

大豆分离蛋白载药性能研究

李炳章¹,王 寒¹,管路遥¹,牛宝龙^{1,2}

(1. 太原理工大学 材料科学与工程学院,山西 太原 030024; 2. 新材料界面科学与工程教育部重点实验室,山西 太原 030024)

摘 要:以大豆分离蛋白(SPI)为主要原料,采用真空冷冻干燥技术制备以 SPI 为载体的姜黄素纳米粒(SPI-Cur)。利用高分辨透射电子显微镜和激光粒度仪表征纳米粒的形态和粒径;通过高效液相色谱仪在 430 nm 处分析 SPI-Cur 的释放行为,测定 SPI-Cur 的载药率、包封率;并采用 MTT 法考察了 Cur 和 SPI-Cur 对人食管癌细胞株 TE-1 的体外抑制作用。结果表明:经 SPI 包被的 Cur 表面粗糙度增加、电位升高,制备的 SPI-Cur 粒径在 186.7 nm 左右,载药量和包封率分别为 3.08% 和 33.90%,包被后的 SPI-Cur 出现明显的缓释行为,当 Cur 浓度在 4.0 μg·mL⁻¹ 以上时,食管癌细胞的生长受到明显抑制,细胞存活率与姜黄素存在时间依赖和剂量依赖关系。

关键词:大豆分离蛋白;姜黄素;药物缓释;真空冷冻干燥;细胞毒作用

中图分类号:TB34;Q518.1 **文献标识码:**A **DOI:**10.11861/j.issn.1000-9841.2016.06.1008

Drug Carrier Study of Soybean Protein Isolation

LI Bing-zhang¹, WANG Han¹, GUAN Lu-yao¹, NIU Bao-long^{1,2}

(1. College of Materials Science and Engineering, Taiyuan University of Technology, Taiyuan 030024, China; 2. Key Laboratory of Interface Science and Engineering in Advanced Materials, Taiyuan University of Technology, Ministry of Education, Taiyuan 030024, China)

Abstract: To study the drug carrying ability of soy protein isolated(SPI), novel soy protein isolated (SPI)-based sponges containing curcumin were prepared by a freeze drying method. The morphology and particle size of soy protein isolated-curcumin nanocomposite(SPI-Cur) was characterized by transmission electron microscopy(TEM) and Nanotracc wave. Then, the drug loading rate, encapsulation efficiency and release behavior of SPI-Cur nanoparticles were measured by high performance liquid chromatography (HPLC). Finally, *in vitro* cytotoxicity of the Cur micelles and SPI-Cur micelles were investigated by a standard MTT assay. The results showed that SPI achieved good surface coating out of the Cur, the surface roughness of Cur increased and the surface potential rised after coated with SPI, the Cur of SPI-Cur could release steadily and slowly, the prepared SPI-Cur presented drug loading and entrapment efficiency of 3.08% and 33.90%. By means of the MTT assay, it was found that the TE-1 cell viability was related to the reaction time and drug concentration. When 4.0 μg·mL⁻¹ Cur was incubated with TE-1 cells for 24 h, the cell viability declined significantly. As an edible carrier, the development of this subject has greatly broadened its application on medical areas.

Keywords: Soy protein isolated; Curcumin; Drug delivery; Vacuum freeze-drying; Cytotoxicity

大豆分离蛋白(soybean protein isolated, SPI)是指除去大豆中油脂和碳水化合物后的蛋白质,其蛋白质的含量在 90% 以上^[1]。作为一种重要的植物蛋白产品,它具有较高的营养价值和良好的加工特性,广泛应用在食品加工领域中^[2]。SPI 具有很好的表面结合和修饰活性,在生物医学材料表面修饰等方面均表现出优异的性能^[3,4]。SPI 还具有高度生物相容性,能够良好地保持生物分子的活性。在水中 SPI 可以通过界面自组装形成具有疏水性内核和亲水性外壳结构的纳米粒子,其中疏水性内核可

