



(21) 申请号 201980089030.5

(22) 申请日 2019.11.15

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 113302236 A

(43) 申请公布日 2021.08.24

(30) 优先权数据
62/767,903 2018.11.15 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2021.07.14

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/CA2019/051635 2019.11.15

(87) PCT国际申请的公布数据
W02020/097740 EN 2020.05.22

(73) 专利权人 赛格里福公司
地址 加拿大安大略省

(72) 发明人 G·帕利亚特 K·蒂瓦里
R·钱德拉斯卡兰
J·科雷亚-贝坦佐 P·巴马纳班
J·苏布拉曼尼安

(74) 专利代理机构 北京市立方律师事务所
11330
专利代理师 李娜

(51) Int.Cl.

C08L 5/00 (2006.01)
A01N 25/10 (2006.01)
A01P 1/00 (2006.01)
A23L 29/206 (2006.01)
A23L 33/10 (2006.01)
A23L 33/105 (2006.01)
A23L 33/21 (2006.01)
A61K 31/715 (2006.01)
A61K 47/36 (2006.01)
A61K 47/61 (2006.01)
A61K 8/73 (2006.01)
A61P 3/06 (2006.01)
A61P 3/08 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61Q 17/04 (2006.01)
C08L 5/06 (2006.01)
C08L 5/14 (2006.01)
D01C 1/02 (2006.01)

(56) 对比文件

曹锦萍.“樱桃果肉中抗氧化和免疫调节活性物质的分离与结构鉴定”.《中国优秀博硕士学位论文全文数据库(博士)农业科技辑》.2016,(第03期),D048-12.

审查员 李佳佳

权利要求书3页 说明书106页 附图52页

(54) 发明名称

植物组织来源的纳米纤维

(57) 摘要

本文提供了纳米纤维,其包含来源于均质化的植物组织的自组装细胞组分。还描述了用于制备此类纳米纤维的方法,以及其在治疗或预防受试者的疾病或病症中和/或作为递送载体的用途。

1. 一种纳米纤维, 包含来源于具有低多酚含量的均质化的植物组织的自组装细胞组分, 所述均质化的植物组织来源于樱桃, 所述细胞组分包含一种或多种结构碳水化合物或碳水化合物的裂解产物, 其中, 脂质和多酚不是所述纳米纤维的结构组分, 其中所述纳米纤维是非结晶的, 不含脂质, 且不含多酚, 其中所述纳米纤维包括细长纤维, 所述细长纤维包含一根或多根股线, 所述一根或多根股线含有至少一种结构碳水化合物或由至少一种结构碳水化合物制成, 并且其中, 多酚在均质化之前从所述植物组织中去除。

2. 根据权利要求1所述的纳米纤维, 其中, 所述纳米纤维包含果胶、半纤维素、肽和/或蛋白质、有机酸、它们的裂解产物、或它们的任何组合。

3. 根据权利要求2所述的纳米纤维, 其中, 所述有机酸包括苹果酸、抗坏血酸、或两者。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的纳米纤维, 其中, 所述细胞组分包括在成熟水果的成熟期间或均质化期间从所述植物组织释放的那些细胞组分, 其能够自组装成所述纳米纤维。

5. 根据权利要求1所述的纳米纤维, 其中, 所述一种或多种结构碳水化合物包括果胶、果胶衍生物、聚半乳糖醛酸、鼠李糖聚半乳糖醛酸、木葡聚糖、半纤维素、和/或阿拉伯半乳糖、和/或它们的裂解产物中的一种或多种。

6. 根据权利要求5所述的纳米纤维, 其中, 所述木葡聚糖包括具有 β -(1 $\rightarrow$ 4)连接的葡萄糖、甘露糖、或木糖主链的木葡聚糖。

7. 根据权利要求1至3中任一项所述的纳米纤维, 所述纳米纤维具有直径为5-10nm的纤维形状。

8. 根据权利要求1至3中任一项所述的纳米纤维, 其中, 所述纳米纤维可以通过氢键相互作用而稳定, 并且在来源于所述植物组织的细胞组分分解代谢并且具有羟基和/或氨基和/或有机酸基团的大分子之间形成。

9. 根据权利要求1至3中任一项所述的纳米纤维, 所述纳米纤维还可以包括生物活性剂。

10. 根据权利要求9所述的纳米纤维, 其中, 所述生物活性剂是药学活性药物、蛋白质、酶、营养制剂、或营养物。

11. 根据权利要求1至3中任一项所述的纳米纤维, 所述纳米纤维在水性溶液中。

12. 根据权利要求1至3中任一项所述的纳米纤维, 所述纳米纤维为粉末形式。

13. 根据权利要求1至3中任一项所述的纳米纤维, 所述纳米纤维为脱水的形式。

14. 根据权利要求1至3中任一项所述的纳米纤维, 所述纳米纤维为冷冻干燥或喷雾干燥的形式。

15. 根据权利要求1至3中任一项所述的纳米纤维, 所述纳米纤维为纳米喷雾干燥的形式。

16. 根据权利要求1至3中任一项所述的纳米纤维, 其中, 所述樱桃是酸樱桃。

17. 一种用于由均质化的植物组织制备纳米纤维的方法, 所述方法包括:

在具有低多酚含量的溶液中制备均质化的植物组织, 所述均质化的植物组织来源于樱桃, 所述溶液包含从所述植物组织释放的细胞组分;

如果存在碎片, 从所述均质化的植物组织中去除所述碎片,

由此提供包含所述纳米纤维的溶液, 所述纳米纤维通过所述细胞组分的自组装形成;

其中脂质和多酚不是所述纳米纤维的结构组分,其中所述纳米纤维是非结晶的,不含脂质,且不含多酚,其中所述纳米纤维包括细长纤维,所述细长纤维包含一根或多根股线,所述一根或多根股线含有至少一种结构碳水化合物或由至少一种结构碳水化合物制成,并且其中,多酚在均质化之前从所述植物组织中去除。

18.根据权利要求17所述的方法,还包括对所述均质化的植物组织进行透析以去除未复合的化合物,或通过尺寸排阻去除所述未复合的化合物。

19.根据权利要求17所述的方法,还包括将包含所述纳米纤维的所述溶液脱水的步骤。

20.根据权利要求17所述的方法,还包括将包含所述纳米纤维的所述溶液冷冻干燥或喷雾干燥的步骤。

21.根据权利要求17所述的方法,还包括将包含所述纳米纤维的所述溶液纳米喷雾干燥的步骤。

22.根据权利要求17至21中任一项所述的方法,其中,所述纳米纤维通过在水性的介质中自组装形成。

23.根据权利要求17至21中任一项所述的方法,其中,在溶液中制备所述均质化的植物组织的步骤包括在水性、有机或混合的水性-有机介质中均质化植物组织。

24.根据权利要求17至21中任一项所述的方法,其中,在溶液中制备所述均质化的植物组织的步骤包括在包含水、乙醇、甲醇、或丙酮中的任何一种或多种的水性、有机、或混合的水性-有机介质中对植物组织进行高剪切均质化和/或超声处理。

25.根据权利要求17至21中任一项所述的方法,其中,在溶液中制备所述均质化的植物组织的步骤包括漂白所述植物组织以从中去除多酚的步骤。

26.根据权利要求25所述的方法,其中,所述漂白包括用提取溶剂从所述植物组织进行多酚的提取。

27.根据权利要求26所述的方法,其中,所述提取溶剂包括乙醇。

28.根据权利要求22所述的方法,其中,所述去除碎片的步骤包括透析、过滤所述均质化的植物组织、离心所述均质化的植物组织、或对所述均质化的植物组织进行切向流过滤或连续流过滤、或它们的任何组合。

29.根据权利要求17至21中任一项所述的方法,其中,所述樱桃是酸樱桃。

30.根据权利要求17至21中任一项所述的方法,其中,所述方法用于制备根据权利要求1至16中任一项所限定的纳米纤维。

31.一种用于由均质化的植物组织制备纳米纤维的方法,所述方法包括:

在具有低多酚含量的溶液中制备均质化的植物组织,所述均质化的植物组织来源于樱桃,所述溶液包含从所述植物组织释放的细胞组分;

如果存在碎片,从所述均质化的植物组织中去掉所述碎片;

允许通过所述细胞组分的自组装形成所述纳米纤维;以及

冷冻干燥或喷雾干燥以形成包含所述纳米纤维的粉末,

其中脂质和多酚不是所述纳米纤维的结构组分,其中所述纳米纤维是非结晶的,不含脂质,且不含多酚,其中所述纳米纤维包括细长纤维,所述细长纤维包含一根或多根股线,所述一根或多根股线含有至少一种结构碳水化合物或由至少一种结构碳水化合物制成,并且其中,多酚在均质化之前从所述植物组织中去掉。

32. 根据权利要求31所述的方法,其中,所述自组装发生在水性介质中。
33. 根据权利要求31或32所述的方法,其中,所述喷雾干燥是纳米喷雾干燥。
34. 根据权利要求31或32所述的方法,其中,在溶液中制备所述均质化的植物组织的步骤包括在水性、有机或混合的水性-有机介质中均质化植物组织。
35. 根据权利要求31或32所述的方法,其中,在溶液中制备所述均质化的植物组织的步骤包括在包含水、乙醇、甲醇、或丙酮中的任何一种或多种的水性、有机、或混合的水性-有机介质中对植物组织进行高剪切均质化和/或超声处理。
36. 根据权利要求31或32所述的方法,其中,在溶液中制备所述均质化的植物组织的步骤包括漂白所述植物组织以从中去除多酚的步骤。
37. 根据权利要求36所述的方法,其中,所述漂白包括用提取溶剂从所述植物组织进行多酚的提取。
38. 根据权利要求37所述的方法,其中,所述提取溶剂包括乙醇。
39. 根据权利要求31或32所述的方法,其中,所述去除碎片的步骤包括透析、过滤所述均质化的植物组织、离心所述均质化的植物组织、或对所述均质化的植物组织进行切向流过滤或连续流过滤、或它们的任何组合。
40. 根据权利要求31或32所述的方法,其中,所述植物组织包括用提取溶剂提取以从中去除多酚的植物组织。
41. 根据权利要求40所述的方法,其中,所述提取溶剂包括乙醇。
42. 根据权利要求31或32所述的方法,其中,所述樱桃是酸樱桃。
43. 根据权利要求31或32所述的方法,其中,所述方法用于制备根据权利要求1至16中任一项所限定的纳米纤维。
44. 一种纳米纤维,通过根据权利要求17至43中任一项所限定的方法制备。
45. 一种食物粉末,通过根据权利要求1至16或44中任一项所限定的纳米纤维制备。
46. 根据权利要求45所述的食物粉末,其中,所述食物粉末以微米级细粉形式提供。
47. 一种靶向纳米纤维,包含根据权利要求1至16或44中任一项所限定的纳米纤维,所述靶向纳米纤维与对癌症标志物特异的靶向抗体缀合。
48. 根据权利要求47所述的靶向纳米纤维,其中,所述靶向抗体包括PD-L1抗体或其抗原结合片段,用于将所述靶向纳米纤维靶向至癌细胞。
49. 根据权利要求47或48所述的靶向纳米纤维,其中,所述靶向纳米纤维与至少一种细胞毒性药物或抗癌药物复合或缀合。
50. 根据权利要求49所述的靶向纳米纤维,其中,所述靶向纳米纤维与紫杉醇、阿霉素或两者复合或缀合。
51. 一种抗菌纳米纤维,包含根据权利要求1至16或44中任一项所限定的纳米纤维,所述纳米纤维与抗菌剂复合或缀合。
52. 根据权利要求51所述的抗菌纳米纤维,其中,所述抗菌剂包括溶菌酶、四环素、或乳链菌肽、或它们的任何组合。
53. 根据权利要求51或52所述的抗菌纳米纤维,所述抗菌纳米纤维用于治疗或预防MDR细菌感染。

植物组织来源的纳米纤维

[0001] 发明领域

[0002] 本发明总体上涉及纳米纤维及其用途。更具体地,本发明涉及植物组织来源的纳米纤维及其用途。

背景技术

[0003] 水果是膳食组分的丰富来源,其范围从提供能量的简单分子(如糖)到具有多种疾病预防和健康调节功能的用作膳食纤维、维生素、矿物质和营养品的复合大分子(如纤维素和果胶)(Paliyath等人,2011)。多酚,尤其是类黄酮及其衍生物,由于其众多的生物学效应,例如清除自由基、调节酶活性、抑制细胞增殖,以及它们作为抗生素、抗过敏剂和抗炎剂的潜在用途,最近越来越受到关注(Clifford和Brown,2006)。多酚已被证明在预防心血管疾病、癌症和其他退行性疾病方面具有潜在作用(Scalbert等人,2005;Paliyath等人,2010)。由于它们广泛分布于植物来源的食品和饮料(包括果汁、茶、咖啡和葡萄酒)中,多酚可能被认为是人类饮食中常见的微量营养素。消费富含多酚的食物已被推广为预防慢性病发展以及降低慢性病死亡率的一种手段。

[0004] 多酚在体内的生物活性取决于其吸收和代谢,以及摄入后在体内的分布(Clifford和Brown,2006年)。在胃肠道(GIT)的情况下,上皮细胞与这些组分或其代谢物接触。食品中多酚的含量范围可为100-5000 mg/kg(Manach等人,2004);然而,膳食多酚在肠道内的吸收程度相对较小(Spencer和Rice Evans,2003)。游离酚类组分的血浆和组织水平一般在低微摩尔范围内。同样,有人提出,由于食物基质相互作用,并非所有消耗的酚类组分都是生物可利用的(Saura-Calixto和Diaz-Rubio,2007;Saura-Calixto等人,2007;Del Rio等人,2010)。了解饮食衍生结构的性质和作用很重要,因为它们的研究影响了对食物衍生纳米材料对人类健康的影响的理解。

[0005] 随着工程纳米材料在世界范围内的应用日益增加,纳米材料对人体健康的影响日益受到关注(Maynard,2006)。工程化纳米材料可以作为空气传播的纳米结构团聚体(例如银纳米颗粒、TiO₂)或SWNT(单壁碳纳米管)逃逸到环境中,并通过吸入、摄入和穿透皮肤进入体内,随后移动到其他器官中。钛和锌的纳米颗粒越来越多地用于化妆品工业来自生物组分的工程化纳米材料也在药物递送、化妆品、食品成分、涂料、食品包装等中被探索(Azeredo等人,2009;Ramasamy等人,2009;Zhao等人,2011;Sessa等人,2011;Zhang等人,2012)。纳米材料也可以通过食物链进入身体,尤其是通过消耗已经从土壤、水和空气中积累了这些材料的植物衍生的食物(Rico等人,2011)。食品中存在的大分子具有自组装成纳米结构的潜力将特别重要(IOM,2009)。例如,已经观察到无定形碳纳米颗粒的潜在形成存在于焦糖化的食品中(Palashuddin等人,2012)。

[0006] 替代的、另外的和/或改进的纳米材料和/或用于其生产的方法是期待的。

发明内容

[0007] 本公开的目的是提供可来源于天然来源(即植物组织)的纳米纤维,其用作食品补

充剂、用于治疗 and/或预防某些疾病或病症、和/或用于将生物活性剂递送至有需要的受试者。还提供了其生产方法。

[0008] 在一个实施方式中,本文提供了一种包含来源于均质化的植物组织的自组装细胞组分的纳米纤维,该细胞组分包含一种或多种结构碳水化合物或其裂解产物,其中,脂质和多酚不是纳米纤维的结构组分。

[0009] 在上述纳米纤维的另一实施方式中,纳米纤维可以基本上不含脂质、可以基本上不含多酚、或两者都不含。

[0010] 在任何上述一种或多种纳米纤维中的又一实施方式中,纳米纤维可以包括:

[0011] 细长纤维,该细长纤维包含含有至少一种结构碳水化合物或由至少一种结构碳水化合物制成的一根或多根股线。

[0012] 在任何上述一种或多种纳米纤维中的又一实施方式中,纳米纤维可以包括果胶、半纤维素、肽和/或蛋白质、有机酸、它们的裂解产物、或它们的任何组合。

[0013] 在任何上述一种或多种纳米纤维中的又一实施方式中,有机酸可以包括苹果酸、抗坏血酸、或两者。

[0014] 在任何上述一种或多种纳米纤维中的又一实施方式中,细胞组分可以包括在成熟水果的成熟期间或均质化期间从植物组织中释放的那些,其能够自组装成纳米纤维。

[0015] 在任何上述一种或多种纳米纤维中的又一实施方式中,一种或多种结构碳水化合物可以包括果胶、果胶酸、果胶甲酯、果胶衍生物、聚半乳糖醛酸、鼠李糖聚半乳糖醛酸、木葡聚糖、半纤维素、具有 β -(1 $\rightarrow$ 4)连接的葡萄糖、甘露糖、或木糖主链的木葡聚糖、和/或阿拉伯半乳糖、和/或它们的裂解产物中的一种或多种。

[0016] 在任何上述一种或多种纳米纤维中的另一实施方式中,纳米纤维可以具有直径为约5-10 nm的纤维形状。

[0017] 在任何上述一种或多种纳米纤维中的又一实施方式中,纳米纤维可以通过氢键相互作用而稳定,并且在来源于植物组织细胞组分分解代谢并且具有羟基和/或氨基和/或有机酸基团的大分子之间形成。

[0018] 在任何上述一种或多种纳米纤维的又一实施方式中,纳米纤维可以是非结晶的。

[0019] 在任何上述一种或多种纳米纤维的又一实施方式中,纳米纤维还可以包含生物活性剂。

[0020] 在任何上述一种或多种纳米纤维的又一实施方式中,生物活性剂可以是药学活性药物、蛋白质、酶、营养制剂、或营养物。

[0021] 在任何上述一种或多种纳米纤维的又一实施方式中,纳米纤维可以在水溶液中。

[0022] 在任何上述一种或多种纳米纤维的又一实施方式中,纳米纤维可以是粉末形式。

[0023] 在任何上述一种或多种纳米纤维的又一实施方式中,纳米纤维可以是脱水、冻干、冷冻干燥的、喷雾干燥或纳米喷雾干燥的形式。

[0024] 在任何上述一种或多种纳米纤维的又一实施方式中,植物组织可以包含水果或蔬菜植物组织,和/或多酚可以在均质化之前已从植物组织中去除。

[0025] 在任何上述一种或多种纳米纤维的又一实施方式中,植物组织可以包含衰老水果、成熟蔬菜或它们的任何组合;优选地,其中,植物组织包括樱桃、蓝莓、葡萄、桃子、油桃、李子、杏子、番木瓜、番茄、或它们的任何组合。

[0026] 在任何上述一种或多种纳米纤维的又一实施方式中,植物组织可以包括酸樱桃水果组织。

[0027] 在又一实施方式中,本文提供了一种用于由均质化的植物组织制备纳米纤维的方法,该方法包括:

[0028] 在具有低多酚含量的溶液中制备均质化的植物组织,该溶液包含从植物组织释放的细胞组分;

[0029] 如果存在碎片,从均质化的植物组织中去除碎片;以及

[0030] 任选地,对均质化的植物组织进行透析以去除未复合的化合物,或通过尺寸排阻去除未复合的化合物,

[0031] 由此提供包含通过细胞组分的自组装形成的纳米纤维的溶液。

[0032] 在上述方法的另一实施方式中,该方法还可以包括将包含纳米纤维的溶液脱水、冻干、冷冻干燥、喷雾干燥或纳米喷雾干燥的步骤。

[0033] 在任何上述任何上述一种或多种方法的又一实施方式中,纳米纤维可以通过在基本上水性的介质中自组装形成。

[0034] 在任何上述任何上述一种或多种方法的又一实施方式中,在溶液中制备均质化的植物组织的步骤可以包括在水性、有机或混合的水性-有机介质中均质化植物组织。

[0035] 在任何上述任何上述一种或多种方法的又一实施方式中,在溶液中制备均质化的植物组织的步骤可以包括在包含水、乙醇、甲醇或丙酮中的任何一种或多种的水性、有机或混合的水性-有机介质中对植物组织进行高剪切均质化和/或超声处理。

[0036] 在任何上述任何上述一种或多种方法的又一实施方式中,在溶液中制备均质化的植物组织的步骤可以包括在均质化植物组织之前漂白植物组织以从中去除多酚的步骤。

[0037] 在任何上述任何上述一种或多种方法的另一实施方式中,漂白可以包括用提取溶剂从植物组织中提取多酚。

[0038] 在任何上述任何上述一种或多种方法的又一实施方式中,提取溶剂可以包括乙醇。

[0039] 在任何上述任何上述一种或多种方法的又一实施方式中,去除碎片的步骤可以包括透析、过滤均质化的植物组织、离心均质化的植物组织、或对均质化的植物组织进行切向流过滤或连续流过滤、或它们的任何组合。

[0040] 在任何上述一种或多种方法的又一实施方式中,方法可以用于制备任何上述一种或多种纳米纤维。

[0041] 在另一实施方式中,本文提供了一种用于由均质化的植物组织制备纳米纤维的方法,该方法包括:

[0042] 在具有低多酚含量的溶液中制备均质化的植物组织,该溶液包含从植物组织释放的细胞组分;

[0043] 如果存在碎片,从均质化的植物组织中去除碎片;

[0044] 允许通过细胞组分的自组装形成纳米纤维;以及

[0045] 冷冻干燥、喷雾干燥或纳米喷雾干燥以形成包含纳米纤维的粉末。

[0046] 在上述方法的另一实施方式中,自组装可以在基本上水性的介质中发生。

[0047] 在任何上述一种或多种方法的又一实施方式中,在溶液中制备均质化的植物组织

的步骤可以包括在水性、有机或混合的水性-有机介质中均质化植物组织。

[0048] 在任何上述一种或多种方法的又一实施方式中,在溶液中制备均质化的植物组织的步骤可以包括在包含水、乙醇、甲醇或丙酮中的任何一种或多种的水性、有机或混合的水性-有机介质中对植物组织进行高剪切均质化和/或超声处理。

[0049] 在任何上述一种或多种方法的又一实施方式中,在溶液中制备均质化的植物组织的步骤可以包括在均质化植物组织之前漂白植物组织以从其中去除多酚的步骤。

[0050] 在任何上述一种或多种方法的又一实施方式中,漂白可以包括用提取溶剂从植物组织中提取多酚。

[0051] 在任何上述一种或多种方法的又一实施方式中,提取溶剂可以包括乙醇。

[0052] 在任何上述一种或多种方法的另一实施方式中,去除碎片的步骤可以包括透析、过滤均质化的植物组织、离心均质化的植物组织、或对均质化的植物组织进行切向流过滤或连续流过滤、或它们的任何组合。

[0053] 在任何上述一种或多种方法的又一实施方式中,植物组织可以包括用提取溶剂提取以从中去除多酚的植物组织。

[0054] 在任何上述一种或多种方法的另一实施方式中,提取溶剂可以包括乙醇。

[0055] 在任何上述一种或多种方法的又一实施方式中,方法可以用于制备任何上述一种或多种纳米纤维。

[0056] 在另一实施方式中,本文提供了一种通过任何上述一种或多种方法制备的纳米纤维。

[0057] 在另一实施方式中,本文提供了一种由任何上述一种或多种纳米纤维制备的食物粉末,任选地其中,该食物粉末以微米级细粉形式提供。

[0058] 在另一实施方式中,本文提供了一种将生物活性剂递送至有需要的受试者或细胞的方法,该方法包括:

[0059] 向受试者施用与生物活性剂复合或缀合的任何上述一种或多种纳米纤维。

[0060] 在上述方法的另一实施方式中,生物活性剂可以是诸如硒、锌、铁或镁的元素。

[0061] 在任何上述一种或多种方法的又一实施方式中,生物活性剂可以是抗癌药物,并且受试者可以是患有癌症的受试者。

[0062] 在任何上述一种或多种方法的又一实施方式中,抗癌药物可以是紫杉醇、长春新碱、或用于治疗癌症的任何天然或合成的化合物。

[0063] 在任何上述一种或多种方法的又一实施方式中,生物活性剂可以在纳米纤维形成期间被引入纳米纤维中,或者生物活性剂可以在任选地包含醇或其他有机组分的水基介质中与已形成的纳米纤维复合或缀合。

[0064] 在任何上述一种或多种方法的另一实施方式中,水基介质可以包含DMSO、或缓冲液、或两者。

[0065] 在又一实施方式中,本文提供了在有需要的受试者中治疗或预防癌症的方法,该方法包括:

[0066] 向受试者施用任何上述一种或多种纳米纤维。

[0067] 在上述方法的另一实施方式中,纳米纤维可以与抗癌药物同时联合施用或依次联合施用。

- [0068] 在任何上述一种或多种方法的又一实施方式中,纳米纤维可以与抗癌药物复合或缀合。
- [0069] 在任何上述一种或多种方法的又一实施方式中,抗癌药物可以是紫杉醇或长春新碱。
- [0070] 在另一实施方式中,本文提供了一种用于向受试者提供可溶性膳食纤维的方法,该方法包括:
- [0071] 向受试者施用任何上述一种或多种纳米纤维。
- [0072] 在又一实施方式中,本文提供了一种包含任何上述一种或多种纳米纤维的增粘食品添加剂。
- [0073] 在另一实施方式中,本文提供了一种用于降低有需要的受试者的血液中的餐后血糖水平的方法,该方法包括:
- [0074] 向受试者施用任何上述一种或多种纳米纤维。
- [0075] 在又一实施方式中,本文提供了一种包含任何上述一种或多种纳米纤维的化妆品。
- [0076] 在又一实施方式中,本文提供了一种用于向有需要的受试者局部施用的组合物,该组合物包含任何上述一种或多种纳米纤维和任选的生物活性剂。
- [0077] 在又一实施方式中,本文提供了一种用于在有需要的受试者中预防太阳灼伤的方法,该方法包括:
- [0078] 将任何上述一种或多种纳米纤维施加至受试者的皮肤。
- [0079] 在上述方法的又一实施方式中,纳米纤维可以包含花青素或另一UV保护剂,或者可以与花青素或另一UV保护剂施加。
- [0080] 在又一实施方式中,本文提供了一种用于减少细胞增殖的方法,该方法包括:
- [0081] 用任何上述一种或多种纳米纤维对细胞或组织或器官进行处理。
- [0082] 在上述方法的又一实施方式中,纳米纤维可以与抗癌药物同时使用或依次使用。
- [0083] 在任何上述一种或多种方法的又一实施方式中,纳米纤维可以与抗癌药物复合或缀合。
- [0084] 在任何上述一种或多种方法的又一实施方式中,抗癌药物可以是紫杉醇或长春新碱。
- [0085] 在另一实施方式中,本文提供了一种用于降低有需要的受试者的肝脏中的甘油三酯堆积的方法,该方法包括:
- [0086] 向受试者施用任何上述纳米纤维。
- [0087] 在又一实施方式中,本文提供了任何上述一种或多种纳米纤维用于向有需要的受试者或细胞递送生物活性剂的用途。
- [0088] 在上述用途的另一实施方式中,生物活性剂可以是诸如硒、锌、镁或铁的元素。
- [0089] 在任何上述一种或多种用途的又一实施方式中,生物活性剂可以是抗癌药物,并且受试者可以是患有癌症的受试者。
- [0090] 在任何上述一种或多种用途的又一实施方式中,抗癌药物可以是紫杉醇或长春新碱。
- [0091] 在任何上述一种或多种用途的又一实施方式中,生物活性剂可以在纳米纤维形成

期间被引入纳米纤维中,或者生物活性剂可以在水基介质中与已经形成的纳米纤维复合或缀合。

[0092] 在任何上述一种或多种用途的另一实施方式中,水基介质可以包含DMSO、或缓冲液、或两者。

[0093] 在又一实施方式中,本文提供了任何上述一种或多种纳米纤维用于在有需要的受试者中治疗或预防癌症的用途。

[0094] 在任何上述一种或多种用途的又一实施方式中,纳米纤维可以与抗癌药物同时联合施用或依次联合施用。

[0095] 在任何上述一种或多种用途的又一实施方式中,纳米纤维可以与抗癌药物复合或缀合。

[0096] 在任何上述一种或多种用途的另一实施方式中,抗癌药物可以是紫杉醇或长春新碱。

[0097] 在另一实施方式中,本文提供了任何上述一种或多种纳米纤维用于向受试者提供可溶性膳食纤维的用途。

[0098] 在又一实施方式中,本文提供了任何上述一种或多种纳米纤维作为增粘食品添加剂或纤维替代物的用途。

[0099] 在又一实施方式中,本文提供了任何上述一种或多种纳米纤维用于降低有需要的受试者的血液中的餐后血糖水平的用途。

[0100] 在另一实施方式中,本文提供了任何上述一种或多种纳米纤维在化妆品中的用途。

[0101] 在又一实施方式中,本文提供了任何上述一种或多种纳米纤维用于向有需要的受试者局部施用的用途,其中纳米纤维任选地与生物活性剂复合或缀合。

[0102] 在又一实施方式中,本文提供了任何上述一种或多种纳米纤维用于作为局部施用的药物递送载体的用途。

[0103] 在又一实施方式中,本文提供了任何上述一种或多种纳米纤维用于在有需要的受试者中预防日光灼伤的用途,其中,将纳米纤维施加至受试者的皮肤。

[0104] 在上述用途的另一实施方式中,纳米纤维可以包含花青素或另一UV保护剂,或者可以与花青素或另一UV保护剂施加。

[0105] 在又一实施方式中,本文提供了任何上述一种或多种纳米纤维用于减少细胞增殖的用途。

[0106] 在上述用途的另一实施方式中,纳米纤维可以与抗癌药物同时使用或依次使用。

[0107] 在上述一种或多种用途的又一实施方式中,纳米纤维可以与抗癌药物复合或缀合。

[0108] 在上述一种或多种用途的又一实施方式中,抗癌药物可以是紫杉醇或长春新碱。

[0109] 在另一实施方式中,本文提供了任何上述一种或多种纳米纤维用于降低有需要的受试者的肝脏中的甘油三酯堆积的用途。

[0110] 在另一实施方式中,本文提供了一种靶向纳米纤维,其包含与对癌症标志物特异的靶向抗体缀合的任何上述一种或多种纳米纤维。

[0111] 在上述靶向纳米纤维的另一实施方式中,靶向抗体可以包含PD-L1抗体或其抗原

结合片段,用于将靶向纳米纤维靶向癌细胞。

[0112] 在上述靶向纳米纤维的又一实施方式中,靶向纳米纤维可以与至少一种细胞毒性药物或抗癌药物复合或缀合。

[0113] 在任何上述靶向纳米纤维的又一实施方式中,靶向纳米纤维可以与紫杉醇、阿霉素或两者复合或缀合。

[0114] 在另一实施方式中,本文提供了一种抗菌纳米纤维,其包含与抗菌剂复合或缀合的任何上述一种或多种纳米纤维。

[0115] 在上述抗菌纳米纤维的另一实施方式中,抗菌剂可以包括溶菌酶、四环素、或乳链菌肽、或它们的任何组合。

[0116] 在任何上述一种或多种抗菌纳米纤维的又一实施方式中,抗菌纳米纤维可用于治疗或预防MDR细菌感染。

[0117] 在另一实施方式中,本文提供了一种包含来源于均质化的植物组织的自组装细胞组分的纳米颗粒,该细胞组分包含一种或多种结构性碳水化合物或其裂解产物,其中,脂质不是纳米颗粒的结构组分。

[0118] 在上述纳米颗粒的另一实施方式中,纳米颗粒可以是基本上不含脂质的。

[0119] 在任何上述一种或多种纳米颗粒的又一实施方式中,纳米颗粒可以包含果胶、半纤维素、肽和/或蛋白质、有机酸、至少一种多酚、它们的裂解产物、或它们的任何组合。

[0120] 在任何上述一种或多种纳米颗粒的又一实施方式中,纳米颗粒可以包含:

[0121] 基于果胶的内核;

[0122] 包围内核的中间层,中间层包含果胶和半纤维素的大分子和/或它们的裂解产物、多酚和有机酸;以及

[0123] 包含大分子碳水化合物和蛋白质的原纤化外层,任选地由植物组织的成熟期间和/或均质化期间的分解代谢形成。

[0124] 在任何上述一种或多种纳米颗粒的另一实施方式中,有机酸可以包括苹果酸、抗坏血酸、或两者。

[0125] 在任何上述一种或多种纳米颗粒的又一实施方式中,多酚可以包括花青素。

[0126] 在任何上述一种或多种纳米颗粒的又一实施方式中,细胞组分可以包括在成熟水果的成熟期间或均质化期间从植物组织释放的那些细胞组分,其能够自组装成纳米颗粒。

[0127] 在任何上述一种或多种纳米颗粒中的又一实施方式中,一种或多种结构碳水化合物可以包括果胶、果胶酸、果胶甲酯、果胶衍生物、聚半乳糖醛酸、鼠李糖聚半乳糖醛酸、木葡聚糖、半纤维素、具有 β -(1 $\rightarrow$ 4)连接的葡萄糖、甘露糖、或木糖主链的木葡聚糖、和/或阿拉伯半乳糖和/或它们的裂解产物中的一种或多种。

[0128] 在任何上述一种或多种纳米颗粒的又一实施方式中,纳米颗粒可以具有直径为约50-250 nm的基本上球形的结构。

[0129] 在任何上述一种或多种纳米颗粒的另一实施方式中,纳米颗粒可以包含:

[0130] 基于果胶的内核;

[0131] 包围内核的中间层,中间层包含一种或多种包含果胶或其衍生物的螺旋原纤维结构,以及一种或多种半纤维素衍生分子或其衍生物;以及

[0132] 原纤化外层,其包含半纤维素或其切割产物,以及来源于细胞蛋白的一种或多种

肽。

[0133] 在任何上述一种或多种纳米颗粒的又一实施方式中,纳米颗粒可以通过在约3-7的pH值范围内存在的氢键相互作用而稳定,并且在来源于植物组织细胞组分分解代谢并且具有羟基和/或氨基和/或有机酸基团的大分子之间形成。

[0134] 在任何上述一种或多种纳米颗粒的又一实施方式中,纳米颗粒可以是非结晶的。

[0135] 在任何上述一种或多种纳米颗粒的又一实施方式中,纳米颗粒还可以包括生物活性剂。

[0136] 在任何上述一种或多种纳米颗粒的另一实施方式中,生物活性剂可以是药学活性药物、蛋白质、酶、营养制剂、或营养物。

[0137] 在任何上述一种或多种纳米颗粒的另一实施方式中,纳米颗粒可以在水溶液中。

[0138] 在任何上述一种或多种纳米颗粒的又一实施方式中,纳米颗粒可以是粉末形式。

[0139] 在任何上述一种或多种纳米颗粒的又一实施方式中,纳米颗粒可以是脱水、冻干、冷冻干燥、喷雾干的或纳米喷雾干燥的形式。

[0140] 在任何上述一种或多种纳米颗粒的又一实施方式中,植物组织可以包含水果或蔬菜植物组织。

[0141] 在任何上述一种或多种纳米颗粒的另一实施方式中,植物组织可以包含衰老水果、成熟蔬菜或它们的任何组合;优选地,其中植物组织包括樱桃、蓝莓、葡萄、桃子、油桃、李子、杏子、番木瓜、番茄、或它们的任何组合。

[0142] 在任何上述一种或多种纳米颗粒的又一实施方式中,植物组织可以包含酸樱桃水果组织。

[0143] 在另一实施方式中,本文提供了一种用于从均质化的植物组织制备纳米颗粒的方法,该方法包括:

[0144] 在溶液中制备均质化的植物组织,该溶液包含从植物组织释放的细胞组分;

[0145] 如果存在碎片,从该均质化的植物组织中去除碎片;以及

[0146] 任选地,透析均质化的植物组织以去除未复合的化合物,或通过尺寸排阻去除未复合的化合物,

[0147] 由此提供一种包含通过细胞组分的自组装形成的纳米颗粒的溶液。

[0148] 在上述方法的另一实施方式中,该方法还可以包括将包含纳米颗粒的溶液脱水、冻干、冷冻干燥、喷雾干燥或纳米喷雾干燥的步骤。

[0149] 在任何上述一种或多种方法的另一实施方式中,纳米颗粒可以通过在基本上水性的介质中自组装形成。

[0150] 在任何上述一种或多种方法的又一实施方式中,在溶液中制备均质化的植物组织的步骤可以包括在水性、有机或混合的水性-有机介质中均质化植物组织。

[0151] 在任何上述一种或多种方法的又一实施方式中,在溶液中制备均质化的植物组织的步骤可以包括使植物组织在包含水、乙醇、甲醇或丙酮中的任何一种或多种的水性、有机或混合的水性-有机介质中进行高剪切均质化和/或超声处理。

[0152] 在任何上述一种或多种方法的又一实施方式中,去除碎片的步骤可以包括透析、过滤均质化的植物组织、离心均质化的植物组织、或对均质化的植物组织进行切向流过滤或连续流过滤、或它们的任何组合。

[0153] 在任何上述一种或多种方法的另一实施方式中,该方法可用于制备如本文所描述的纳米颗粒。

[0154] 在另一实施方式中,本文提供了一种用于从均质化的植物组织制备纳米颗粒的方法,该方法包括:

[0155] 在溶液中制备均质化的植物组织,该溶液包含从植物组织释放的细胞组分;

[0156] 允许通过细胞组分的自组装形成纳米颗粒;

[0157] 如果存在碎片,从均质化的植物组织中去除碎片;以及

[0158] 冷冻干燥、喷雾干燥或纳米喷雾干燥以形成包含纳米颗粒的粉末。

[0159] 在上述方法的另一实施方式中,自组装可在基本上水性的介质中发生。

[0160] 在任何上述一种或多种方法的又一实施方式中,在溶液中制备均质化的植物组织的步骤可以包括在水性、有机或混合的水性-有机介质中对植物组织进行高剪切均质化。

[0161] 在任何上述一种或多种方法的另一实施方式中,去除碎片的步骤可以包括过滤均质化的植物组织、或离心均质化的植物组织、或两者。

[0162] 在任何上述一种或多种方法的又一实施方式中,该方法可用于制备如本文所描述的纳米颗粒。

[0163] 在另一实施方式中,本文提供了一种通过任何上述一种或多种方法制备的纳米颗粒。

[0164] 在另一实施方式中,本文提供了一种由任何上述一种或多种纳米颗粒制备的食物粉末,任选地其中,该食物粉末以微米级细粉形式提供。

[0165] 在另一实施方式中,本文提供了一种将生物活性剂递送至有需要的受试者、细胞或生物体的方法,该方法包括:

[0166] 使用化学或物理方法将与生物活性剂复合或缀合的任何上述一种或多种纳米颗粒施用至受试者、细胞或生物体。

[0167] 在上述方法的另一实施方式中,生物活性剂可以是诸如硒、锌、铁或镁的元素。

[0168] 在任何上述一种或多种方法的另一实施方式中,生物活性剂可以是抗癌药物,并且受试者可以是患有癌症的受试者。

[0169] 在任何上述一种或多种方法的另一实施方式中,抗癌药物可以是紫杉醇、长春新碱、或用于治疗癌症的任何天然或合成的化合物。

[0170] 在任何上述一种或多种方法的另一实施方式中,生物活性剂可以在纳米颗粒形成期间被引入纳米颗粒中,或者生物活性剂可以在任选地包含醇或其他有机组分的水基介质中与已形成的纳米颗粒复合或缀合。

[0171] 在任何上述一种或多种方法的另一实施方式中,水基介质可以包含DMSO、或缓冲液、或两者。

[0172] 在另一实施方式中,本文提供了一种用于在有需要的受试者中治疗与导致炎症的活性氧物质水平升高相关的疾病或病症的方法,该方法包括:

[0173] 向受试者施用任何上述一种或多种纳米颗粒。

[0174] 在另一实施方式中,本文提供了一种用于在有需要的受试者中治疗或减轻炎症的方法,该方法包括:

[0175] 向受试者施用任何上述一种或多种纳米颗粒。

- [0176] 在上述方法的另一实施方式中,纳米颗粒可以包含抗炎剂或与抗炎剂联合施用。
- [0177] 在上述一种或多种方法的又一实施方式中,抗炎剂可以包含姜黄素。
- [0178] 在另一实施方式中,本文提供了一种用于在有需要的受试者中治疗或减轻肥胖症的方法,该方法包括:
- [0179] 向受试者施用任何上述一种或多种纳米颗粒。
- [0180] 在上述方法的另一实施方式中,纳米颗粒可以包含至少部分来源于传统上用于食品或医疗目的的坚果、豆科植物、草本植物、香料、蔬菜或真菌植物组织的组分。
- [0181] 在另一实施方式中,本文提供了一种用于在有需要的受试者中治疗或预防癌症的方法,该方法包括:
- [0182] 向受试者施用任何上述一种或多种纳米颗粒。
- [0183] 在上述方法的另一实施方式中,纳米颗粒可以与抗癌药物同时或依次联合施用。
- [0184] 在上述一种或多种方法的又一实施方式中,纳米颗粒可以与抗癌药物复合或缀合。
- [0185] 在上述一种或多种方法的又一实施方式中,抗癌药物可以是紫杉醇或长春新碱。
- [0186] 在另一实施方式中,本文提供了一种用于向受试者提供可溶性膳食纤维的方法,该方法包括:
- [0187] 向受试者施用任何上述一种或多种纳米颗粒。
- [0188] 在另一实施方式中,本文提供了一种包含任何上述一种或多种纳米颗粒的增粘食品添加剂。
- [0189] 在另一实施方式中,本文提供了一种用于降低有需要的受试者的血液中的餐后血糖水平的方法,该方法包括:
- [0190] 向受试者施用任何上述一种或多种纳米颗粒。
- [0191] 在另一实施方式中,本文提供了一种包含任何上述一种或多种纳米颗粒的化妆品。
- [0192] 在又一实施方式中,本文提供了一种用于向有需要的受试者局部施用的组合物,该组合物包含任何上述一种或多种纳米颗粒和任选的生物活性剂。
- [0193] 在又一实施方式中,本文提供了一种用于在有需要的受试者中预防太阳灼伤的方法,该方法包括:
- [0194] 将任何上述一种或多种纳米颗粒施加至受试者的皮肤。
- [0195] 在上述方法的另一实施方式中,纳米颗粒可以包括另外的花青素或另一UV保护剂,或可以与另外的花青素或另一UV保护剂施加。
- [0196] 在另一实施方式中,本文提供了一种用于减少细胞增殖的方法,该方法包括:
- [0197] 使用任何上述一种或多种纳米颗粒处理细胞或组织或器官。
- [0198] 在上述方法的另一实施方式中,纳米颗粒可以与抗癌药物同时使用或依次使用。
- [0199] 在上述一种或多种方法的又一实施方式中,纳米颗粒可以与抗癌药物复合或缀合。
- [0200] 在上述一种或多种方法的又一实施方式中,抗癌药物可以是紫杉醇或长春新碱。
- [0201] 在另一实施方式中,本文提供了一种用于降低有需要的受试者的肝脏中甘油三酯堆积的方法,该方法包括:

[0202] 向受试者施用任何上述一种或多种纳米颗粒。

[0203] 在另一实施方式中,本文提供了一种任何上述一种或多种纳米颗粒用于向有需要的受试者或细胞递送生物活性剂的用途。

[0204] 在上述用途的另一实施方式中,生物活性剂可以是诸如硒、锌、镁或铁的元素。

[0205] 在上述一种或多种用途的另一实施方式中,生物活性剂可以是抗癌药物,并且受试者可以是患有癌症的受试者。

[0206] 在上述一种或多种用途的又一实施方式中,抗癌药物可以是紫杉醇或长春新碱。

[0207] 在任何上述一种或多种用途的又一实施方式中,生物活性剂可以在纳米颗粒形成期间被引入纳米颗粒中,或者生物活性剂可以在水基介质中与已形成的纳米颗粒复合或缀合。

[0208] 在上述一种或多种用途的另一实施方式中,水基介质可以包含DMSO、或缓冲液、或两者。

[0209] 在另一实施方式中,本文提供了任何上述一种或多种纳米颗粒用于在有需要的受试者中治疗与活性氧物质相关的疾病或病症的用途。

[0210] 在另一实施方式中,本文提供了任何上述一种或多种纳米颗粒用于在有需要的受试者中治疗或减轻炎症的用途。

[0211] 在上述一种或多种用途的又一实施方式中,纳米颗粒可以包含抗炎剂或可以与抗炎剂一起施用。

[0212] 在上述一种或多种用途的又一实施方式中,抗炎剂可以包含姜黄素。

[0213] 在另一实施方式中,本文提供了任何上述一种或多种纳米颗粒用于在有需要的受试者中治疗或减轻肥胖症的用途。

[0214] 在上述一种或多种用途的又一实施方式中,纳米颗粒可以来源于坚果、豆科植物、草本植物、香料、蔬菜或真菌植物组织。

[0215] 在另一实施方式中,本文提供了任何上述一种或多种纳米颗粒用于在有需要的受试者中治疗或预防癌症的用途。

[0216] 在上述一种或多种用途的又一实施方式中,纳米颗粒可以与抗癌药物同时或依次联合施用。

[0217] 在上述一种或多种用途的又一实施方式中,纳米颗粒可以与抗癌药物复合或缀合。

[0218] 在上述一种或多种用途的又一实施方式中,抗癌药物可以是紫杉醇或长春新碱。

[0219] 在另一实施方式中,本文提供了任何上述一种或多种纳米颗粒用于向受试者提供可溶性膳食纤维的用途。

[0220] 在又一实施方式中,本文提供了任何上述一种或多种纳米颗粒作为增粘食品添加剂或纤维替代物的用途。

[0221] 在又一实施方式中,本文提供了任何上述一种或多种纳米颗粒用于降低有需要的受试者的血液中的餐后血糖水平的用途。

[0222] 在另一实施方式中,本文提供了任何上述一种或多种纳米颗粒在化妆品中的用途。

[0223] 在又一实施方式中,本文提供了任何上述一种或多种纳米颗粒用于向有需要的受

试者局部施用的用途。

[0224] 在另一实施方式中,本文提供了任何上述一种或多种纳米颗粒作为局部施用的药物递送载体的用途。

[0225] 在另一实施方式中,本文提供了任何上述一种或多种纳米颗粒用于在有需要的受试者中预防太阳灼伤的用途,其中,将纳米颗粒施加至受试者的皮肤。

[0226] 在上述用途的又一实施方式中,纳米颗粒可以包括另外的花青素或另外的UV保护剂,或可以与另外的花青素或另外的UV保护剂施加。

[0227] 在另一实施方式中,本文提供了任何上述一种或多种纳米颗粒用于减少细胞增殖的用途。

[0228] 在上述用途的另一实施方式中,纳米颗粒可以与抗癌药物同时使用或依次使用。

[0229] 在上述一种或多种用途的又一实施方式中,纳米颗粒可以与抗癌药物复合或缀合。

[0230] 在上述一种或多种用途的又一实施方式中,抗癌药物可以是紫杉醇或长春新碱。

[0231] 在另一实施方式中,本文提供了任何上述一种或多种纳米颗粒用于降低有需要的受试者的肝脏中甘油三酯的堆积的用途。

[0232] 在另一实施方式中,本文提供了一种靶向纳米颗粒,该靶向纳米颗粒包含任何上述一种或多种纳米颗粒,该靶向纳米颗粒与对癌症标志物特异的靶向抗体缀合。

[0233] 在上述靶向纳米颗粒的另一实施方式中,靶向抗体可以包含PD-L1抗体或其抗原结合片段,用于将靶向纳米颗粒靶向癌细胞。

[0234] 在上述一种或多种靶向纳米颗粒的又一实施方式中,靶向纳米颗粒可以与至少一种细胞毒性药物或抗癌药物复合或缀合。

[0235] 在上述一种或多种靶向纳米颗粒的又一实施方式中,靶向纳米颗粒可以与紫杉醇、阿霉素或两者复合或缀合。

[0236] 在另一实施方式中,本文提供了一种抗菌纳米颗粒,该抗菌纳米颗粒包含任何上述一种或多种纳米颗粒,该抗菌纳米颗粒与抗菌剂复合或缀合。

[0237] 在上述抗菌纳米颗粒的另一实施方式中,抗菌剂可以包含溶菌酶、四环素、或乳链菌肽、或它们的任何组合。

[0238] 在上述一种或多种抗菌纳米颗粒的又一实施方式中,抗菌纳米颗粒可用于治疗或预防MDR细菌感染。

[0239] 在另一实施方式中,本文提供了一种食物粉末,该食物粉末包含来源于均质化的植物组织的自组装细胞组分,该细胞组分包含一种或多种结构性碳水化合物或它们的裂解产物并且还包含至少一种营养剂,其中,脂质不是食物粉末的结构组分。

[0240] 在上述食物粉的另一实施方式中,食物粉末可以包含:

[0241] 自身缠绕或环绕以形成纳米球样结构的纤维结构。

[0242] 在任何上述一种或多种食物粉末的又一实施方式中,食物粉末还可以包含疏水性组分。

[0243] 在任何上述一种或多种食物粉末的又一实施方式中,疏水性组分可以包括杏仁乳、椰子汁和/或来源于可食用坚果的乳或可以在杏仁乳、椰子汁和/或来源于可食用坚果的乳中提供。

[0244] 在任何上述一种或多种食物粉末的又一实施方式中,营养剂可以包含具有健康益处的天然存在的活性成分。

[0245] 在任何上述一种或多种食物粉末的又一实施方式中,营养剂可以包括一种或多种类胡萝卜素、番荔枝素(annonacin)、乳香(Boswellia)、南非醉茄(Ashwagandha)、姜科成员、低聚果糖、低聚半乳糖、菊粉、菊芋、胡椒科成员、胡椒或含有胡椒碱和/或其衍生物的野生近缘种、或具有健康益处的其任何活性成分、或从其分离的任何提取物、衍生物或产物、或它们的任何组合。

[0246] 在任何上述一种或多种食物粉末的又一实施方式中,食物粉末可以包含:

[0247] 酸樱桃或其水提取物;

[0248] 杏仁乳、或杏仁的另一匀浆物;

[0249] 豆浆、或大豆的另一匀浆物;

[0250] 西兰花、或西兰花的水提取物;以及

[0251] 姜黄或其粉末。

[0252] 在任何上述一种或多种食物粉末的又一实施方式中,食物粉末可以包含:

[0253] 约25-30 v/v%的酸樱桃提取物(至少约0.1 mg/ml的多酚当量);

[0254] 约25-30 v/v%的杏仁乳或杏仁的另一匀浆物;

[0255] 约10-18 v/v%的豆浆或大豆的另一匀浆物;

[0256] 约25-30 v/v%的西兰花提取物;以及

[0257] 约0.5-2.5 w/v%的姜黄或其粉末。

[0258] 在任何上述一种或多种食物粉末的另一实施方式中,酸樱桃提取物可以是约1-2 mg/ml多酚当量。

[0259] 在另一实施方式中,本文提供了一种用于由均质化的植物组织制备食物粉末的方法,该方法包括:

[0260] 在溶液中制备均质化的植物组织,该溶液包含从植物组织释放的细胞组分,该细胞组分包含一种或多种结构碳水化合物或其裂解产物,并且溶液中的均质化的植物组织还包含至少一种营养剂;

[0261] 任选地,如果存在碎片,从溶液中的均质化的植物组织中去除碎片;以及

[0262] 对溶液中的均质化的植物组织冷冻干燥、冻干、喷雾干燥或纳米喷雾干燥以形成食物粉末。

[0263] 在上述方法的另一实施方式中,植物组织可以包括水果、蔬菜或其他植物组织。

[0264] 在任何上述一种或多种方法的又一实施方式中,植物组织可以包括衰老水果、成熟蔬菜或它们的任何组合;优选地,其中植物组织包括樱桃、蓝莓、葡萄、桃子、油桃、李子、杏子、番木瓜、番茄、野生来源的水果和/或浆果、或它们的任何组合。

[0265] 在任何上述一种或多种方法的又一实施方式中,溶液中的均质化的植物组织还可以包含疏水性组分。

[0266] 在任何上述一种或多种方法的另一实施方式中,疏水性组分可以包括杏仁乳、椰子汁和/或来源于可食用坚果的乳,或者可以在杏仁乳、椰子汁和/或来源于可食用坚果的乳中提供。

[0267] 在任何上述一种或多种方法的又一实施方式中,营养剂可以包含具有健康益处的

天然存在的活性成分。

[0268] 在任何上述一种或多种方法的又一实施方式中,营养剂可以包括一种或多种类胡萝卜素、番荔枝素、乳香、南非醉茄、姜科成员、低聚果糖、低聚半乳糖、菊粉、菊芋、胡椒科成员、胡椒或含有胡椒碱和/或其衍生物的野生近缘种、或具有健康益处的其任何活性成分、或从其分离的任何提取物、衍生物或产物、或它们的任何组合。

[0269] 在任何上述一种或多种方法的又一实施方式中,溶液中均质化的植物组织可以包含:

[0270] 酸樱桃或其水提取物;

[0271] 杏仁乳或杏仁的另一匀浆物;

[0272] 豆浆或大豆的另一匀浆物;

[0273] 西兰花或其水提取物;以及

[0274] 姜黄或其粉末。

[0275] 在任何上述一种或多种方法的另一实施方式中,溶液中的均质化的植物组织可以包含:

[0276] 约25-30 v/v%的酸樱桃提取物(至少约0.1 mg/ml的多酚当量);

[0277] 约25-30 v/v%的杏仁乳或杏仁的其他匀浆物;

[0278] 约10-18 v/v%的豆浆或其他大豆的匀浆物;

[0279] 约25-30 v/v%的西兰花提取物;以及

[0280] 约0.5-2.5 w/v%的姜黄或其粉末。

[0281] 在任何上述一种或多种方法的又一实施方式中,酸樱桃提取物可以是约1-2 mg/ml多酚当量。

[0282] 在任何上述一种或多种方法的又一实施方式中,制备均质化的植物组织的步骤可以包括在水性介质、有机介质或混合的水性-有机介质中均质化植物组织。

[0283] 在任何上述一种或多种方法的又一实施方式中,植物组织可以包括一种或多种含营养物的材料,其可以是新鲜的、预处理的或浓缩的材料、或它们的任何组合。

[0284] 在任何上述一种或多种方法的又一实施方式中,制备均质化的植物组织的步骤可以包括用优选在高rpm下操作并产生高剪切力的搅拌器、声谱显示仪(Sonolator)或另一高性能混合装置均质化植物组织。

[0285] 在任何上述一种或多种方法的又一实施方式中,去除碎片的步骤可以包括用离心装置、用过滤装置、通过膜过滤、通过切向流过滤或它们的任何组合来去除碎片。

[0286] 在任何上述一种或多种方法的又一实施方式中,植物组织可以包括获自或包含酸樱桃、杏仁或杏仁乳、大豆或豆浆、西兰花、姜黄或它们的任何组合的植物组织。

[0287] 在任何上述一种或多种方法的又一实施方式中,均质化的植物组织可以包括酸樱桃提取物、杏仁乳、豆浆、西兰花提取物、以及姜黄粉。

[0288] 在另一实施方式中,本文提供了一种通过任何上述一种或多种方法生产的食物粉末。

[0289] 在又一实施方式中,本文提供了一种用于向有需要的受试者、细胞或生物体递送生物活性剂的方法,该方法包括:

[0290] 向受试者或者细胞或生物体施用任何上述一种或多种食物粉末,该食物粉末使用

化学或物理方法与生物活性剂复合或缀合。

[0291] 在上述方法的另一实施方式中,生物活性剂可以是诸如硒、锌、铁或镁的元素。

[0292] 在上述一种或多种方法的又一实施方式中,生物活性剂可以是抗癌药物,并且受试者可以是患有癌症的受试者。

[0293] 在任何上述一种或多种方法的又一实施方式中,抗癌药物可以是紫杉醇、长春新碱或用于治疗癌症的任何天然或合成的化合物。

[0294] 在任何上述一种或多种方法的另一实施方式中,生物活性剂可以在食物粉末形成期间被引入食物粉末中,或者生物活性剂可以在任选地包含醇或其他有机组分的水基介质中与已形成的食物粉末复合或缀合。

[0295] 在任何上述一种或多种方法的另一实施方式中,水基介质可以包括DMSO、或缓冲液、或两者。

[0296] 在又一实施方式中,本文提供了一种用于在有需要的受试者中治疗与导致炎症的活性氧物质水平升高相关的疾病或病症的方法,其包括:

[0297] 向受试者施用任何上述一种或多种食物粉末。

[0298] 在又一实施方式中,本文提供了一种用于在有需要的受试者中治疗或减轻炎症的方法,该方法包括:

[0299] 向受试者施用任何上述一种或多种食物粉末。

[0300] 在上述方法的另一实施方式中,食物粉末可以包含抗炎剂或与抗炎剂联合施用。

[0301] 在任何上述一种或多种方法的又一实施方式中,抗炎剂可以包括姜黄素。

[0302] 在又一实施方式中,本文提供了一种用于在有需要的受试者中治疗或减轻肥胖症的方法,该方法包括:

[0303] 向受试者施用任何上述一种或多种食物粉末。

[0304] 在上述方法的另一实施方式中,食物粉末可含有或包含至少部分来源于传统上用于食品或医疗目的的坚果、豆科植物、草本植物、香料、蔬菜或真菌植物组织的组分。

[0305] 在又一实施方式中,本文提供了在有需要的受试者中治疗或预防癌症的方法,该方法包括:

[0306] 向受试者施用任何上述一种或多种食物粉末。

[0307] 在上述方法的另一实施方式中,食物粉末可以与抗癌药物同时联合施用或依次联合施用。

[0308] 在任何上述一种或多种方法的又一实施方式中,食物粉末可以与抗癌药物复合或缀合。

[0309] 在任何上述一种或多种方法的又一实施方式中,抗癌药物可以是紫杉醇或长春新碱。

[0310] 在另一实施方式中,本文提供了一种用于向受试者提供可溶性膳食纤维的方法,该方法包括:

[0311] 向受试者施用任何上述一种或多种食物粉末。

[0312] 在又一实施方式中,本文提供了一种包含任何上述一种或多种食物粉末的增粘食品添加剂。

[0313] 在又一实施方式中,本文提供了一种用于降低有需要的受试者的血液中的餐后血

糖水平的方法,该方法包括:

[0314] 向受试者施用任何上述一种或多种食物粉末。

[0315] 在又一实施方式中,本文提供了一种用于减少细胞增殖的方法,该方法包括:

[0316] 用任何上述一种或多种食物粉末对细胞或组织或器官进行处理。

[0317] 在上述方法的另一实施方式中,食物粉末可以与抗癌药物同时使用或依次使用。

[0318] 在上述方法的又一实施方式中,食物粉末可以与抗癌药物复合或缀合。

[0319] 在上述一种或多种方法的又一实施方式中,抗癌药物可以是紫杉醇或长春新碱。

[0320] 在另一实施方式中,本文提供了一种用于降低有需要的受试者的肝脏中的甘油三酯的堆积的方法,该方法包括:

[0321] 向受试者施用任何上述一种或多种食物粉末。

[0322] 在又一实施方式中,本文提供了任何上述一种或多种食物粉末用于向有需要的受试者或细胞递送生物活性剂的用途。

[0323] 在上述用途的另一实施方式中,生物活性剂可以是诸如硒、锌、镁或铁的元素。

[0324] 在上述一种或多种用途的又一实施方式中,生物活性剂可以是抗癌药物,并且受试者是患有癌症的受试者。

[0325] 在上述一种或多种用途的又一实施方式中,抗癌药物可以是紫杉醇或长春新碱。

[0326] 在任何上述一种或多种用途的又一实施方式中,生物活性剂可以在食物粉末形成期间被引入食物粉末中,或者生物活性剂可以在任选地包含醇或其他有机组分的水基介质中与已形成的食物粉末复合或缀合。

[0327] 在任何上述一种或多种用途的另一实施方式中,水基介质可以包括DMSO、或缓冲液、或两者。

[0328] 在又一实施方式中,本文提供了任何上述一种或多种食物粉末用于在有需要的受试者中治疗与活性氧物质相关的疾病或病症的用途。

[0329] 在另一实施方式中,本文提供了任何上述一种或多种食物粉末用于在有需要的受试者中治疗或减轻炎症的用途。

[0330] 在上述用途的另一实施方式中,食物粉末可以包含抗炎剂或可与抗炎剂一起施用。

[0331] 在上述一种或多种用途的又一实施方式中,抗炎剂可以包含姜黄素。

[0332] 在又一实施方式中,本文提供了任何上述一种或多食物粉末用于在有需要的受试者中治疗或减轻肥胖的用途。

[0333] 在任何上述一种或多种用途的又一实施方式中,食物粉末可以至少部分来源于坚果、豆科植物、草本植物、香料、蔬菜或真菌植物组织。

[0334] 在另一实施方式中,本文提供了任何上述一种或多种食物粉末在有需要的受试者中治疗或预防癌症的用途。

[0335] 在任何上述一种或多种用途的又一实施方式中,食物粉末可以与抗癌药物同时联合施用或依次联合施用。

[0336] 在任何上述一种或多种用途的又一实施方式中,食物粉末可以与抗癌药物复合或缀合。

[0337] 在任何上述一种或多种用途的又一实施方式中,抗癌药物可以是紫杉醇或长春新

碱。

[0338] 在又一实施方式中,本文提供了任何上述一种或多种食物粉末用于向受试者提供可溶性膳食纤维的用途。

[0339] 在又一实施方式中,本文提供了任何上述一种或多种食物粉末作为增粘食品添加剂或纤维替代物的用途。

[0340] 在又一实施方式中,本文提供了任何上述一种或多种食物粉末用于降低有需要的受试者的血液中的餐后血糖水平的用途。

[0341] 在又一实施方式中,本文提供了任何上述一种或多种食物粉末用于减少细胞增殖的用途。

[0342] 在上述用途的另一实施方式中,食物粉末可以与抗癌药物同时使用或依次使用。

[0343] 在上述一种或多种用途的又一实施方式中,食物粉末可以与抗癌药物复合或缀合。

[0344] 在任何上述一种或多种用途的又一实施方式中,抗癌药物可以是紫杉醇或长春新碱。

[0345] 在又一实施方式中,本文提供了任何上述一种或多种食物粉末用于降低有需要的受试者的肝脏中甘油三酯的堆积的用途。

[0346] 在又一实施方式中,本文提供了一种抗菌食物粉末,包含与抗菌剂复合或缀合的任何上述一种或多种食物粉末。

[0347] 在上述抗菌食物粉末的另一实施方式中,抗菌剂可以包括溶菌酶、四环素、或乳链菌肽、或它们的任何组合。

[0348] 在任何上述一种或多种抗菌食物粉末的又一实施方式中,抗菌食物粉末可以用于治疗或预防MDR细菌感染。

[0349] 在又一实施方式中,本文提供了一种用于将生物活性剂或货物(cargo)装载到任何上述一种或多种纳米颗粒的方法,该方法包括:

[0350] 提供脱水、冻干或冷冻干燥的纳米颗粒样品;

[0351] 将生物活性剂或货物与纳米颗粒的样品混合以提供混合物;以及

[0352] 向混合物中加入水或水基溶液以使纳米颗粒收缩,将生物活性剂或货物捕获在其中。

[0353] 在某些实施方式中,本文提供了一种组合物,其包含任何上述一种或多种纳米颗粒、任何上述一种或多种食物粉末、任何上述一种或多种纳米纤维、或它们的任何组合。在某些实施方式中,组合物还可以包含药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂。在某些实施方式中,预期本文所描述的纳米颗粒、纳米纤维和/或食物粉末的任何两种或任何三种的混合物可以用于本文所描述的用途和/或方法。在某些实施方式中,例如,可以使用纳米颗粒和纳米纤维的混合物;可以使用纳米颗粒和食物粉末的混合物;可以使用纳米纤维与食物粉末的混合物;或者可以使用纳米颗粒、纳米纤维和食物粉末的混合物。

附图说明

[0354] 图1显示了由酸樱桃(A)制备的纳米颗粒的透射电子显微图像。通过将网格漂浮在50 μ l的萃取液液滴上,使纳米颗粒吸附到碳涂覆的镍网格上1 min。取出网格,在边缘吸干

并漂浮在1%乙酸双氧铀滴上。30 s后,移除栅格,在边缘吸干并使用Leo电子显微镜直接检查。在液体介质中,纳米颗粒的尺寸在直径上在50-100 nm之间变化。版面B显示了纳米颗粒的放大视图。箭头指示从纳米颗粒发出的原纤维状结构;

[0355] 图2显示了在EM下观察到的纳米颗粒的放大视图。版面A-两个已经剥离外部结构(箭头2)的纳米颗粒暴露更光滑的内壳(箭头1)。版面B、C-显示了包含原纤维的外壳的详细形态。箭头1显示了原纤维的具有螺旋丝状结构的区域。螺旋丝状结构表面包裹有原纤维(箭头2)。版面C显示了具有从螺旋长丝剥离的简单原纤维结构的区域。版面D显示了当作为溶液储存时,在复合物潜在的自然解离过程中形成的原纤维垫(箭头);

[0356] 图3显示了果胶酶(多聚半乳糖醛酸酶)处理对纳米颗粒稳定性的影响。用果胶酶(1单位/ml提取物)处理1 ml含有纳米颗粒的透析提取物(0.8-1 mg多酚当量/ml)15 min。使纳米颗粒吸附到碳涂覆的镍网格上,并在如前所描述用乙酸双氧铀染色后观察。版面A-在对提取物进行聚半乳糖醛酸酶处理后,可以看到球形复合物溶解成较小的囊泡和丝状结构(方框区域),表明存在含有聚半乳糖醛酸的 α -1,4-糖苷键的大分子结构。版面B示出了框区域的放大版本。版面C和D显示了用纤维素酶(β -1,4-葡聚糖酶)处理纳米颗粒的效果,其剥离丝状外壳的复合物,留下内核,表明在长丝中存在 β -1,4-葡聚糖型组分;

[0357] 图4显示了胰蛋白酶处理对由酸樱桃制备的纳米颗粒的结构的影响。用1单位胰蛋白酶处理透析提取物(1 ml)15 min,并如上所描述检测纳米颗粒。胰蛋白酶处理导致外部丝状结构的溶解(版面,用钨红染色),表现为纳米颗粒的球形内部果胶壳周围的深色染色区域。在纤维素酶处理后也观察到壳状结构倾向于融合在一起(参见图3)。通过胰蛋白酶溶解外壳表明外部丝状外壳也由蛋白质(即在细胞壁中发现的延伸类型的糖蛋白)和可能来源于它们在成熟和衰老期间降解的肽组成。版面示出了壳状结构的放大视图。版面C显示了部分消化的纳米颗粒,其显示了分散成原纤维/原纤维状结构的丝状外壳。版面D显示了已经从原纤维状结构上剥离的纳米颗粒。箭头显示了原纤维状结构溶解后留下的球形壳。版面E显示了原纤维/原纤维状结构的放大视图,示出了可能形成原纤维/原纤维状结构的交织组件。原纤维/原纤维状结构不是丝状的并且似乎缺乏左右对称性,并且表现为螺旋排列的分子将围绕其自身轴线以形成具有形成的一级、二级和三级绳状形式的原纤维状结构;

[0358] 图5示出了冷冻干燥的透析的酸樱桃提取物的扫描电子显微照片,其示出了纳米颗粒。去除水似乎会增加纳米颗粒的尺寸,可能会导致外部原纤维部分塌陷。不希望受理论的束缚,在水性环境中,纳米颗粒的外部部分似乎是游离的和延伸的,结构可以至少部分地通过氢键结合保持在一起。当去除水时,原纤维状结构可能倾向于与纳米颗粒的果胶核融合,也膨胀,因为没有水分子促进氢键结合。而在溶液中,纳米颗粒通常显示直径范围为25-50 nm的尺寸分布,在冷冻干燥后尺寸为200-800 nm,一些直径达到微米以上;

[0359] 图6示出了来自酸樱桃的透析提取物的扫描电子显微照片,示出了多个结构的形成,该多个结构包括薄片(箭头1)、管状区域(箭头2)以及原纤维(箭头3)。在一些区域中可以看到纳米颗粒的萌芽(箭头4)。这些结构代表形成纳米颗粒的中间阶段;

[0360] 图7显示了从乙醇漂白的酸樱桃中分离的纳米纤维的扫描电子显微照片(版面A)和透射电子显微照片。将酸樱桃水果在50%乙醇中孵育,以去除多酚(花青素),洗涤并在水中均质化。在去除碎片后,将匀浆物用水透析,并将透析提取物冷冻干燥用于SEM,并直接用于TEM。版面A示出了纳米纤维和纳米纤维的纳米膜结构(箭头1、箭头2)。用乙酸双氧铀染色

