

葡萄多组分重组囊泡的制备及其载多肽性能研究

张 蕾^{1,2,3}, 乔宏志^{1,2,3*}, 何凤军¹, 方 栋^{1,2,3}, 吴文瀚¹, 狄留庆^{1,2,3*}

1. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023

2. 江苏省中药高效给药系统工程技术研究中心, 江苏 南京 210023

3. 南京市中药微丸产业化工程技术研究中心, 江苏 南京 210023

摘要: **目的** 分离葡萄不同组分并重组构建功能囊泡, 考察其装载多肽类药物的性能。 **方法** 采用乙醇为溶剂提取葡萄多酚(GP), 通过单因素和正交试验优化 GP 的提取工艺。大孔树脂吸附法纯化 GP。正交试验考察蜂毒肽(Mel)与 GP 的复合条件, 制备纳米复合物(GPMC)。蔗糖密度梯度离心法提取葡萄囊泡(GDVs), 用于装载优化的 GPMC, 得到 GPMC-GDVs。考察 GPMC-GDVs 在 PBS、DMEM、10% FBS 中的稳定性。MTT 法评价其对 SMMC-7721 及 HepG2 细胞的毒性。 **结果** 优化的 GP 提取工艺: 60%乙醇为提取溶剂, 料液比 1:10, 提取温度 50 ℃, 提取 50 min, 提取 2 次。GP 纯化条件: 4 mg/mL GP 粗提物上样 7 BV (树脂床体积), 水洗 5 BV, 60%乙醇洗脱 5 BV。GPMC-GDVs 制备工艺: 室温下, 将 0.4 mg/mL GDVs 缓慢滴入等体积含 Mel 质量浓度为 2 mg/mL 的 GPMC 溶液中, 孵育 30 min。制备的 GPMC-GDVs 在 PBS、DMEM、10% FBS 中稳定性良好。MTT 结果显示, GPMC-GDVs 具有明显的肿瘤抑制作用。 **结论** 通过对 GP 与 GDVs 组分的分离重组, 可制备含药囊泡, 并能用于活性多肽的装载, 在多肽类药物递送和抗肿瘤领域具有较好的应用前景。

关键词: 葡萄多酚; 蜂毒肽; 囊泡; 纳米药物递送; 抗肿瘤; 协同效应

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)12-2793-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.12.010

Preparation and characterization of restructured vesicles of grape-derived multicomponents for active peptides loading

ZHANG Lei^{1,2,3}, QIAO Hong-zhi^{1,2,3}, HE Feng-jun¹, FANG Dong^{1,2,3}, WU Wen-han¹, DI Liu-qing^{1,2,3}

1. School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

2. Jiangsu Engineering Research Center for Efficient Delivery System of TCM, Nanjing 210023, China

3. Nanjing Engineering and Technology Research Center for TCM Pellets, Nanjing 210023, China

Abstract: **Objective** To reconstruct the functional vesicles by using the components isolated from grapes, and investigate its properties of the loading of peptides. **Methods** Grape polyphenols (GP) were extracted by ethanol, and the extraction technology of GP was optimized by single factor and orthogonal experiments. GP was purified by macroporous resin adsorption and the purification technology. The preparation of GP and melittin (Mel) complexes (GPMC) were determined by orthogonal tests, and Sucrose density gradient centrifugation was used to extract grape-derived vesicles (GDVs) for loading complex GPMC to get GPMC-GDVs. The stability of GPMC-GDVs in PBS, DMEM, and 10% FBS were investigated. The cytotoxicity of GPMC and GPMC-GDVs on SMMC-7721 or HepG 2 cells was investigated by MTT method. **Results** The extraction process of GP was as follows: the extraction solvent was 60% ethanol solution, the heating temperature was 50 ℃, the solid-liquid ratio was 1:10, the extraction time was 50 min and extract 2 times. The purification conditions of GP were as follows: 4 mg/mL GP crude sample volume was 7 times of bed volume (BV), the washing dosage was 5 BV, and the elution volume of 60% ethanol was 5 BV. The preparation of GPMC-GDVs was as follows: 0.4 mg/mL GDVs was slowly dripped into GPMC solution with equal volume of Mel containing 2 mg/mL and incubated at

收稿日期: 2018-05-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81503259); 江苏省自然科学基金资助项目 (BK20151002); 中国科协青年人才托举工程项目 (CACM-2017-QNC1-01); 江苏省研究生科研与实践创新计划项目 (KYLX16_1158); 江苏高校优势学科建设工程项目

作者简介: 张 蕾, 女, 硕士研究生, 研究方向为中药新剂型与新技术。Tel: (025)85811230 E-mail: da_pupu@163.com

*通信作者 乔宏志, 博士, 副教授。Tel: 15151855306 E-mail: qiaohz@njucm.edu.cn

狄留庆, 教授, 博士生导师。Tel: (025)85811230 E-mail: diliuqing@hotmail.com

room temperature for 30 min. As-prepared GPMC-GDVs had good stability in PBS, DMEM, and 10% FBS. The results of MTT method showed that GPMC-GDVs had a better tumor inhibitive effect. **Conclusion** By extracting the components of grape GP and GDVs and reorganizing the structures, the vesicles can be prepared for the loading of active melittin, which has a good application prospect in the field of delivery and anti-tumor effect of polypeptide drugs.