以作为疏水性药物的储库^[5]进而提高药物的溶解度^[6]。对于 SPI 的乳化性、吸油性、凝胶性、发泡性等功能特性^[1],国内外已经进行了很多研究,但尚未见 SPI 作为药物载体的报道。

姜黄素(Curcumin, Cur)是姜科姜黄属植物姜黄的主要活性成分,研究发现 Cur 有抗炎、抗氧化、抗凝、降血脂、抗肿瘤等药理活性,且抗癌谱广、几乎无毒副作用^[1-3],因此 Cur 被认为是理想的天然抗癌先导化合物之一。但是由于 Cur 水溶性差,在体外易被氧化,难以在体内吸收,生物利用度低^[4],这

收稿日期:2016-08-12
基金项目:山西省基础研究项目-青年科技研究基金面上项目(2014021020-3);山西省回国留学人员科研资助项目(2015-033);山西省高校科技创新项目(2015130)。
第一作者简介:李炳章(1992-),男,硕士,主要从事生物医用高分子材料的研究。E-mail:libingzhang0131@link.tyut.edu.cn。
通讯作者:牛宝龙(1981-),博士,主要从事生物纳米材料和复合材料研究。E-mail: niubaolong521@126.com。

极大限制了它的应用。因此急需开发出新的姜黄素给药系统,以提高其溶解度和稳定性。因此,本研究以 SPI 为载体材料,利用真空冷冻干燥法制备载有 Cur^[7-9] 大豆分离蛋白纳米粒 (SPI-Cur),测定 SPI-Cur 纳米粒的载药率、包封率,考察 SPI-Cur 纳米粒释放行为,并采用 MTT 法考察了 SPI-Cur 纳米粒对人食管癌细胞株 TE-1 的体外抑制作用,以期利用天然可溶的 SPI 成分构建 SPI-Cur 载体克服姜黄素体内消除迅速的缺陷,延长其在体内作用的时间,提高其溶解性和稳定性,从而为 SPI 药物的广泛应用提供可能。

1 材料与方法

1.1 材料

激光粒度仪 (S3500, 美国 Microtrac Inc); 高效液相色谱仪 (ULTIMATE 3000, 美国 Thermo Fisher Scientific); 酶标分析仪 (M3, 西安闽丰科教设备有限公司); 真空冷冻干燥机 (SCIENT2-12N, 宁波新芝生物科技股份有限公司); 大豆分离蛋白 (上海江莱生物科技有限公司); 姜黄素 (99%, 天津市光复精细化工研究所); 乙腈 (色谱纯); 透析袋 (截留分子量: 14 000, 山西赛奥生物科技有限公司); 胰酶细胞消化液 (山西赛奥生物科技有限公司); RPMI-1640 培养基 (山西赛奥生物科技有限公司); 噻唑蓝 (北京全式金生物技术有限公司); 胎牛血清 (北京全式金生物技术有限公司); 青霉素 - 链霉素溶液 (北京全式金生物技术有限公司); 试验用水均为超纯水 (18 MΩ); 食管癌细胞株 TE-1 (中科院上海细胞库); 其余试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 SPI-Cur 纳米颗粒的制备及表征 将 Cur 溶于 DMF 中制备 400 mg·mL⁻¹ 的 Cur 溶液备用, 配置 1 mg·mL⁻¹ SPI 溶液 100 mL。将 25 μL Cur 溶液逐滴加入在 37℃ 恒温水浴下以 1 500 r·min⁻¹ 搅拌的 SPI 溶液中保存 24 h, 然后用冷冻离心机在 0℃, 10 000 r·min⁻¹ 离心 20 min 取上清液真空冷冻干燥, 即得黄色絮状粉末 SPI-Cur 纳米粒。取适量 SPI-Cur 纳米冻干粉及 Cur 粉末分别分散于超纯水中, 用冷冻离心机在 0℃, 10 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液用透射电子显微镜 (TEM) 观察拍照。

