

张韵晨,方旭波,李莹,等. 铁蛋白-AHLL 纳米颗粒的稳定性及肠吸收研究[J]. 江苏农业科学,2021,49(20):194-200.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.20.031

铁蛋白-AHLL 纳米颗粒的稳定性及肠吸收研究

张韵晨^{1,2}, 方旭波¹, 李莹², 夏伟荣¹, 柴智², 冯进², 陈小娥¹

(1. 浙江海洋大学食品与药学院, 浙江舟山 316022; 2. 江苏省农业科学院农产品加工研究所, 江苏南京 210014)

摘要:使用马脾铁蛋白包封降血压活性肽 AHLL, 通过紫外、荧光和圆二光谱研究 AHLL 荷载对 HSF 结构的影响。在此基础上, 研究铁蛋白包封对 AHLL 稳定性以及体外胃肠道消化过程中血管紧张素转化酶 (ACE) 抑制活性的影响作用, 并开展复合纳米颗粒 (HSF-AHLL) 的细胞转运试验。结果表明, AHLL 载运显著降低了 HSF 的 α -螺旋结构和 β -转角结构, 而 β -折叠结构含量和无规卷曲含量增加, 另外, 包埋后 HSF 四重轴通道上的色氨酸微环境被改变。HSF-AHLL 的热稳定性、pH 稳定性和紫外稳定性明显高于游离 AHLL。在模拟胃消化过程中, 结合态与游离态 AHLL 的 ACE 抑制活性在胃液中下降明显, 而在肠液中变化不明显。HSF-AHLL 在 Caco-2 细胞上的转运试验具有一定方向性。吸收 (AP \rightarrow BL) 大于外排 (BL \rightarrow AP), HSF-AHLL 在 Caco-2 细胞单层膜上以细胞旁路转运为主, 内吞抑制剂和肽载体抑制剂对 HSF-AHLL 的转运没有明显影响, 而脱氧胆酸钠能打开细胞间通路促进其转运; HSF-AHLL 的转运与多药耐药蛋白抑制剂形成竞争性抑制, HSF-AHLL 的转运对温度具有一定的依赖性, 属于能量依赖型转运。

关键词:马脾脱铁铁蛋白, 血管紧张素转化酶抑制肽; 纳米粒; Caco-2 细胞模型; 转运

中图分类号:S188 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2021)20-0194-07

本试验所用的 ACE 抑制肽 AHLL 在前期的研究中已证明发现它可以有效抑制 ACE 活性, 在原发性高血压大鼠上具有一定降血压效果^[1]。但由于 AHLL 较不稳定, 容易被消化道里的胃蛋白酶、胰蛋

白酶降解, 从而影响 ACE 的抑制活性^[2], 机体对活性肽 AHLL 的吸收随之也受到影响。铁蛋白结构中 包含氢键、盐桥和疏水作用力^[3], 但是, 单独用作纳米载体时易受外界环境、pH 值和温度变化等影响。以往对铁蛋白的研究中, 它作为纳米载体对铁蛋白表面进行修饰, 利用其特有的结构广泛应用在材料学、纳米学^[4-5]等方面, 铁蛋白经过脱铁处理后可包裹特定的活性负载物并对活性负载物起到靶向输送的作用, 这一方法已经在生物医药领域得到应用^[6]。铁蛋白脱铁后变化为特殊的空腔结构, 小分子物质可以通过自由扩散的形式进入空腔, 通过非共价键结合的作用力附和铁蛋白的空腔里。铁

收稿日期:2020-12-12

基金项目:食品科学与技术国家重点实验室开放课题(编号:SKLF-KF-201712)。

作者简介:张韵晨(1996—), 女, 新疆克拉玛依人, 硕士研究生, 研究方向为水产品加工与贮藏。E-mail:rhymezye@163.com。

通信作者:方旭波, 博士, 教授, 主要从事水产品加工与贮藏研究, E-mail:fxb70@163.com; 李莹, 博士, 副研究员, 主要从事食品营养与健康研究, E-mail:hijoly@163.com。

芦笋营养与品质的影响[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(5):84-89.

[19] 国家卫生和计划生育委员会. 食品中水分的测定:GB 5009.3—2016[S]. 北京:中国标准出版社, 2016.

[20] 姚荷, 谭亦成, 谭兴和, 等. 微波-热风联用制取笋干工艺条件优化[J]. 食品科学, 2019, 40(12):260-266.

[21] 杨慧, 王赵改, 史冠莹, 等. 烫漂时间对香椿嫩芽颜色及挥发性风味成分的影响研究[J]. 核农学报, 2017, 31(7):1339-1348.

[22] 徐明亮, 周祥, 蔡金龙, 等. 不同干燥方法对海芦笋干品质影响[J]. 食品科学, 2010(11):71-75.

[23] Kassem A S, Shokr A Z, El-Mahdy A R, et al. Comparison of drying characteristics of Thompson seedless grapes using combined microwave oven and hot air drying[J]. Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences, 2011, 10(1):33-40.

[24] Aral S, Bese A V. Convective drying of hawthorn fruit (*Crataegus* spp.): Effect of experimental parameters on drying kinetics, color, shrinkage, and rehydration capacity[J]. Food Chemistry, 2016, 210(11):577-284.

[25] 李湘利, 刘静, 侯一超, 等. 大蒜粒微波-热风联合干燥的工艺优化[J]. 食品与发酵工业, 2018, 44(11):237-244.

