess试剂等体积 混合,20min后,在 $540\text{nm}$ 处测量吸光度。其中,Griess试剂由N- (1-萘基) 乙 二胺(质量体积百分含量为0.1%) 和碘胺(质量体积百分含量为1%) 的混合 溶液溶解在质量百分含量为5%的磷酸中形成。

[0113] 如图5结果所示,EPS80-1组均能够有效抑制经LPS诱导的THP-1细胞表 达NO,浓度为 $25\mu\text{g}/\text{mL}$ 的EPS80-1组的NO表达水平相较于LPS组低76.7%, 表明浓度为 $25\mu\text{g}/\text{mL}$ 的EPS80-1组对细胞表达NO的抑制效果最为显著。

[0114] 3、测试EPS80-1对经LPS诱导的THP-1细胞表达IL-1 $\beta$ 和IL-10的影响

[0115] 将THP-1细胞在96孔板 ( $1\times 10^5/\text{孔}$ ) 中培养,对除了control组外的其余培 养孔用 磷酸缓冲盐水 (PBS) 冲洗细胞,更换培养基为RPMI 1640培养基(无FBS), 然后加入LPS刺激 THP-1的炎症反应,部分培养孔中加入终浓度分别为1、5、10、 $25\mu\text{g}/\text{mL}$ 的EPS80-1,其中,以 无EPS80-1介入的为LPS组,加入有EPS80-1 的为EPS80-1组。

[0116] 培养48h后,使用多赛特酶联免疫吸附试验 (ELISA) 试剂盒 (R&D Systems) (Sigma-Aldrich,上海,中国) 测定上清液中细胞因子的浓度。

[0117] 如图6和图7结果所示,EPS80-1组均能够有效抑制经LPS诱导的THP-1 细胞表达 IL-1 $\beta$ 和IL-10,其中,浓度为 $25\mu\text{g}/\text{mL}$ 的EPS80-1组的IL-1 $\beta$ 表达 水平相较于LPS组低 92.4%,且IL-10表达水平相较于LPS组低74.3%,表明 浓度为 $25\mu\text{g}/\text{mL}$ 的EPS80-1组对细胞表达IL-1 $\beta$ 和IL-10的抑制效果最为显著。

[0118] 综上,本发明实施例提供的胞外多糖EPS80-1均能够有效抑制经LPS诱导 的THP-1 细胞炎症反应,表明胞外多糖EPS80-1具有良好的抗炎活性。

[0119] 为了评估EPS80-1对THP-1细胞的毒活性影响,以下采用MTT法对实施 例1制得的 胞外多糖EPS80-1进行细胞毒活性测试,其测试方法包括:

[0120] 首先将细胞在96孔平底组织培养板 (105个细胞/孔) 中培养24小时,以 获得稳定的 生长,然后用不同浓度的EPS80-1刺激48h。培养48h后,用MTT 法(甲基噻唑基四唑盐, Sigma) 进行分析。活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶将 外源MTT还原为不溶于水的蓝色和紫 色晶体沉积在细胞内,而死细胞则不具 有这种功能。MTT孵育4h后,加入二甲基亚砜 (DMSO) 溶解MTT,上清液 在摇板机中摇匀。然后用酶标仪测定 $490\text{nm}$ 处的光密度 (OD) 值。

[0121] 图8为EPS80-1的细胞毒活性测试结果,结果表明,当EPS80-1浓度高达  $100\mu\text{g}/\text{mL}$  时,THP-1细胞的存活率始终接近90%,表明在高剂量条件下, EPS80-1对细胞并无明显毒 理作用,具有良好的安全性能,具有潜在的药物开 发价值,可应用于制备抗炎药物。

[0122] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发 明的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等,均应包含在本发明 的保护范围之内。