1.2.2 SPI-Cur 纳米颗粒性能考察

(1) SPI-Cur 纳米颗粒的粒径分析: 将制备的 SPI-Cur 纳米颗粒分散在水中 (1 mg·mL⁻¹), 采用 Microtrac Inc 激光粒度仪测试其粒径分布及电位变

化情况。按照公式 $\bar{D}_n = \frac{\sum n_i D_i}{\sum n_i}$ 统计分析计算平均粒径, 其中 \bar{D}_n 为微球的平均粒径, D_i 为微球的直径, n_i 为直径为 D_i 的微球的数量。电位值由 Microtrac Inc 激光粒度仪直接测得。

(2) SPI-Cur 纳米颗粒的载药量和包封率测定: 将 10 mg SPI-Cur 纳米颗粒用超纯水溶于 10 mL 容量瓶中, 用流动相定容至刻度。精密移取上清液经筛孔内径 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 进行 HPLC 进样分析, 测定药物载药量^[10]; 并计算包封率^[11], 重复试验 3 次取平均值。(色谱条件: 色谱柱为 Hypersil C18 柱 (250 mm×4.6 mm; 5 μm); 流动相: 乙腈 - 4% 冰醋酸 (48:52); 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 柱温: 30℃; 检测波长: 430 nm; 进样量: 20 μL; 理论板数按姜黄素峰值计不低于 5 000)。

载药率 (%) = (称取的 SPI-Cur 纳米粒中 Cur 的质量/称取的 SPI-Cur 纳米粒的质量) × 100

包封率 (%) = (制备的 SPI-Cur 纳米粒中 Cur 的质量/试验中 Cur 的投药量) × 100

1.2.3 SPI-Cur 纳米粒释放行为考察 将上述 SPI-Cur (相当于 Cur 1 mg) 及 Cur (1 mg) 分别分散于含 4 mL PBS (pH7.4, 30% 乙醇)^[12] 的透析袋内, 装入含有 100 mL PBS (pH7.4, 30% 乙醇) 溶液的烧杯中, 于 37℃, 100 r·min⁻¹ 振荡条件下进行透析。于预定时间点准确取样 100 μL, 再加入 100 μL (pH7.4, 30% 乙醇) 以维持透析液的体积不变。用高效液相色谱仪以 1.2.2 中的色谱条件检测透析液中 Cur 的量。以时间 - 释放百分比做 SPI-Cur 的释放曲线, 3 次重复。

1.2.4 SPI-Cur 纳米粒的体外细胞毒性研究 SPI-Cur 体外抗肿瘤效果利用 MTT 法来考察。取处于对数生长期的人食管癌细胞 (TE-1), 以每孔 5 000 个的密度接种于 96 孔板, 用含胎牛血清和青霉素 - 链霉素的 RPMI-1640 培养基培养过夜^[13]。弃去培养基, 加入含不同浓度 Cur 或 SPI-Cur 的培养基 (Cur 的浓度范围为 1 ~ 32 μg·mL⁻¹) 继续培养 24 或 48 h。弃去培养基, 加入 200 μL 含有 MTT 的培养基 (MTT 浓度为 0.5 mg·mL⁻¹), 置于 37℃ 细胞培养箱避光培养 4 h。去掉培养基, 加入 200 μL 的 DMSO 溶解结晶。在 492 nm 处测定吸光度值。细胞活力计算公式如下:

细胞存活率 (%) = (测量值 - 空白组)/(对照组 - 空白组) × 100。

2 结果与分析

2.1 SPI-Cur 粉末表征

SPI-Cur 纳米粒的透射电镜结果如图 1 所示,从图 1a 可以看出,游离的 Cur 发生了很明显的团聚,图 1b 说明 $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 SPI 修饰后的 Cur 团聚减弱,这主要是因为 Cur 表面被一层 SPI 膜所覆盖。