后,纳米纤维呈现为长(微米或更多)结构(箭头1),直径为5-10 nm(版面B)。这些纤维仍然保持在溶液中形成螺旋结构(箭头2)的能力。如图所示,相比较而言,纳米纤维和纳米颗粒具有不同的结构;

[0361] 图8显示了去污剂对纳米颗粒稳定性的影响。酸樱桃的透析提取物在增加浓度的脂质不稳定去污剂(如曲拉通-X 100和脱氧胆酸钠)的存在下在 6-8 kDa截留透析袋中孵育,并在pH值调节至为4的水中透析12 h。在520 nm(苯并吡喃)和260 nm(酚环)处测定透析袋内多酚的吸光度。去污剂处理没有破坏复合物,因为在广泛透析后没有观察到多酚含量的损失。如果纳米颗粒含有脂质作为结构实体/组分,则去污剂处理将导致多酚从透析袋泄漏到透析液中,相应地降低了透析袋内提取物的吸光度。当溶液中曲拉通-X 100的浓度增加时,曲拉通-X 100在260 nm处的吸光度增加可能是由于曲拉通-X 100的苯基部分在260 nm处的吸收所致;

[0362] 图9显示了通过尺寸排阻柱(PD 10)过滤匀浆后获得的纳米颗粒的有机组成。分离纳米颗粒和纳米纤维并冻干成粉末。将粉末(400 μg)溶于100 μl 吡啶,并加入100 μl BSTFA: TMCS混合物(99:1)。将该溶液在80 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1 h。直接注入1 μl 用于GC-MS分析。显示了有机酸标准物(A)、纳米颗粒(B)和纳米纤维(C)的非水解三甲基甲硅烷基化(TMS)以及使用GC-MS分离它们,表明存在苹果酸。如图所示,相比较而言,纳米纤维和纳米颗粒是具有不同组成的不同类型的结构,而苹果酸是共同的组分。下组显示了参比苹果酸三甲基甲硅烷基衍生物的质谱;

[0363] 图10显示了纳米颗粒(在图中称为纳米复合物)和纳米纤维(在图中称为纳米丝)(上版面)和糖标准品(下版面)中糖的三甲基甲硅烷基衍生物。在用BSTFA衍生化之前,使用三氟乙酸(TFA)对纳米颗粒和纳米纤维进行消化。纳米颗粒中的主要糖是甘露糖、半乳糖/半乳糖醛酸和葡萄糖。纳米纤维富含阿拉伯糖和少量葡萄糖,以及半乳糖/半乳糖醛酸。量是相对的,因为TFA消化是苛刻的,并且可能降解一些组分。半乳糖和半乳糖醛酸提供相似的峰分布,因此该峰可能代表两种化合物。结果主要表明,己糖在纳米颗粒中占主导地位,戊糖在纳米纤维中占主导地位;

[0364] 图11显示了分离自酸樱桃级分并用考马斯蓝染色的蛋白的SDS-PAGE分析。采用Trizol提取从整个水果中分离蛋白。在抑制蛋白酶活性的条件下(如在苯酚、异硫氰酸胍存在下),在加入水和相分离后,蛋白质降解最小并且蛋白质存在于有机相(苯酚:氯仿)中。泳道1-分子量标准参照物;泳道2-分离自整个水果的蛋白;泳道3-来自水中水果匀浆物的蛋白;泳道4-来自在1500 $\times g$ 离心后获得的细胞碎片汁液的蛋白;泳道5-在15000 $\times g$ 离心后获得的澄清汁液中的蛋白;泳道6-溶解并上样到样品缓冲液中的透析提取物的冻干粉末;泳道7-使用trizol试剂、有机相从冻干粉中提取的蛋白。在用水提取水果后,果汁主要含有仍处于有机相的低分子量肽(25 kD)。经SDS-PAGE和考马斯蓝染色后观察时,透析提取物的冻干粉(泳道6)不显示离散的蛋白条带,但显示肽的涂片(泳道6)。Trizol提取和提取物与水的相分离理论上应导致蛋白迁移至富含有机物的相(苯酚:氯仿相)。考马斯亮蓝未观察到染色(泳道7),表明由于亲水性增强(与碳水化合物、多酚的缔合),肽可能已迁移到水相中基于鲜重在每个泳道中上样等量的样品(15 μg 蛋白);

[0365] 图12显示了纳米颗粒中肽的SDS-PAGE分析。在水和缓冲液(柠檬酸钾,300 mM,pH 6,均质化后的最终pH为pH 5)中进行提取和透析以提高多酚(花青素)的稳定性。版面A显示

了当凝胶在水中的10%乙酸(v/v)中孵育时,染色前的凝胶由于多酚(花青素)显示粉红色。版面B显示了用考马斯亮蓝染色以显示肽的相同凝胶。泳道1-分子量标准参照物;泳道2显示多酚(花青素)和多肽在来自上样在样品缓冲液中的透析水提取物的冻干粉末的纳米颗粒中的缔合。在Trizol提取后,上清液(水相,泳道3)显示了肽的存在以及它们与多酚(花青素)的缔合。泳道4-上样在样品缓冲液中的缓冲的透析提取物粉末。泳道5、6和7对应于trizol提取后得到的透析提取物粉末的上清液、中间相和有机相。注意,大部分肽和多酚(花青素)在trizol提取物(泳道5)的水(亲水)相中。对应于有机相的泳道7未显示出花青素或肽染色。泳道8、9和10对应于乙醇漂白樱桃的透析提取物粉未经Trizol提取后得到的上清液、中间相和有机相,其中大部分多酚(花青素)已被去除。版面B中泳道8显示考马斯蓝色。漂白的樱桃透析提取物的中间相和有机相显示肽的染色最少(泳道9、10;版面B)。透析提取物粉末的SDS-PAGE后,用碘化丙啶和考马斯亮蓝染色的相似性揭示了纳米颗粒中果胶和多肽的缔合(版面C和D)。版面C显示了使用碘化丙啶(10 μg 在水中,0.2%在水中)的染色模式。泳道1对应于市售果胶的标准样品。泳道2表示透析提取物的透析粉末;泳道3对应于透析液,且该级分显示相对更强烈的多肽染色。泳道4对应于聚半乳糖醛酸标准品,其显示用碘化丙啶染色,而不是多肽染色。酸樱桃匀浆物的胶状样沉淀也显示了果胶和多肽的存在(泳道5);

[0366] 图13显示了分别含有纳米纤维和纳米颗粒的乙醇漂白樱桃和未漂白樱桃的透析提取物,对其进行SDS-PAGE和结构特异性单克隆抗体(大鼠IgM, www.Plant Probes.net)的免疫定位。用碱性磷酸酶标记羊抗大鼠IgG检测结合抗体。版面A显示了通过考马斯亮蓝染色纳米纤维(泳道2)和纳米颗粒(泳道3)中的多肽。漂白樱桃的纳米纤维吸湿性很强,会变成胶状物,不容易进入凝胶。B版面显示了抗体对同型半乳糖醛酸聚糖(寡聚1,4-连接的半乳糖醛酸甲酯;LM 20)的反应性。漂白樱桃的透析提取物显示了对该抗体的反应性,表明纳米纤维中暴露的同型半乳糖醛酸聚糖单元。然而,对未漂白樱桃(含有球形纳米颗粒)的透析提取物的反应性要低得多(版面B,泳道3)。这再次反映在版面B下方所示的斑点印迹强度中。在球形纳米颗粒中,果胶部分形成壳,并且可能被肽、半纤维素和多酚(花青素)掩盖。这些可能会阻碍抗同型半乳糖醛酸聚糖抗体进入内部。而在纳米纤维中,果胶部分可能暴露,这使得能够与抗同型半乳糖醛酸聚糖抗体发生强相互作用。纳米纤维和纳米颗粒都仅显示对抗伸展蛋白(其识别由一系列HRGP[富含羟脯氨酸的糖蛋白]携带的LMI表位)的轻微反应性,表明伸展蛋白(其是水果中的主要细胞壁蛋白)(版面C)可能不完整,但可能含有来源于伸展蛋白的肽。对复合物和纤维中的抗阿拉伯半乳糖-蛋白(糖蛋白;LM14表位)(半纤维素蛋白)观察到非常强烈的反应,表明这可能是纳米颗粒或纳米纤维基本结构的主要组分(版面D)。版面A下方的下版面显示了纳米颗粒和纳米纤维对抗木葡聚糖(LM 15;识别木葡聚糖的XXXG基序)的交叉反应性。在印迹期间,抗体和从凝胶转移的分子之间没有反应。斑点印迹显示纳米纤维对抗木葡聚糖有强烈反应,但对纳米颗粒没有反应;

[0367] 图14显示了纳米颗粒(泳道2)和纳米纤维(泳道3)的还原SDS-PAGE。将100 μg 各溶于10%凝胶。(A)将凝胶A在10%乙酸中孵育,然后用考马斯亮蓝染色(凝胶B)。以数字突出显示的凝胶条带通过LC/MS/MS鉴定如下:条带1:PR蛋白片段;来自樱桃的葡聚糖内-1,3- β -葡萄糖苷酶(登录号#P50694);条带2:PR蛋白片段;主要樱桃过敏原Pru a1(登录号#024248;条带3:最有可能是条带1的片段。版面B和C分别显示了 β -葡萄糖苷酶(登录号P50694)和Prua1

(登录号024248)的氨基酸序列;

[0368] 图15显示了乙醇漂白和未漂白樱桃的透析提取物的冻干粉末(上版面)与具有结构相似性的几种组分(下版面)的比較的FT-IR光谱。由于提取物中组分的复杂性质,难以获得结构和官能团的精确归属。与标准品光谱的比較表明存在OH伸缩(碳水化合物、多酚、3000-3500 cm^{-1})和几个由于CH-、C=O-、CN-等从500-2000 cm^{-1} 延伸而产生的峰。与真正的果胶、蛋白质、肽骨架(C-N-C-N)相似性是明显的。图中包括BSA和PGA作为标准品用于比較;

[0369] 图16显示了经酸樱桃的水提取后获得的透析提取物(纳米颗粒)和透析液(果胶)的冻干粉末的广角X射线衍射。尖峰是由样品架的偏转引起的。透析提取物和透析液粉末都显示出从 2θ 10° 到 30° 的非常弥散的带,表明透析提取物(DE)和透析液(DZ)中不存在晶体结构。纤维素(β -1,4-葡聚糖)是在细胞壁中以晶体结构存在的唯一碳水化合物。该结果表明在纳米颗粒中不存在纤维素产物(β -1,4-葡聚糖部分)作为主要组分。果胶具有无定形结构,使得它们能够形成薄片、囊泡和长丝,并且不显示清楚的尖锐衍射图案;

[0370] 图17显示了表明所提出的纳米颗粒的结构模型的结果。在酸樱桃匀浆物中通过TEM观察到的纳米颗粒的放大视图提供于版面A,并且放大区域如版面B所示。将该酸樱桃的水性匀浆物在 4°C 下离心(15000 $\times g$) 15 min以沉淀碎片和凝胶状果胶状材料。使匀浆通过填充有 Sephadex G 25(排阻极限 5 kD,7.5 ml 床体积,Amersham Biosciences)的 PD 10 尺寸排阻柱,并收集空隙体积级分。对含有纳米颗粒的级分进行透射电子显微镜检查。该图显示了围绕内核的塌陷区域,呈环状结构(版面A,箭头1),被由可能含有果胶和蛋白的螺旋丝状结构组成的较低电子密度区域(版面A,箭头2)包围,有时如前所见位于螺旋组织中(箭头2)。在该层周围,存在形成纳米颗粒外部的电子密度稍高的纤维状区域(版面A,箭头3),其可能包含含阿拉伯半乳糖-蛋白的长丝,并可能含有多酚(即花青素)。纳米颗粒的放大视图如版面B所示。螺旋元件用箭头表示;

[0371] 图18显示了给小鼠喂食纳米颗粒(NP)溶液对野生型和ETKO小鼠体重变化的影响。将小鼠(6-7月龄)分成4组,每组5-6只(野生型未处理(WT U)、野生型处理(WT T)、敲除未处理(KO U)和敲除处理(KO T))。纳米颗粒处理的小鼠通过管饲法接受133 μg 当量的NP溶液/40g体重/天(100 mg 提取物/kg体重)的剂量,每周5次。未处理的小鼠接受水。实验持续4周。在测试组中,NP处理的第一周对小鼠体重没有影响,然而,在第2、3和4周之后,继续NP处理阻止了ETKO小鼠的体重增加。尽管未处理的WT和在这些特定剂量/条件下处理的WT之间体重减轻没有显著变化,但未处理的KO和处理的KO之间体重增加的减少具有统计学意义($P<0.05$)。

[0372] 图19显示了纳米颗粒(NP)处理对肝脏中甘油三酯水平变化的影响。该组织来源于实施例2中描述的试验。肝组织的甘油三酯水平通过使用 Wako L型 TG M检测试剂盒(Wako Life Sciences, CA, USA)中描述的方法进行评估。接受NP处理的ETKO小鼠中存在甘油三酯水平的显著降低。上版面显示了从雄性小鼠和雌性小鼠获得的数据。下版面显示了从雄性小鼠获得的数据。通过NP处理降低肝脏甘油三酯支持NP用于预防肝脏中脂质沉积和相关病理症状的用途,该病理症状由例如标记酶活性(如丙氨酸转氨酶和天冬氨酸转氨酶的活性)和更接近野生型小鼠肝脏结构的结构逆转所限定。在非酒精性脂肪变性和/或NASH的人类中也观察到类似的异常,这表明本文所描述的纳米颗粒和/或食物粉末可以提供治疗和/或逆转此类病症的选择;

[0373] 图20显示了来自经实施例2所描述处理的小鼠的肝脏切片的组织病理学。冷冻切片用油红-O染色剂(Sigma-Aldrich)染色以使含有甘油三酯的脂滴可见为红色液滴。顶部两版面/行表示来自野生型(未处理-顶部;纳米颗粒处理-底部)小鼠的染色的肝脏切片的图像。红色染色区域的量化显示对照组和处理组小鼠的变化很小。各版面/行表示来自3只独立小鼠的切片。底部两版面/行显示来自ETK0未处理(顶部)和NP处理(底部)小鼠的肝脏切片的外观。一般来说,来自ETK0小鼠的肝脏切片显示出几个空白区域。这些区域在处理过的ETK0小鼠中减少。此外,肝脏的结构往往与WT相似(与对照相比,紫色区域相对更多)。处理后油红染色区域的面积显著减少(附图下版面)。缩写:野生型未处理(WT-U),野生型处理(WT-T),敲除未处理(KO-U)和敲除处理(KO-T)。出现在附图标记中的“SC”表示“酸樱桃”;

[0374] 图21显示了纳米颗粒(NP)处理的和未处理的小鼠的血清参数。白蛋白、球蛋白及其比值无明显变化。血清中的总蛋白水平似乎略有降低。数值为3次独立处理的平均值 $\pm$ SEM。缩写:野生型未处理(WT/U),野生型处理(WT/T),敲除未处理(KO/U)和敲除处理(KO/T);

[0375] 图22显示了对照和NP处理小鼠的血清生理功能标记(ALT、AST、胆固醇和CK)水平的变化。这些分析是在Guelph大学实验室服务部的病理学实验室使用测试试剂盒通过标准方法进行的。丙氨酸转氨酶和天冬氨酸转氨酶是指示肝脏功能状态的酶。如果肝功能低下或如果肝脏发炎,则更多的这些酶分泌到血液中。在肥胖小鼠中,ALT和AST水平响应于NP处理均有显著且实质性的降低。即使在这些酶水平低的野生型小鼠中,NP处理也会导致下降。NP处理似乎使肥胖小鼠的肝功能正常化。在野生型小鼠和肥胖小鼠中,血清中的胆固醇水平也响应于NP处理降低。高肌酸激酶水平是肌肉损伤的指标,其在NP处理的肥胖小鼠中也显示出大幅下降。这些结果支持NP的抗炎功能。缩写:野生型未处理(WT/U),野生型处理(WT/T),敲除未处理(KO/U)和敲除处理(KO/T);

[0376] 图23显示了未处理的小鼠和纳米颗粒处理的小鼠的血液中葡萄糖和磷的水平。未处理和处理的野生型和ETK0小鼠血清中的磷水平均没有显著变化。葡萄糖水平在野生型中相似,并且在用NP溶液处理后在肥胖小鼠中呈下降趋势;

[0377] 图24显示了响应于用如实施例2中所描述的纳米颗粒溶液处理的STAT4基因表达变化的评估。用琼脂糖凝胶电泳对PCR产物进行定量,并用溴化乙锭染色。未处理的和处理的野生型小鼠之间的STAT4水平没有显著变化。在喂食NP溶液的ETK0小鼠中STAT4表达有下降的趋势。在该测试中,数值与未处理的ETK0小鼠中的水平没有显著差异,但观察到下降的趋势。数值是每组4-5只小鼠的平均值 $\pm$ SEM。STAT4(信号转导子和转录激活子4)是蛋白质STAT家族的转录因子。STAT4被Janus激酶磷酸化,这使得它能够二聚化,并且在细胞因子信号转导过程中易位到细胞核中,并且增加基因表达。Stat 4相关基因表达的增加是激活炎症途径的指征;

[0378] 图25显示了响应于用实施例2中所描述的纳米颗粒溶液处理的NF- κ B基因表达变化的评估。通过蛋白质印迹和化学发光检测对NF- κ B带强度进行定量。在肥胖小鼠中NF- κ B的表达上调,表明炎症途径功能增加。用纳米颗粒溶液处理未导致野生型或肥胖小鼠中NF- κ B水平的显著变化。数值是每组4-5只小鼠的平均值 $\pm$ SEM。核因子- κ B(NF- κ B)是参与通过细胞因子(如白细胞介素和肿瘤坏死因子- α)起始炎症信号传导的关键蛋白。该途径是复杂的,并且可能基于病症具有促炎和抗炎作用。降低的NF- κ B信号传导被认为是炎症程度降低

的指征；

[0379] 图26显示了响应于用实施例2中所描述的纳米颗粒溶液处理的小鼠的TNF α 基因表达变化的评估。通过RT-PCR进行定量,通过琼脂糖凝胶电泳和溴化乙锭染色分离产物。未处理的和处理的野生型小鼠之间的TNF α 基因表达水平没有显著变化。在喂食NP溶液的ETKO小鼠中存在TNF α 表达的显著降低。数值是每组4-5只小鼠的平均值 $\pm$ SEM。TNF α 是参与与由感染以及自身免疫激活引起的炎症相关的信号传导途径的关键蛋白。例如,通常需要下调TNF α 来控制慢性自身免疫性疾病。减少TNF α 有助于减少肥胖症,肥胖症也与体内炎症状态有关；

[0380] 图27显示了响应于用实施例2中所描述的纳米颗粒溶液处理的小鼠的IL6基因表达变化的评估。未处理的和处理的野生型小鼠之间的IL6水平没有显著变化。在喂食NP溶液的ETKO小鼠中存在IL6表达的显著降低。数值是每组4-5只小鼠的平均值 $\pm$ SEM。IL6是介导促炎和抗炎途径的细胞因子。已知IL6的激活会导致慢性炎症状态的发展,从而导致多种疾病。下调IL6可以帮助减轻炎症和慢性病症,例如肥胖症；

[0381] 图28显示了响应于用如实施例2中所描述的纳米颗粒溶液处理的FASN基因表达变化的评估。通过在琼脂糖凝胶上分离PCR产物进行定量,并且溴化乙锭染色使条带可视化。在NP处理的野生型小鼠中FAS水平显著降低。在喂食NP溶液的ETKO小鼠中FAS表达有下降的趋势。在该测试中,数值与未处理的ETKO小鼠中的水平没有显著差异。数值是每组4-5只小鼠的平均值 $\pm$ SEM。FAS (脂肪酸合酶) 是参与脂肪酸生物合成的酶。脂肪酸转化为甘油三酯,并且增加的脂肪酸水平可致使脂肪沉积,从而导致肥胖。因此,该酶水平的降低可有利于降低甘油三酯生物合成和沉积；

[0382] 图29显示了响应于用如实施例2中所描述的纳米颗粒溶液处理的ATGL基因表达变化的评估。通过在琼脂糖凝胶上分离PCR产物进行定量,并且溴化乙锭染色使条带可视化。对照和NP处理的野生型小鼠之间的ATGL水平没有显著差异。同样地,在未处理和NP处理的ETKO小鼠中ATGL表达水平相同。数值是每组4-5只小鼠的平均值 $\pm$ SEM；ATGL (脂肪甘油三酯脂酶) 是参与甘油三酯分解代谢为脂肪酸的起始的酶。ATGL功能可能参与代谢综合征的发展；

[0383] 图30显示了响应于用如实施例2中所描述的纳米颗粒溶液处理的HSL基因表达变化的评估。通过在琼脂糖凝胶上分离PCR产物进行定量,并且溴化乙锭染色使条带可视化。对照和NP处理的野生型小鼠之间的HSL转录水平显著增加。在未处理和NP处理的ETKO小鼠中HSL表达水平相同。数值是每组4-5只小鼠的平均值 $\pm$ SEM。HSL (激素敏感性脂肪酶) 是参与脂肪组织中甘油三酯水解的关键酶,并且是参与能量产生的关键酶。HSL与ATGL结合起作用以从甘油三酯释放游离脂肪酸。当需要能量时,如在禁食期间,该酶通常响应儿茶酚胺而被激活,并且因此在动员储存的脂质方面起作用。在甾体生物合成中,它还从胆固醇酯中释放脂肪酸；

[0384] 图31显示了响应于用如实施例2中所描述的纳米颗粒溶液处理的LPL基因表达变化的评估。通过在琼脂糖凝胶上分离PCR产物进行定量,溴化乙锭染色使条带可视化。在野生型小鼠中,LPL转录本的水平在对NP处理的响应中没有变化。相反,在NP处理的ETKO小鼠中LPL表达水平显著降低。数值是每组4-5只小鼠的平均值 $\pm$ SEM。LPL (脂蛋白脂酶) 是水解与脂蛋白结合的甘油三酯,从而释放游离脂肪酸和单酰基甘油的酶。LPL与其他脂肪酶如胰

脂肪酶和肝脂肪酶相似。LPL存在于几种组织中,例如心脏、肌肉和脂肪组织,并且它们存在于靠近毛细管内腔的细胞层中。LPL可能影响毛细血管内脂蛋白代谢。LPL活性受激素例如胰岛素和肾上腺素的差异调节。已知LPL水平在高脂肪饮食或高碳水化合物饮食后增加,并且可能在肥胖的发展中具有功能;

[0385] 图32显示了响应于用如实施例2中所描述的纳米颗粒溶液处理的PGC1- α 基因表达变化的评估。通过在琼脂糖凝胶上分离PCR产物进行定量,溴化乙啶染色使条带可视化。在野生型小鼠中,PGC1- α 转录本的水平在对NP处理的响应中没有变化。相反,在NP处理的ETKO小鼠中,PGC1- α 表达水平显著降低。数值是每组4-5只小鼠的平均值 $\pm$ SEM。PGC1- α (过氧化物酶体增殖物激活受体- γ 共激活剂)属于转录共激活剂家族,参与调控与碳水化合物和脂质相关的能量代谢。PGC1-A在应激条件下被激活。还已知该蛋白激活参与增强炎症途径的NF- κ B。PGC1-A水平的降低因此可以下调炎症;

[0386] 图33显示了响应于用如实施例2中所描述的纳米颗粒溶液处理的PPAR- α 基因表达变化的评估。通过在琼脂糖凝胶上分离PCR产物进行定量,并且溴化乙啶染色使条带可视化。在野生型小鼠以及ETKO肥胖小鼠中,PPAR- α 转录本的水平在对NP处理的响应中均无变化。数值是每组4-5只小鼠的平均值 $\pm$ SEM。PPAR- α (过氧化物酶体增殖物激活受体- α)属于一组细胞核定位的转录因子。PPAR- α 在肝脏的脂质代谢中具有关键的调节功能,包括刺激参与脂肪酸摄取、转运和分解代谢的基因;

[0387] 图34显示了响应于用如实施例2中所描述的纳米颗粒溶液处理的PPAR- γ 基因表达变化的评估。通过在琼脂糖凝胶上分离PCR产物进行定量,溴化乙啶染色使条带可视化。在NP处理的野生型小鼠中,PPAR- γ 转录本显著减少。NP处理后肥胖小鼠中的PPAR γ 水平无明显变化。数值是每组4-5只小鼠的平均值 $\pm$ SEM。PPAR- γ (过氧化物酶体增殖物激活受体- γ)是位于细胞核中的另一转录因子。该蛋白参与脂肪细胞增殖,促进肥胖发生。PPAR γ 在脂肪组织中表达,在肌肉中以较低水平表达。已知PPAR γ 影响肥胖和II型糖尿病的发展;

[0388] 图35显示了响应于用如实施例2中所描述的纳米颗粒溶液处理的CTL1基因表达变化的评估。通过在琼脂糖凝胶上分离PCR产物进行定量,溴化乙啶染色使条带可视化。在野生型小鼠中,CTL-1转录本的水平在对NP处理的响应中没有变化。相反,在NP处理的ETKO小鼠中CTL1表达水平显著降低。数值是每组4-5只小鼠的平均值 $\pm$ SEM。CTL-1(胆碱转运蛋白样蛋白1)是一种膜结合酶,且发现于脑细胞的质膜和线粒体中。它参与胆碱在线粒体中的转运,用于磷脂酰胆碱的生物合成和膜的生物发生。通过炎症增强巨噬细胞的产生导致CTL-1的过表达,并且似乎与炎症增加相关。降低高水平的膜生物发生可以帮助减少细胞的增大和肥胖相关的变化;

[0389] 图36显示了响应于用如实施例2中所描述的纳米颗粒溶液处理的PSS 2基因表达变化的评估。通过在琼脂糖凝胶上分离PCR产物进行定量,并且溴化乙啶染色使条带可视化。在野生型小鼠中,PSS 2转录本的水平在对NP处理的响应中没有变化;但在ETKO小鼠中显示出较低但显著的减少。数值是每组4-5只小鼠的平均值 $\pm$ SEM。PSS 2(CDP-二酰基甘油-丝氨酸0-磷脂酰转移酶2;磷脂酰丝氨酸合酶2)是一种参与磷脂酰丝氨酸生物合成的酶。该蛋白定位于线粒体中。PSS 2敲除小鼠显示出正常的寿命。结果表明,纳米颗粒溶液处理的效果可能是靶向特定基因而不是所有参与脂类生物合成途径的基因;

[0390] 图37显示了来自2种独立纳米纤维制剂的纳米纤维的透射电子显微照片 (TERM)。

左版面显示了使用冷冻干燥(冻干法)从乙醇漂白的酸樱桃中分离的纳米纤维。右版面显示了通过纳米喷雾干燥分离的纳米纤维;

[0391] 图38显示了纳米纤维与铁的复合物。将纳米纤维制剂(2 mg)溶解在2 ml水中并与1 mM氯化亚铁混合。将该溶液孵育2 h,并用水(2X)透析过夜以去除未结合的铁。在电子显微镜下检查透析溶液,没有重金属染色(即没有用通常用于增加对比度的乙酸双氧铀染色)。纳米纤维复合物用铁(而不是乙酸双氧铀)染色,显示了纳米纤维作为铁载体的潜力;

[0392] 图39显示了哺乳动物细胞中负载钙黄绿素的纳米纤维的摄取(钙黄绿素-纳米纤维加合物)。钙黄绿素(Ex 494 nm/Em 517 nm)自身通过膜是不可渗透的,并且可以通过胞吞作用以低水平被吸收(A、C)。乙醇漂白的樱桃在水中均质化,也含有1 mg/g鲜重当量的钙黄绿素,且上清液用水透析。与纳米纤维复合的钙黄绿素保留在透析袋内,并用于通过共聚焦显微术进行吸收测量。HT 29细胞(左上版面)和正常肠细胞(左下版面)中单独摄取钙黄绿素相对非常低(版面A和C)。负载钙黄绿素的纳米纤维被吸收到结肠直肠癌细胞系HT29(右上,B)和正常人肠CRL 1790(右下,D)细胞中的离散区室中。(比例尺-10 μm)。版面B和D显示了纳米纤维-钙黄绿素复合物在两种类型的细胞中的增强的摄取;

[0393] 图40展示了从未漂白的酸樱桃中分离的纳米颗粒(A、C、E)和从乙醇漂白的酸樱桃中分离的纳米纤维(B、D、F)被吸收到人类细胞(HT-29、CRL 2158、CRL1790)中。纳米颗粒和纳米纤维与Dylight 650进行化学偶联,并在水中进行大范围透析(3x)以去除未结合的染料。使用一种与通常用于标记抗体的氨基的方法类似的方法将Dylight缀合至纳米颗粒和纳米纤维,并在所提供的SOP表中进行了详细描述(ThermoFisher)。总之,用N-羧基琥珀酰亚胺酯激活Dylight,后者与伯胺反应,形成稳定的共价酰胺键。用尺寸排阻柱去除缀合有Dylight的纳米颗粒和纳米纤维。将缀合产物在-20 $^{\circ}\text{C}$ 避光储存。接种细胞并使其生长48 h。将缀合的纳米颗粒和纳米纤维(3ml 培养基中~5 μM Dylight当量)加入到培养基中,并将细胞再孵育24 h。将细胞维持在培替氏平皿(直径3.5 cm)上,并在共聚焦显微镜(Leica)下观察,激发波长为633 nm且发射波长为680 nm。版面A和B分别显示了HT 29细胞(结肠直肠癌细胞系)对Dylight缀合的纳米颗粒和纳米纤维的摄取;版面C和D分别显示了CRL 2158细胞(MDR结肠直肠癌细胞系)对Dylight缀合的纳米颗粒和纳米纤维的摄取;以及版面E和F分别显示了CRL 1790细胞(正常人肠细胞)对缀合的纳米颗粒的摄取。版面中的插图是细胞的放大的合成图像。(比例尺-10 μm);

[0394] 图41显示了纳米纤维-紫杉醇对人结肠直肠癌细胞(HT 29)的细胞毒性。显示了在共聚焦显微镜下观察的HT 29结肠直肠癌细胞的活-死细胞分析。测定试剂盒(Invitrogen)含有两种荧光染料,钙黄绿素AM酯(Ex 494 nm,Em 517 nm),其特异性地进入活细胞,去酯化并且将活细胞染成绿色。垂死细胞以及死细胞是膜受损的(泄漏的质膜)并且允许乙锭均二聚体(Ex 517 nm/Em 617)进入,将细胞核染成红色。在分化活细胞的 517 nm(绿色通道)和使死细胞可视化的 617 nm 处观察细胞。两种波长的合成图像显示细胞正在向细胞活力丧失过渡(A,D,G;黄色)。版面B、C分别表示在617 nm(红色,死细胞)和517 nm(绿色,活细胞)处观察的对照细胞。版面A是未处理细胞的合成图像。版面E、F表示分别在两种波长617和517 nm处记录的用紫杉醇(32 nM)处理的细胞的图像。版面D是合成图像。版面H和I显示了用紫杉醇+纳米纤维(32 nM+4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 纳米纤维)处理的细胞。版面G是红色和绿色图像的合成;

[0395] 图42显示了纳米纤维-紫杉醇对人结直肠MDR癌细胞(CRL 2158)的细胞毒性。显示了在共聚焦显微镜下观察的CRL 2158多药抗性结肠癌细胞的活-死细胞分析。测定试剂盒(Invitrogen)含有两种荧光染料,钙黄绿素AM酯(Ex 494 nm,Em 517 nm),其特异性地进入活细胞,去酯化并且将活细胞染成绿色。垂死细胞以及死细胞是膜受损的(泄漏的质膜)并且允许乙锭均二聚体(Ex 517 nm/Em 617)进入,将细胞核染成红色。在分化活细胞的 517 nm(绿色通道)和使死细胞可视化的 617 nm 处观察细胞。两种波长的合成图像显示细胞正在向细胞活力丧失过渡(A,D,G;黄色)。版面B、C分别表示在617 nm(红色,死细胞)和517 nm(绿色,活细胞)处观察的对照细胞。版面A是未处理细胞的合成图像。版面E、F表示分别在两种波长617和517 nm处记录的用紫杉醇(32 nM)处理的细胞的图像。版面D是合成图像。版面H和I显示了用紫杉醇+纳米纤维(32 nM+4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 纳米纤维)处理的细胞。版面G是红色和绿色图像的合成;

[0396] 图43显示了纳米纤维-紫杉醇对正常人肠细胞(CRL 1790 TM)的细胞毒性。显示了在共聚焦显微镜下观察的CRL 1790人结肠正常上皮细胞的活-死细胞分析。测定试剂盒(Invitrogen)含有两种荧光染料,即钙黄绿素AM酯(Ex 494 nm,Em 517 nm),其特异性地进入活细胞,去酯化并且将活细胞染成绿色。垂死细胞以及死细胞是膜受损的(泄漏的质膜)并且允许乙锭均二聚体(Ex 517 nm/Em 617)进入,将细胞核染成红色。在分化活细胞的 517 nm(绿色通道)和使死细胞可视化的 617 nm 处观察细胞。两种波长的合成图像显示细胞正在向细胞活力丧失过渡(A,D,G;黄色)。版面B、C分别表示在617 nm(红色,死细胞)和517 nm(绿色,活细胞)处观察的对照细胞。版面A是未处理细胞的合成图像。版面E、F表示分别在两种波长617和517 nm处记录的用紫杉醇(32 nM)处理的细胞的图像。版面D是合成图像。版面H和I显示了用紫杉醇+纳米纤维(32 nM+4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 纳米纤维)处理的细胞。版面G是红色和绿色图像的合成;

[0397] 图44显示了由酸樱桃、西兰花和其他食物成分制备的食物粉末的扫描电子显微照片。如实施例4所描述,通过共混各组分的均质化溶液的混合物,并对共混的混合物进行纳米喷雾干燥来制备食物粉末;

[0398] 图45显示了食物粉末水溶液的透射电子显微照片,其显示了超微结构特征。该食物粉末呈扁长至球状的紧密缠绕的纤维结构(参见标记为A的箭头)。该结构类似于在酸樱桃纳米颗粒中观察到的没有结构组织的纳米颗粒(参见图17)。然而,可以观察到类似于球形芯(标记为B的箭头)的球形结构,其中纤维结构从其中发出。螺旋组织结构(箭头C)类似于在纳米颗粒中观察到的螺旋纤维。将50 μl 食物粉末悬浮液的等分试样置于载玻片上,并将碳涂覆的网格以涂覆侧朝下的方式漂浮在溶液上,持续30 s。将该网格在边缘吸干并用0.1%乙酸铀溶液染色。该图片显示了食物粉末颗粒的大聚集体,其经历溶解到小得多的纳米颗粒中(标记为A的箭头)。箭头B显示了具有未缠绕纤维的纳米颗粒的核。缠绕纤维的螺旋性质如箭头C所示;

[0399] 图46显示了食物粉末的抗氧化能力的评估。将该粉末溶解在水中,并且通过将溶液的DPPH自由基清除能力评估为以微克为单位的多酚当量(通过Folin-Ciocalteu试剂评估)来确定溶液的抗氧化能力。在甲醇中制备0.1 mM的Folin-Ciocalteu试剂,并以指定的量加入食物粉末溶液。使抗氧化剂与1 ml DPPH试剂反应,并监测吸光度(紫色,517 nm吸收)。与不含多酚的对照相比,注意到517 nm吸光度的下降并表示为淬灭百分比。Trolox以

与多酚相同的浓度用作阳性对照,并显示TEAC值为1。每个浓度点代表所制备的食物粉末的单个样品;

[0400] 图47显示了用食物粉末和水处理的野生型(WT)和乙醇胺敲除小鼠(KO)的体重变化的评估。用24周龄的Pcyt2敲除小鼠(KO)和同窝出生小鼠对照进行实验。在处理时通过管饲法给予未处理(U)的KO和野生型小鼠组(每组n=4-6)100 μ L水。对KO小鼠和野生型(WT)小鼠(每组n=4-6)的处理(T)组施用100 μ g的食物粉末(在100 μ L水中),每周5次。所有组的口服管饲持续8周。在处理期结束时,处死小鼠并收集血液和组织样品用于分析。星号表示显著不同的数值(*- $P < 0.05$;**- $P < 0.01$);

[0401] 图48显示了食物粉末处理对肝脏中甘油三酯水平变化的影响。该组织来源于实施例4中描述的试验。肝组织的甘油三酯水平通过使用 Wako L型 TG M检测试剂盒(美国,加利福利亚洲,Wako生命科学公司)中描述的方法进行评估。在进行食物粉末处理的野生型和ETKO小鼠中甘油三酯水平均没有显著降低。数值为三个单独样品的平均值 $\pm$ SEM。似乎存在食物粉末处理的肥胖小鼠中甘油三酯降低的趋势。通过食物粉末处理降低肝脏甘油三酯对表现出代谢综合征的个体可能是有益的。缩写:野生型未处理(WT/U),野生型处理(WT/T),敲除未处理(KO/U)和敲除处理(KO/T);

[0402] 图49显示了食物粉末处理的和未处理的野生型和ETKO小鼠的血清参数。白蛋白、球蛋白及其比值无明显变化。对照组和处理组在总蛋白方面差异无统计学意义。数值为3次独立处理的平均值 $\pm$ SEM。缩写:野生型未处理(WT/U),野生型处理(WT/T),敲除未处理(KO/U)和敲除处理(KO/T);

[0403] 图50显示了食物粉末处理的和未处理的野生型和ETKO小鼠的血清参数。葡萄糖、磷和尿素水平无明显变化。在用食物粉末处理的肥胖小鼠中,甘油三酯水平似乎有轻微降低。数值为3个独立样品的平均值 $\pm$ SEM。缩写:野生型未处理(WT-U),野生型处理(WT-T理),敲除未处理(KO-T)和敲除处理(KO-T);

[0404] 图51显示了在用食物粉末处理的野生型和ETKO小鼠中趋化因子(趋化细胞因子)的转录水平的变化。CCL型趋化因子是由激活的T细胞分泌的小糖蛋白,其吸引单核细胞到炎症部位。CCL1(C-C基序趋化因子配体1)及其家族成员(CCL2、CCL3、CCL5...)参与炎症过程。在野生型小鼠中观察到CCL2和CCL5响应于食物粉末处理而显著减少。在ETKO小鼠中存在显示食物粉末处理后这些趋化因子减少的趋势,但在该测试中没有显著差异。数据是来自3只独立小鼠的样品中转录本水平的平均值 $\pm$ SEM。CCL1与CCR8结合发挥其功能。CCL2(单核细胞趋化蛋白1;MCP1)还参与将单核细胞吸引至炎症位点并与受体CCR2和CCR4结合。CCL3(巨噬细胞炎性蛋白- α ;MIP1 α)参与急性炎症并且是一种白细胞引诱物。它结合受体CCR1、CCR4和CCR5)。CCL5结合于CCR5表面受体,并且参与炎症和癌症进展。缩写:野生型未处理(WT/U),野生型处理(WT/T),敲除未处理(KO/U)和敲除处理(KO/T);

[0405] 图52显示了在用食物粉末处理的野生型和ETKO小鼠中趋化因子(趋化细胞因子)的转录水平的变化。CCL型趋化因子是由激活的T细胞分泌的小糖蛋白,其吸引单核细胞到炎症位点。该图显示了CCL6、CCL7、CCL17和CCL19的转录水平的变化。CCL6对啮齿动物是独特的,并且在其作用期间可以与CCR1结合。CCL6在髓细胞分化期间在巨噬细胞中表达。在响应于食物粉末处理的野生型小鼠中观察到CCL6、CCL7和CCL17显著降低。在ETKO小鼠中观察到CCL7的显著降低。在野生型和ETKO小鼠中都显示CCL 19转录本没有变化。数据是来自3只

独立小鼠的样品中转录本水平的平均值 $\pm$ SEM。CCL6与CCR1结合发挥其功能。CCL7还参与将单核细胞吸引至炎症位点并与CCR2受体结合。CCL7的异常表达与肿瘤的发生、MMP-2的激活及转移有关。因此,下调CCL7可能非常有益于癌症预防。CCL17参与淋巴细胞的化学性诱导(chemo attraction),并且参与炎症性疾病如动脉粥样硬化和炎症性肠病的诱导。CCL19参与淋巴细胞再循环。缩写:野生型未处理(WT/U),野生型处理(WT/T),敲除未处理(KO/U)和敲除处理(KO/T);

[0406] 图53显示了在用食物粉末处理的野生型和ETKO小鼠中CCL22趋化因子(趋化细胞因子)的转录水平的变化。CCL22由肿瘤和肿瘤浸润性T细胞产生,引起免疫抑制和免疫细胞逃避肿瘤,从而有助于肿瘤进展。CCL22在免疫细胞中的过表达是由白细胞介素- α 引起的。野生型和ETKO小鼠中的CCL22水平在对食物粉末处理的响应中均无变化。数据是来自3只独立小鼠的样品中转录本水平的平均值 $\pm$ SEM。缩写:野生型未处理(WT/U),野生型处理(WT/T),敲除未处理(KO/U)和敲除处理(KO/T);

[0407] 图54显示了在用食物粉末处理的野生型和ETKO小鼠中CCR型受体的转录本水平的变化的评价。CCR家族的趋化因子受体在血细胞如嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、淋巴细胞、巨噬细胞和树突细胞中表达,并且其表达/活性的增强与增加的炎症有关。当CCR与配体趋化因子(CCL家族)结合时,许多信号转导途径被激活。食物粉末处理没有改变野生型和ETKO小鼠中CCR1和CCR6的表达水平。野生型小鼠中的CCR2和CCR8显示了响应于食物粉末处理的显著下调,表明食物粉末可以下调引起CCR的炎症水平。此外,在喂饲食物粉末的ETKO小鼠中存在CCR8的显著下调。因此,趋化因子及其受体水平的降低似乎是对食物粉末处理的响应。数据是来自3只独立小鼠的样品中转录本水平的平均值 $\pm$ SEM。缩写:野生型未处理(WT/U),野生型处理(WT/T),敲除未处理(KO/U)和敲除处理(KO/T);

[0408] 图55显示了在用食物粉末处理的野生型和ETKO小鼠中CSF(集落刺激因子)的转录本水平变化的评估。CSF是粒细胞/巨噬细胞(GM-CSF)、巨噬细胞(M-CSF)和粒细胞(G-CSF)产生的细胞因子。其表达/活性的增强与炎症的增加有关,且下调有助于减轻炎症和自身免疫性疾病。在野生型小鼠和用食物粉末处理的小鼠中CSF水平相似。CSF3在ETKO小鼠中上调,这是与肥胖发展的潜在联系。用食物粉处理使CSF水平接近于在野生型小鼠中观察到的水平。趋化因子及其受体水平的降低似乎是对食物粉末处理的响应。CD40LG是定位于免疫细胞表面上的CD40蛋白的配体,并且该蛋白表达的增加与炎症的增加有关,与几种癌症的发展有关。在血管内皮中,血小板分泌CD40配体的增加似乎增强ROS的产生,导致斑块细胞的形成和动脉的阻塞。在用食物粉处理的小鼠中,CD40配体的表达显著降低,使其水平接近野生型小鼠。数据是来自3只独立小鼠的样品中转录本水平的平均值 $\pm$ SEM。缩写:野生型未处理(WT/U),野生型处理(WT/T),敲除未处理(KO/U)和敲除处理(KO/T);

[0409] 图56显示了野生型和ETKO小鼠中响应于食物粉末处理的CXC基序趋化因子的变化的评估。CXC1型趋化因子: CXCL趋化因子与免疫原性细胞表面上的CXCR型受体结合并诱导它们的作用。通过其受体CXCR-2起作用的CXCL1(CXC基序配体1)在炎症中起关键作用。CXCL1在野生型小鼠中显著下调,而ETKO小鼠在对食物粉末处理的响应中没有显示出显著变化。CXCL 10及其受体CXCR3涉及在自身免疫性疾病发展过程中发生的病理,包括器官特异性疾病(I型糖尿病)和系统性自身免疫性疾病例如类风湿性关节炎。CXCL 10及其受体CXCR3与自身免疫疾病发展过程中发生的病理有关,包括器官特异性疾病(1型糖尿病)和系统性自

身免疫疾病(如类风湿性关节炎)。干扰素和TNF激活CXCL10的产生,从而导致TH1淋巴细胞的激活。CXCL 10在野生型小鼠中显著下调,而ETKO小鼠没有显示出响应于食物处理的任何变化。CXCL-12(CXC-基序配体-12;基质细胞衍生因子1或SDF 1)是结合其受体CXC-R 4的趋化因子。CXCL-12在多种组织中表达,且在发育中很重要。CXCL-12的过表达导致炎症并且对白细胞具有高度趋化性(神经炎症)。CXCL 12是胰腺癌、多发性硬化、阿尔茨海默病等的临床标志物。CXCL-12在响应于食物粉末处理的野生型小鼠中下调。数据是来自3只独立小鼠的样品中转录本水平的平均值 $\pm$ SEM。缩写:野生型未处理(WT/U),野生型处理(WT/T),敲除未处理(KO/U)和敲除处理(KO/T);

[0410] 图57显示了评估食物处理对CXC-配体转录水平的影响。在由白细胞介素和TNF α 刺激的炎症期间产生CXCL 5。它结合CXC受体2。认为它在细胞增殖、增强运动性和血管生成中起作用。未处理的和食物粉末处理的野生型和ETKO小鼠之间的CXCL 5没有变化。CXCL 15是在肺表皮细胞、肠细胞等中表达的趋化因子,并且与炎症有关。未处理和食物粉末处理的野生型和ETKO小鼠之间的CXCL15的转录本水平没有变化。数据是来自3只独立小鼠的样品中转录本水平的平均值 $\pm$ SEM。缩写:野生型未处理(WT/U),野生型处理(WT/T),敲除未处理(KO/U)和敲除处理(KO/T);

[0411] 图58显示了CXCR(CXC基序趋化因子受体,通过吸引免疫活性血细胞和诱导炎症与趋化因子家族和白细胞介素的CXC配体结合)。食物粉末处理使野生型小鼠中CXCR-2水平显著降低。在ETKO小鼠中没有观察到变化。在野生型和ETKO小鼠中CXCR-5和3以及CXCR5均无差异。结果表明,除了配体(C-C;C-X-C-基序),还可以通过用食物粉末处理来调节受体,这可以提供更好的炎症下调。肿瘤坏死因子家族的受体是参与炎症的另一组受体,已知几种天然产物下调TNF α 连接的信号转导途径。FAS配体(FASL)属于TNF超家族,并且与其受体结合可引发细胞凋亡。在食物粉末处理后,野生型和ETKO小鼠的FASL水平均没有显著差异。数据是来自3只独立小鼠的样品中转录本水平的平均值 $\pm$ SEM。缩写:野生型未处理(WT/U),野生型处理(WT/T),敲除未处理(KO/U)和敲除处理(KO/T);

[0412] 图59显示了在野生型和ETKO小鼠中作为对食物粉末处理的响应的白细胞介素变化的评估。白细胞介素是参与免疫功能的细胞因子,一些是促炎症因子(proinflammatory, IL17),一些是抗炎因子(antiinflammatory, IL10)。它们在正常条件下以及在受到致病生物体挑战时介导免疫功能。观察到用食物粉末处理的野生型小鼠的IL-1A、IL-1B和IL-7的表达水平显著降低。这些白细胞介素的水平在对食物粉末处理的响应中保持相似。在未处理和食物粉末处理的野生型和ETKO小鼠中,IL4的表达水平保持相似。数据是来自3只独立小鼠的样品中转录本水平的平均值 $\pm$ SEM。缩写:野生型未处理(WT/U),野生型处理(WT/T),敲除未处理(KO/U)和敲除处理(KO/T);

[0413] 图60显示了在野生型和ETKO小鼠中作为对食物粉末处理的响应的白细胞介素变化的评估。白细胞介素在正常条件下以及在受到致病生物体挑战时介导免疫功能。经食物粉末处理后,野生型和ETKO小鼠的IL11、IL13、IL2rb和IL17f的表达水平均无变化。数据是来自3只独立小鼠的样品中转录本水平的平均值 $\pm$ SEM。缩写:野生型未处理(WT/U),野生型处理(WT/T),敲除未处理(KO/U)和敲除处理(KO/T);

[0414] 图61显示了在野生型和ETKO小鼠中作为对食物粉末处理的响应的白细胞介素变化的评估。在食物粉末处理后,野生型和ETKO小鼠的IL-21表达水平均无变化。干扰素 γ

(IFNG) 是另一参与抗病毒剂应答的细胞因子。在野生型和ETK0小鼠中, IFNG水平在对食物粉末处理的响应中均无变化。数据是来自3只独立小鼠的样品中转录本水平的平均值 $\pm$ SEM。缩写: 野生型未处理 (WT/U), 野生型处理 (WT/T), 敲除未处理 (KO/U) 和敲除处理 (KO/T); 以及

[0415] 图62显示了在野生型和ETK0小鼠中, 与用食物粉末处理期间肿瘤坏死因子超家族成员的应答相关的转录本水平变化的评价。LTB(淋巴毒素B: 淋巴毒素 β (TNF超家族, 成员3) 是一种膜蛋白和炎症应答的诱导剂。野生型小鼠中LTB转录本的水平响应于食物粉末处理而下调。在用食物粉末处理的ETK0小鼠中, LTB转录本水平没有变化。在食物粉末处理后, 野生型和ETK0小鼠中TNF超家族的其他成员如TNFSF11、TNFSF11b和TNFSF113b的转录水平平均无改变。数据是来自3只独立小鼠的样品中转录本水平的平均值 $\pm$ SEM。缩写: 野生型未处理 (WT/U), 野生型处理 (WT/T), 敲除未处理 (KO/U) 和敲除处理 (KO/T)。

[0416] 图63显示了用和不用食物粉末处理的小鼠的肝脏切片的组织病理学结果。(A) 组示出了用苏木精和曙红染色的未处理的野生型 (WT) 小鼠肝脏切片; 可见极少量脂质体。(B) 组示出了用食物粉末处理并用苏木精和曙红染色的野生型 (WT) 小鼠肝脏切片, ; 可见极少量脂质体。(C) 组示出了用苏木精和曙红染色的未处理肥胖 (KO) 小鼠肝脏切片; 清楚的圆形区域是广泛分布在肝脏中的脂质体。(D) 组示出了用食物粉末处理并用苏木精和曙红染色的 (KO) 小鼠肝脏切片; 清楚的圆形区域是脂质体。组织再生的潜在区域如箭头所示。

具体实施方式

[0417] 本文描述了植物组织衍生的纳米纤维、其生产方法及其用途。为了比较, 还描述了纳米颗粒和食物粉末及其生产方法。应当理解, 提供实施方式和实施例是为了本领域技术人员所期望的说明性目的, 并不意味着以任何方式进行限制。

[0418] 如下文详细描述, 目前已经开发了纳米颗粒、食物粉末和纳米纤维, 其可以以几种令人感兴趣的性质为特征。尽管纳米颗粒和纳米纤维都可以由植物组织制备, 但是在本文中已经使用显著不同的方法制备了这两种纳米结构, 并且在本文中已经发现这两种纳米结构采用显著不同的结构, 以表征在组成方面的显著差异, 并且表征在功能和/或生物效应方面的令人感兴趣的差异 (和相似性)。

[0419] 例如, 本文描述了包括来源于均质化植物组织的自组装细胞组分的纳米颗粒, 该细胞组分包括一个或多个细胞壁和/或其他细胞组分。相比而言, 还描述了包含自组装细胞组分的纳米纤维, 该自组装细胞组分来源于已提取多酚的均质化植物组织, 该细胞组分包含一种或多种细胞壁和/或其他细胞组分。还描述了用于制备此类纳米颗粒和纳米纤维的方法和方案 (指示了它们之间的差异), 以及此类纳米颗粒和纳米纤维在例如治疗或预防受试者的疾病或病症和/或作为递送载体中的用途。本文还详细描述了涉及 (但不同于) 目前描述的纳米颗粒和纳米纤维, 特别是本发明的纳米颗粒的食物粉末。

[0420] 纳米颗粒及其制备方法

[0421] 纳米颗粒:

[0422] 在一个实施方式中, 本文提供了一种包含来源于均质化植物组织的自组装细胞组分的纳米颗粒, 该细胞组分包含一种或多种细胞壁和/或其他细胞组分。在某些实施方式中, 细胞组分可以包括通过均质化从植物组织释放的组分, 其例如自组装成纳米颗粒。在某

些实施方式中,一种或多种细胞壁组分可以包括果胶和/或其衍生物。

[0423] 在某些实施方式中,本文提供了一种包含来源于均质化的植物组织的自组装细胞组分的纳米颗粒,该细胞组分包含一种或多种结构性碳水化合物或其裂解产物,其中脂质不是纳米颗粒的结构组分。

[0424] 在某些实施方式中,纳米颗粒可以基本上或完全不含脂质,或者可以仅含有最小量、残余量或痕量的脂质。在某些实施方式中,脂质例如磷脂、二酰基甘油、三酰基甘油、游离脂肪酸或醛和烷烃不是纳米颗粒的结构组分(即,脂质,并且纳米颗粒作为整体不形成膜性质的单层囊泡或多层囊泡)。在某些实施方式中,如果存在一定量的脂质,则脂质的量低于临界胶束浓度(CMC)水平并且不形成胶束或囊泡。在某些实施方式中,脂质基本上对纳米颗粒三级或四级结构没有贡献,和/或对纳米颗粒自组装没有贡献。在某些实施方式中,可选择植物组织以提供极少或不提供脂质,和/或可在纳米颗粒自组装之前去除脂质。

[0425] 在某些实施方式中,细胞组分可以包括在成熟水果的成熟期间或均质化期间从植物组织释放的那些细胞组分,其能够自组装成纳米颗粒。

[0426] 在某些实施方式中,植物组织可以包含例如水果、蔬菜、叶、花、种子(通常在任何发育阶段)的植物组织或植物材料,或它们的任何组合。在某些实施方式中,可以使用两种或更多种组织的混合物。在某些实施方式中,可以使用多种组织,每种组织富集纳米颗粒的一种或多种组分,使得混合物的均质化提供了用于自组装以形成纳米颗粒的组分。在某些实施方式中,植物组织或植物材料可以包括例如酸樱桃、蓝莓、其部分或其混合物。在某些实施方式中,植物材料或植物组织可以包括成熟水果。在某些实施方式中,发育中的水果(成熟前)可能不含有足够的纳米颗粒组分,但仍可通过与其他植物材料或组织和/或特定纳米颗粒组分混合使用来补偿,和/或其中用酶处理未成熟水果以产生足够的纳米颗粒组分,从而允许在均质化之后进行纳米颗粒组装。在某些实施方式中,植物组织的均质化可以通过增加细胞组分在催熟酶将被激活的条件下暴露于催熟酶来增加催熟的方式进行。在某些实施方式中,植物组织可以提供果胶、一种或多种半纤维素、蛋白质/肽、一种或多种碳水化合物、苹果酸(或能够形成氢键的另一有机酸)、至少一种花青素、和/或抗坏血酸、或它们的任何组合。在某些实施方式中,植物组织可以至少提供果胶、一种或多种半纤维素、蛋白质/肽、一种或多种碳水化合物、苹果酸(或能够形成氢键的另一有机酸)、至少一种花青素和抗坏血酸。在某些实施方式中,纳米颗粒可以包含果胶、半纤维素、肽和/或蛋白质、有机酸、至少一种多酚、它们的裂解产物、或它们的任何组合。在某些实施方式中,有机酸可以包括苹果酸、抗坏血酸或两者。在某些实施方式中,多酚可以包括花青素。在某些实施方式中,细胞组分包括在成熟水果的成熟期间和/或均质化期间从植物组织释放的那些细胞组分,其能够自组装成纳米颗粒。在某些实施方式中,均质化可增加细胞组分暴露于成熟酶,形成可能有助于纳米颗粒的切割产物。

[0427] 在某些实施方式中,本文所描述的纳米颗粒可以不含或基本上不含淀粉(例如 α -和 β -直链淀粉)。淀粉倾向于形成树枝状大分子型结构(dendromer-type structure),因此在用于产生纳米颗粒的植物组织中存在较高水平的淀粉可能干扰纳米颗粒的产生。在某些实施方式中,如果使用含有淀粉的植物组织,则它们可以少量使用以保持低含量淀粉。例如,如果香蕉被用作植物组织的一部分,则由香蕉表示的植物组织的比例可以相对于所使用的植物组织的其他组分相对较低。在某些实施方式中,类似的考虑也可适用于也在本文

中详细描述的食物粉末和/或纳米纤维。

[0428] 在某些实施方式中,植物组织可以是具有部分降解的细胞壁的部分降解状态(例如成熟的),或者可以通过在使细胞壁组分分解代谢的均质化过程中向组织中加入碳水化合物和/或蛋白质分解代谢酶而从植物组织产生。在某些实施方式中,可以部分地处理起始植物组织,例如通过固定在防腐剂如酒精或乙酸(醋)中,并且在进行均质化之前再水化。在某些实施方式中,例如,可以将植物组织与抗坏血酸和苹果酸共混以促进纳米颗粒的结构完整性和/或产率。

[0429] 在某些实施方式中,植物组织可以包括水果或蔬菜植物组织。在某些实施方式中,植物组织可以包括衰老水果、成熟蔬菜或它们的任何组合。在某些优选的实施方式中,植物组织可以包括樱桃(例如酸樱桃)、蓝莓、葡萄、桃子、油桃、李子、杏子、番木瓜、番茄、或它们的任何组合。例如,在某些优选的实施方式中,植物组织可以包括酸樱桃水果组织。在某些实施方式中,植物组织可以包括果皮和/或水果的外部组织,例如在可可中。

[0430] 在某些实施方式中,纳米颗粒可以包含果胶、半纤维素、肽和/或蛋白质、有机酸、至少一种多酚、它们的裂解产物、或它们的任何组合。在某些实施方式中,有机酸可以包括苹果酸、抗坏血酸或两者。在某些实施方式中,多酚可以包括花青素。

[0431] 在某些实施方式中,纳米颗粒的一种或多种结构性碳水化合物可以包含果胶、果胶酸、果胶甲酯、果胶衍生物、聚半乳糖醛酸、鼠李糖聚半乳糖醛酸、半纤维素如木葡聚糖(在某些实施方式中,其可以既不是纤维素也不是果胶)并具有 β -(1 $\rightarrow$ 4)连接的葡萄糖、甘露糖、或木糖主链、和/或阿拉伯半乳糖和/或它们的裂解产物中的一种或多种。

[0432] 在某些实施方式中,纳米颗粒可以具有例如直径为约50-250 nm的基本上球形的结构。在某些实施方式中,纳米颗粒可以是非结晶的。在某些实施方式中,纳米颗粒可以以水溶液,干燥粉末形式或脱水的、冻干的、冷冻干燥的、喷雾干燥的或纳米喷雾干燥的形式提供。

[0433] 在某些实施方式中,纳米颗粒可以包含:基于果胶的内核;包围内核的中间层,中间层包含果胶和半纤维素的大分子和/或它们的裂解产物、多酚和有机酸;以及包含大分子碳水化合物和蛋白质(肽)的原纤化外层,任选地由植物组织的成熟期间和/或均质化期间形成的分解代谢产物形成。在下文中更详细描述图17描绘了这种结构组织的示例。在某些实施方式中,基于果胶的内核可以是通常中空的、或实心的、球形的结构,并且用果胶降解酶例如多聚半乳糖醛酸酶/果胶酶处理纳米颗粒可以导致内核分解成更小的球状体(表明内核可以是基于果胶的)。在某些实施方式中,中间层可以包含例如由果胶和半纤维素来源的大分子、通过花青素键合的氢、抗坏血酸和苹果酸、以及来源于各种细胞蛋白的肽形成的层。在某些实施方式中,原纤化外层可以包含例如来源于在植物组织成熟期间产生的分解代谢的大分子结构碳水化合物和/或蛋白质。

[0434] 在某些实施方式中,纳米颗粒可以包含一种或多种肽,该肽来源于在成熟和/或均质化期间在植物组织中产生的蛋白质降解。在某些实施方式中,纳米颗粒可以包含一种或多种结构性碳水化合物的分解代谢产物,其产生于成熟和/或均质化期间的植物组织中。

[0435] 在某些实施方式中,纳米颗粒可以包含:基于果胶的内核;包围内核的中间层,中间层包含一种或多种包含果胶或其衍生物的螺旋原纤维状结构,以及一种或多种半纤维素衍生分子或其衍生物;以及原纤化外层,其包含半纤维素或其切割产物,以及来源于细胞蛋

白的一种或多种肽。

[0436] 在某些实施方式中,纳米颗粒可以通过在约3-7的pH值范围内存在的氢键相互作用而稳定,并在来源于植物组织细胞组分分解代谢并具有羟基(例如在糖中发现的)和/或氨基(例如在肽中发现的)和/或有机酸基团(如在抗坏血酸和/或苹果酸中发现的)的大分子之间形成。在某些实施方式中,氢键相互作用还可以涉及小分子的羟基,例如多酚(例如花青素,例如花青素-3-葡萄糖苷和/或花青素-3-芸香糖苷)。在某些实施方式中,纳米颗粒可以在略微中性-酸性条件下(例如在约3-7的pH下)以及在一种非缓冲剂的溶液或另一可能干扰氢键的具有高离子强度的溶液中形成/自组装。在某些实施方式中,钙离子可以作为聚半乳糖醛酸链之间的桥,从而能够稳定纳米颗粒。应当理解,盐如钾、钠和/或钙可以存在于溶液中,例如来源于植物组织。

[0437] 应当理解,通过均质化从植物组织中释放的细胞组分可以自组装成纳米颗粒的条件可以根据具体应用和使用的材料而变化。在某些实施方式中,上述条件可以在约15℃-40℃,优选约15℃-35℃的温度范围内。在某些实施方式中,上述条件可以在水中、或在水与水混溶性有机溶剂例如(但不限于)甲醇或乙醇的混合物中。在某些实施方式中,通过均质化从植物组织中释放的细胞组分可以自组装成纳米颗粒的条件可以是在约15%-100% v/v水、更优选约30%-100% v/v水、最优选约100% v/v水的溶液中。当在水性或基本上水性的溶液而发生自组装时,预期在某些实施方式中,可以向混合物中加入通常存在于成熟环境中的酶(例如聚半乳糖醛酸酶),尤其是在使用未成熟水果作为植物组织或作为植物组织的一部分时帮助自组装。在某些实施方式中,可以发生自组装的条件可以是例如在基本上水性的介质中。在某些实施方式中,纳米颗粒的生产可以通过如本文所描述的方法使用合适的介质实现。通常,该介质可以是水或水性介质,但在某些实施方式中可以是或包含水和可混溶的有机溶剂,例如但不限于一种或多种醇(其可以包括乙醇和/或甲醇)、一种或多种酮(如丙酮)、一种或多种溶剂(其可以包括二甲亚砜)、或者单独地或以其任何合适的组合。在某些实施方式中,纳米颗粒的自组装可以发生在上述介质之一中。用于自组装的条件可以包括任何热力学上可行的条件。在某些实施方式中,例如,自组装的条件可以包括约4℃-30℃的温度、通常与生理学上发现的那些一致的离子浓度(即微摩尔至毫摩尔水平)、约5-10% w/v范围内的糖浓度和毫摩尔范围内存在的天然有机酸。

[0438] 在某些实施方式中,优选的方法可以包括这样的方法,其中在约4℃下,使用搅拌器、polytron或任何其他可能破坏细胞组织的设备将水果组织在水性或酒精介质(或两者的组合)中均质化。在使起始材料制成光滑匀浆物后,可过滤匀浆以去除碎片,并以约10000 xg离心以沉淀细碎片。所得匀浆物可以在约4℃用约100 kD截留渗析袋透析约15 h。可以收集来自透析袋的溶液并进行除水和/或冷冻干燥/喷雾干燥、纳米喷雾干燥等形式以提供纳米颗粒。例如,这些可以在约-20℃下在需要长期储存的暗处干燥储存。

[0439] 在某些实施方式中,均质化可以包括任何合适的浸渍植物组织的方法,例如研磨、混合、高剪切均质化或使用装置例如Polytron均质化植物组织。

[0440] 在某些实施方式中,植物组织可以包括一种或多种水果和/或蔬菜,它们可以与或不与其他植物组织组合。在需要营养制剂的实例中,载体(例如水果)和含有营养制剂的植物(例如姜黄根茎)可用作植物组织。在某些实施方式中,可以使用植物组织(例如水果)以及纯化的或部分纯化的产物(例如姜黄粉或姜黄素)。

- [0441] 营养制剂化合物和植物家族的一些实例可以包括：
- [0442] 1. 类胡萝卜素 (β -胡萝卜素、番茄红素、黄体素和/或其他叶黄素, 虾青素等)；
- [0443] 2. 番荔枝素 (具有抗癌特性的来源于番荔枝水果的聚酮化合物)；
- [0444] 3. 乳香 (其可与例如姜黄素一起提供额外的抗炎功能)；
- [0445] 4. 南非醉茄 (一种含有醉茄内酯 (withanolide) 的草药组分, 具有抗应激和预防癌症的作用), 主要具有类固醇结构；
- [0446] 5. 姜科成员, 包括食用姜 (*Zingiber officinalis*)、芒果姜 (*Curcuma amada*) 和其他含有几种生物活性成分 (包括姜辣素和姜烯酚) 的姜科成员；
- [0447] 6. 姜黄 (含有姜黄素)；
- [0448] 7. 来自菊芋的低聚果糖和低聚半乳糖以及菊粉, 以增加益生元含量；
- [0449] 8. 胡椒科 (*Piperaceae*) 成员, 例如胡椒 (*Piper nigrum*) 及其含有胡椒碱和几种衍生物的野生近缘种；和/或
- [0450] 9. 来自以上未列出的植物的任何其他合适的成分。
- [0451] 在进一步的实施方式中, 纳米颗粒可以包含至少一种多酚。在某些实施方式中, 多酚可以是或包含花青素或几种花青素。在更进一步的实施方式中, 纳米颗粒还可以包含有机酸, 例如苹果酸、抗坏血酸或两者。在某些实施方式中, 纳米颗粒可以包含一种以上多酚。如将理解的, 纳米颗粒的多酚组成可以反映所使用的植物组织 (例如, 水果) 的多酚组成, 并且提供任何额外的多酚 (如果加入外部多酚)。在使用酸樱桃时, 例如, 多酚可以包括花青色素3芸香糖苷或葡萄糖苷。在使用蓝莓时, 多酚可以包括在蓝莓中发现的多种酚类和花青素。多酚的实例 (花青素和酚类) 示于下表中：
- [0452] 花青素组分酚类组分
- [0453] 飞燕草素3-半乳糖苷咖啡酸
- [0454] 飞燕草素3-葡萄糖苷阿魏酸
- [0455] 飞燕草素3-阿拉伯糖苷没食子酸
- [0456] 花青色素3-葡萄糖苷肉桂酸
- [0457] 矮牵牛素3-半乳糖苷苯乙酸
- [0458] 芍药色素3-半乳糖苷儿茶素/表儿茶素
- [0459] 矮牵牛素3-阿拉伯糖苷异鼠李素
- [0460] 锦葵色素3-半乳糖苷杨梅素
- [0461] 芍药色素3-阿拉伯糖苷绿原酸
- [0462] 锦葵色素3-葡萄糖苷4-O-阿魏酰奎尼酸
- [0463] 锦葵色素3-阿拉伯糖苷槲皮素3-阿拉伯糖苷
- [0464] 飞燕草素6-乙酰基-3-葡萄糖苷丁香亭3-O-半乳糖苷
- [0465] 锦葵色素6-乙酰-3-葡萄糖苷
- [0466] 在某些实施方式中, 纳米颗粒可具有直径为约50-250 nm的基本上球形的结构。在某些实施方式中, 纳米颗粒可以包含基于果胶的核, 其被一个或多个包含果胶组分的螺旋原纤维状结构 (例如, 鼠李糖聚半乳糖醛酸)、一种或多种半纤维素衍生的分子 (例如, 木葡聚糖) 以及一种或多种来源于细胞壁蛋白质例如富含羟脯氨酸的糖蛋白 (HRGP) 的肽所包围。