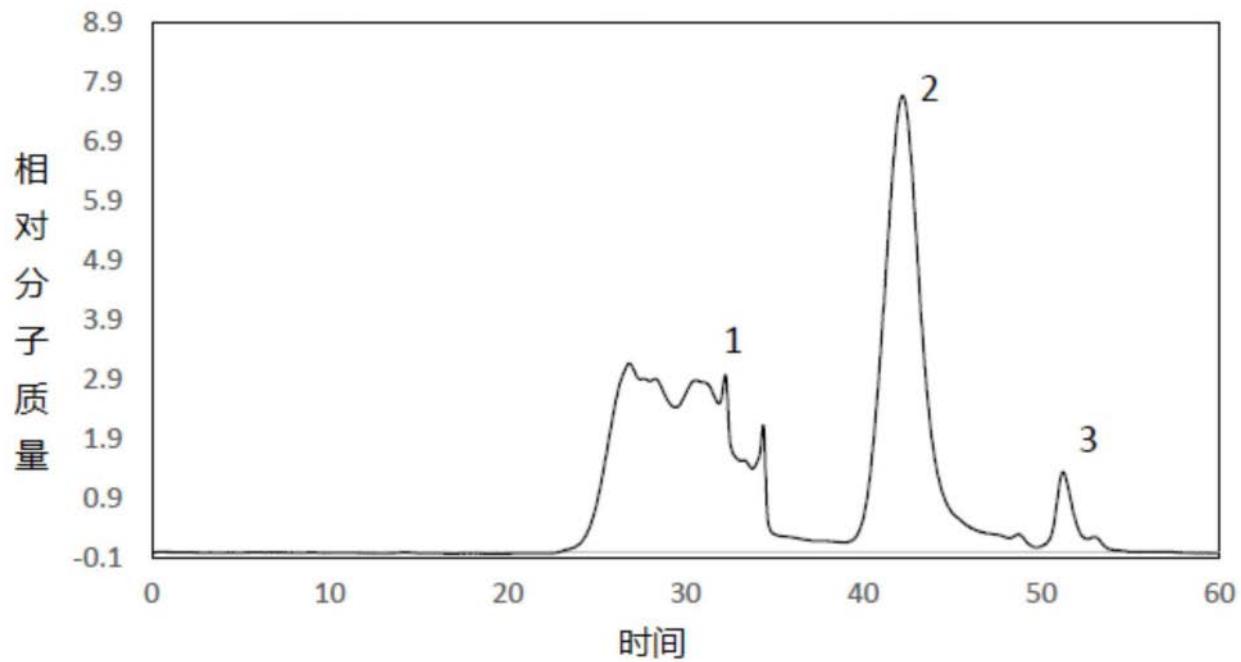


图1

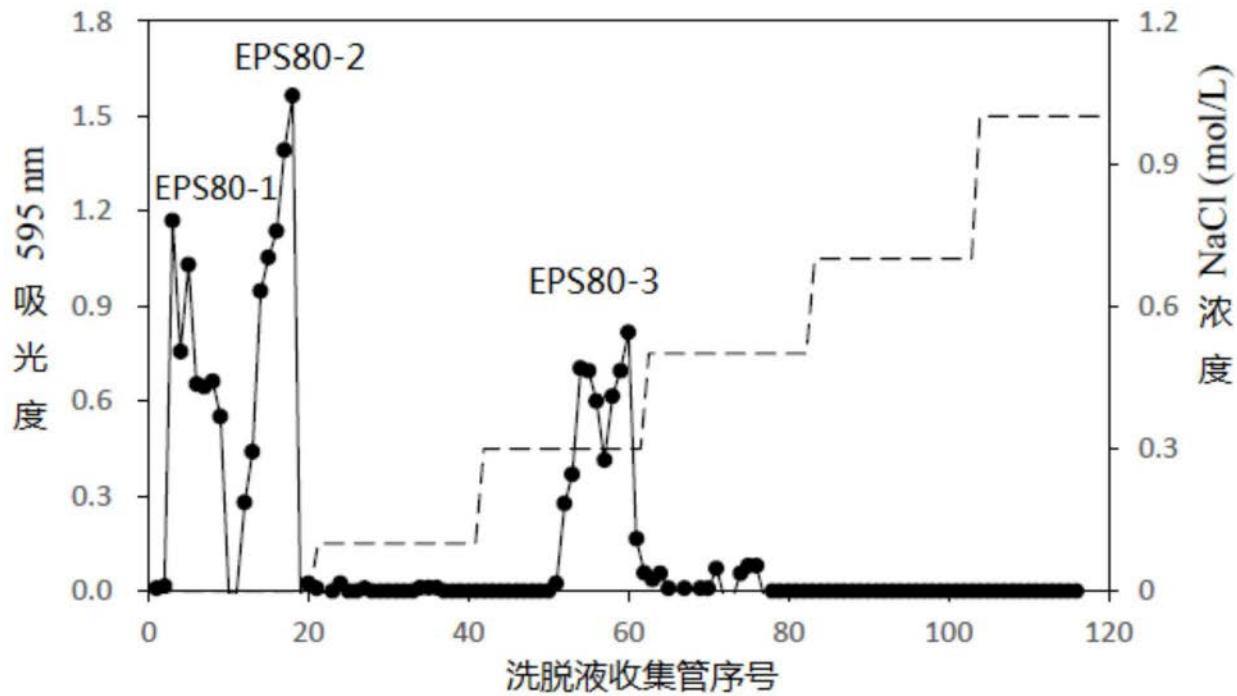


图2

