

酪蛋白-葡萄糖-PGG 纳米复合物的制备及其延缓线虫衰老能力的研究

陈运娇^{1,2}, 李伟^{1,2}, 陈洪璋¹, 黄庆荣³, 曹庸^{1,2}

(1. 华南农业大学食品学院, 广东广州 510642) (2. 广东省天然活性物工程技术研究中心, 广东广州 510642)

(3. 美国罗特格斯大学, 美国新泽西 08901)

摘要: 本文采用凝胶电泳、红外光谱和荧光光谱研究酪蛋白与葡萄糖美拉德接枝物的相互作用方式, 接着用溶剂蒸发法制备酪蛋白-葡萄糖-PGG (1,2,3,4,6-O-五没食子酰葡萄糖) 纳米复合物, 以期提高 PGG 的水溶性及延缓秀丽隐杆线虫衰老能力。结果表明, 生成的接枝物分子量大于 116 ku。糖末端的羰基与蛋白的氨基以化学共价键相连, 酪蛋白中引入的糖分子具有 D-吡喃葡萄糖环结构。PGG 与酪蛋白或酪蛋白-葡萄糖作用力主要为疏水力。PGG 与酪蛋白-葡萄糖接枝共聚物在疏水力诱导下协同组装得到酪蛋白-葡萄糖-PGG 纳米复合物, 纳米粒子包埋率为 62.27%, 粒径为 265 nm。该纳米粒子外观呈淡黄色。当浓度为 10 mg/mL 时, 该纳米粒子在水中溶解度较好。酪蛋白-葡萄糖-PGG 纳米复合物组线虫平均寿命比 PGG 组延长了 13.00%, 因此酪蛋白-葡萄糖接枝共聚物的包埋能有效增强 PGG 的延缓线虫衰老能力。

关键词: 1,2,3,4,6-O-五没食子酰葡萄糖; 美拉德反应; 纳米复合物; 秀丽隐杆线虫

文章编号: 1673-9078(2016)8-21-27

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.8.004

Preparation and Anti-aging Effect of Casein-g-glucose-PGG Nanocomplexes

CHEN Yun-jiao^{1,2}, LI Wei^{1,2}, CHEN Hong-zhang¹, HUANG Qing-rong³, CAO Yong^{1,2}

(1. College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

(2. Guangdong Province Engineering Research Center for Bioactive Natural Products, Guangzhou 510642, China)

(3. Rutgers university, New Jersey 08901, USA)

Abstract: A casein and glucose copolymer was prepared by Maillard reaction and its properties investigated by gel electrophoresis, Fourier transform infrared spectroscopy, and fluorescence spectroscopy. Casein-g-glucose-PGG nanocomplexes were prepared using the solvent evaporation method to improve the water solubility and anti-aging effects of PGG in *Caenorhabditis elegans*. The results showed that the molecular weight of the conjugate product (casein-g-glucose) was larger than 11 ku. The reducing end of the glucose was covalently linked with the amino group of the protein, and the sugar molecule introduced into the casein had a d-glucopyranose ring structure. The binding force between PGG and casein, or casein-g-glucose, was mainly hydrophobic interaction, which induced the self-assembly of PGG and casein-g-glucose to form casein-g-glucose-PGG nanocomplexes. The encapsulation efficiency of the nanocomplex reached up to 62.27%, the particle size of the nanocomplexes was 265 nm, and the nanocomplexes were light-yellow powders. Nanocomplexes showed good solubility in water at a concentration of 10 mg/mL. Compared with PGG treatment, treatment with the nanocomplexes could significantly extend the mean worm lifespan by 13.00%. In conclusion, the nanocomplex can effectively increase the anti-aging effect of PGG in *C. elegans*.

Key words: pentagalloyl glucose; Maillard reaction; nanocomplex; *Caenorhabditis elegans*

收稿日期: 2016-06-25

基金项目: 广东省自然科学基金博士启动项目 (2015A030310118); 广东省教育厅科研项目 (平台) (2013gjh20003); 广东省自然科学基金自由申请项目 (2016A030313394)

作者简介: 陈运娇 (1984-), 女, 博士, 讲师, 主要从事天然活性物质抗氧化、抗衰老方面研究

通讯作者: 曹庸 (1966-), 男, 博士, 教授, 主要从事天然活性物质提取、分离、鉴定及活性评价

1,2,3,4,6-O-五没食子酰葡萄糖 (PGG) 是一种天然的单宁多酚类化合物, 具有抗癌活性、抗氧化、抗炎症、抗过敏、抗病毒和抗菌及延缓线虫衰老等多种生物学活性^[1,2]。但 PGG 是疏水性化合物, 在水中的溶解性差, 而且 PGG 是一类单宁, 具有螯合金属离子, 结合和/或沉淀蛋白的共性^[3], 这些性质降低了其稳定性、生物利用度和生物活性, 限制了其应用。