[26] Askari G R, Emamdjomeh Z, Mousavi S M. An investigation of the effects of drying methods and conditions on drying characteristics and quality attributes of agricultural products during hot air and hot air/microwave-assisted dehydration[J]. Drying Technology, 2009, 27(7/8):831-841.

[27] 冯寅洁, 石芳荣, 应铁进. 加工工艺和复水条件对脱水胡萝卜复水性的影响[J]. 中国食品学报, 2009, 9(4):155-160.

蛋白包埋技术已经很成熟,但由于对包载物质的分子量有要求,因此包埋率较低。铁蛋白壳具有高度保守的二级结构和三级结构,80 ℃ 高温都不能使之变性的特性,亚基之间的氢键和疏水作用力可以维持三、四级结构的稳定,运用可调控手段,使其解散又重组为铁蛋白分子纳米^[7]。蛋白载体在胃酸大环境和胃蛋白酶的作用下会被降解^[8],完整的运载体系在小肠吸收完成前就会被破坏,蛋白质载体的稳定性受到多种因素的制约。若运用多肽对蛋白载体进行修饰使其形成较稳定的复合纳米体系,能够稳定蛋白本身在不定 pH 和温度范围内的溶解性,抑制蛋白质出现大量聚集沉淀和失去稳定变性的现象^[9]。另外,在胃酸的酸性大环境下,多肽通过包埋和静电吸引作用包被于铁蛋白的内部空腔结构中,阻止胃蛋白酶对其降解,进入小肠后,蛋白载体完成有效吸收,因此多肽和蛋白质可形成双重结构,协同改善运载药物的稳定性、吸收性和生物活性的长效发挥^[10]。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

ACE 抑制肽 AHLL(纯度 >99%),上海强耀生物科技有限公司;马脾铁蛋白,美国 Sigma Aldrich 公司;MOPS 缓冲液,美国 Amresco 公司;27 mmol/L 透析袋(分子量为 14 000),美国 biosharp 公司;乙腈(分析纯),江苏汉邦公司;三氟乙酸,上海源叶生物科技有限公司;Transwell 细胞培养板(聚碳酸酯膜直径 12 mm,孔径 0.4 μm)、25 cm² 卡氏细胞培养瓶,美国 Corning 公司;维拉帕米,MK-571,氧化苯胍,脱氧胆酸钠,美国 Sigma 公司;DMEM 培养基(4.5 g/L D-葡萄糖)、胎牛血清、磷酸盐缓冲液、Hank's 平衡盐溶液,美国 Gibco 公司。

1.2 主要仪器与设备

TGL-50WS 型大容量高速离心机,巩义市宏华仪器设备工贸有限公司;FRQ 系列小型超声波清洗机,杭州法兰特超声波科技有限公司;1260Infinity 高效液相色谱仪,美国 Agilent 公司;GI20 体外模拟消化系统,澳大利亚 Nutriscan 公司;JASCO-810 圆二色谱仪,日本 JASCO 公司;Alpha-1900Plus 紫外分光光度计,上海普元仪器有限公司;F-7000 荧光分光光度计,日本 Hitachi 公司;500 型精密电子天平,意大利 BEL 公司;DK-8D 电子恒温水浴槽,上海精宏实验设备有限公司;SpectraMax M5/M5e 多

功能酶标仪,美谷分子仪器(上海)有限公司;PLUS-E2-20TJ 实验级超纯水机,南京易普易达科技发展有限公司;二氧化碳恒温培养箱,日本 SANYO 公司;BHC-1300 II A/B2 型微生物洁净安全柜,江苏净化设备有限公司;Millicell ERS-2 电阻仪,美国 Millipore 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 根据前期研究得出纳米粒的最优制备条件^[11] 准确称取 20 mg 的 AHLL 标品制得浓度为 20 mg/mL 的 AHLL 母液,放置于 4 ℃ 保存。取 2 mL 浓度为 2 μmol/L 的蛋白溶液(5 mmol/L MOPS,pH 值为 7.0),用 1 mol/L HCl 调节溶液 pH 值至 2.0,在室温环境下搅拌 20~30 min,使蛋白逐步解离成单个亚基状态,放置于磁力搅拌器上一边搅拌一边缓慢滴加 20 μL AHLL 母液(20 mg/mL),使其终浓度为 200 μg/mL,此时蛋白和 AHLL 的质量之比为 1:200。在室温环境下搅拌 20~30 min 后,用 1 mol/L NaOH 将溶液 pH 值调至 7.4 后立即放置于 4 ℃ 层析冷柜中搅拌 2 h 以上。搅拌完成后用孔径为 12 000~14 000 u 的透析袋置于 pH 值为 7.4 的 5 mmol/L MOPS 溶液里进行透析处理,以除去游离泥鳅源高活性降压肽 AHLL,透析期间每隔 4 h 换 1 次透析液,以此制得 HSF-AHLL 复合纳米粒。经检测空壳的 HSF 的粒径为 19.62 nm,粒径分布均匀。载入 ACE 抑制肽后,HSF-AHLL 纳米粒粒径增大至 28.19 nm,HSF-AHLL 和 HSF 表面都带负电荷,HSF 的电位为 -39.9 mV,HSF-AHLL 的电位约 -34 mV,载体铁蛋白浓度在 1~2 μmol/L 之间,AHLL 的终浓度在 100~200 μg/mL 范围内,可制备出包封率 20.94% 的稳定纳米粒体系。