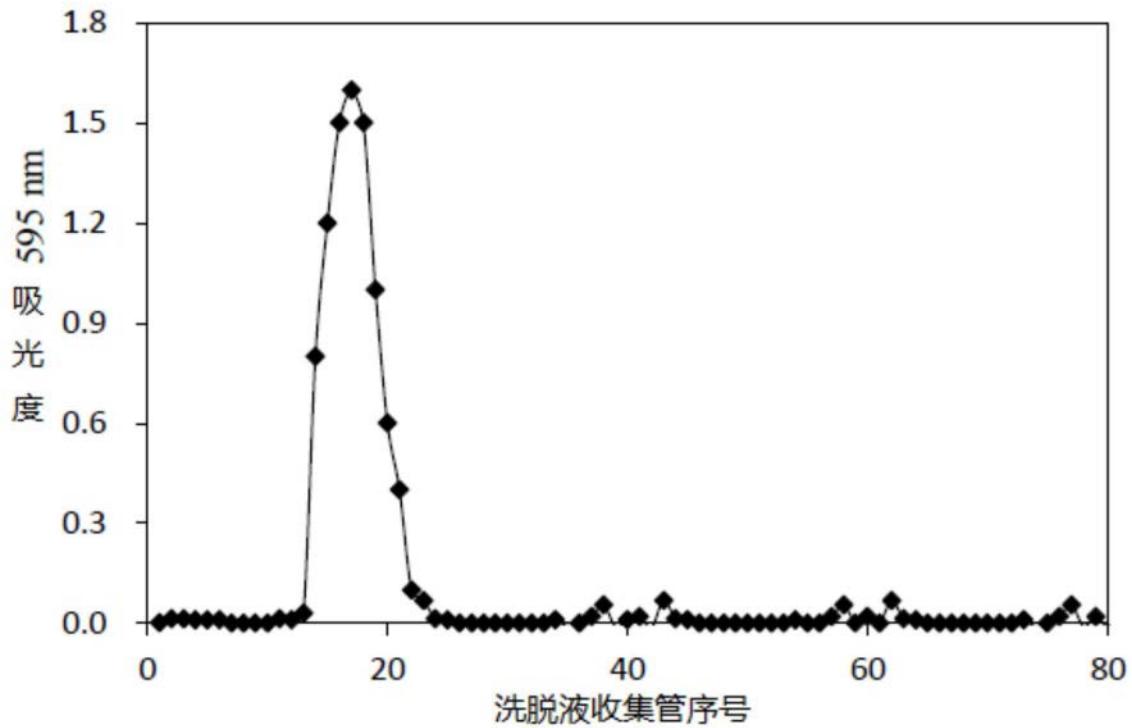


图3

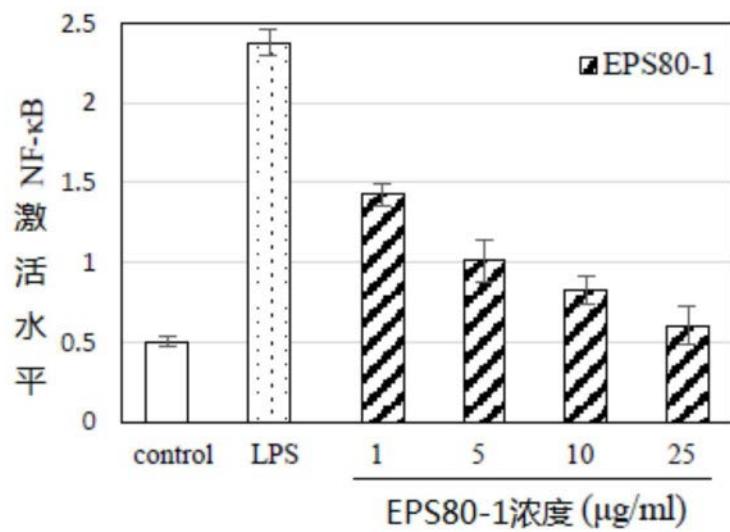


图4