Key words: grape polyphenols; melittin; vesicles; nanoscale delivery; antitumor; synergistic effect

葡萄 *Vitis vinifera* L. 是葡萄科 (Vitaceae) 落叶木质藤本植物葡萄的果实, 是世界上起源最古老的果树树种之一。千百年来, 葡萄因其具有较高的药用价值和营养价值而受到人们的青睐, 被认为是一种具有“治愈能力”的水果^[1]。《本草纲目》记载“葡萄主治筋骨湿痹, 益气倍力强志, 令人肥健。耐饥忍风寒。久食, 轻身不老延年。可作酒。逐水, 利小便, 除肠间气, 调中治淋。时气痘疮不出, 食之, 或研酒饮, 甚效^[2]。”现代研究发现葡萄具有抗氧化、调血脂、修复肝损伤、增强机体免疫等功能^[3-5]。

葡萄中所含成分既包括脂质、糖类等初生代谢产物, 还包含一些次生代谢产物, 如多酚等^[6]。葡萄多酚 (grape polyphenols, GP) 易被氧化成醌式结构而具有较强的抗氧化、抗炎能力, 为葡萄中含量最为丰富的活性成分, 主要存在于葡萄皮与籽中^[7-8]。现代研究证实 GP 具有明显的抗肿瘤作用, 其作用途径主要包括诱导肿瘤细胞凋亡、使细胞周期阻滞、降低基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMP) 活性进而抑制肿瘤转移以及增强机体免疫功能等^[9-14]。除了小分子成分, 葡萄中还含有大量的生物大分子物质。研究发现, 葡萄果肉中存在大量的由脂质等构成的囊泡结构 (grape-derived vesicles, GDVs), 这些结构可能是细胞内外物质和信息交换的主要媒介^[6,15]。限于多酚和囊泡在葡萄中分布的异域性, 本课题组设想将 GP 和 GDVs 分别提取后进行重组, 能更高效地实现有效物质的汇聚与运输。另外, 多酚具有很强的蛋白/多肽沉淀作用^[16], 有利于二者结构的稳定和功能的固化。

本课题组前期通过制备茶多酚和蜂毒肽 (melittin, Mel) 复合物, 成功构建了纳米药物共传递系统, 表现出显著的抗肿瘤特性^[17]。受此鼓舞, 本实验仍以 Mel 作为模型药物, 利用其与 GP 的聚集性质和囊泡的负载能力, 构建载多肽的葡萄重组囊泡 (GPMC-GDVs), 筛选优化制备过程涉及的多项工艺条件和载药技术, 创新动物多肽类药物的递送方式, 为解决毒肽药物的毒副作用和成药性难题提供可借鉴的制剂学参考。

1 仪器与材料

JA-SERIES 分析天平, 常州市幸运电子有限公司; B11-3 恒温磁力搅拌器, 上海司乐仪器有限公司; Lambda 35 紫外-可见分光光度计, 美国 PerkinElmer 公司; IKARV8 旋蒸仪, 南京大卫仪器设备有限公司; WJE2802D 榨汁机, 美的集团有限公司; Nano ZS90 激光粒度仪, 英国 Malvern 公司; Optima TM XPN 超速离心机, 美国 Beckman Coulter 公司; MCO-15AC 细胞培养箱, 日本 Sanyo 公司; Sorvall ST 16R 离心机、Varioskan Flash 酶标仪, 美国 Thermo 公司。

巨峰葡萄, 南京苏果超市, 经南京中医药大学药学院鉴定教研室邹立思实验师鉴定为葡萄科植物巨峰葡萄 *Vitis vinifera* cv. Kyoho 的果实; Mel, 批号 201505001, 质量分数 >98%, 上海吉尔生化有限公司; 没食子酸对照品, 批号 JBZ-0431, 质量分数 ≥98%; 无水乙醇、无水碳酸钠, 分析纯, 国药集团化学试剂有限公司; 福林-酚, 质量分数 99%; D101、AB-8、XAD-7Hp、NKA-9 大孔树脂, 上海源叶生物科技有限公司; 噻唑蓝 (MTT), 质量分数 >98%, 南京生兴生物有限公司; 胎牛血清, 美国 Gibco 公司; 1640 培养基、PBS, 美国 Hyclone 公司; 二甲基亚砜 (DMSO), 美国 Amreso 公司。

人肝癌细胞系 SMMC-7721 及 HepG2 细胞均购于中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。

2 方法与结果

2.1 GP 含量测定

2.1.1 对照品溶液配制 取没食子酸对照品 5 mg, 精密称定, 置于 50 mL 量瓶中, 去离子水定容至刻度, 摇匀, 得到质量浓度为 0.1 mg/mL 的没食子酸对照品溶液, -4 °C 保存备用。

2.1.2 供试品溶液配制 精密称取 GP 粗提物 2 mg, 置于 100 mL 量瓶中, 去离子水定容至刻度, 超声溶解, 放冷, 滤过即得, -4 °C 保存备用。