酪蛋白是牛奶中的主要组成成分, 占牛奶蛋白含量的 80% 左右。酪蛋白是由一类结构相近似的蛋白质组成的, 包括 as_1 -酪蛋白, as_2 -酪蛋白, β -酪蛋白, 和 κ -酪蛋白, 其重量比约为 4:1:4:1。酪蛋白有许多优良的功能特性, 如与人体有很好的生物相容性, 是生物活性肽的主要来源等。这些优良的功能特性使得酪蛋白可以作为理想的基材来构造活性物质载体。目前, 一些两亲性共聚物已经被开发用作水相体系中的疏水药物载体^[4]。美拉德反应是在加工、烹调 and 存储食品过程中都会发生的无毒反应。美拉德反应能生成一个新的包括亲水性和疏水性链段的两亲性生物聚合物, 与蛋白质相比, 改善了溶解性和乳化性^[5]。由两亲性纳米粒子形成的疏水性药物载体通常是自发地形成纳米复合物。作为国际上衰老研究的优秀模式生物, 秀丽隐杆线虫因其寿命短, 培养简单, 遗传操作灵活, 在研究延缓衰老方面有明显的优势^[2]。因此, 本文采用凝胶电泳、红外光谱和荧光光谱研究酪蛋白与葡萄糖美拉德接枝物的相互作用方式, 然后用溶剂蒸发法制备酪蛋白-葡萄糖-PGG 纳米复合物, 以期通过酪蛋白-葡萄糖接枝共聚物的包埋作用提高 PGG 的水溶性及延缓线虫衰老能力, 为 PGG 实际应用提供新的参考。

1 材料与方法

1.1 试剂

酪蛋白和葡萄糖(technical grade)购自 Sigma 公司。线虫生长固体培养基 (NGM) 配制: NaCl, 蛋白胨, 琼脂, 链霉素, 胆固醇, $CaCl_2$, $MgSO_4$, 制霉菌素。线虫裂解液配制: NaOH, 家用漂白剂(Clorox, USA)。其它试剂购自美国 VWR 公司。样品溶液都用去离子水配制。

1.2 美拉德反应制备酪蛋白-葡萄糖共聚物

将酪蛋白溶于去离子水中配成溶液(10 mg/mL), 并用 1.0 M 的 NaOH 溶液调节酪蛋白溶液的 pH 值至 11。然后将葡萄糖溶液(15 mg/mL)逐滴加入温和搅拌

下的酪蛋白溶液中直至酪蛋白与葡萄糖的重量比达到 1:2。当混合溶液搅拌均匀后, 将其冻干并将冻干粉末在放置了饱和 KBr 的密封干燥器中加热一定时间。反应温度为 60 °C, 反应相对湿度为 78.9%。反应结束后, 将产物置于-20 °C 的冰箱中保存备用。

1.3 酪蛋白-葡萄糖接枝共聚物/PGG 纳米粒子的制备

将 PGG 溶于无水乙醇配成溶液。将相同体积的 PGG 无水乙醇溶液和酪蛋白-葡萄糖接枝共聚物水溶液混合, 并在室温、避光下搅拌 24 h, 然后在旋转蒸发器下将混合液的溶剂抽干(20 °C)。将样品在水中重新分散后再次抽干溶剂。最后将样品溶于少量的水中, 冻干后放置-20 °C 的冰箱中备用。

1.4 粒径大小的测定

将样品溶于蒸馏水, 配制成浓度为 1 mg/mL 的溶液以用于检测样品在水溶液中的水合直径和分散系数。测试所用的仪器为美国 DLS-based BIC 90plus 粒度分析仪, 仪器配置有 Brookhaven BI-9000AT 数字相关器和激光光源, 该激光光源在波长为 658 nm 时的输出功率 30 mW。所有的测试均在 25 °C 下进行, 散射角度为 90°。信号由高灵敏度雪崩光电二极管检测, 测量到的时间相关函数由相关器自带的自动程序进行分析。结果表示为平均值±标准偏差(n=3)。

1.5 高效液相色谱

美国戴安 HPLC 仪 (UltiMate 3000 HPLC 系统, 25D UV 紫外吸收检测仪); 分析条件如下: 色谱柱为 Diamonsil C18 色谱柱 (250×4.6 mm, 5 μm); 检测波长 270 nm, 色谱洗脱条件 0%~90% 甲醇 (含有 0.2% 乙酸) 梯度洗脱 1 h, 流速为 1 mL/min; 进样量: 20 μL。