1.3.2 圆二色谱分析 调节样品蛋白终浓度为 1.2 μg/mL,扫描波长范围为 200~280 nm,扫描温度 25 ℃,每点扫描时间 2.5 μs,样品池光程为 10 mm,扫描速率是 200 nm/min,扫描步长为 0.5 nm^[12]。平均扫描 3 次。

1.3.3 荧光光谱分析 调节纳米粒载体蛋白的终浓度为 1.2 μg/mL。激发波长为 280 nm,发射波长为 285~500 nm,激发缝 1 nm,发射狭缝 5 nm^[13]。对 AHLL、HSF-AHLL 进行全波长扫描^[14]。

1.3.4 紫外光谱测定 控制纳米粒载体的蛋白终浓度为 1.2 μg/mL。使用 UV-6300 紫外可见分光光度计对 HSF、HSF-AHLL 进行全波长扫描。

1.3.5 复合纳米粒温度稳定性的测定 将制备好的 HSF、HSF - AHLL 纳米粒溶液分别置于不同温度 (60、70、80、90、100 ℃) 的水浴锅中孵育 1 h 后取样,对照为游离的 AHLL 溶液。取样后用高效液相法测定 AHLL 的剩余含量。

1.3.6 复合纳米粒 pH 值稳定性的测定 调节 HSF、HSF - AHLL 纳米粒溶液 pH 值 (2.0、4.0、5.0、6.0、7.0、7.4、8.0),磁力搅拌 60 min 和 90 min 后,用高效液相法测定 AHLL 的剩余量。

1.3.7 复合纳米粒紫外稳定性的测定^[7] 将纳米粒溶液经紫外灯 (20 W) 照射 24 h,期间每 4 h 取样,选用游离的 AHLL 溶液作对照。用高效液相法测定 AHLL 的剩余量。

1.3.8 复合纳米粒体外模拟胃肠消化反应 模拟胃消化^[15],用盐酸 (0.1 mol/L) 将 AHLL、HSF - AHLL 溶液 pH 值调至 2.0,水浴加热至 37 ℃ 后,加入胃蛋白酶 (加量比 AHLL : 胃蛋白酶 = 1 : 20) 在 GI20 体外模拟消化系统上恒温酶解 2 h。模拟胃消化总时长 120 min,于胃消化开始后 30 min 取样,取样间隔时间 30 min,取样后立即放入沸水浴中灭酶 10 min,测定经过模拟胃消化后的 ACE 抑制活性变化。模拟肠消化^[16]:样品经过模拟胃消化 2 h 后,用 NaHCO₃ (1.0 mol/L) 调节体系的 pH 值至 7.0。继续加热至 37 ℃,加入胰蛋白酶 (加量比 AHLL : 胰蛋白酶 = 1 : 20),在 GI20 体外模拟消化系统上恒温酶解 2 h。在肠消化期间每隔 1 h 取样 1 次于沸水浴中灭酶 10 min,测定样品的 ACE 抑制活性在肠消化结束后的变化情况。

1.3.9 ACE 抑制活性测定方法^[2,11] 取 10 μL ACE 溶液和 10 μL 样品不混合地加入 96 孔板中,然后加入 150 μL 预热过的底物 (1.0 mmol/L FAPGG 溶解于 50 mmol/L Tris - HCl, pH 值为 7.5,包含 0.3 mol/L NaCl),使其开始反应。酶标仪升温至 37 ℃ 后立即放入 96 孔板,于 340 nm 检测吸光度,检测时间间隔为 1 min,检测时长为 20 min。空白对照为 10 μL 缓冲液 (50 mmol/L Tris - HCl, pH 值为 7.5,包含 0.3 mol/L NaCl)。以吸光度 ($D_{340\text{min}}$) 为横坐标,检测时间为纵坐标绘制标准曲线,取 10 ~ 20 min 的斜率计算。

$$\text{ACE 抑制率} = 1 - (D_{\text{抑制剂}} / D_{\text{空白}}) \times 100\%。$$

1.3.10 探究 HSF - AHLL 在 Caco - 2 细胞上的转运途径 当 Transwell 板上的 Caco - 2 细胞的跨膜电阻 $>600 \Omega \cdot \text{cm}^2$ 、荧光黄表观渗透系数 $P_{\text{app}} < 1.0 \times$

10^{-6} cm/s 时,可进行细胞转运试验^[7,17]。选用纳米粒 HSF - AHLL (100 - 200 μg/mL) 作为供液,HBSS (pH 值 = 7.4) 溶液作为接收液,考察 10 μmol/L Gly - Pro^[18] (肽转运载体竞争性抑制剂)、25 μmol/L 氧化苯肼 (内吞抑制剂) 和 100 μmol/L 脱氧胆酸钠^[19] (旁路转运促进剂),对 HSF - AHLL 转运途径的影响。对于 AP → BL 转运:将 0.5 mL 样品加入 AP 侧作为供给池,同时 BL 侧加入 1.5 mL 空白 HBSS 作为接收池;对于 BL → AP 的转运:将 1.5 mL 样品加入 BL 侧作为供给池,AP 侧加 0.5 mL 空白 HBSS 作为接收池,抑制剂加样量 200 μL,每次取样 150 μL,同时相应地补加 37 ℃ 150 μL 空白 HBSS 溶液,转运时长为 120 min,所有试验都 3 次平行。样品中 AHLL 含量用高效液相法测定。