2.1.3 显色方法 采用福林-酚 (Folin-phenol) 法^[18]进行显色, 取待测液 1 mL 于 10 mL 量瓶中, 依次加入 3 mL 去离子水, 1.5 mL 福林-酚试剂, 混匀, 5 min 内加入 3 mL 20% 碳酸钠溶液, 去离子水定容

至 10 mL, 室温于暗处静置 2 h。1 mL 去离子水替代供试品溶液按上述方法配制空白溶液。

2.1.4 测定波长的选择 取稀释 10 倍后的没食子酸对照品溶液 1 mL 于 10 mL 量瓶中, 按照“2.1.3”项下方法显色, 以空白试剂作为参比, 紫外-可见分光光度计进行 200~800 nm 全波长扫描, 测得最大吸收波长为 760 nm。

2.1.5 线性范围考察 分别吸取没食子酸对照品溶液 0.25、0.5、0.75、1.25、2.0 mL 于 25 mL 棕色量瓶中, 去离子水定容至刻度。按照“2.1.3”项下方法显色, 于 760 nm 处测定吸光度 (A) 值, 每个样品平行测 3 次, 以没食子酸质量浓度为横坐标 (X), A 值为纵坐标 (Y) 绘制标准曲线。结果显示没食子酸在 0.001~0.008 mg/mL 与 A 值呈现良好的线性关系, 回归方程为 $Y=111.83 X+0.011 5$, $r^2=0.999 5$ 。

2.1.6 精密度试验 精密称取适量 GP 粗提物, 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 再按照“2.1.3”项下方法显色, 于 760 nm 处连续测定 6 次, 记录 A 值, 计算 RSD 值为 0.98%, 表明该条件下仪器精密度良好。

2.1.7 稳定性试验 精密称取适量 GP 粗提物, 按照“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.1.3”项下方法显色, 分别在不同时间点 0、1、2、4、6 h 测定 A 值, 计算 RSD 值为 1.95%, 表明供试品溶液在 6 h 内稳定。

2.1.8 重复性试验 精密称取 GP 粗提物 6 份, 按照“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.1.3”项下方法显色, 于 760 nm 处测定 A 值, 计算 GP 含量的 RSD 为 1.87%, 表明该方法重复性良好。

2.1.9 加样回收率试验 精密称取 6 份已测定的 GP 粗提物, 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 分别加入适量 0.1 mg/mL 没食子酸对照品溶液, 再按照“2.1.3”项下方法显色, 测定 A 值, 计算加样回收率。结果显示, 测得的平均回收率为 98.91%, RSD 为 2.57%, 表明方法回收率良好。

2.2 GP 提取工艺研究

2.2.1 葡萄处理 手动剥取葡萄皮与籽, 冷冻干燥, 粉碎备用。

2.2.2 单因素实验考察 准确称取葡萄皮与籽粉末 (质量比为 5:1) 5.00 g, 采用乙醇溶液提取多酚, 分别对乙醇体积分数、料液比、提取温度、提取时间、提取次数进行单因素考察。多酚提取率用 760 nm 处 A 值表示, 其 A 值检测按照“2.1.3”项下方

法测定。结果显示 GP 提取工艺为乙醇体积分数 60%, 料液比 1:10, 提取温度 45 °C, 提取 2 次, 每次提取 60 min。

2.2.3 正交试验考察 为了综合考察多种因素对 GP 提取效率的影响, 在单因素考察结果的基础上, 选择 4 因素 3 水平的正交试验分析优化 GP 提取工艺。以多酚质量分数为指标, 提取温度 (A)、提取时间 (B)、料液比 (C)、提取次数 (D) 为考察因素, 采用 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验, 因素水平表与正交结果见表 1, 方差分析结果见表 2。

表 1 $L_9(3^4)$ 正交试验设计与结果分析

Table 1 Results of orthogonal experimental design

试验号	A/°C	B/min	C	D	GP/%
1	40 (1)	50 (1)	1:8 (1)	1 (1)	19.91
2	40 (1)	60 (2)	1:10 (2)	2 (2)	21.99
3	40 (1)	70 (3)	1:12 (3)	3 (3)	18.89
4	45 (2)	50 (1)	1:10 (2)	3 (3)	23.09
5	45 (2)	60 (2)	1:12 (3)	1 (1)	20.54
6	45 (2)	70 (3)	1:8 (1)	2 (2)	20.94
7	50 (3)	50 (1)	1:12 (3)	2 (2)	25.76
8	50 (3)	60 (2)	1:8 (1)	3 (3)	24.98
9	50 (3)	70 (3)	1:10 (2)	1 (1)	25.87
K_1	60.79	68.76	65.83	66.32	
K_2	64.57	67.51	70.95	68.69	
K_3	76.61	65.70	65.19	66.96	
R	15.82	3.06	5.76	2.37	

表 2 方差分析

Table 2 Variance analysis

因素	离差平方和	自由度	F 值	显著性
A	45.502 5	2	45.404 6	$P<0.05$
B	1.578 0	2	1.574 6	
C	6.644 6	2	6.630 3	
D	1.002 2	2	1.000 0	