[0467] 在某些实施方式中,纳米颗粒还可以包含一种或多种生物活性剂。在某些实施方式中,生物活性剂可以与纳米颗粒复合、缀合或混合。例如,生物活性剂可以是药学活性药物、营养制剂或营养物。考虑到本文的教导,本领域技术人员将知晓可根据具体应用使用的多种合适的药物、营养制剂和/或营养物。在某些实施方式中,药学活性药物可以包括开发用于控制慢性疾病的任何合适的药物,例如用于癌症治疗的那些(例如,长春新碱、长春花碱、紫杉醇、阿霉素、聚酮化合物等)。在某些实施方式中,营养制剂可以包含类胡萝卜素(例如,番茄红素、玉米黄质、虾青素,其可具有用于滴眼剂中的潜力)、抗炎剂(例如姜黄/姜黄素、乳香、南非醉茄和/或其他生物活性草本植物)、营养物(例如Fe²⁺、Zn、Se、钴胺素(Vit B12))和/或抗氧化酶(例如靶向区域、缺血/再灌注的超氧化物歧化酶、过氧化氢酶等)。

[0468] 在某些实施方式中,纳米颗粒可以以例如水溶液、干燥粉末形式或脱水的、冻干的、冷冻干燥的、喷雾干燥的或纳米喷雾干燥的形式提供。在某些实施方式中,纳米颗粒可以配制用于口服施用。在某些实施方式中,纳米颗粒可以以适于与食物一起摄入的形式提供。在某些实施方式中,纳米颗粒可以以胶囊、可注射形式、用于粘膜区域的喷雾形式和/或用于皮肤应用的局部施用形式(例如软膏剂)提供。

[0469] 在某些实施方式中,本文提供了一种包含如本文所描述的纳米颗粒的组合物。在某些实施方式中,纳米颗粒或组合物还可以包含在纳米颗粒的制备期间或之后添加的药学上可接受的载体、赋形剂或稀释剂。在某些实施方式中,组合物还可以包括生物活性剂,例如药物、生物分子、蛋白质、酶、抗体或任何其他药剂。

[0470] 在更进一步的实施方式中,制备纳米颗粒的植物组织可以包括水果或蔬菜植物组织。在某些实施方式中,植物组织可以独立地或组合地包括水果,例如樱桃、蓝莓、葡萄,并且在某些实施方式中可以另外包括具有营养重要性的其他产品,例如西兰花、杏仁、大豆或姜黄,作为组织或作为加工产品或其任何组合。例如,植物组织可以包括酸樱桃水果。在某些实施方式中,植物组织还可以包括植物来源的营养物或营养制剂载体。在某些实施方式中,植物组织还可以包括例如酸樱桃水果与植物组织(例如,西兰花、蘑菇、坚果或坚果产品(即,杏仁、榛子)、根部(即南非醉茄、人参、香附子等)的组合。

[0471] 已经进行了广泛的研究,表明本文所描述的纳米颗粒的组织结构是复杂的。基于所获得的实验证据(参见下面列出的实施例部分),并且不希望以任何方式受理论束缚,提出本文所描述的纳米颗粒的某些实施方式的以下结构模型:

[0472] 根据EM数据,纳米颗粒可以包括由不同的中间层包围的不同的内核,在中间层上可以提供具有突出的纤维状结构的更原纤化的外层。这三个不同的区域(内核、中间层和外层)基于它们结合重金属(例如,醋酸双氧铀)的能力是可区分的。铀离子可以与诸如聚合物链的糖酸(葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸)等带负电荷的部分结合,使该区域电子密集。因此,三层之间的区别可以反映这些层中聚合物组成的差异。

[0473] 酶处理纳米颗粒导致结构断裂,显示出中间结构。果胶酶(多聚半乳糖醛酸酶)处理导致整个纳米颗粒破裂成囊泡结构,表明多聚半乳糖醛酸部分可以分散在整个纳米颗粒中。

[0474] 用 β -1,4-葡聚糖酶处理导致纳米颗粒的外部结构溶解,留下内核。由于结构中不存在可感知水平的长链纤维素分子(x射线衍射图),似乎该活性可能针对具有 β -1,4-葡聚糖结构的半纤维素部分。因此,预期半纤维素可以形成排列在纳米颗粒的中间层(middle/

intermediate layers)和外层中的组分的主要部分。

[0475] 胰蛋白酶处理后观察到核结构。胰蛋白酶处理也导致外层和中间层的溶解,留下球形的基于果胶的内核。因此,外层和中间层也可以含有蛋白质/肽。

[0476] 在 SDS-PAGE 过程中,针对同型半乳糖醛酸聚糖产生的抗体对纳米纤维表现出强烈反应。SDS-PAGE显示纳米颗粒中存在花青素、肽和果胶,而纳米纤维中不含花青素。据推测,抗体可能无法到达纳米颗粒内部,因此反应较弱。这也表明同型半乳糖醛酸聚糖可能暴露在纳米纤维中,并导致与抗体的强交叉反应性(斑点印迹,图12)。

[0477] 纳米颗粒和纳米纤维中与针对伸展蛋白产生的抗体的交叉反应性都非常低(斑点印迹,图12),表明纳米颗粒和纳米纤维中都不存在明显水平的伸展蛋白来源的肽。

[0478] 相反,观察到针对半纤维素-蛋白(阿拉伯半乳聚糖-蛋白)产生的抗体的强反应性,表明这可能是纳米颗粒外层的主要组分,并作为纳米纤维的组分。

[0479] 在某些实施方式中,如本文所描述的纳米颗粒还可以包含一种或多种生物活性剂,例如药物、营养物、生物分子(即蛋白、酶、核酸、营养制剂或其他药剂)。在某些实施方式中,生物活性剂可以与纳米颗粒复合或化学缀合。在某些实施方式中,在纳米颗粒形成期间或之后,可以将生物活性剂引入纳米颗粒(并与纳米颗粒复合或缀合)。

[0480] 在另一实施方式中,本文提供了一种靶向纳米颗粒,其包含与特异性针对癌症标志物的靶向抗体缀合的本文所描述的纳米颗粒。在某些实施方式中,靶向抗体可以包括用于将靶向纳米颗粒靶向癌细胞的PD-L1抗体。在某些实施方式中,靶向纳米颗粒可以与至少一种细胞毒性药物或抗癌药物复合或缀合。在某些实施方式中,靶向纳米颗粒可以与紫杉醇、阿霉素或两者复合或缀合。

[0481] 在另一实施方式中,本文提供了一种抗菌纳米颗粒,其包含与抗菌剂复合或缀合的如本文所描述的纳米颗粒。在某些实施方式中,抗菌剂可以包含溶菌酶、四环素、或乳链菌肽、或它们的任何组合。在某些实施方式中,抗菌纳米颗粒可用于治疗或预防MDR细菌感染。

[0482] 制备纳米颗粒的方法:

[0483] 在一个实施方式中,本文提供了一种用于从均质化的植物组织制备纳米颗粒(例如本文所描述的那些)的方法,该方法包括:

[0484] 在溶液中提供均质化植物组织,该溶液包含从植物组织释放的细胞组分;

[0485] 从该均质化的植物组织中去除碎片(如果存在的话);和

[0486] 任选地,透析均质化的植物组织以去除未复合的化合物,或通过尺寸排阻去除未复合的化合物,

[0487] 由此提供一种包含通过细胞组分的自组装形成的纳米颗粒的溶液。

[0488] 在某些实施方式中,溶液可以包含任何合适的介质。通常,该介质可以包含水或水性介质,但在某些实施方式中可以是或包含水和可混溶的有机溶剂,例如但不限于一种或多种醇(其可以包括乙醇和/或甲醇)、一种或多种酮(如丙酮)、一种或多种溶剂(其可以包括二甲亚砜)、或者单独地或以其任何合适的组合。

[0489] 在某些实施方式中,可以通过透析、过滤均质化的植物组织、离心均质化的植物组织、或对均质化的植物组织进行切向流过滤或连续流过滤、或它们的任何组合去除碎片。在某些实施方式中,去除碎片的步骤可以包括过滤均质化的植物组织、或离心均质化的植物

组织、或两者。在某些实施方式中,这些碎片可以通过以下技术中的一种或组合来去除,这些技术可以包括离心(例如,简单或连续流离心)和/或膜过滤(例如,透析、使用适当截留膜例如1-100 μm 的离心分离)、切向流过滤、尺寸排阻柱分离等……,这些技术单独或参与这些技术的组合。在某些实施方式中,在~9000-12000 g的离心可以沉淀大部分碎片,或者通过100微米过滤器过滤可以提供合适的碎片去除。

[0490] 在某些实施方式中,透析步骤(如果进行的话)可以使用对水(或另一水溶液,尽管水是优选的)的简单透析来进行,尽管这可能更容易地用于实验室规模而不是商业大规模的产品。因此,在某些实施方式中,透析/分离可以使用连续离心分离、切向流过滤来进行,或者可以通过使颗粒足够细从而可以省略透析分离(例如,使用设备例如高剪切均质化器(例如声谱显示仪)或微射流机)。

[0491] 在某些实施方式中,去除碎片的澄清匀浆物可以使用膜过滤技术进一步纯化,其中可以去除未掺入到纳米颗粒中的较小分子。这可以包括,例如,使用(例如)100,000 MW截留透析袋对水进行简单透析,或通过类似截留尺寸的合适膜或使用可以浓缩纳米颗粒的搅拌槽(例如Amicon或类似装置)的跨膜过滤对匀浆物进行切向流过滤(交叉流过滤)。或者,可以使用具有相似排阻限(100,000 MW)的尺寸排阻柱,其中使用溶剂(水或低摩尔浓度的缓冲液(例如 1 mM)在约4-5的pH值下)在空隙体积中洗脱纳米颗粒。这样的操作可以优选在约4°C下进行。

[0492] 在某些实施方式中,该方法还可以包括使包含纳米颗粒的溶液进行脱水、冻干、冷冻干燥、喷雾干燥或纳米喷雾干燥的步骤。

[0493] 在某些实施方式中,该方法可以包括在合适的条件下通过自组装形成纳米颗粒。在某些实施方式中,例如,上述条件可以在约4°C-40°C,优选约15°C-35°C的温度范围内。在某些实施方式中,上述条件可以在水中、或在水与水混溶性有机溶剂例如(但不限于)甲醇或乙醇的混合物中。在某些实施方式中,通过均质化从植物组织中释放的细胞组分可以自组装成纳米颗粒的条件可以是在约15%-100% v/v水、更优选约30%-100% v/v水、最优选约100% v/v水的溶液中。当在水性或基本上水性的溶液中发生自组装时,预期在某些实施方式中,可以向混合物中加入通常存在于成熟环境中的酶(例如聚半乳糖醛酸酶),尤其是在使用未成熟水果作为植物组织或作为植物组织的一部分时帮助自组装。在某些实施方式中,可以发生自组装的条件可以是例如在基本上水性的介质中。在某些实施方式中,纳米颗粒的生产可以通过如本文所描述的方法使用合适的介质实现。通常,该介质可以是水或水性介质,但在某些实施方式中可以是或包含水和可混溶的有机溶剂,例如但不限于一种或多种醇(其可以包括乙醇和/或甲醇)、一种或多种酮(如丙酮)、一种或多种溶剂(其可以包括二甲亚砜)、或者单独地或以其任何合适的组合。在某些实施方式中,纳米颗粒的自组装可以发生在上述介质之一中。用于自组装的条件可以包括任何热力学上可行的条件。在某些实施方式中,例如,自组装的条件可以包括约4°C-30°C的温度、通常与生理学上发现的那些一致的离子浓度(即微摩尔至毫摩尔水平)、以及约5-10% (w/v) 范围内的糖浓度和毫摩尔范围内存在的天然有机酸。

[0494] 在某些实施方式中,该方法可以包括通过在基本上水性介质中自组装形成纳米颗粒。通常,在上述方法中,透析可以在约4°C过夜进行以促进纳米颗粒组装。如果在室温下进行透析,那么来自大气污染物的污染的风险可能增加。在某些实施方式中,可以在GMP条件

下制备纳米颗粒以提供纯的纳米颗粒,特别是在药物应用中,例如其中将药物添加至纳米颗粒的应用。在某些实施方式中,以约1 g组织与1或2 ml水的比率制备均质化的植物组织(即匀浆物)。该组织通常已经是80-90%的水。这些条件可以基于起始材料的性质而变化。在某些实施方式中,纳米颗粒可以在均质化过程中形成或开始形成,并且也可以随后例如在透析(如果进行的话)期间形成。在某些实施方式中,可以获得含有约80%或更多纳米颗粒的纳米颗粒溶液。在某些实施方式中,温度通常可以保持较低,例如在约4℃以防止不期望的降解。

[0495] 在上述方法的另一实施方式中,在溶液中提供均质化的植物组织的步骤可以包括将植物组织在水性介质或有机介质(例如但不限于,水性介质或有机介质(或其混合物),包括水、乙醇、甲醇或丙酮或其混合物)中均质化。在某些实施方式中,均质化的植物组织可以通过polytron或使用例如声谱显示仪的超声处理来制备。在另一实施方式中,在溶液中提供均质化的植物组织的步骤可以包括使植物组织在包含例如水、乙醇、甲醇或丙酮中的任何一种或多种的水性介质或有机介质中进行高剪切均质化和/或超声分解。在某些实施方式中,高剪切均质化可以包括例如在约3000-5000 rpm下均质化,其中刀片直径约20 cm,压力约80 kN(考虑到本文的教导,本领域技术人员将知道适合特定应用的合适的高剪切均质化条件)。例如,如果可以使用超声处理和/或空化,可以选择剪切力使得纳米颗粒不会被使用的条件拉开。在某些实施方式中,溶液中均质化的植物组织所要达到的尺寸范围可以是例如约50-250 nm。在某些实施方式中,可以使用例如设置为约6-7的速率的Polytron,使用30 s脉冲,持续约3个周期。

[0496] 例如,在某些说明性的实施方式中,均质化的植物组织可以包括植物组织例如樱桃水果,其已经用搅拌机以约4500 rpm均质化约5 min,然后进一步用polytron进行精细均质化约5 min。然后可将所得浆液通过约4层纱布过滤并在约10,000 x g下离心以去除碎片,并可收集上清液。上清液可以在大约10,000 D截留透析袋中用水透析以去除小分子量组分。透析后,可将溶液冷冻干燥或喷雾干燥以获得粉末形式的纳米颗粒。

[0497] 在某些实施方式中,可以使用声谱显示仪,其使用加速的流体流动、超声空化和湍流来制备分散体。在纳米颗粒的情况下,预期相对低压的系统可能是优选的,因此可以相应地进行泵选择。声谱显示仪是康涅狄格州斯特拉特福Sonic Corporation的产品(www.sonicmixing.com)。

[0498] 在又一实施方式中,本文提供了一种用于从均质化的植物组织制备如本文所描述的纳米颗粒的方法,该方法包括:

[0499] 在溶液中制备均质化的植物组织,该溶液包含从植物组织释放的细胞组分;

[0500] 允许通过细胞组分的自组装形成纳米颗粒;

[0501] 从该均质化的植物组织中去除碎片(如果存在的话);和

[0502] 冷冻干燥、喷雾干燥或纳米喷雾干燥以形成包含纳米颗粒的粉末。

[0503] 例如,在某些实施方式中,喷雾干燥步骤可以采用例如Fujisaki 4喷嘴喷雾干燥系统,其可以蒸发不同容量的水(DAIICHI JITSUGYO (AMERICA), Inc. (DJA) 939 A.E.C. Drive, Wood Dale, IL 60191, USA)。一种这样的中试规模模型(MDL 150)每小时可以蒸发~ 10 kg水,设计每天喷雾干燥~200升匀浆物,每天回收~40 kg NP或食物粉末。

[0504] 在某些实施方式中,当植物组织包括例如酸樱桃时,可以使用上述方法。已经发现

酸樱桃对上述方法特别有效,在形成包含纳米颗粒的粉末之前不需要进行透析步骤。

[0505] 在上述方法的某些实施方式中,自组装可在基本上水性的介质中发生。在某些实施方式中,在溶液中制备均质化的植物组织的步骤可以包括使植物组织在水性介质或有机介质中进行高剪切均质化。在某些实施方式中,去除碎片的步骤可以包括过滤均质化的植物组织、或离心均质化的植物组织、或两者。

[0506] 在某些实施方式中,预期本文所描述的纳米颗粒可用于递送货物,例如生物活性剂或另一感兴趣的试剂。已经观察到,例如本文所描述的纳米颗粒在冷冻或喷雾干燥时尺寸会膨胀,然后当置于水性溶液或水中时尺寸会收缩。因此,在某些实施方式中,预期可以将干燥的或基本上干燥的粉末或纳米颗粒的其他制剂与特定的货物混合,然后加入水或水性溶液以收缩纳米颗粒,从而将货物捕获在纳米颗粒中用于递送。在实验研究中,纳米颗粒溶液产生50-250 nm直径的结构,当在SEM(真空干燥效应)下观察时,根据TEM和SEM的数据,观察到这些纳米颗粒溶液具有直径大~4-5倍的壳状结构,提供了干燥时这种尺寸膨胀的实例。

[0507] 在某些实施方式中,在需要纳米颗粒与另一部分如生物活性剂复合或缀合的情况下,本文所描述的任何方法还可以包括在适于该部分与纳米颗粒复合或化学偶联或缀合的条件下将该部分(即生物活性剂)引入溶液中的均质化植物组织或引入已形成的纳米颗粒的额外步骤。

[0508] 在某些实施方式中,例如,可以使用适合于存在于纳米颗粒(即-NH₂、-COOH、-OH)和缀合试剂中的官能团的方法实现化学缀合。例如,当在以下实施例3中使用Dylight时,使用N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)酯激活染料,该酯是用于标记蛋白质的-NH₂部分的反应性基团。化合物的NHS酯与受体(即含有肽的纳米颗粒、纳米纤维)的伯胺反应,形成稳定的共价酰胺键并释放NHS基团。如将理解的,在相同或不同官能团处结合的其他偶联剂或交联剂也是可用的(例如,来自ThermoFisher Scientific)。

[0509] 在一个优选的实施方式中,可以将纳米颗粒和/或纳米纤维溶解在磷酸盐缓冲盐水中并与所推荐的0.67 M硼酸盐缓冲液(ThermoFisher scientific)混合以提供2 mg/ml的浓度水平。在与激活的标记试剂(NHS酯)充分混合后,可以将混合物在25℃孵育1 h。含有缀合产物(NP/NF)的混合物可以使用由制造商提供的尺寸排阻柱或旋转柱分离。缀合的NP/NF可以洗脱在空隙体积中。缀合产物可被冻干并作为干粉储存在例如-20℃下(参见,例如,Nour Karra和Simon Benita*(2012),用于靶向癌症治疗的配体纳米颗粒缀合方法(The Ligand Nanoparticle Conjugation Approach for Targeted Cancer Therapy);现代药物代谢(Current Drug Metabolism),2012, 13, 22-41,以引用方式并入本文)。

[0510] 纳米纤维及其生产方法

[0511] 纳米纤维

[0512] 纳米纤维也已被开发,并在本文中进行了描述。尽管纳米颗粒和纳米纤维都可以由植物组织制备,但是在本文中已经使用显著不同的方法制备了这两种纳米结构,并且在本文中已经发现这两种纳米结构采用显著不同的结构,以表征在组成方面的显著差异,并且表征在功能和/或生物效应方面的令人感兴趣的差异(和相似性)。

[0513] 因此,本文还描述了一种包含来源于均质化的植物组织的自组装细胞组分的纳米纤维。与如上所描述的纳米颗粒相比,纳米纤维在许多方面不同,特别是纳米纤维来源于均

质化的植物组织,多酚已从该植物组织中提取或该植物组织中天然多酚含量已经很低。在某些实例中,细胞组分可以包括通过均质化从植物组织释放的组分,其自组装成纳米纤维。在某些实例中,一种或多种细胞组分可以包含果胶。在某些实例中,纳米纤维可以包含一种或多种半纤维素衍生的分子、一种或多种来源于细胞壁蛋白的肽、或两者。

[0514] 在一个实施方式中,本文提供了一种包含来源于均质化的植物组织的自组装细胞组分的纳米纤维,该细胞组分包含一种或多种结构碳水化合物或其裂解产物,其中脂质和多酚不是纳米纤维的结构组分。

[0515] 如本文所描述,当前描述的纳米纤维通常可以用任何合适的植物组织制备,例如可以用于制备如本文详细描述的那些(例如,参见上文),条件是多酚已经首先被提取或者在植物组织中以低水平或降低的水平存在。在某些实施方式中,自组装、细胞组分、结构性碳水化合物或它们的裂解产物以及纳米纤维的脂质含量可以基本上类似于本文详细描述的那些,除了多酚在纳米纤维中不发挥结构作用,导致纳米纤维采用与纳米颗粒显著不同的结构和组织。

[0516] 在某些实施方式中,纳米纤维可以基本上不含脂质、可以基本上不含多酚、或两者都不含。

[0517] 在某些实施方式中,纳米纤维可以包括细长纤维,该细长纤维包括一根或多根包含至少一种结构碳水化合物或由至少一种结构碳水化合物制成的股线。在某些实施方式中,基本纳米纤维可以包括细长纤维,该细长纤维的长度为微米级并且直径为约5-10 nm(参见图37,左组和右组)。这些纤维似乎与胰蛋白酶处理后从纳米颗粒释放的纤维同源(参见图4,版面D、E)。当用扫描电子显微镜检查干燥的纳米纤维时,也观察到这样的纤维状结构(参见图7,版面A)。在某些实施方式中,纳米纤维可以被认为乙醇漂白的纳米颗粒的产物。纳米纤维也被观察为螺旋缠绕结构(参见图2,版面C),表明其可能源于围绕纳米颗粒的果胶核的大分子。

[0518] 在某些实施方式中,纳米纤维可以包含果胶、半纤维素、肽和/或蛋白质、有机酸、它们的裂解产物、或它们的任何组合。在某些实施方式中,有机酸可以包括苹果酸、抗坏血酸或两者。

[0519] 在某些实施方式中,细胞组分可以包括在成熟水果的成熟期间或均质化期间从植物组织释放的那些细胞组分,其能够自组装成纳米纤维。

[0520] 在某些实施方式中,一种或多种结构碳水化合物包含果胶、果胶酸、果胶甲酯、果胶衍生物、聚半乳糖醛酸、鼠李糖聚半乳糖醛酸、木葡聚糖、半纤维素、具有 β -(1 $\rightarrow$ 4)连接的葡萄糖、甘露糖、或木糖主链的木葡聚糖、和/或阿拉伯半乳糖和/或它们的裂解产物中的一种或多种。

[0521] 在某些实施方式中,纳米纤维可以具有例如直径为约5-10 nm的纤维形状。在某些实施方式中,纳米纤维可以是非结晶的。

[0522] 在某些实施方式中,纳米纤维可以通过氢键相互作用而稳定,并在来源于植物组织细胞组分分解代谢并具有羟基和/或氨基和/或有机酸基团的大分子之间形成。

[0523] 在某些实施方式中,纳米纤维还可以包括生物活性剂。例如,在某些实施方式中,如本文所描述的纳米纤维还可以包含一种或多种生物活性剂,例如药物、营养物、生物分子(即蛋白、酶、核酸、营养制剂或其他药剂)。在某些实施方式中,生物活性剂可以与纳米纤维

复合或化学缀合。在某些实施方式中,在纳米纤维形成期间或之后,可以将生物活性剂引入纳米纤维(并与纳米纤维复合或缀合)。在某些实施方式中,生物活性剂可以是或包含药学活性药物、蛋白质、酶、营养制剂或营养物。

[0524] 在某些实施方式中,纳米纤维通常可以以任何合适的形式提供,例如参考上述纳米颗粒描述的那些。在某些实施方式中,纳米纤维可以以例如水溶液、干燥粉末形式或脱水的、冻干的、冷冻干燥的、喷雾干燥的或纳米喷雾干燥的形式提供。

[0525] 在某些实施方式中,用于制备纳米纤维的植物组织可以包含多酚含量低、或者多酚已经从其中提取或去除的水果或蔬菜植物组织。在某些实施方式中,植物组织可以包括衰老水果、成熟蔬菜或它们的任何组合;优选地,其中植物组织包含多酚含量低和/或多酚已被去除或降低的樱桃(例如,酸樱桃)、蓝莓、葡萄、桃子、油桃、李子、杏子、番木瓜、番茄或它们的任何组合。在某些实施方式中,植物组织可以包含果皮和/或水果的外部组织,例如在可可中,例如多酚含量低和/或多酚已从其中去除或降低。

[0526] 在某些实例中,纳米纤维可以具有丝状或纤维状结构,其直径为约5-10 nm,且长度在微米范围内。在某些实例中,纳米纤维还可以包含一种或多种生物活性剂。在某些实例中,生物活性剂可以与纳米纤维复合、缀合或混合。举例说明,生物活性剂可以是药学活性药物、营养制剂或营养物。在某些实施方式中,生物活性剂可以包含一种或多种癌症药物如紫杉醇、多西他赛、多柔比星、长春新碱和/或长春花碱;一种或多种金属如铁、镁、硒和/或锌;一种或多种营养制剂如乳香、醉茄内酯、番荔枝素、诸如万古霉素等四环素,以及其他抗细菌剂如蓖麻子毒素(nicin)、溶菌酶和具有类似性质的其他分子,用于控制疾病和食品细菌污染。

[0527] 在某些实例中,纳米纤维可以以例如水溶液、干燥粉末形式或脱水的、冻干的、冷冻干燥的、喷雾干燥的或纳米喷雾干燥的形式提供。

[0528] 在某些实施方式中,纳米纤维可以作为待与食物一起摄取的胶囊提供,或者作为纳米纤维-营养制剂复合物(例如乳香、姜黄素、南非醉茄等,参见本文提供的与纳米颗粒和/或食物粉末有关的其他实例)提供。

[0529] 例如,在某些说明性实施方式中,均质化的植物组织可以包括诸如樱桃水果等植物组织,其已经通过在约95%的乙醇(1:1 w/v)中浸泡约24-48 h而基本上去除或耗尽小分子质量组分(包括多酚),之后可以倒出溶液并将水果在乙醇中进一步培养额外48 h,以便去除大部分或基本上所有的颜色组分(即花青素)。然后用水充分洗涤水果组织约24 h(在等体积的水中2x-3x)。然后用搅拌器以约4500 rpm均质化水果组织约5 min,然后进一步用polytron均质化约5 min。然后可将所得浆液通过约4层纱布过滤并在约10,000 x g下离心以去除碎片,并可收集上清液。上清液可以在大约10,000 D截留透析袋中用水透析以去除小分子量组分。透析后,可将溶液冷冻干燥或喷雾干燥以获得粉末形式的纳米纤维。

[0530] 或者,在某些实施方式中,可对水果组织进行冷榨以分离汁液。这样获得的果渣可以去除色素组分,并且然后在乙醇中孵育以去除色素组分(例如,花青素和其他可与纳米颗粒的碳水化合物和肽氢键结合的多酚)。在水合之后,组织可以如上所描述进行均质化和加工。

[0531] 在更进一步的实例中,制备纳米纤维的植物组织可以包括水果或蔬菜植物组织。在某些实例中,植物组织可以包括樱桃、蓝莓、葡萄或其水果的任何组合。通过一个优选实

例,植物组织可以包括酸樱桃水果组织。

[0532] 用于生产纳米纤维的方法

[0533] 在另一实施方式中,一种用于从均质化的植物组织制备纳米纤维(例如本文所描述的那些)的方法可以包括:

[0534] 在多酚含量低的溶液中制备均质化的植物组织,该溶液包含从植物组织释放的细胞组分;

[0535] 从该均质化的植物组织中去除碎片(如果存在的话);和

[0536] 任选地,透析均质化的植物组织以去除未复合的化合物,或通过尺寸排阻去除未复合的化合物,

[0537] 由此提供包含通过细胞组分的自组装形成的纳米纤维的溶液。

[0538] 在某些实施方式中,漂白的植物组织通常可以被认为是一种组织,通过使用与水高度混溶的有机溶剂将它们从组织中提取出来,从而从中去除简单的、游离的、可溶分子。这可能包括溶剂,例如乙醇、甲醇、丙酮等。这些溶剂可能会破坏细胞区室,并使大部分游离分子(例如花青素、糖、有机酸等)能够浸出到脱水介质中。相比之下,使用蔗糖溶液的渗透脱水主要提取水分,将组分留在水果中。本文所描述的漂白是指组织颜色的丧失,而不是氧化过程。

[0539] 在另一实施方式中,本文提供了一种用于从均质化的植物组织制备纳米纤维的方法,该方法包括:

[0540] 在多酚含量低的溶液中制备均质化的植物组织,该溶液包含从植物组织释放的细胞组分;

[0541] 从该均质化的植物组织中去除碎片(如果存在的话);

[0542] 允许通过细胞组分的自组装形成纳米纤维;和

[0543] 冷冻干燥、喷雾干燥或纳米喷雾干燥以形成包含纳米纤维的粉末。

[0544] 在某些实施方式中,本文所描述的制备纳米纤维的方法及其步骤可以基本上类似于本文所描述的用于生产纳米颗粒的那些,区别在于植物组织可以是多酚含量低的,或者植物组织可以是从中提取多酚以促进纳米纤维形成的植物组织。

[0545] 在上述方法的某些实例中,纳米纤维可以通过在基本上水性的介质中自组装形成。在某些实施方式中,在均质化过程中可以使用低温(即约40℃),并且可以考虑使用宽范围的水混溶性溶剂来分离纳米纤维。

[0546] 在上述方法的某些实例中,该方法可以包括将包含纳米纤维的溶液脱水、冻干、冷冻干燥、喷雾干燥或纳米喷雾干燥的步骤。

[0547] 在某些实施方式中,在溶液中制备均质化的植物组织的步骤可以包括在水性或有机介质或混合的水性/有机介质中均质化植物组织。在某些实施方式中,在溶液中制备均质化的植物组织的步骤可以包括使植物组织在包含水、乙醇、甲醇或丙酮中的任何一种或多种的水性或有机介质中进行高剪切均质化和/或超声分解。

[0548] 在更进一步的实例中,在溶液中制备均质化的植物组织的步骤可以包括在均质化植物组织之前漂白植物组织以从其中去除多酚的步骤。在另一实施方式中,植物组织的漂白可以包括用提取溶液从植物组织提取多酚。在某些实施方式中,提取溶液可以包含乙醇。

[0549] 在另一实例中,在溶液中提供均质化的漂白的植物组织的步骤可以包括使植物组

织在水性介质或有机介质中进行高剪切均质化。在另一实例中,在溶液中提供均质化的漂白的植物组织的步骤可以包括在水性或有机介质中均质化漂白的植物组织。

[0550] 在某些实施方式中,去除碎片的步骤可以包括透析、过滤均质化的植物组织、离心均质化的植物组织、或对均质化的植物组织进行切向流过滤或连续流过滤、或它们的任何组合。

[0551] 食物粉末和添加剂及其生产方法

[0552] 食物粉末和添加剂

[0553] 在另一实施方式中,本文提供了一种食物粉末或食物添加剂,其包括本文所描述的纳米颗粒和/或纳米纤维、或其部分或组分、或与其相关的结构。在某些实施方式中,食物粉末可以包含例如形成微米级细粉形式的纳米颗粒和/或纳米纤维的基本结构组分。

[0554] 在另一实施方式中,本文提供了一种包含来源于均质化的植物组织的自组装细胞组分的食物粉末,该细胞组分包含一种或多种结构性碳水化合物或其裂解产物,并且还包含至少一种营养剂。

[0555] 在某些实施方式中,食物粉末可以包含围绕其自身缠绕以形成纳米球状结构的纤维结构。

[0556] 在某些实施方式中,本文所描述的食物粉末可以包括在制备条件下尺寸范围为约 1-10 μm 的基本上球形或椭圆形状的结构。在某些实施方式中,当溶解于水中时,这种大结构可能会消散为约 50-100 nm 范围内的较小球形结构。在某些实施方式中,食物粉末结构可以包含与在纳米颗粒和纳米纤维中观察到的那些同源的随机缠绕和组装的一种或多种纤维。在某些实施方式中,食物粉末的整个结构可以类似于或同源于纳米球的结构,其中没有纤维的精确组织,并且所描述纤维可能能够吸附存在于例如组织提取物的匀浆物中的几种成分。

[0557] 在某些实施方式中,一种或多种食物粉末的营养剂可与食物粉末的上述纤维纳米球结构复合,并且可有助于食物粉末形成和/或其所得结构。

[0558] 在某些实施方式中,食物粉末还可以包含疏水性组分。在某些实施方式中,疏水性组分可以包括杏仁乳、椰子汁和/或来源于可食用坚果的乳或可以在杏仁乳、椰子汁和/或来源于可食用坚果的乳中提供。

[0559] 在某些实施方式中,营养剂可以包含具有健康益处的天然存在的活性成分。在某些实施方式中,营养剂可以包括一种或多种组分如类胡萝卜素、番荔枝素、乳香、南非醉茄、姜科成员、低聚果糖、低聚半乳糖、菊粉、菊芋、胡椒科成员、胡椒或含有胡椒碱和/或其衍生物的野生近缘种、或具有健康益处的其任何活性成分、或从其分离的任何提取物、衍生物或产物、或它们的任何组合。

[0560] 在一个优选的实施方式中,食物粉末可以包括:

[0561] 酸樱桃或其水提取物;

[0562] 杏仁乳或杏仁的另一匀浆物;

[0563] 豆浆、或大豆的另一匀浆物;

[0564] 西兰花或其水提取物;和

[0565] 姜黄或其粉末。

[0566] 在某些进一步优选的实施方式中,食物粉末可以包括:

[0567] 约25-30 v/v%的酸樱桃提取物(多酚当量至少约0.1 mg/ml);

[0568] 约25-30 v/v%的杏仁乳或杏仁的另一匀浆物;

[0569] 约10-18 v/v%的豆浆或大豆的另一匀浆物;

[0570] 约25-30 v/v%的西兰花提取物;和

[0571] 约0.5-2.5 w/v%的姜黄或其粉末。

[0572] 上述食物粉末实例旨在提供一种没有西兰花或大豆气味的美观产品。应当理解,本文还涵盖各种其他组分、组分的组合和组分的相对百分比。

[0573] 在某些进一步的实施方式中,酸樱桃提取物可以是约1-2 mg/ml多酚当量。

[0574] 在某些实施方式中,酸樱桃提取物可以与一种或多种由干燥的全果商业生产的水果粉末、果渣、或通过喷雾干燥由果汁生产的粉末、或另一商业上可获得的感兴趣的水果粉末组合或被其替代。在某些实施方式中,干燥并粉碎至微米大小的水果(而不是例如新鲜水果)可用于再水化和均质化。

[0575] 如本文所描述,本发明的食物粉末通常可用任何合适的植物组织制备,该植物组织可用于制备本文详细描述纳米颗粒和/或纳米纤维。在某些实施方式中,食物粉末可以由水果、蔬菜或能够形成如本文所描述的基于碳水化合物的纳米颗粒或纳米纤维的另一植物组织或产品制备,但是如将理解的,食物粉末可以具有不同的组织,例如更多纳米球状的结构。食物粉末可以在包括水性、有机或它们的组合的任何合适的介质中制备。在某些实施方式中,这些食物粉末还可以包括希望包括在该食物粉末产品(其通常将针对食品粉末的预期应用进行定制)中的营养剂或含有营养物的材料(或营养物),并且可以包括新鲜的、加工的或浓缩的粉末,单独地或以按重量或体积的任何所需组合。

[0576] 在某些实施方式中,本文所描述的食物粉末可以由适合于制备如本文已经详细描述纳米颗粒和/或纳米纤维的植物组织与营养剂或含营养物的材料组合来制备。如将理解的,营养剂或含营养物的材料通常将针对食物粉末的预期应用进行定制,并且可以包括新鲜的、加工的或浓缩的粉末,单独地或以任何期望的重量或体积组合。在某些实施方式中,食物粉末可以与营养剂或含营养物的组分或与靶向针对特定生理状况(例如慢性疾病)的组分一起开发,并且这类营养剂或含营养物的材料可以具有例如预防和/或治疗性质。如将理解的,如本文使用的术语营养剂或营养物可以包括适合于特定适应症的任何合适的活性剂或化合物(或包含活性剂或化合物的材料),并且不限于通常被认为是营养物的那些实体,例如在食物中发现的那些。例如,在某些实施方式中,营养物可以包括具有健康益处的任何合适的天然(或非天然)成分。在某些实施方式中,植物组织可以包括果皮和/或水果的外部组织,例如在可可中。

[0577] 在某些实施方式中,食物粉末可以包括:

[0578] 1. 酸樱桃(或酸樱桃提取物),或另一水果或蔬菜(或其提取物),其能够形成如本文所描述的基于碳水化合物的纳米颗粒或纳米纤维;

[0579] 2. 疏水性组分(例如但不限于杏仁乳),其可以结合来自添加的物质的疏水性分子(其他实例是例如椰子汁或来源于可食用坚果的乳);和

[0580] 3. 含有一种或多种生物活性成分的含营养物的材料(例如功能性食物提取物),其含有例如为食物粉末的所需应用而定制的一种或多种生物活性成分。

[0581] 含营养物的材料的一些非限制性实例可以包括以下活性化合物和/或植物家族中

的一种或多种:

[0582] 类胡萝卜素(即, β -胡萝卜素、番茄红素、黄体素和其他叶黄素,虾青素等);

[0583] 番荔枝素(具有抗癌特性的来源于番荔枝水果的聚酮化合物);

[0584] 乳香(其可与姜黄素一起提供额外的抗炎功能);

[0585] 南非醉茄(一种含有醉茄内酯的草药组分,具有抗应激和预防癌症的作用),主要具有类固醇结构;

[0586] 姜科成员,可以包括食用姜、芒果姜或其他含有任何几种生物活性成分(包括姜辣素和姜烯酚)的姜科成员;姜黄(即姜黄,含有姜黄素);

[0587] 来自菊芋的低聚果糖和低聚半乳糖以及菊粉,以增加益生元含量;

[0588] 胡椒科(Piperaceae)成员,例如胡椒(Piper nigrum)及其含有胡椒碱和几种衍生物的野生近缘种;和/或

[0589] 以上未列出的任何其他合适的成分(例如但不限于来源于植物的那些);

[0590] 和/或任何提取物、衍生物、由其分离的产物、或含有这类组分的材料或植物组织。

[0591] 用于生产食物粉末和添加剂的方法

[0592] 在另一实施方式中,本文提供了一种用于从均质化的植物组织制备食物粉末的方法,该方法包括:

[0593] 在溶液中制备均质化的植物组织,该溶液包含从植物组织释放的细胞组分,该细胞组分包含一种或多种结构碳水化合物或它们的裂解产物,并且溶液中均质化的植物组织还包含至少一种营养剂;

[0594] 任选地,从溶液中均质化的植物组织中去除碎片(如果存在的话);和

[0595] 冷冻干燥、冻干、喷雾干燥或纳米喷雾干燥溶液中均质化的植物组织以形成食物粉末。

[0596] 上文已经详细描述了合适的植物组织和营养剂的实例。

[0597] 在上述方法的又一实施方式中,制备均质化的植物组织的步骤可以包括在水性介质、有机介质或混合的水性-有机介质中均质化植物组织。在某些实施方式中,可以通过在溶液中均质化食物粉末起始材料来制备食物粉末。例如,可以使用优选地在高rpm下操作并且能够产生高剪切力的共混机、或能够高效混合的任何其他合适的机器(如声谱显示仪)来实现均质化。

[0598] 在某些实施方式中,溶液中的均质化的植物组织可以被过滤以去除碎片,或者碎片可以另外从均质化的混合物中去除。例如,可以使用能够过滤碎片(即,未进入匀浆物中并且在重力下沉降的颗粒物质)的离心装置或过滤装置(例如,膜过滤装置或切向流过滤装置)来去除碎片。

[0599] 在某些实施方式中,食物粉末随后可以被脱水、冻干、喷雾干燥、纳米喷雾干燥、或以其他方式脱水或干燥。例如,可以使用能够去除水(或使用的另一溶剂)的设备,其可以包括纳米喷雾干燥器、或用于水性样品的冷冻干燥器,或更优选地可以使用能够喷雾干燥大体积的高效喷雾干燥器。在某些实施方式中,干燥器可在减压下操作。

[0600] 在另一实施方式中,植物组织可以包括水果、蔬菜或植物组织。在另一实施方式中,植物组织可以包含衰老水果、成熟蔬菜或它们的任何组合;优选地,其中植物组织包括樱桃、蓝莓、葡萄、桃子、油桃、李子、杏子、番木瓜、番茄或它们的任何组合。在某些实施方式

中,植物组织可以包括获自或包含酸樱桃、杏仁或杏仁乳、大豆或豆浆、西兰花、姜黄或它们的任何组合的植物组织。在某些实施方式中,均质化的植物组织可以包括酸樱桃提取物、杏仁乳、豆浆、西兰花提取物和姜黄粉。上文已经详细描述了合适的植物组织。

[0601] 在某些实施方式中,溶液中均质化的植物组织还可以包含如上文已经描述的疏水性组分。

[0602] 在又一实施方式中,植物组织可以包括一种或多种含营养物的材料,其可以是新鲜的、预处理的或浓缩的材料、或它们的任何组合。

[0603] 在上述方法的某些实施方式中,制备均质化的植物组织的步骤可以包括用优选在高rpm下操作并产生高剪切力的搅拌器、声谱显示仪或另一高性能混合装置来均质化植物组织。

[0604] 在以上方法的某些实施方式中,去除碎片的步骤可以包括用离心装置、用过滤装置、通过膜过滤、通过切向流过滤或它们的任何组合来去除碎片。

[0605] 在某些实施方式中,植物组织可以包括获自或包含酸樱桃、杏仁或杏仁乳、大豆或豆浆、西兰花、姜黄或它们的任何组合的植物组织。

[0606] 在一个优选的实施方式中,用于该方法的起始材料可以包括:

[0607] 酸樱桃或其水提取物;

[0608] 杏仁乳或杏仁的另一匀浆物;

[0609] 豆浆或大豆的另一匀浆物;

[0610] 西兰花或其水提取物;和

[0611] 姜黄或其粉末。

[0612] 在某些进一步优选的实施方式中,用于该方法的起始材料可以包括:

[0613] 约25-30 v/v%的酸樱桃提取物(多酚当量至少约0.1 mg/ml);

[0614] 约25-30 v/v%的杏仁乳或杏仁的另一匀浆物;

[0615] 约10-18 v/v%的豆浆或大豆的另一匀浆物;

[0616] 约25-30 v/v%的西兰花提取物;和

[0617] 约0.5-2.5 w/v%的姜黄或其粉末。

[0618] 在某些实施方式中,酸樱桃提取物可以是例如约1-2 mg/ml多酚当量。

[0619] 上述食物粉末实例旨在提供一种没有西兰花或大豆气味的美观产品。应当理解,本文还涵盖各种其他组分、组分的组合和组分的相对百分比。

[0620] 在某些实施方式中,如本文所描述的制备食物粉末的方法及其步骤可以基本上类似于本文所描述的用于产生纳米颗粒和/或纳米纤维的那些,区别在于至少一种营养剂的存在有利于产生食物粉末纳米球结构,而不是纳米颗粒和/或纳米纤维结构。

[0621] 纳米颗粒、纳米纤维和食物粉末的用途

[0622] 下文列出了本文所描述的纳米颗粒、纳米纤维和食物粉末的预期用途的实例。这些实例并非旨在进行限制,而是提供旨在供本领域技术人员使用的说明性实例。在以下实施例部分中阐述的实验研究提供了关于示例性方法和用途的进一步细节。

[0623] 在某些实施方式中,本文提及的受试者或细胞可以包括动物受试者或动物细胞。在某些实施方式中,动物可以是哺乳动物。在某些实施方式中,动物可以是人。

[0624] 纳米颗粒:

[0625] 在一个实施方式中,本文提供了一种将生物活性剂递送至有需要的受试者的方法,该方法包括:

[0626] 向受试者施用如本文所描述的与生物活性剂复合或缀合的纳米颗粒。

[0627] 例如,在某些实施方式中,生物活性剂可以是硒、锌、镁和/或铁。在某些实施方式中,生物活性剂可以包括抗癌药物,并且受试者可以是患有癌症的受试者。在某些实施方式中,抗癌药物可以是紫杉醇或长春新碱或用于治疗癌症的另一天然或合成化合物。在某些实施方式中,生物活性剂可以在纳米颗粒形成过程中引入纳米颗粒中,或者生物活性剂可以在任选地包含醇或其他有机化合物的水基介质中与已形成的纳米颗粒复合。在某些实施方式中,水基介质可以包括DMSO、或缓冲液、或两者。

[0628] 在另一实施方式中,本文提供了一种用于在有需要的受试者中治疗与活性氧物质相关的疾病或病症的方法,该方法包括:

[0629] 向受试者施用如本文所描述的纳米颗粒。

[0630] 在某些实施方式中,纳米颗粒可作为一种抗氧化剂。

[0631] 在又一实施方式中,本文提供了一种用于在有需要的受试者中治疗或减轻炎症的方法,该方法包括:

[0632] 向受试者施用如本文所描述的纳米颗粒。

[0633] 在某些实施方式中,纳米颗粒可以包含抗炎剂、或与抗炎剂依次、同时或联合施用。在某些实施方式中,抗炎剂可以包含姜黄素。

[0634] 在又一实施方式中,本文提供了一种用于在有需要的受试者中治疗或减轻肥胖症的方法,该方法包括:

[0635] 向受试者施用如本文所描述的纳米颗粒。

[0636] 在某些实施方式中,纳米颗粒可以包含至少部分来源于传统上用于食品或医疗目的的坚果、豆科植物、草本植物、香料、蔬菜或真菌植物组织的组分。

[0637] 在又一实施方式中,本文提供了在有需要的受试者中治疗或预防癌症的方法,该方法包括:

[0638] 向受试者施用如本文所描述的纳米颗粒。

[0639] 在某些实施方式中,纳米颗粒可以与抗癌药物同时或依次或联合施用。在某些实施方式中,纳米颗粒可以与抗癌药物复合或缀合。在更进一步的实施方式中,抗癌药物可以是紫杉醇或长春新碱。

[0640] 在又一实施方式中,本文提供了一种为受试者提供可溶性膳食纤维的方法,该方法包括:

[0641] 向受试者施用如本文所描述的纳米颗粒。

[0642] 在又一实施方式中,本文提供了一种包含如本文所描述的纳米颗粒的增粘食品添加剂(viscosity enhancing food additive)。

[0643] 在又一实施方式中,本文提供了一种用于降低有需要的受试者的血液中的餐后血糖水平的方法,该方法包括:

[0644] 向受试者施用如本文所描述的纳米颗粒。

[0645] 在又一实施方式中,本文提供了一种包含如本文所描述的纳米颗粒的化妆品。

[0646] 在又一实施方式中,本文提供了一种用于向有需要的受试者局部施用的组合物,

该组合物包含如本文所描述的纳米颗粒和任选的生物活性剂。

[0647] 在又一实施方式中,本文提供了一种用于在有需要的受试者中预防太阳灼伤的方法,该方法包括:

[0648] 将本文所描述的纳米颗粒施加至受试者的皮肤。

[0649] 在某些实施方式中,纳米颗粒可以包括额外的花青素或另一UV保护剂,或与额外的花青素或另一UV保护剂施加。

[0650] 在另一实施方式中,本文提供了一种用于减少细胞增殖的方法,该方法包括:

[0651] 使细胞或组织或器官与本文所描述的纳米颗粒接触。

[0652] 在某些实施方式中,纳米颗粒可以与抗癌药物同时或依次使用。在又一实施方式中,纳米颗粒可以与抗癌药物复合或缀合。在又一实施方式中,抗癌药物可以是紫杉醇或长春新碱。

[0653] 在又一实施方式中,本文提供了一种用于降低有需要的受试者的肝脏中的甘油三酯堆积的方法,该方法包括:

[0654] 向受试者施用如本文所描述的纳米颗粒。

[0655] 在又一实施方式中,本文提供了一种用于在有需要的受试者中降低胆固醇水平的方法,该方法包括:

[0656] 施用如本文所描述的纳米颗粒。

[0657] 在又一实施方式中,本文提供了一种用于在有需要的受试者中改善脂质代谢的方法,该方法包括:

[0658] 施用如本文所描述的纳米颗粒。

[0659] 在另一实施方式中,本文提供了一种靶向纳米颗粒,其包含与特异性针对癌症标志物的靶向抗体缀合的本文所描述的纳米颗粒。在某些实施方式中,靶向抗体可以包含用于将纳米颗粒靶向癌细胞的PD-L1抗体。在某些实施方式中,靶向纳米颗粒可以与至少一种细胞毒性药物或抗癌药物复合或缀合。在某些实施方式中,靶向纳米颗粒可以与紫杉醇、阿霉素或两者和/或另一抗癌剂例如一种或多种途径导向抗体(即PI3K(磷脂酰肌醇-3-激酶))复合或缀合。

[0660] 在另一实施方式中,本文提供了一种抗菌纳米颗粒,其包含与抗菌剂复合或缀合的如本文所描述的纳米颗粒。在某些实施方式中,抗菌剂可以包含溶菌酶、四环素、或乳链菌肽、或它们的任何组合。在某些实施方式中,例如,抗菌纳米颗粒可用于治疗或预防MDR细菌感染、和/或用于诸如食品工业和/或医院中的表面灭菌。

[0661] 纳米纤维:

[0662] 在一个实施方式中,本文提供了一种将生物活性剂递送至有需要的受试者的方法,该方法包括:

[0663] 向受试者施用如本文所描述的与生物活性剂复合或缀合的纳米纤维。

[0664] 在某些实施方式中,生物活性剂可以包括锌或铁或硒或镁、或它们的任何组合。在某些实施方式中,生物活性剂可以包括抗癌药物,并且受试者可以是患有癌症的受试者。在某些实施方式中,抗癌药物可以是紫杉醇或长春新碱。

[0665] 在某些实施方式中,生物活性剂可以在纳米纤维形成过程引入纳米纤维,或者生物活性剂可以与已经形成的纳米纤维在任选地包含醇或其他有机化合物的水基介质中复

合。在某些实施方式中,水基介质可以包括DMSO、或缓冲液、或两者。

[0666] 在另一实施方式中,本文提供了一种用于在有需要的受试者中治疗或预防癌症的方法,该方法包括:

[0667] 向受试者施用本文所描述的纳米纤维。

[0668] 在某些实施方式中,纳米纤维可以与抗癌药物同时或依次或联合施用。在某些实施方式中,纳米纤维可以与抗癌药物复合或缀合。在某些实施方式中,抗癌药物可以是紫杉醇或长春新碱。

[0669] 在另一实施方式中,本文提供了一种为受试者提供可溶性膳食纤维的方法,该方法包括:

[0670] 向受试者施用本文所描述的纳米纤维。

[0671] 在某些实施方式中,本文提供了一种包含如本文所描述的纳米纤维的增粘食品添加剂。

[0672] 在另一实施方式中,本文提供了一种用于降低有需要的受试者的血液中的餐后血糖水平的方法,该方法包括:

[0673] 向受试者施用本文所描述的纳米纤维。

[0674] 在另一实施方式中,本文提供了一种包含如本文所描述的纳米纤维的化妆品。

[0675] 在另一实施方式中,本文提供了一种用于向有需要的受试者局部施用的组合物,该组合物包含如本文所描述的纳米纤维和任选的生物活性剂。

[0676] 在另一实施方式中,本文提供了一种用于在有需要的受试者中预防太阳灼伤的方法,该方法包括:

[0677] 将本文所描述的纳米纤维施加至受试者的皮肤。

[0678] 在某些实施方式中,纳米纤维可以包括花青素或另一UV保护剂,或与花青素或另一UV保护剂一起施加。

[0679] 在又一实施方式中,本文提供了一种用于减少细胞增殖的方法,该方法包括:

[0680] 将任选地与细胞毒性剂复合或缀合的纳米纤维引入细胞或组织或器官。

[0681] 在某些实施方式中,纳米纤维可以与特异性针对细胞或组织或器官的靶向抗体复合或缀合。

[0682] 在某些实施方式中,纳米纤维可以与抗癌药物同时或依次或联合施用或使用。在某些实施方式中,纳米纤维可以与抗癌药物复合或缀合。在某些实施方式中,抗癌药物可以是紫杉醇或长春新碱。

[0683] 在另一实施方式中,本文提供了一种用于降低有需要的受试者的肝脏中甘油三酯堆积的方法,该方法包括:

[0684] 向受试者施用本文所描述的纳米纤维。

[0685] 在另一实施方式中,本文提供了一种靶向纳米纤维,其包含与特异性针对癌症标志物的靶向抗体缀合的本文所描述的纳米纤维。在某些实施方式中,靶向抗体可以包含用于将靶向纳米纤维靶向至癌细胞的PD-L1抗体。在某些实施方式中,靶向纳米纤维可以与至少一种细胞毒性药物或抗癌药物复合或缀合。在某些实施方式中,靶向纳米纤维可以与紫杉醇、阿霉素或两者复合或缀合。

[0686] 在另一实施方式中,本文提供了一种抗菌纳米纤维,其包含与抗菌剂复合或缀合

的如本文所描述的纳米纤维。在某些实施方式中,抗菌剂可以包含溶菌酶、四环素、或乳链菌肽、或它们的任何组合。在某些实施方式中,抗菌纳米纤维可用于治疗或预防MDR细菌感染。

[0687] 食物粉末:

[0688] 在一个实施方式中,本文提供了一种将生物活性剂递送至有需要的受试者或生物体的方法,该方法包括:

[0689] 向受试者施用如本文所描述的食物粉末,其使用化学或物理方法与生物活性剂复合或缀合。

[0690] 在另一实施方式中,生物活性剂可以是诸如硒、锌、铁或镁的元素。在另一实施方式中,生物活性剂可以是抗癌药物,并且受试者可以是患有癌症的受试者。在某些实施方式中,抗癌药物可以是紫杉醇、长春新碱或用于治疗癌症的任何天然或合成化合物。

[0691] 在另一实施方式中,生物活性剂可以在食物粉末形成过程引入食物粉末中,或者生物活性剂可以与已经形成的食物粉末在任选地包含醇或其他有机化合物的水基介质中复合。在某些实施方式中,水基介质可以包括DMSO、或缓冲液、或两者。

[0692] 在又一实施方式中,本文提供了一种用于在有需要的受试者中治疗与导致炎症的活性氧物质水平升高相关的疾病或病症的方法,其包括:

[0693] 向受试者施用如本文所描述的食物粉末。

[0694] 在另一实施方式中,本文提供了一种用于在有需要的受试者中治疗或减轻炎症的方法,该方法包括:

[0695] 向受试者施用如本文所描述的食物粉末。

[0696] 在某些实施方式中,食物粉末可以包括抗炎剂或与抗炎剂联合施用。在某些实施方式中,抗炎剂可以包含姜黄素。

[0697] 在另一实施方式中,本文提供了一种用于在有需要的受试者中治疗或减轻肥胖症的方法,该方法包括:

[0698] 向受试者施用如本文所描述的食物粉末。

[0699] 在又一实施方式中,食物粉末可以包含至少部分来源于传统上用于食品或医疗目的的坚果、豆科植物、草本植物、香料、蔬菜或真菌植物组织的组分。

[0700] 在另一实施方式中,本文提供了一种用于在有需要的受试者中治疗或预防癌症的方法,该方法包括:

[0701] 向受试者施用如本文所描述的食物粉末。

[0702] 在另一实施方式中,食物粉末可以与抗癌药物同时或依次联合施用。在又一实施方式中,食物粉末可以与抗癌药物复合或缀合。在又一实施方式中,抗癌药物可以是紫杉醇或长春新碱。

[0703] 在另一实施方式中,本文提供了一种为受试者提供可溶性膳食纤维的方法,该方法包括:

[0704] 向受试者施用如本文所描述的食物粉末。

[0705] 在另一实施方式中,本文提供了一种包含如本文所描述的食物粉末的增粘食物添加剂。

[0706] 在另一实施方式中,本文提供了一种用于降低有需要的受试者的血液中的餐后血

糖水平的方法,该方法包括:

[0707] 向受试者施用如本文所描述的食物粉末。

[0708] 在另一实施方式中,本文提供了一种用于减少细胞增殖的方法,该方法包括:

[0709] 利用如本文所描述的食物粉末处理细胞或组织或器官。

[0710] 在另一实施方式中,食物粉末可以与抗癌药物同时或依次使用。在又一实施方式中,食物粉末可以与抗癌药物复合或缀合。在又一实施方式中,抗癌药物可以是紫杉醇或长春新碱。

[0711] 在另一实施方式中,本文提供了一种用于降低有需要的受试者的肝脏中甘油三酯堆积的方法,该方法包括:

[0712] 向受试者施用如本文所描述的食物粉末。

[0713] 在另一实施方式中,本文提供了一种抗菌食物粉末,其包含与抗菌剂复合或缀合的如本文所描述的食物粉末。在某些实施方式中,抗菌剂可以包含溶菌酶、四环素、或乳链菌肽、或它们的任何组合。在某些实施方式中,抗菌食物粉末可用于治疗或预防MDR细菌感染。

[0714] 在另一实施方式中,本文提供了一种抗菌食物粉末,其包含与抗菌剂复合或缀合的如本文所描述的食物粉末。在另一实施方式中,抗菌剂可以包含溶菌酶、四环素或乳链菌肽、或它们的任何组合。在某些实施方式中,抗菌食物粉末可用于治疗或预防MDR细菌感染。

[0715] 实施例1-纳米颗粒和纳米纤维的制备和表征

[0716] 酸樱桃(*Prunus cerasus* L.)水果中大分子在细胞破碎条件下自发组装成纳米颗粒和纳米纤维,及其比较

[0717] 本发明人假设纳米结构可以通过发生细胞破碎的特定水果加工方法产生,提供可能发生分子相互作用的环境,并且可能导致形成明确定义的纳米结构。本实施例描述了使用不同方法从生物来源(本实施例中为酸樱桃水果)衍生的纳米颗粒和纳米纤维的制备、分离、理化性质和结构特征,其可在例如食物功能、慢性病预防和/或改善药物和/或生物活性递送至细胞中具有有益作用。

[0718] 在本实施例中,研究了酸樱桃水果在水性介质(或含有醇和水两者的醇介质)中的均质化,以及细胞组分(例如,果胶、葡聚糖、与蛋白质连接的低聚糖和/或其降解产物)、多酚以及有机酸(例如,苹果酸)的自发组装以形成纳米颗粒(和纳米纤维,其中多酚已经从均质化的水果中提取)。在这些研究中形成的纳米颗粒是去污剂稳定的、在溶液中尺寸范围为约25-50 nm的均匀球形结构,并且当冻干成粉末后脱水时尺寸大得多。还制备了形态不同类型的纳米结构,在本文中称为纳米纤维,其区别于球形结构并且呈纳米纤维的形式,宽度为约5-10 nm,长度为数微米,该纳米纤维由乙醇漂白的不含多酚的樱桃作为均质化的植物组织产生。用果胶酶处理可完全破坏复合物,指示了组成结构的果胶性质。而且,用纤维素酶和胰蛋白酶处理去除了纳米颗粒的外部原纤维状结构,暴露了内核。纳米颗粒的SDS-PAGE显示不同质量的多肽,与果胶和多酚共迁移为成片条带,而纳米纤维主要显示多肽。纳米颗粒和纳米纤维都对针对阿拉伯半乳糖-蛋白质复合物产生的抗体表现出很强的亲和力,而对抗伸展蛋白的亲和力则低得多。纳米颗粒不与抗同型半乳糖醛酸聚糖和抗木葡聚糖反应,而纳米纤维表现出很强的反应。纳米颗粒富含己糖如葡萄糖、半乳糖/半乳糖醛酸

和甘露糖,而纳米纤维富含戊糖如阿拉伯糖。纳米颗粒和纳米纤维的FT-IR光谱与蛋白质和果胶的FT-IR光谱相似。在SDS-PAGE后作为明显的条带可见的38 kD多肽显示出与葡聚糖内-1,3- β -葡萄糖苷酶的序列相似性,而20 kD多肽显示出与索马甜样蛋白的相似性。与同样以不同方式来源于酸樱桃水果的纳米纤维相比,本实施例描述了来自酸樱桃水果的自组装纳米颗粒的结构特征。

[0719] 材料和方法:

[0720] 酸樱桃:本实施例中使用的酸樱桃水果来自安大略省瓦恩兰的葡萄基地研究工作站(Vineland Research Station),其中这些水果作为种质保存。所有品种均为高多酚品种,多酚含量范围为300-500 mg/100 g鲜重。本研究的主要品种为V 70151,其他品种如V 71261,Hymann Conserva和Hymann Rubisn也显示出高水平的纳米颗粒形成。在本实施例中使用的酸樱桃是欧洲酸樱桃(*Prunus cerasus* L.)。

[0721] 化学品获自美国圣路易斯市西格马化学公司;Fisher化学公司;In Vitrogen;分子探针公司(Molecular Probes);以及其他公司等。

[0722] 纳米颗粒的制备和分离以及纳米纤维的制备和分离:

[0723] 对于纳米颗粒,提取方法包括使用具有PTA 10探针的polytron均质器在介质(优选如本实施例中使用的水,但可以替代地使用例如纯的或稀释的甲醇或乙醇)中以1:1 w/w的比例(1 g组织对1 ml水或醇)在中间(4-5)设置下均质化酸樱桃水果,直至水果组织完全均质化。通过4层纱布过滤匀浆物以去除碎片。将所得匀浆物在Sorvall RC 6 Plus离心机中离心(18,000x g)20 min。倒出上清液。将5 ml上清液在4℃下水(1 L)透析(spectra-Por,6-8kD截留)12 h。透析袋内透析提取物与上清液(称为粗提取物)一样冷冻保存于-20℃。由于提取物可能含有在水溶液中可能降解纳米颗粒的酶,因此透析提取物保持在低温下。在使用含醇或基本上含醇的介质的实施方式中,这类酶将可能是变性的和/或具有降低的活性,尽管低温通常仍然是优选的。如本文所描述,一旦冻干或喷雾干燥(例如),纳米颗粒是稳定的。

[0724] 浸出到水中的多酚被大量稀释,因此,出于实验目的,将其通过sep-pakC 18柱,并且用甲醇洗脱,通过疏水相互作用色谱法浓缩。

[0725] 对于冻干法,将透析的匀浆物置于具有1升体积(~250 ml)的烧瓶中,并通过在液体N₂中冷却制成壳。将烧瓶连接到冻干机(在-60℃下操作,为此目的使用3-4 Toricelli真空)。在进行冻干之前,将醇溶液用水透析以去除醇。在纳米颗粒的情况下,通过这种方法不能实现水的完全去除,这可能是由于水结合到纳米颗粒上,但是这可以提供浓缩的溶液。可以使用这种方法将纳米纤维溶液透析成精细粉末。

[0726] 对于纳米纤维,将去核的酸樱桃水果在50%乙醇中浸泡48 h,更换3次溶剂,这导致多酚被去除,樱桃水果呈灰白色(本文称为漂白)。酸樱桃水果的去核产生与溶剂的接触表面,并且预期在某些实施方式中水果甚至可以被切成较小尺寸的片以进一步增强多酚的去除。将漂白后的水果/切片浸入水中,并在水中彻底洗涤3次以去除乙醇(总共3h)。使用如上述未漂白的樱桃提取物所用的polytron在水或甲醇(1:1 w/w)中均质化这些水果。离心(18000xg)15 min去除碎片后,将匀浆物用水透析。含有纳米纤维的透析提取物基本上不含多酚并且可以冻干成蓬松的白色粉末。

[0727] 对于纳米喷雾干燥,将纳米颗粒/纳米纤维溶液用水稀释至一定浓度,使其形成精

细喷雾(浓溶液往往会堵塞所用喷雾器的喷嘴)。使用Buchi微型喷雾干燥器(B290)(泵速为35-50%,提供10-15 ml流量,入口温度为180℃,出口温度为100℃,气流保持在40 L/h)进行纳米喷雾干燥。将所得粉末储存在-20℃的密封管中

[0728] 电子显微镜:将约500-1000 μg 的经处理的纳米级樱桃粉末纳米颗粒或纳米纤维粉末均匀撒在双面粘性碳导电胶带的一侧上。然后将胶带安装在12 mm直径铝支线(aluminum stub)上。在不同的放大倍数下观察样品表面,并且使用扫描电子显微镜(型号QUANTA 250,FEI,荷兰)记录图像。

[0729] 使用先前所描述透析提取物或溶解在水中的粉末(~ 100 -200 $\mu\text{g}/\text{ml}$)进行纳米颗粒的透射电子显微检查(Jacob和Paliyath,2008)。将碳涂覆的镍网格漂浮在50 μl 溶液滴上,并使纳米颗粒吸附到网格上30 s。将网格吸干并漂浮在1%乙酸铀滴上30 s。将网格吸干并在Leo 912 B透射电子显微镜下检查。

[0730] 蛋白质分析:为了评估加工期间的蛋白质降解,如制造商(Invitrogen)所建议,使用TRIzol®从每个步骤提取蛋白质。简而言之,将100 μg 蛋白质当量的样品(如通过Bradford试剂测定的)在TRIzol试剂(1 ml)中均质化或充分混合,并在室温下孵育5 min。将匀浆物在4℃下离心15 min。对于相分离,加入200 μl 氯仿并涡旋以充分混合并在4℃离心15 min。分离水相和有机相。通过冻干干燥水相。将干燥的残余物通过在上样缓冲液中加热(90℃)重新溶解,用于SDS-PAGE。为了从有机级分中沉淀蛋白,添加1.5 ml异丙醇,并且在室温下孵育10 min,随后在4℃下以12000 $\times g$ 离心10 min。离心后得到的沉淀用0.3 M盐酸胍的95%乙醇溶液洗涤3次,然后用2 ml 100%乙醇最终洗涤。通过在上样缓冲液中加热使沉淀重新溶解。在变性和还原条件下在10%聚丙烯酰胺凝胶上分离蛋白样品。将凝胶在10%乙酸中固定并用考马斯亮蓝染色。

[0731] 多酚与多肽在纳米颗粒中的缔合作用:酸樱桃在水中均质化期间形成纳米颗粒是一个自发的过程。所得均浆为强酸性,pH通常为约3.0。为了测试在接近中性的pH下均质化是否对纳米颗粒形成以及对蛋白质和多酚的缔合有影响,还将酸樱桃在pH 6.0的300 mM柠檬酸钠缓冲液中均质化。在TRIzol™蛋白质提取方法中,游离蛋白质转移到有机相中,而与亲水性分子如碳水化合物紧密结合的蛋白质可分配到水相中。为了评估多酚与蛋白质在纳米颗粒中的缔合,使用SDS-PAGE分析来自 TRIzol™提取后获得的水相和有机相的蛋白质。通过冻干浓缩稀释的水相,而使用如前所描述的异丙醇沉淀来自有机相的蛋白质。将沉淀的中间相直接溶解在蛋白质样品上样缓冲液中。在变性和还原条件下在10%聚丙烯酰胺凝胶上分离蛋白质。电泳后,将凝胶在10%乙酸中孵育5 min,并拍摄照片突出显示有色多酚的分布。然后用考马斯亮蓝染色检测蛋白质。

[0732] 在这些测试中,在3-6的低pH值下有利于纳米颗粒的形成。多酚与肽的缔合可以通过在未染色的凝胶(图12 A)和用考马斯亮蓝染色的相同凝胶(图12 B)中观察到的肽和花青素的共迁移来理解。

[0733] 果胶酸在纳米颗粒中的缔合:将苹果果胶和聚半乳糖醛酸溶解在0.1 N NaOH中并用作标准品。纳米颗粒和游离多酚以及这些果胶样品在变性/还原条件下在10%聚丙烯酰胺凝胶上分离。电泳后,凝胶用10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 碘化丙锭水溶液染色1 h并拍照。相同的凝胶再次用考马斯亮蓝染色。