1.3.11 不同外排抑制剂对 HSF - AHLL 在 Caco - 2 细胞上的转运影响 选用 100 μmol/LP - 糖蛋白抑制剂维拉帕米^[20],50 μmol/L 多药耐药蛋白转运时取 AP 侧转运液,测定转运液中的药物浓度。计算表观渗透参数 (P_{app}) 和 PDR 值。

根据以下公式计算表观渗透系数:

$$P_{\text{app}} = \Delta Q / (\Delta t \times A \times C_0) \quad (\text{cm/s})。$$

式中: ΔQ 是累积转运量,为 Δt 内的转运量,单位 mg; A 是 Transwell 膜表面积,单位 cm^2 ; C_0 为加入 Caco - 2 细胞模型的样品初始质量浓度,单位 μg/mL。

$$\text{表观渗透系数比 PDR} = P_{\text{app(BtoA)}} / P_{\text{app(AtoB)}}。$$

1.3.12 不同温度对复合纳米粒转运的影响:对于 Caco - 2 细胞的转运试验同“1.3.10”节,分别于 4、37 ℃ 培养,计算 AP → BL 和 BL → AP 的表观渗透参数 (P_{app}),分析温度对转运的影响。

2 结果与分析

2.1 HSF - AHLL 纳米粒的结构表征

2.1.1 圆二色谱分析 通过圆二色谱仪测定光谱区域范围在 200 ~ 280 nm 内的复合纳米载体的二级结构,以铁蛋白在此光谱区域的数值作对比,观察其变化情况。如图 1 - A 可观察到 HSF 和 HSF - AHLL 在 209.5 nm 和 218.5 nm 有负的肩峰谱带;复合纳米粒 HSF - AHLL 在 240 ~ 280 nm 范围内的圆二光谱曲线与铁蛋白的光谱曲线几乎重叠在一起,说明 AHLL 通过静电吸引力作用被包埋进 HSF 的空腔内形成了复合纳米粒,包埋过程对铁蛋白的二级结构没有影响,HSF - AHLL 纳米粒的圆二色谱

特征肩峰谱带^[21]在 222 nm 和 208 nm 处有出峰更能证明 HSF-AHLL 纳米粒具有 α -螺旋结构,但与铁蛋白的二级结构存在差异。

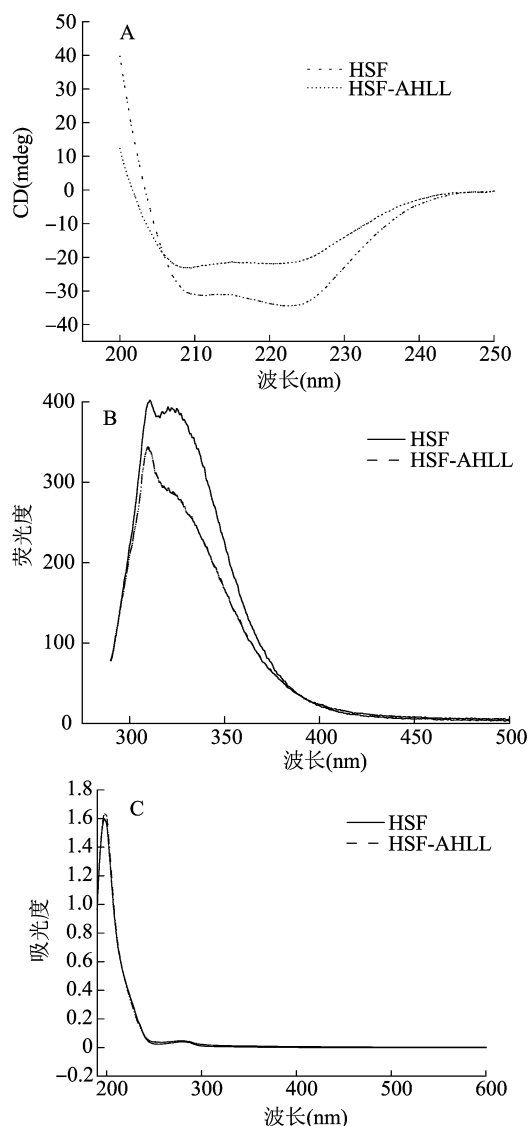


图1 HSF、HSF-AHLL 的圆二光谱(A)、荧光光谱(B)、紫外可见光吸收光谱(C)

从表 1 可知,HSF-AHLL 复合纳米粒的 α -螺旋结构和 β -转角结构含量比 HFS 有所降低,但 β -折叠结构含量和无规卷曲含量较 HFS 又有所增长。蛋白质分子 α -螺旋结构的降低和 β -折叠结构的升高意味着蛋白质结构由规整向松散转化^[22]。出现这种情况可能是因为经过包埋处理后蛋白质空间结构发生了一定的变化^[11],蛋白的结构较包埋前更加延展。 α -螺旋结构包含数量较多的氢键,整体紧密且没有空腔,而 β -折叠结构较为无序,蛋白质结构的有序性与其某些功能性质是相关联的, β -折叠含量的增加有利于发挥蛋白质的某些功能

性质^[23],例如有利于增强蛋白质的柔韧性和扩展性。经过包埋处理后的 HSF 二级结构出现以上的变化,标志着 HSF 的整体分子构象从有序转化为无序,与之相对应的功能也随着分子构象的改变而变化。