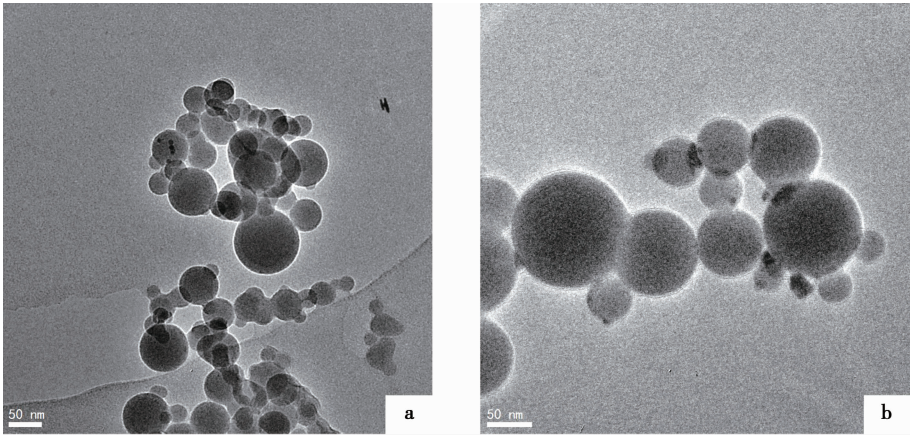


图 1 Cur(a) 及 SPI-Cur(b) 的 TEM 图
Fig.1 TEM images of Cur(a) and SPI-Cur (b)

2.2 SPI-Cur 纳米颗粒性能

SPI-Cur 载药体系发挥其“纳米效应”^[14] 需要有纳米级的尺寸。经粒度仪测定,绘制粒径的频率分布图,结果如图 2 所示。统计分析计算平均粒径,游离 Cur 的水力直径在 $1.495\text{ }\mu\text{m}$ 左右,SPI-Cur 的水力直径在 186.7 nm 左右。这表明经 SPI 修饰的 Cur 有效地减小了 Cur 的团聚,分散更加均匀。经测定 Cur 电位值为 -17.6 mV ,SPI-Cur 电位为 -22.6 mV 。这主要是由于 SPI 包被在 Cur 表面,增加了 Cur 颗粒的电负性,使颗粒之间的排斥作用增强,不容易相互靠近,团聚的几率大大下降^[15]。

取 40 mg Cur 溶于 20 mL DMF 中,吸取 $200\text{ }\mu\text{L}$ 至 10 mL 容量瓶,用流动相定容至刻度并稀释为浓度分别为 $40, 20, 10, 5, 2.5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的标准溶液,按 1.2.2 中色谱条件进行进样分析,以样品浓度为横坐标($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$),吸收峰面积为纵坐标,进行线性回归得到线性方程 $Y=2.1617X-0.2193(R^2=0.9998)$,表明 Cur 浓度在 $2.5\sim40\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内

SPI 是具有特殊结构的两亲性分子,并且 SPI 中的很多疏水性氨基酸都暴露在蛋白的表面,在 SPI 表面形成一片疏水的“补丁”。这个疏水的“补丁”可以和疏水的 Cur 表面通过疏水作用力结合,使得 SPI 在 Cur 表面发生自我组装,组装之后的 SPI 在 Cur 表面形成亲水基团,使得 Cur 的表面从疏水变成亲水,因此 SPI-Cur 在 PBS 溶液中分散的更加均匀。

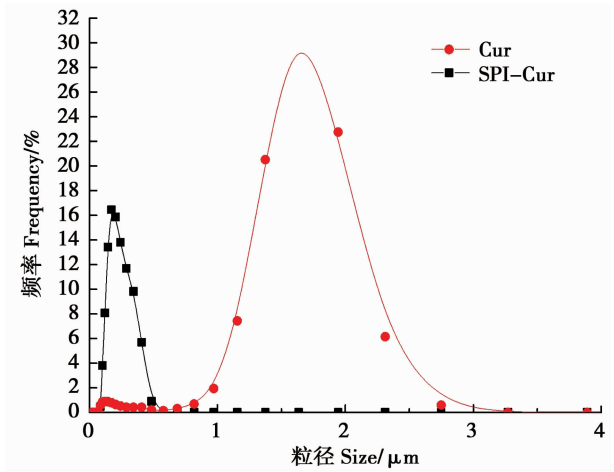


图 2 粒度分析
Fig.2 The volume-weighted size distribution plots obtained by Cur and SPI-Cur in distilled water