[0734] 纳米颗粒中结构成分的蛋白质印迹和斑点印迹分析:为了鉴定纳米颗粒的主要碳

水化合物结构组分的性质,使用针对同型半乳糖醛酸聚糖(LM20)、扩展蛋白(LM1)和阿拉伯半乳聚糖-蛋白质(LM14)产生的三种单克隆抗体(www.Plantprobes.net)进行斑点印迹和蛋白质印迹。将来自未漂白和漂白的酸樱桃的纳米颗粒和纳米纤维的冻干粉末分别在上样缓冲液中于沸水中加热5 min,并使用10% SDS-PAGE在还原条件下分离。从凝胶中分离的多肽被电转移到硝酸纤维素膜上过夜。对于斑点印迹分析,将2 μ l煮沸的样品直接施加到硝酸纤维素膜上。将这些硝酸纤维素膜用PBS(磷酸盐缓冲盐水)缓冲液中的5%脱脂奶粉溶液在室温下封闭1 h。用PBS-T(含0.1% Tween-20的PBS)洗涤三次并用PBS最终洗涤后,将膜于室温下在PBS中的一抗溶液(20x稀释)中孵育2 h。孵育后,将膜用PBS-T洗涤3次,最后用PBS洗涤,然后在抗-大鼠-AP缀合的第二抗体中于室温孵育1 h。在第二抗体中孵育后,用PBS-T洗涤膜3次,最后用PBS洗涤。如制造商所推荐,使用Bio-Rad碱性磷酸酶缀合物底物试剂盒实现显色。

[0735] 在配有离子阱的Varian Saturn 2000系统上进行分析。将GC以1 ml/min的恒定流速编程在Sil-CB8(0.25 mm $\times$ 30 m)柱上。在分流模式下,进样器温度保持恒定在250 $^{\circ}$ C(20:1)。在进样过程中,烘箱温度在100 $^{\circ}$ C下保持恒定4 min,然后以8 $^{\circ}$ C/min的速度升温至250 $^{\circ}$ C,并在250 $^{\circ}$ C下再保持3 min。离子阱被编程为分析40-650 m/z之间的质量,初始延迟段为3 min。

[0736] 糖的衍生化:制备各种戊糖和己糖的三甲基甲硅烷基(TMS)衍生物以确定它们在给定GC-MS参数中各自的保留时间。将各种糖标准品(2 mg)溶解在100 μ l的无水吡啶中,并将100 μ l的BSTFA:TMCS(N, O-双(三甲基甲硅烷基)三氟乙酰胺:三甲基氯硅烷;99:1)添加到玻璃瓶中的溶液中。使用供应商(Sigma)描述的方法进行衍生化。将反应混合物在80 $^{\circ}$ C下孵育2 h。在GC-MS中进样1 μ l衍生糖用于分析。

[0737] 纳米颗粒的衍生化:通常如上所描述,通过在10 ml蒸馏水中均质化 10 g酸樱桃水果,新鲜制备纳米颗粒。将均浆以15000 g离心20 min。上清液澄清后通过10 ml PD-10脱盐柱,用6-8 kDa截留膜对蒸馏水进行透析。将100 μ l纯化的纳米颗粒与200 μ l浓缩的TFA混合至8.6 M的最终浓度,并在90 $^{\circ}$ C下孵育2 h。将水解的样品在氮气流下干燥。将干燥的样品重新悬浮在100 μ l的吡啶中并将100 μ l的BSTFA:TMCS(99:1)添加至该溶液中。通过在80 $^{\circ}$ C孵育1 h进行衍生化。进样1 μ l样品用于GC-MS分析。

[0738] 纳米纤维的衍生化:通过将4 mg冻干的纳米纤维溶解在1 ml水中制备纳米纤维溶液。将100 μ l的纳米纤维在8.6 MTFA中在90 $^{\circ}$ C水解2 h。水解的样品通过玻璃纤维过滤器过滤并在氮气流下干燥。将干燥的样品重新悬浮在100 μ l的吡啶中并将100 μ l的BSTFA:TMCS(99:1)添加至该溶液中。通过在80 $^{\circ}$ C孵育1 h进行衍生化。进样1 μ l样品用于GC-MS分析。

[0739] 纳米颗粒的FT-IR分析:使用Bruker Tensor 27红外光谱仪进行纳米颗粒和纳米纤维的FT-IR分析。将等量的粉末(1%)与KBr混合并制成透明圆盘,扫描该圆盘以获得光谱。

[0740] 纳米颗粒的X-射线衍射:使用Bruker Nanostar SAXS衍射仪进行纳米颗粒的小角度X-射线衍射。使用未漂白樱桃的透析提取物和透析液的纳米颗粒的冻干粉末进行衍射分析。

[0741] 统计分析:使用GraphPad Prism第4版进行统计分析。使用Student t检验比较具有两个平均值的结果。使用单因素方差分析,随后使用“Tukey检验”比较具有多个平均值的结果,以评价显著性水平。不同的上标表示显著不同的平均值($p < 0.05$)。

[0742] 结果和讨论:

[0743] 纳米颗粒的表征:在这些研究中,水果在水性介质中的均质化破坏了细胞大分子和简单分子的天然组织,导致它们随机但结构化的组装,从而产生具有不同物理化学和结构特征的结构。使用能够进行尺寸排阻分离的低分子量截留膜或PD-10柱,通过透析,使用多酚和与多酚复合的纳米结构之间的尺寸差异来分离这些结构。粗酸樱桃提取物、含有纳米颗粒的透析提取物和透析液(含有被膜排除的分子量为~6kD或更低的分子)的多酚含量如表1所示。提取物中大约80%的多酚保留在透析膜内,表明多酚以复合状态存在。与葡萄和蓝莓等其他水果相比,酸樱桃中复合物的形成要高得多(尽管葡萄和蓝莓中也形成了纳米颗粒)。多酚组分的HPLC-MS分离显示存在作为主要花青素的花青素-3芸香糖苷,而芍药色素-3-芸香糖苷含量较低。酚酸如绿原酸和对香豆酰奎尼酸的含量要小得多(参见表2)。表3给出了粗提物、透析提取物(纳米颗粒;NP)和来自水和甲醇提取物的透析液的抗氧化活性。所有提取物都显示出高水平的超氧化物、羟基和DPPH自由基清除活性。在两种提取条件下,粗提物均显示出最高的抗氧化能力。透析液的抗氧化活性最低。抗氧化能力的很大一部分与纳米颗粒(即透析提取物)有关。

[0744] 在甲醇中提取(最终~50% v/v)也导致纳米颗粒的形成。

[0745] 透析提取物可被冻干成含有蛋白质(10-12%)、多酚(12-14%)、果胶(10%-15%)和其他碳水化合物(例如,半纤维素组分如木葡聚糖,果胶组分如阿拉伯半乳聚糖)的蓬松粉末。一旦形成,纳米颗粒中的多酚就无法用乙醇提取(比例为50-100%)。复合物一般是酸稳定的($\text{pH} < 3$)。加入10%三氯乙酸导致复合物沉淀为红色残余物,然而,碱性条件($\text{pH} > 7$)导致多酚的环裂解,从而可能使大分子组织不稳定。相比而言,乙醇漂白的樱桃的纳米纤维不含有可检测量的多酚,但含有蛋白质(~15%)、果胶(15-20%)和其他碳水化合物(半纤维素如木葡聚糖,果胶组分如阿糖基木聚糖和复合果胶(60-70%)。由于复合物形成是随机事件,难以实现各组分类型之间严格的比例关系,从而提供了各组分的一般比例关系。

[0746] 表1:酸樱桃提取物中总多酚含量

[0747] 总多酚含量(mg没食子酸/g鲜重当量)

[0748] 样品水提取物甲醇提取物

[0749] 粗提物 $0.88 \pm 0.1\text{b}, \text{c}$ - $0.94 \pm 0.1\text{b}, \text{c}$ $1.04 \pm 0.1\text{b}, \text{c}$ - $1.13 \pm 0.1\text{b}, \text{c}$

[0750] 透析提取物

[0751] (纳米颗粒) $0.65 \pm 0.1\text{a}, \text{c}$ - $0.63 \pm 0.1\text{a}, \text{c}$ $0.70 \pm 0.1\text{a}, \text{c}$ - $0.80 \pm 0.1\text{a}, \text{c}$

[0752] 透析液 $0.03 \pm 0.1\text{a}, \text{b}$ - $0.06 \pm 0.1\text{a}, \text{b}$ $0.03 \pm 0.1\text{a}, \text{b}$ - $0.05 \pm 0.1\text{a}, \text{b}$

[0753] 上标“a”表示在 $p < 0.05$ 时来自CE(水和甲醇)的统计显著性;“b”表示在 $p < 0.05$ 时来自DE(水和甲醇)的统计显著性;以及“c”表示在 $p < 0.05$ 时分别来自DZ(水和甲醇)的统计显著性。每组的值是来自三个独立估计的平均值 $\pm$ 标准误差。

[0754] 表2:酸樱桃透析提取物的多酚组成(mg没食子酸当量/g鲜重)

[0755] 多酚透析水提取物透析甲醇提取物

[0756] 花青素-3-槐糖苷 0.07 ± 0.10 0.07 ± 0.0

[0757] 花青素-3-芸香糖苷 $0.71 \pm 0.1\text{b}$ $0.55 \pm 0.1\text{a}$

[0758] 芍药色素-3-芸香糖苷 0.17 ± 0.10 0.16 ± 0.0

[0759] 天竺葵色素-3-芸香糖苷 $0.06 \pm 0.1\text{b}$ $0.1 \pm 0.1\text{a}$

[0760] 对香豆酰奎尼酸 $0.02 \pm 0.00.01 \pm 0.0$

[0761] 绿原酸 $0.04 \pm 0.10.04 \pm 0.1$

[0762] 上标“a”和“b”分别表示每种酚类组分的透析水提取物和透析甲醇提取物中的组分间在 $p < 0.05$ 时的统计显著性。ND: 未检测到。通过HPLC-MS分析和峰面积比较进行定量。

[0763] 表3: 酸樱桃粗提物、透析提取物和透析液的抗氧化能力

[0764] 抗氧化剂活性 (%淬灭率/ μg 多酚)

[0765] 水提取物 甲醇提取物

[0766] 抗氧化剂测定粗提物 透析提取物

[0767] (纳米颗粒) 透析液粗提物 透析提取物 透析液

[0768] 超氧化物清除 $2.6 \pm 0.2b, c1.8 \pm 0.1a1.4 \pm 0.1a3.6 \pm 0.1b, c2.5 \pm 0.1a, c1.6 \pm 0.2a, b$

[0769] 羟基自由基清除 $4.9 \pm 0.2b, c2.1 \pm 0.2a, c1.5 \pm 0.1a, b6.5 \pm 0.3b, c3.9 \pm 0.3a, c1.8 \pm 0.1a, b$

[0770] DPPH自由基清除 $8.2 \pm 0.3b, c4.4 \pm 0.5a4.7 \pm 0.1a8.8 \pm 0.2b, c6.2 \pm 0.2a, c3.3 \pm 0.4a, b$

[0771] 酸樱桃提取物的DPPH、羟基和超氧化物自由基清除能力(RSC)。上标“a”表示在 $p < 0.05$ 时来自粗提物(CE)(水和甲醇)的统计显著性;“b”表示在 $p < 0.05$ 时来自透析提取物(DE)(水和甲醇)的统计显著性;以及“c”表示在 $p < 0.05$ 时分别来自透析液(DL)(水和甲醇)的统计显著性。

[0772] 纳米颗粒的形态: 透析提取物的透射电子显微镜(TEM)显示出直径在约25-50 nm范围内的纳米颗粒(图1A, 箭头)。尺寸变化很大, 表明复合物可能会通过结构组分的损失而发生转化。纳米颗粒具有缠绕在中心结构周围的线性丝状组分。在复合物的放大视图中, 可以看到这些结构在两个纳米颗粒之间伸展(图1B, 箭头)。纳米颗粒尺寸的变化可能是由于多根纤维多次缠绕在中心核上而引起的。纤维似乎在几种纳米颗粒中展开(图1B, 箭头), 表明这些纳米颗粒可以通过非共价键结合在一起, 并且外部环境的变化可以将纳米颗粒解离成它们的构建单元。纳米颗粒的结构组分的TEM如图2所示。图2A显示了作为球形结构的纳米颗粒的核结构, 其从缠绕长丝中剥离(箭头)。在从中心球形结构发出的背景中可以观察到纤维状结构。在图2B和C中可以看到显示出螺旋原纤维状结构的长丝的亚结构(箭头1、2)。图2D显示了由原纤维构成的延伸纤维结构(箭头)。因此, 纳米颗粒似乎具有多个组织水平以形成具有不同特征的亚结构、中心核、围绕核的纤维、组装为螺旋的纤维结构(其可以延伸成可以通过非共价键结合在一起的原纤维)。

[0773] 纳米颗粒的结构组分: 在本实施例中, 将成熟的酸樱桃用作植物组织以制备纳米颗粒和纳米纤维。存在于成熟水果中的大分子主要是碳水化合物, 例如纤维素、半纤维素、果胶和与细胞壁相关的糖蛋白(Negi和Handa, 2008)。成熟水果中可溶性蛋白极少。在樱桃等水果中, 有机酸是主要的贮藏分子, 在成熟过程中转化为糖类。淀粉是主要的贮藏成分, 它以高分子量结构存在, 在成熟水果中不存在。多酚的生物合成在成熟过程中增加, 多酚在液泡中的积累使水果呈红色。

[0774] 因此, 来自酸樱桃的纳米颗粒可以由细胞壁碳水化合物(结构碳水化合物)和蛋白质作为主要结构组分构成。如果是这样, 则假设可以使用果胶分解酶和纤维素分解酶以及

蛋白酶对纳米颗粒进行酶消化,并通过结构检查评估稳定性以了解有关结构组织的更多信息。果胶酶(多聚半乳糖醛酸酶、 α 1-4-糖苷酶)处理对纳米颗粒稳定性的影响如图3A所示,且放大区域如图3B所示。在果胶酶(1单元/ml)消化后,将纳米颗粒完全分解为小管状/泡状结构,其散布在电子致密的基质内,该电子致密的基质可能通过将铀离子结合到果胶中的半乳糖醛酸的带负电荷的分子而形成(Negi和Handa,2008)。值得注意的是,这些消化的结构类似于在市售康科德(Concord)葡萄汁中观察到的纳米囊泡(Jacob和Paliyath,2008)。水果匀浆物通常用果胶酶处理以在工业加工过程中获得更高的出汁率。该观察结果表明纳米颗粒含有高水平的来源于果胶的碳水化合物低聚物。用纤维素酶(β -1,4-葡聚糖酶,1单位/ml)处理纳米颗粒,并研究所得的结构修饰。与果胶酶消化相比,用纤维素酶处理导致形成大得多的囊泡和囊泡聚集体(图3C和3D,箭头)。因为纤维素酶不能消化果胶,所以消化后留下的结构可能由果胶构成,可能是纳米颗粒的核。因此,纤维素部分可以形成包围纳米颗粒的果胶核的丝状结构的部分。纳米颗粒也在胰蛋白酶(1单位/ml)存在下孵育,胰蛋白酶再次消化纳米颗粒的外部丝状结构,留下由果胶制成的核(图4A)。这些结构也类似于纤维素酶处理后观察到的空壳结构,表明纳米颗粒的外部丝状结构含有纤维素部分和多肽(即蛋白质材料)。用胰蛋白酶处理剥离外层纤维结构后壳结构的放大图如图4B所示。在胰蛋白酶消化过程中形成的中间结构如图4C、图4D和图4E所示。图4C显示了被纤维状结构的同心环(即,果胶核周围的纤维组织)包围的纳米颗粒,这些纤维状结构的同心环由于胰蛋白酶处理而被释放。图4D显示了纳米颗粒的壳以及从复合物剥离的纤维。图4E显示了由长的原纤维结构构成的纤维材料的亚结构,这些长的原纤维状结构相互交织并编织成类似绳的结构,显示了纤维形成大型编织实体的潜力。这些纤维状结构是长的,在长度上达到微米级,但是具有约2-3 nm的直径。纳米颗粒对化学处理的回弹性可能来自通过不同类型的大分子的相互作用来稳定结构的这种结构复杂性。

[0775] [551]干燥纳米颗粒粉末的扫描电子显微镜(SEM):将纳米颗粒冻干,并且在去除水后,获得无定形粉末。通过SEM对这种粉末的检查揭示了可能指示导致纳米颗粒形成的过渡阶段的结构方面。纳米颗粒的尺寸分布如图5所示。在干燥形式下,这些复合物的直径范围从<200 nm到直径超过微米。这几乎比在悬浮液中的水合纳米颗粒中观察到的高十倍(图1A),其中尺寸变化为约25-50 nm)。这表明在缓慢脱水期间,与纳米颗粒结合的水被去除,导致复合物膨胀。通过悬浮在水中使粉末再水化,导致它们逆转成小的纳米颗粒(数据未显示)。除了球形结构外,在冻干粉末中也观察到管状结构(图5,箭头)。还可以在图6中看到冻干粉末的结构变化,图6示出了片状(箭头1)、长丝(箭头2)、管状(箭头3)和囊泡形式的过渡结构的异质性,所有这些都可以以混合状态看到。囊泡从管状结构出芽的区域如箭头4所示。因此,就它们的来源而言,这些薄片似乎倾向于形成管状结构,其可从囊泡结构萌出,在纳米颗粒形成过程中被果胶/纤维素低聚物-多肽和其他小分子例如多酚和苹果酸包裹。

[0776] [552]来自漂白樱桃的纳米纤维:由于多酚与纳米颗粒紧密结合并且难以通过溶剂提取(醇、DMSO、酸等)去除,因此尝试在产生纳米颗粒之前通过乙醇从水果中去除多酚。将水果在50%乙醇中浸泡48 h,更换3次溶剂,并且这导致多酚被去除,樱桃水果呈灰白色。通常随后进行用于制备纳米颗粒的相同方法。多酚的去除导致与对于纳米颗粒所观察到的相比的总体结构变化。对冻干粉末的检查显示了延伸的股线或丝状结构(纳米纤维)散布着直径为纳米(2-3 nm)的膜,这些膜在长度上延伸至微米级(图7A)。在水性状态下,纳米纤维

保持其形态,长度为数微米,直径为约5-10 nm(图7B,箭头1)。这些长丝还显示出具有螺旋结构的区域(图7B,箭头2),表明这些区域可能源自包裹纳米颗粒的螺旋纤维状结构,其在使用胰蛋白酶处理后表现为拉伸的纤维(图4E)。因此,似乎多酚在确定纳米颗粒的结构组织中具有主要作用,并且这些相互作用也可以涉及与多肽的缔合。

[0777] 已知多酚与蛋白质相互作用(Dangles和Dufour,2006)。在功能上,已知苹果果胶与多酚相互作用并增强结肠发酵和从体内去除脂质的有益效果(Aprikan等人,2003)。在结构上,已知多酚通过离子键和氢键与果胶和纤维素两者相互作用(Padayachee等人,2012)。多酚与纤维素和果胶组分在双相过程中相互作用,结合高达18%。纤维素果胶复合物显示出最高的结合。因此,多肽、果胶/纤维素低聚物的组合可因此为多酚结合提供高度有利的环境,其甚至在去除多酚之后仍保留多肽-果胶-纤维素骨架,组装成纳米纤维。

[0778] 纳米颗粒对去污剂的稳定性:通过用去污剂如TriionX-100和脱氧胆酸钠处理透析提取物进一步检验纳米颗粒的稳定性,去污剂可以破坏大分子结构。当将含有纳米颗粒的透析提取物与浓度增加的这些去污剂一起孵育时,在520 nm处测量时与纳米颗粒缔合的多酚水平几乎保持不变,这是花青素苯并吡喃部分的最大吸收特征(图8)。用脱氧胆酸钠也获得了类似的结果。在260 nm处测量显示增加时,可能表明胶束形成高于曲拉通X-100在其中捕获多酚的临界胶束浓度。这些结果还表明在纳米颗粒的结构组分中不存在脂质。

[0779] 纳米颗粒的化学组成及与纳米纤维的比较:

[0780] 纳米颗粒的酸性:纳米颗粒在水溶液和干粉中都是高度稳定的。在纳米颗粒的尺寸排阻色谱期间,与纳米颗粒结合的多酚在空隙体积中洗脱,在520 nm处显示出多酚特征的最大吸收,并且pH为3。溶液中存在的游离多酚洗脱被延迟,洗脱液呈蓝灰色,pH接近7,发生花青素苯并吡喃环断裂,伴有红色丧失。在充分透析已去除果汁分子中游离有机酸的酸樱桃提取物后,透析提取物仍显示接近3的pH,这表明除了同型半乳糖醛酸聚糖(pH 3)的低聚半乳糖醛酸部分之外,可能存在与纳米颗粒结合的酸性组分(有机酸)作为结构组分。为了鉴定这些组分,干燥纳米颗粒和纳米纤维并制备三甲基甲硅烷基衍生物,并对衍生物进行GC-MS分析。结果如图9所示。上版面(A)处显示了标准有机酸的洗脱模式。(b)和(C)分别显示了化合物从纳米颗粒和纳米纤维的洗脱曲线。纳米颗粒和纳米纤维都显示了在13.7 min洗脱的清楚存在的苹果酸(质谱,三甲基甲硅烷基衍生物)。苹果酸是酸樱桃水果中存在的主要有机酸。作为羟基酸,苹果酸可以形成氢键以稳定纳米颗粒和纳米纤维的组分之间的分子缔合。在20-25 min之间洗脱的峰来自衍生的糖或寡糖。图9的下组显示了参考苹果酸三甲基甲硅烷基衍生物的质谱。

[0781] 酸樱桃多肽的SDS-PAGE分析:水果中蛋白质的量通常相对较低,并且在成熟期间通过蛋白酶的激活发生蛋白质降解。纳米颗粒中蛋白质的存在通过它们对胰蛋白酶的敏感性得到证实。使用TRIzol™分离水果和匀浆物中的蛋白质,TRIzol™是一种通用试剂,非常适合提取水果中的核酸和蛋白质(Tiwari和Paliyath,2011)。在蛋白酶活性被抑制的这些条件下(如在苯酚、异硫氰酸胍存在下),蛋白质降解最小并且在添加水之后蛋白质存在于有机相中,这导致TRIzol提取物的相分离。将原始水果、匀浆物和离心匀浆物的沉淀中的蛋白质进行Trizol提取,并通过SDS-PAGE分析通常含有蛋白质的有机相(氯仿:苯酚)。结果如图11所示。可以看到凝胶中蛋白质条带的明显分离(参见图11,泳道2、3、4),其代表水果中的蛋白质(泳道2)、总水匀浆物中的蛋白质(泳道3)和匀浆物离心后获得的沉淀(泳道4)。然

而,在对离心后获得的水果匀浆物的上清液进行Trizol提取后,有机相几乎不含蛋白质并且主要含有低分子量肽(25 kD)(泳道5)。当在没有TRIzol提取的情况下直接分析时,透析提取物的冻干粉末没有显示如水果或其匀浆物中的蛋白质的离散条带,但是当在SDS-PAGE和考马斯蓝染色后可视化时显示多肽的成片条带(泳道6)。然而,在透析提取物粉末的TRIzol提取后,有机相显示没有用考马斯亮蓝染色,表明蛋白质/肽可能已经迁移至水相,因为与碳水化合物和多酚缔合的亲水性增强(泳道7)。

[0782] 纳米颗粒中多肽的SDS-PAGE分析:由于纳米颗粒由各种分子量的多肽组成(图11,泳道6),进行进一步的分析以描述它们与其他组分如碳水化合物和多酚组分结合的性质。如果这些结构组分在纳米颗粒中紧密缔合,则假定它们应该在SDS-PAGE期间共迁移。在水中或缓冲液(柠檬酸钾,300 mM,pH 6,均质化后最终pH为pH 5)中提取酸樱桃,并用水或缓冲液进行透析。冻干透析提取物,并将粉末重新悬浮于上样缓冲液中。将等量(15 μ g)的蛋白质(重悬于15%甘油水溶液中)上样到凝胶上并进行SDS-PAGE。电泳后,去除凝胶并在10%(v/v)乙酸水溶液中孵育。版面A(图12)显示了肽分离后和考马斯亮蓝染色前的凝胶,以显示泳道中由于多酚的存在而导致的粉红色拖尾颜色。版面B显示了用考马斯亮蓝染色以显示多肽的相同凝胶。泳道2显示了透析提取物粉末的染色模式。版面A和B中泳道2的比较揭示了肽迁移(泳道2,版面B)与多酚迁移(泳道2,版面A)的相似性,表明多酚与纳米颗粒中的多肽紧密结合。与肽相比,多酚是小且不带电荷的分子,如果它们没有复合,它们会从凝胶中洗脱下来。对含有纳米颗粒(获自水提取物)的透析提取物粉末进行trizol提取和相分离,对应于水性上清液级分的泳道3(版面A、B)显示存在多肽和多酚,表明它们紧密结合。这种性质还揭示了肽-碳水化合物-多酚复合物的亲水性,因为在没有复合物形成的情况下,多肽本身将在TRIzol提取物(苯酚:氯仿)的有机相中分配。然而,如前所描述(图11,泳道7),来自纳米颗粒的trizol提取物的有机相不具有任何多肽。肽和多酚的缔合在透析的缓冲液提取物粉末中也很明显(图12,泳道4)。泳道5、6和7对应TRIzol提取后得到的透析缓冲液提取物粉末的上清液、中间相和有机相。通常保留在氯仿:酚相中的多肽迁移到水相中(泳道5),在水相中可以观察到大量的多肽和多酚。中间相显示存在多肽,但很少存在多酚(泳道6,版面B、A)。对应于有机相的泳道7既没有显示花青素的存在,也没有显示肽的存在。泳道8、9和10对应于乙醇漂白樱桃的透析提取物粉末经Trizol提取后得到的上清液、中间相和有机相,其中大部分多酚已被去除。尽管多酚的去除导致纳米颗粒从球形结构纳米纤维到丝状结构纳米纤维的结构转变,但多肽仍然是纳米纤维的组成部分(泳道8,版面B)。漂白的樱桃透析提取物的中间相和有机相显示肽的染色最少(泳道9、10;版面B)。

[0783] 纳米颗粒和纳米丝的碳水化合物组成:通过SDS-PAGE后碘化丙锭染色和考马斯亮蓝染色的相似性揭示了纳米颗粒中碳水化合物的果胶性质及其与多肽的缔合。已报道碘化丙锭(propidium iodide)是果胶酸的一种染色剂(Rounds等人,2011)。版面C(图12)显示了用碘化丙锭(10 μ mol水溶液)的纳米颗粒的染色模式。下版面(D)显示了用考马斯亮蓝染色的相应凝胶。泳道1对应于市售果胶的标准样品,其显示了用碘化丙锭的最小染色。用碘化丙锭染色果胶是由于存在带负电荷的游离羧酸基团。如果某些果胶样品中自然发生的甲基化作用封闭了羧酸基团,染色将减少。泳道2显示了溶解在15%甘油中的透析提取物的冻干粉末中的组分的迁移模式,显示了果胶在纳米颗粒(版面A)和多肽(版面B)中的分布。泳道3对应于冻干透析液级分后获得的果胶/多酚/肽级分,该级分对多肽显示相对更强的染色。

泳道4对应于聚半乳糖醛酸标准品,其显示用碘化丙锭染色,而不是多肽染色。酸樱桃匀浆物的胶状样沉淀也显示了果胶和多肽的存在(泳道5);

[0784] 通过蛋白质印迹分析对纳米颗粒化学性质的进行进一步分析(图13)。在乙醇中漂白(去除多酚)之前和之后,将酸樱桃水果在水中提取,并通过对水的透析分离纳米颗粒和纳米纤维。将透析提取物冻干,将复合物溶解在甘油:水中,然后进行SDS-PAGE,并利用针对同型半乳糖醛酸聚糖(α -1,4-半乳糖醛酸的二十聚体,中间插入形成果胶的主要骨架结构的甲基化单元)、伸展蛋白(主要的细胞壁糖蛋白)和阿拉伯半乳聚糖-蛋白(主要的果胶连接蛋白)产生的结构特异性单克隆抗体(大鼠IgM)进行免疫定位。用碱性磷酸酶标记羊抗大鼠IgG检测结合抗体。版面A显示了来自漂白樱桃(泳道2;纳米纤维)和未漂白樱桃(泳道3;纳米颗粒)的纳米纤维/纳米颗粒分别通过考马斯亮蓝染色的情况。在乙醇提取多酚后,考马斯亮蓝染色显著降低,表明多肽与多酚可能一起减少(泳道2)。这也可能是由于漂白樱桃的纳米纤维对凝胶的渗透降低了。版面B显示了针对同型半乳糖醛酸聚糖产生的抗体对来自漂白樱桃(版面B,泳道2)和未漂白樱桃(泳道3)的纳米纤维/纳米颗粒的反应性。有趣的是,与未漂白樱桃的纳米颗粒(版面B,泳道3)相比,漂白樱桃的纳米纤维对同型半乳糖醛酸聚糖的反应性更强。这再次反映在版面B下方所示的斑点印迹的强度中。这可以潜在地反映出纳米颗粒/纳米纤维中的抗体在同型半乳糖醛酸聚糖部分的可接近性方面的差异。未漂白樱桃的纳米颗粒与漂白樱桃的纳米纤维之间的关键差异是多酚的存在。通过漂白去除多酚,同型半乳糖醛酸聚糖部分可以更大程度地暴露,这可导致对抗体的反应性增加。而且,这些结果表明多酚是未漂白樱桃的纳米颗粒的组成部分,而多酚的去除可导致结构转变。将丝状纳米纤维与樱桃多酚孵育并不逆转从丝状到球形的转化(数据未显示),然而,两种形式都是结构稳定的。纳米颗粒和纳米纤维都对抗伸展蛋白表现出温和的反应性,抗伸展蛋白是一种针对水果中主要的细胞壁蛋白产生的抗体(版面C)。抗伸展蛋白的斑点印迹也显示出最小的反应性。然而,两种纳米颗粒/纳米纤维类型均观察到针对抗阿拉伯半乳聚糖-蛋白质(果胶-蛋白质)的非常强的反应,表明这可能是纳米颗粒/纳米纤维的基本结构的主要成分(版面D,泳道2、3;斑点印迹)。抗木葡聚糖的蛋白质印迹在凝胶中没有显示出任何交叉反应性,但显示处针对纳米纤维的强烈反应(底部版面,版面A,形成丝状聚集体)。似乎多肽在SDS溶解过程中从纳米颗粒和纳米纤维上剥离,但是碳水化合物可能保持为聚集体,由于大尺寸和缺乏电荷而不能有效地进入凝胶。

[0785] 在用三氟乙酸(8.6 M)消化并使用BSTFA:TMCS(Sigma,99:1)对释放的糖进行三甲基甲硅烷基化之后,进行纳米颗粒和纳米纤维的碳水化合物组成的定性分析。通过GC-MS分离和鉴定的糖的定性特征以及作为标准品的常见糖的定性特征(下版面)如图10(上版面)所示。纳米颗粒(蓝色;标记为纳米复合物)和纳米纤维(红色;标记为纳米丝)的糖成分既有相似之处,也有差异。葡萄糖、半乳糖/半乳糖醛酸和甘露糖是纳米颗粒中的主要成分,阿拉伯糖的含量相对较低。纳米纤维的糖富含阿拉伯糖,半乳糖/半乳糖醛酸和葡萄糖的含量较低。在纳米颗粒和纳米纤维中可能存在未鉴定的其他糖,并且一些峰也可能源于在TFA消化期间改性的糖。结果表明,在纳米纤维形成过程中,富含葡萄糖、半乳糖/半乳糖醛酸和甘露糖的几种低聚物可以被剥离掉,留下仍然来源于果胶的阿拉伯半乳聚糖的主要富含阿拉伯糖低聚物的纳米纤维。

[0786] 来源于纳米纤维中发病相关蛋白的肽的鉴定:在SDS-PAGE分析中,在纳米颗粒和

纳米纤维中都可以检测到各种分子量的肽的出现,这是由在樱桃的均质化过程中天然蛋白酶活性的作用引起的(图14,版面A;泳道2、3;凝胶A、B)。其中,在相对分子质量为40kD和20kD(标记为1、3,图14;版面A)的纳米纤维中,至少有两个条带是不同的(泳道3;B)。还观察到一条强度稍强、分子量约为40kD的多肽条带(标记为2,凝胶B)。在未染色的凝胶中发现这3种多肽与多酚(紫色)结合(凝胶A,泳道2)。切割这些条带并在胰蛋白酶消化和LC-MS/MS后进行肽指纹图谱分析。鉴定的主要肽的序列如图14(版面B和C)所示。泳道3(纳米纤维)中具有~40 kD分子量的条带1显示出与来自樱桃(版面B)的PR蛋白葡聚糖内切-1,3- β -葡萄糖苷酶(登录号#P50694)的序列相似性。通过LC-MS-MS鉴定的序列(显示为突出显示的片段和来自基因库的推导序列)对应于蛋白质的246个氨基酸长的肽。泳道3中~20 kD处的第二条带(纳米纤维)显示出与另一PR蛋白(主要的樱桃过敏原Pru a1(登录号#024248))的序列相似性,多肽中总共有161个氨基酸(版面B)。对应于纳米纤维中条带1的纳米颗粒中的40kD条带没有产生水解产物,这可能是由于结合的多酚的干扰。这些鉴定的肽片段占在凝胶上分离的所有多肽的一小部分。这可能暗示蛋白酶的高活性,其产生了可形成纳米颗粒和纳米纤维的整体组分的肽。

[0787] 纳米颗粒的FT-IR分析:来自未漂白和漂白的樱桃水果的纳米颗粒/纳米纤维粉末的FT-IR光谱显示出复杂的光谱,彼此高度相似,并且与蛋白质和细胞壁多糖等大分子结构相似(图15;纳米复合物=纳米颗粒,纳米丝=纳米纤维。该图还显示了聚半乳糖醛酸(PGA)(同型半乳糖醛酸聚糖,果胶)和白蛋白(BSA)的光谱。观察到纳米颗粒的主要吸收带为3000-3600 nm、2600-3000 nm之间的宽带,以及指纹区域中 1750-800 nm之间的几个峰。由于纳米颗粒的大分子性质,各个官能团或结构特征特有的吸收峰合并。与多肽、果胶和多酚的光谱特征相比,可以阐明纳米颗粒的几种结构特征。纳米颗粒中蛋白质(>10%)、碳水化合物(~70%)以及存在的多酚(~10-15%)等组分比例也可能影响峰和峰形,揭示了峰特征对碳水化合物的总体优势。细胞壁碳水化合物组分的FT-IR分析显示出纤维素、半纤维素和果胶的特征(Kacurakova等人,2000;Urias-Orona,2010)。在成熟水果中,纤维素分解酶和果胶分解酶的活性增加导致细胞壁组分的分解代谢,产生具有特征键(characteristic linkage)的小分子量低聚物。其中果胶是具有 α -1,4-连接的半乳糖醛酸的复合分子,具有由鼠李糖半乳糖醛酸聚糖、半乳聚糖、阿拉伯聚糖和阿拉伯半乳聚糖组成的间歇毛发区(即刷毛状)(Negi和Handa,2008)。木葡聚糖、木聚糖、葡甘露聚糖和半乳甘露聚糖是细胞壁的半纤维素组分。因此,在水果的均质化过程中,这些组分中的任一种可整合到纳米颗粒中。蛋白质印迹研究显示在纳米颗粒中存在同型半乳糖醛酸聚糖和阿拉伯半乳聚糖,表明果胶主要参与其形成。来自樱桃的两种类型的纳米颗粒/纳米纤维的FT-IR光谱在跨越900 cm^{-1} 和1200 cm^{-1} 的碳水化合物区域中显示出强吸收。来自漂白樱桃的纳米纤维在~1017 cm^{-1} 处显示出尖锐的峰,这是具有高比例同型半乳糖醛酸的果胶的特征(Kacurakova等人,2000)。在1045 cm^{-1} 和1074 cm^{-1} 之间的肩峰可源于 β -连接的阿拉伯半乳聚糖。来自鼠李糖聚半乳糖醛酸聚糖以及半纤维素的吸收发生在这个广泛的区域中。

[0788] 尽管碳水化合物区域中的吸收主要源于糖苷键(C-O-C),但异头区域提供了关于糖部分之间连接类型的信息。 α -连接的特征在于在834 cm^{-1} 处的吸收带,且 β -连接的特征在于898 cm^{-1} 处的吸收带。两种类型的纳米颗粒均在~834 nm处显示宽的吸收最大值,表明复合物的碳水化合物主要具有 α 型连接,如在果胶中常见的,再次表明纳米颗粒中的碳水化

合物主要来源于果胶(图15)。

[0789] 如在其他植物组织中观察到的那样,在 $\sim 1550\text{ cm}^{-1}$ 和 $\sim 1800\text{ cm}^{-1}$ 之间观察到的宽带是果胶的特征(McCann等人,1994)。通常,从烟草细胞分离的果胶在 900 cm^{-1} 和 1800 cm^{-1} 之间的FT-IR光谱图(包括指纹区)与对于纳米颗粒观察到的几乎相同。果胶的两个主要结构元素是酯键(1740 cm^{-1})和羧酸基团(1600 和 1414 cm^{-1})。在 1740 cm^{-1} 处的宽峰在两种类型的纳米颗粒中都很明显,表明存在酯化果胶,在来自漂白樱桃的纳米颗粒中强度略低(图15)。

[0790] 纳米颗粒中蛋白质的吸收带可能在很大程度上被果胶产生的吸收带所掩盖(Gorinstein等人,2009)。然而,在这些光谱中可以观察到二级结构的某些特征。蛋白质的FT-IR光谱通过特定的酰胺吸收来表征,称为酰胺A带、酰胺B带和酰胺I至VII。由-NH伸缩产生的酰胺A带($\sim 3500\text{ cm}^{-1}$)和酰胺B带($\sim 3100\text{ cm}^{-1}$)可能与碳水化合物羟基的-OH伸缩(3400 cm^{-1})重叠,在纳米颗粒光谱中在 3600 cm^{-1} 和 3000 cm^{-1} 之间形成宽峰。酰胺I和II吸收分别来自与来自果胶的酯吸收重叠的-C=O和-C-N基团($1600\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$)的伸缩振动和NH伸缩($1510\text{--}1580\text{ cm}^{-1}$)。酰胺I吸收是主链结构的特征,主要是在 $\sim 1629\text{ cm}^{-1}$ 处吸收的 β -折叠。细胞壁糖蛋白例如伸展蛋白具有较大的 β 片层组分,然而,使用伸展蛋白抗体的Western分析未显示纳米颗粒中普遍存在伸展蛋白(图13)。然而,在两种类型的纳米颗粒和纳米纤维中都观察到了针对阿拉伯半乳聚糖-蛋白产生的抗体的高度阳性反应性。这可能表明,本质上是两亲性的阿拉伯半乳聚糖连接的蛋白(Seifert和Roberts,2007)可以为纳米颗粒提供碳水化合物-多肽组分(图15)。

[0791] 多酚是纳米颗粒的组成部分。纳米颗粒中多酚的相对含量为12-15%。含有多酚的纳米颗粒和从不含多酚的漂白樱桃中分离出的纳米纤维的FT-IR光谱没有显示主要差异。多酚以纯净形式显示特征光谱,主要吸收在碳水化合物区、-C=H伸缩($\sim 2850\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$)、以及由多酚羟基和糖羟基组成的羟基伸缩(游离 $3200\text{--}3600\text{ cm}^{-1}$) (David等人,2009)。由于多酚的相对含量低,多酚官能团的吸收难以从碳水化合物和蛋白质中解析出来(图15)。

[0792] 纳米颗粒的X-射线衍射:如本实施例所示,水果中果胶的普遍存在可能会通过结构转变产生纳米颗粒。由于纳米颗粒对果胶酶处理非常敏感,并经历完全的组织溶解,因此果胶似乎是纳米颗粒的主要组分。果胶可以形成凝胶,这取决于甲氧基化程度和糖的存在和低pH以及如钙等二价离子(Fu和Rao,2001;Strom等人,2007)。 β -1,4-葡聚糖如纤维素作为结晶实体存在,但也可以以无定形状态存在。纳米颗粒对纤维素处理的敏感性表明具有 β -1,4-糖苷键的组分也是纳米颗粒结构的一部分,并且这些可以包括连接纤维素微纤维的无定形纤维素和/或半纤维素组分(木葡聚糖)。之前对罗望子种子的研究已经表明木葡聚糖可能被果胶掩蔽,而果胶的溶解暴露了木葡聚糖(Marcus等人,2008)。因此,纳米颗粒中同时存在果胶和纤维素是一种可能的情况。结晶纤维素的X-射线衍射显示出以衍射角(2θ) 22.5° 为中心的锐峰,而无定形纤维素的X-射线衍射显示出 20.7° 处的特征性宽峰(Park等人,2010)。纳米颗粒粉末的X射线衍射(图16)显示出以约 20° 为中心的峰,表明纳米颗粒中存在无定形纤维素。透析液粉末的衍射图显示出以 20° 为中心的更宽的峰,因为它可能含有多种类型的碳水化合物组分。纳米颗粒和透析液的X射线衍射图也类似于明胶-果胶复合物(Sharma等人,2011)。随着水果成熟,纤维素酶和果胶酶活性增加,导致细胞壁组分溶解,可能会释放出几种可以整合到纳米颗粒中的细胞壁聚合物。因此,纳米颗粒似乎来源于果胶

组分,例如含有游离和酯化羧基的聚半乳糖醛酸、阿拉伯半乳聚糖、木葡聚糖、无定形纤维素等。在提取过程中与肽和多酚的进一步组装可能导致这些组分自组装形成纳米颗粒。

[0793] 球形纳米颗粒结构组织的建议模型:从几个结果可以阐明形成纳米颗粒的大分子和多酚的组织。来自未漂白樱桃的透析级分的单个纳米颗粒的电子显微照片如图17 A所示。虽然大多数纳米颗粒的直径在约25-50 nm的尺寸范围内,并且是非常稳定的球形结构,但偶尔也会形成直径超过100 nm的较大复合物。与较小的纳米颗粒相比,较大的尺寸可能会使这样的复合物在结构上较不稳定。在正常条件下呈现球形的大纳米颗粒偶尔会塌缩,从而揭示结构细节。在显微照片中,塌缩区域如中心(箭头1;版面A,图17)所示这种观察结果与酶(胰蛋白酶、纤维素酶)处理后获得的结果一致,其中纳米颗粒从它们的外部结构剥离,显示出球形、柔韧的果胶核。该核可能由同型半乳糖醛酸聚糖部分和未暴露的纳米颗粒形成,因为纳米颗粒对针对同型半乳糖醛酸聚糖产生的抗体未显示出交叉反应性。塌缩的结构表明核的内部可以是中空的。该核被以螺旋组织装配的长丝包围(图17,版面A,箭头2),通过其对果胶酶和胰蛋白酶的敏感性推断,长丝由同型半乳糖醛酸聚糖和蛋白构成。多酚可能在稳定长丝的螺旋组织中发挥重要作用,因为用乙醇去除多酚导致完全不同的组织,将螺旋结构解旋为长丝。当去除多酚时,这些长丝显示出对同型半乳糖醛酸聚糖抗体的强反应性,这表明多酚可以掩盖螺旋结构。在覆盖果胶核的螺旋长丝外部,似乎有另一层明显的原纤维层,其似乎与内部原纤维层不同(图17,版面A,箭头3)。很可能该层的组成不同于内层的组成(箭头2),因为这可能主要由与多肽偶联的阿拉伯半乳聚糖构成,因为来自未漂白樱桃的纳米颗粒对阿拉伯半乳聚糖-蛋白抗体显示出强反应性,指示了它们的外部位置和增强的对抗体的易接近性。阿拉伯半乳聚糖-蛋白也是从漂白樱桃分离的长丝结构的一部分。因此,从未漂白樱桃分离的纳米颗粒和从漂白樱桃分离的纳米纤维可以具有类似的组分,但是组织为物理上不同的结构。纳米颗粒的放大视图(图17,版面B)显示了纳米颗粒的内层上的螺旋结构(箭头)。

[0794] 由于使用工程化纳米材料如氧化铁纳米颗粒、树枝状大分子、金和银纳米颗粒、碳纳米管等存在潜在的细胞毒性效应,但尚未得到充分评估,因此不断地探索基于天然产物的纳米材料的开发(Maynard,2006)。工程化纳米材料的问题是可能没有从系统中消除这些物质的机制。在细胞培养研究中,已经观察到,随着结构的羟基化增加,来自富勒烯型纳米材料的毒性降低(Lewinski等人,2008)。工程化纳米材料的主要应用是在诊断和生物医学中(Kunzmann等人,2011)。70 nm的二氧化硅纳米颗粒能够穿透胎盘屏障并进入胎儿,而那些300 nm和900 nm大小的二氧化硅纳米颗粒在胎儿组织中没有积累(Yamashita等人,2011)。类似地,直径为30 nm的载药聚合物胶束在穿透低渗透性肿瘤方面比50 nm、70 nm或100 nm胶束更有效(Cabral等人,2011)。理解工程化纳米材料的吸收、分布和消除机制也有助于理解生物来源的纳米材料的这些机制。

[0795] 已经提出了不同形状和尺寸的生物纳米材料以提供药物递送和保留的益处。纳米脂质体、纳米凝胶、胶束,丝状体等是生物纳米结构的潜在形态变体,在生物医学中具有潜在的应用(Nishiyama,2007)。其中,已经观察到直径为22-60 nm和长度为2-8 μ m的称为丝束的丝状聚合物胶束在血液中停留的时间比球形纳米胶束更长(Discher和Eisenberg,2002)。纤维蛋白原等蛋白质围绕着包裹有聚丙烯酸的金纳米颗粒,这似乎是一种结构变化,是其引发炎症的一部分(Deng等人,2011)。通过提高生物利用度和增加循环时间,负载

大豆苷元的固体脂质纳米颗粒比单独的大豆苷元在动物模型中的心脑血管保护方面更有效(Gao等人,2008)。

[0796] 纳米颗粒可能被胞吞机制吸收,因此在与细胞表面结合、内化、转运和在细胞中释放过程中可能经历几种类型的修饰。在胞吞过程中,纳米颗粒可以结合到细胞表面,随后通过内体、吞噬体和巨胞饮小体的细胞质膜的囊泡化进行内化。在这些过程中可能涉及不同类型的机制。细胞质膜起源的囊泡结构可变成多泡体并与溶酶体融合。溶酶体的pH呈酸性,为通过蛋白酶和水解酶释放内容物降解纳米颗粒提供了理想条件。纳米颗粒被细胞的吸收取决于细胞的表面特性(Iverson等人,2011)。直径为20-50 nm的纳米颗粒似乎比更大或更小的纳米颗粒吸收得更多。吸收还可取决于受体细胞的表面电荷,通常,带正电荷的纳米颗粒被更有效地吸收。来自酸樱桃的纳米结构可能表现出这两种特性:当呈球形纳米颗粒形式时,由于周围的肽氨基基团和隐藏的聚半乳糖醛酸的羧基的潜在暴露而带正电荷;而当具有更大量的聚半乳糖醛酸(酸性基团)的纳米纤维暴露于它们所悬浮的接近中性的水性介质中时带负电荷。具有隐藏的聚半乳糖醛酸部分的纳米颗粒与抗同型半乳糖醛酸聚糖抗体的反应较差。相比之下,具有高度暴露的聚半乳糖醛酸部分的纳米纤维与抗同型半乳糖醛酸聚糖抗体的反应非常强烈,如图13所示。

[0797] 果胶作为一种广泛存在于植物特别是在水果和蔬菜中的生物大分子,其理化特性已被充分研究,并且其在药物包封、靶向递送、开发用作皮肤保护剂的水凝胶(单独使用或与蛋白质或诸如聚乙烯吡咯烷酮、聚乳酸等合成分子结合使用)的潜在用途正在越来越多地被探索(Mishra等人,2012)。基于果胶的材料的一个优点是,它在整个进化过程中一直被人类食用,并且已经证实其作为食物基质将封装材料运输到结肠中的生物学特性,其中在结肠中多糖被益生菌消化,释放内含物。果胶还可以结合并帮助从胃肠系统中去除胆固醇。已经探索了基于果胶的递送系统通过多根系进行药物递送(Yadav,2009;Sriamornsak,2011)。果胶基质的三维结构可能受到游离羧基基团(同型半乳糖醛酸聚糖和鼠李糖半乳糖醛酸聚糖)的影响,因为根据包埋溶液的pH值,果胶链可以作为阴离子链存在,阴离子链可以被各种形式的二价离子如钙稳定。另外,甲基化羧基与游离羧基的比值也会影响果胶形成3D结构的能力。因此,果胶制剂如膜、水凝胶、纳米结构等已被开发用于多种医学应用。然而,仅基于果胶的基质可能具有一些缺点,如低机械强度、低剪切稳定性、低药物负载功效和过早的药物释放。因此,通过与生物可降解聚合物如壳聚糖、聚乳酸、淀粉、明胶、大豆蛋白、 β -乳球蛋白、人血清白蛋白等共混或共聚,果胶的化学和物理改变可提供更高的电荷密度(正伯胺和负羧基)。已经实现了直径在70-200 nm范围内的ZnO-果胶纳米颗粒的生产,以探索提高缺锌人群对锌吸收的可能性(Shi和Gunasekaran,2008)。已经观察到这类分子更深地穿透到组织中并且能够提供更好的药物递送。已经制备了硫醇化的果胶纳米颗粒用于更好的眼部药物递送。将SPION(基于超顺磁性铁的纳米颗粒)和奥沙利铂包封在Pectin-Ca²⁺中以形成具有磁性功能的直径为100-200 nm的基于果胶的球形纳米结构。抗癌药物紫杉醇与果胶纳米结构结合,该过程受到果胶的亲水性(-OH和-COOH基团)以及天冬酰胺带正电荷的酰胺基团的影响(Verma等人,2011)。还尝试通过基于果胶的纳米结构递送几类药物,例如低溶解度的噻唑类药物、抗癌药物、神经和情绪活性药物以及胰岛素(Sharma等人,2012)。

[0798] 与生产基于果胶的纳米颗粒的合成方法相反,本实施例表明使用体内水果基系统

生产具有独特特性的纳米颗粒和纳米纤维的潜力。水果作为独立的工厂,用于形成纳米颗粒和纳米纤维。随着水果成熟,分解代谢过程被激活,导致水果软化并产生较低分子量的细胞壁组分,包括纤维素、果胶和来源于具有阳性、阴性和两亲性特征的细胞壁糖蛋白的多肽、以及在均质化过程中释放的钙离子和低pH。一旦组织被均质化并且各种组分被释放,将观察到各种组分发生自组装。应当注意,在没有外部影响的情况下,本实施例中形成的纳米颗粒在尺寸、形状和物理化学特性上基本上是均匀的。具有不同特征的水果,例如酸樱桃、蓝莓和葡萄,都显示出基本细胞组分的这种自组装形成基本相同类型的纳米颗粒的潜力。

[0799] 从本实施例中已经变得明显的一个有趣特征是花青素和可能的苹果酸在确定组分自组装以形成纳米颗粒中的作用。在花青素的存在下,纳米颗粒是球形的,带有与半乳糖醛酸聚糖-木葡聚糖-阿拉伯半乳聚糖-多肽长丝编织在一起的中心果胶核。这些长丝在花青素的存在下本质上是螺旋的并且包含原纤维状结构。花青素是两亲性分子并且可以用作各种组分之间的桥接结构。然而,一旦去除了花青素,纳米颗粒就会形成薄膜型(果胶的平面结构,图7)和纤维状结构(丝束型),称为纳米纤维。不管它们的形状如何,球形纳米颗粒和纳米纤维都是高度稳定的,并且能够以高效率 and 吸收能力与多种药物(紫杉醇、长春新碱)和/或矿物质结合。在功能方面,球形纳米颗粒也可用作花青素的载体以将花青素靶向递送至结肠中,例如,与游离花青素相比,花青素可以在球形复合结构内得到更多保护,从而在胃和肠之间的过渡期间保护它们免受pH变化的影响。

[0800] 在本实施例中,由水果制备纳米颗粒和纳米纤维,并研究和描述纳米颗粒和纳米纤维的理化特性和功能。在存在或不存在多酚的情况下,这些纳米颗粒和纳米纤维的独特之处在于它们通过由果胶、纤维素和蛋白质形成三级结构而产生的巨大表面积。这些生物来源的纳米颗粒和纳米纤维可以在几种应用中提供工程化纳米材料的替代物。由于构建组分已经通过食物(果汁、冰沙)被消耗掉,并且没有观察到不利影响,这可能表明结构组分可能会发生生物消除,就像任何食物大分子一样。纳米颗粒和纳米纤维被哺乳动物细胞内化,表明它们可用作例如小分子、营养物、药物、矿物质或其他此类试剂/货物的递送系统。尽管纳米颗粒和纳米纤维来源于类似的材料,但如本文详细描述,纳米颗粒和纳米纤维具有显著的差异。

[0801] 实施例2-纳米颗粒的功能和应用

[0802] 纳米颗粒处理对野生型和ETK0小鼠体重的影响

[0803] 材料和方法:

[0804] 体内分析-动物和基因分型-Pcyt2+/-小鼠(在本文中也称为ETK0小鼠)的产生和基因分型如前所描述(Fullerton MD等人,2007)。Pcyt2是一种负责调控产生磷脂——磷脂酰乙醇胺(PE)的基因,PE是细胞膜和细胞器的重要组分。完全敲除Pcyt2基因(无效动物)导致早期胚胎致死性死亡(出生前幼仔死亡),而杂合动物(仅具有一个拷贝的基因)在出生时和出生后是正常的。然而,杂合小鼠由于磷脂代谢改变而经历长期体重增加。组成磷脂的组分发生了重新定向,细胞机制从制造PE变为甘油三酯(脂肪)。这意味着小鼠体重增加,肝脏和血浆中的脂肪更多,最终对胰岛素的敏感性降低(胰岛素抗性)。

[0805] 根据大学动物护理委员会批准的方法,对Pcyt2+/-小鼠进行杂交,并在圭尔夫大学维持杂合群体。小鼠被安置在12 h光照/12 h黑暗循环中,可以自由饮水,并被喂食标准化的食物(目录号S-2335;Harlan Teklad)。将小鼠分成4个实验组(n=3-6/组):(i)野生型

(C57BL/6) 未处理 (WT-U) ; (ii) 野生型 (C57BL/6) 处理 (WT-T) ; (iii) Pcyt2 敲除-未处理 (KO-U) 和 (iv) Pcyt2 敲除-处理 (KO-T)。用于生化分析的样本 (血清和组织 (肝脏)) 在液氮中速冻并储存在 -80℃ 以备后用。

[0806] 血液分析. 临床死亡后, 从心脏收集末端血液。血清被立即分离并送到动物健康实验室 (圭尔夫大学; 经认可的分析设备) 进行生化分析, 例如白蛋白、球蛋白、A:G、总蛋白、ALT、AST、胆固醇、CK、葡萄糖、磷、甘油三酯和尿素的分析。

[0807] 化学品和试剂. L型甘油三酯M试剂盒购自Wako Diagnostics (日本大阪和德国诺伊斯)。抗p65 NF- κ B和B-微管蛋白的抗体分别来自圣克鲁斯生物技术公司 (Santa Cruz Biotechnology) 和细胞信号传导技术公司 (Cell Signaling Technology)。用于RNA分离的RNeasy Plus试剂盒购自Qiagen (美国, 加利福尼亚州, 瓦伦西亚)。用于cDNA制备的高容量cDNA逆转录试剂盒来自应用生物系统公司 (美国, 加利福尼亚州, 福斯特市)。使用的引物如下所示。

[0808] 表4: 用于PCT的引物序列, 用于评估用纳米颗粒处理后特定基因的表达水平。F=正向, R=反向。

[0809] 引物序列 SEQ ID NO: TM (°C) 扩增子大小 (bp)

[0810] STAT4F- 5' AGGTAAAGCTGGCTGTCCTG 3'

[0811] R- 5' AGATCTCTTGTCTTCTGGTTTGTG3' 1

[0812] 262

[0813] 150

[0814] TNF- α F- 5' CCGATGGGTTGTACCTTGTC 3'

[0815] R- 5' GGGCTGGGTAGAGAATGGAT 3' 3

[0816] 460

[0817] 300

[0818] IL-6F- 5' CAAGGGTGTTACACTGG 3'

[0819] R- 5' CTGGTCTCATCCGAACCCTG 3' 5

[0820] 662

[0821] 200

[0822] FASF-5' CTTGAGATGTGCTCCCAGCTGC 3'

[0823] R-5' CTTAGTGATAAGGTCCACGGAGGC 3' 11

[0824] 1259

[0825] 268

[0826] ATGLF-5' CAACGCCACTCACATCTACGG 3'

[0827] R-5' GGACACCTCAATAATGTTGGCAC 3' 13

[0828] 1457

[0829] 106

[0830] HSLF-5' ACGCTACACAAAGGCTGCTT 3'

[0831] R-5' TCGTTGCGTTTGTAGTGCTC 3' 15

[0832] 1659

[0833] 125

- [0834] LPLF-5' GCTCGCACGAGCGCTCCATT 3'
- [0835] R-5' CCTCGGGCAGGGTGAAGGGAA 3' 17
- [0836] 1859
- [0837] 350
- [0838] PGC1- α F- 5' TTGACTGGCGTCATTCGGG 3'
- [0839] R- 5' GAAGGACTGGCCTCGTTGTC 3' 19
- [0840] 5
- [0841] 396
- [0842] PPAR- α F-5' CGCATGTGAAGGCTGTAAGGGC 3'
- [0843] R-5' GTCATCCAGTTCTAAGGCATTG 3' 21
- [0844] 2257
- [0845] 289
- [0846] PPAR- γ F-5' CAGAAGTGCCTTGCTGTGGGG 3'
- [0847] R-5' CTTGGCTTTGGTCAGCGGG 3' 23
- [0848] 2457
- [0849] 157
- [0850] CTL1F-5' GAACGCTCTGCGAGTGGCTGC 3'
- [0851] R-5' TTCTTATGTTCTTGACTGCC 3' 25
- [0852] 2649
- [0853] 376
- [0854] PCYT1F-5' ATGCACAGAGAGTTCAGCTAAAG 3'
- [0855] R-5' GGGCTTACTAAAGTCAACTTCAA 3' 27
- [0856] 2850
- [0857] 170
- [0858] PSS2F-5' GAGTGGCTGTCCCTGAAGAC 3'
- [0859] R-5' TCGTAGATCTCACGCATGGC 3' 31
- [0860] 3259
- [0861] 305

[0862] 纳米颗粒处理. 用24-30周龄的Pcyt2敲除小鼠和同窝出生的对照进行实验。K0未处理组和对照小鼠(野生型;每组n=3-6) (通过管饲法) 提供100 μ L水,每周3次。K0处理组和对照小鼠(每组n=3-6;平均体重~ 40 g) 在100 μ L水中服用100 mg/kg/4周多酚等量的纳米颗粒溶液,每周3次(每剂133 μ g多酚当量)。所有组的口服管饲持续4周。将试验重复两次,并且在试验结束时将小鼠处死并用于血液和组织分析。

[0863] 免疫印迹. 通过使用10% SDS-PAGE的免疫印迹、蛋白质印迹和化学发光检测条带来测定NF- κ B。用在1X PBST中的5%牛奶封闭膜,并在4℃下用抗NF- κ B(美国,加利福利亚洲,圣克鲁斯,圣克鲁斯生物技术公司)抗体孵育过夜。然后将膜与抗-兔IgG孵育并通过化学发光(Sigma-Aldrich)进行可视化。用 β -微管蛋白进行膜再杂交以检查装载准确性。用成像密度计(ImageJ)定量特定条带的密度。

[0864] 肝脏甘油三酯测定. 根据试剂盒(Wako)方法使用L-型TG M试剂测量肝脏的TG含

量。

[0865] 总RNA分离和基因表达. 使用RNeasy Plus试剂盒(美国,加利福利亚洲,瓦伦西亚,Qiagen)分离总RNA,并使用高容量cDNA逆转录试剂盒(美国,加利福利亚洲,福斯特市,应用生物系统公司)制备cDNA。在PCR扩增的指数阶段,使用最佳cDNA量和反应循环数分析感兴趣的基因。各基因水平相对于内部GAPDH对照表达。测试的基因包括促炎基因(STAT4、TNF- α 和IL-6)和脂解基因(FAS, ATGL、HSL、LPL、PGC1- α 、PPAR- α 、PPAR- γ 、CTL1、PCYT1和PSS2)。通过使用从Pcyt2+/-和Pcyt2+/+雄性小鼠和雌性小鼠收集的肝脏样本进行实验。将反应产物进行电泳并用溴化乙锭染色观察条带。使用ImageJ 1.46软件来定量条带密度,并且将基因水平表示为相对于对照的倍数变化。所用引物列于上表中。

[0866] 通过SDS-PAGE免疫印迹、蛋白质印迹和化学发光检测条带来测定NF- κ B。用在1X PBST中的5%牛奶封闭膜,并在4℃下用抗NF- κ B(美国,加利福利亚洲,圣克鲁斯,圣克鲁斯生物技术公司)抗体孵育过夜。然后将膜与抗-兔IgG孵育并通过化学发光(Sigma-Aldrich)进行可视化。用 β -微管蛋白进行膜再杂交以检查装载准确性。用成像密度计(ImageJ)定量特定条带的密度。

[0867] 统计分析. 使用Prism GraphPad完成统计分析。数据表示为平均值 $\pm$ S.E.使用Student t检验(P值<0.05被认为是显著的)或多因素方差分析计算统计学显著性。当发现显著性效果时,使用Tukey诚实显著性差异检验进行事后比较。P<0.05认为差异有显著性。

[0868] 结果和讨论:进行实验以研究纳米颗粒处理对野生型小鼠和ETKO小鼠体重的影响。图18显示了给小鼠喂食纳米颗粒(NP)溶液对野生型和ETKO小鼠体重变化的影响。将小鼠(6-7月龄)分成4组,每组5-6只(野生型未处理(WT U)、野生型处理(WT T)、敲除未处理(KO U)和敲除处理(KO T))。纳米颗粒处理的小鼠通过管饲法接受133 μ g 当量的NP溶液/40g体重/天(100 mg 提取物/kg体重)的剂量,每周5次。未处理的小鼠接受水。实验持续4周。在测试组中,NP处理的第一周对小鼠体重没有影响,然而,在第2、3和4周之后,继续NP处理阻止了ETKO小鼠的体重增加。尽管未处理的WT和在这些特定剂量/条件下处理的WT之间体重减轻没有显著变化,但未处理的KO和处理的KO之间体重增加的减少具有统计学意义(P<0.05)。这些结果支持纳米颗粒在处理和/或管理肥胖和/或体重减轻中的用途。

[0869] 纳米颗粒处理对肝脏甘油三酯水平、肝脏组织病理学、血清生化参数和基因表达的影响

[0870] 材料和方法:

[0871] 组织学分析为了检查肝脏组织学,将组织固定在10%中性缓冲福尔马林+磷酸盐缓冲盐水中,并包埋在石蜡中。10 μ m肝脏切片用苏木精和曙红(H&E)染色并通过光学显微镜观察。用如前所描述的成像密度计(ImageJ)分析组织脂质(Fullerton等人,2007)。

[0872] 肝脏甘油三酯测定. 根据试剂盒(Wako)方法使用L-型TG M试剂测量肝脏的TG含量。

[0873] 血液分析. 在小鼠临床死亡后,从心脏收集末端血液。血清立即被分离并送去进行生化分析,例如白蛋白、球蛋白、A:G、总蛋白、ALT、AST、胆固醇、CK、葡萄糖、磷、甘油三酯和尿素的分析。

[0874] 结果和讨论:

[0875] 进行研究以探讨纳米颗粒处理对野生型和ETKO小鼠肝脏中的甘油三酯水平的影

响。在正常生理条件下,肝脏甘油三酯水平相对较低,因为肝脏不参与脂肪的储存。非酒精性脂肪肝的甘油三酯取决于脂肪酸从血浆摄入细胞的速率和肝细胞容量(Bradbury MW. 2006, Kawano Y 2013)。由于甘油三酯在肥胖小鼠肝脏组织中的积累,在有或没有纳米颗粒(NP)处理的WT和ETKO小鼠中研究了甘油三酯的水平。图19显示了纳米颗粒(NP)处理对小鼠肝脏中甘油三酯水平变化的影响。肝组织的甘油三酯水平通过使用 Wako L型 TG M检测试剂盒(美国,加利福尼亚州,Wako生命科学公司)中描述的方法进行评估。接受NP处理的ETKO小鼠中存在甘油三酯水平的显著降低。上版面显示了从雄性小鼠和雌性小鼠获得的数据。下版面显示了从雄性小鼠获得的数据。通过纳米颗粒(NP)处理的肝脏甘油三酯的降低支持NP用于降低肥胖小鼠肝脏或有需要的另一动物或受试者的肝脏中甘油三酯水平的用途。

[0876] 还进行了研究以探讨纳米颗粒处理对肝脏组织病理学的影响。脂滴被认为是肝细胞脂质储存细胞器(Mashek DG, 2015)。某些代谢综合征疾病被认为是由于肝脏中异常的脂质积累所致(Gluchewaski 2017)。因此,进行了研究以探讨纳米颗粒处理对野生型和敲除(ETKO)小鼠的肝脏组织病理学和肝脏脂滴的影响。图20显示了来自进行纳米颗粒处理的小鼠(WT和KO)的肝脏切片的组织病理学。冷冻切片用油红-O染色剂(Sigma-Aldrich)染色以使含有甘油三酯的脂滴可见为红色液滴。顶部两版面/行表示来自野生型(未处理-顶部;纳米颗粒处理-底部)小鼠的染色的肝脏切片的图像。红色染色区域的量化显示对照组和处理组小鼠的变化很小。各版面/行表示来自3只独立小鼠的切片。底部两版面/行显示来自ETKO未处理(顶部)和NP处理(底部)小鼠的肝脏切片的外观。一般来说,来自ETKO小鼠的肝脏切片显示出几个空白区域。这些区域在处理过的ETKO小鼠中减少。此外,肝脏的结构往往与WT相似(与对照相比,紫色区域相对更多)。处理后油红染色区域的面积显著减少(附图下版面)。处理后,尽管在WT-T/WT-U组中没有观察到显著变化,但与KO-U(未处理)小鼠相比,KO-T(处理)小鼠中脂滴的量显著减少。这些数据显示NP处理降低了肥胖小鼠肝脏中脂滴的百分比。

[0877] 考虑到用纳米颗粒处理后肥胖小鼠中肝脏甘油三酯的降低,以及肝脏的组织病理学检查结果,似乎纳米颗粒处理可能是控制肝脏中脂质沉积的有效手段。在非酒精性脂肪变性(即 NASH)下观察到的这种情况类似于在肥胖小鼠中观察到的情况。因此,例如,如本文所描述的抗炎植物产物如纳米颗粒的摄入可以是一种调控和/或管理动物、哺乳动物或人类受试者中NASH的方式。

[0878] 还进行了研究以探讨纳米颗粒处理对小鼠(野生型WT和敲除,KO小鼠)血清生化参数的影响。血清参数是个体营养状况的重要指标。循环脂肪酸水平的增加可以引起它们与白蛋白的结合,从而引起构象变化(YamatoM 2007)。球蛋白水平可能由于肥胖和肝病而改变。总蛋白量的波动可以指示肝脏和肾脏病症、心力衰竭和营养不良。肝酶、丙氨酸氨基转移酶(ALT)和天冬氨酸氨基转移酶(AST)的升高也是在非酒精性脂肪肝病和肥胖症的情况下观察到的肝功能异常的关键指标(Marchesini G 2008)。胆固醇和甘油三酯的高血液水平是脂质代谢障碍、高脂血症或高胆固醇血症的结果。血清中肌酸激酶(CK)量的增加是肌肉损伤、心脏病、慢性肾病和急性肾衰竭的指标。血清中磷水平与营养不良、吸收障碍及肾功能损害有关。高水平的葡萄糖通常指示糖尿病,然而,它可能与许多其他疾病有关。