表 1 HSF、HSF-AHLL 的二级结构含量

二级结构	不同样品含量(%)	
	HSF	HSF-AHLL
α -螺旋	23.1 \pm 0.30	14.9 \pm 0.29 *
β -折叠	9.2 \pm 0.35	15.9 \pm 0.38 *
β -转角	39.7 \pm 0.27	37.4 \pm 0.24 *
无规卷曲	28.0 \pm 0.53	31.8 \pm 0.51 *

注: * 代表 HSF-AHLL 与 HSF 差异显著($P < 0.05$)。

2.1.2 荧光光谱分析 在以往研究中得知,色氨酸的典型发射曲线在激发波长为 280 nm 时出现^[24]。利用荧光光谱分析复合纳米粒,如图 1-B 所示,在 310 nm 波长处附近产生内源荧光,由此可以推测铁蛋白中有色氨酸和络氨酸的存在。图 1-B 中复合纳米粒 HSF-AHLL 的内源荧光光谱强度在 310 nm 处发生了明显的变化,可能是发生了淬灭现象,可以推测,由于包埋处理导致铁蛋白四重轴通道上的色氨酸微环境有所改变。多肽 AHLL 与铁蛋白的静电结合,对铁蛋白的分子结构也存在些许影响。

2.1.3 紫外光谱分析 图 1-C 反映的是 HSF、HSF-AHLL 的紫外可见光吸收光谱。它们在近紫外区(190~350 nm)的紫外光谱几乎重叠,表现出相似的光谱特征。与文献[25]记载的最大吸收峰波长的出峰时间(212 nm 和 280 nm)基本一致。这种吸收峰的出现是由于铁蛋白中存在带有芳环的氨基酸残基而造成的,吸收峰的强度与蛋白的浓度变化成正比。根据光谱变化可以确定,复合纳米粒 HSF-AHLL 具有和铁蛋白类似的大分子共轭结构,并且 AHLL 通过包埋处理进入铁蛋白的空腔中,铁蛋白的表面性质没有受到改变。

2.2 HSF-AHLL 纳米粒的稳定性分析

2.2.1 AHLL 纳米粒的温度稳定性 由图 2 可知,在不同温度下处理 60 min,80 $^{\circ}$ C 处游离的 AHLL 降解了 78.30%,而 HSF-AHLL 中的 AHLL 只降解了 51.34%,其稳定性提高了 26.96 百分点。80 $^{\circ}$ C 之后游离的 AHLL 降解率变化有所缓和,但包埋处理后的复合纳米粒 HSF-AHLL 的降解率较 AHLL 而言普遍偏低。这一现象反映出复合纳米粒 HSF-AHLL 的热稳定性明显提高。由于铁蛋白具有非常

稳定的结构,在中性条件下加热至 80 ℃ 也不易变性^[26],ACE 抑制肽 AHLL 通过疏水作用力或范德华力与铁蛋白内部空腔结构中的氨基酸残基稳定结合,形成了 HSF - AHLL 复合物^[11],铁蛋白的外壳相当于一层坚固的壁垒,起到隔绝温度和保护的作用,其空腔内部包裹着 AHLL,在复杂的食品体系中可以减少 AHLL 与铁蛋白外部的小分子发生反应的概率,使 AHLL 更加稳定。

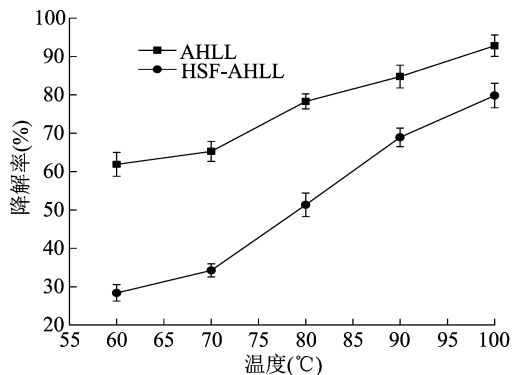


图2 不同温度下 AHLL 和 HSF-AHLL 的降解率

2.2.2 AHLL 纳米粒的 pH 稳定性的影响 将制备好的 HSF - AHLL 纳米粒分别调 pH 值至 2.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0,置于磁力搅拌器上分别反应 30 min 和 60 min,再将 pH 值还原至 7.4,在反应期间取样测定 AHLL 含量变化。由图 3 可知,包封率在酸性和碱性环境下的变化明显,但在中性环境下相对稳定,可以推测中性环境最适于 HSF - AHLL 纳米粒的保存。出现此种现象的原因是铁蛋白自身特殊的结构特点,铁蛋白在极酸或极碱性环境下极易变性,发生变性的蛋白会逐个解离成单个亚基的状态,当 pH 值由极酸或极碱还原成中性时,铁蛋白会随之变化,恢复成稳定的球形结构。