线性良好。测得 SPI-Cur 溶液中 Cur 的浓度为 $30.812\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。载药率和包封率计算过程及结果如下:

$$\text{SPI-Cur}(\%) = \frac{30.812\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1} \times 10\text{ mL}}{10 \times 10^3\text{ }\mu\text{g}} \times 100 = 3.08\%$$

$$\text{Cur 包封率}(\%) = \frac{30.812\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1} \times 10\text{ mL} \times (100\text{ mg} + 400\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1} \times 0.025\text{ mL})}{400 \times 10^3\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1} \times 0.025\text{ mL} \times 10\text{ mg}} \times 100 = 33.89\%$$

2.3 SPI-Cur 体外药物释放行为

SPI-Cur 药物释放曲线如图 3 所示,游离 Cur 在 5 h 时释放率达到 95.94%。而 SPI-Cur 在最初 4 h Cur 释放速度较快,这是由包裹于离 SPI 模表面较近和 SPI 模表面吸附的 Cur 释放引起的;在 4 ~ 16 h,SPI-Cur 中 Cur 呈相对稳定、缓慢的释放,释放出来的主要是 SPI-Cur 中心的 Cur。由于它的释放要通过 SPI 膜,所以释放速率相对较慢。SPI-Cur 20 h 内累计释放量为 85.15%,说明 SPI-Cur 显示出明显的缓释特性。

2.4 SPI-Cur 胶束的体外抗肿瘤效果

由图 4 可知,游离 Cur 和 SPI-Cur 对 TE-1 细胞的抑制作用都有明显的浓度依赖性和时间依赖关系,给药浓度和给药时间增加时抑制效果变强。当药物浓度和作用时间相同时,经过 SPI-Cur 处理后