[0879] 为了探讨NP处理对4个实验组(野生型纳米颗粒处理和未处理-WT-T、WT-U;敲除纳

米颗粒处理和未处理, KO-T和KO-U) 中白蛋白、球蛋白、A:G、总蛋白、ALT、AST、胆固醇、CK、葡萄糖、磷和甘油三酯的血清浓度的影响, 将小鼠用100 mg/kg体重的NP溶液处理4周。图21显示了纳米颗粒(NP) 处理的和未处理的小鼠的血清参数。白蛋白、球蛋白及其比值无明显变化。血清中的总蛋白水平似乎略有降低。数值为3次独立处理的平均值 $\pm$ SEM。图22显示了对照和NP处理小鼠的血清生理功能标记(ALT、AST、胆固醇和CK) 水平的变化。这些分析是在Guelph大学实验室服务部的病理学实验室使用测试试剂盒通过标准方法进行的。丙氨酸转氨酶和天冬氨酸转氨酶是指示肝脏功能状态的酶。如果肝功能低下或如果肝脏发炎, 则更多的这些酶分泌到血液中。在肥胖小鼠中, ALT和AST水平响应于NP处理均有显著且实质性的降低。即使在这些酶水平低的野生型小鼠中, NP处理也会导致下降。NP处理似乎使肥胖小鼠的肝功能正常化。在野生型小鼠和肥胖小鼠中, 血清中的胆固醇水平也响应于NP处理降低。高肌酸激酶水平是肌肉损伤的指标, 其在NP处理的肥胖小鼠中也显示出大幅下降。这些结果支持NP处理的抗炎功能。图23显示了未处理的小鼠和纳米颗粒处理的小鼠的血液中葡萄糖和磷的水平。未处理和处理的野生型和ETKO小鼠血清中的磷水平均没有显著变化。葡萄糖水平在野生型中相似, 并且在用NP溶液处理后在肥胖小鼠中呈下降趋势。

[0880] 纳米颗粒处理对基因表达的影响

[0881] 结果和讨论:

[0882] 进行了研究以探讨纳米颗粒处理对参与各种相关生物途径和/或条件的各种关键基因的表达水平的影响。用纳米颗粒处理小鼠(野生型、WT和ETKO敲除、KO), 并分析基因表达水平的变化。

[0883] STAT4(信号转导子和转录激活子4) 是蛋白质STAT家族的转录因子。STAT4被Janus激酶磷酸化, 这使得它能够二聚化, 并且在细胞因子信号转导过程中易位到细胞核中, 并且增加基因表达。Stat 4相关基因表达的增加是激活炎症途径的指征。图24显示了响应于用纳米颗粒溶液处理的STAT4基因表达变化的评估。用琼脂糖凝胶电泳对PCR产物进行定量, 并用溴化乙锭染色。未处理的和处理的野生型小鼠之间的STAT4水平没有显著变化。在喂食NP溶液的ETKO小鼠中STAT4表达有下降的趋势。在该测试中, 数值与未处理的ETKO小鼠中的水平没有显著差异, 但观察到下降的趋势。数值是每组4-5只小鼠的平均值 $\pm$ SEM。这表明纳米颗粒溶液可能显示出减轻身体炎症状态的潜力。

[0884] 核因子- κ B(NF- κ B) 是参与通过细胞因子(如白细胞介素和肿瘤坏死因子- α) 起始炎症信号传导的关键蛋白。该途径是复杂的, 并且可能基于病症具有促炎和抗炎作用。认为NF- κ B信号传导的下降有利于炎症相关的慢性病症的下调。图25显示了响应于用纳米颗粒溶液处理的NF- κ B基因表达变化的评估。通过蛋白质印迹和化学发光检测对NF- κ B带强度进行定量。未处理的和处理的野生型小鼠之间的NF- κ B水平没有显著变化。在肥胖小鼠的情况下进行类似的观察。然而, 与野生型小鼠相比, 肥胖小鼠中的NF- κ B表达水平有所增加。这些结果表明与野生型相比, 肥胖小鼠的炎性状态有所增加。数值是每组4-5只小鼠的平均值 $\pm$ SEM。

[0885] TNF α 是参与与由感染以及自身免疫激活引起的炎症相关的信号传导途径的关键蛋白。TNF α 的下调被认为是控制慢性自身免疫疾病如关节炎的理想手段。减少TNF α 有助于减少肥胖症, 肥胖症也与体内炎症状态有关。图26显示了响应于用纳米颗粒溶液处理的小鼠的TNF α 基因表达变化的评估。通过RT-PCR进行定量, 通过琼脂糖凝胶电泳和溴化乙锭染

色分离产物。未处理的和处理的野生型小鼠之间的TNF α 基因表达水平没有显著变化。在喂食NP溶液的ETKO小鼠中存在TNF α 表达的显著降低。数值是每组4-5只小鼠的平均值 $\pm$ SEM。

[0886] IL6是介导促炎和抗炎途径的细胞因子。已知IL6的激活会导致慢性炎症状态的发展,从而导致多种疾病。IL6有多种作用。IL6受体的单克隆抗体(Tocilizumab)靶向类风湿性关节炎,一种炎性疾病。下调IL6可以帮助减轻慢性病症,例如肥胖症。图27显示了响应于用纳米颗粒溶液处理的小鼠的IL6基因表达变化的评估。未处理的和处理的野生型小鼠之间的IL6水平没有显著变化。在喂食NP溶液的ETKO小鼠中存在IL6表达的显著降低。数值是每组4-5只小鼠的平均值 $\pm$ SEM。

[0887] FAS(脂肪酸合酶)是参与脂肪酸生物合成的酶。脂肪酸转化为甘油三酯,并且增加的脂肪酸水平可致使脂肪沉积,从而导致肥胖。因此,该酶水平的降低可有利于降低甘油三酯生物合成和沉积。图28显示了响应于用纳米颗粒溶液处理的FASN基因表达变化的评估。通过在琼脂糖凝胶上分离PCR产物进行定量,并且溴化乙啶染色使条带可视化。在NP处理的野生型小鼠中FAS水平显著降低。在喂食NP溶液的ETKO小鼠中FAS表达有下降的趋势。在该测试中,数值与未处理的ETKO小鼠中的水平没有显著差异。数值是每组4-5只小鼠的平均值 $\pm$ SEM。ATGL(脂肪甘油三酯脂酶)是参与甘油三酯分解代谢为脂肪酸的起始的酶。ATGL功能可能参与代谢综合征的发展。图29显示了响应于用纳米颗粒溶液处理的ATGL基因表达变化的评估。通过在琼脂糖凝胶上分离PCR产物进行定量,并且溴化乙啶染色使条带可视化。对照和NP处理的野生型小鼠之间的ATGL水平没有显著差异。同样地,在未处理和NP处理的ETKO小鼠中ATGL表达水平相同。数值是每组4-5只小鼠的平均值 $\pm$ SEM。

[0888] HSL(激素敏感性脂肪酶)是参与脂肪组织中甘油三酯水解的关键酶,并且是参与能量产生的关键酶。HSL与ATGL结合起作用以从甘油三酯释放游离脂肪酸。当需要能量时,如在禁食期间,该酶通常响应儿茶酚胺而被激活,并且因此在动员储存的脂质方面起作用。在甾体生物合成中,它还从胆固醇酯中释放脂肪酸。HSL可以通过破坏泡沫细胞中的胆固醇酯而具有降低动脉粥样硬化的功能。图30显示了响应于用纳米颗粒溶液处理的HSL基因表达变化的评估。通过在琼脂糖凝胶上分离PCR产物进行定量,并且溴化乙啶染色使条带可视化。对照和NP处理的野生型小鼠之间的HSL转录水平显著增加。在未处理和NP处理的ETKO小鼠中HSL表达水平相同。数值是每组4-5只小鼠的平均值 $\pm$ SEM。

[0889] LPL(脂蛋白脂酶)是水解与脂蛋白结合的甘油三酯,从而释放游离脂肪酸和单酰基甘油的酶。LPL与其他脂肪酶如胰脂肪酶和肝脂肪酶相似。LPL存在于几种组织中,例如心脏、肌肉和脂肪组织,并且它们存在于靠近毛细管内腔的细胞层中。LPL可能影响毛细管内脂蛋白代谢。LPL活性受激素例如胰岛素和肾上腺素的差异调节。已知LPL水平在高脂肪饮食或高碳水化合物饮食后增加,并且可能在肥胖的发展中具有功能。图31显示了响应于用纳米颗粒溶液处理的LPL基因表达变化的评估。通过在琼脂糖凝胶上分离PCR产物进行定量,溴化乙啶染色使条带可视化。在野生型小鼠中,LPL转录本的水平在对NP处理的响应中没有变化。相反,在NP处理的ETKO小鼠中LPL表达水平显著降低。数值是每组4-5只小鼠的平均值 $\pm$ SEM。

[0890] PGC1- α (过氧化物酶体增殖物激活受体- γ 共激活剂)属于转录共激活剂家族,参与调控与碳水化合物和脂质相关的能量代谢。PGC1-A在应激条件下被激活。还已知该蛋白激活参与增强炎症途径的NF-kB。PGC1-A水平的降低因此可以下调炎症;图32显示了响应于用

纳米颗粒溶液处理PGC1- α 基因表达变化的评估。通过在琼脂糖凝胶上分离PCR产物进行定量,溴化乙啶染色使条带可视化。在野生型小鼠中,PGC1- α 转录本的水平在对NP处理的响应中没有变化。相反,在NP处理的ETK0小鼠中,PGC1- α 表达水平显著降低。数值是每组4-5只小鼠的平均值 $\pm$ SEM。

[0891] PPAR- α (过氧化物酶体增殖物激活受体- α) 属于一组细胞核定位的转录因子。PPAR- α 在肝脏的脂质代谢中具有关键的调节功能,包括刺激参与脂肪酸摄取、转运和分解代谢的基因。PPR- α 敲除小鼠具有导致脂肪肝疾病的异常脂质代谢。图33显示了响应于用纳米颗粒溶液PPAR- α 基因表达变化的评估。通过在琼脂糖凝胶上分离PCR产物进行定量,并且溴化乙啶染色使条带可视化。在野生型小鼠以及ETK0肥胖小鼠中,PPAR- α 转录本的水平在对NP处理的响应中均无变化。数值是每组4-5只小鼠的平均值 $\pm$ SEM。

[0892] PPAR- γ (过氧化物酶体增殖物激活受体- γ) 是位于细胞核中的另一转录因子。该蛋白参与脂肪细胞增殖,促进肥胖发生。PPAR γ 在脂肪组织中表达,在肌肉中以较低水平表达。已知PPAR γ 影响肥胖和II型糖尿病的发展。图34显示了响应于用纳米颗粒溶液PPAR- γ 基因表达变化的评估。通过在琼脂糖凝胶上分离PCR产物进行定量,溴化乙啶染色使条带可视化。在NP处理的野生型小鼠中,PPAR- γ 转录本显著减少。NP处理后肥胖小鼠中的PPAR γ 水平无明显变化。数值是每组4-5只小鼠的平均值 $\pm$ SEM。

[0893] CTL-1 (胆碱转运蛋白样蛋白1) 是一种膜结合酶,且发现于脑细胞的质膜和线粒体中。它参与胆碱在线粒体中的转运,用于磷脂酰胆碱的生物合成和膜的生物发生。通过炎症增强巨噬细胞的产生导致CTL-1的过表达,并且似乎与炎症增加相关。降低高水平的膜生物发生可以帮助减少细胞的增大和肥胖相关的变化。图35显示了响应于用纳米颗粒溶液处理的CTL1基因表达变化的评估。通过在琼脂糖凝胶上分离PCR产物进行定量,溴化乙啶染色使条带可视化。在野生型小鼠中,CTL-1转录本的水平在对NP处理的响应中没有变化。相反,在NP处理的ETK0小鼠中CTL1表达水平显著降低。数值是每组4-5只小鼠的平均值 $\pm$ SEM。

[0894] PSS 2 (CDP-二酰基甘油-丝氨酸O-磷脂酰转移酶2;磷脂酰丝氨酸合酶2) 是一种参与磷脂酰丝氨酸生物合成的酶。该蛋白定位于线粒体中。PSS 2敲除小鼠显示出正常的寿命。图36显示了响应于用纳米颗粒溶液处理的PSS 2基因表达变化的评估。通过在琼脂糖凝胶上分离PCR产物进行定量,并且溴化乙啶染色使条带可视化。在野生型小鼠中,PSS 2转录本的水平在对NP处理的响应中没有变化;但在ETK0小鼠中观察到低但显著的降低。数值是每组4-5只小鼠的平均值 $\pm$ SEM。

[0895] 水果、果汁和果粉的功能(抗氧化、抗炎)和疾病预防性质归因于这些水果中存在各种成分,例如花青素、酚类成分、维生素C等。然而,由于其性质,花青素不能有效地被人体吸收。此外,花青素在通过胃肠系统的转运过程中进行结构重排。肠中的碱性条件导致花青素的环断裂。与纳米颗粒复合的花青素可以更容易地转运穿过肠表皮并且可以潜在地在体内释放花青素。内化的花青素可能会改变基因表达,从而有利于(通过清除ROS)作为抗氧化剂来减少炎症,并通过下调涉及蛋白质(TNF α 、STAT、白细胞介素及其受体)以及调节和参与代谢途径的效应酶的炎症途径来改变基因表达。

[0896] 这些结果证明了用纳米颗粒处理和减少肥胖症的直接效果。支持效果包括甘油三酯肝脏的减少、肝脏病理的减少(脂滴的减少)、肝功能标志物酶如ALT和AST的减少、体重的显著减少(4周内 $>10\%$)、炎症促进基因表达的下调等。慢性退行性疾病的减少与水果和蔬

菜消耗的增加有关。由于功能性成分的可用性取决于各种产品(包括水果、蔬菜、坚果、香料等)的消费,这些研究至少部分旨在通过单一浓缩高效剂量提供这种成分组合,以及在~2.5 mg/kg体重的日剂量下观察到在减少炎症标志物和预防体重增加方面的有效性(小鼠试验)。例如,将此数据对人类的预测表明,对于体重为70 kg的人而言,每日剂量~175 mg。

[0897] 实施例3-纳米纤维的功能和应用

[0898] 纳米纤维(和纳米颗粒)作为递送媒介物,以及来自酸樱桃(*Prunus cerasus* L.)水果的纳米颗粒和纳米纤维对结肠直肠癌细胞的细胞毒性

[0899] 材料和方法:

[0900] 酸樱桃:本实施例中使用的酸樱桃水果来自安大略省瓦恩兰的葡萄基地研究工作站(Vineland Research Station),其中这些水果作为种质保存。所有品种均为高多酚品种,多酚含量范围为300-500 mg/100 g鲜重。本研究的主要品种为V 70151,其他品种如V 71261, Hymann Conserva和Hymann Rubisn也显示出高水平的纳米颗粒形成。

[0901] 纳米颗粒和纳米纤维的分离:提取方法包括使用polytron均质化器和PTA 10探针在培养基(优选水,可以使用无水或稀释的甲醇或乙醇/水)中以1:1 w/w的比例(1 g组织比1 ml水或乙醇/水)在中间设置(4-5)下均质化水果,直至水果组织完全均质化。通过4层纱布过滤匀浆物以去除碎片。将所得匀浆物在Sorvall RC 6 Plus离心机中离心(18,000x g) 20 min。倒出上清液。将5 ml上清液在4℃下用水(1 L)透析(spectra-Por, 6-8kD截留) 12 h。透析袋内透析提取物与上清液(称为粗提取物)一样冷冻保存于-20℃。浸出到水中的多酚被大量稀释,因此,出于实验目的,将其通过sep-pakC 18柱,并且用甲醇洗脱,通过疏水相互作用色谱法浓缩。

[0902] 多酚评估和分析:如在我们的实验室中常规进行的,通过Folin-Ciocalteu方法评估多酚(Jacob和Paliyath, 2008)。用50% (v/v) 乙醇水溶液将合适等分的提取物稀释至终体积为100 μ l。向混合溶液中加入蒸馏水(0.5 ml)和50 μ l亚叶酸钙试剂(μ M)。将碳酸钠(100 μ l 5% (w/v))加入到每个样品中,通过涡旋混合,并且在黑暗中孵育1 h。在充分混合样品之后,使用贝克曼库尔特DU 800分光光度计(美国,贝克曼库尔特公司)在 $\lambda_{\max}$ = 725 nm下测量吸光度。用浓度为0-200 μ g/ml的没食子酸产生标准曲线。多酚浓度表示为每克水果鲜重的没食子酸当量。

[0903] 当需要时,使用Sep-PakC 18色谱纯化和浓缩多酚。通常,将提取物的1-2 mg多酚当量上样到1 ml柱体上,用1-2 ml水洗涤,并且用100%甲醇洗脱多酚。在45℃下在氮气流中去除甲醇。在去除甲醇后,将得到的干燥多酚溶解在甲醇(用于HPLC-MS)中用于分析或水中用于抗氧化剂测定和细胞培养研究,并再溶解在水中。

[0904] 使用Agilent 1100系列HPLC-MS对从粗提取物、透析提取物和透析液级分中分离出的花青素进行HPLC-MS分析。使用X-Terra® MS C-18柱(5 μ m, 150×3.0 mm, 美国, 马萨诸塞州, 沃特世公司)进行分离。用甲醇(溶剂A)和2.0% (v/v) 甲酸(溶剂B)的梯度以0.8 ml/min的流速洗脱花青素。使用的梯度如下:0-2 min, 93 % B; 2-30 min, 80% B; 30-45 min, 70% B; 45-50 min; 65 % B, 50-60 min, 50% B; 60-65 min, 20% B; 65-70 min, 93% B。在520 nm处检测花青素并在260 nm处检测酚酸。用API-ES质谱仪进行电喷雾电离(ESI)。氮气在350℃下以12 l/min的流速用作雾化和干燥气体;离子喷雾电压4000 V, 碎裂器电压80 V。产生的离子从m/z 150-700扫描。以正离子和负离子模式获得光谱。所有样品使用20 μ l (20

μg) 的样品进样体积。通过将 LC-ESI-MS 获得的分子离子 (m/z) 与文献数据 (www.metabolomics.jp) 进行匹配,实现了化合物的结构鉴定。分析了三个独立的样品,成分的数量表示为每克组织等效鲜重的平均值 $\pm$ SEM。

[0905] 抗氧化能力的评价:

[0906] 通过在体外测定条件下评估清除超氧阴离子自由基、羟基阴离子自由基和 DPPH 自由基的效率来进行抗氧化性能(清除活性氧物质或活性自由基的能力)(Jacob 和 Paliyath, 2008)。清除这些基团的效率由具体淬灭速率表示。

[0907] 细胞培养:使用来自结肠的三种细胞系,正常细胞系 CRL 1790、结肠直肠癌细胞系 HT 29 和多药抗性结肠直肠癌细胞系(ATCC) CRL 2158 a 来评价纳米复合物的细胞毒性。在特别推荐用于每种细胞系的培养基中培养细胞。对于 HT 29,使用的培养基是 DMEM (Dulbecco 改良的 Eagle's 培养基, Sigma), 对于 CRL 2158,使用的培养基是 RPMI, 且对于 CRL 1790,使用的培养基是 EMEM (Eagle 最低必需培养基;加拿大安大略省伯灵顿柏林实验室)。所有培养基均添加 FBS、青霉素/链霉素和 L-谷氨酰胺。在汇合($\sim 80\%$)时,用 $1 \times \text{PBS}$ 洗涤细胞两次。将细胞与胰蛋白酶-EDTA 孵育 5 min,然后在补充有 10% FBS 的相应培养基中稀释,之后用台盼蓝 ($50 \mu\text{l}$ 细胞和 $450 \mu\text{l}$ 台盼蓝)染色并计数活细胞以评价细胞毒性。通过活细胞的台盼蓝排除和死细胞的蓝色染色来测定细胞毒性。计数单位面积中的死细胞数目,并表示为面积中总细胞的百分比。

[0908] 共聚焦研究:将 2×10^5 个细胞铺在细胞培养皿 ($35 \text{ mm} \times 10 \text{ mm}$) 上,并且每两天更换培养基直到板达到汇合。用合适的试剂染色后,在共聚焦显微镜下检查细胞。发现 Dylight 650 (激发波长为 650 nm 且发射波长为 700 nm, Thermo Scientific Pierce 生物制品公司)在吸收实验期间具有卓越的性能和稳定性。将含有纳米复合物 (4 mg) 的透析提取物的冻干粉与溶解在二甲基甲酰胺中的 Dylight 650 酯的 $10 \mu\text{M}$ 溶液混合,并在 25°C 孵育 1 h 用于缀合。反应后,使用 6-8 kD 透析膜将混合物对水 (pH) 透析,直至完全去除游离试剂。通过监测透析的纳米复合物的荧光来评估 Dylight 与纳米复合物的结合。

[0909] HT 29、CRL 1790 细胞中的钙黄绿素摄取:将负载钙黄绿素的纳米颗粒摄取到哺乳动物细胞中。钙黄绿素自身通过膜是不可渗透的,并且可以通过胞吞作用以低水平被吸收。乙醇漂白的樱桃在水中均质化,也含有 1 mg/g 鲜重当量的钙黄绿素,且上清液用水透析。与纳米丝复合的钙黄绿素保留在透析袋内,并用于通过共聚焦显微术进行吸收测量。负载钙黄绿素的纳米颗粒被吸收到 HT 29 和 CRL 1790 细胞中的离散区室中。

[0910] Dylight 与纳米复合物和纳米丝的缀合及其在 HT 29、CRL 1790 和 CRL 2158 细胞中的吸收:展示了从未漂白的酸樱桃中分离的纳米复合物和从乙醇漂白的酸樱桃中分离的纳米丝摄取到哺乳动物细胞 (HT-29、CRL 2158、CRL 1790) 中。将纳米复合物和纳米丝与 Dylight 650 缀合,并在水中进行大范围透析 (3x) 以去除未结合的染料。接种细胞并使其生长 48 h。将缀合的纳米复合物和长米 (3 ml 培养基中 $\sim 5 \mu\text{M}$ Dylight 当量) 加入到培养基中,并将细胞再孵育 24 h。将细胞维持在培替氏平皿 (直径 3.5 cm) 上,并在共焦显微镜 (Leica) 下观察,激发波长为 633 nm 且发射波长为 680 nm。版面 A 和 B 分别显示了 Dylight 缀合的纳米复合物和纳米丝被 HT 29 细胞摄取;版面 C 和 D 分别显示了 Dylight 缀合的纳米复合物和纳米丝被 CRL 2158 细胞摄取;以及版面 E 和 F 分别显示了 CRL 1790 细胞对缀合的纳米复合物的摄取。版面中的插图是细胞的放大的合成图像。(比例尺)

[0911] 活-死细胞分析:如前所描述,细胞以汇合和亚汇合单层生长24 h(Hakimuddin等人,2005)。将细胞用紫杉醇或紫杉醇连同纳米纤维一起处理12 h(将适量的紫杉醇和纳米纤维在5% DMSO的水溶液中混合,并再次加入到细胞中)。如制造商所描述,用磷酸盐缓冲液洗涤细胞,并使用活/死细胞活力试剂盒(安大略省,米西索加,Invitrogen)在CRL 1790、CRL 2158和HT 29细胞上进行细胞活力测试。在共聚焦显微镜下观察活-死细胞。测定试剂盒含有两种荧光染料,即钙黄绿素AM酯(Ex 494 nm,Em 517 nm),其特异性地进入活细胞,去酯化并且将活细胞染成绿色。垂死细胞以及死细胞是膜受损的(泄漏的质膜)并且允许乙锭均二聚体(Ex 517 nm/Em 617)进入,将细胞核染成红色。在分化活细胞的 517 nm(绿色通道)和使死细胞可视化的 617 nm 处观察细胞。两种波长的合成图像显示细胞正在向细胞活力丧失过渡。

[0912] 在本实施例中,通过在小瓶中将(50% DMSO中)紫杉醇的10 x溶液与适量的纳米纤维混合,将纳米纤维与紫杉醇偶联。在无菌条件下将适当的量分配到培养板中。

[0913] 从酸樱桃水果中分离出通过自发组装形成的具有球形或纤维状性质的纳米颗粒或纳米纤维。评价了主要由碳水化合物、蛋白质和多酚(纳米颗粒)构成的这些纳米颗粒/纳米纤维的功能性质,并探讨了它们的差异。富含纳米颗粒的酸樱桃提取物级分显示出强的抗氧化活性以及增加的针对HT 29结肠直肠癌细胞的细胞毒性,而在测试的条件下,来自乙醇漂白的不含多酚的樱桃的纳米纤维在这方面是无活性的。纳米颗粒和纳米纤维均被正常结肠细胞和癌细胞内化。细胞毒性分析表明,在存在或不存在纳米纤维的情况下,用紫杉醇处理的HT-29细胞产生高水平的细胞毒性。尽管多重耐药性结肠直肠癌细胞对紫杉醇处理具有耐药性,但在纳米纤维存在下,该处理导致几乎完全的细胞毒性。在相似的处理条件下,在紫杉醇或混合有纳米纤维的紫杉醇存在下,正常结肠细胞显示出非常小的细胞毒性。这些结果表明纳米纤维可以是用于例如在癌细胞和多药抗性癌细胞中内化药物和诱导细胞毒性的有效工具。

[0914] 当用这些缀合的颗粒处理哺乳动物细胞时,与Dylight 650缀合的纳米颗粒以及纳米纤维位于离散但相似的细胞器中,表明缀合至纳米颗粒或纳米纤维的组分可以具有相似的被吸收的机会和以相似方式积累的机会。预计当纳米颗粒或纳米纤维与其他药物、营养制剂或其他生物活性剂(而不是Dylight)结合时,Dylight的这些结果可以外推到应用中。

[0915] 抗氧化能力的评价:通过在体外测定条件下评估清除超氧阴离子自由基、羟基阴离子自由基和DPPH自由基的效率来进行抗氧化性能(清除活性氧物质或活性自由基的能力)(Jacob和Paliyath,2008)。清除这些基团的效率由具体淬灭速率表示。

[0916] 结果和讨论:

[0917] 纳米颗粒和纳米纤维的形态:从原始酸樱桃水果和乙醇漂白的酸樱桃水果中分离的纳米颗粒和纳米纤维显示出不同的特性(参见实施例1和3,以及图1和17(纳米颗粒)和图37(纳米纤维)。来自原始樱桃提取物的纳米颗粒的形态为球形。详细分析显示,在某些实施方式中,球形复合物可以由果胶核形成,该果胶核被纤维状结构包围,该纤维状结构包含果胶组分、半纤维素衍生分子、来源于细胞壁蛋白的肽、花青素和苹果酸。这些复合物在溶液中的直径为50-250 nm。在乙醇漂白酸樱桃水果之后,当去除花青素和其他小分子(即,在某些实施方式中为苹果酸)时,所得水果在均质化过程中形成纤维状结构,其长度为数微米,

直径为5-10 nm(参见图37)。纳米颗粒和纳米纤维均用于评价它们的功能性质。

[0918] 纳米颗粒中的多酚含量:从含有高水平多酚的酸樱桃良种系中获得樱桃匀浆物。在不同樱桃品种的提取过程中,在水提取物中,匀浆物含有0.88-0.94 mg/g鲜重的多酚,而在甲醇提取物中,多酚含量范围为1.04-1.13 mg/g鲜重(参见实施例1,表1)。将在水或酒精(甲醇,最终浓度约为 50% v/v)中制备的酸樱桃匀浆物进行水透析,导致透析袋中近80%的多酚以复合状态保留(参见实施例1,表1)。用甲醇提取水果将粗提物中的多酚含量增加了近20%,然而透析提取物中剩余的量与水提取物透析后获得的相当。从透析袋中移出的游离多酚(M_r 截留6000-8000)进入透析液的量非常低(低于3%)通常,在多次提取中,水性提取物中透析提取物的多酚含量为0.63-0.65 mg/g鲜重,而在甲醇提取物的透析提取物中,多酚含量为0.70-0.80 mg/g鲜重。透析液中的多酚含量非常低,水溶液和甲醇提取物中分别为0.03-0.06 mg/g鲜重。

[0919] 通过HPLC-MS(参见实施例1,表2)和组分分析透析提取物和透析液的多酚组成。多酚构成了主要比例的酚类组分(>90%)和次要比例的酚酸(<10%)。花青素-3-芸香糖苷是主要的花青素(~70%),其次是芍药素-3-芸香糖苷。天竺葵素-3-芸香糖苷和花青素-3-槐糖苷的含量为~10-12%。绿原酸和对香豆酰奎尼酸是主要的酚酸。透析液的质量组成与透析液相似。就数量而言,透析提取物含有较高含量的花青素-3-芸香糖苷(高~25-30%),通过形成纳米颗粒显示出特异性富集。

[0920] 游离和复合多酚的抗氧化能力:测定水和甲醇提取物的粗提取物、透析提取物和透析液的抗氧化活性。超氧化物、羟基自由基和DPPH自由基的具体淬灭如实施例1,表3中所示。樱桃的水或甲醇粗提物具有很强的超氧化物、羟基自由基和DPPH清除能力。尽管多酚是纳米颗粒的一部分,但仍表现出较高的抗氧化活性,比透析液中的游离多酚高得多,表明复合物的形成不妨碍多酚的抗氧化活性。因此,基于这些结果,含有多酚的纳米颗粒穿过GIT膜的身体组织中不太可能会降低它们的抗氧化功能。

[0921] 在本实施例中,进行实验以研究纳米纤维(和纳米颗粒)的细胞摄取,并研究纳米纤维(和纳米颗粒)作为各种货物的递送载体的应用。图37示出了纳米纤维的实例,代表在这些实验中使用的。图37显示了来自2种独立纳米纤维制剂的纳米纤维的透射电子显微照片(TEM)。左版面显示了使用冷冻干燥(冻干法)从乙醇漂白的酸樱桃中分离的纳米纤维。右版面显示了通过纳米喷雾干燥分离的纳米纤维。如下面进一步详细描述,诸如这些的纳米纤维用于研究细胞摄取和作为递送载体的应用。

[0922] 进行研究以探讨用于运载矿物货物例如铁的纳米纤维的应用。图38显示了与铁形成的纳米纤维复合物。将纳米纤维制剂(2 mg)溶解在2 ml水中并与1 mM氯化亚铁混合。将该溶液孵育2 h,并用水(2X)透析过夜以去除未结合的铁。在电子显微镜下检查透析液,没有乙酸双氧铀染色。纳米纤维复合物用铁(而不是乙酸双氧铀)染色,显示了纳米纤维作为铁载体的潜力。

[0923] 还进行了研究以探讨纳米纤维作为感兴趣的货物的递送媒介物的用途,其中货物与纳米纤维非共价复合。在本研究中,纳米纤维用于细胞递送钙黄绿素。图39显示了哺乳动物细胞中负载钙黄绿素的纳米纤维的摄取(钙黄绿素-纳米纤维加合物)。钙黄绿素(E_x 494 nm/ E_m 517 nm)自身通过膜是不可渗透的,并且可以通过胞吞作用以低水平被吸收(图39, A、C)。乙醇漂白的樱桃在水中均质化,也含有1 mg/g鲜重当量的钙黄绿素,且上清液用水透

析。与纳米纤维复合的钙黄绿素保留在透析袋内,并用于通过共聚焦显微术进行吸收测量。HT 29细胞(版面A)和正常人肠道细胞(版面C)中单独的钙黄绿素的摄取相对非常低。负载钙黄绿素的纳米纤维更有效地吸收到结肠直肠癌细胞系HT 29(B)和正常人肠CRL 1790(D)细胞中的离散区室中。(比例尺-10 μm)。

[0924] 纳米颗粒和纳米纤维对癌细胞的细胞毒性:这些研究使用正常人结肠上皮细胞(CRL 1790)、人结肠直肠癌细胞(HT 29)和多药耐药人结肠直肠癌细胞(CRL 2158)在存在或不存在紫杉醇的情况下评估从酸樱桃中分离的纯化纳米颗粒和纳米纤维的细胞毒性作用。纳米颗粒作为多酚当量等分试样加入,而纳米纤维基于重量加入。使细胞增殖48 h,每个培替氏平皿用紫杉醇(32 nM)和4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 纳米纤维处理,通过台盼蓝排除法评价细胞毒性。处理的效果在下表中以在处理不同时间后存活细胞的百分比给出。

[0925] 表5:纳米颗粒和纳米纤维的细胞毒性数值为三次重复的平均值。重复至重复的变化一般在1-2%之间。在用钙黄绿素/乙锭均二聚物(calceinAM/Ethidium homodimer)染色后,通过对来自4-6个随机帧的活/死细胞进行计数来获得处理B中的数据。

[0926] A-处理 活细胞%

[0927] 正常细胞系

[0928] CRL 1790活细胞%

[0929] 结肠直肠癌细胞系HT 29活细胞%

[0930] 结肠直肠MDR细胞系CRL 2158

[0931] 纳米颗粒($\mu\text{g}/\text{ml}$)

[0932] 0

[0933] 5

[0934] 20

[0935] 80

[0936] 100

[0937] 87.58

[0938] 81.50

[0939] 72.54

[0940] 100

[0941] 75.64

[0942] 66.02

[0943] 58.33

[0944] 100

[0945] 89.65

[0946] 83.44

[0947] 74.48

[0948] 纳米纤维

[0949] 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$

[0950] 99-100

[0951] 98-100

[0952]	100
[0953]	紫杉醇 (nM)
[0954]	0
[0955]	2
[0956]	8
[0957]	32
[0958]	100
[0959]	86.66
[0960]	74.28
[0961]	66.79
[0962]	100
[0963]	70.93
[0964]	59.11
[0965]	48.27
[0966]	100
[0967]	90.86
[0968]	86.17
[0969]	83.76
[0970]	B-活/死细胞分析
[0971]	-紫杉醇-纤维100100100
[0972]	紫杉醇32 nM,24 h97.610.7846.00
[0973]	紫杉醇+纳米纤维(4 $\mu\text{g}/\text{ml}$)117.310.574.2

[0974] 纳米颗粒本身对细胞显示出轻微的毒性(上表所示)。HT 29对纳米颗粒最敏感,而正常CRL 1790细胞受影响最小。在80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的多酚浓度下,多药抗性细胞系CRL 2158显示存活细胞减少近25%。在正常细胞中也观察到相似程度的易感性。以80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 多酚处理的HT 29细胞显示存活细胞减少近42%。在使用的浓度(4 $\mu\text{g}/\text{ml}$)下,纳米纤维对任何细胞系没有细胞毒性。当混合纳米颗粒和纳米纤维时,在80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 多酚浓度下,HT 29和MDR细胞系的细胞毒性略有增加。紫杉醇本身对HT 29细胞具有细胞毒性(在32 nM下存活50%),而正常细胞和MDR细胞显示低水平的细胞毒性(上表所示)。当纳米颗粒与紫杉醇一起被包括时,在测试条件下细胞毒性没有很大程度的改变。当紫杉醇和纳米纤维一起添加时,在32 nM紫杉醇时,MDR细胞的细胞毒性增加到近50%。HT 29细胞对单独的紫杉醇显示高水平的细胞毒性,而紫杉醇和纳米纤维的组合在测试条件下不改变细胞的存活率。

[0975] 纳米纤维对复合分子的摄取:纳米纤维极长(例如参见图37,长度为数微米,直径为~5 nm;),并探讨了它们穿过质膜的能力。在本实验中,研究了纳米纤维与膜不渗透荧光染料钙黄绿素形成天然复合物的能力。通过上述步骤由乙醇漂白的樱桃制备纳米纤维。在均质化的同时,将1 mg/g鲜重当量的钙黄绿素与樱桃混合。在均质化和去除碎片后,将匀浆物用水透析(3x)直至透析液不显示荧光。同时,透析袋内的提取物显示出高度的荧光性。将HT-29和CRL-1790细胞在单独的钙黄绿素和钙黄绿素复合的纳米纤维(具有相等的荧光强度)存在下孵育。通过共聚焦显微镜监测钙黄绿素和与纳米纤维复合的钙黄绿素的摄取。结

果如图39所示。版面A和B分别显示了HT 29细胞中未复合的钙黄绿素和纳米纤维复合的钙黄绿素的摄取。从图中可以看出,与纳米纤维复合的钙黄绿素优先被细胞吸收(版面B),并且这些似乎定位于囊泡结构中。观察到钙黄绿素的吸收大大降低,因为钙黄绿素是相对不渗透膜的分子。虽然大部分荧光位于HT 29细胞靠近质膜的区域,但在与钙黄绿素-纳米纤维复合物孵育的CRL 1790细胞中摄取更强烈(版面D)。此外,细胞内可见钙黄绿素荧光分布。CRL 1790细胞对钙黄绿素的摄取极低。使用纳米颗粒也进行了类似的实验,然而,由于多酚对荧光的淬灭,未实现图像的成功获取。如下文进一步研究的,预期本文所描述的纳米颗粒可有效地吸收钙黄绿素(或药物/补充剂性质的任何其他分子)。

[0976] 纳米颗粒和纳米纤维对缀合的Dylight 650的摄取:进行另外的研究以探讨纳米纤维(和纳米颗粒)作为感兴趣的货物的递送媒介物的用途,其中货物与纳米纤维(或纳米颗粒)共价复合。在本研究中,纳米纤维(和纳米颗粒)用于Dylight 650的细胞递送。为了进一步评价纳米颗粒和纳米纤维进入细胞的能力,这些分别从未漂白的樱桃和乙醇漂白的樱桃中分离出来,并与荧光染料 Dylight 650(激发波长650 nm,发射波长670 nm)进行化学缀合。使HT 29、CRL 2158和CRL 1790细胞生长并与染料溶液一起孵育,并在共聚焦显微镜下检查(图40)。

[0977] 与染料缀合的纳米颗粒和纳米纤维在孵育过程中都被细胞吸收,并且在细胞质和细胞核周围的囊泡结构中被清晰可见的区室化。图40中版面A和B分别显示了HT 29细胞对纳米颗粒和纳米纤维的摄取。两种缀合物均被插图(细胞放视图)中显示的细胞吸收。与缀合的纳米颗粒(C)和纳米纤维(D)一起孵育的多药抗性CRL 2158细胞显示出与HT-29细胞显示的同等的摄取,在与纳米颗粒一起孵育的细胞中相对强度可能更高(版面C)。插图显示了细胞的合成图像的放大视图,再次显示了纳米颗粒在细胞核周围的细胞器中的积累。根据视觉强度判断,CRL 1790细胞显示出对纳米颗粒(E)的摄取比纳米纤维(F)高得多。这些结果表明,从未漂白和漂白的樱桃中分离的纳米颗粒和纳米纤维能够穿过细胞膜并在特定细胞器中积累。

[0978] 图40展示了从未漂白的酸樱桃中分离的纳米颗粒(A、C、E)和从乙醇漂白的酸樱桃中分离的纳米纤维(B、D、F)被吸收到人类细胞(HT-29、CRL 2158、CRL1790)中。纳米颗粒和纳米纤维与Dylight 650化学缀合,并在水中进行大范围透析(3x)以去除未结合的染料。接种细胞并使其生长48 h。将缀合的纳米颗粒和纳米纤维(3ml 培养基中~5 μ M Dylight当量)加入到培养基中,并将细胞再孵育24 h。将细胞维持在培替氏平皿(直径3.5 cm)上,并在共焦显微镜(Leica)下观察,激发波长为633 nm且发射波长为680 nm。版面A和B分别显示了HT 29细胞(结肠直肠癌细胞系)对Dylight缀合的纳米颗粒和纳米纤维的摄取;版面C和D分别显示了CRL 2158细胞(MDR结肠直肠癌细胞系)对Dylight缀合的纳米颗粒和纳米纤维的摄取;以及版面E和F分别显示了CRL 1790细胞(正常人肠细胞)对缀合的纳米颗粒的摄取。版面中的插图是细胞的放大的合成图像。(比例尺-10 μ m);

[0979] 通过活-死细胞分析区分细胞毒性:进行进一步的研究以探讨使用纳米纤维将紫杉醇递送到各种细胞系中。为了进一步评估纳米纤维增强紫杉醇细胞毒性的效率,进行了活-死细胞分析。培养正常细胞(CRL 1790)、癌细胞(HT-29)和MDR细胞(CRL 2158)并暴露于单独的紫杉醇以及紫杉醇连同纳米纤维。将细胞培养24 h,此时向培养物中加入紫杉醇和纳米纤维。暴露于药物24 h后进行活-死细胞分析。结果如图41-43所示。图41显示了纳米

纤维-紫杉醇对人结肠直肠癌细胞 (HT 29) 的细胞毒性。显示了在共聚焦显微镜下观察的 HT 29 结肠直肠癌细胞的活-死细胞分析。测定试剂盒 (Invitrogen) 含有两种荧光染料, 钙黄绿素 AM 酯 (Ex 494 nm, Em 517 nm), 其特异性地进入活细胞, 去酯化并且将活细胞染成绿色。垂死细胞以及死细胞是膜受损的 (泄漏的质膜) 并且允许乙锭均二聚体 (Ex 517 nm/Em 617) 进入, 将细胞核染成红色。在分化活细胞的 517 nm (绿色通道) 和使死细胞可视化的 617 nm 处观察细胞。两种波长的合成图像显示细胞正在向细胞活力丧失过渡 (A, D, G; 黄色)。版面 B、C 分别表示在 617 nm (红色, 死细胞) 和 517 nm (绿色, 活细胞) 处观察的对照细胞。版面 A 是未处理细胞的合成图像。版面 E、F 表示分别在两种波长 617 和 517 nm 处记录的用紫杉醇 (32 nM) 处理的细胞的图像。版面 D 是合成图像。版面 H 和 I 显示了用紫杉醇+纳米纤维 (32 nM+4 μ g/ml 纳米纤维, 将纤维和适量的紫杉醇混合在 5%DMSO 中, 并加入到细胞的培养基中, 然后孵育 1 h) 处理的细胞。版面 G 是红色和绿色图像的合成。这些结果表明使用纳米纤维将紫杉醇 (与纳米纤维复合, 未缀合) 递送至细胞, 这在例如 MDR 细胞中特产生了特别的细胞毒性。紫杉醇单独取得了效果, 但仅限于 HT 29 癌细胞系, 而不是 MDR。纳米纤维在 MDR 中具有更好的效果。如在使用钙黄绿素和 DyLight 的较早实例中所支持的, 预期纳米颗粒在吸收一种或多种药物 (或药物/补充剂性质的任何其他分子) 方面可能同样有效。

[0980] 图 42 显示了纳米纤维-紫杉醇对人结直肠 MDR 癌细胞 (CRL 2158) 的细胞毒性。显示了在共聚焦显微镜下观察的 CRL 2158 多药抗性结肠癌细胞的活-死细胞分析。测定试剂盒 (Invitrogen) 含有两种荧光染料, 即钙黄绿素 AM 酯 (Ex 494 nm, Em 517 nm), 其特异性地进入活细胞, 去酯化并且将活细胞染成绿色。垂死细胞以及死细胞是膜受损的 (泄漏的质膜) 并且允许乙锭均二聚体 (Ex 517 nm/Em 617) 进入, 将细胞核染成红色。在分化活细胞的 517 nm (绿色通道) 和使死细胞可视化的 617 nm 处观察细胞。两种波长的合成图像显示细胞正在向细胞活力丧失过渡 (A, D, G; 黄色)。版面 B、C 分别表示在 617 nm (红色, 死细胞) 和 517 nm (绿色, 活细胞) 处观察的对照细胞。版面 A 是未处理细胞的合成图像。版面 E、F 表示分别在两种波长 617 和 517 nm 处记录的用紫杉醇 (32 nM) 处理的细胞的图像。版面 D 是合成图像。版面 H 和 I 显示了用紫杉醇+纳米纤维 (32 nM+4 μ g/ml 纳米纤维) 处理的细胞。版面 G 是红色和绿色图像的合成。

[0981] 图 43 显示了纳米纤维-紫杉醇对正常人肠细胞 (CRL 1790 TM) 的细胞毒性。显示了在共聚焦显微镜下观察的 CRL 1790 人结肠正常上皮细胞的活-死细胞分析。测定试剂盒 (Invitrogen) 含有两种荧光染料, 即钙黄绿素 AM 酯 (Ex 494 nm, Em 517 nm), 其特异性地进入活细胞, 去酯化并且将活细胞染成绿色。垂死细胞以及死细胞是膜受损的 (泄漏的质膜) 并且允许乙锭均二聚体 (Ex 517 nm/Em 617) 进入, 将细胞核染成红色。在分化活细胞的 517 nm (绿色通道) 和使死细胞可视化的 617 nm 处观察细胞。两种波长的合成图像显示细胞正在向细胞活力丧失过渡 (A, D, G; 黄色)。版面 B、C 分别表示在 617 nm (红色, 死细胞) 和 517 nm (绿色, 活细胞) 处观察的对照细胞。版面 A 是未处理细胞的合成图像。版面 E、F 表示分别在两种波长 617 和 517 nm 处记录的用紫杉醇 (32 nM) 处理的细胞的图像。版面 D 是合成图像。版面 H 和 I 显示了用紫杉醇+纳米纤维 (32 nM+4 μ g/ml 纳米纤维) 处理的细胞。版面 G 是红色和绿色图像的合成。

[0982] 这些结果提供了使用纳米纤维 (和潜在的纳米颗粒) 将药物递送到细胞中的信息。在本实施例中, 使用癌细胞模型 HT 29 (其为结肠直肠癌细胞系) 和多药抗性结肠直肠癌细

胞系CRL 2158来研究纳米纤维复合的紫杉醇的功效。在HT 29细胞中,单独紫杉醇和紫杉醇与纳米纤维复合的细胞毒性作用几乎相同。该细胞系是非多药抗性的,对单独紫杉醇的细胞毒性敏感。这些细胞也对纳米纤维复合的紫杉醇作出反应,表明药物从细胞内的复合物中释放,而不被纳米纤维保留。多药抗性发展是癌症化疗的主要问题,其中细胞主动抽出药物,从而消除细胞毒性。在CRL 2158的情况下,通过其对紫杉醇处理的抗性揭示了多药抗性能力。然而,通过与纳米纤维复合克服了多药抗性,其中近100%的MDR细胞显示出细胞毒性。因此,与纳米纤维复合可提供一种对抗多药抗性细胞的途径。有趣的是,在紫杉醇的使用浓度下,正常肠细胞(CRL 1790)对单独的紫杉醇或紫杉醇-纳米纤维复合物没有显示出细胞毒性,表明这种处理对细胞的安全性。

[0983] 有趣的是,在不存在或存在紫杉醇的情况下,甚至在用纳米纤维处理时,难以在正常结肠细胞(CRL 1790)中发现细胞毒性(图43,版面A-I)。这些细胞在紫杉醇(版面D、E、F)或紫杉醇和纳米纤维(版面G、H、I)存在下保持它们的形态,并且没有观察到膜完整性的损失。

[0984] 在本实施例的上表中给出了在存在或不存在紫杉醇以及紫杉醇和纳米纤维的情况下,细胞培养期间CRL 1790、HT 29和CRL 2158中活细胞的定量估算。正常细胞系对单独或在纳米纤维存在下提供的32 nM紫杉醇没有显示出任何细胞毒性。HT 29细胞显示了对紫杉醇以及紫杉醇和纳米纤维一起提供的高水平细胞毒性。CRL 2158细胞在单独提供时对紫杉醇表现出一定程度的抗性(~50%的存活率),而在纳米纤维存在的情况下,存活率降低至4%。活-死细胞分析是在用各种组分处理期间测定细胞存活的更准确的方式。

[0985] 上述结果提供了关于使用纳米纤维(和潜在的通过延伸的纳米颗粒)将药物递送到细胞中的见解。在本实施例中,使用癌细胞模型HT 29(其为结肠直肠癌细胞系)和多药抗性结肠直肠癌细胞系CRL 2158来研究纳米纤维复合的紫杉醇的功效。在HT 29细胞中,单独紫杉醇和紫杉醇与纳米纤维复合的细胞毒性作用几乎相同。该细胞系是非多药抗性的,对单独紫杉醇的细胞毒性敏感。这些细胞也对纳米纤维复合的紫杉醇作出反应,表明药物从细胞内的复合物中释放,而不被纳米纤维保留。多药抗性发展是癌症化疗的主要问题,其中细胞主动抽出药物,从而消除细胞毒性。在CRL 2158的情况下,通过其对紫杉醇处理的抗性揭示了多药抗性能力。然而,通过与纳米纤维复合克服了多药抗性,其中近100%的MDR细胞显示出细胞毒性。因此,与纳米纤维复合提供了对抗多药抗性细胞的途径。有趣的是,在紫杉醇的使用浓度下,正常肠细胞(CRL 1790)对单独的紫杉醇或紫杉醇-纳米纤维复合物没有显示出细胞毒性,表明这种处理对细胞的安全性。

[0986] 讨论:

[0987] 评估了在酸樱桃水果均质化过程中通过细胞组分自组装形成的纳米颗粒和纳米纤维的组成和结构特征,这些细胞组分包括源自细胞壁的细胞组分(纤维素、果胶、蛋白质)和液泡成分(花青素和苹果酸)。纳米颗粒是直径为约50-250 nm的球形复合物,其包含由螺旋纤维状结构缠绕的果胶核。相反,由乙醇漂白的樱桃水果形成的纳米纤维是纤维状的(宽度为约5-10 nm)并且长度为数微米。在这些研究中,从水果中去除花青素和苹果酸以促进纳米纤维形成。因此,根据本发明该方法,花青素含量低的水果可能具有形成纳米纤维的优先趋势。由于纳米颗粒中存在花青素,它们显示出高的抗氧化活性,因此可能是营养相关的结构复合物。在细胞毒性试验中,纳米纤维与抗癌药物复合时表现出更高的活性。本实施例

描述了纳米颗粒和纳米纤维在哺乳动物细胞中的潜在功能作用。

[0988] 食物和药物中的多酚/与药物的相互作用:营养和饮食干预最近已经成为下调各种炎症疾病的潜在的补充策略(Willcox等人,2004)。饮食摄入富含多酚的水果导致在动物模型和人中几种炎症标志物的下调(Gonzalez-Galego等人,2010)。适量饮用果汁以及葡萄和石榴制品可增强抗氧化功能并减少血浆中的脂质过氧化(Garcia-Alonso等人,2006; Jensen等人,2008年)。几项研究的结果表明,水果和蔬菜的摄入量与血液中炎症标志物(如CRP(C反应蛋白)和IL6(白细胞介素6)以及其他几种炎症标志物如CRP、IL-6和TNF α)的表达呈负相关。在120名年龄在40-74岁之间的男性和女性中,摄入富含多酚的蓝莓提取物(300 mg/天,持续3周)导致NF- κ B途径的促炎细胞因子和趋化因子(IL-4、IL-13、IL-8 和 IFN- α)血浆水平显著降低(Karlsen等人,2007)。类似地,增加甜樱桃的消耗量(280 g/天)导致CRP和NO水平降低(Kelley等人,2006)。酸樱桃多酚是环氧合酶的强抑制剂,环氧合酶是一种参与炎症途径的关键酶(Chandra等人,2002)。一项涉及70岁老年男性的研究表明,增加富含抗氧化剂的食物摄入量会降低环氧合酶、细胞因子介导的炎症和氧化应激(Helmersson等人,伦敦,2009)。因此,含多酚的食品具有下调炎症途径的性质,从而预防慢性退行性疾病,如癌症、心血管疾病和神经退行性疾病。

[0989] 已经提出的关于多酚的生物效应的主要问题是认为多酚通过胃肠系统的吸收非常差(0.5%-1.5%)。而且,在从胃到肠的转运期间通过与胰液和胆汁混合使食物碱化,使花青素结构不稳定,导致开环和部分降解。

[0990] 在本实施例中,证明了纳米颗粒(和纳米纤维)被人细胞有效内化。因为花青素稳定在纳米颗粒中,并且可以抵抗pH变化,所以纳米颗粒的内化可以是多酚在GIT中递送的替代形式。因此,含有多酚的纳米颗粒的形成可以提高多酚的生物利用度,因为它们可以绕过空肠中典型的载体介导的吸收,使得它们能够在肠道前部位被吸收。复合物形成还可以帮助将多酚转运至肠的下游区域,例如小肠和结肠的远端部分,在那里它们可以发挥有益作用。在某些实施方式中,预期这些可能涉及抗氧化功能以保护肠组织免受结肠微生物群产生的活性氧物质的影响、调节细胞增殖和/或使得能够形成可提供额外健康益处的代谢物。

[0991] 药物递送、生物纳米颗粒的重要性:利用工程化纳米材料以及从天然存在的生物分子制备的那些材料,在开发医学和健康中基于纳米技术的策略方面已经取得了巨大的进展。通过体内靶向纳米结构和纳米结构缀合物来检测癌症位点是非常有意义的领域,然而,需要更多关于摄取和生物分布机制的信息。纳米结构和它们的缀合物被认为通过多种机制积累,包括内吞作用、非特异性进入、囊泡形成等(Iversia等人,2011)。然而,最近的研究也为特定的摄取机制提供了证据。发现SWNT被特异性地隔离到免疫细胞群Ly6c单核细胞中(Smith等人,2014)。SWNT与靶向肽RGD的缀合进一步增强了纳米结构进入单核细胞。因此,单核细胞通过特洛伊木马机制将SWNT递送到肿瘤部位,从而使近25%的SWNT在靶位点积累。因此,用免疫细胞靶向肿瘤细胞可以为癌症药物递送提供有效的策略。

[0992] 线粒体是决定癌细胞存活或凋亡的重要细胞器。破坏线粒体能量产生是将癌细胞导向细胞凋亡途径的关键步骤。将细胞凋亡诱导肽靶向线粒体对于杀死癌细胞具有重要意义,但是,其局限性包括递送的非特异性和缺乏溶解性。发现通过与磁性核-壳纳米颗粒缀合来增加细胞凋亡诱导、线粒体靶向两亲性尾锚肽(ATAP)向恶性脑和转移性癌细胞的递送是增强化疗功效的有效方式(Shah等人,2014)。通过在小鼠模型的血管内皮细胞中由低分

子量多胺和脂质 (Dahlman等人, 2014) 合成的聚合物纳米结构可以实现递送siRNA以同时沉默在癌细胞中上调的几种基因 (Dahlman等人, 2014)。

[0993] 理化特性 (例如组成、尺寸、表面电荷分布等) 可影响纳米结构的细胞吸收。在最近的一项研究中 (Agarwala等人, 2013) 已经报道, 除了这些特征之外, 纳米结构的形状可以影响它们的摄取。在本研究中, 观察到哺乳动物上皮细胞、内皮细胞和免疫细胞优先内化带负电荷的亲水性盘状纳米结构。具有高纵横比的纳米盘优于具有较低纵横比和棒状纳米结构的纳米盘。即使当球形纳米结构的尺寸减小时, 它们也以较低的效率内化。Cabral等人 (2011) 也报道了纳米结构在肿瘤中的积累也取决于尺寸。纳米结构内化过程可以是复杂的, 包括纳米结构和膜之间的相互作用、细胞粘附和膜变形的能量、以及细胞膜表面的纳米结构浓度。

[0994] 本文所描述的分离自樱桃的纳米颗粒和纳米纤维在结构上是复杂的。纳米颗粒的冻干粉末耐酸 (4M HCl)、耐碱 (1M NaOH)、耐冷冻。纳米颗粒和纳米纤维都与未解离的小分子 (染料、药物等) 形成复合物。药物如紫杉醇也可以与这些结构缀合。紫杉醇是治疗癌症的有效药物。这些研究表明, 当与纳米纤维一起提供给哺乳动物细胞时, 可以提高紫杉醇的有效性。此外, 多药抗性癌细胞 (CRL 2158) 显示了对紫杉醇的抗性。当与纳米纤维一起提供时, 紫杉醇显示了与正常HT 29癌细胞类似的对MDR细胞的细胞毒性。因此, 药物与纳米纤维一起应用可以绕过紫杉醇排斥, 提高其功效。一个令人感兴趣的方面是效率的增加可以由纳米纤维和紫杉醇之间的纯缔合产生。除了与有机分子形成复合物之外, 纳米纤维和纳米颗粒能够与金属如铁、锌、Mg、Se和/或其他金属结合。预期在某些实施方式中, 随着纳米颗粒和纳米纤维更高的内化效率, 可以提高金属离子摄取的效率, 从而减少剂量。

[0995] 本实施例结果表明纳米颗粒和纳米纤维结构具有功能性应用。纳米颗粒本身可以是高效抗氧化剂, 并且可以适用于需要局部抗氧化剂功能的治疗应用。纳米纤维对缀合或复合药物的内化有很强的促进作用。紫杉醇-纳米纤维复合物的内化可以绕过多药耐药性癌症的药物消除能力, 使得它们对癌症药物的敏感性与被简单药物杀死的癌细胞一样。因此, 结果表明纳米颗粒和纳米纤维两者都可能具有提高例如癌症治疗效率的显著潜力。

[0996] 本文详细描述的结果表明, 特定纳米颗粒、纳米纤维和食物粉末的制备可以通过加工 (例如) 成熟水果来实现, 包括均质化, 在此期间处于部分分解状态的细胞壁基质如纤维素、果胶和蛋白质可以自发地组装成例如结构良好的纳米颗粒, 其中包含多酚 (抗氧化剂, 细胞代谢和基因表达的调节剂)、有机酸如苹果酸以及由蛋白水解产生的肽。在其他水果的相似加工过程中形成具有相似结构的纳米颗粒。例如在蓝莓中, 形成的纳米颗粒结构类似于在酸樱桃中形成的纳米颗粒。在本实施例中, 探讨了来自酸樱桃的纳米颗粒和纳米纤维的营养和抗增殖活性。

[0997] 纳米技术在医学、特别是靶向给药领域取得了巨大的进步。尽管工程化纳米材料的使用因毒性和系统无法有效地消除纳米材料而变得复杂 (Maynard, 2006; Lewinski等人, 2008; Kunzman等人, 2011; Yamashita等人, 2011), 使用来源于可在生物系统中容易地降解的生物材料的纳米颗粒可提供靶向药物递送的新途径。

[0998] 在本实施例中, 描述了分离自酸樱桃水果的纳米颗粒 (和纳米纤维) 内化到正常和癌细胞中的能力, 以及当包含花青素或抗癌药物紫杉醇时它们引起细胞毒性的能力。纳米纤维来源于不含花青素的酸樱桃水果。因为纳米纤维的构建组分是来源于食物的组分, 所

以食物分分的药物应用可以被认为比摄入与合成分分缀合的药物时对正常细胞的损伤更小。同样,不希望受理论的束缚,细胞对这些结构的内化表明组分(果胶、肽、花青素、有机酸等)可以具有与GIT不同的进入形式。这种纳米颗粒可以作为花青素吸收的促进剂,所描述花青素作为简单分子吸收非常差,但是在体外条件下显示出很大的抗氧化活性和细胞毒性潜力。

[0999] 实施例4-食物粉末制备、结构和应用的研究

[1000] 食物粉末的制备和结构研究

[1001] 在本实施例中,描述了通过高剪切共混和纳米喷雾干燥由西兰花、酸樱桃、杏仁、大豆和/或姜黄或它们的任何组合的提取物(特别是所有这些组分)制成的功能性食品粉末。与源自各原料组分的单独干燥粉末的共混物相比,该粉末的每个颗粒含有源自以下原料的营养制剂的基本上均匀的共混物(萝卜硫素,吲哚-3-甲醇、多酚、植物甾醇、异黄酮、姜黄素等)。

[1002] 该食物粉末以显示高抗氧化活性的形式提供了成分的高生物利用度,并且通常显示广谱抗炎活性。因此,特别是当与适当的健康生活方式结合使用时,食用食物粉可以提供对发展慢性疾病的保护。

[1003] 人们公认,以推荐水平食用水果和蔬菜,结合积极的健康生活方式,可以减少慢性疾病如肥胖、II型糖尿病、癌症、关节炎等的发展。然而,一般公众食用的水果和蔬菜量不足。由于目前的生活方式,肥胖的发病率有所增加,尤其是儿童肥胖症。为了提高通常在水果和蔬菜中可获得的活性组分的膳食摄入,已经开发了本发明的食物粉末,其具有生物可利用形式的成分。由于多种原因,水果和蔬菜中的营养制剂组分的生物利用度通常较低。使用目前描述的食物粉末,可以增加生物利用度,并由此增强这些组分的功效。

[1004] 本实施例中使用的主要食物组分(及其一些营养剂)包括以下:

[1005] 西兰花——含有营养制剂组分(即营养剂),例如萝卜硫素和吲哚-3-甲醇的前体。两种组分均增强先天抗氧化系统(KEAP-1/NRF2/ARE途径)和参与消除外源物质的2期酶。

[1006] 酸樱桃——酸樱桃含有花青素-3葡萄糖苷/芸香糖苷作为主要多酚。已经表明酸樱桃提取物对关节炎具有很强的抗炎作用。

[1007] 杏仁——杏仁含有必需的不饱和脂肪酸和植物甾醇,可以减少胆固醇的生物合成。它也是维生素E的高来源。

[1008] 豆浆——大豆是异黄酮和蛋白质的来源。

[1009] 姜黄——姜黄是一种香料并且被认为具有抗炎特性。姜黄中含有姜黄素,姜黄素是一种强环氧合酶抑制剂。最近的研究也证实了其在实验性体内模型中减轻肥胖的能力。

[1010] 材料和方法:通过将多种成分与酸樱桃提取物(其在制备过程中是主要成分)混合来制备食物粉末。通过使用Reicht高速搅拌机以4000 rpm的速度将酸樱桃和西兰花在水中(1g与2 ml的比例)混合 5 min,独立制备酸樱桃和西兰花的提取物。通过4层纱布过滤匀浆物并丢弃碎片。将匀浆物冷冻储存备用。

[1011] 100 ml酸樱桃提取物、100 ml西兰花提取物、100 ml杏仁乳(~8% w/v; Silk™ Brand; 由美国科罗拉多州Whitewave Foods分售)、50 ml豆浆(~10%)和5 g姜黄粉在Reicht 高速搅拌机中以5000 rpm的速度混合5 min。将混合物冷藏2 h并倒出。用水将该溶液调节至一定的稀稠度,并使用类似的设置如实施例1中所描述进行纳米喷雾干燥。收集干

燥的粉末并在-20℃的氮气氛围中冷储存在棕色瓶中。

[1012] 结果与讨论:进行实验以制备和结构表征食物粉末。

[1013] 如本文所描述,本发明的食物粉末通常可用任何合适的植物组织制备,该植物组织可用于制备本文所描述的纳米颗粒和/或纳米纤维。在某些实施方式中,食物粉末可以由能够形成如本文所描述的基于碳水化合物的纳米颗粒或纳米纤维的水果、蔬菜或另一植物组织或产品制备。食物粉末可以在包括水性、有机或它们的组合的任何合适的介质中制备。在某些实施方式中,这些食物粉末还可以包括希望包括在该食物粉末产品(其通常将针对食品粉末的预期应用进行定制)中的含有营养物的材料(或营养物),并且可以包括新鲜的、加工的或浓缩的粉末,单独地或以按重量或体积的任何所需组合。

[1014] 在某些实施方式中,可以通过在均质化食物粉末起始材料来制备食物粉末。例如,可以使用优选地在高rpm下操作并且能够产生高剪切力的共混机、或能够高效混合的任何其他合适的机器(如声谱显示仪)来实现均质化。

[1015] 在某些实施方式中,食物粉末可以被过滤以去除碎片,或者碎片可以另外从均质化的混合物中去除。例如,可以使用能够过滤碎片(即,未进入匀浆物中并且在重力下沉降的颗粒物质)的离心装置或过滤装置(例如,膜过滤装置或切向流过滤装置)来去除碎片。

[1016] 在某些实施方式中,食物粉末随后可以被脱水、冻干、喷雾干燥、纳米喷雾干燥、或以其他方式脱水或干燥。例如,可以使用能够去除水(或使用的另一溶剂)的设备,其可以包括纳米喷雾干燥器、或用于水性样品的冷冻干燥器,或更优选地可以使用能够喷雾干燥大体积的高效喷雾干燥器。在某些实施方式中,干燥器可以在减压下操作。

[1017] 在某些实施方式中,本文所描述的食物粉末可以由适合于制备如本文已经详细描述过的纳米颗粒和/或纳米纤维的植物组织与含营养物的材料组合来制备。如将理解的,含营养物的材料通常将针对食物粉末的预期应用进行定制,并且可以包括新鲜的、加工的或浓缩的粉末,单独地或以任何期望的重量或体积组合。在某些实施方式中,食物粉末可以与含营养物的组分或与靶向针对特定生理状况(例如慢性疾病)的组分一起开发,并且这类含营养物的材料可以具有例如预防和/或治疗性质。如将理解的,如本文使用的术语营养物可以包括适合于特定适应症的任何合适的活性剂或化合物(或包含活性剂或化合物的材料),并且不限于通常被认为是营养物的那些实体,例如在食物中发现的那些。例如,在某些实施方式中,营养物可以包括具有健康益处的任何合适的天然(或非天然)成分。

[1018] 在某些实施方式中,食物粉末可以包括:

[1019] 1. 酸樱桃(或酸樱桃提取物),或另一水果或蔬菜(或其提取物),其能够形成如本文所描述的基于碳水化合物的纳米颗粒或纳米纤维;

[1020] 2. 疏水性组分(例如但不限于杏仁乳),其可以结合来自添加的物质的疏水性分子(其他实例是例如椰子汁或来源于可食用坚果的乳);和

[1021] 3. 含有一种或多种生物活性成分的含营养物的材料(例如功能性食物提取物),其含有例如为食物粉末的所需应用而定制的一种或多种生物活性成分。

[1022] 含营养物的材料的一些非限制性实例可以包括以下活性化合物和/或植物家族中的一种或多种:

[1023] 类胡萝卜素(即, β -胡萝卜素、番茄红素、黄体素和其他叶黄素,虾青素等);

[1024] 番荔枝素(具有抗癌特性的来源于番荔枝水果的聚酮化合物);

- [1025] 乳香(其可与姜黄素一起提供额外的抗炎功能);
- [1026] 南非醉茄(一种含有醉茄内酯的草药组分,具有抗应激和预防癌症的作用),主要具有类固醇结构;
- [1027] 姜科成员,可以包括食用姜、芒果姜或其他含有任何几种生物活性成分(包括姜辣素和姜烯酚)的姜科成员;姜黄(即姜黄,含有姜黄素);
- [1028] 来自菊芋的低聚果糖和低聚半乳糖以及菊粉,以增加益生元含量;
- [1029] 胡椒科(Piperaceae)成员,例如胡椒(Piper nigrum)及其含有胡椒碱和几种衍生物的野生近缘种;和/或
- [1030] 以上未列出的任何其他合适的成分(例如但不限于来源于植物的那些);
- [1031] 和/或任何提取物、衍生物、由其分离的产物、或含有这类组分的材料或植物组织。
- [1032] 在本实施例中,由以下起始材料制备食物粉末:
- [1033] 1.酸樱桃的水性提取物;
- [1034] 2.可作为杏仁乳商购的杏仁匀浆物;
- [1035] 3.可作为豆浆商购的大豆匀浆物;
- [1036] 4.西兰花的水性提取物;以及
- [1037] 5.姜黄粉。
- [1038] 将这些起始材料在高速共混机(Recht,ATS scientific,柏林顿)中以4500 rpm共混;并在建议的设置下在Buchi纳米喷雾干燥器中进行纳米喷雾干燥。使用的体积/重量包括:
- [1039] 100 ml酸樱桃提取物(使用1-2 mg/ml多酚当量,但预期可以使用范围从约 0.1 mg/ml到多酚在水或其他溶剂中的完全饱和溶液的浓度);
- [1040] ~8-10%, w/v的100 ml杏仁乳;
- [1041] ~8-10%, w/v的50 ml的豆浆;
- [1042] 100 ml西兰花提取物;以及
- [1043] 5 g 姜黄粉。
- [1044] 如将理解的,虽然在本实施例中酸樱桃提取物的体积保持在100 ml,但在其他实施方式中,预期酸樱桃和/或其他成分的体积/重量可以根据需要变化,并且可以以任何合适的比例包含另外的组分。
- [1045] 图44显示了由酸樱桃、西兰花和其他食物成分制备的如本文所描述食物粉末的扫描电子显微照片。通过共混各组分的均质化溶液的混合物,并对共混的混合物进行纳米喷雾干燥来制备食物粉末;使用上述特定混合物制备食物粉末。
- [1046] 图45显示了食物粉末水溶液的透射电子显微照片,其显示了超微结构特征。图45描绘了与上述图44中所描绘的相同的食物粉末。将50 μ l食物粉末悬浮液的等分试样置于载玻片上,并将碳涂覆的网格以涂覆侧朝下的方式漂浮在溶液上,持续30 s。将该网格在边缘吸干并用0.1%乙酸铀溶液染色。该食物粉末呈扁长至球状的紧密缠绕的纤维结构(参见箭头A)。该构类似于纳米颗粒,但没有在酸樱桃纳米颗粒中观察到的结构组织(参见图17)。实际上,该结构可被认为是纳米球,其由围绕其自身缠绕以形成纳米球状结构的纤维结构限定(与缠结的绳球不同,其中一个或多个纤维缠结成球状结构)。可以观察到由围绕自身缠绕的纳米纤维制成的球状结构(箭头B),其纤维结构从其发出。这种结构类似于纳米球的