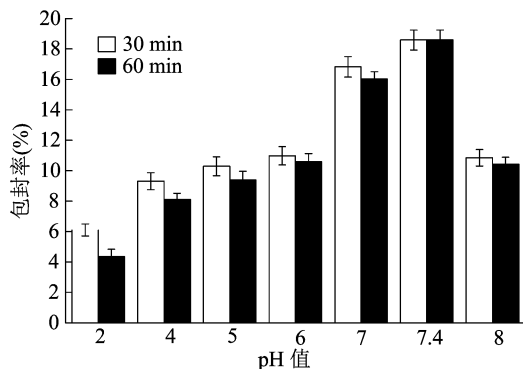


图3 不同 pH 值处理后的 HSF-AHLL 包封率

2.2.3 AHLL 纳米粒的紫外稳定性 如图 4 所示, AHLL 和 HSF - AHLL 经过紫外照射后,24 h 内游离的 AHLL 降解了 87.28%,而 HSF - AHLL 包埋物中

的 AHLL 降解了 51.45%,其稳定性分别提高了 35.83 百分点。所以,经包埋处理后的复合纳米粒 HSF - AHLL 受紫外辐照后的降解率明显降低。

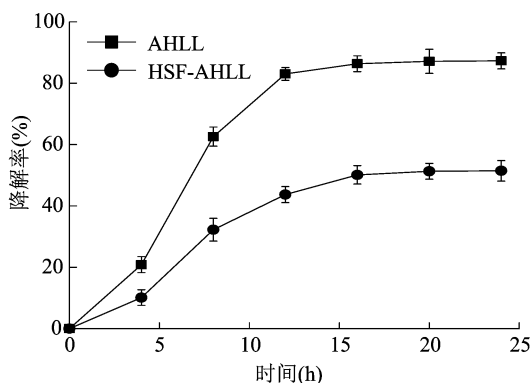


图4 紫外照射 24 h 后 AHLL、HSF-AHLL 的降解率

2.2.4 AHLL 纳米粒的体外消化 图 5 所显示的是, AHLL 和 HSF - AHLL 经过模拟体外胃消化 1 ~ 3 h 后进入肠消化 4 ~ 6 h,产物的 ACE 抑制活性变化。在胃部消化过程中,游离 AHLL 的 ACE 抑制活性明显高于 HSF 包封的 AHLL。一个可能的原因是, HSF 将 AHLL 与外界环境阻隔,从而降低了其抑制活性。两者的 ACE 抑制活性在 2 h 后明显下降,预示 AHLL 在酸性环境下发生了降解,且游离态 AHLL 的下降幅度高于包封 AHLL,可能与 HSF 的稳态化保护效果有关。当转移到肠液中后,两者的 ACE 抑制活性变化幅度不明显。

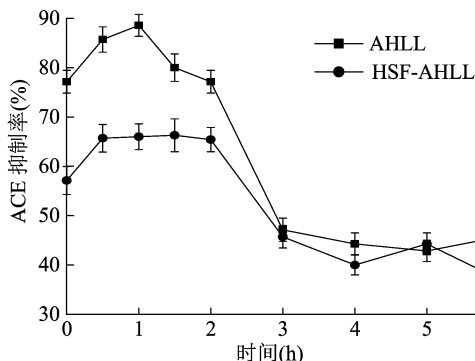


图5 模拟体外消化后 AHLL 和 HSF-AHLL 的 ACE 抑制率变化

2.3 HSF - AHLL 纳米粒在 Caco - 2 细胞模型中的吸收机制

2.3.1 不同抑制剂处理 HSF - AHLL 在 Caco - 2 细胞上的转运分析 细胞旁路转运、跨膜转运和肽载体介导的主动转运是物质跨肠上皮细胞转运的常见途径。本试验采用肽转运载体竞争性抑制剂 Gly - Pro^[18]、内吞抑制剂氧化苯胍和旁路转运促进剂脱氧胆酸钠^[19]探讨 HSF - AHLL 的转运途径。

从图 6 中可以看出, HSF - AHLL 在经过 Gly - Pro 对肽转载体竞争性的抑制和氧化苯胍对胞吞转运的抑制 120 min 后, 浓度变化与空白组对照相比差异并不明显, 而经过促进剂脱氧胆酸钠处理的 AHLL 和 HSF - AHLL 的含量较高, 说明复合纳米粒 HSF - AHLL 在 Caco - 2 细胞单层膜上的主要转运方式是旁路转运, 脱氧胆酸钠属于胆酸盐类的细胞旁路转运促进剂, 对溶解磷脂相对有效, 有利于旁路转运^[27]。当 HSF - AHLL 在 Caco - 2 细胞单层上进行跨膜转运时, 能有效地打开细胞通路从而促进其在 Caco - 2 细胞单层的转运。

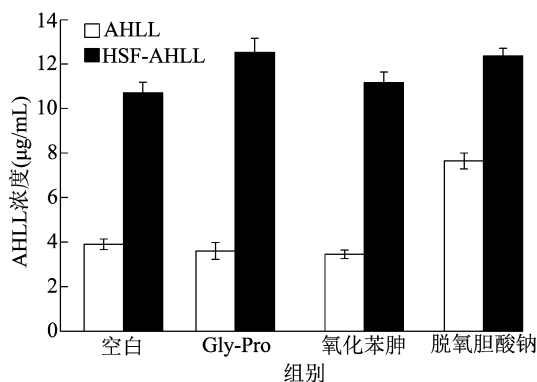


图6 转运抑制剂或促进剂对 HSF-AHLL 转运的影响

在 AP 侧或 BL 侧分别加入 *P* - 糖蛋白抑制剂维拉帕米^[21]、多药耐药蛋白抑制剂 MK - 571^[28]。Caco - 2 细胞 AP 侧存在 2 种主要的外排蛋白^[11], 即 *P* - 糖蛋白和多药耐药蛋白, 其主要功能是通过抑制消耗能量, 把细胞中的营养物质排到细胞外, 从而影响细胞自身对营养物质吸收。转运 120 min 后, 加入维拉帕米的 $P_{app(AtoB)}$ 值为 $(27.12 \pm 0.54) \times 10^{-6}$ cm/s, PDR 为 0.23。说明 AHLL 是 *P* - 糖蛋白的外排底物。加入 MK - 571 的 $P_{app(AtoB)}$ 值升高, $P_{app(BtoA)}$ 值没有明显的差异 (图 7), PDR 值降低 10%, 证明 HSF - AHLL 的转运与多药耐药蛋白抑制剂形成竞争性抑制。