1.6 PGG 包埋率的测定

PGG 在酪蛋白-葡萄糖接枝物中的包埋率测定方法参考文献^[6]并作适当修改。

将酪蛋白-葡萄糖接枝共聚物/PGG 复合物溶液转移到 Macrosep 超滤装置 (截留分子量为 1000 Da, 美国 Pall 公司)。离心 (4000 g) 30 min 后, 超滤液中 PGG 的含量用 HPLC 法测定, 超滤装置里的酪蛋白-葡萄糖接枝共聚物/PGG 纳米粒子溶液冻干备用。PGG 包埋率用下面公式计算:

$$\text{PGG包埋率(\%)} = [(\text{PGG总量} - \text{超滤液中PGG的含量}) / \text{PGG总量}] \times 100$$

1.7 傅里叶变换红外光谱

样品红外光谱测试仪器型号为 Thermo Nicolet Nexus 670 FT-IR 系统, 仪器配置有 Smart MIRacle™ 水平衰减全反射仪 (美国, Thermo Fisher Scientific 公司)。所有的样品扫描范围为 500~4000 cm^{-1} ; 分辨率为 4 cm^{-1} ; 扫描次数为 512 次。

1.8 荧光光谱

荧光强度测试仪器为法国 Horiba Jobin Yvon 公司的 Fluoro Max-3 荧光光谱仪。设定激发波长 280 nm, 激发与发射狭缝均为 10 nm, 扫描范围的荧光发射光谱 295~500 nm。在 298 和 308 K 恒温下重复上述实验。

为了确定荧光猝灭机理, 假设蛋白质荧光体与荧光猝灭剂分子间的相互作用可以用 Stern-Volmer 动态猝灭方程^[7]描述:

$$F_0/F = 1 + K_{sv}[Q] = 1 + K_Q T_0 [Q] \quad (1)$$

其中, F_0 和 F 分别是不存在和存在猝灭剂 PGG 时的荧光强度, K_{sv} 为 Stern-Volmer 猝灭常数。[Q] 为猝灭剂 PGG 的浓度。 K_Q 为双分子猝灭过程速率常数, T_0 为猝灭剂不存在时生物大分子的荧光寿命, 值为 10^8 s。

显然通过下面的方程即可求出 K_Q ,

$$K_{sv} = K_Q T_0 \quad (2)$$

在静态猝灭中, 结合常数与荧光强度、猝灭剂浓度之间的关系可以用 Lineweaver-Burk 双倒数函数表示:

$$1/(F_0 - F) = 1/F_0 + K/(F_0[Q]) \quad (3)$$

其中 K 为结合常数。物质与蛋白质之间的主要作用力可以根据下列方程推导前后热力学焓变 ΔH 和熵变 ΔS 的相对大小判断出来。

$$\ln(k_2/k_1) = \Delta H(1/T_1 - 1/T_2)/R \quad (4)$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (5)$$

$$\Delta G = -RT\ln K \quad (6)$$

其中 ΔH , ΔG 和 ΔS 分别表示热力学焓变, 自由能变化和熵变。

1.9 凝胶电泳分析

酪蛋白和酪蛋白-葡萄糖接枝共聚物的分子量用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分析, 测试仪器为美国 Bio-Rad 公司。分离胶的浓度为 12%, 凝胶用考马斯亮蓝作为染色剂。

1.10 寿命实验

本研究使用的线虫为秀丽隐杆线虫遗传学中心

(CGC, University of Minnesota) 所提供。将刚裂解好的卵加入各组平板上, 并放入 20 °C 恒温生化培养箱中培养至 L4 期幼虫。挑取同步化的 L4 期幼虫到新的各组平板上 (每组 3 个平板, 每个平板 20 条) 继续培养。线虫生殖期每天将线虫转移到新的各组平板中, 其它时期每两天转移到新的平板中, 以保证处理化合物的浓度。

隔天计数线虫死亡、存活条数, 直至所有组线虫死亡, 实验结束 (线虫存活天数从卵孵化第一天算起)。线虫死亡判断标准: 用铂丝轻触虫体, 无任何反应, 即判断为死亡。虫卵在体内孵化而成袋样虫或逃离出培养基而干死的线虫应从统计数据中排除。每组实验都包括一对对照组。Log-rank (Mantel-Cox) tests 和单向方差分析分别用 windows 版 GraphPad Prism version 5.00 (美国加州 GraphPad 软件公司) 和 SPSS 软件 (美国芝加哥 SPSS 公司) 统计。