$F_{0.05}(2, 2)=19.00$ $F_{0.01}(2, 2)=99.00$

根据正交试验结果可知, $A_3B_1C_2D_2$ 组合对 GP 的提取效率最高, 即以 60%乙醇溶剂, 以 1:10 的料液比, 在 50 °C 条件下, 提取 50 min, 提取 2 次。方差分析可知, 4 种因素对 GP 提取效率的影响程度依次为 $A>C>B>D$, 即提取温度对 GP 提取效率的影响最大, 其次是料液比, 提取时间和提取次数影响最小。

2.2.4 验证试验 称取葡萄皮与籽粉末 3 份, 按正

交法确立的提取工艺进行验证,得到 GP 粗提物,测定粗提取物中多酚的含量。结果显示多酚平均含量为 25.15%, RSD 为 2.28%。该工艺条件稳定,能够用于 GP 的提取。

2.3 GP 纯化工艺研究

2.3.1 树脂筛选 利用大孔树脂对化学成分的吸附可逆性能选择最佳的树脂型号^[19]。称取 4 种树脂各 5.0 g 于具塞三角瓶中,加入 100 mL 质量浓度为 4 mg/mL GP 粗提液,室温下吸附 12 h,滤过,滤液于 760 nm 处测定 *A* 值。树脂加入到体积为 100 mL,体积分数为 80%乙醇溶液中,于室温下解吸 12 h,滤过,检测解析液 *A* 值。结果 AB-8 的吸附率为 80.82%,解吸率为 74.45%; D101 的吸附率为 79.03%,解吸率为 75.21%; NKA-9 的吸附率为 67.05%,解吸率为 61.08%; XAD-7Hp 的吸附率为 89.50%,解吸率为 81.31%。对多酚吸附解析性能都高的树脂为最佳选择,不仅有较高的吸附量,而且能够最大程度上回收多酚类成分。XAD-7Hp 型树脂不论是吸附率还是解吸率均最高,因此选取 XAD-7Hp 型树脂用于后续多酚纯化的工艺参数研究。

2.3.2 上样量 称取 XAD-7Hp 树脂 20.0 g,湿法装柱,以多酚质量浓度为 4 mg/mL 的 GP 粗提液上样,体积流量控制在 1 BV/h,每 1 BV 收集 1 份流出液,测每份流出液中含有的 GP 含量,制备泄漏曲线。由图 1 可知,在上样 7 BV 后,测得的流出液中多酚的质量浓度趋向于稳定,由此可知树脂对多酚的吸附能力接近饱和,若继续上样,多酚的吸附量基本不再增加。因此上样量定为 7 BV。

2.3.3 水洗量 称取 XAD-7Hp 树脂 20.0 g,湿法装柱,以多酚质量浓度为 4 mg/mL 体积为 70 mL 的 GP 粗提液上样,体积流量为 1 BV/h,收集流出液。去离子水淋洗,体积流量为 1 BV/h,每 1 BV 作为 1 份流出液,测每份流出液中含有的 GP 含量,制

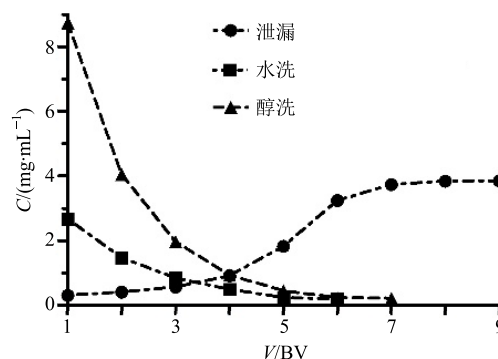


图 1 XAD-7Hp 树脂泄漏、水洗、醇洗脱曲线

Fig. 1 Curves of leaking, washing, and alcohol elution of XAD-7Hp resin

备水洗曲线。由图 1 可知,水洗量 5 BV 后,测得的流出液中多酚的质量浓度趋向于稳定,说明未完全吸附的样品此时已被基本淋洗下来,因此将水洗量定为 5 BV。

2.3.4 乙醇体积分数 称取 XAD-7Hp 树脂 20.0 g,湿法装柱,以多酚质量浓度为 4 mg/mL 体积为 70 mL 的 GP 粗提液上样,体积流量为 1 BV/h,收集流出液。50 mL 去离子水淋洗,收集水洗液。分别用 50 mL 体积分数为 20%、30%、50%、60%、70%、80%的乙醇洗脱,体积流量为 1 BV/h,收集醇洗脱液,测每份流出液中 GP 的含量。由表 3 可知,60%~70%乙醇洗脱效果最好,回收率最高。考虑成本因素,选择 60%乙醇作为洗脱液。

2.3.5 乙醇用量 称取 XAD-7Hp 树脂 20.0 g,湿法装柱,以多酚质量浓度为 4 mg/mL 体积为 70 mL 的 GP 粗提液进行上样,体积流量为 1 BV/h,收集流出液。50 mL 去离子水淋洗,收集水洗液。采用 60%的乙醇作为洗脱液进行洗脱,体积流量为 1 BV/h,测定流出液中葡萄总酚含量,绘制洗脱曲线。由图 1 可知,乙醇用量达到 5 BV 后,吸附的多酚已经基本被洗脱。考虑经济性和时效性,将洗脱乙醇用量