结构,其中纤维缠绕在一起并且能够吸附几种类型的功能成分。螺旋组织结构(箭头C)类似于在纳米颗粒中观察到的螺旋纤维。在本食物粉末实施例中,食物粉末含有由西兰花提取物和姜黄粉组分贡献的营养剂。这些营养剂与上述纤维结构复合,并且可有助于食物粉末形成和/或所得结构。

[1047] 使用肥胖小鼠模型在体内施用食物粉末

[1048] 材料和方法:

[1049] 表达分析-化学品和试剂。L型甘油三酯M试剂盒购自Wako Diagnostics(日本大阪和德国诺伊斯)。用于RNA分离的RNeasy Plus试剂盒购自Qiagen(美国,加利福尼亚州,瓦伦西亚)。用于cDNA制备的高容量cDNA逆转录试剂盒来自应用生物系统公司(美国,加利福尼亚州,福斯特市)。RT² Profiler™ PCR阵列小鼠炎性细胞因子&受体试剂盒来自Qiagen(美国,加利福尼亚州,瓦伦西亚)。iQ SYBR Green Supermix来自Bio-rad(美国,加利福尼亚州)。

[1050] 食物粉末处理。用36-48周龄的Pcyt2敲除小鼠和同窝出生的对照进行实验。未处理组的KO小鼠和对照小鼠(每组n=3-6)(经管饲法)每天摄入100 μL的水,治疗组的KO小鼠和对照小鼠(每组n=3-6)每周给予5次100 μL的100 μg食物粉末水溶液。所有组的口服管饲持续8周。将试验重复两次,并且在试验结束时将小鼠处死并用于血液和组织分析。

[1051] 总RNA分离和基因表达。使用RNeasy Plus试剂盒(美国,加利福尼亚州,瓦伦西亚,Qiagen)分离总RNA,并使用高容量cDNA逆转录试剂盒(美国,加利福尼亚州,福斯特市,应用生物系统公司)制备cDNA。使用适用于Bio-rad CFX96 RT-qPCR机器的RT² Profiler™ PCR阵列小鼠炎性细胞因子和受体试剂盒进行RT-qPCR。96孔板中的RT² Profiler™ PCR阵列含有84种途径或疾病聚焦基因的引物测定。在PCR扩增的指数阶段,使用最佳cDNA量和反应循环数分析感兴趣的基因。各基因水平相对于内部的B2m(β-2-微球蛋白)对照表达。通过使用从Pcyt2^{+/+}-和Pcyt2^{+/+}雌性小鼠收集的肝脏样本进行实验。基因水平表示为相对于对照的倍数变化。使用比较ΔΔCt方法分析RT-qPCR结果。

[1052] 统计分析。使用Prism GraphPad完成统计分析。数据表示为平均值±S.E。使用Student t检验(P值<0.05被认为是显著的)或多因素方差分析计算统计学显著性。当发现显著性效果时,使用Tukey诚实显著性差异检验进行事后比较。P<0.05认为差异有显著性。*

[1053] 结果和讨论:进行实验以探讨本文所描述的食物粉末的应用。对于这些研究,使用了在上述研究中制备的食物粉末。

[1054] 图46显示了食物粉末的抗氧化能力的评估。将该粉末溶解在水中,并且通过将溶液的DPPH自由基清除能力评估为以微克为单位的多酚当量(通过Folin-Ciocalteu试剂评估)来确定溶液的抗氧化能力。在甲醇中制备0.1 mM的Folin-Ciocateau试剂,并以指定的量加入食物粉末溶液。使抗氧化剂与1 ml DPPH试剂反应,并监测吸光度(紫色,517 nm吸收)。与不含多酚的对照相比,注意到517 nm吸光度的下降并表示为淬灭百分比。Trolox以与多酚相同的浓度用作阳性对照,并显示TEAC值为1。每个浓度点代表所制备的食物粉末的单个样品。结果表明该食物粉末具有较强的抗氧化能力。因为抗氧化剂组分(结合到纳米纤维骨架)的生物利用度可能更高,所以这些结果表明与在溶液中游离的组分相比,食物粉末在清除自由基和减少炎症方面可能具有更大的影响。

[1055] 图47显示了用食物粉末和水处理的野生型(WT)和乙醇胺敲除小鼠(KO)的体重变

化的评估。用24周龄的Pcyt2敲除小鼠(KO)和同窝出生小鼠对照进行实验。在处理时通过管饲法给予未处理(U)的KO和野生型小鼠组(每组n=4-6)100 μ L水。对KO小鼠和野生型(WT)小鼠(每组n=4-6)的处理(T)组施用100 μ g的食物粉末(在100 μ L水中),每周5次。所有组的口服管饲持续8周。在处理期结束时,处死小鼠并收集血液和组织样品用于分析。星号表示显著不同的数值(*- $P < 0.05$; ** - $P < 0.01$);这些结果表明食物粉末处理可能在防止体重增加方面具有显著作用。在可能受到遗传损害而导致肥胖的系统中,食用食物粉末可以是维持体重的选择。食物粉末处理还可以作为由于不健康的饮食习惯而发展为肥胖的那些人的干预。

[1056] 图48显示了食物粉末处理对肝脏中甘油三酯水平变化的影响。肝组织的甘油三酯水平通过使用 Wako L型 TG M检测试剂盒(美国,加利福利亚洲,Wako生命科学公司)中描述的方法进行评估。在进行食物粉末处理的野生型和ETKO小鼠中甘油三酯水平均没有显著降低。数值为三个单独样品的平均值 $\pm$ SEM。似乎存在食物粉末处理的肥胖小鼠中甘油三酯降低的趋势。通过食物粉末处理减少肝脏甘油三酯对表现出代谢综合征和发展成肥胖倾向的个体可能是有益的。脂质在肝脏中的积累是与脂肪性肝病相关的综合征。食物粉末组分可以至少部分地逆转这样的综合症和相关的健康问题。

[1057] 图49显示了食物粉末处理的和未处理的野生型和ETKO小鼠的血清参数。白蛋白、球蛋白及其比值无明显变化。对照组和处理组在总蛋白方面差异无统计学意义。数值为3次独立处理的平均值 $\pm$ SEM。该数据表明食物粉末处理不会引起若干生理参数的显著变化,这表明其作用可能相对更特异于某些条件。

[1058] 图50显示了食物粉末处理的和未处理的野生型和ETKO小鼠的血清参数。葡萄糖、磷和尿素水平无明显变化。在用食物粉末处理的肥胖小鼠中,甘油三酯水平似乎有轻微降低。数值为3个独立样品的平均值 $\pm$ SEM。这些数据表明食物粉末处理不会引起若干生理参数的显著变化,这表明其作用可能相对更特异于某些条件。

[1059] 图51显示了在用食物粉末处理的野生型和ETKO小鼠中趋化因子(趋化细胞因子)的转录水平的变化。CCL型趋化因子是由激活的T细胞分泌的小糖蛋白,其吸引单核细胞到炎症位点。CCL1(C-C基序趋化因子配体1)及其家族成员(CCL2、CCL3、CCL5...)参与炎症过程。在响应于食物粉末处理的野生型小鼠中观察到CCL2和CCL5显著减少。在ETKO小鼠中存在显示食物粉末处理后这些趋化因子减少的趋势,但在该测试中没有显著差异。数据是来自3只独立小鼠的样品中转录本水平的平均值 $\pm$ SEM。CCL1与CCR8结合发挥其功能。CCL2(单核细胞趋化蛋白1;MCP1)还参与将单核细胞吸引至炎症位点并与受体CCR2和CCR4结合。CCL3(巨噬细胞炎性蛋白- α ;MIP1 α)参与急性炎症并且是一种白细胞引诱物。它结合受体CCR1、CCR4和CCR5)。CCL5结合于CCR5表面受体,并且参与炎症和癌症进展。这些数据表明食物粉末处理可能导致这些炎症组分的下调。

[1060] 图52显示了在用食物粉末处理的野生型和ETKO小鼠中趋化因子(趋化细胞因子)的转录水平的变化。CCL型趋化因子是由激活的T细胞分泌的小糖蛋白,其吸引单核细胞到炎症位点。该图显示了CCL6、CCL7、CCL17和CCL19的转录水平的变化。CCL6对啮齿动物是独特的,并且在其作用期间可以与CCR1结合。CCL6在髓细胞分化期间在巨噬细胞中表达。在响应食物粉末处理的野生型小鼠中观察到CCL6、CCL7和CCL17显著降低。在ETKO小鼠中观察到CCL7的显著降低。在野生型和ETKO小鼠中都显示CCL 19转录本没有变化。数据是来自3只独

立小鼠的样品中转录本水平的平均值 $\pm$ SEM。CCL6与CCR1结合发挥其功能。CCL7还参与将单核细胞吸引至炎症位点并与CCR2受体结合。CCL7的异常表达与肿瘤的发生、MMP-2的激活及转移有关。因此,下调CCL7可能非常有益于癌症预防。CCL17参与淋巴细胞的化学吸引,并且参与炎症疾病如动脉粥样硬化和炎症肠病的诱导。CCL19参与淋巴细胞再循环。总之,这些结果支持降低与炎症增加有关的组分的水平。

[1061] 图53显示了在用食物粉末处理的野生型和ETK0小鼠中CCL22趋化因子(趋化细胞因子)的转录水平的变化。CCL22由肿瘤和肿瘤浸润性T细胞产生,引起免疫抑制和免疫细胞逃避肿瘤,从而有助于肿瘤进展。CCL22在免疫细胞中的过表达是由白细胞介素- α 引起的。野生型和ETK0小鼠中的CCL22水平在对食物粉末处理的响应中均无变化。数据是来自3只独立小鼠的样品中转录本水平的平均值 $\pm$ SEM。这些结果表明,食物粉末处理对CCL22的表达没有显著影响。

[1062] 图54显示了在用食物粉末处理的野生型和ETK0小鼠中CCR型受体的转录本水平的变化的评价。CCR家族的趋化因子受体在血细胞如嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、淋巴细胞、巨噬细胞和树突细胞中表达,并且其表达/活性的增强与增加的炎症有关。当CCR与配体趋化因子(CCL家族)结合时,许多信号转导途径被激活。食物粉末处理没有改变野生型和ETK0小鼠中CCR1和CCR6的表达水平。野生型小鼠中的CCR2和CCR8显示了响应于食物粉末处理的显著下调,表明食物粉末可以下调引起CCR的炎症水平。此外,在喂饲食物粉末的ETK0小鼠中存在CCR8的显著下调。因此,趋化因子及其受体水平的降低似乎是对食物粉末处理的响应。数据是来自3只独立小鼠的样品中转录本水平的平均值 $\pm$ SEM。图55显示了在用食物粉末处理的野生型和ETK0小鼠中CSF(集落刺激因子)的转录本水平变化的评估。CSF是粒细胞/巨噬细胞(GM-CSF)、巨噬细胞(M-CSF)和粒细胞(G-CSF)产生的细胞因子。其表达/活性的增强与炎症的增加有关,且下调有助于减轻炎症和自身免疫性疾病。在野生型小鼠和用食物粉末处理的小鼠中CSF水平相似。CSF3在ETK0小鼠中上调,这是与肥胖发展的潜在联系。用食物粉处理使CSF水平接近于在野生型小鼠中观察到的水平。趋化因子及其受体水平的降低似乎是对食物粉末处理的响应。CD40LG是定位于免疫细胞表面上的CD40蛋白的配体,并且该蛋白表达的增加与炎症的增加有关,与几种癌症的发展有关。在血管内皮中,血小板分泌CD40配体的增加似乎增强ROS的产生,导致斑块细胞的形成和动脉的阻塞。在用食物粉处理的小鼠中,CD40配体的表达显著降低,使其水平接近野生型小鼠。数据是来自3只独立小鼠的样品中转录本水平的平均值 $\pm$ SEM。

[1063] 图56显示了野生型和ETK0小鼠中响应于食物粉末处理的CXC基序趋化因子的变化的评估。CXC1型趋化因子: CXCL趋化因子与免疫原性细胞表面上的CXCR型受体结合并诱导它们的作用。通过其受体CXCR-2起作用的CXCL1(CXC基序配体1)在炎症中起关键作用。CXCL1在野生型小鼠中显著下调,而ETK0小鼠在对食物粉末处理的响应中没有显示出显著变化。CXCL 10及其受体CXCR3涉及在自身免疫性疾病发展过程中发生的病理,包括器官特异性疾病(I型糖尿病)和系统性自身免疫性疾病例如类风湿性关节炎。CXCL 10及其受体CXCR3与自身免疫疾病发展过程中发生的病理有关,包括器官特异性疾病(I型糖尿病)和系统性自身免疫疾病(如类风湿性关节炎)。干扰素和TNF激活CXCL10的产生,从而导致TH1淋巴细胞的激活。CXCL 10在野生型小鼠中显著下调,而ETK0小鼠没有显示出响应于食物处理的任何变化。CXCL-12(CXC-基序配体-12;基质细胞衍生因子1或SDF 1)是结合其受体CXC-R 4的趋

化因子。CXCL-12在多种组织中表达,且在发育中很重要。CXCL-12的过表达导致炎症并且对白细胞具有高度趋化性(神经炎症)。CXCL 12是胰腺癌、多发性硬化、阿尔茨海默病等的临床标志物。CXCL-12在响应于食物粉末处理的野生型小鼠中下调。数据是来自3只独立小鼠的样品中转录本水平的平均值 $\pm$ SEM。这些结果表明野生型小鼠和ETKO小鼠对相同处理的应答不同。不希望受理论束缚,肥胖症作为一种病症可改变对抗炎剂的应答模式。

[1064] 图57显示了评估食物处理对CXC-配体转录水平的影响。在由白细胞介素和TNF α 刺激的炎症期间产生CXC1-5。它结合CXC受体2。认为它在细胞增殖、增强运动性和血管生成中起作用。未处理的和食物粉末处理的野生型和ETKO小鼠之间的CXCL 5没有变化。CXCL15是在肺表皮细胞、肠细胞等中表达的趋化因子,并且与炎症有关。未处理和食物粉末处理的野生型和ETKO小鼠之间的CXCL15的转录本水平没有变化。数据是来自3只独立小鼠的样品中转录本水平的平均值 $\pm$ SEM。这些基因对食物粉末处理没有反应,表明其作用的特异性。

[1065] 图58显示了CXCR(CXC基序趋化因子受体,通过吸引免疫活性血细胞和诱导炎症与趋化因子家族和白细胞介素的CXC配体结合)结果。食物粉末处理使野生型小鼠中CXCR-2水平显著降低。在ETKO小鼠中没有观察到变化。在野生型和ETKO小鼠中,CXCR-5和CXCR-3以及CXCR5均无差异。结果表明,除了配体(C-C;C-X-C-基序),还可以通过用食物粉末处理来调节受体,这可以提供更好的炎症下调。肿瘤坏死因子家族的受体是参与炎症的另一组受体,已知几种天然产物下调TNF α 连接的信号转导途径。FAS配体(FASL)属于TNF超家族,并且与其受体结合可引发细胞凋亡。在食物粉末处理后,野生型和ETKO小鼠的FASL水平均没有显著差异。数据是来自3只独立小鼠的样品中转录本水平的平均值 $\pm$ SEM。在测试条件下,食物粉末处理似乎不影响这些基因的表达。

[1066] 图59显示了在野生型和ETKO小鼠中作为对食物粉末处理的响应的白细胞介素变化的评估。白细胞介素是参与免疫功能的细胞因子,一些是促炎症因子(proinflammatory, IL17),一些是抗炎因子(antiinflammatory, IL10)。它们在正常条件下以及在受到致病生物体挑战时介导免疫功能。观察到用食物粉末处理的野生型小鼠的IL-1A、IL-1B和IL-7的表达水平显著降低。这些白细胞介素的水平在响应于食物粉末处理的ETKO小鼠中保持类似。在未处理和食物粉末处理的野生型和ETKO小鼠中,IL4的表达水平保持相似。数据是来自3只独立小鼠的样品中转录本水平的平均值 $\pm$ SEM。结果表明野生型小鼠和ETKO小鼠之间的表达模式不同。

[1067] 图60显示了在野生型和ETKO小鼠中作为对食物粉末处理的响应的白细胞介素变化的评估。白细胞介素在正常条件下以及在受到致病生物体挑战时介导免疫功能。在响应于食物粉末处理的野生型和ETKO小鼠中,IL11、IL13、IL2rb和IL171的表达水平均无变化。数据是来自3只独立小鼠的样品中转录本水平的平均值 $\pm$ SEM。这些结果表明,食物粉末处理不会引起野生型小鼠和ETKO小鼠中所有基因表达的改变,但是相对靶向性更强。

[1068] 图61显示了在野生型和ETKO小鼠中作为对食物粉末处理的响应的白细胞介素变化的评估。在食物粉末处理后,野生型和ETKO小鼠的IL17表达水平均无变化。干扰素 γ (IFNG)是另一参与抗病毒剂应答的细胞因子。在野生型和ETKO小鼠中,IFNG水平在对食物粉末处理的响应中均无变化。数据是来自3只独立小鼠的样品中转录本水平的平均值 $\pm$ SEM。这些结果表明了食物粉末对改变基因表达的靶向作用。

[1069] 图62显示了在野生型和ETKO小鼠中,与用食物粉末处理期间肿瘤坏死因子超家族

成员的应答相关的转录本水平变化的评价。LTB(淋巴毒素B;淋巴毒素 β (TNF超家族,成员3)是一种膜蛋白和炎症应答的诱导剂。野生型小鼠中LTB转录本的水平响应于食物粉末处理而下调。在用食物粉末处理的ETK0小鼠中,LTB转录本水平没有变化。在食物粉末处理后,野生型和ETK0小鼠中TNF超家族的其他成员如TNFSF11、TNFSF11b和TNFSF113b的转录水平均无改变。数据是来自3只独立小鼠的样品中转录本水平的平均值 $\pm$ SEM。

[1070] 值得注意的是,野生型小鼠还通过下调炎症性细胞因子及其受体对食物粉末治疗作出反应,在某些情况下比肥胖小鼠的反应要大得多。这表明即使在正常小鼠中,食物粉末也可能在下调炎症中特别有效。因为炎症的下调与几种慢性疾病的预防高度相关,所以类似的这样的食物粉末处理(即,摄取)可以有益于人和/或其他动物中的几种这样的慢性疾病。

[1071] 实施例5-有机分子与纳米颗粒和纳米纤维结合的pH依赖性

[1072] 进行实验以评估有机分子在水性条件下与纳米纤维和纳米颗粒的结合能力。纳米纤维和纳米颗粒的主要成分是聚半乳糖醛酸(PG)聚合物(参见下文)以及其他次要的碳水化合物聚合物如木聚糖和阿拉伯聚糖。PG的羧酸部分在pKa接近4的水溶液中为PG提供了强酸性在该pH下,大部分羧酸将为解离形式(COO^-)。这可能倾向于排斥多链结构中的各条链,并且可能促进配体分子的结合增加。

[1073] 为了测试这种可能性,将纳米纤维和纳米颗粒与染料一起孵育,并且监测结合能力。对于纳米纤维,使用钙黄绿素(Ex 490;Em- 515),且对于纳米颗粒,使用dylight(Ex 650;Em 680)。由于纳米颗粒含有多酚,它们倾向于淬灭光谱的绿橙区域中的发射。因此,使用吸收/发射特性超过600 nm的dylight。这两种染料都被纳米颗粒和纳米纤维掺入。

[1074] 将纳米纤维(10 mg)溶解在10 ml水中。纳米颗粒在10 ml水中还含有10 mg粉末。(这两种制剂在组成、官能团等方面可能不相同)。将纳米纤维与5 mg钙黄绿素(10 ml)混合。将纳米颗粒溶液与200 μg 当量的dylight(10 ml)混合。

[1075] 将溶液轻轻混合3 h,并分成100 μl 的级分,将其对pH4至pH7的不同pH的缓冲液透析过夜。将透析的纳米纤维和纳米颗粒溶液稀释至2 ml并在 λ_{max} 下测量染料的吸光度(490 nm处的钙黄绿素;652 nm处的dylight)。按照纳米纤维和纳米颗粒溶液中的比例稀释钙黄绿素和dylight溶液以提供对照。结果在下表6和7中给出。

[1076] 表6:纳米纤维(NF)样品-作为染料的钙黄绿素。

[1077] 样本ID λ MaxOD变化超过空白吸光度%

[1078] 钙黄绿素+水491.51.121对照

[1079] 钙黄绿素+缓冲液pH 4.0472.50.444对照

[1080] 透析NF (pH 4.0+钙黄绿素) 472.51.090145.5

[1081] 钙黄绿素+缓冲液pH 6.0491.50.927对照

[1082] 透析NF (pH 6.0+钙黄绿素) 4912.010116.83

[1083] 钙黄绿素+缓冲液pH 6.54921.250对照

[1084] 透析NF (pH 6.5+钙黄绿素) 4922.23078.4

[1085] 钙黄绿素+缓冲液pH 7.04921.390对照

[1086] 透析NF (pH 7.0+钙黄绿素) 491.52.47478

[1087] 钙黄绿素的吸收从pH 4增加到pH 7。钙黄绿素吸光度在pH 4-6区域最高,超过该区域结合可能降低。在pH 4-6范围内结合最大,比没有纳米纤维的对照增加145%和116%。当

所有羧酸基团完全解离时,有效结合倾向于随着pH增加而降低。不希望受理论的束缚,这也可能是由于纳米纤维结构中的结构有机酸(例如苹果酸、抗坏血酸)在较高pH值下解离。

[1088] 表7:纳米颗粒样品-Dylight 650作为染料。

[1089] 样本ID λ MaxOD变化超过空白吸光%

[1090] Dylight+缓冲液pH 4.0652.50.3154对照

[1091] 透析NP (pH 4.0+Dylight) 652.50.254580.95

[1092] Dylight+缓冲液pH 6.0652.50.3620对照

[1093] 透析NP (pH 6.0+Dylight) 652.50.276076.24

[1094] Dylight+缓冲液pH 6.5652.50.4309对照

[1095] 透析NP (pH 6.5+Dylight) 652.50.250458.00

[1096] Dylight+缓冲液pH 7.0652.50.3788对照

[1097] 透析NP (pH 7.0+Dylight) 652.50.305380.47

[1098] 将纳米颗粒的水溶液和dylight轻轻混合3 h,并分成100 μ l的级分,将其对pH4至pH7的不同pH的缓冲液透析过夜。将透析后的纳米颗粒溶液稀释至2 ml,在 $\lambda_{\max}$ (652.5 nm)下测定吸光度。Dylight溶液也像在透析的纳米颗粒溶液中一样按比例稀释,以提供对每个pH设置的控制。在纳米颗粒的存在下,在测试条件下,不管pH如何,来自dylight的吸光度趋于降低,并且与pH没有明显的关系。不希望受理论的束缚,这可能是因为纳米颗粒是紧密缔合的结构并且可能不允许内部部分在其自组装后高效地结合到某些组分。然而,在这两种情况下,尽管进行了大量透析,仍保留染料,这表明纳米颗粒和纳米纤维的货物递送可能不需要化学缀合物。然而,在某些实施方式中,在货物较大的情况下,例如在抗体如单克隆抗体和/或其他大分子的情况下,缀合可以是优选的。

[1099] 实施例6-用食物粉末处理的肝脏切片的小鼠研究

[1100] 在小鼠中进行了研究以评估食物粉末处理在肥胖症小鼠模型中的效果。实验条件如上所描述。切片用曙红/苏木精染色。

[1101] 图63显示了用和不用食物粉末处理的小鼠的肝脏切片。版面(A)示出了未处理的野生型(WT)小鼠肝脏切片。可以看出,可见的脂质体非常少。版面(B)示出了用食物粉末处理的野生型(WT)小鼠肝脏切片。再次,可见极少量的脂质体。版面(C)示出了未处理的肥胖(KO)小鼠肝脏切片。在该版面中,清楚的圆形区域是广泛分布在肝脏中的脂质体。版面(D)示出了用食物粉末处理的(KO)小鼠肝脏切片。清楚的圆形区域是脂质体。组织再生的潜在区域如箭头所示。这些结果显示了用如本文所描述的食物粉末处理的肥胖小鼠中脂质小体的明显减少。

[1102] 已经通过举例描述了一个或多个说明性实施例。本领域的技术人员应当理解,在不脱离权利要求所限定的本发明的范围的情况下,可以进行多种变化和修改。

[1103] 参考文献

[1104] Aprikian, O., Duclos, V., Guyot, S., Besson, C., Manach, C., Bernalier, A., Rémésy, C. and Demigné, C. (2003) Apple pectin and a polyphenol-rich apple concentrate are more effective together than separately on cecal fermentations and plasma lipids in rats. J. Nutr., 133, 1860-1865.

[1105] Azeredo, H.M.C., Mattoso, L.H.C., Wood, D., Williams, T.G., Avena-

- Bustillos, R.J. and McHugh, T.H. (2009) Nanocomposite edible films from mango puree reinforced with cellulose nanofibers. *J. Food. Sci.*, 74, Nr 5, N31-N35.
- [1106] Cabral, H., Matsumoto, Y., Mizuno, K., Chen, Q., Murakami, M., Kimura, M., Terada, Y., Kano, M.R., Miyazono, K., Uesaka, M., Nishiyama, N. and Kataoka, K. (2011) Accumulation of sub-100 nm polymeric micelles in poorly permeable tumours depends on size., *Nature Nanotechnol.*, 6., 815-823.
- [1107] Clifford, M. and Brown, J.E. (2006) Dietary flavonoids and health- Broadening the perspective In *Flavonoids Chemistry biochemistry and applications*, Andersen OM, Markham KR (Eds.); Taylor and Francis, New York, NY: 320-370.
- [1108] Dangles, O. and Dufour, C. (2006). Flavonoid-protein interactions. In *Flavonoids: Chemistry, biochemistry&applications*, ed. Andersen O, Markham K. 443-69. Boca Raton, FL: CRC Press.
- [1109] David, I., Ștefănuț, M.N., Căta, A., Ienașcu, I., Pop, R., Tănasie, C., and Balcu, I. (2009) Study of polyphenols from *Vaccinium Myrtillus* L. frozen fruits.*J. Agroalimentary Processes and Technol.* 15 (3), 348-352.
- [1110] Del Rio, D., Borges, G. and Crozier, A. (2010) Berry Flavonoids and phenolics: bioavailability and evidence of protective effects. *Brit. J. Nutr.*, 104: S 67-S90.
- [1111] Deng, Z. J., Liang, M., Monteiro, M., Toth, I. and Minchin, R. F. (2011) Nanoparticle-induced unfolding of fibrinogen promotes Mac-1 receptor activation and inflammation. *Nature Nanotech.* 6, 39-44.
- [1112] Discher, D. E. and Eisenberg, A. (2002) Polymer vesicles. *Science* 297, 967-973.
- [1113] Fu, J.T.; Rao, M.A. (2001) Rheology and structure development during gelation of low-methoxyl pectin gels: The effect of sucrose. *Food Hydrocolloid.*, 15, 93-100.
- [1114] Gao, Y., Gu, W., Chen, L., Xu, Z., Li, Y. (2008). The role of daidzein-loaded sterically stabilized solid lipid nanoparticles in therapy for cardio-cerebrovascular diseases. *Biomaterials.*, 29, 4129-4136.
- [1115] Gorinstein, S., Haruenkit, R., Poovarodom, S., Park, Y-S., Vearasilp, S., Suhaj, M., Ham, K-S., Heo, B-G., Cho, J.Y., and Jang, H.G. 2009. The comparative characteristics of snake and kiwi fruits. *Food and Chem. Toxicol.*, 47, 1884-1891.
- [1116] IOM (Institute of Medicine) (2009) Nanotechnology in food products: Workshop Summary. Washington, DC: The National Academies Press.
- [1117] Iversen, T.G., Skotland, T. and Sandvig, K. (2011). Endocytosis and intracellular transport of nanoparticles: Present knowledge and need for future studies. *Nano Today*, 6, 176-185.

- [1118] Jacob, J.K. and Paliyath, G. (2008) Physico-chemical characteristics of nanovesicle-carbohydrate complexes in grape juice, *J. Agr. Food Chem.*, 56, 1305-1315.
- [1119] Kacurakova, M., Capek, P., Sasinkova, N., Wellner, A., and Ebrigerova, A. (2000) FT-IR study of plant cell wall model compounds: pectic polysaccharides. *Carbohydrate Polym.*, 43, 195-203.
- [1120] Kunzmann, A., Andersson, B., Thurnherr, T., Krug, H., Scheynius, A. and Fadeel, B. (2011) Toxicology of engineered nanomaterials: Focus on biocompatibility, biodistribution and biodegradation. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1810, 361-373.
- [1121] Lewinski, N., Colvin, V. and Drezek, R. (2008) cytotoxicity of nanoparticles. *Small*, 4, 26-49.
- [1122] Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C. and Jimenez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *Amer. J. Clin. Nutr.*, 79:727-747.
- [1123] Marcus, S.E., Verhertbruggen, Y., Hervé, C., Ordaz-Ortiz, J.J., Farkas, V., Pedersen, H.L., Willats, W.G.T. and Knox, J.P. (2008). Pectic homogalacturonan masks abundant sets of xyloglucan epitopes in plant cell walls. *BMC Plant Biol.*, 8, 60-72.
- [1124] Maynard, A. D. (2006) Nanotechnology: Assessing the risks. *Nanotoday*, 1, 22-33.
- [1125] McCann, M.C., Shi, J., Roberts, K. And Carpita, N.C. (1994) Changes in pectin structure and localization during the growth of unadapted and NaCl-adapted tobacco cells. *Plant J.*, 5, 773-785.
- [1126] Mishra, R.K., Banthia, A.K. and Majeed, A.B.A. (2012) Pectin based formulations for biomedical applications: A Review. *Aian J. Pharm. Clin. Res.*, 5, 1-7.
- [1127] Mishra, R.K., Banthia, A.K. and Majeed, A.B.A. (2011). Development and characterization of pectin/gelatin hydrogel membranes for wound dressing. *Int. J. Plast. Technol.*, 15, 82-95.
- [1128] Negi, P.S. and Handa, A.K. (2008) Structural deterioration of the produce: The breakdown of cell wall components. In, *Post Harvest Biology and Technology of Fruits, Vegetables and Flowers*(Eds)
- [1129] Paliyath, G., D.P. Murr, A.K. Handa and S. Lurie, Blackwell Publications, Iowa, pp 162-194.
- [1130] Nishiyama N (2007) Nanocarriers shape up for long life. *Nature Nanotechnol.*, 2, 203-205.
- [1131] Padayachee, A., Netzel, G., Netzel, M., Day, L., Zabaras, D., Mikkelsen, D. and Gidley, M. (2012) Binding of polyphenols to plant cell wall

analogues - Part 1: Anthocyanins. Food Chemistry, 134, 155-161.

[1132] Palashuddin, Md. S.K., Jaiswal, A., Paul, A., Ghosh, S.S. and Chattopadhyay, A. (2012) Presence of amorphous carbon nanoparticles in food caramels. Nature Scientific Reports, 2, Article number: 383. doi:10.1038/srep00383

[1133] Paliyath, G., Bakovic, M. and Shetty, K. (2011). Functional foods, nutraceuticals and degenerative disease prevention, Wiley-Blackwell, Oxford, UK, 392 pages.

[1134] Park, S., Baker, J.O., Himmel, M.E., Parilla, P.A., Johnson, D.K. (2010). Cellulose crystallinity index: measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance. BMC Biotechnol. Fuels, 3, 10-20.

[1135] Ramasamy, T., Kandasamy, U, Hinabindhu, R. and Kona, K. (2009) Nanocochleate - A New Drug Delivery System. FABAD J. Pharm. Sci., 34, 91-101.

[1136] Rico, C.M., Majumdar, S., Duarte-Gardea, M., Peralta-Videa, J.R. and Gardea -Torresdey, J.L. (2011) Interaction of Nanoparticles with Edible Plants and Their Possible Implications in the Food Chain. J. Agr. Food. Chem., 59, 3485-3498.

[1137] Rounds, C.M., Lubeck, E., Hepler, P.K. and Winship, L.J. (2011) Propidium iodide competes with Ca²⁺ to label pectin in pollen tubes and Arabidopsis root hairs. Plant Physiol., 157, 175-187.

[1138] Saura-Calixto, F. and Diaz-Rubio, M.E. (2007a). Polyphenols associated with dietary fibre in wine- A wine polyphenols gap? Food Res Int.; 40: 613-619.

[1139] Saura-Calixto, F., Serrano, J. and Goni, I. (2007b). Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. Food Chemistry, 101: 492-501.

[1140] Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C. and Jiménez, L. (2005). Dietary polyphenols and the prevention of diseases. Crit Rev Food Sci Nutr 45(4): 287-306

[1141] Seifert, G.J. and Roberts, K. (2007) The Biology of Arabinogalactan Proteins. Annu. Rev. Plant Biol., 58, 137-161.

[1142] Sessa, M., Tsao, R., Liu, R., Ferrari, G. and Donsì, F. (2011). Evaluation of the stability and antioxidant activity of nanoencapsulated resveratrol during in vitro digestion. J. Agr. Food Chem., 59, 12352-12360.

[1143] Shi, L. and Gunasekaran, S. (2008) Preparation of pectin-ZnO nanocomposites. (2008). Nanoscale Research Letters, 3:491-495.

[1144] Spencer, J.P.E. and Rice-Evans, C.A. (2003) Metabolism in the small intestine and gastrointestinal tract. In Flavonoids in Health and disease,

Rice-Evans C, Packer L (Eds.); Marcel Dekker, Inc. New York: 363-389.

[1145] Sriamornsak, P. (2011) Application of pectin in oral drug delivery. *Expert Opinion on Drug. Deliv.*, 8, 1009-1023.

[1146] Ström, A.; Ribelles, P.; Lundin, L.; Norton, I.; Morris, E.R.; Williams, A.K. Influence of pectin

[1147] fine structure on the mechanical properties of calcium-pectin and acid-pectin gels.

[1148] *Biomacromolecules* 2007, 8, 2668-2674.

[1149] Urias-Orona, V., Rascón-Chu, A., Lizardi-Mendoza, J., Carvajal-Millán, E., Gardea, A.A., and Ramírez-Wong, B. (2010). A Novel Pectin Material: Extraction, Characterization and Gelling Properties, 11, 3686-3695.

[1150] Verma, A. K., Chanchal, A., Kumar, A. (2011) Potential of Negatively charged pectin nanoparticles encapsulating Paclitaxel: Preparation & Characterization. *IEEE.*, 978, 1-8.

[1151] Yadav, N., Morris, G. A., Harding, S. E., Ang, S. and Adams, G. G. (2009) Various non-injectable delivery systems for the treatment of diabetes mellitus. *Endo. Metabol. & Imm. Disord. - Drug Targ.* 2009, 9, 1-13.

[1152] Yamashita, K. et al. (2011) Silica and titanium dioxide nanoparticles cause pregnancy complications in mice *Nature Nanotech.*, 6, 321-328.

[1153] Zhao, N., Bagaria, H.G., Wong, M.S. and Zu, Y. (2011) A nanoparticle that is both tumor cell-selective

[1154] and cancer gene-specific for anaplastic large cell lymphoma. *J. Nanobiotechnol.*, 9, 1-12.

[1155] Zhang, H.Y., Arab Tehrany, E., Kahn, C.J.F., Poncet, M. and Cleymand, L.F. (2012) Effects of nanoliposomes based on soya, rapeseed and fish lecithins on chitosan thin films designed for tissue engineering. *Carbohydrate Polymers.*, 88, 618-627.

[1156] Agarwala, R., Singh, V., Journey, P., Shib, L., Sreenivasan, S.V., and Roy, K. (2013). Mammalian cells preferentially internalize hydrogel nanodiscs over nanorods and use shape-specific uptake mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 110, 17247-17252.

[1157] Barenholz, Y. (2012) Doxil® — The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned. *J. Controlled Release*, 160, 117-134.,

[1158] Cabral, H., Matsumoto, Y., Mizuno, K., Chen, Q., Murakami, M., Kimura, M., Terada, Y., Kano, M.R., Miyazono, K., Uesaka, M., Nishiyama, N. and Kataoka, K. (2011) Accumulation of sub-100 nm polymeric micelles in poorly permeable tumours depends on size., *Nature Nanotechnol.*, 6., 815-823.

[1159] Chandra, A., Nair, M.G. and Lezzoni, A. (1992). Evaluation and characterization of the anthocyanin pigments in tart cherries (*Prunus cerasus*

L.). J. Agric. Food Chem., 40, 967-969.

[1160] Kai-Hua Chow, E. and Ho, D. (2013) Cancer nanomedicine: From drug delivery to imaging. Sci. Transl. Medicine., 5, (216) 1-12.

[1161] Clifford, M. and Brown, J.E. (2006) Dietary flavonoids and health-Broadening the perspective In Flavonoids Chemistry biochemistry and applications, Andersen OM, Markham KR (Eds.); Taylor and Francis, New York, NY: 320-370.

[1162] Dahlman, J.E.Barnes, C. et al. (2014) In vivo endothelial siRNA delivery using polymeric

[1163] nanoparticles with low molecular weight. Nature Nanotechnol., 2014, 9, 648-654.

[1164] Del Rio, D., Borges, G. and Crozier, A. (2010) Berry Flavonoids and phenolics: bioavailability and evidence of protective effects. Brit. J. Nutr., 104: S 67-S90.

[1165] Gao, Y., Gu, W., Chen, L., Xu, Z., Li, Y. (2008). The role of daidzein-loaded sterically stabilized solid lipid nanoparticles in therapy for cardio-cerebrovascular diseases. Biomaterials., 29, 4129-4136.

[1166] Garcia-Alonso, J., Rosa, G., Vidal-Guevera, M.L. and Periago, M.J. (2006) Acute intake of phenolic rich juice improves antioxidant status in healthy subjects. Nutr. Res., 26: 330-339.

[1167] Gonzalez-Gallego, J., Victoria Garcia-Mediavilla, M., Sanchez-Campos, S. and Tunon, M.J. (2010) Fruit polyphenols, immunity and inflammation. British J. Nutr., 104: S15-S27.

[1168] Hakimuddin, F, Paliyath, G. and Meckling, K. (2004). Selective cytotoxicity of a red grape wine flavonoid fraction against MCF-7 cells, Breast Cancer Res. Treatment. 85:65-79.

[1169] Hakimuddin, F., Paliyath, G. and Meckling, K. (2006). Red wine polyphenols cause selective cytotoxicity in MCF-7 cells by disrupting calcium signaling, mitochondrial function and the cell cycle. J. Agric. Food Chem., 54:7912-7923.

[1170] Hakimuddin, F., Tiwari, K., Paliyath, G. and Meckling, K. (2008). Grape and wine polyphenols down-regulate the expression of signal transduction genes and inhibit the growth of estrogen receptor-negative mda-mb231 tumors in nu/nu mouse xenografts. Nutr. Res., 28:702-713.

[1171] Hakimuddin, F. and Paliyath, G. (2011). Cancer prevention by polyphenols: Influence on signal transduction and gene expression. In Functional foods, nutraceuticals and degenerative disease prevention. Eds Paliyath G, Bakovic M, Shetty K. Wiley-Blackwell, Oxford, UK, pp 283-321.

[1172] Holt, E.M., Steffen, L.M., Moran, A., Basu, S., Steinberger, J.,

Ross, J., Hong, C.P. and Sinaiko, A.R. (2009). Fruit and vegetable consumption and its relation to markers of inflammation and oxidative stress in adolescents. *J Am Diet Assoc.*, 109: 414-421.

[1173] Iversena, T.G., Skotlanda, T. and Sandvig, K. (2011). Endocytosis and intracellular transport of nanoparticles: Present knowledge and need for future studies. *Nano Today*, 6, 176-185.

[1174] Jacob, J.K. and Paliyath, G. (2008) Physico-chemical characteristics of nanovesicle-carbohydrate complexes in grape juice, *J. Agr. Food Chem.*, 56, 1305-1315.

[1175] Jacob, J.K., Tiwari, K, Correa-Betanzo, J., Misran, A, Chandrasekaran, R and G. Paliyath. (2012) Biochemical basis for functional ingredient design from fruits. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.*, 3, 79-104.

[1176] Jensen, G.S., Wu, X, Patterson, K.M, Barnes, J., Carter, S.G., Scherwitz, L.S., Beaman, R., Endres, J.R. and Schauss, A.G. (2008) In vitro and in vivo antioxidant and antiinflammatory capacities of an antioxidant rich fruit and berry juice blend. Results of a pilot and randomized double blind, placebo controlled, crossover study. *J. Agric. Food Chem.*, 56: 8326-8333.

[1177] Karlsen, A., Retterstol, L., Laake, P., Paur, I., Kjolsrud-Bohn, S., Sandvik, L. and Blomhoff, R. (2007) Anthocyanins inhibit, Nuclear Factor kappa B-activation in monocytes and reduce plasma concentration of pro-inflammatory mediators in healthy adults. *Journal of Nutrition*, 137, 1951-1954.

[1178] Kelley, D.S., Rasooly, R., Jacob, R.A., Kader, A.A., and Mackey, B.E. (2006). Consumption of bing sweet cherries lowers circulating concentrations of inflammation markers in healthy men and women. *J.Nutr.*, 136: 981-986.

[1179] Kunzmann, A., Andersson, B., Thurnherr, T., Krug, H., Scheynius, A. and Fadeel, B. (2011) Toxicology of engineered nanomaterials: Focus on biocompatibility, biodistribution and biodegradation. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1810, 361-373.

[1180] Lewinski, N., Colvin, V. and Drezek, R. (2008) cytotoxicity of nanoparticles. *Small*, 4, 26-49.

[1181] Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C. and Jimenez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *Amer. J. Clin. Nutr.*, 79:727-747

[1182] Maynard, A. D. (2006) Nanotechnology: Assessing the risks. *Nanotoday*, 1, 22-33.

[1183] Morton, S.W., Lee, M.J., Deng, Z.J., Dreaden, E.C. Siouve, E., Shopsowitz, K. E., Shah, N.J., Yaffe, M.B., Hammond, P.T. (2014) A

Nanoparticle-Based Combination Chemotherapy Delivery System for Enhanced Tumor Killing by Dynamic Rewiring of Signaling Pathways. *Science Signalling.*, 7, 1-11.

[1184] Palashuddin, Md. S.K., Jaiswal, A., Paul, A., Ghosh, S.S. and Chattopadhyay, A. (2012) Presence of amorphous carbon nanoparticles in food caramels. *Nature Scientific Reports*, 2, Article number: 383. doi:10.1038/srep00383

[1185] Ramasamy, T., Kandasamy, U, Hinabindhu, R. and Kona, K. (2009) Nanocochleate - A New Drug Delivery System. *FABAD J. Pharm. Sci.*, 34, 91-101.

[1186] Saura-Calixto, F. and Diaz-Rubio, M.E. (2007a). Polyphenols associated with dietary fibre in wine- A wine polyphenols gap? *Food Res Int.*; 40: 613-619.

[1187] Sessa, M., Tsao, R., Liu, R., Ferrari, G. and Donsì, F. (2011). Evaluation of the stability and antioxidant activity of nanoencapsulated resveratrol during in vitro digestion. *J. Agr. Food Chem.*, 59, 12352-12360.

[1188] Shah, B.P., Pasquale, N., De, G., Tan, T., Ma, J. and Lee, K-B. (2014). Core shell nanoparticle-based peptide therapeutics and combined hyperthermia for enhanced cancer cell apoptosis.

[1189] *ACS Nano*, 8, 9379-9387.

[1190] Smith, B.R., Ghosn, E.E.B., Rallapalli, H., Prescher, J.A., Larson, T., Herzenberg, L.A. and Gambhir, S.S. (2014) Selective uptake of single-walled carbon nanotubes by circulating monocytes for enhanced tumour delivery. *Nature Nanotechnol.*, 9, 481-487.

[1191] Verma, A. K., Chanchal, A., Kumar, A. (2011) Potential of Negatively charged pectin nanoparticles encapsulating Paclitaxel: Preparation& Characterization. *IEEE.*, 978, 1-8.

[1192] Willcox, J.K., Ash, S.L. and Catignani, G.L. (2004). Antioxidants and prevention of chronic disease. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44: 275-295.

[1193] Yamashita, K. et al. (2011) Silica and titanium dioxide nanoparticles cause pregnancy complications in mice *Nature Nanotech.*, 6, 321-328.

[1194] Zhao, N., Bagaria, H.G., Wong, M.S. and Zu, Y. (2011) A nanoparticle that is both tumor cell-selective and cancer gene-specific for anaplastic large cell lymphoma. *J. Nanobiotechnol.*, 9, 1-12.

[1195] Zhu, G., Mei, L., and Tan W. (2014) Nanomedicine. *The Scientist Magazine*, August 22nd 2014.

[1196] Atkins, M.B.; Regan, M.; McDermott, D. Update on the role of interleukin 2 and other cytokines in the treatment of patients with stage IV renal carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 2004, 10, 6342S-6346S.

- [1197] Atkins, M.B.; Lotze, M.T.; Dutcher, J.P.; Fisher, R.I.; Weiss, G.; Margolin, K.; Abrams, J.; Sznol, M.; Parkinson, D.; Hawkins, M.; et al. High-dose recombinant interleukin 2 therapy for patients with metastatic melanoma: Analysis of 270 patients treated between 1985 and 1993. *J. Clin. Oncol.* 1999, 17, 2105-2116.
- [1198] Balkwill, F. (2006). TNF- α in promotion and progression of cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, 25: pp. 409-416.
- [1199] Balkwill, F. (2009). Tumour necrosis factor and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 9, 361-371.
- [1200] Chang, K.J., Reid, T., Senzer, N., et al., (2012). Phase I evaluation of TNFerade Biologic plus chemoradiotherapy before esophagectomy for locally advanced resectable esophageal cancer, *Gastrointestinal Endoscopy*, 75: pp. 1139-1146, 2012.
- [1201] Commins SP, Borish L&Steinke JW (2010) Immunologic messenger molecules: cytokines, interferons, and chemokines. *J Allergy Clin Immunol* 125 (2 Suppl 2): S53-72.
- [1202] Dougan, M., and Dranoff, G. (2009). Immune therapy for cancer. *Annual Review of Immunology* 27: 83-117.
- [1203] Eferl, R., and Wagner, E.F. (2003). AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nat. Rev. Cancer* 3: 859-868.
- [1204] Heikkilä, K., Ebrahim, S., and Lawlor, D.A. (2008) Systematic review of the association between circulating interleukin-6 (IL-6) and cancer. *European Journal of Cancer* 44: pp. 937-945.
- [1205] Herman, J.M., Wild, A.T., Wang H., et al., 2013. Randomized phase III multi-institutional study of TNFerade biologic with fluorouracil and radiotherapy for locally advanced pancreatic cancer: final results. *Journal of Clinical Oncology*, 31: pp. 886-894.
- [1206] Hodge, D.R., Hurt, E.M., and Farrar, W.L. 2005. The role of IL-6 and STAT3 in inflammation and cancer. *European Journal of Cancer*, 41: pp. 2502-2512.
- [1207] Karin, M. (2006). Nuclear factor-kappa B in cancer development and progression. *Nature* 441, 431-436.
- [1208] Laveti, D., Kumar, M., Hemalatha, R., Sistla, R., Naidu, V.G., Talla, V., Verma, V., Kaur, N., and Nagpal, R., (2013) Anti-inflammatory treatments for chronic diseases: a review, *Inflamm. Allergy Drug Targets* 12: 349-361.
- [1209] Lee S and Margolin K (2011) Cytokines in cancer immunotherapy. *Cancers* 3: 3856-3893.
- [1210] Lust, J.A., Lacy, M.Q., Zeldenrust, S.R., Dispenzieri, A., Gertz, M.A., Witzig, T.E., Kumar, S., Hayman, S.R., Russell, S.J., Buadi, F.K., et al. (2009). Induction of a chronic disease state in patients with smoldering

or indolent multiple myeloma by targeting interleukin 1 β -induced interleukin 6 production and the myeloma proliferative component. Mayo Clin. Proc. 84, 114-122.

[1210] Popa, C., Netea, M.G., Van Riel, J P. L. C. M., Van Der Meer, W. M., and Stalenhoef, A. F. H. (2007) The role of TNF- α in chronic inflammatory conditions, intermediary metabolism, and cardiovascular risk. Journal of Lipid Research vol. 48: pp. 751-762.

[1211] Thornton, A.M.; Donovan, E.E.; Piccirillo, C.A.; Shevach, E.M. Cutting edge: IL-2 is critically required for the in vitro activation of CD4⁺ CD25⁺ T cell suppressor function. J. Immunol. 2004, 172, 6519-6523.

[1212] Waldner, M.J., and Neurath, M.F. (2009). Colitis-associated cancer: the role of T cells in tumor development. Semin. Immunopathol. 31, 249-256.

[1213] Zhang, J.Y., Green, C.L., Tao, S., and Khavari, P.A. (2004). NF-kappa B RelA opposes epidermal proliferation driven by TNFR1 and JNK. Genes Dev. 18, 17-22.

[1214] Zitvogel, L., Apetoh, L., Ghiringhelli, F., and Kroemer, G. (2008). Immunological aspects of cancer chemotherapy. Nat. Rev. Immunol. 8, 59-73.

[1215] Aprikian, O., Duclos, V., Guyot, S., et al., (2003) Apple pectin and a polyphenol-rich apple concentrate are more effective together than separately on cecal fermentations and plasma lipids in rats. J. Nutr., 133, 1860-1865.

[1216] Azeredo, H.M.C., Mattoso, L.H.C., Wood, D., Williams, T.G., Avena-Bustillos, R.J. and McHugh, T.H. (2009) Nanocomposite edible films from mango puree reinforced with cellulose nanofibers. J. Food. Sci., 74, Nr 5, N31-N35.

[1217] Cabral, H., Matsumoto, Y., Mizuno, K., Chen, Q., Murakami, M., Kimura, M., Terada, Y., Kano, M.R., Miyazono, K., Uesaka, M., Nishiyama, N. and Kataoka, K. (2011) Accumulation of sub-100 nm polymeric micelles in poorly permeable tumours depends on size., Nature Nanotechnol., 6., 815-823.

[1218] Clifford, M. and Brown, J.E. (2006) Dietary flavonoids and health-Broadening the perspective In Flavonoids Chemistry biochemistry and applications, Andersen OM, Markham KR (Eds.); Taylor and Francis, New York, NY: 320-370.

[1219] Dangles, O. and Dufour, C. (2006). Flavonoid-protein interactions. In Flavonoids: Chemistry, biochemistry&applications, ed. Andersen O, Markham K. 443-69. Boca Raton, FL: CRC Press.

[1220] David, I., Ștefănuț, M.N., Căta, A., Ienașcu, I., Pop, R., Tănasie, C., and Balcu, I. (2009) Study of polyphenols from Vaccinium Myrtillus L. frozen fruits.J. Agroalimentary Processes and Technol. 15 (3), 348-352.

[1221] Del Rio, D., Borges, G. and Crozier, A. (2010) Berry Flavonoids and

phenolics: bioavailability and evidence of protective effects. *Brit. J. Nutr.*, 104: S 67-S90.

[1222] Deng, Z. J., Liang, M., Monteiro, M., Toth, I. and Minchin, R. F. (2011) Nanoparticle-induced unfolding of fibrinogen promotes Mac-1 receptor activation and inflammation. *Nature Nanotech.* 6, 39-44.

[1223] Discher, D. E. and Eisenberg, A. (2002) Polymer vesicles. *Science* 297, 967-973.

[1224] Fu, J.T.; Rao, M.A. (2001) Rheology and structure development during gelation of low-methoxyl pectin gels: The effect of sucrose. *Food Hydrocolloid.*, 15, 93-100.

[1225] Gao, Y., Gu, W., Chen, L., Xu, Z., Li, Y. (2008). The role of daidzein-loaded sterically stabilized solid lipid nanoparticles in therapy for cardio-cerebrovascular diseases. *Biomaterials.*, 29, 4129-4136.

[1226] Gorinstein, S., Haruenkit, R., Poovarodom, S., Park, Y-S., Vearasilp, S., Suhaj, M., Ham, K-S., Heo, B-G., Cho, J.Y., and Jang, H.G. 2009. The comparative characteristics of snake and kiwi fruits. *Food and Chem. Toxicol.*, 47, 1884-1891.

[1227] IOM (Institute of Medicine) (2009) Nanotechnology in food products: Workshop Summary. Washington, DC: The National Academies Press.

[1228] Iversen, T.G., Skotland, T. and Sandvig, K. (2011). Endocytosis and intracellular transport of nanoparticles: Present knowledge and need for future studies. *Nano Today*, 6, 176-185.

[1229] Jacob, J.K. and Paliyath, G. (2008) Physico-chemical characteristics of nanovesicle-carbohydrate complexes in grape juice, *J. Agr. Food Chem.*, 56, 1305-1315.

[1230] Kacurakova, M., Capek, P., Sasinkova, N., Wellner, A., and Ebrigerova, A. (2000) FT-IR study of plant cell wall model compounds: pectic polysaccharides. *Carbohydrate Polym.*, 43, 195-203.

[1231] Kunzmann, A., Andersson, B., Thurnherr, T., Krug, H., Scheynius, A. and Fadeel, B. (2011) Toxicology of engineered nanomaterials: Focus on biocompatibility, biodistribution and biodegradation. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1810, 361-373.

[1232] Lewinski, N., Colvin, V. and Drezek, R. (2008) cytotoxicity of nanoparticles. *Small*, 4, 26-49.

[1233] Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C. and Jimenez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *Amer. J. Clin. Nutr.*, 79:727-747.

[1234] Marcus, S.E., Verhertbruggen, Y., Hervé, C., Ordaz-Ortiz, J.J., Farkas, V., Pedersen, H.L., Willats, W.G.T. and Knox, J.P. (2008). Pectic

homogalacturonan masks abundant sets of xyloglucan epitopes in plant cell walls. *BMC Plant Biol.*, 8, 60-72.

[1235] Maynard, A. D. (2006) Nanotechnology: Assessing the risks. *Nanotoday*, 1, 22-33.

[1236] McCann, M.C., Shi, J., Roberts, K. And Carpita, N.C. (1994) Changes in pectin structure and localization during the growth of unadapted and NaCl-adapted tobacco cells. *Plant J.*, 5, 773-785.

[1237] Mishra, R.K., Banthia, A.K. and Majeed, A.B.A. (2012) Pectin based formulations for biomedical applications: A Review. *Aian J. Pharm. Clin. Res.*, 5, 1-7.

[1238] Mishra, R.K., Banthia, A.K. and Majeed, A.B.A. (2011). Development and characterization of pectin/gelatin hydrogel membranes for wound dressing. *Int. J. Plast. Technol.*, 15, 82-95.

[1239] Negi, P.S. and Handa, A.K. (2008) Structural deterioration of the produce: The breakdown of cell wall components. In, *Post Harvest Biology and Technology of Fruits, Vegetables and Flowers*(Eds)

[1240] Paliyath, G., D.P. Murr, A.K. Handa and S. Lurie, Blackwell Publications, Iowa, pp 162-194.

[1241] Nishiyama N (2007) Nanocarriers shape up for long life. *Nature Nanotechnol.*, 2, 203-205.

[1242] Padayachee, A., Netzel, G., Netzel, M., Day, L., Zabaras, D., Mikkelsen, D. and Gidley, M. (2012) Binding of polyphenols to plant cell wall analogues - Part 1: Anthocyanins. *Food Chemistry*, 134, 155-161.

[1243] Palashuddin, Md. S.K., Jaiswal, A., Paul, A., Ghosh, S.S. and Chattopadhyay, A. (2012) Presence of amorphous carbon nanoparticles in food caramels. *Nature Scientific Reports*, 2, Article number: 383. doi:10.1038/srep00383

[1244] Paliyath, G., Bakovic, M. and Shetty, K. (2011). *Functional foods, nutraceuticals and degenerative disease prevention*, Wiley-Blackwell, Oxford, UK, 392 pages.

[1245] Park, S., Baker, J.O., Himmel, M.E., Parilla, P.A., Johnson, D.K. (2010). Cellulose crystallinity index: measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance. *BMC Biotechnol. Fuels*, 3, 10-20.

[1246] Ramasamy, T., Kandasamy, U, Hinabindhu, R. and Kona, K. (2009) Nanocochleate - A New Drug Delivery System. *FABAD J. Pharm. Sci.*, 34, 91-101.

[1247] Rico, C.M., Majumdar, S., Duarte-Gardea, M., Peralta-Videa, J.R. and Gardea -Torresdey, J.L. (2011) Interaction of Nanoparticles with Edible Plants and Their Possible Implications in the Food Chain. *J. Agr. Food.*

Chem., 59, 3485-3498.

[1248] Rounds, C. M., Lubeck, E., Hepler, P. K., and Winship, L. J., (2011) Propidium iodide competes with Ca^{2+} to label pectin in pollen tubes and Arabidopsis root hairs. *Plant Physiol.*, 157, 175-187.

[1249] Saura-Calixto, F. and Diaz-Rubio, M.E. (2007a). Polyphenols associated with dietary fibre in wine- A wine polyphenols gap? *Food Res Int.*; 40: 613-619.

[1250] Saura-Calixto, F., Serrano, J. and Goni, I. (2007b). Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. *Food Chemistry*, 101: 492-501.

[1251] Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C. and Jiménez, L. (2005). Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr* 45(4): 287-306

[1252] Seifert, G.J. and Roberts, K. (2007) The Biology of Arabinogalactan Proteins. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 58, 137-161.

[1253] Sessa, M., Tsao, R., Liu, R., Ferrari, G. and Donsì, F. (2011). Evaluation of the stability and antioxidant activity of nanoencapsulated resveratrol during in vitro digestion. *J. Agr. Food Chem.*, 59, 12352-12360.

[1254] Shi, L. and Gunasekaran, S. (2008) Preparation of pectin-ZnO nanocomposites. (2008). *Nanoscale Research Letters*, 3:491-495.

[1255] Spencer, J.P.E. and Rice-Evans, C.A. (2003) Metabolism in the small intestine and gastrointestinal tract. In *Flavonoids in Health and disease*, Rice-Evans C, Packer L (Eds.); Marcel Dekker, Inc. New York: 363-389.

[1256] Sriamornsak, P. (2011) Application of pectin in oral drug delivery. *Expert Opinion on Drug. Deliv.*, 8, 1009-1023.

[1257] Ström, A.; Ribelles, P.; Lundin, L.; Norton, I.; Morris, E.R.; Williams, A.K. Influence of pectin fine structure on the mechanical properties of calcium-pectin and acid-pectin gels. *Biomacromolecules* 2007, 8, 2668-2674.

[1258] Urias-Orona, V., Rascón-Chu, A., Lizardi-Mendoza, J., Carvajal-Millán, E., Gardea, A.A., and Ramírez-Wong, B. (2010). A Novel Pectin Material: Extraction, Characterization and Gelling Properties, 11, 3686-3695.

[1259] Verma, A. K., Chanchal, A., Kumar, A. (2011) Potential of Negatively charged pectin nanoparticles encapsulating Paclitaxel: Preparation & Characterization. *IEEE.*, 978, 1-8.

[1260] Yadav, N., Morris, G. A., Harding, S. E., Ang, S. and Adams, G. G. (2009) Various non-injectable delivery systems for the treatment of diabetes mellitus. *Endo. Metabol. & Imm. Disord. - Drug Targ.* 2009, 9, 1-13.

[1261] Yamashita, K. et al. (2011) Silica and titanium dioxide nanoparticles

cause pregnancy complications in mice *Nature Nanotech.*, 6, 321-328.

[1262] Zhao, N., Bagaria, H.G., Wong, M.S. and Zu, Y. (2011) A nanocomplex that is both tumor cell-selective and cancer gene-specific for anaplastic large cell lymphoma. *J. Nanobiotechnol.*, 9, 1-12.

[1263] Zhang, H.Y., Arab Tehrany, E., Kahn, C.J.F., Poncet, M. and Cleymand, L.F. (2012) Effects of nanoliposomes based on soya, rapeseed and fish lecithins on chitosan thin films designed for tissue engineering. *Carbohydrate Polymers.*, 88, 618-627.

[1264] Chang, D., Lei, J., Cui, H., Lu, N., Sun, Y, Zhang, X., Gao, C and Yin, Y. 2012. *Carbohydrate Polymers.*, 88, 663-669.

[1265] Gao, Y., Gu, W., Chen, L., Xu, Z and Li, Y. 2008. The role of daidzein-loaded sterically stabilized solid lipid nanoparticles in therapy for cardio-vascular diseases. *Biomaterials*, 29, 4129-4136.

[1266] Gao, J and Xu, B. 2009. Applications of nanomaterials inside cells. *Nano Today*, 4, 37-51.

[1267] Jacob, J.K. and G. Paliyath (2008) Physico-chemical characteristics of nanovesicle-carbohydrate complexes in grape juice, *J. Agr. Food Chem.*, 56, 1305-1315.

[1268] Lewinski, N., Colvin, V., and Rebekah, D. 2008. Cytotoxicity of nanoparticles. *Small.*, 4, 26-49.

[1269] Maynard, A. 2006. Nanotechnology: Assessing the risks. *Nanotoday*, 1, 22-33.

[1270] Paliyath, G. and J.E. Thompson (1990) Evidence for early changes in membrane structure during post-harvest development of cut carnation flowers, *New Phytologist*, 114, 555-562

[1271] Ramasamy, T., Kandasamy, U, Hinabindhu, R and K. Kiran. (2009). Nanocochleate- a new drug delivery system, *FABAD J. Pharm. Sci.*, 34, 91-101.

[1272] Sessa, M., R. Tsao, R. Liu, G. Ferrari, and F. Donsi. (2011) Evaluation of the stability and antioxidant activity of nanoencapsulated resveratrol during in vitro digestion, *J. Agr. Food Chem.*, 59, 12352-12360.

[1273] Yao, K., G. Paliyath, R.W. Humphrey, F.R. Hallet and J.E. Thompson (1991) Identification and characterization of non-sedimentable lipid-protein microvesicles enriched in phospholipid degradation products, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 88, 2269-2273

[1274] Yao, K., G. Paliyath and J.E Thompson (1991) Non-sedimentable microvesicles from senescing bean cotyledons contain gel phase-forming phospholipid degradation products, *Plant Physiol.*, 97, 502-508.

[1275] Zhang, N., Ping, Q., Huang, G., Xu, W., Cheng, Y., and Han, X. 2006. Lectin-modified solid lipid nanoparticles as carriers for oral administration

of insulin. *Internat. J. Pharmaceut.*, 327, 153-159.

[1276] Zhang, H. Y., Tehrany E.A., Kahn, C.J.F., Poncot, M, Linder M and F, Cleymand. 2012. Effects of nanoliposomes basaed on spya, rapeseed and fish lecithinon chitosan thin film s designed for tissue engineering. *Carb. Polymers.*, 88, 618-627.

[1277] Zhao, N., Bagaria, H.G., Wong, M.S. and Zu, Y. 2011. A nanocomplex that is both tumour cell selective and cancer gene specific for anaplastic large cell lymphoma. *J. Nanobiotechnol.*, 9, 2-14.

[1278] Zheng, D., Gilijohann, A, Chen, D.L., Massich, M.D., Wang, X-Q., Lordanov, H., Mirkin, C.A. and Paller, A.S. 2012. Topical delivery of siRNA basedspherical nucleic acid nanoparticle conjugates for gene regulation. *Proc. Natl. Acad. Scii.(USA)*, 109, 11975-11980.

[1279] J. Correa-Betanzo a, E. Allen-Vercoe b, J. McDonald b, K. Schroeter b, M. Corredig a, G. Paliyath (2014) Stability and biological activity of wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) polyphenols during simulated in vitro gastrointestinal digestion. *Food Chemistry* 165 (2014) 522-531;

[1280] Julieta Correa-Betanzo, Priya Padmanabhan,, Milena Corredig, Jayasankar Subramanian, and Gopinadhan Paliyath (2015) Complex Formation of Blueberry (*Vaccinium angustifolium*) anthocyanins during Freeze-Drying and Its Influence on Their Biological Activity. *J. Agric. Food Chem.* 2015, 63, 2935-2946) .