1.11 数据分析

用 SPSS 软件中进行 T 检验和单因素方差分析。

2 结果与讨论

2.1 美拉德反应制备酪蛋白-葡萄糖共聚物

通过 Maillard 反应将葡萄糖接枝到酪蛋白, 制备了酪蛋白-葡萄糖接枝共聚物, 提高了酪蛋白的亲水性。据报道, Maillard 反应的机制和产物受反应条件影响, 包括 pH 值、温度、反应时间和相对湿度。发现在固态状态下, 在温度接枝 60 °C, pH 10 和相对湿度为 78.9% 的条件下, 美拉德反应程度适中, 副反应也不明显。我们通过控制反应物不变褐色, 使反应控制在美拉德反应最初状态^[8]。

2.2 酪蛋白-葡萄糖共聚物的凝胶电泳及红外光谱

在 Maillard 反应后, 用凝胶电泳分析法检测产物的分子量。如图 1 所示, 美拉德反应前酪蛋白的四个组成成分显示出两条条带, 与文献报道相符^[9]。美拉德反应后, 两条比原来分子高的条带出现在凝胶上, 而原来两条条带消失。这表明在固相下美拉德反应速率比较高, 葡萄糖已经接枝到酪蛋白上, 生成了比酪蛋白分子量高的接枝物。随着反应时间的增长, 还出现一条分子量大于 116 ku 的弥散条带。这表明随着美拉德反应时间的延长, 越来越多的葡萄糖接枝到了酪蛋白上, 生成了分子量大于 116 ku 的酪蛋白-葡萄糖

接枝共聚物。为了保持美拉德反应产物成分简单, 应控制反应在初级反应阶段, 因此选用反应时间为 4 h。

为了进一步研究酪蛋白与葡萄糖之间的反应, 本研究采用傅里叶变换红外光谱仪分别检测酪蛋白、酪蛋白-葡萄糖接枝共聚物红外光谱吸收情况。如图 2 所示, 3397.09 cm^{-1} 为 N-H 伸缩振动, 1655.56 cm^{-1} 、1546.43 cm^{-1} 为 N-H 面内振动, 这些都是蛋白的特征波数。接枝物在 1345 cm^{-1} 有红外吸收, 而在 1350 cm^{-1} 左右为 O-H 面内变形振动, 这表明当蛋白与糖反应时, 糖末端的羰基与蛋白的氨基以化学共价键相连, 从而引起末端糖环内的羟基产生变形振动。923.82 cm^{-1} 为 D-吡喃葡萄糖环振动, 说明引入的糖分子中存在 D-吡喃葡萄糖环。结果表明葡萄糖的还原性末端接枝到蛋白质的胺基上。

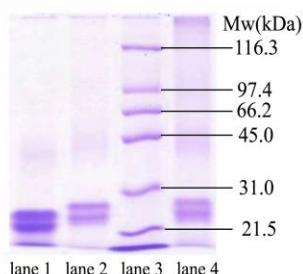


图 1 Maillard 反应 4 和 6 h 产物的凝胶电泳分析

Fig.1 SDS-PAGE patterns of the casein-g-glucose copolymer produced by four hours (Lane 2) and six hours (Lane 4) of Maillard reaction

注: 温度: 60 $^{\circ}\text{C}$; pH 值: 10; 湿度: 78.9%; 酪蛋白与葡萄糖重量比: 1:2; Lane 1: 酪蛋白; Lane 2: 酪蛋白-葡萄糖接枝共聚物 (反应 4 小时); Lane 3: Marker; Lane 4: 酪蛋白-葡萄糖接枝共聚物 (反应 6 h)。

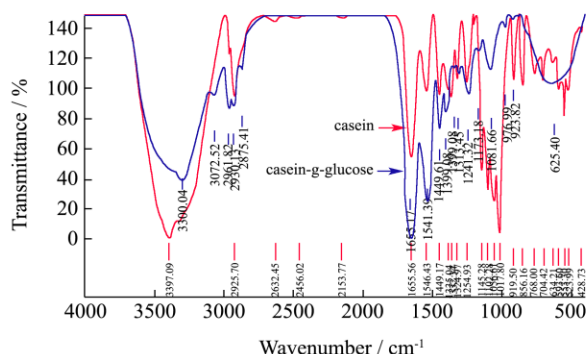


图 2 酪蛋白与酪蛋白-葡萄糖接枝物的红外光谱图

Fig.2 FT-IR spectra of casein and casein-g-glucose

2.3 PGG 与酪蛋白或酪蛋白-葡萄糖接枝共聚物荧光猝灭

酪蛋白分子中主要组成成分 α -酪蛋白, β -酪蛋白,

和 κ -酪蛋白中因含有几个色氨酸残基而产生较强的内源荧光。为了确定荧光猝灭机理, 分别测定了在 25 $^{\circ}\text{C}$ 和 35 $^{\circ}\text{C}$ 时 PGG 对酪蛋白或酪蛋白-葡萄糖接枝共聚物的荧光猝灭光谱。