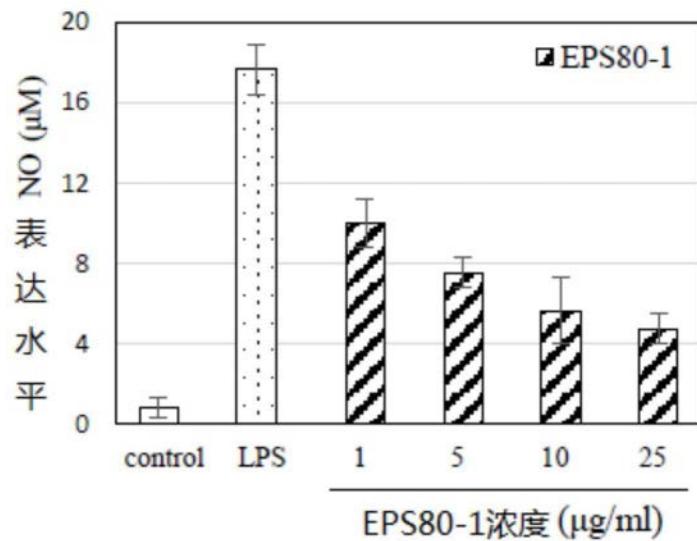


图5

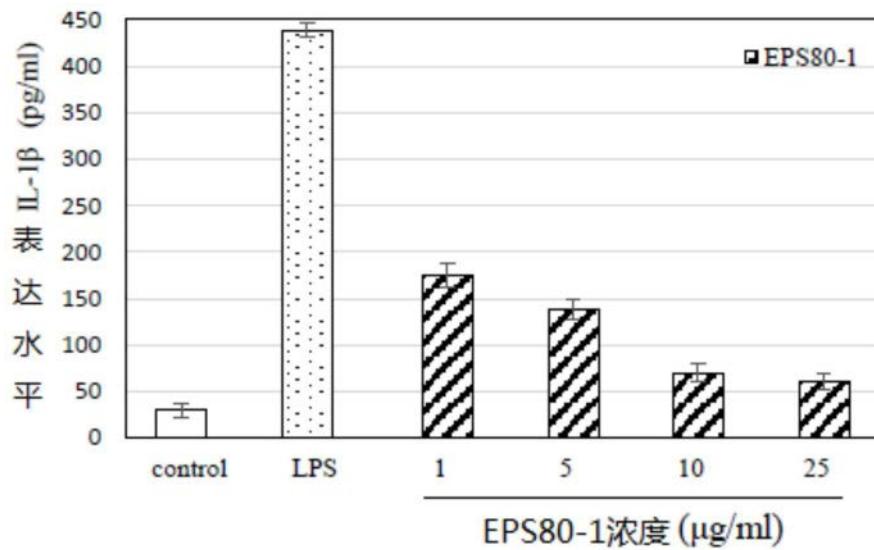


图6