表 3 乙醇体积分数选择

Table 3 Ethanol concentration selection

乙醇/%	流出量/mg	水洗量/mg	吸附量/mg	醇洗脱量/mg	样品洗脱率/%	样品回收率/%	5 mL 洗脱质量/mg	多酚/%
20	79.81	46.01	154.18	108.31	70.25	38.68	26.64	40.66
40	70.17	46.37	163.47	127.76	78.16	45.63	27.09	47.16
50	73.17	46.37	160.46	134.02	83.52	47.86	26.39	50.78
60	74.30	42.16	163.54	140.28	85.78	50.10	26.61	52.72
70	77.30	42.97	159.73	138.72	86.84	49.54	25.96	53.43
80	84.82	38.41	156.78	137.60	87.77	49.14	27.57	59.91

定为 5 BV。

2.3.6 验证试验 称取 3 份 XAD-7Hp 树脂 20.0 g, 湿法装柱, 以多酚质量浓度为 4 mg/mL 的 70 mL GP 粗提液上样, 体积流量为 1 BV/h, 收集流出液。50 mL 去离子水淋洗, 收集水洗液。用体积分数为 60% 乙醇洗脱 5 BV, 体积流量为 1 BV/h, 收集洗脱液浓缩, 减压干燥, 得到干浸膏, 研磨得到 GP 提取物粉末。各称取 3 份葡萄提取物粉末, 福林-酚法测定 *A* 值。结果显示, 3 份样品中多酚质量分数均值为 54.03%, 相较于 GP 粗提液, 多酚含量提升了 1 倍, 所得 GP 的纯化工艺较为稳定。

2.4 GDVs 提取工艺

取“2.2.1”项下葡萄去籽和皮之后的果肉投入榨汁机榨取果汁。取出葡萄果汁, 倒入等体积的 PBS (pH 7.4), 混匀。将葡萄果汁与 PBS 混合液, 4 000×*g* 离心 1 h, 取上层清液, 继续 10 000×*g* 离心 1 h。上清倒入超速离心管, 以 150 000×*g* 超速离心 2 h。取下层沉淀加入 40 mL PBS 混悬超声分散均匀, 将混悬液转移至蔗糖密度梯度 (8%、30%、45%、60%) 溶液中, 150 000×*g* 超速离心 2 h, 收集 8%/30% 和 30%/45% 界面间的沉降带, 加入 PBS 超滤离心洗去蔗糖, 即为 GDVs, 冻干, -20 °C 保存备用。所得 GDVs 粒径为 (155.09±3.03) nm, 电位为 (-24.51±1.43) mV, 多分散系数 (PDI) 为 0.211±0.040。

2.5 GPMC-GDVs 制备工艺研究

2.5.1 GP 与 Mel (GPMC) 复合工艺研究 采用正交设计优选 GPMC 的复合工艺。称取 GP 提取物与 Mel 分别溶于 pH 值为 4.5、6.5、7.4 的 PBS 缓冲溶液中, 将不同质量浓度的 GP 溶液 (0.5、1.0、2.0 mg/mL) 1 mL 缓慢滴入到等体积 1.0 mg/mL 的 Mel 溶液中, 于 25、37、50 °C 的温度下孵育 0.5 h, 测定粒径。因素水平表与正交结果见表 4 (A、B、C 分别代表 GP 与 Mel 质量比、pH 值、孵育温度), 方差分析结果见表 5。

由表 4 可知, 3 个因素对复合工艺的影响程度依次为 GP 与 Mel 的复合比例>孵育温度>pH 值。当保持 Mel 质量浓度不变时, 随着 GP 量增加, GPMC 粒径呈先不变后增加的趋势, 可能是过量 GP 使复合物聚集。温度在低于 37 °C 条件下, 复合物粒径变化不明显, 而温度升至 50 °C 时, 粒径增大。此外, 粒径在 3 种 pH 值条件下没有明显变化。综合分析, 将 GPMC 的制备工艺定为室温下, 将

表 4 $L_9(3^4)$ 正交试验设计与结果分析

试验号	A	B	C/°C	D (空白)	粒径/nm
1	0.5 (1)	4.5 (1)	25 (1)	(1)	96.13
2	0.5 (1)	6.5 (2)	37 (2)	(2)	100.06
3	0.5 (1)	7.4 (3)	50 (3)	(3)	139.26
4	1.0 (2)	4.5 (1)	37 (2)	(3)	48.46
5	1.0 (2)	6.5 (2)	50 (3)	(1)	78.17
6	1.0 (2)	7.4 (3)	25 (1)	(2)	46.47
7	2.0 (3)	4.5 (1)	50 (3)	(2)	73.00
8	2.0 (3)	6.5 (2)	25 (1)	(3)	46.69
9	2.0 (3)	7.4 (3)	37 (2)	(1)	50.14
K_1	335.45	217.59	189.29	224.44	
K_2	173.10	224.92	198.66	219.53	
K_3	169.83	235.87	290.43	234.41	
<i>R</i>	165.62	18.28	101.14	14.88	