一般情况下, 荧光猝灭过程可分为动态猝灭和静态猝灭。在动态猝灭过程, 温度的升高将增加分子间的有效碰撞, 使荧光猝灭常数随温度的升高而增大。而在静态猝灭过程, 温度的升高将降低复合物的稳定性, 使猝灭常数减小。各种猝灭剂对生物大分子的最大扩散碰撞猝灭常数 K_Q 为 $2 \times 10^{10} \text{ L}(\text{mol}\cdot\text{s})^{[10]}$ 。如果根据 Stern-Volmer 方程计算出的 K_Q 远大于 $2 \times 10^{10} \text{ L}(\text{mol}\cdot\text{s})$, 猝灭过程则为形成复合物所引起的静态猝灭, 而不是由于分子碰撞所引起的动态猝灭。根据 Stern-Volmer 方程推算, 所得的 PGG 与酪蛋白或酪蛋白-葡萄糖接枝共聚物相互作用的 Stern-Volmer 猝灭常数和速率常数如表 1 所示。结果表明不同温度下 K_Q 远大于 $2 \times 10^{10} \text{ L}(\text{mol}\cdot\text{s})$, 同时随着温度的升高, 猝灭常数 K_{sv} 的值减小, 这说明 PGG 与酪蛋白或酪蛋白-葡萄糖接枝共聚物之间的相互作用都是静态猝灭。

在静态猝灭中, 结合常数 K 可以用方程 3 表示, 所得的 PGG 与酪蛋白或酪蛋白-葡萄糖接枝共聚物相互作用的结合常数 K 如表 2 所示。PGG 和其它单宁的性质一样, 容易与酪蛋白、唾液蛋白质等富含脯氨酸蛋白发生反应, 形成高度交联的、不溶的复合物, 该反应为 pH 值依赖型^[11]。如表 2 所示, PGG 和酪蛋白之间的结合常数 (4.57×10^9 和 3.20×10^9) 比 PGG 和酪蛋白-葡萄糖接枝共聚物之间的结合常数 (8.25×10^8 和 4.43×10^8) 高。这表明酪蛋白-葡萄糖接枝共聚物降低了 PGG 和酪蛋白之间的结合常数, 即减少 PGG 和酪蛋白沉淀物质的生成, 增加了酪蛋白-葡萄糖-PGG 纳米复合物的稳定性。

表 1 不同温度下 PGG 与酪蛋白或酪蛋白-葡萄糖接枝共聚物相互作用的 Stern-Volmer 猝灭常数和速率常数

Table 1 Stern-Volmer quenching constants and the quenching rate constants between PGG and casein or casein-g-glucose at different temperatures

样品	T/K	$K_{sv}/(\text{L}/\text{mol})$	$K_Q/[\text{L}/(\text{mol}\cdot\text{s})]$
酪蛋白/PGG	298.00	2.07×10^6	2.07×10^{14}
	308.00	1.73×10^6	1.73×10^{14}
酪蛋白-葡萄糖接枝共聚物/PGG	298.00	8.80×10^5	8.80×10^{13}
	308.00	6.45×10^5	6.45×10^{13}

活性物与蛋白质之间有多种不同结合力, 包括氢键作用力、范德华力、静电引力和疏水作用力^[12], 不同物质与蛋白质作用力类型可能不同。在温度变化不大时, 反应的焓变 ΔH 可以看作是常数, 焓变 ΔH , 自

由能变化 ΔG 和熵变 ΔS 可以根据方程4, 5和6计算。如表2所示, 在PGG和酪蛋白、PGG和酪蛋白-葡萄糖接枝共聚物两个体系中焓变 $\Delta H < 0$, 熵变 $\Delta S > 0$, 自

由能变化 $\Delta G < 0$, 由此推测形成复合物的主要作用力是疏水作用力。

表2 不同温度下 PGG 与酪蛋白或酪蛋白-葡萄糖接枝共聚物的结合常数与热力学系数

Table 2 Binding constants and thermodynamic parameters between PGG and casein or casein-g-glucose at different temperatures