的 TE-1 细胞存活率更低,这说明 SPI 提高了 Cur 的体外抗肿瘤效果。

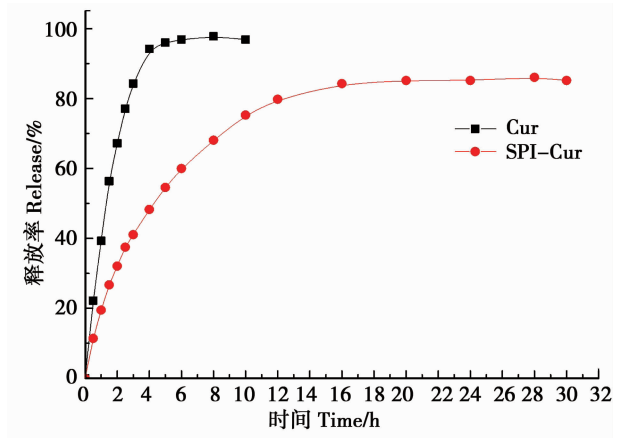


图 3 Cur 和 SPI - Cur 的释放曲线
Fig. 3 In vitro release profiles of Cur and SPI - Cur

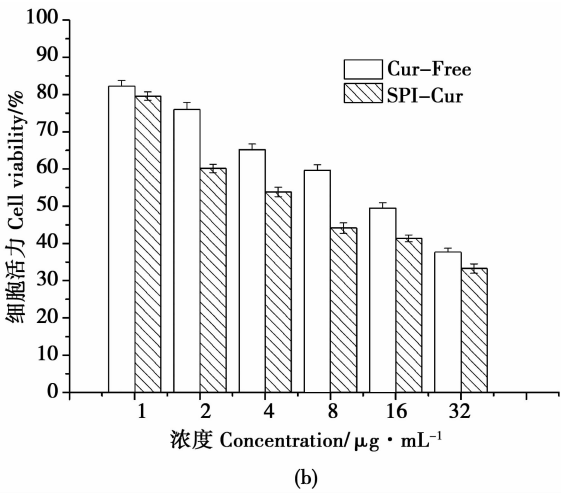
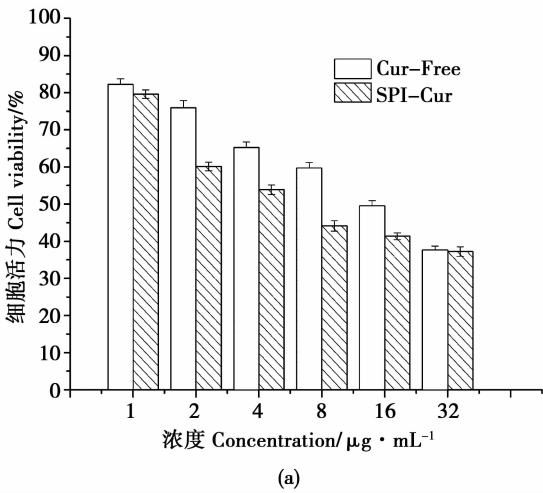


图 4 不同浓度姜黄素作用 TE - 1 细胞 24 h(a) 和 48 h(b) 后细胞的存活率
Fig. 4 Cell viability of TE - 1 cells after treated with Cur and SPI-Cur
in different concentrations at 24 h (a) and 48 h (b)

3 结论与讨论

粒度测试表明经过 SPI 包被后的 Cur 团聚明显减弱,水力粒径由 1.495 μm (Cur) 变为 186.7 nm (SPI-Cur),且分布均一。电位分析表明 SPI-Cur(- 22.6 mV)在 PBS 溶液中比 Cur(- 17.6 mV)更加稳定。由体外释放试验可知,Cur 组在 5 h 内释放 95.94%, SPI-Cur 组在前 4 h 内释药较快 (48.28%),这可能是 SPI 表面吸附的药物释放引起的,随后 SPI-Cur 的释放逐渐趋于平缓,在 20 h 释放 85.15%,这表明 SPI-Cur 表现出了较好的缓释效果,其原因可能是 SPI 长链在 Cur 表面所形成的水化层能够有效阻止药物扩散,从而延长药物的体内循环时间。因此 SPI 载体可以克服姜黄素体内消除迅速的缺陷,延长其在体内的作用时间。体外细胞

毒性试验表明,SPI-Cur 抗肿瘤效果强于游离 Cur,这可能与 SPI 能促进细胞摄取^[16]和细胞凋亡^[17]等机制有关。

相比于聚合物给药系统,利用真空冷冻干燥技术制备的 SPI-Cur 工艺简单,样品制备过程中最大程度减少了有机溶剂的使用,并且以可食用食品 SPI 作为载体,使药物可以直接作用于细胞,在提高局部药物浓度、增加治疗效果的同时减少了毒副作用。因此,优化 SPI-Cur 的制备工艺,提高 SPI 的载药量和稳定性必将使 SPI 药物载体得到广泛应用。

参考文献

[1] 李玉珍,肖怀秋,兰立新. 大豆分离蛋白功能特性及其在食品工业中的应用[J]. 中国食品添加剂,2008, 1(21): 121-124.
(Li Y Z, Xiao H Q, Lan L X. Functional characterizations of SPI