表 5 方差分析

误差来源	离差平方和	自由度	<i>F</i> 值	显著性
A	5 977.577 8	2	155.971 4	$P<0.01$
B	56.421 1	2	1.472 2	
C	2 082.092 2	2	54.327 5	$P<0.05$
D (误差)	38.324 8	2		

$F_{0.05}(2, 2)=19.00$ $F_{0.01}(2, 2)=99.00$

GP 溶液缓慢滴加到等体积相同质量浓度的 Mel 溶液中, 孵育 0.5 h。

2.5.2 GPMC-GDVs 的制备工艺研究 室温条件下, 取适量质量浓度 (0、2、4、10、20 mg/mL) 的 GP 溶液 5 mL 在不断搅拌下缓慢滴入等体积相同质量浓度的 Mel 溶液中, 孵育 0.5 h。将 5 mL 质量浓度为 0.4 mg/mL 的 GDVs 溶液缓慢滴入上述一系列含不同质量浓度 GP 的 GPMC 溶液中, 室温搅拌 0.5 h, 以粒径为指标考察 GDVs 与 GPMC 的最佳比例。

结果由表 6 可知, 随着 GPMC (以 Mel 质量计) 与 GDVs 比例的增加, GPMC-GDVs 粒径逐渐增大, 电位逐渐升高, 显示复合比例的变化对粒子的电荷及粒子间作用力有较大影响, 当比例大于 5:1 时, 粒径均大于 200 nm。目前临床上已批准的纳米粒径在 100~200 nm^[20], 粒径过大会增加肝脾对粒子的摄取, 不利于其在肿瘤部位的富集和渗透^[21], 影响治疗效果。因此, 确定的 GPMC-GDVs 制备条件为室温下, 将 0.4 mg/mL GDVs 缓慢滴入等体积含

表 6 GPMC (以 Mel 质量计) 与 GDVs 质量比对制剂粒径、电位和 PDI 影响

Table 6 Particle size, zeta potential, and PDI of GPMC-GDVs prepared by different mass ratio of GPMC (Mel mass) and GDVs

GPMC 与 GDVs 比例	粒径/nm	电位/mV	PDI
0 : 1	155.09±3.03	-24.51±1.43	0.211±0.04
2.5 : 1	168.93±7.55	-20.29±1.22	0.203±0.02
5 : 1	192.42±2.36	-16.83±2.24	0.207±0.03
12.5 : 1	246.47±7.41	-13.69±0.88	0.284±0.11
25 : 1	272.11±12.84	-12.13±2.13	0.313±0.05

Mel 2 mg/mL 的 GPMC 溶液中, 孵育 0.5 h。GPMC-GDVs 粒径为 (192.42 ± 2.36) nm, 多分散系数(PDI)为 0.207 ± 0.030 , 表面 Zeta 电荷为 (-16.83 ± 2.24) mV。

2.6 GPMC-GDVs 稳定性研究

取 1 mL GPMC-GDVs 与 1 mL PBS、DMEM、10%血清混合, 37 °C 孵育 0、2、4、8、12、24、48 h, 粒径仪测定粒径。结果见图 2, 在 48 h 内, GPMC-GDVs 在 3 种体系中粒径均无明显变化, 说明其在血液及在细胞培养环境下均能保持结构稳定, 不会产生聚集沉淀。

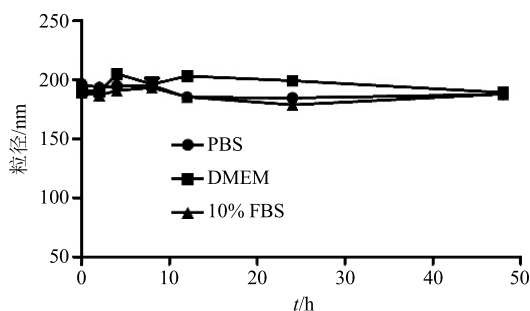


图 2 GPMC-GDVs 在 PBS、DMEM 和 10% FBS 中的稳定性

Fig. 2 GPMC-GDVs stability in PBS, DMEM, and 10% FBS

2.7 抗细胞增殖研究

取对数生长期的 SMMC-7721 或 HepG 2 细胞以 1×10^4 /孔密度接种于 96 孔细胞培养板, 于细胞培养箱中培养 12 h, 移去 1640 细胞培养基, 加入不同质量浓度 Mel、GP、GPMC、GPMC-GDVs 及空白 GDVs 的不完全培养基 200 μ L (GPMC 中 GP 与 Mel 质量比为 1 : 1, GPMC-GDVs 中 GDVs 与 Mel 的质量比为 1 : 5), 细胞随后置于培养箱中孵育 24 h, 吸去含药培养基, 加入 200 μ L PBS 清洗 1 次, 加入

200 μ L 含有 MTT 的 1640 不完全培养基, 37 °C 孵育 4 h, 小心吸弃培养基, 加入 150 μ L 的 DMSO, 摇匀, 于 570 nm 处测定 A 值。