[1281] 本文及说明书中其他地方所引用的所有参考文献,在此全部纳入参考。

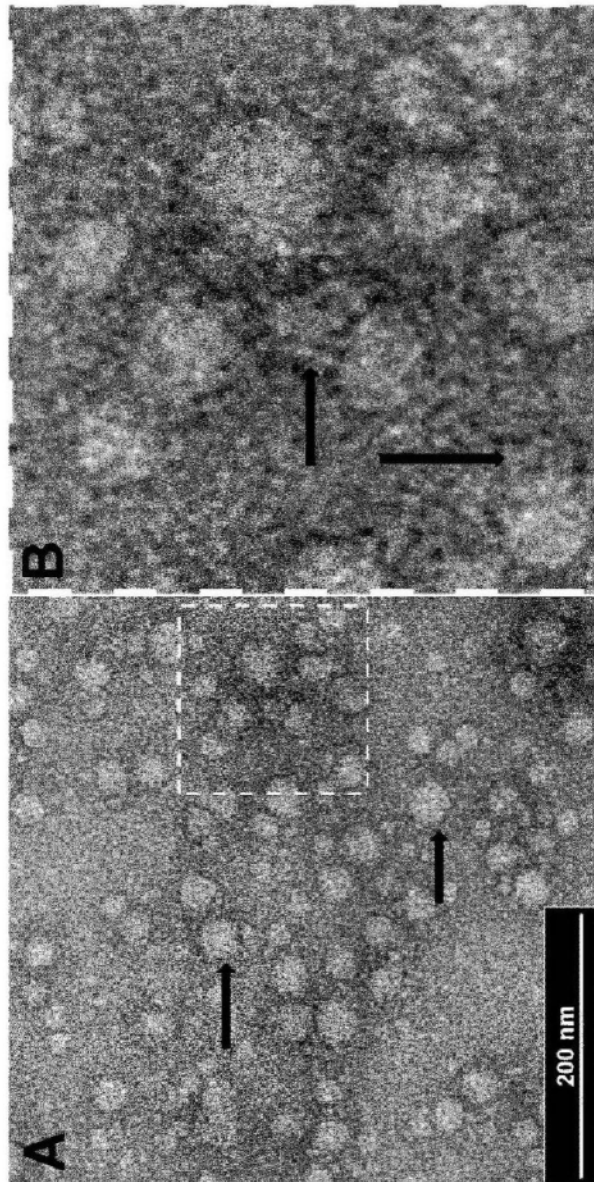


图1

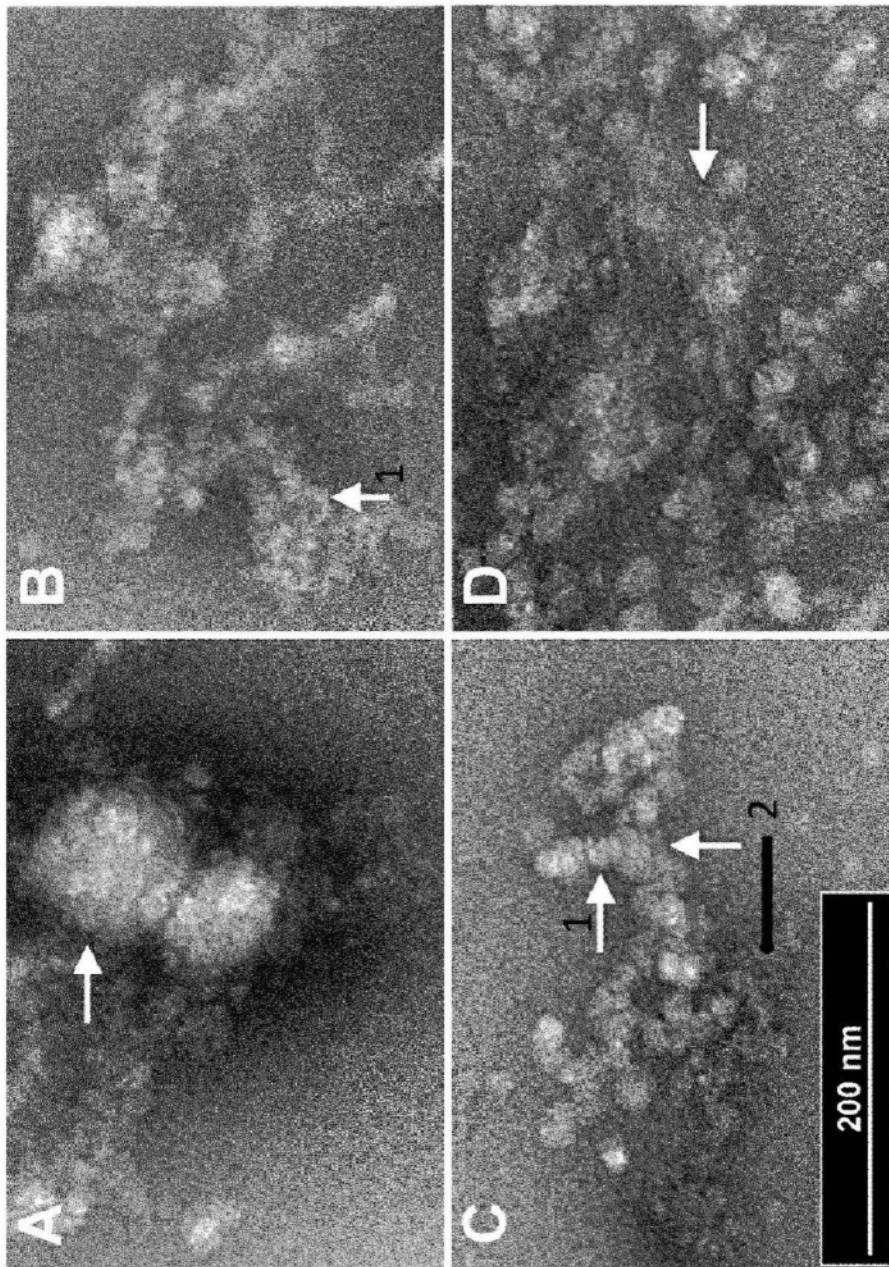


图2

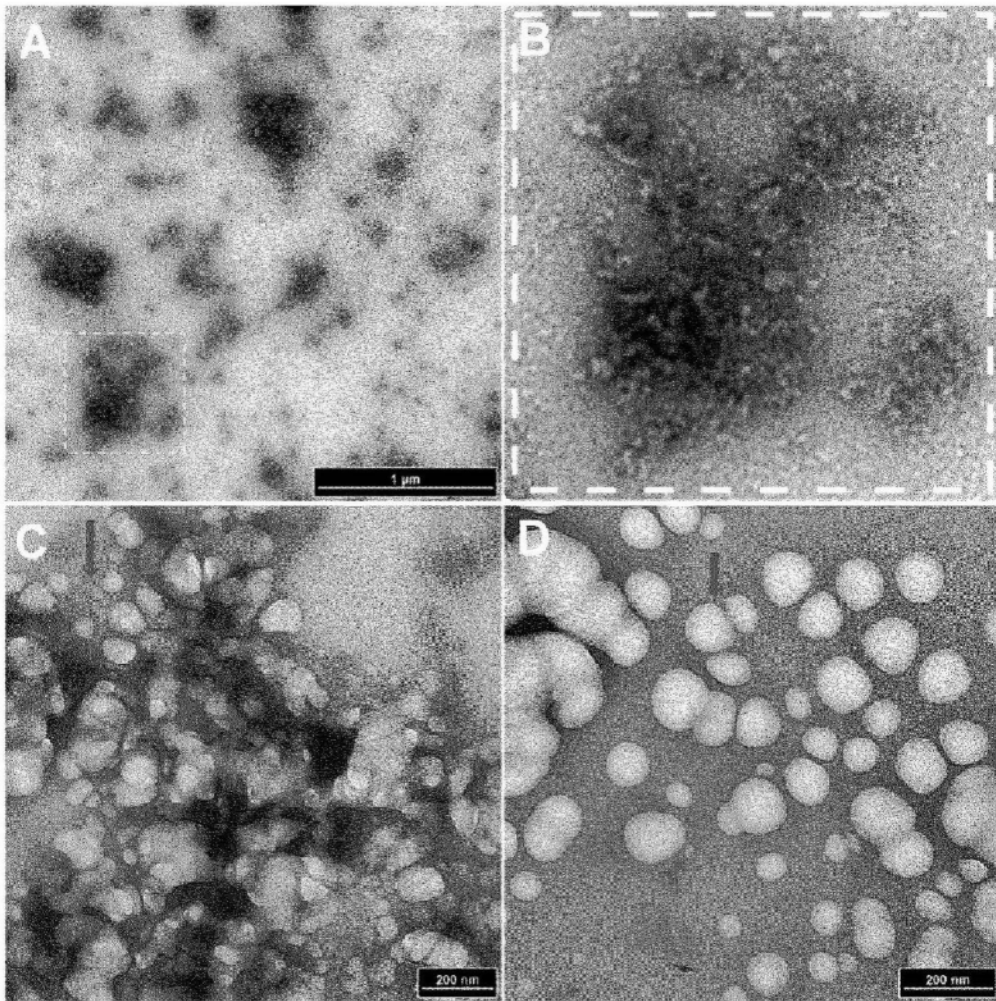


图3

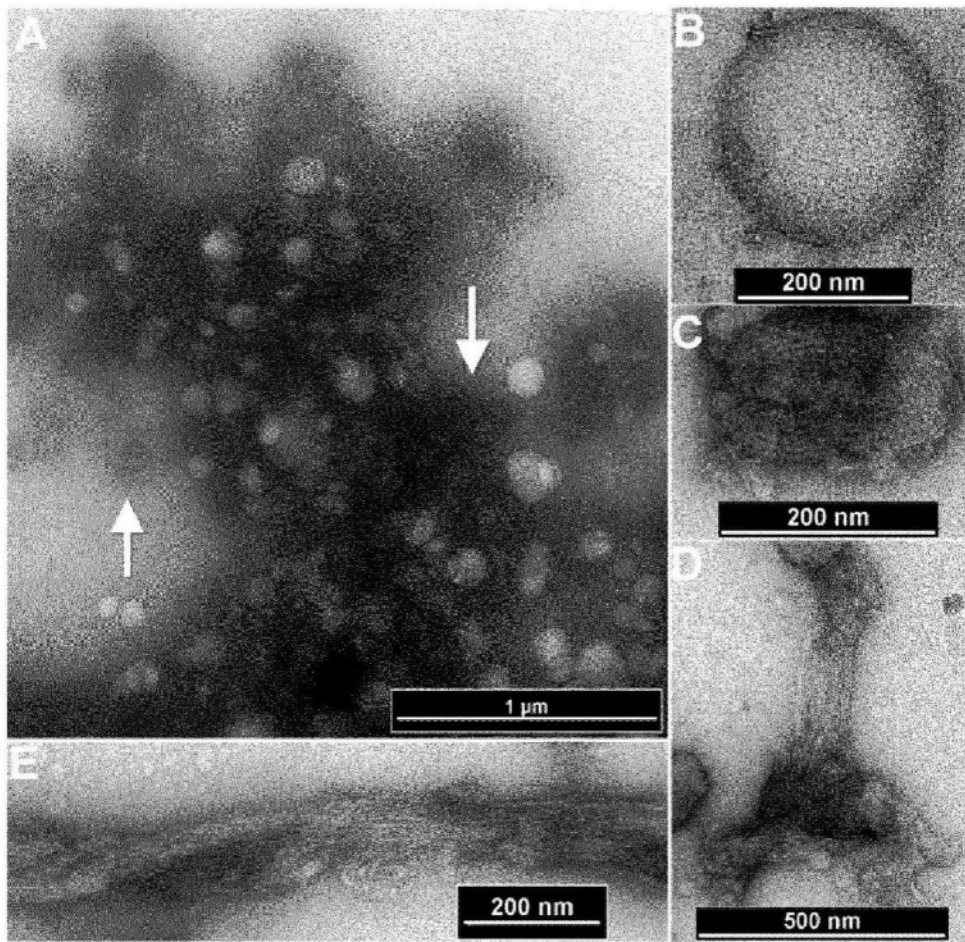


图4

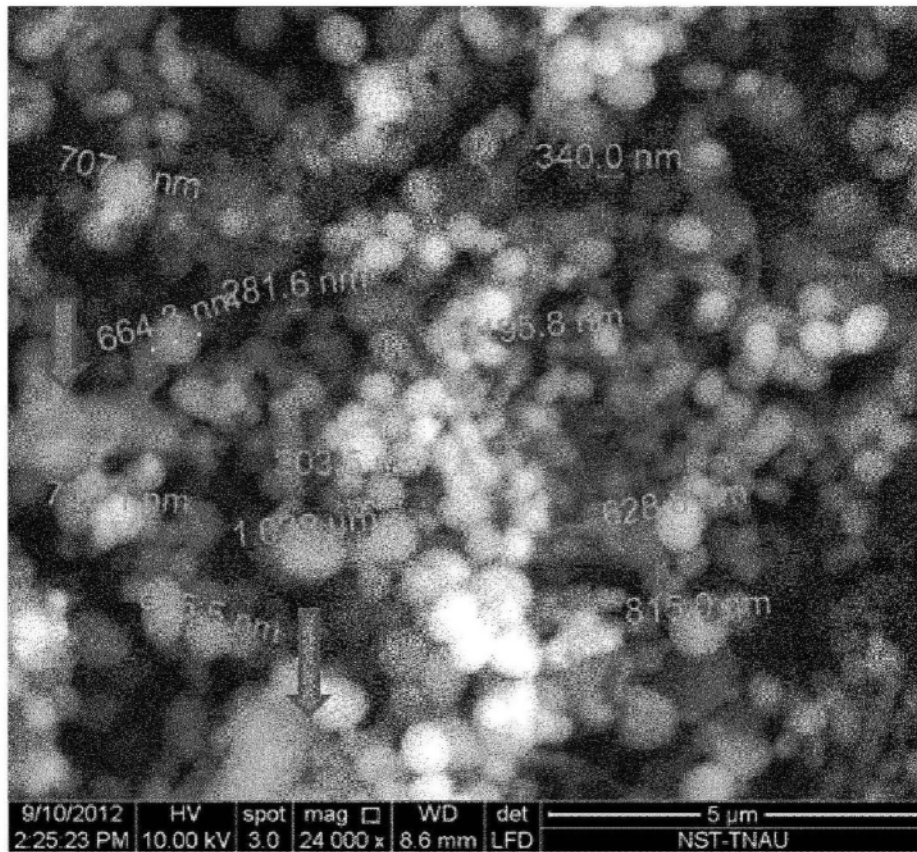


图5

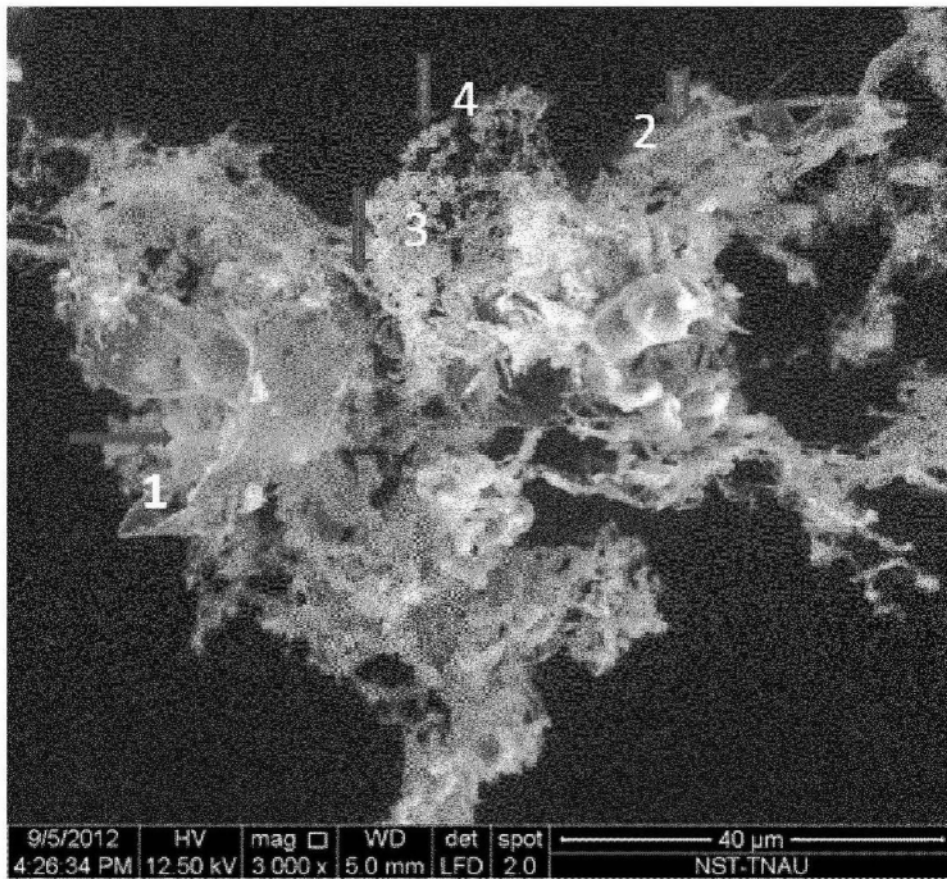


图6

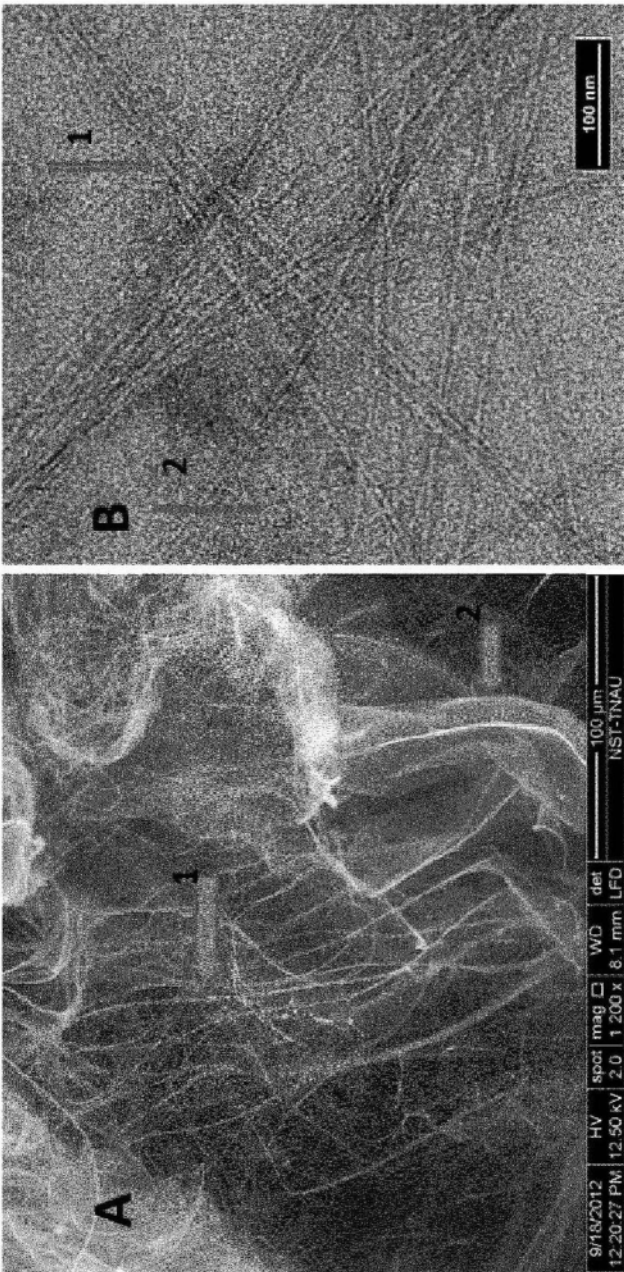


图7

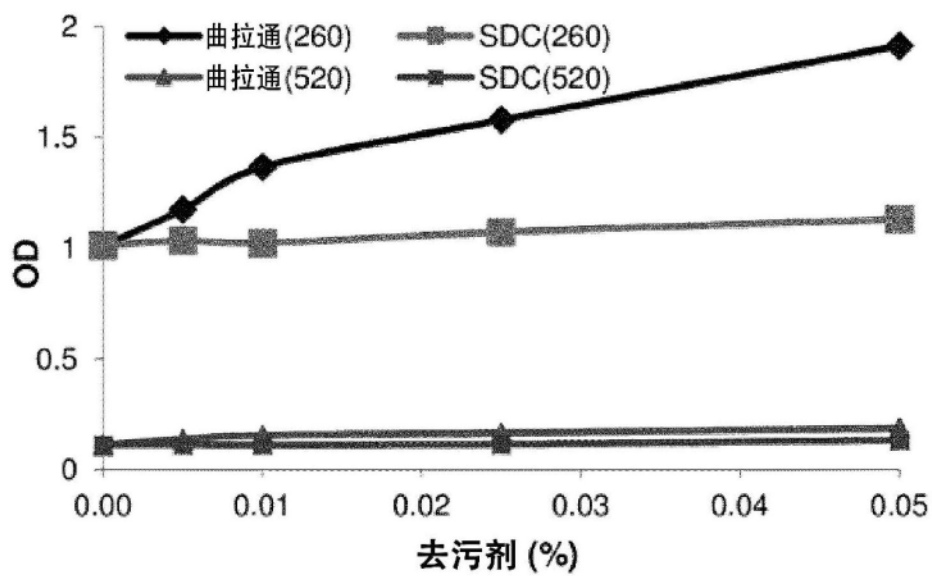


图8

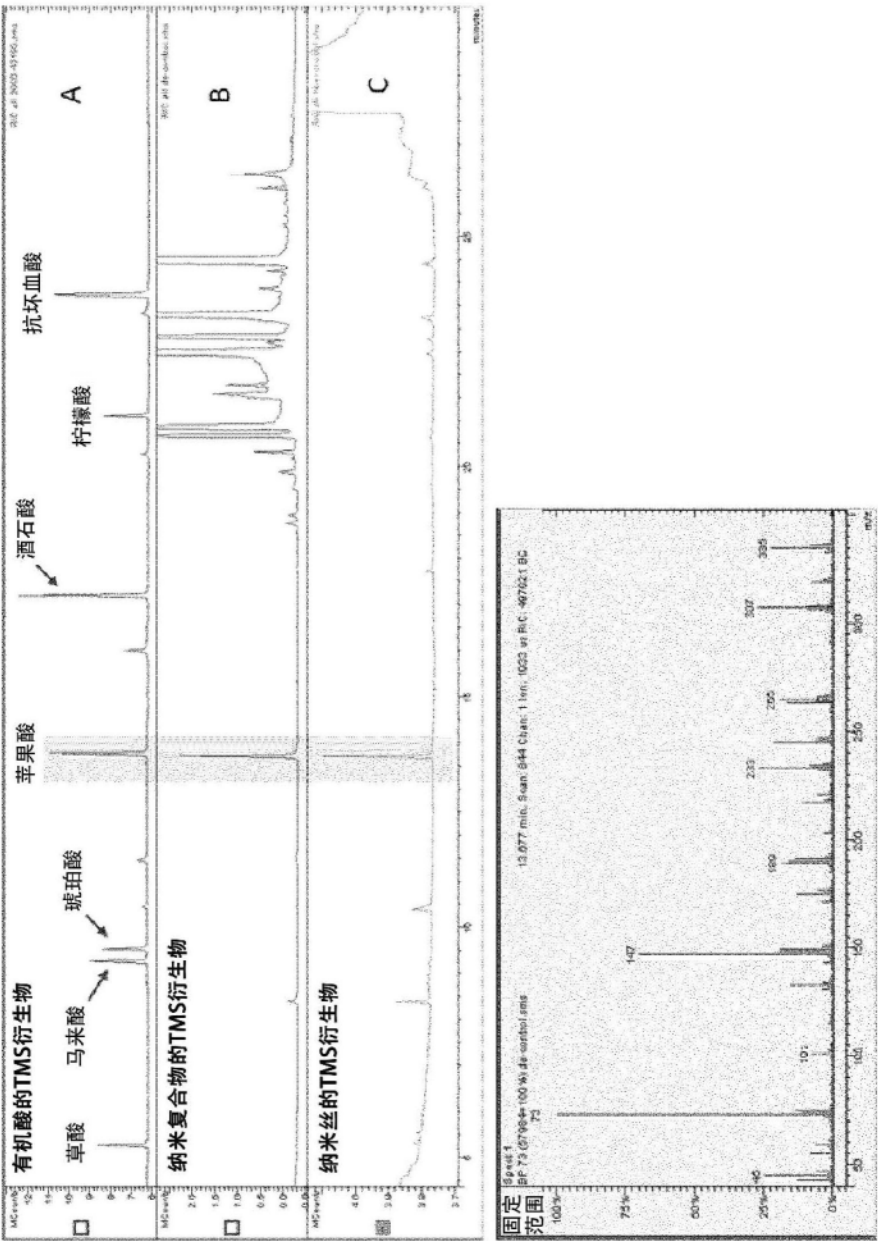


图9

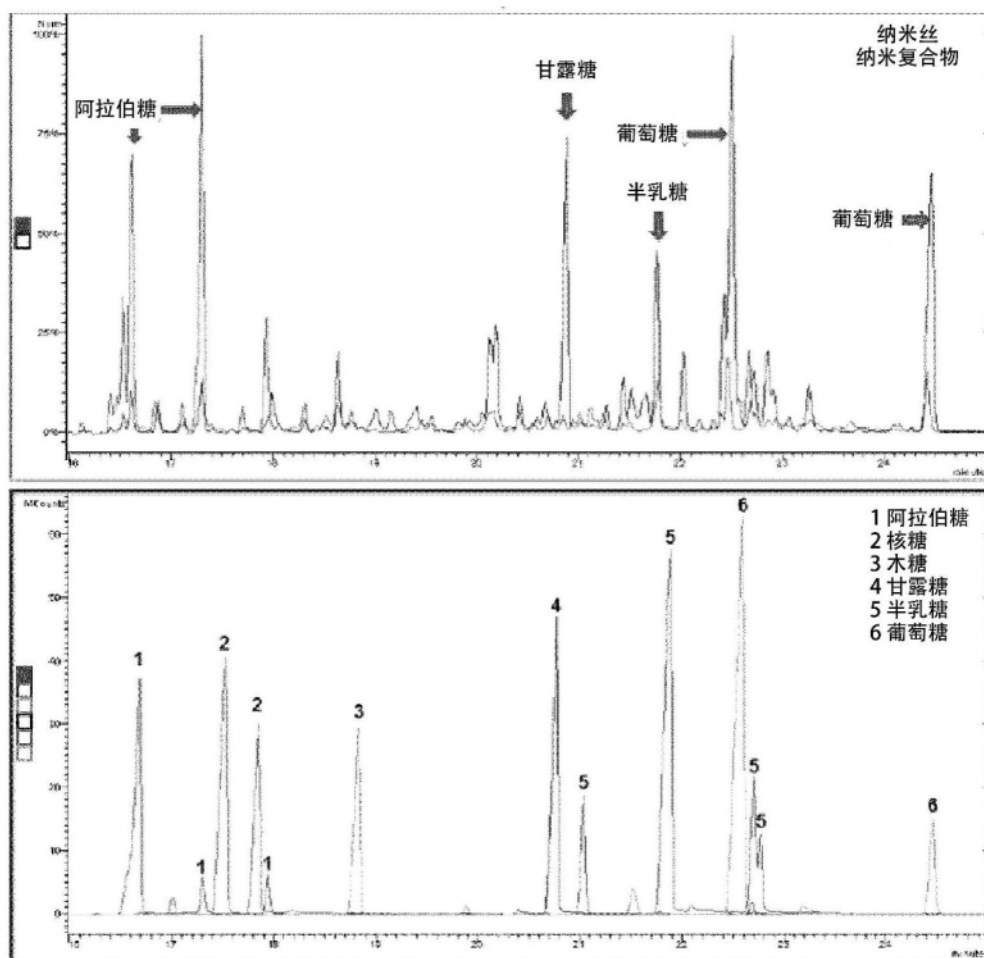


图10

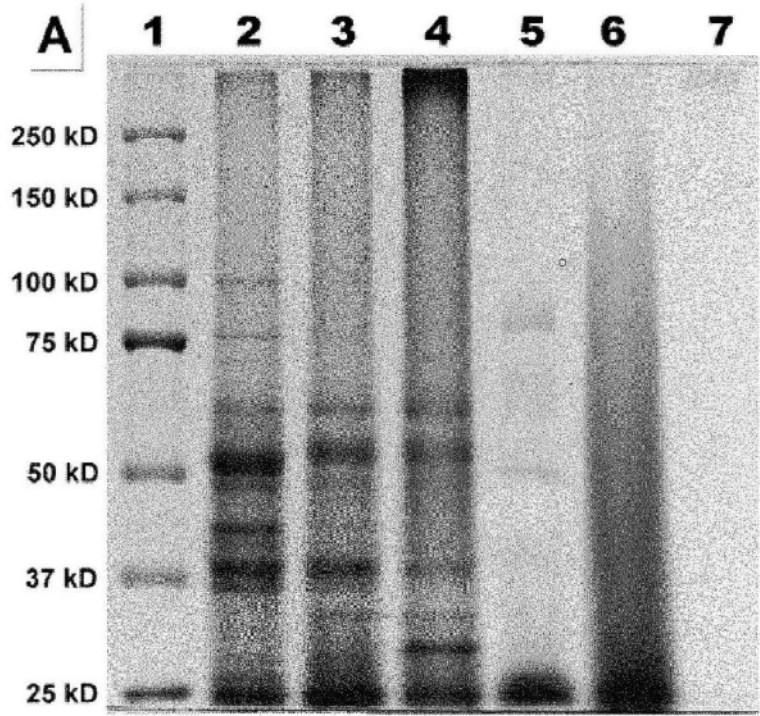


图11

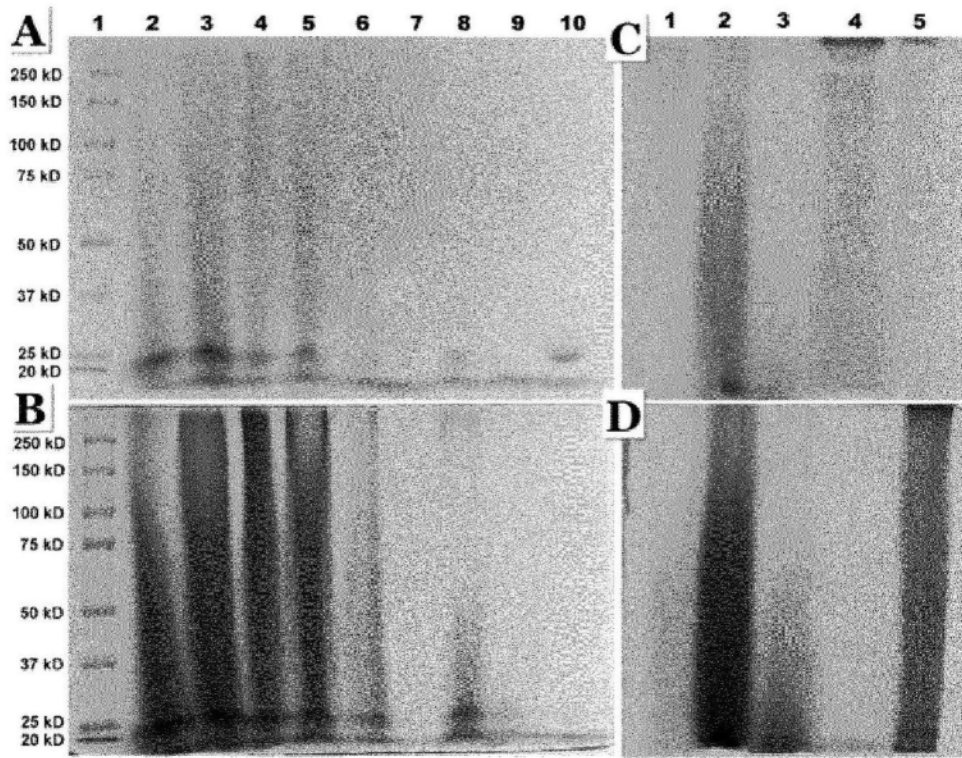


图12

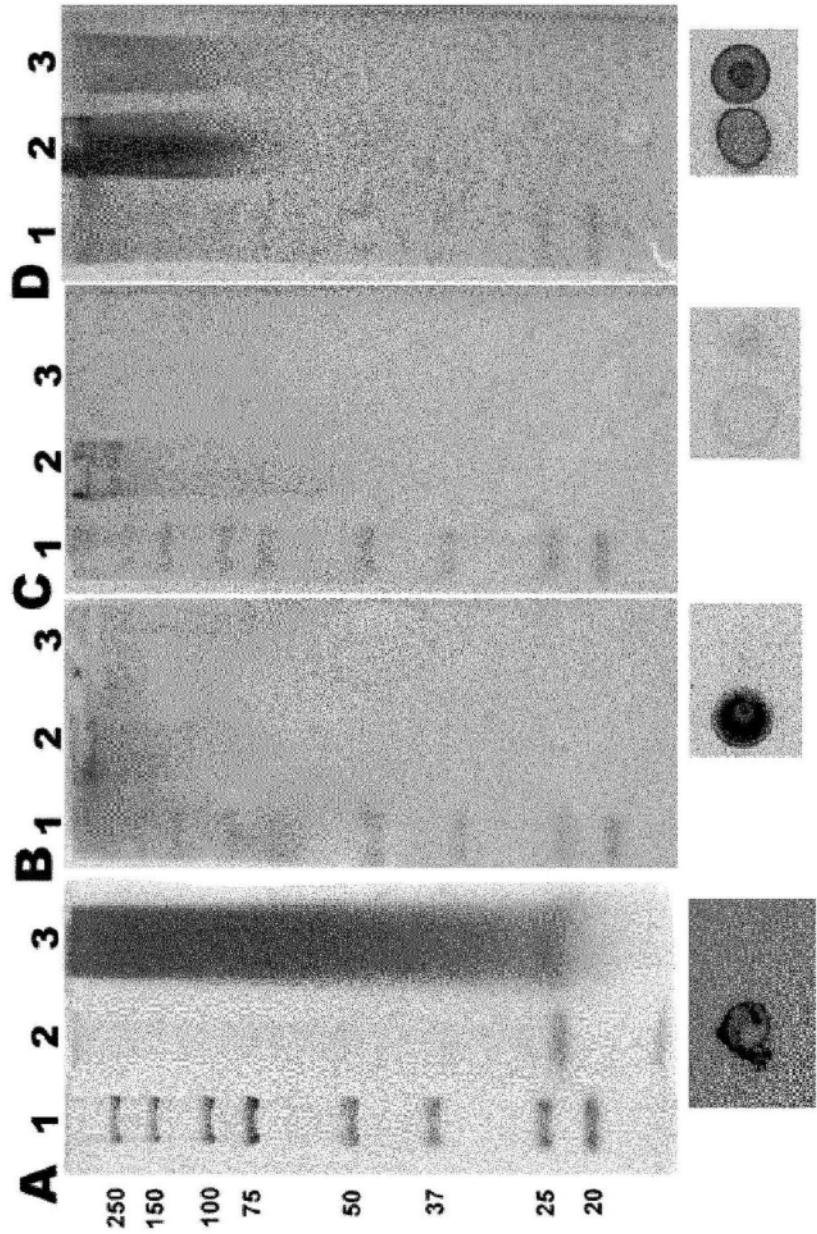


图13

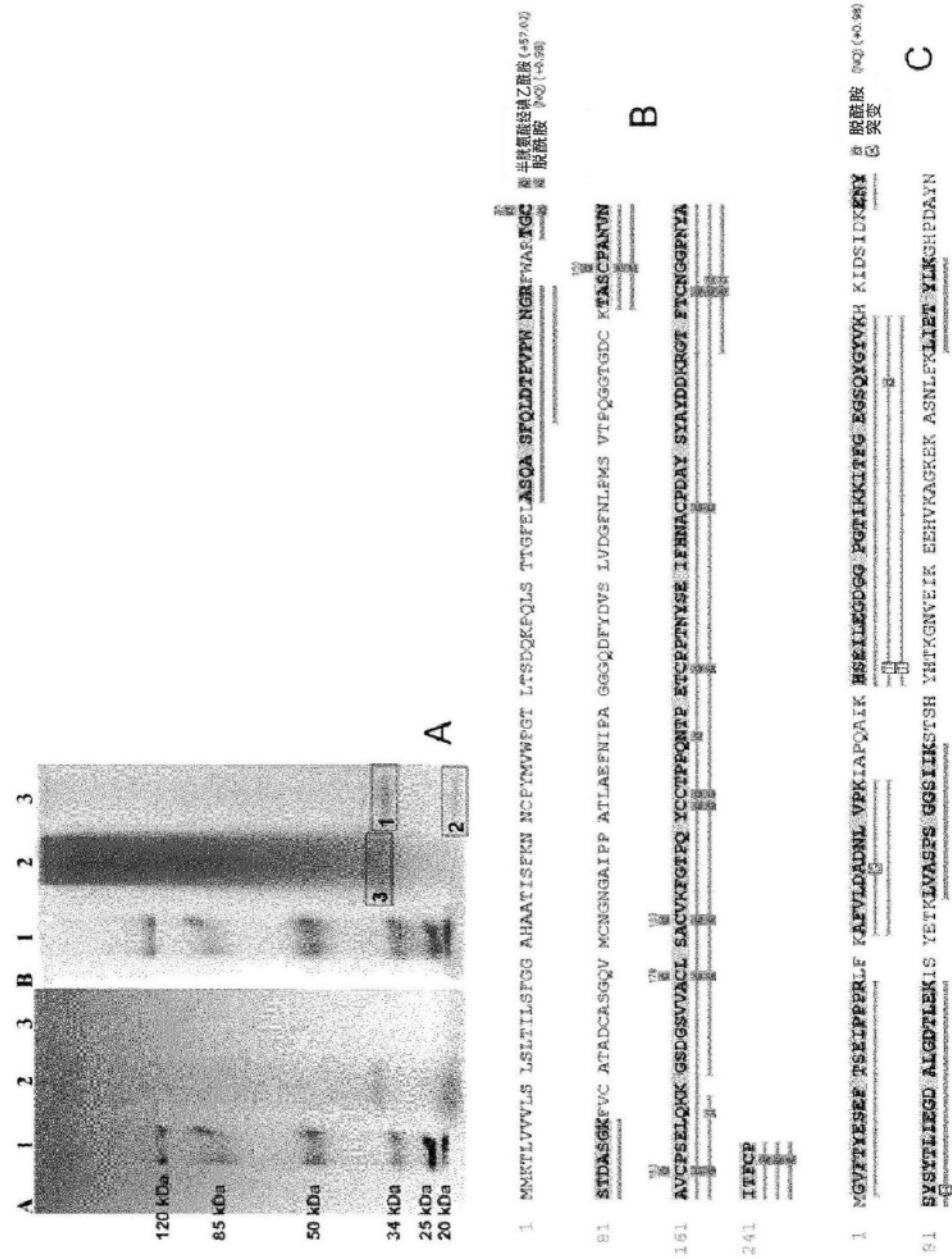


图14

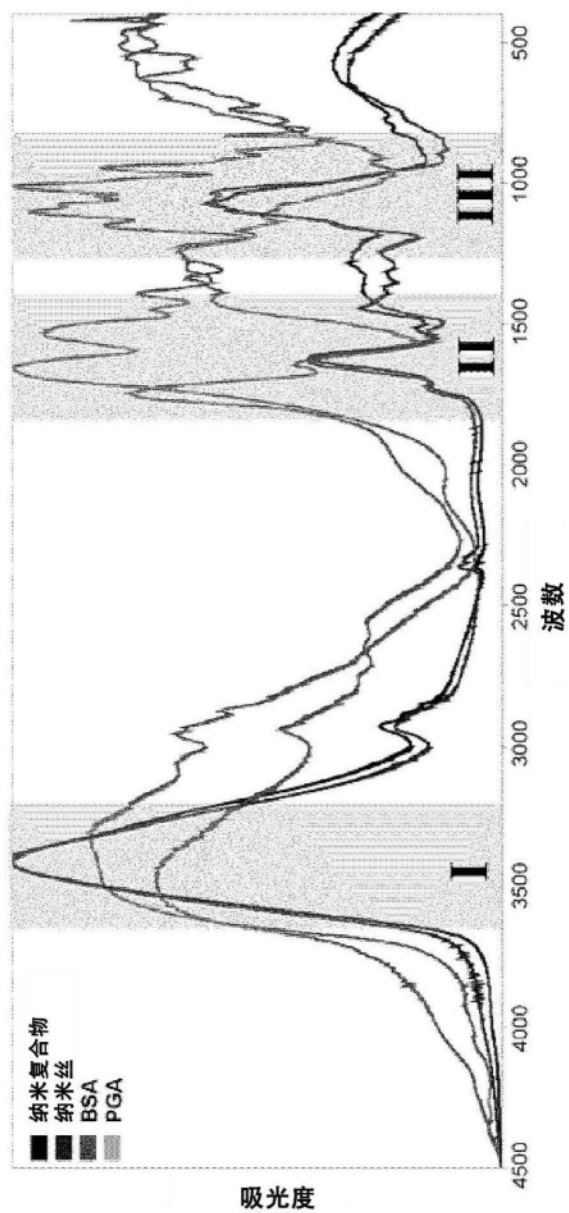


图15

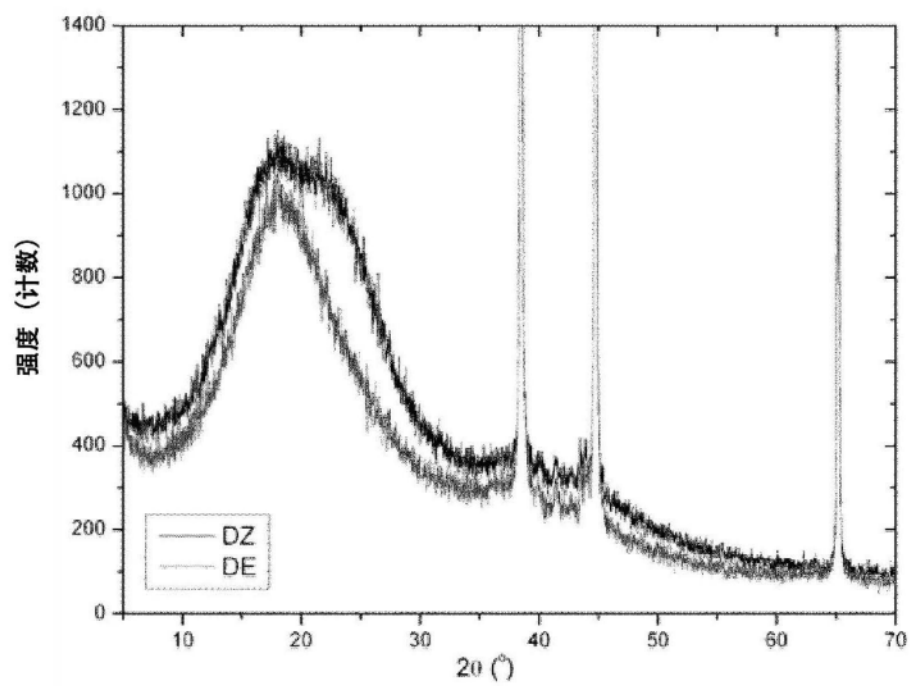


图16

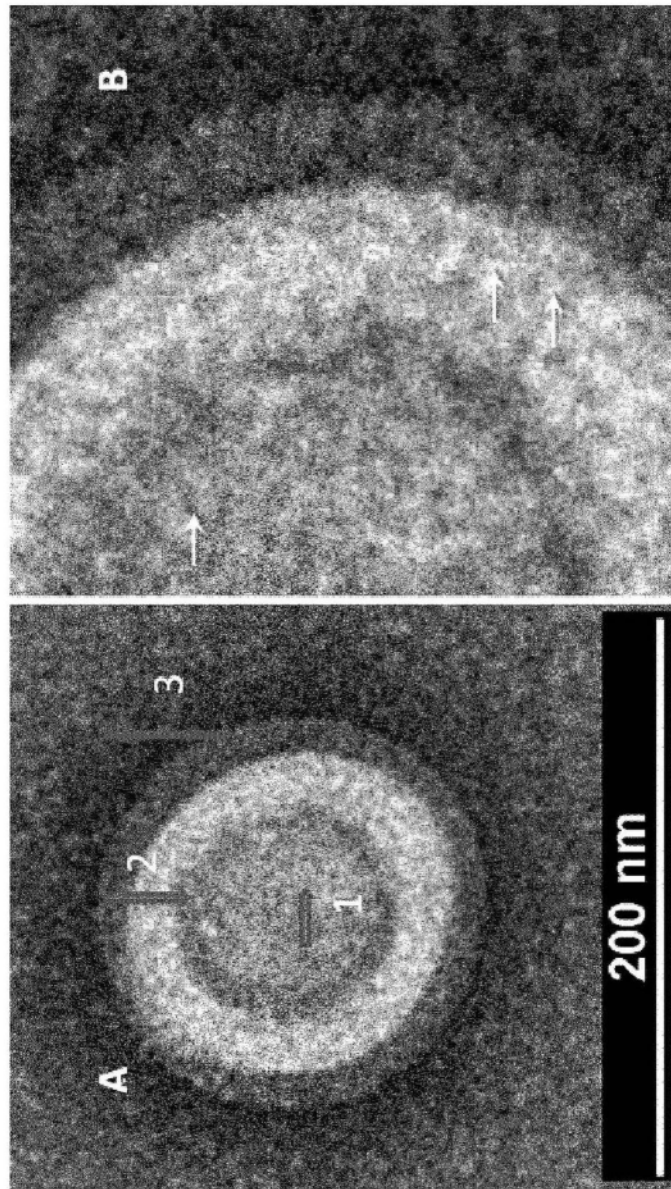


图17

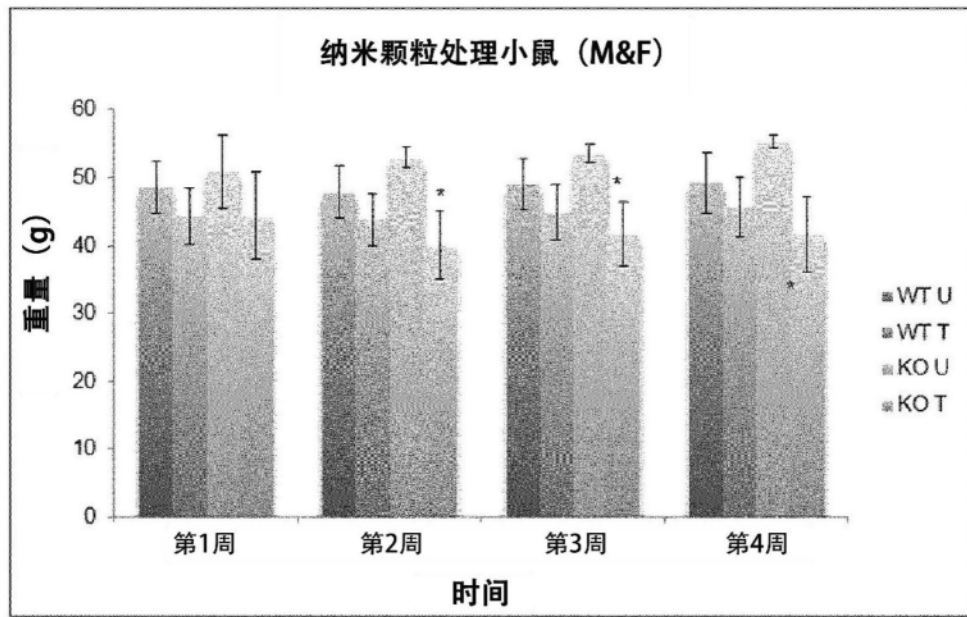


图18

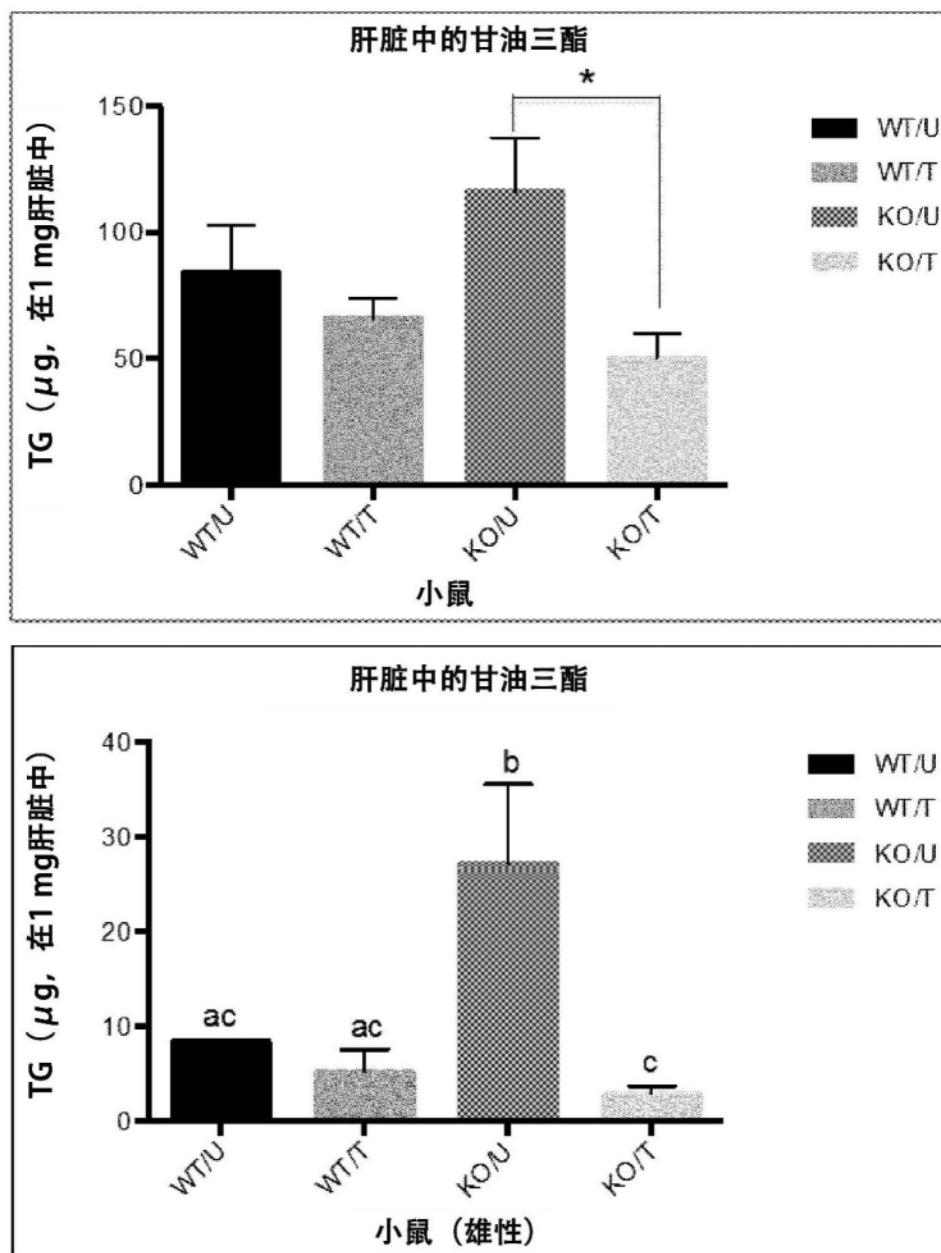


图19

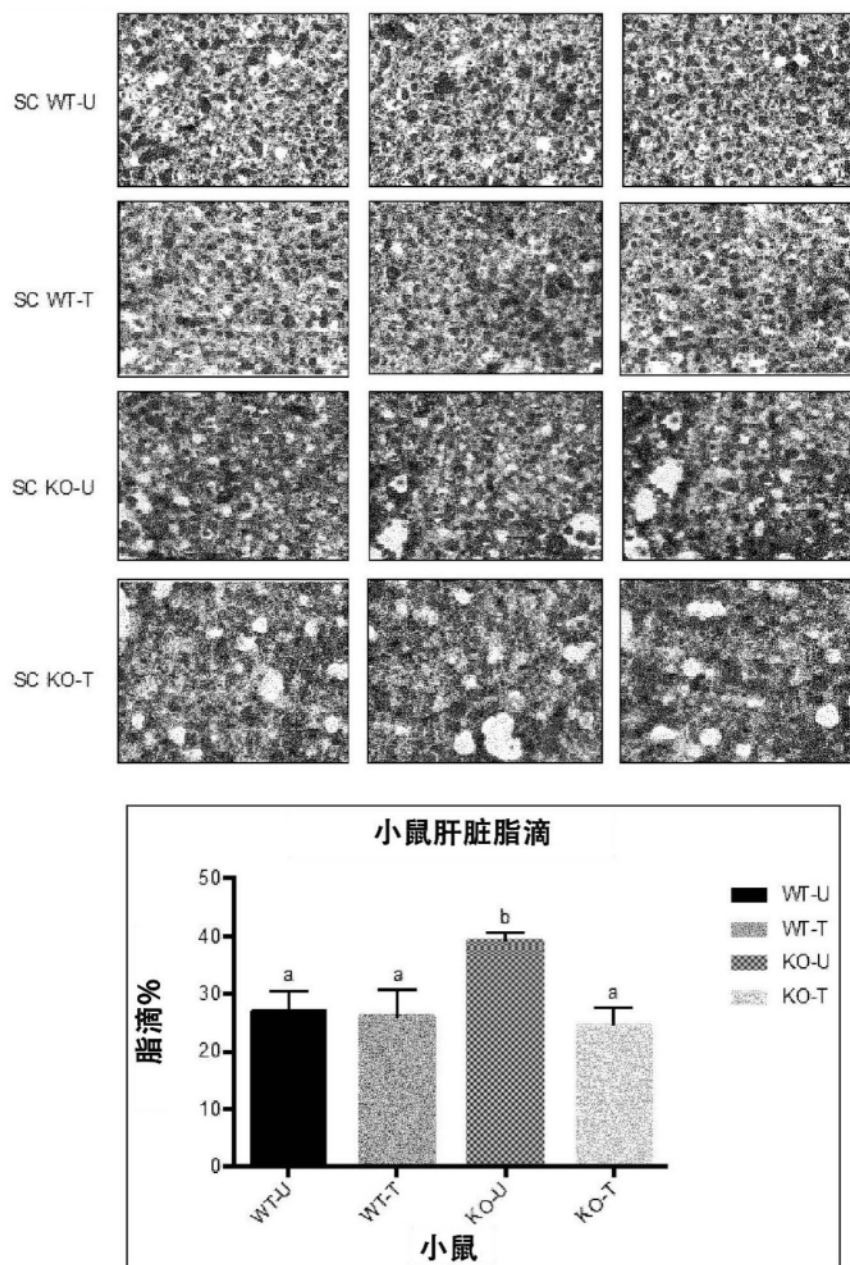


图20

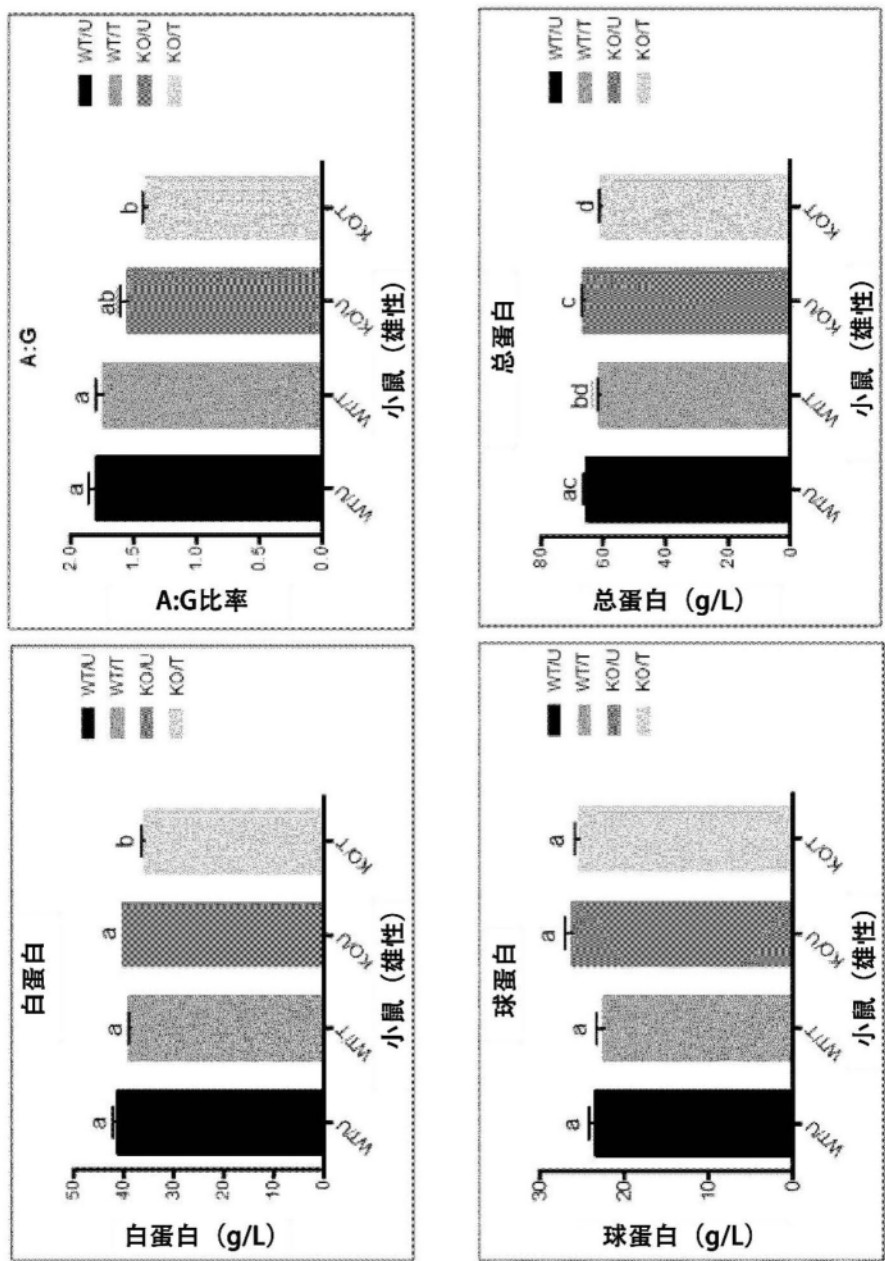


图21

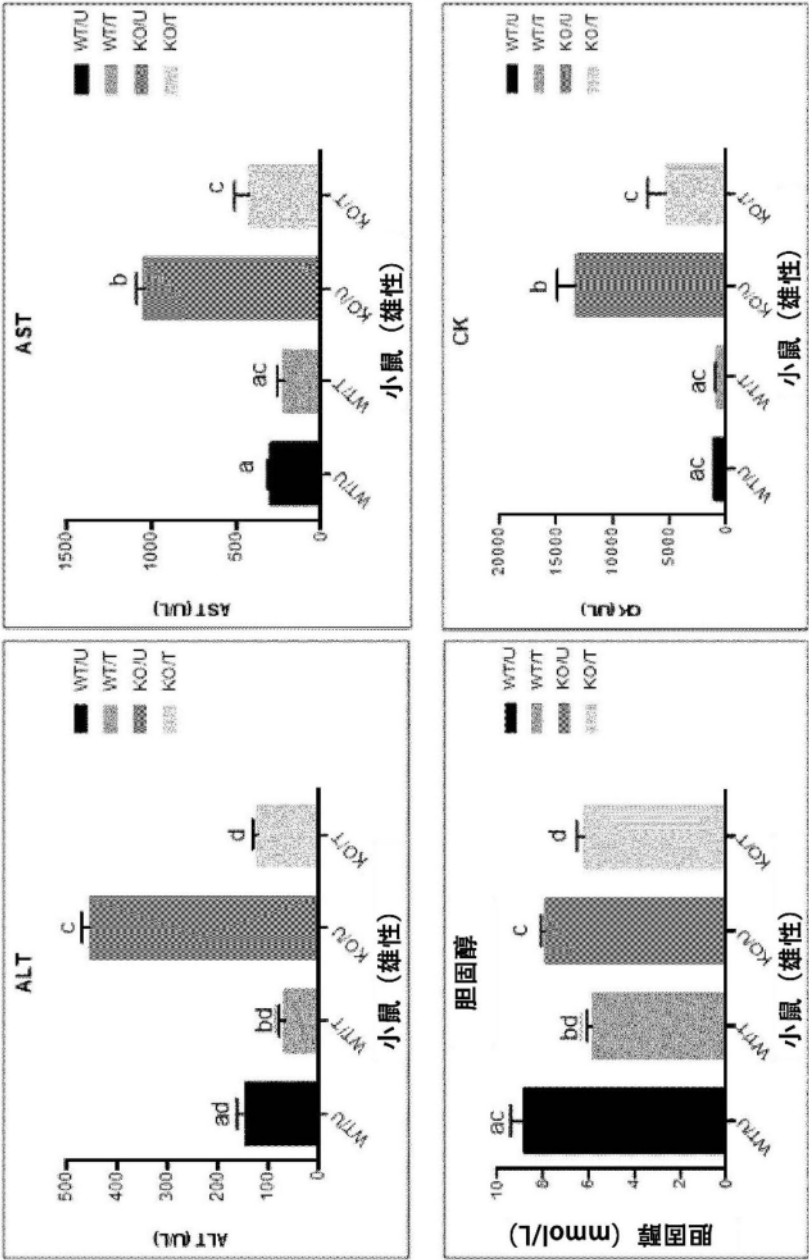


图22

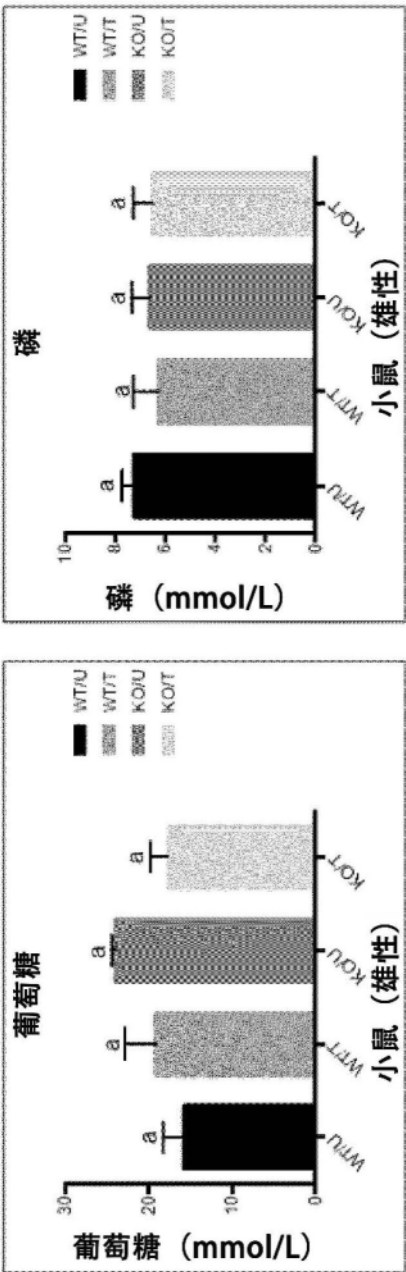


图23

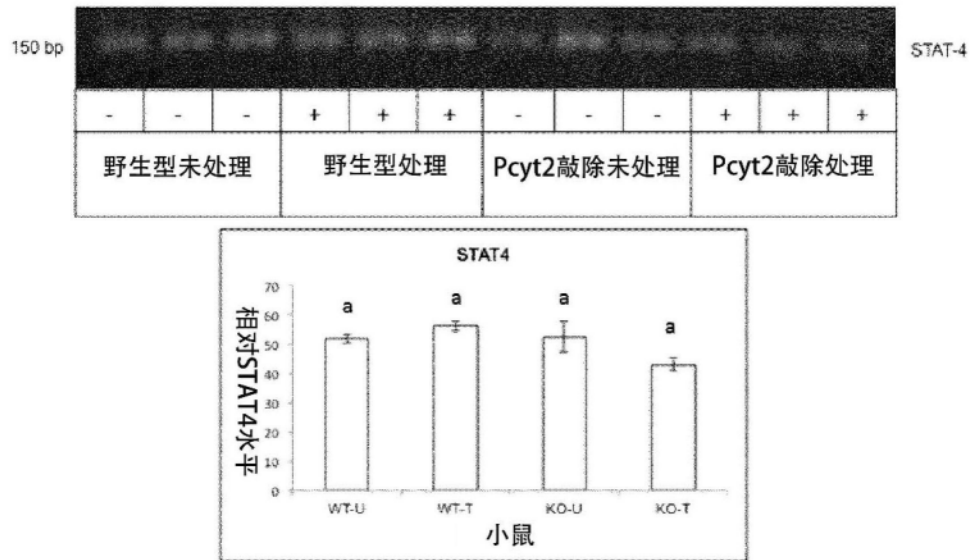


图24

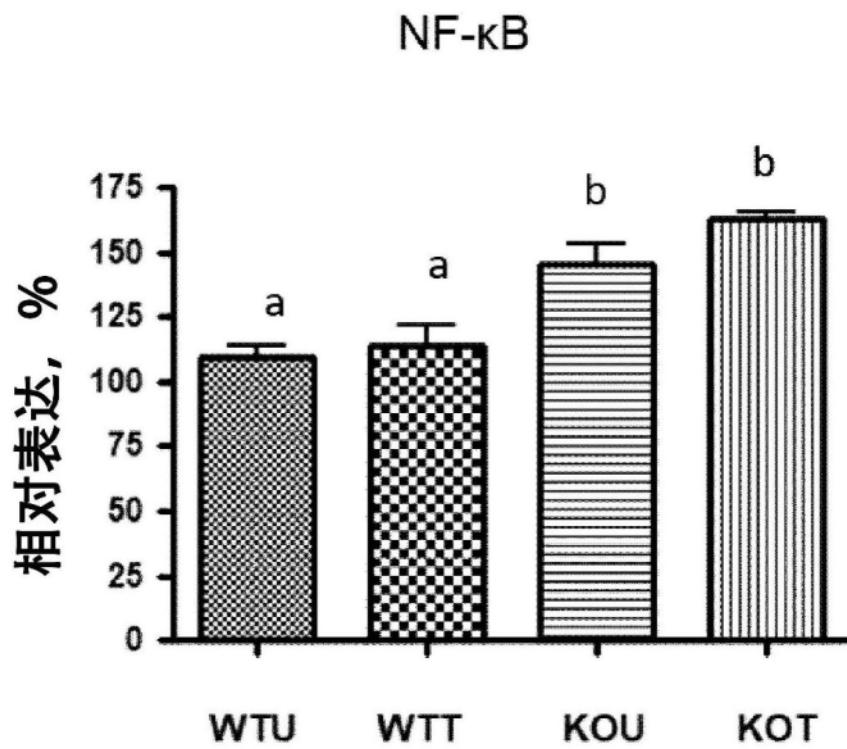


图25

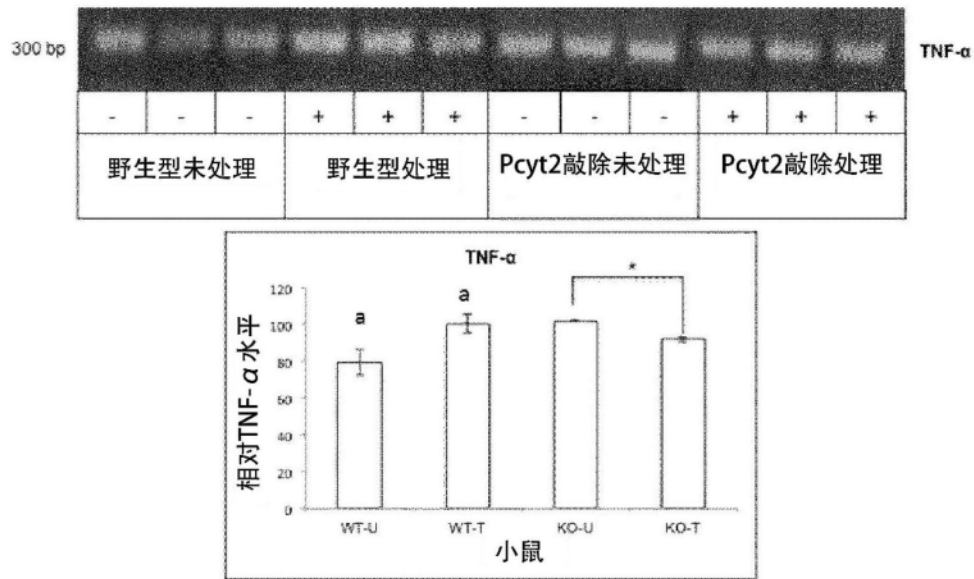


图26

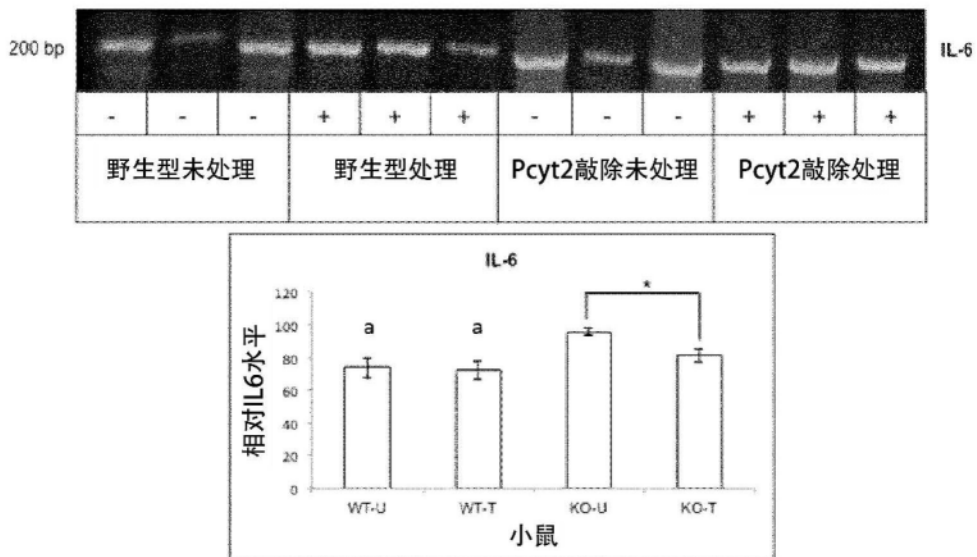


图27

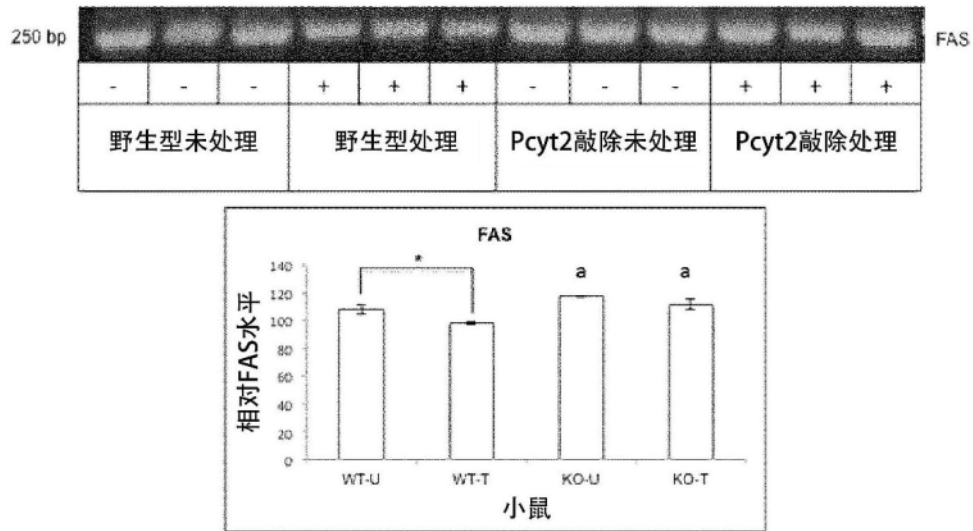


图28

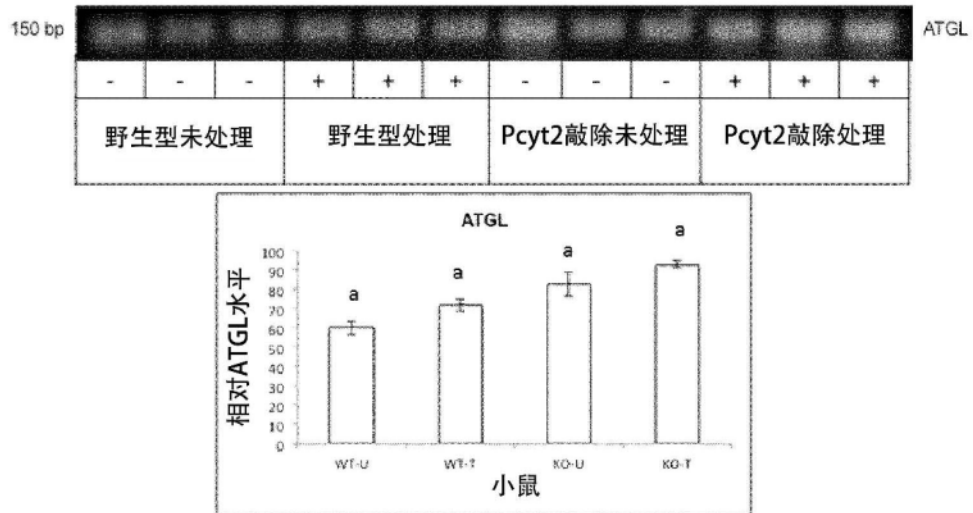