样品	T/K	K/(L/mol)	ΔG /(kJ/mol)	ΔH /(kJ/mol)	ΔS /[J/(mol·K)]
酪蛋白/PGG	298.00	4.57×10^9	-55107.74	-27158.68	93.79
	308.00	3.20×10^9	-56045.62		
酪蛋白-葡萄糖接枝共聚物/PGG	298.00	8.25×10^8	-50865.68	-47429.94	11.53
	308.00	4.43×10^8	-50980.97		

2.4 酪蛋白-葡萄糖-PGG 纳米复合物的制备

两亲分子对疏水性物质的包埋方法很大程度上取决于载体粒子的制备方法。常用的包埋方法有透析法和溶剂蒸发法等^[13]。本研究用溶剂蒸发法将 PGG 包埋到酪蛋白-葡萄糖接枝共聚物中。溶剂蒸发法是将疏水性物质和共聚物溶于它们的有机共同溶剂中, 然后将溶剂完全蒸发并用水重新分散混合物^[14], 这样就可以得到载活性物质粒子。

首先, 我们通过美拉德反应制备出酪蛋白-葡萄糖接枝共聚物。然后将共聚物和 PGG 分别溶于水和无水乙醇, 量取相同体积的共聚物水溶液和 PGG 无水乙醇溶液并混合在一起。据文献报道, 水和乙醇在 0 °C 的蒸汽压分别为 4.6 和 12.3 mmHg。因此在蒸发过程中, 乙醇会优先蒸发掉, 样品中剩余乙醇的比例会逐步降低, 溶液的极性增强。在疏水作用下, PGG 与酪蛋白逐渐聚合在一起, 接枝在酪蛋白上的葡萄糖伸展水相里, 从而增加了粒子的稳定性。

制备过程中共聚物和 PGG 以两种不同浓度混合在一起, 通过检测粒子大小和 PGG 包埋率来判断酪蛋白-葡萄糖-PGG 复合物制备的效果, 结果如表3所示。随着共聚物和 PGG 浓度的提高, 粒子大小由 125 nm 增大到 339 nm, 而 PGG 包埋率从 62% 下降到 30%。因此, 我们选取 1 mg/mL 共聚物和 1 mg/mL PGG 混合在一起制备纳米粒子。

表3 不同浓度制备的粒子大小和 PGG 包埋率

Table 3 The particle size and encapsulation efficiency of PGG loaded casein-g-glucose nanoparticles

Conc ratio of PGG and casein-g-glucose	Diameter (Mean±SD)/nm	Poly dispersity	Encapsulation efficiency/%
1 mg/mL:1 mg/mL	265.33±10.07	0.33±0.03	62.27±3.06
5 mg/mL:5 mg/mL	338.87±5.85	0.31±0.02	29.90±0.01

2.5 酪蛋白-葡萄糖接枝共聚物/PGG 纳米粒子的

的物理性质

如图3所示, PGG 为淡棕色粉末, 酪蛋白-葡萄糖接枝共聚物/PGG 纳米粒子为淡黄色粉末。当浓度为 2 mg/mL 或 10 mg/mL, 酪蛋白-葡萄糖-PGG 复合物在水中溶解度较好, 其水溶液透明。但 PGG 水溶解度较差, 会形成悬浊液和沉淀, 即使其浓度为 2 mg/mL。这表明酪蛋白-葡萄糖-PGG 纳米复合物增加了 PGG 水溶性。

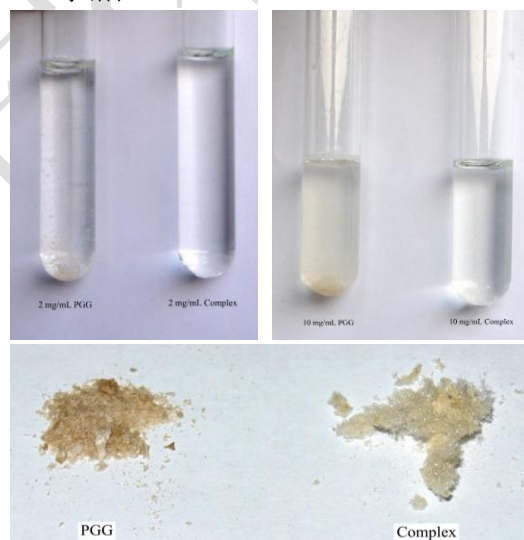


图3 PGG 与 PGG 纳米粒子的溶解情况及外观情况

Fig.3 Dissolution and appearance of PGG and PGG nanocomplexes

不同 pH 值下物质的水合直径如图4所示。总体上, 酪蛋白-葡萄糖-PGG 纳米复合物的水合直径比酪蛋白-葡萄糖接枝共聚物和酪蛋白的水合直径大, 可能粒子的尺寸随着聚集链的增加而增大。