利用协同系数 (CI)^[22] 评价 GP 与 Mel 的协同程度, $CI = D_1/D_{m1} + D_2/D_{m2}$, 式中 D_1 和 D_2 分别是联合给药达到影响分数 (fraction affected, F_a) 抑制率时 GP 和 Mel 的质量浓度, D_{m1} 和 D_{m2} 分别是单独给药达到 F_a 抑制率时 GP 和 Mel 的质量浓度。当 $CI < 1$ 时, 表示两药有协同作用; 当 $CI = 1$ 时, 表示最终的作用为两药加和效应; 当 $CI > 1$ 时, 表示两药有拮抗作用^[23]。

由图 3 可知, 对于不同质量浓度 GDVs, 2 种细胞存活率都在 95% 以上, 表明 GDVs 对 2 种细胞的毒性均较低, 适合作为药物的递送载体。GPMC-GDVs 对 2 种细胞的 IC_{50} 分别为 7.74、10.70 μ g/mL (Mel 质量浓度), 不论 SMMC-7721 或 HepG2 细胞, GPMC-GDVs 都表现出优于 Mel 和 GP 的抗肿瘤增殖活性。通过计算 GP 和 Mel 的 CI, 当达到 50% 抑制率时, 对于 SMMC-7721 和 HepG2 细胞, GPMC 的 CI 分别为 0.93 和 1.06, 接近于 1, 表明 GPMC 对 2 种细胞的毒性仅是加和效应, 而 GPMC-GDVs 的 CI 分别为 0.56 和 0.57, 小于 1, 表明在 GPMC-GDVs 中 GP 和 Mel 起到协同抗肿瘤的作用, 这可

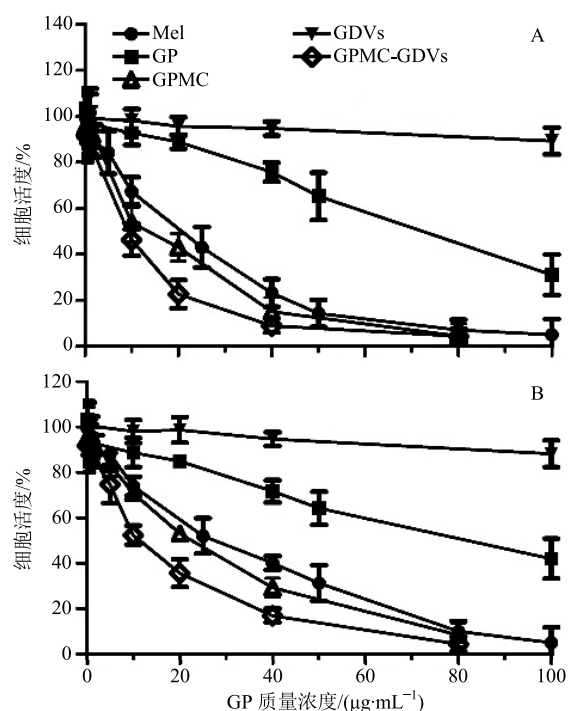


图 3 各制剂对 SMMC-7721 (A) 和 HepG2 (B) 细胞的毒性
Fig. 3 Toxicity of each preparation on SMMC-7721 (A) and HepG2 cells (B)

能是与 GDVs 负载后,制剂的稳定性增加,同时增加细胞对制剂的摄取有关。

3 讨论

基于多酚和囊泡在葡萄中分布的异域性,本研究首先分离出葡萄皮与葡萄籽中的 GP 以及葡萄果肉中的 GDVs 组分,并利用多酚对多肽的聚集作用和囊泡的负载能力,重组构建载蜂毒肽的葡萄囊泡 GPMC-GDVs,实现葡萄多组分的汇聚和功能集成。制备的 GPMC-GDVs 分布均匀,稳定性良好。体外细胞毒性试验研究表明葡萄功能囊泡与蜂毒肽联合使用时具有更好的肿瘤抑制作用。

毒性多肽是很多动物类中药,如全蝎、蜈蚣、水蛭等的主要活性成分,这些动物药常被应用于临床抗肿瘤的组方和治疗,并被现代医学确证其抗肿瘤机制,具备很强的新药开发价值。然而,多肽类成分体内稳定性差,血中半衰期较短,用药后短时间内就被清除或降解,需要频繁给药才能达到治疗剂量,给临床治疗带来诸多不便^[24-25]。此外,其较强的溶血性、免疫原性和非选择性细胞毒性存在较大的毒副作用风险^[26],限制了其进一步开发应用。本课题组前期利用中药鞣质能聚集蛋白的性质,开发出多酚-蜂毒肽复合物,能明显改善多肽的稳定性,有效屏蔽表面正电荷,降低细胞毒性,同时表现出较好的协同抗肿瘤效果^[27]。本实验在此基础上,将空间异域的葡萄多酚和囊泡组分整合重构,同时完成了毒性多肽的复合和纳米化装载,制备的类脂质结构在载药性能和药效发挥方面均呈现良好的操作性和优势,具有较好的研究价值。