- and its applications in food industry[J]. China Food Additives, 2008, 1(21): 121-124.)
- [2] 顾振宇,江美都,付道才,等.大豆分离蛋白乳化性的研究[J]. 中国粮油学报,2000, 15(3):32-34. (Gu Z Y, Jiang M D, Fu D C, et al. Study on emulsifying properties of soy protein isolate [J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2000, 15(3): 32-34.)
- [3] Li M M, Xiao Y, Chen Y, et al. Soy protein-modified waterborne polyurethane biocomposites with improved functionality[J]. RSC Advances, 2016, 6(16): 12837-12849.
- [4] 王欣,乔玲.大豆分离蛋白的营养、功能特性及应用研究[J]. 农业科技与装备, 2013(5): 55-56. (Wang X, Qiao L. Study on the nutrition, functional properties and application of soy protein isolate[J]. Agricultural Science & Technology and Equipment, 2013(5): 55-56.)
- [5] Mackay J A, Chen M N, Mcdaniel J R, et al. Self-assembling chimeric polypeptide-doxorubicin conjugate nanoparticles that abolish tumours after a single injection [J]. Nature Materials, 2009, 8(12): 993-999.
- [6] Sungwon K, Shi Y Z, Ji Y K, et al. Overcoming the barriers in micellar drug delivery: Loading efficiency, *in vivo* stability, and micelle-cell interaction[J]. Expert Opinion on Drug Delivery, 2010, 7(1): 49-62.
- [7] 刘红艳,王海燕,叶松,等.姜黄素药理作用及其机制研究进展[J]. 中国现代医学杂志, 2012, 22(6):48-51. (Liu H Y, Wang Hai-yan, Ye S, et al. Research progress of curcumin pharmacological action and mechanism[J]. China Journal of Modern Medicine, 2012, 22(6): 48-51.)
- [8] Sunagawa Y, Katanasaka Y, Hasegawa K, et al. Clinical applications of curcumin[J]. Pharnutrition, 2015, 3(4): 131-135.
- [9] Dong-Chan K, Sae-Kwang K, Jong-Sup B. Anticoagulant activities of curcumin and its derivative[J]. BMB Reports, 2012, 45(4): 221-226.
- [10] 郑施施,李星熠,王增寿. PCL-PEG-PCL载姜黄素纳米粒子的制备以及体外药物释放的考察[J]. 中国现代应用药学, 2012, 29(6): 513-516. (Zheng S S, Li X Y, Wang Z S. Curcumin loaded PCL-PEG-PCL nanoparticle: Preparation, characterization and *in vitro* release study[J]. Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy, 2012, 29(6): 513-516.)
- [11] Acartürk F, Takka S. Calcium alginate microparticles for oral administration; II. Effect of Formulation factors on drug release and drug entrapment efficiency [J]. Journal of Microencapsulation, 1999, 16(3): 291-301.
- [12] Guan T T, Miao Y Q, Xu L S, et al. Injectable nimodipine-loaded nanoliposomes: Preparation, lyophilization and Characteristics [J]. International Journal of Pharmaceutics, 2011, 410(1): 180-187.
- [13] 李敏,郭爱洁,张骁,等.姜黄素共聚物胶束的制备与体外细胞毒评价[J]. 现代生物医学进展, 2016, 16(3): 427-430. (Li M, Guo A J, Zhang X, et al. Preparation and *in vitro* cytotoxicity of curcumin-loaded polymeric [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2016, 16(3): 427-430.)
- [14] 张晓燕,李倩,孙建绪,等.纳米效应对难溶性药物阿瑞匹坦体内性质影响[J]. 中国药理学杂志, 2014, 49(14): 1226-1232. (Zhang X Y, Li Q, Sun J X, et al. Influences of nanometer effects on the characters of water-insoluble drug aprepitant *in vivo* and *in vitro* [J]. China Pharmaceutical Journal, 2014, 49(14): 1226-1232.)
- [15] 朱佳,轩亚茹,张春春,等.姜黄素复方脂质体的制备及质量评价[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(19): 19-23. (Zhu J, Xuan Y R, Zhang C C, et al. Preparation and quality evaluation of Curcumin-quinacrine Liposomes [J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2015, 21(19): 19-23.)
- [16] Gong C, Deng S, Wu Q, et al. Improving antiangiogenesis and antitumor activity of curcumin by biodegradable polymeric micelles [J]. Biomaterials, 2013, 34(4): 1413-1432.
- [17] Gao X, Zheng F, Guo G, et al. Improving the anti-colon cancer activity of curcumin with biodegradable nano-micelles [J]. Journal of Materials Chemistry B, 2013, 1(42): 5778-5790.