在 pH 为 4 时, 酪蛋白、酪蛋白-葡萄糖接枝共聚物和酪蛋白-葡萄糖-PGG 纳米复合物三者的尺寸比在其它 pH 值时要大, 这可能在 pH 为 4 时离酪蛋白分子等电点 (pH 4.6) 较近, 其溶解度降低, 而且溶液的多分散性提高 0.25 (pH 2) 时到 0.39 (pH 4), 所以

可能粒子之间发生聚集。在 pH 4 时，酪蛋白-葡萄糖接枝共聚物和酪蛋白-葡萄糖-PGG 纳米复合物两者的尺寸比酪蛋白的尺寸小，可能是接枝在酪蛋白上的葡萄糖增加了两者粒子的稳定性，一定程度上减少了聚集的发生。

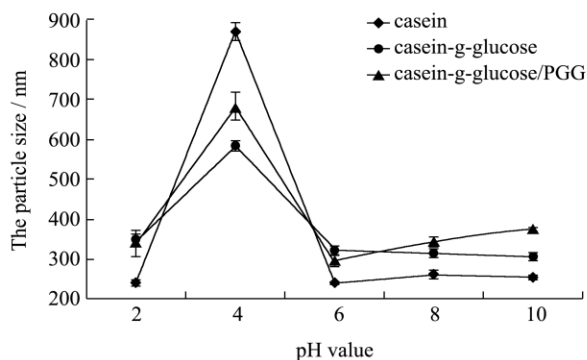


图 4 不同 pH 值下物质的水合直径

Fig4 Partide size of complexes at different pH levels

综上所述，酪蛋白-葡萄糖-PGG 纳米复合物为淡黄色粉末，在水中溶解度较好，其水溶液透明。在酪蛋白等电点周围的 pH 中，酪蛋白-葡萄糖接枝共聚物和酪蛋白-葡萄糖-PGG 纳米复合物两者的尺寸比酪蛋白的尺寸小。

2.6 酪蛋白-葡萄糖-PGG 纳米复合物延缓线虫衰老能力

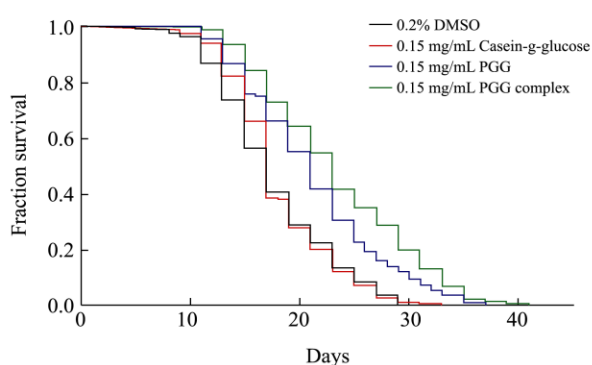


图 5 处理组的线虫的生长曲线

Fig5 Survival curves of wild-type *Caenorhabditis elegans* (N2) worms with different treatments

注：处理组分别为 0.2% DMSO: 0.2% 二甲基亚砷; 0.15 mg/mL Casein-g-glucose: 酪蛋白-葡萄糖接枝共聚物; 0.15 mg/mL PGG: 0.15 mg/mL 1,2,3,4,6-O-五没食子酰葡萄糖; 0.15 mg/mL PGG complex: 酪蛋白-葡萄糖-PGG 纳米复合物。

本团队前期研究^[2]发现 PGG 能显著地提高线虫的平均寿命和中位值寿命，同时能使存活曲线右移。为进一步研究酪蛋白-葡萄糖接枝共聚物自组装前后对 PGG 生物活性的影响，我们以秀丽隐杆线虫为模

型研究了其延缓线虫衰老能力的变化。对线虫全程存活情况作生存曲线（图 5），与酪蛋白-葡萄糖接枝共聚物组（casein-g-glucose）和 PGG 组比较，酪蛋白-葡萄糖-PGG 纳米复合物存活曲线显著右移（Log-rank 测验中 $p < 0.0001$ ），并分别延长了平均寿命 31.20% 和 13.00%（表 4），从而表明，酪蛋白-葡萄糖-PGG 纳米复合物比 PGG 单体具有更强的延缓寿命作用。与 0.2% DMSO 对照组比较，酪蛋白-葡萄糖接枝共聚物组的线虫平均寿命没有显著差异，表明酪蛋白-葡萄糖接枝共聚物对线虫寿命没有明显影响，从而排除共聚物对结果的影响。由此可得，自组装的酪蛋白-葡萄糖-PGG 纳米复合物比 PGG 具有更强的延缓衰老能力。