参考文献

- [1] Kar P, Laight D, Shaw K M, *et al.* Flavonoid-rich grapeseed extracts: A new approach in high cardiovascular risk patients? [J]. *Int J Clin Pract*, 2006, 60(11): 1484-1492.
- [2] 杨友谊. 明以前中西交流中的葡萄研究 [D]. 广州: 暨南大学, 2006.
- [3] 徐莉, 李盛钰, 李宜平. 葡萄籽化学和药理学研究进展 [J]. *吉林中医药*, 2002, 22(1): 61-63.
- [4] Haminiuk C W I, Maciel G M, Plata-Oviedo M S V, *et al.* Phenolic compounds in fruits-an overview [J]. *Int J Food Sci Tech*, 2012, 47(10): 2023-2044.
- [5] Garavaglia J, Markoski M M, Oliveira A, *et al.* Grape seed oil compounds: Biological and chemical actions for health [J]. *Nutr Metab Insights*, 2016, 9(9): 59-64.
- [6] Soleti R, Andriantsitohaina R, Martinez M C. Impact of polyphenols on extracellular vesicle levels and effects and their properties as tools for drug delivery for nutrition and health [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2018, 644: 57-63.
- [7] Xia E Q, Deng G F, Guo Y J, *et al.* Biological activities of polyphenols from grapes [J]. *Int J Mol Sci*, 2010, 11(2): 622-646.
- [8] Eghbaliferiz S, Iranshahi M. Prooxidant activity of polyphenols, flavonoids, anthocyanins and carotenoids: Updated review of mechanisms and catalyzing metals [J]. *Phytother Res*, 2016, 30(9): 1379-1391.
- [9] 吕昕泽, 吴秀祯, 张卫. 葡萄多酚对心肌保护作用研究进展 [J]. *药物评价研究*, 2012, 35(1): 16-52.
- [10] Nassiri-Asl M, Hosseinzadeh H. Review of the pharmacological effects of *Vitis vinifera* (grape) and its bioactive constituents: An update [J]. *Phytother Res*, 2016, 30(9): 1392-1403.
- [11] Estrela J M, Mena S, Obrador E, *et al.* Polyphenolic phytochemicals in cancer prevention and therapy: Bioavailability versus bioefficacy [J]. *J Med Chem*, 2017, 60(23): 9413-9436.
- [12] Calabriso N, Massaro M, Scoditti E, *et al.* Red grape skin polyphenols blunt matrix metalloproteinase-2 and-9 activity and expression in cell models of vascular inflammation: Protective role in degenerative and inflammatory diseases [J]. *Molecules*, 2016, 21(9): 1-18.
- [13] Hu B, Liu X X, Zhang C L, *et al.* Food macromolecule based nanodelivery systems for enhancing the bioavailability of polyphenols [J]. *J Food Drug Anal*, 2017, 25(1): 3-15.
- [14] 卢晓霆, 许中畅, 王田田, 等. 玉米多孔淀粉-海藻酸钠-壳聚糖-葡萄多酚缓释微胶囊的制备及表征 [J]. *中草药*, 2016, 47(13): 2252-2259.
- [15] 王晓华. 植物细胞物质转运中分泌囊泡动态和胞间连丝组成蛋白的细胞分子生物学研究 [D]. 北京: 中国科学院大学, 2011.
- [16] 刘夫国, 马翠翠, 王迪, 等. 蛋白质与多酚相互作用研究进展 [J]. *食品与发酵工业*, 2016, 42(2): 282-288.
- [17] 方栋, 张蕾, 孙娟, 等. “药辅合一”茶多酚-蜂毒肽纳米复合物的制备及抗肿瘤研究 [J]. *中草药*, 2017, 48(16): 3300-3307.
- [18] 贾荣. 山葡萄籽多酚提取物及抗氧化活性的研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2010.
- [19] 陈岗. 橄榄中多酚类物质的分离纯化及功能性研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2009.
- [20] Tang L, Yang X, Yin Q, *et al.* Investigating the optimal

- size of anticancer nanomedicine [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(43): 15344-15349.
- [21] Wang J, Mao W, Lock L L, *et al.* The role of micelle size in tumor accumulation, penetration, and treatment [J]. *ACS Nano*, 2015, 9(7): 7195-7206.
- [22] Chou T C, Motzer R J, Tong Y, *et al.* Computerized quantitation of synergism and antagonism of taxol, topotecan, and cisplatin against human teratocarcinoma cell growth: A rational approach to clinical protocol design [J]. *J Natl Cancer Inst*, 1994, 86(20): 1517-1524.
- [23] Meyer M, Philipp A, Oskuee R, *et al.* Breathing life into polycations: Functionalization with pH-responsive endosomolytic peptides and polyethylene glycol enables siRNA delivery [J]. *J Am Chem Soc*, 2008, 130(11): 3272-3273.
- [24] 方宏清. 多肽类药物制剂研究现状 [J]. 药学进展, 1998, 22(1): 18-23.
- [25] 姚金凤, 白露, 宋亚芳. 多肽类药物代谢研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2013, 29(7): 895-899.
- [26] 侯春生, 郭丽琼, 王建荣, 等. 蜂毒溶血肽及蜂毒主要功能成分研究进展 [J]. 中国生化药物杂志, 2012, 33(5): 682-685.
- [27] Qiao H Z, Fang D, Zhang L, *et al.* Nanostructured peptidotoxins as natural pro-oxidants induced cancer cell death via amplification of oxidative stress [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2018, 10(5): 4569-4581.