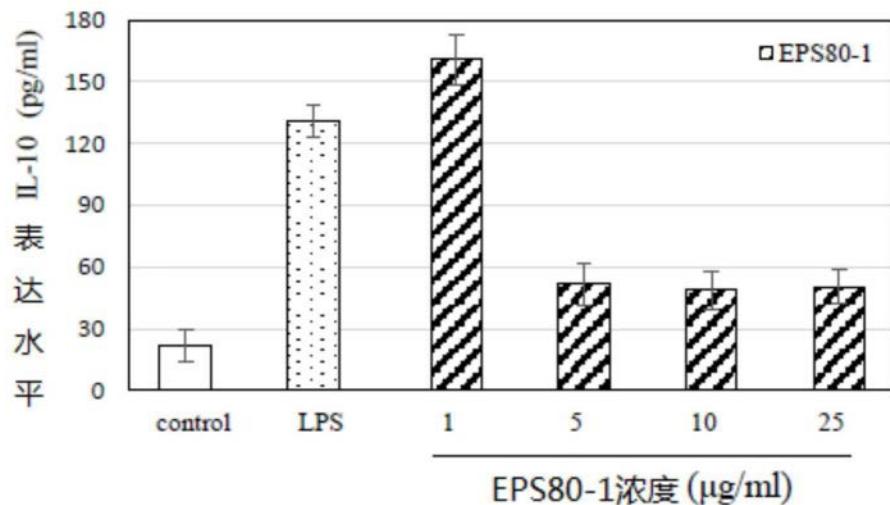


图7

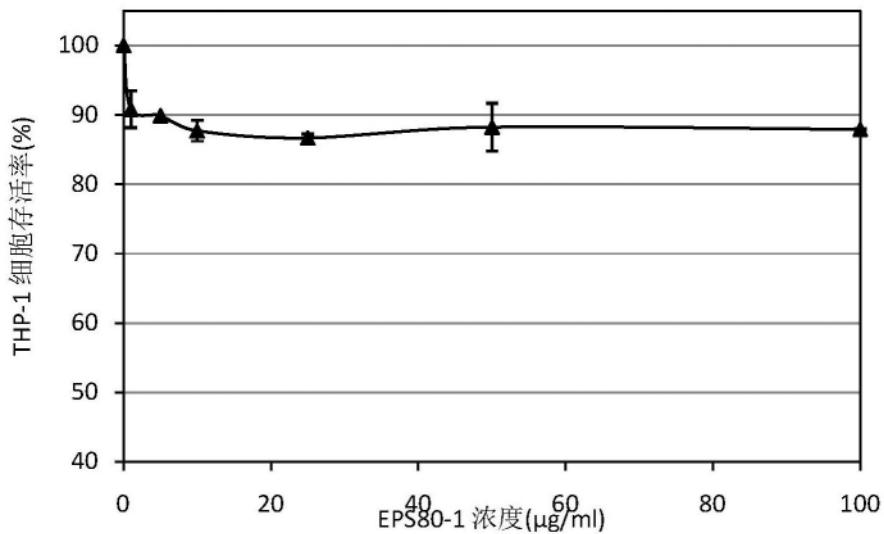


图8