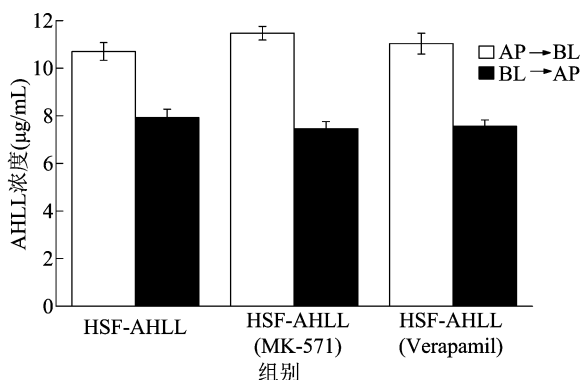


图7 外排抑制剂作用对 HSF-AHLL 转运的影响

2.3.2 不同温度对复合纳米粒转运的影响 当转运温度从 4 ℃ 变化为 37 ℃ 时, 复合纳米粒 HSF - AHLL 在 Caco - 2 细胞单层的双向吸收变化情况如图 8 所示。转运温度为 37 ℃ 时 AP → BL 和 BL → AP 2 个方向的 AHLL 浓度相较 4 ℃ 时有所增加, $P_{app(AtoB)}$ 从 $(6.75 \pm 0.34) \times 10^{-6}$ cm/s 上升到 $(25.29 \pm 0.63) \times 10^{-6}$ cm/s, $P_{app(BtoA)}$ 从 $(2.18 \pm 0.11) \times 10^{-6}$ cm/s 上升到 $(6.27 \pm 0.27) \times 10^{-6}$ cm/s, 温度上升对 HSF - AHLL 在 Caco - 2 细胞单层的转运起到了促进作用。温度扮演着能量依赖转运抑制剂的角色, 温度降低减少了细胞代谢, 反之温度升高细胞代谢也会增强, 可以推测说明 HSF - AHLL 的转运对温度具有一定的依赖性, 属于能量依赖型转运。

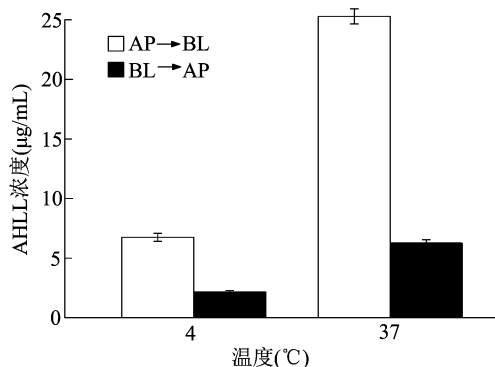


图8 不同温度处理 HSF-AHLL 后的 AHLL 含量

3 讨论与结论

从圆二色谱结果可知, 经过包埋处理后 AHLL 通过静电吸引力作用被包埋进 HSF 的空腔内形成了复合纳米粒, 包埋过程对铁蛋白的二级结构没有影响, 蛋白质空间结构发生了些许的变化; 紫外光谱结果说明复合纳米粒 HSF - AHLL 具有和铁蛋白类似的大分子共轭结构, 并且 AHLL 通过包埋处理进入铁蛋白的空腔中, 铁蛋白的表面性质没有受到改变; 荧光光谱结果说明包埋处理改变了铁蛋白在四重轴通道上的色氨酸微环境。

不同温度处理 60 min, HSF - AHLL 中的 AHLL 只降解了 51.34%, 其稳定性提高了 26.96%, HSF - AHLL 较游离的 AHLL 热稳定性明显提高, HSF - AHLL 纳米粒在中性环境的稳定性最好。

模拟体外胃肠消化说明, 在胃酸的大环境下铁蛋白的亚基会打开, 复合纳米粒 HSF - AHLL 进入消化系统后, ACE 抑制率低于游离的 AHLL 经过体外消化后的抑制率; 复合纳米粒 HSF - AHLL 在肠

道的中性条件下能够稳定地保持继而有效地吸收,ACE 抑制活性明显提高。

HSF - AHLI 在 Caco - 2 细胞单层膜上以细胞旁路转运为主,内吞抑制剂和肽载体抑制剂对其转运没有明显影响,而脱氧胆酸钠能打开细胞间通路促进其转运。

HSF - AHLI 的转运与多药耐药蛋白抑制剂形成竞争性抑制,HSF - AHLI 的转运对温度具有一定的依赖性,属于能量依赖型转运。

参考文献:

- [1]李莹,曾晓雄,周剑忠,等. 泥鳅 ACE 抑制肽的体外活性研究[J]. 食品工业科技,2012,33(17):127-130.
- [2]李莹. 泥鳅蛋白源 ACE 抑制肽的酶法制备及其降压活性研究[D]. 南京:南京农业大学,2012.
- [3]权静,管增东. 马脾铁蛋白的应用研究[J]. 科技资讯,2015,13(24):214-215.
- [4]Bradley J M,le Brun N E,Moore G R. Ferritins:Furnishing proteins with iron[J]. Journal of Biological Inorganic Chemistry,2016,21(1):13-28.
- [5]Zhen Z,Tang W,Guo C,et al. Ferritin nanocages to encapsulate and deliver photosensitizers for efficient photodynamic therapy against cancer[J]. ACS Nano,2013,7(8):6988-6996.
- [6]杨彩云,曹长乾,蔡垚,等. 铁蛋白表面修饰及其应用[J]. 化学进展,2016,28(1):91-102.
- [7]夏伟荣. 铁蛋白——海藻酸钠包埋 ACE 抑制肽及细胞吸收机制的研究[D]. 舟山:浙江海洋大学,2019.
- [8]王兴,黄忠明,王莉,等. 苦荞蛋白模拟消化产物抗氧化活性及组成研究[J]. 中国食品学报,2009,9(6):10-15.
- [9]Mounsey J S,O'Kennedy B T,Fenelon M A,et al. The effect of heating on β -lactoglobulin-chitosan mixtures as influenced by pH and ionic strength[J]. Food Hydrocolloids,2007,22(1):65-73.
- [10]牛广财,朱丹,王宪青,等. 南瓜籽油微胶囊稳定性与缓释性能的研究[J]. 粮油加工,2009(12):80-82.
- [11]夏伟荣,李莹,柴智,等. 铁蛋白-海藻酸钠纳米包埋 ACE 抑制肽[J]. 食品科学,2020,41(8):77-82.
- [12]杨伟. 乳铁蛋白、EGCG 和果胶三元复合物的形成机制及结构表征[D]. 北京:中国农业大学,2015.
- [13]杨瑞,田婧,刘玉茜,等. 基于铁蛋白-壳聚糖制备芦丁纳米复合物及芦丁稳定性研究[J]. 中国食品学报,2017,17(9):58-65.
- [14]吕凤娇,吴洪,许小平. 荧光光谱测定纳米粒体系中阿霉素含量[J]. 宜春学院学报,2013,35(9):121-124.

- [15]Cinq - Mars C D, Hu C, Kitts D D, et al. Investigations into inhibitor type and mode, simulated gastrointestinal digestion, and cell transport of the angiotensin I - converting enzyme - inhibitory peptides in Pacific hake (*Merluccius productus*) fillet hydrolysate[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,2008,56(2):410-419.
- [16]游丽君. 泥鳅蛋白抗氧化肽的分离纯化及抗疲劳、抗癌功效研究[D]. 广州:华南理工大学,2010.
- [17]祝倩,郭宇星,潘道东,等. Caco - 2 细胞模型构建及抗高血压肽 VPP 和 IPP 小肠吸收机制研究[J]. 食品科学,2014,35(15):226-231.
- [18]Enjoh M, Hashimoto K, Arai S, et al. Inhibitory effect of arphamenine A on intestinal dipeptide transport[J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry,1996,60(11):1893-1895.
- [19]Lo Y L, Huang J D. Effects of Sodium deoxycholate and Sodium caprate on the transport of epirubicin in human intestinal epithelial Caco - 2 cell layers and everted gut sacs of rats[J]. Biochemical Pharmacology,2000,59(6):665-672.
- [20]Nakagami T, Yasui - Furukori N, Saito M, et al. Effect of verapamil on pharmacokinetics and pharmacodynamics of risperidone: *in vivo* evidence of involvement of P - glycoprotein in risperidone disposition[J]. Clinical Pharmacology and Therapeutics,2005,78(1):43-51.
- [21]Swift J, Wehbi W A, Kelly B D, et al. Design of functional ferritin-like proteins with hydrophobic cavities[J]. Journal of the American Chemical Society,2006,128(20):6611-6619.
- [22]王明波,冯庆玲,余振定,等. PLGA 微球包埋药物的稳定性及释放研究的新进展[J]. 功能材料,2011,42(增刊4):591-595.
- [23]李晨. 基于糖基化反应的花生蛋白成膜性及其风味缓释效应的研究[D]. 无锡:江南大学,2015.
- [24]李青,梁艳红,孙娟,等. 槲皮素与转铁蛋白相互作用的荧光光谱法研究[J]. 河北师范大学学报(自然科学版),2010,34(2):187-191.
- [25]Xing R, Wang X, Zhang C, et al. Characterization and cellular uptake of platinum anticancer drugs encapsulated in apoferritin[J]. Journal of Inorganic Biochemistry,2009,103(7):1039-1044.
- [26]Stefanini M, Fawcett H, Botta E, et al. Genetic analysis of twenty - two patients with Cockayne syndrome[J]. Human Genetics,1996,97(4):418-423.
- [27]文爱东,蒋永培. 吸收促进剂在口服制剂中增强药物生物利用度的作用[J]. 国外医学(药学分册),2000(6):354-357.
- [28]Haimeur A, Conseil G, Deeley R G, et al. The MRP - related and BCRP/ABCG2 multidrug resistance proteins: biology, substrate specificity and regulation[J]. Current Drug Metabolism,2004,5(1):21-53.