表 4 各组线虫寿命比较 (d, 平均值±标准差)

Table 4 Comparison of the lifespan of *Caenorhabditis elegans* with different treatments (days, mean ±SD)

组别	平均寿命	中位值寿命	最大寿命	n
0.2% DMSO	17.04±1.76 ^a	16.3±1.2 ^a	28.3±1.2 ^a	135
0.15 mg/mL酪蛋白-葡萄糖接枝共聚物	17.63±1.73 ^a	17.0±0.0 ^a	29.0±3.5 ^a	148
0.15 mg/mL PGG	20.69±0.34 ^b	20.3±2.3 ^b	35.7±3.1 ^b	126
0.15 mg/mL PGG 纳米复合物	23.26±1.02 ^c	23.0±0.0 ^c	37.7±3.1 ^b	163

注：数据分析为单因素方差分析（SPSS 13），表中不同字母表示显著性差异（ $p < 0.05$ ）。

3 结论

3.1 通过美拉德反应制备了酪蛋白-葡萄糖接枝共聚物，生成的接枝物分子量大于 110 ku。红外光谱表明糖末端的羰基与蛋白的氨基以化学共价键相连，酪蛋白中引入的糖分子具有 D-吡喃葡萄糖环结构。PGG 与酪蛋白或酪蛋白-葡萄糖作用力主要为疏水力。

3.2 采用蒸发法，使 PGG 与酪蛋白-葡萄糖接枝共聚物在疏水力诱导下协同组装得到酪蛋白-葡萄糖-PGG 纳米复合物。该纳米粒子外观呈淡黄色，在水中溶解度较好，粒径为 265 nm。

3.3 酪蛋白-葡萄糖接枝共聚物对线虫寿命没有明显影响。自组装的酪蛋白-葡萄糖-PGG 纳米复合物比 PGG 单体具有更强的延缓衰老能力。

参考文献

[1] Chen Y, Wang J, Oua Y, et al. Cellular antioxidant activities of polyphenols isolated from eucalyptus leaves (*Eucalyptus grandis* × *Eucalyptus urophylla* GL9) [J]. Journal of Functional Food, 2014, 7: 737-745

[2] Chen Y, Onken B, Chen H, et al. Mechanism of longevity extension of caenorhabditis elegans induced by pentagalloyl glucose isolated from eucalyptus leaves [J].

- Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(15): 3422-3431
- [3] Zhang J, Li L, Kim S H, et al. Anti-cancer, anti-diabetic and other pharmacologic and biological activities of penta-galloyl-glucose [J]. *Pharm. Res.*, 2009, 26(9): 2066-2080
- [4] Allen C, Maysinger D, Eisenberg A. Nano-engineering block copolymer aggregates for drug delivery [J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 1999, 16(1): 3-27
- [5] Wooster T J, Augustin M A. β -Lactoglobulin-dextran Maillard conjugates: their effect on interfacial thickness and emulsion stability [J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2006, 303(2): 564-572
- [6] Hu B, Ting Y, Zeng X, et al. Bioactive peptides/chitosan nanoparticles enhance cellular antioxidant activity of (-)-epigallocatechin-3-gallate [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, 61(4): 875-881
- [7] Lakowicz J R. Principles of fluorescence spectroscopy [M]. Springer, 2009
- [8] Fayle S E. The maillard reaction [M]. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2002
- [9] Shepherd R, Robertson A, Ofman D. Dairy glycoconjugate emulsifiers: casein-maltodextrins [J]. *Food Hydrocolloids*, 2000, 14(4): 281-286
- [10] Ware W R. Oxygen quenching of fluorescence in solution: an experimental study of the diffusion process [J]. *The Journal of Physical Chemistry*, 1962, 66(3): 455-458
- [11] Hagerman A E, Rice M E, Ritchard N T. Mechanisms of protein precipitation for two tannins, pentagalloyl glucose and epicatechin16 (4 \rightarrow 8) catechin (procyanidin) [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1998, 46(7): 2590-2595
- [12] Ross P D, Subramanian S. Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability [J]. *Biochemistry*, 1981, 20(11): 3096-3102
- [13] Kwon G S, Okano T. Polymeric micelles as new drug carriers [J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1996, 21(2): 107-116
- [14] Lavasanifar A, Samuel J, Kwon G S. Poly (ethylene oxide)-block-poly (l-amino acid) micelles for drug delivery [J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2002, 54(2): 169-190