图29

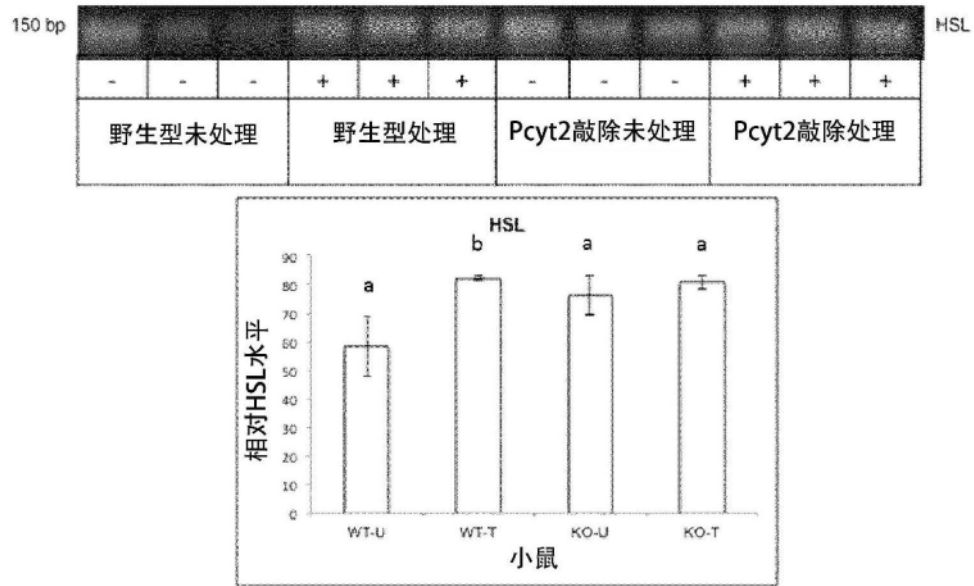


图30

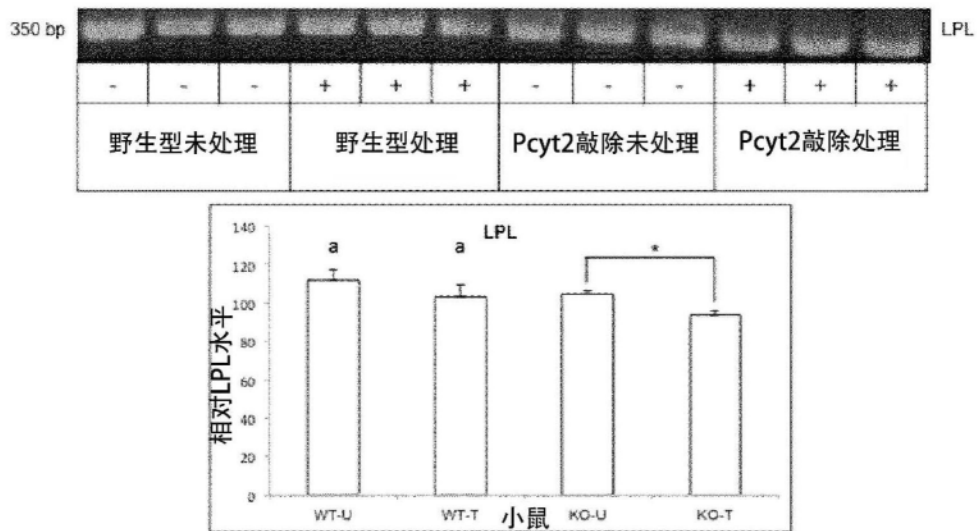


图31

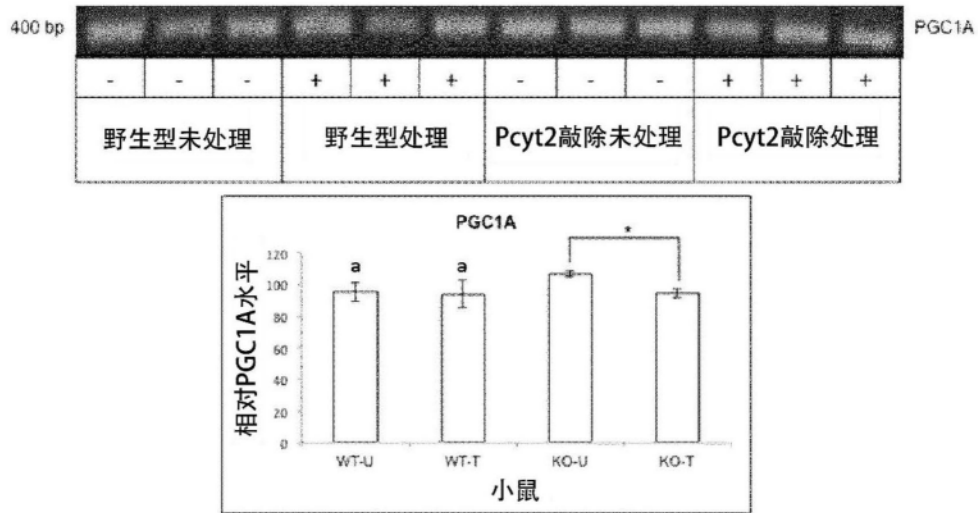


图32

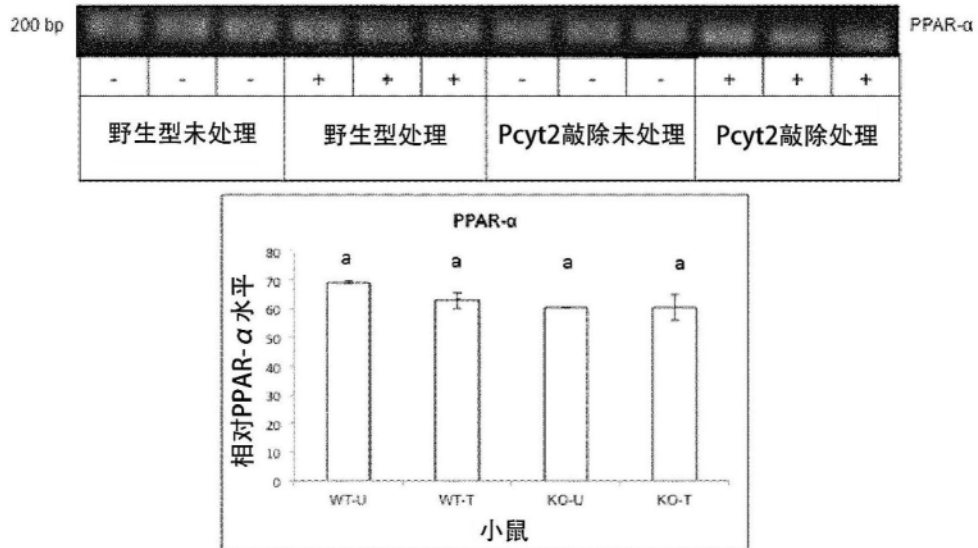


图33

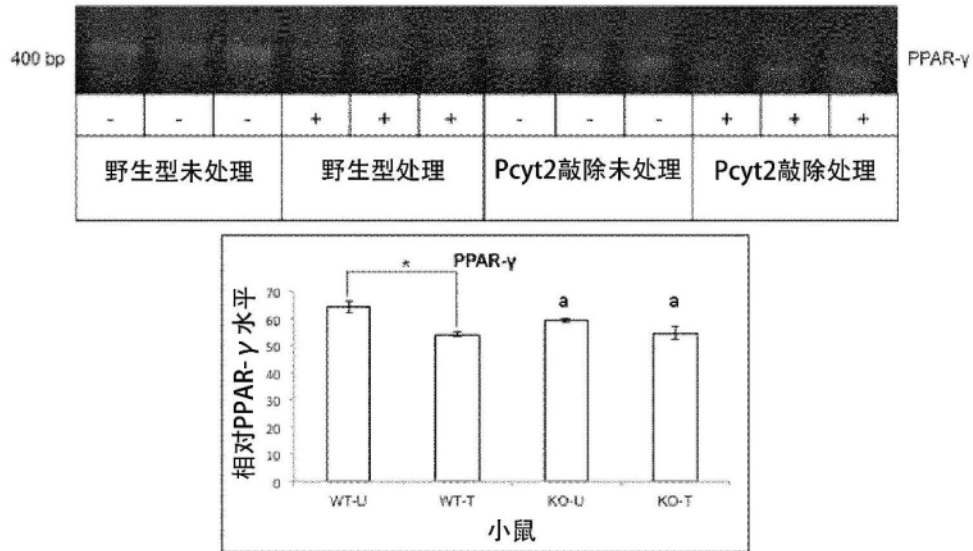


图34

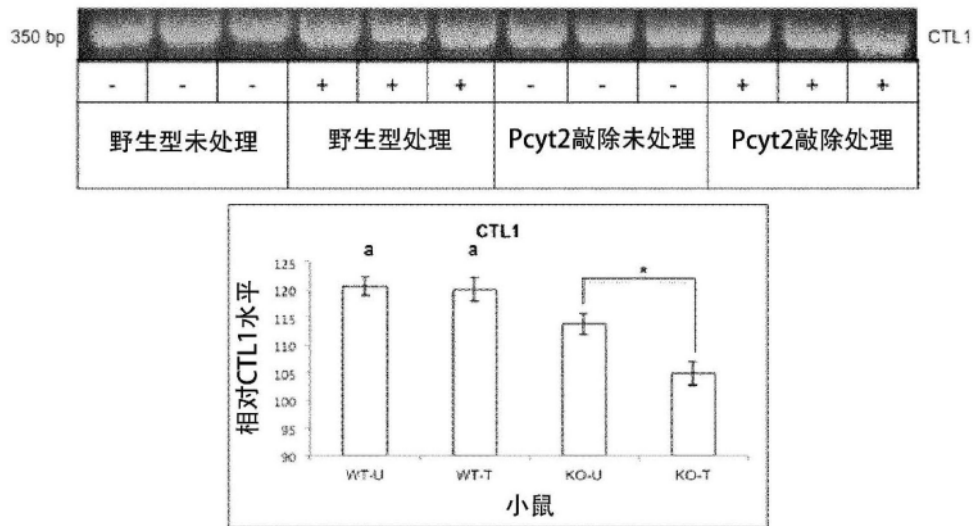


图35

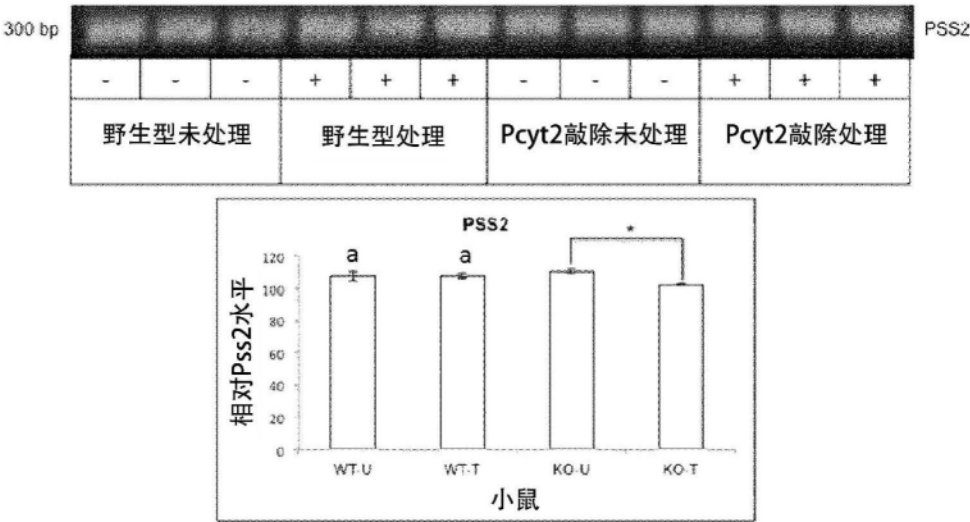


图36

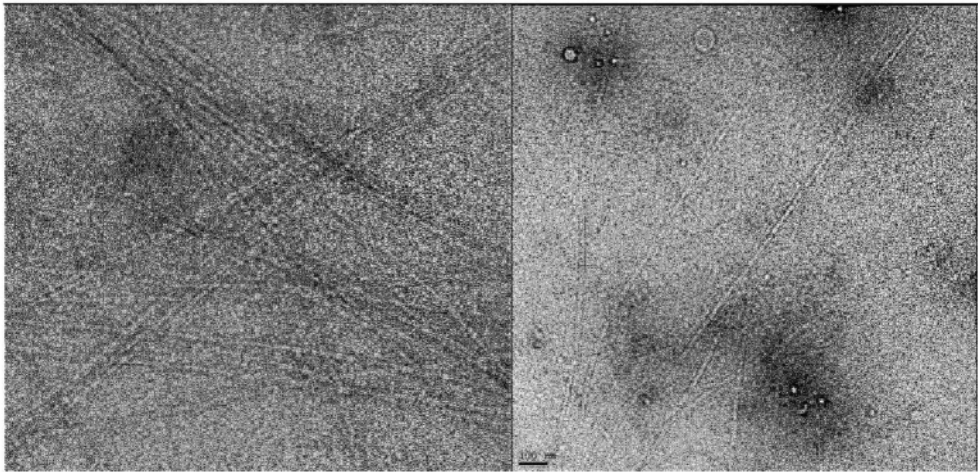


图37

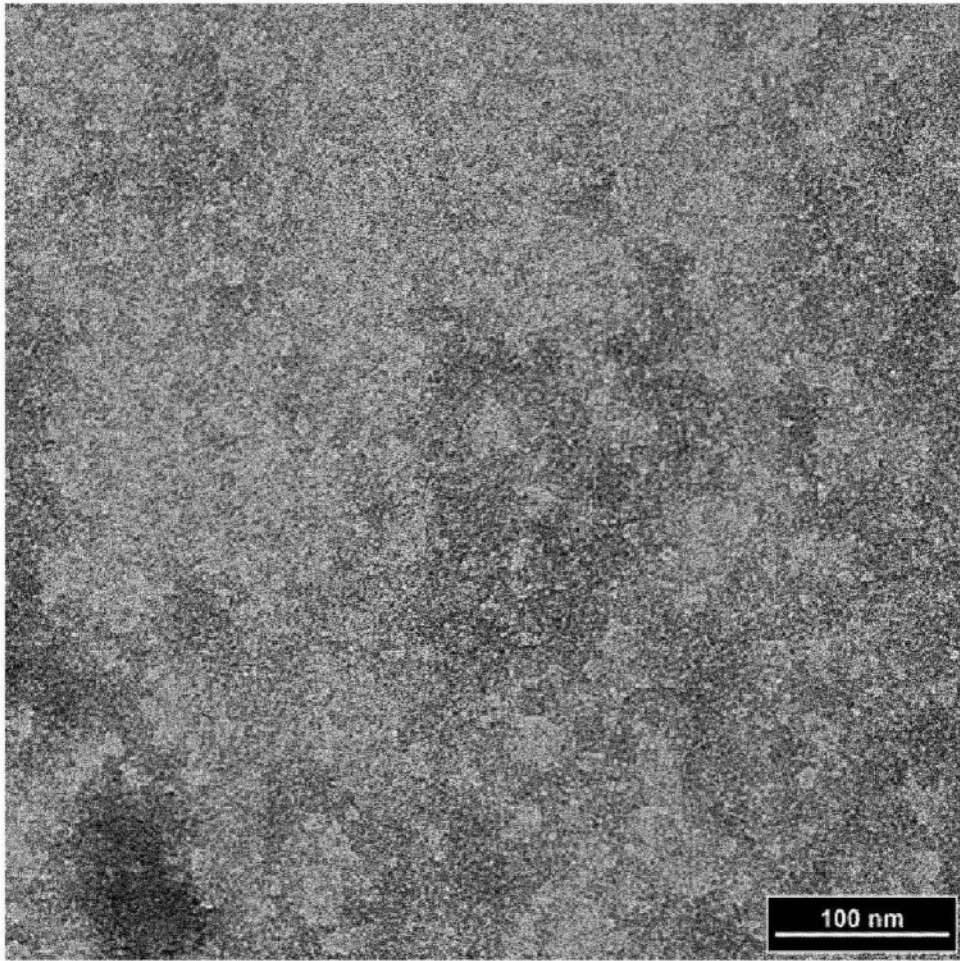


图38

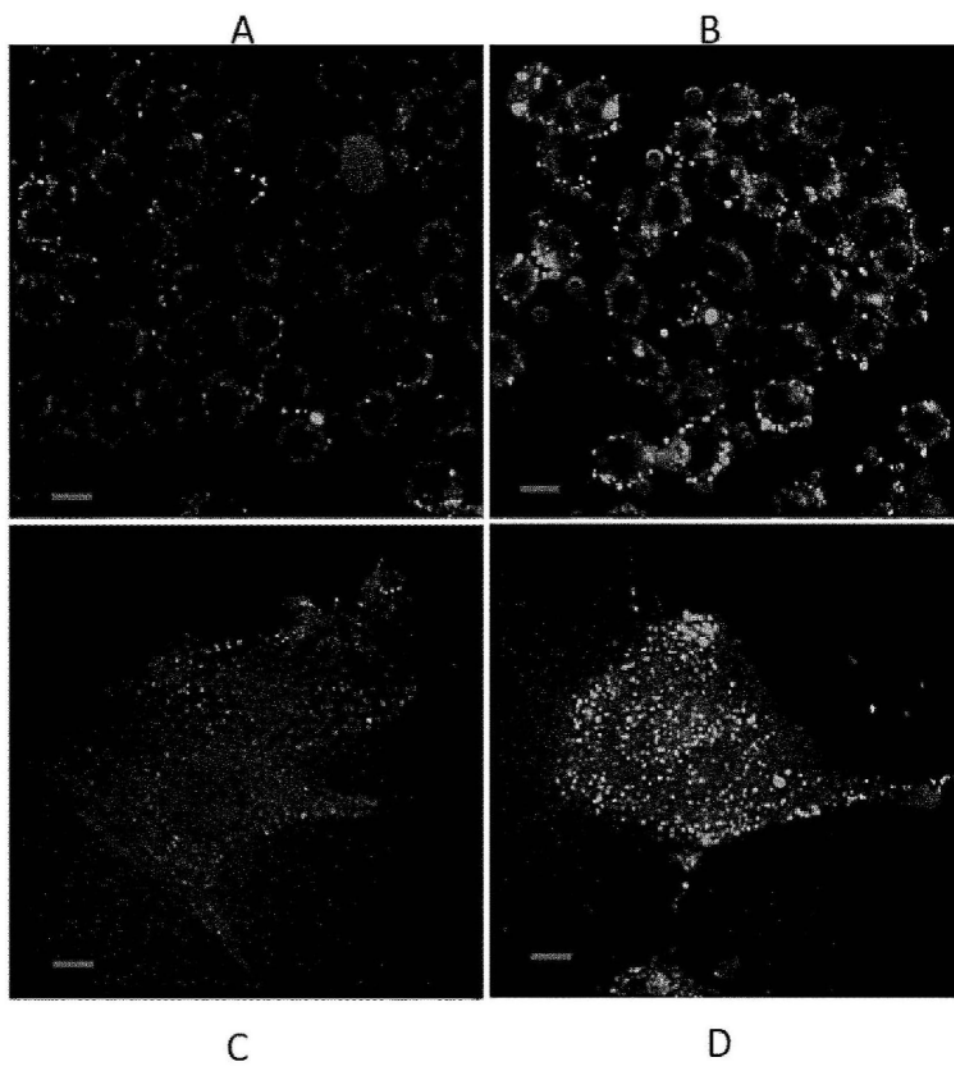


图39

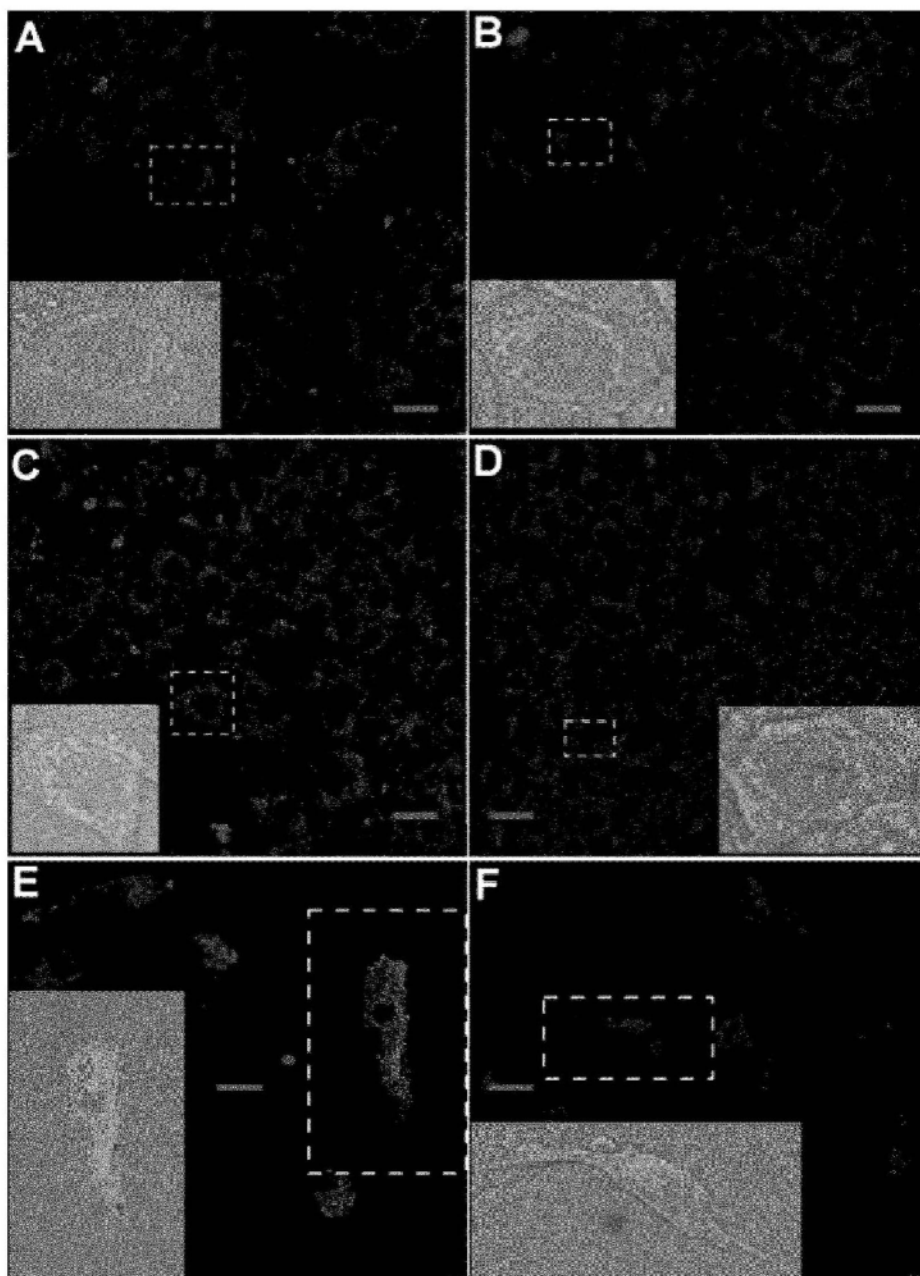


图40

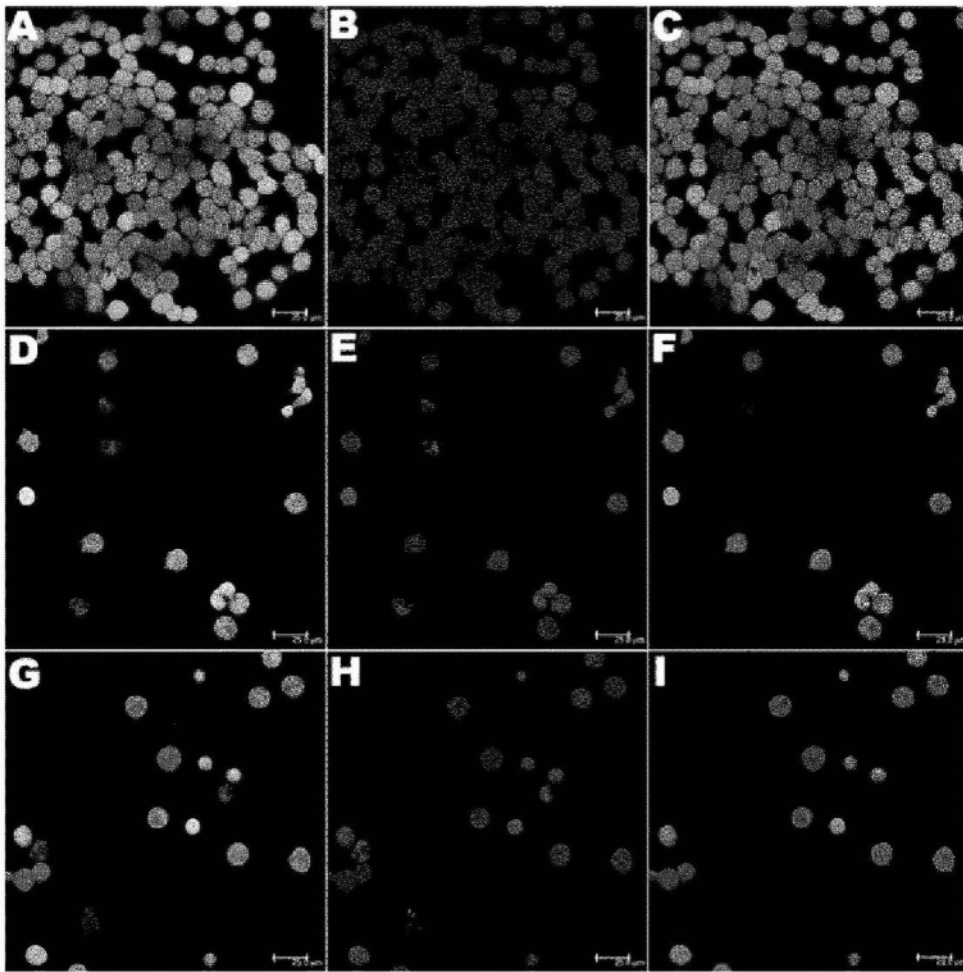


图41

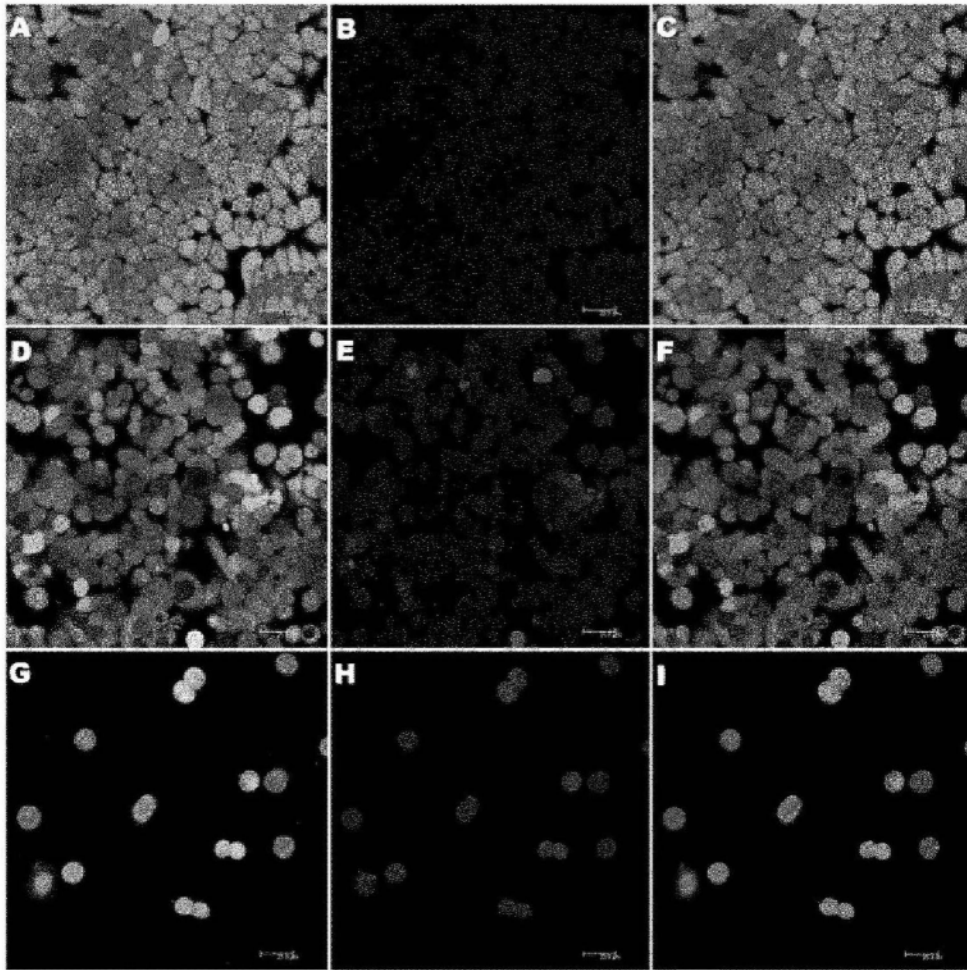


图42

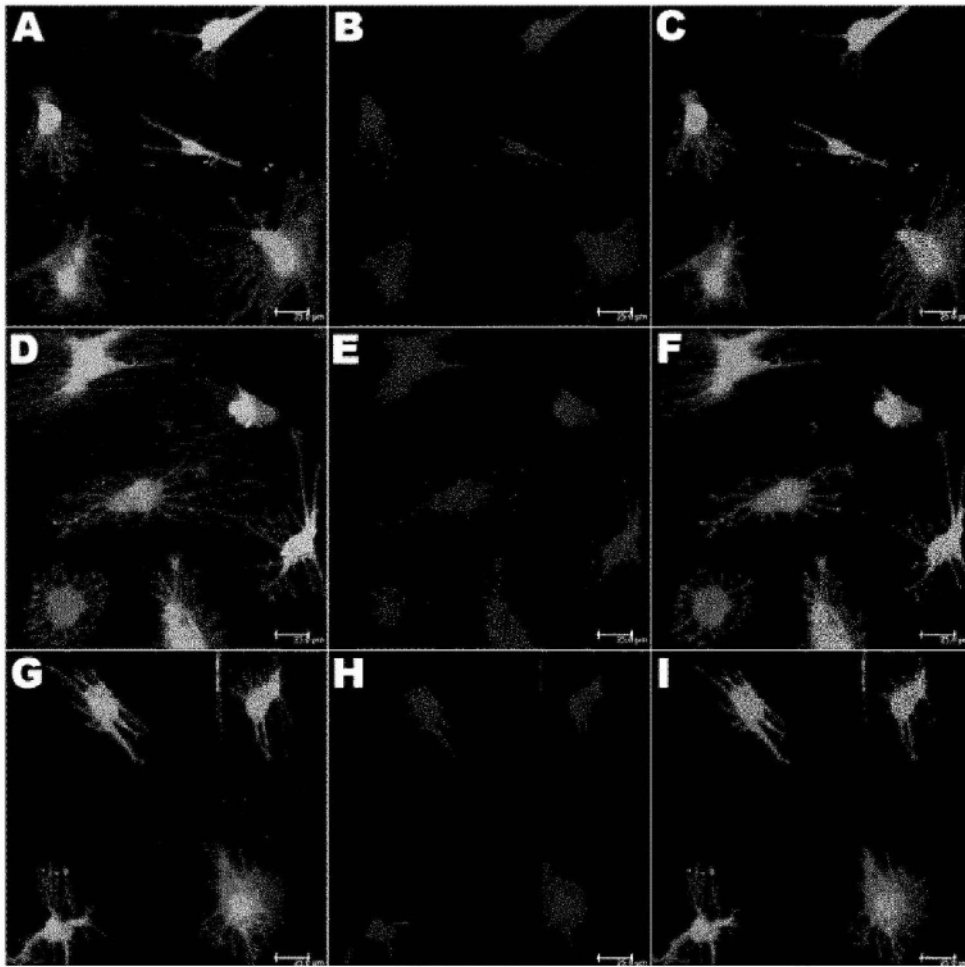


图43

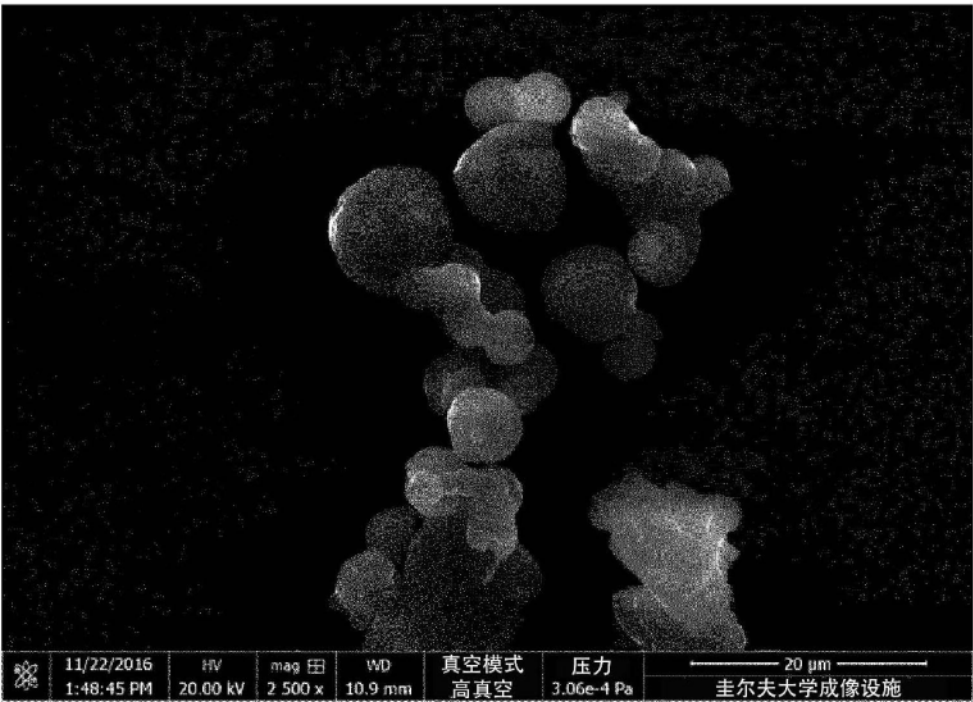


图44

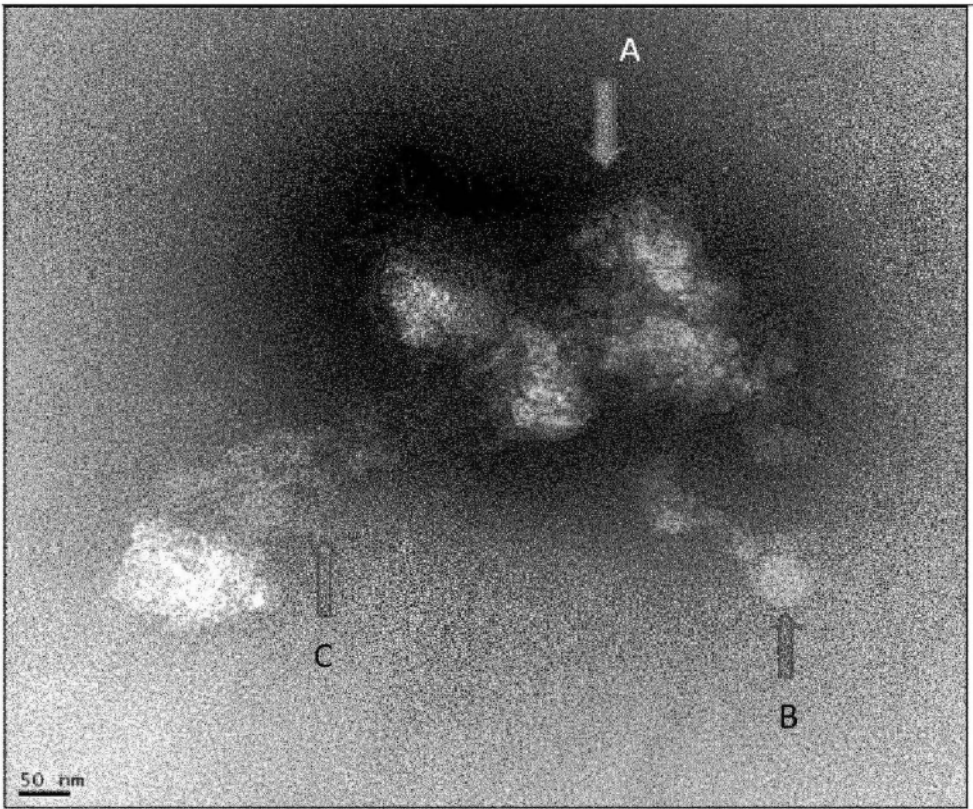


图45

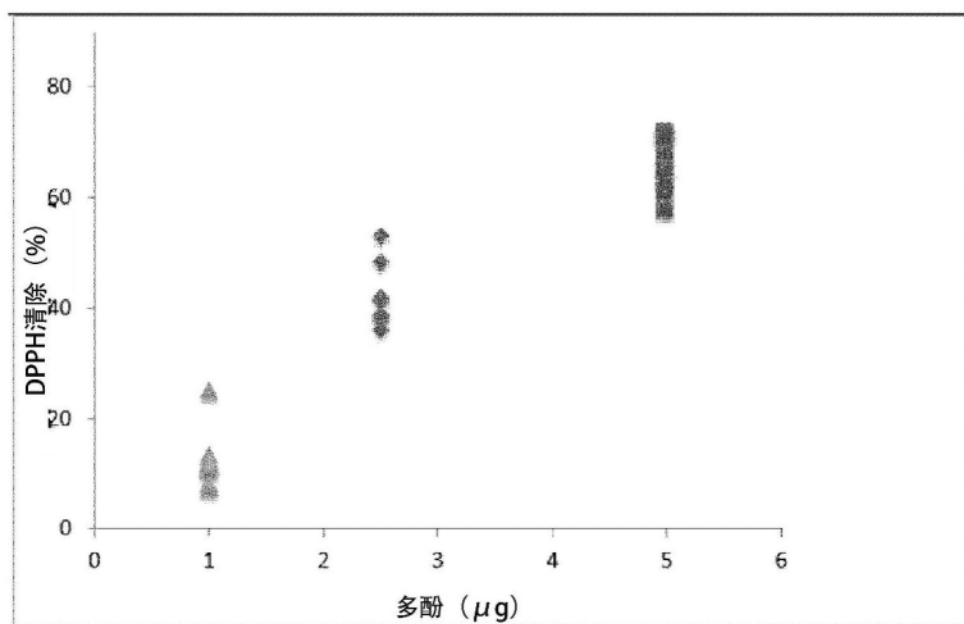


图46

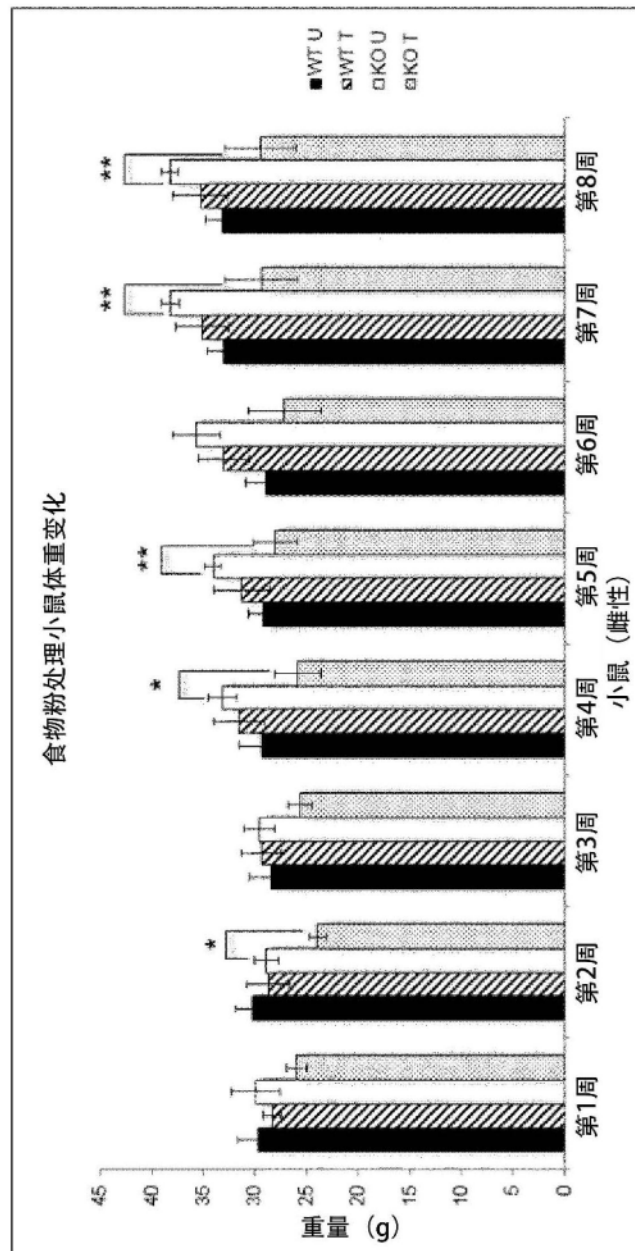


图47

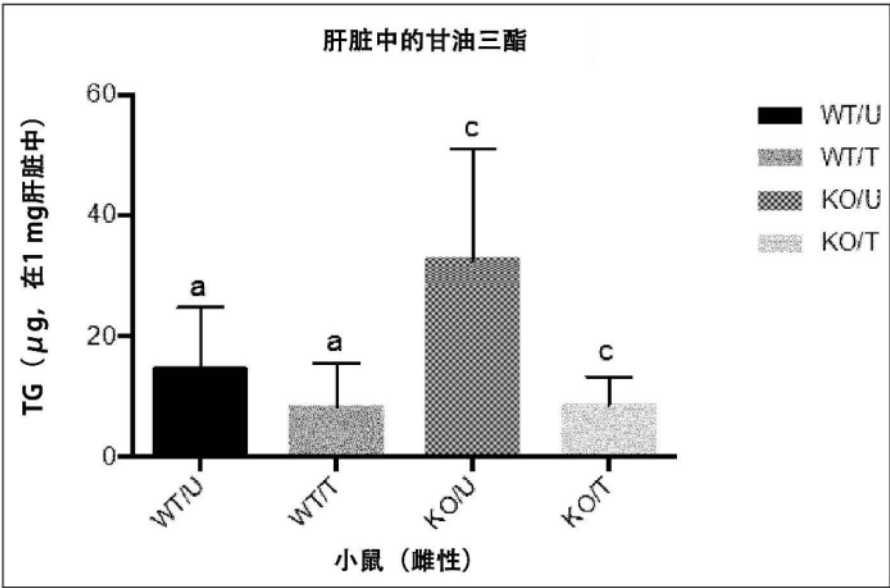


图48

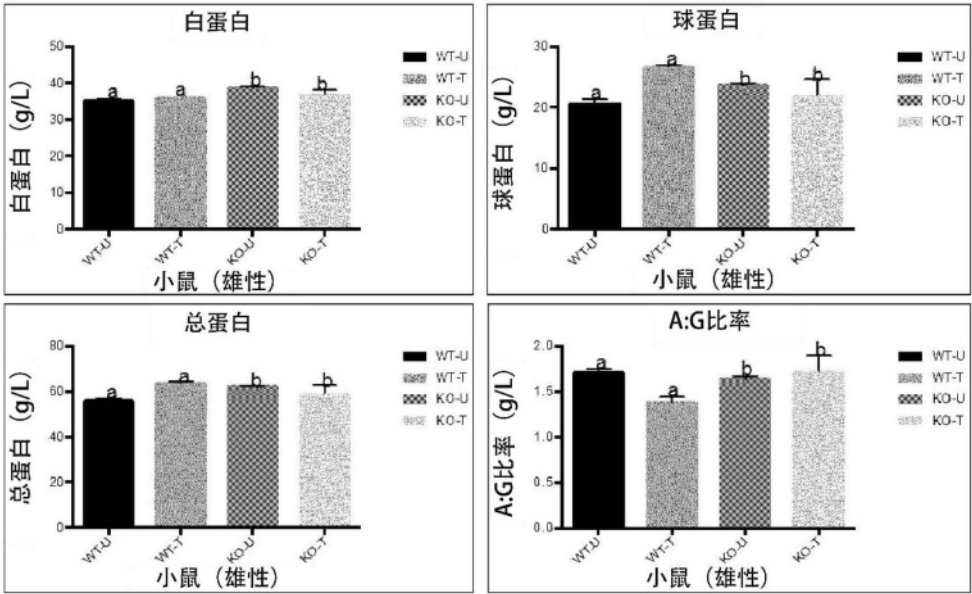


图49

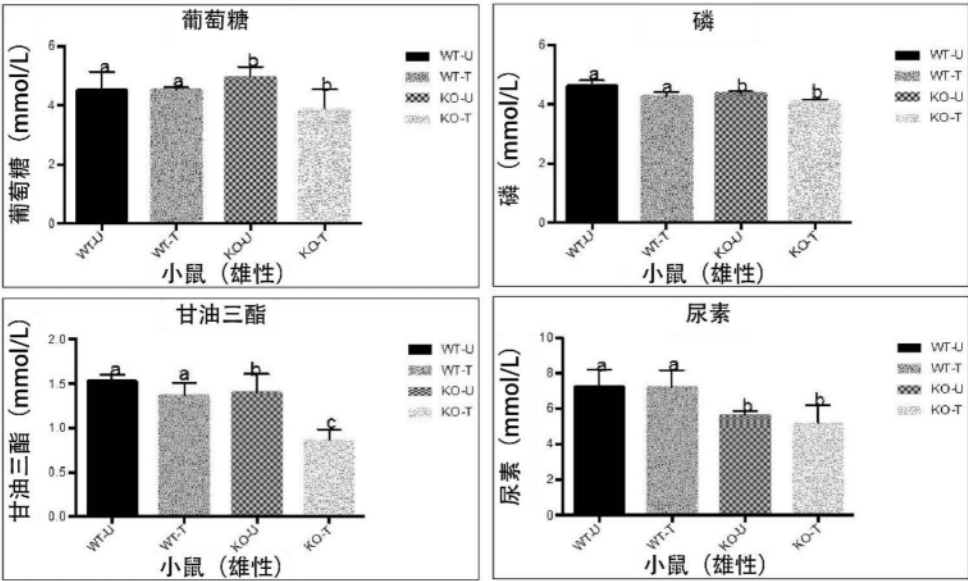


图50

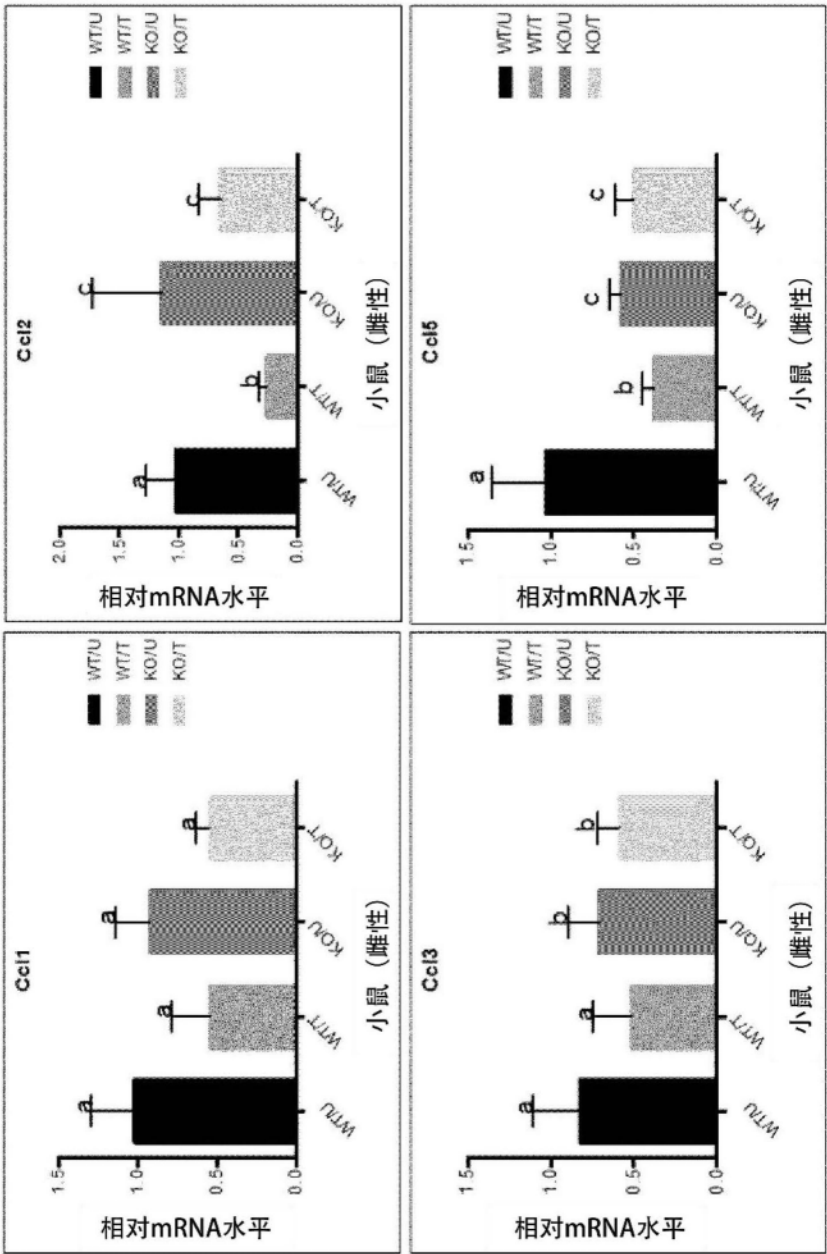


图51

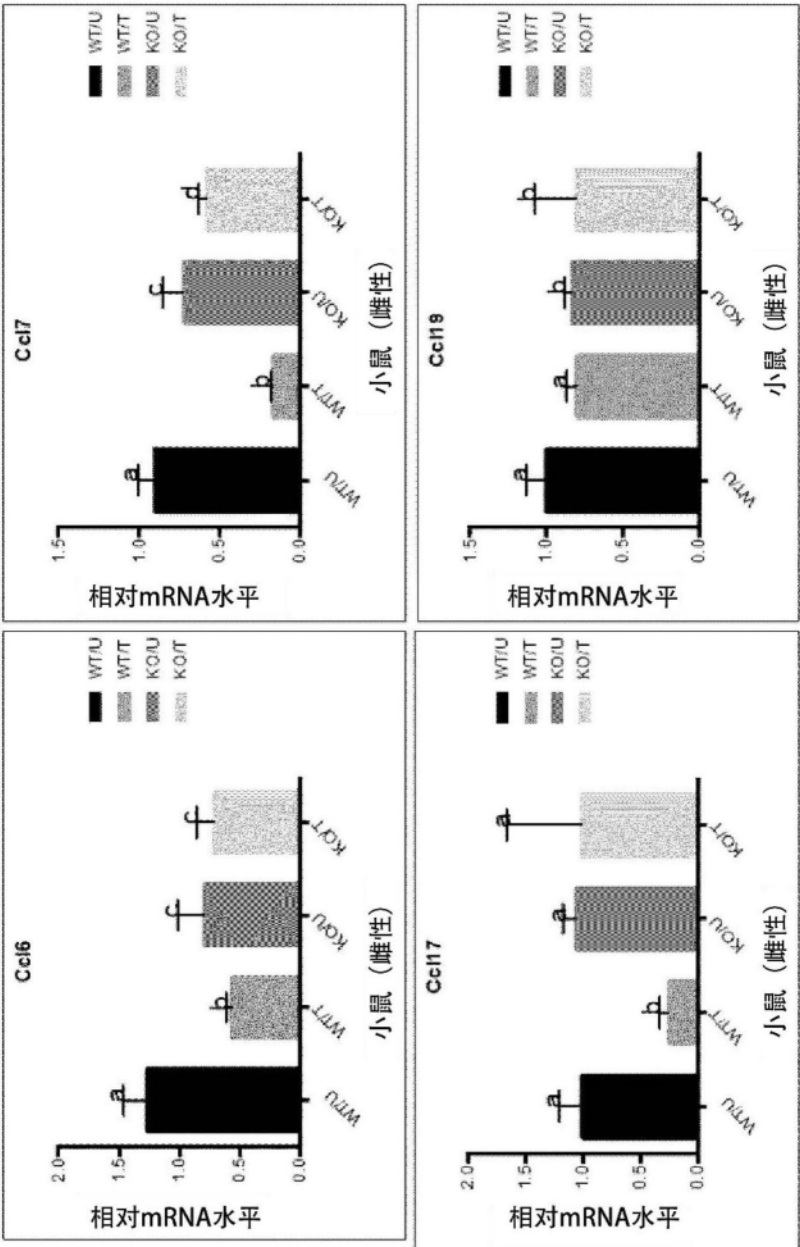


图52

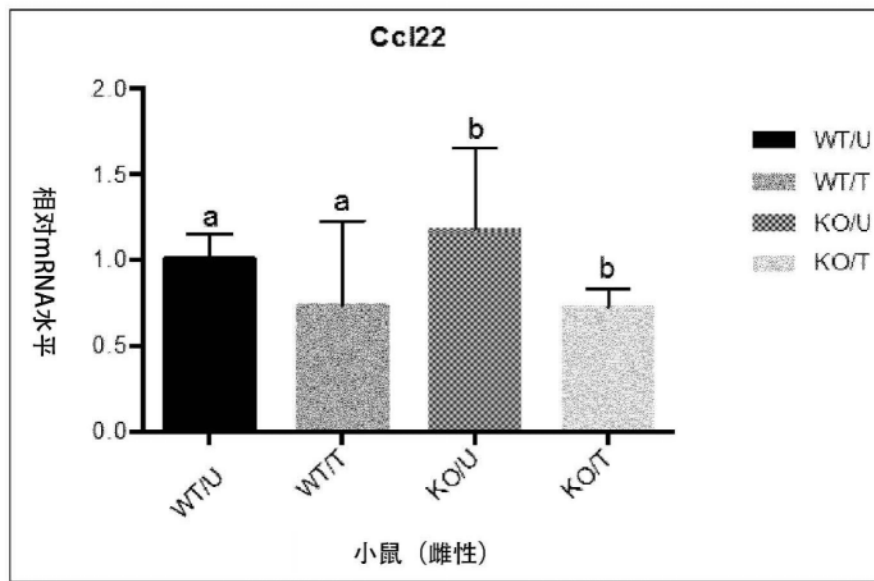


图53

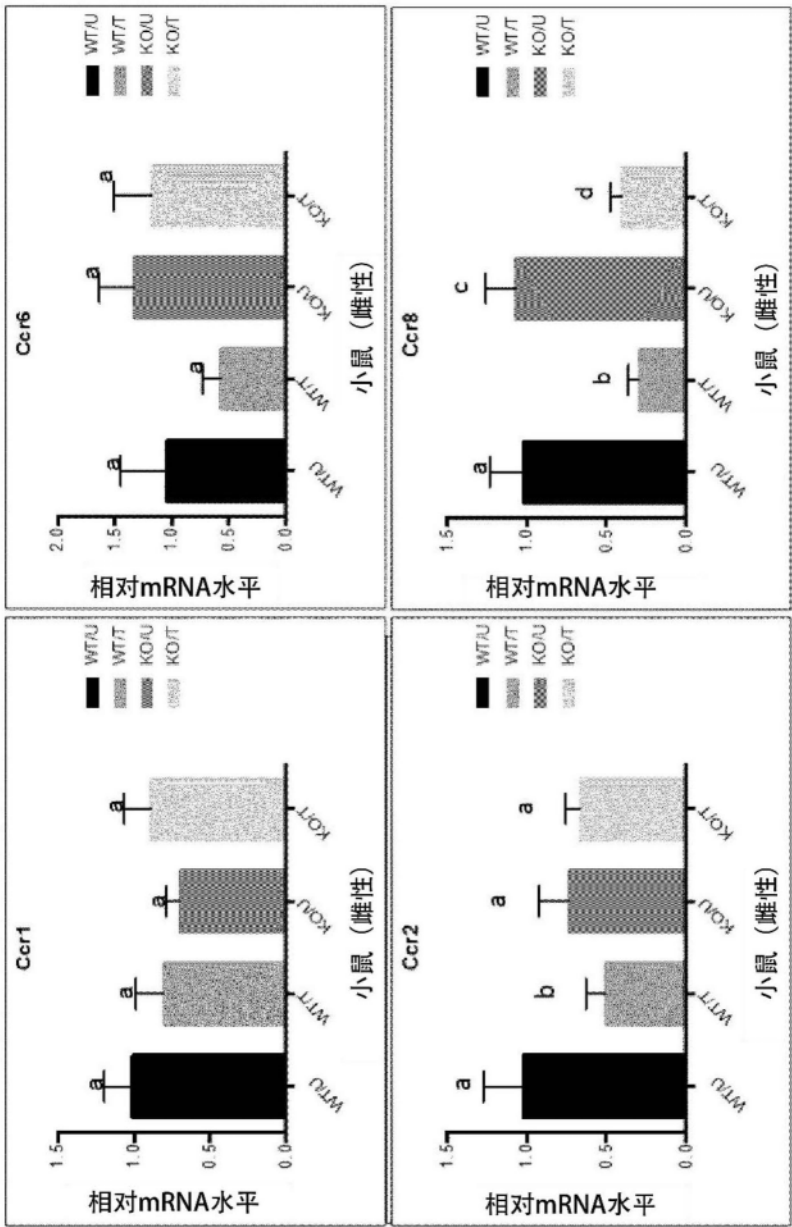


图54

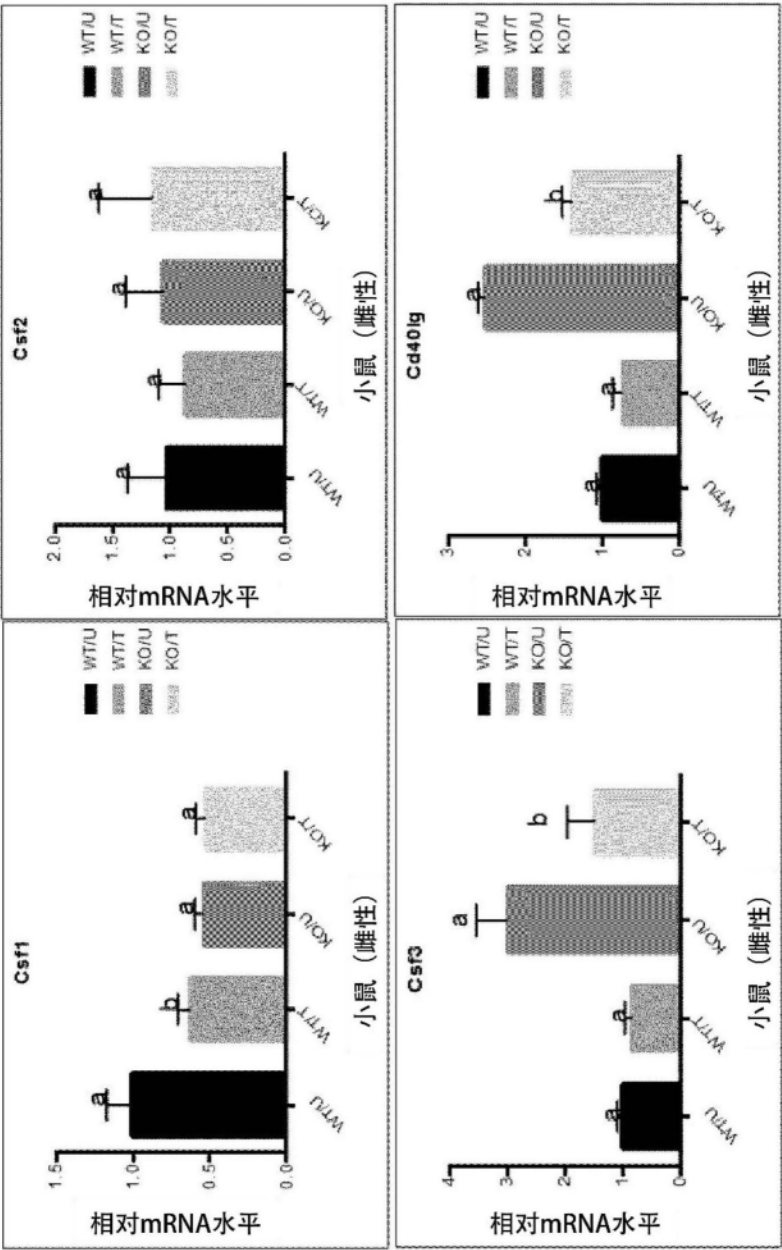


图55

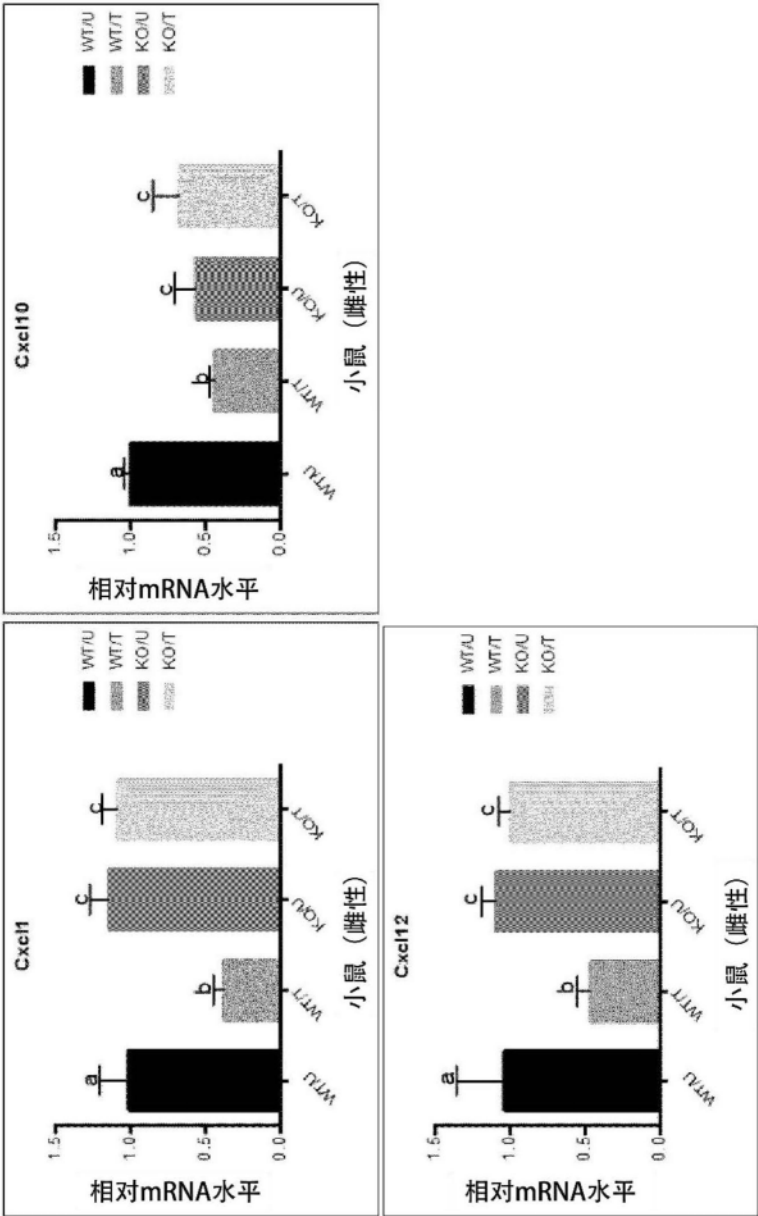


图56

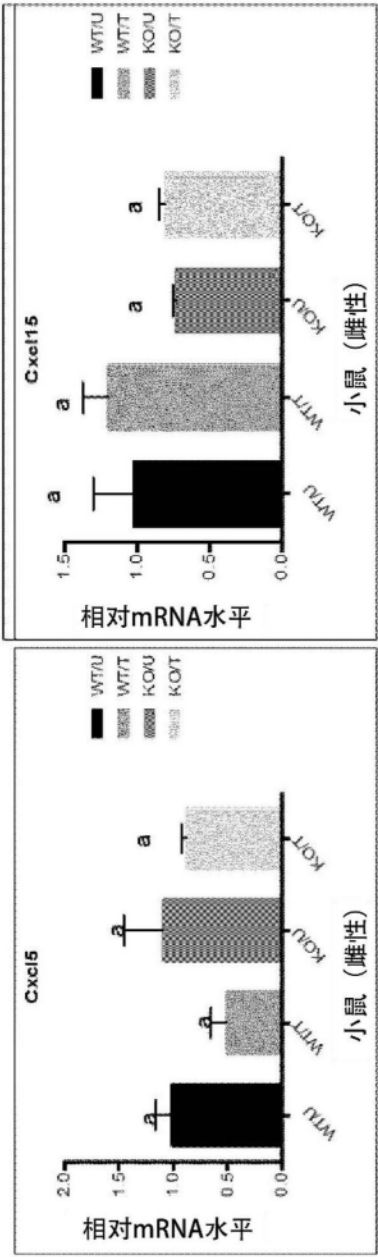


图57

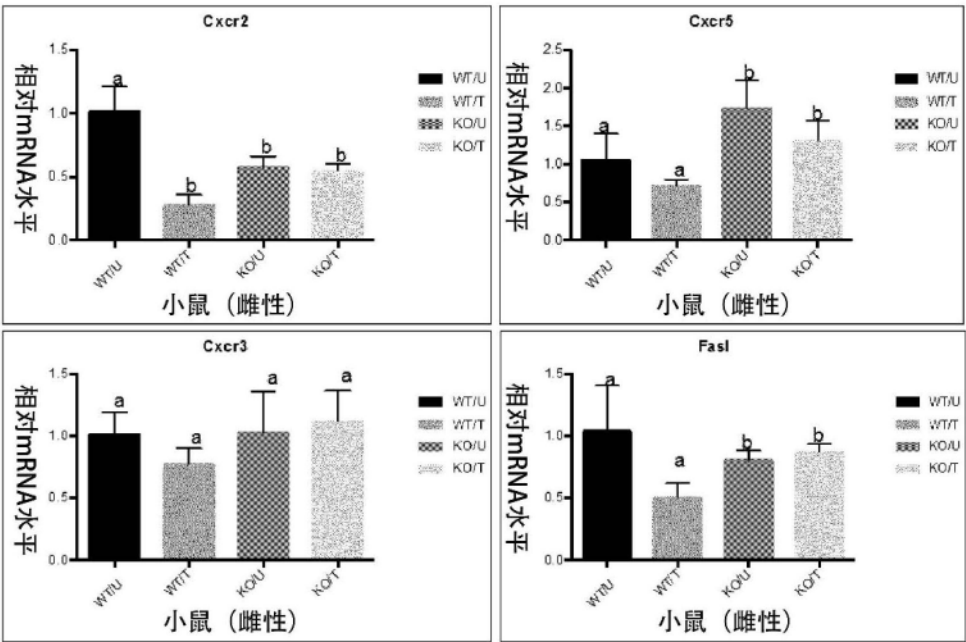


图58

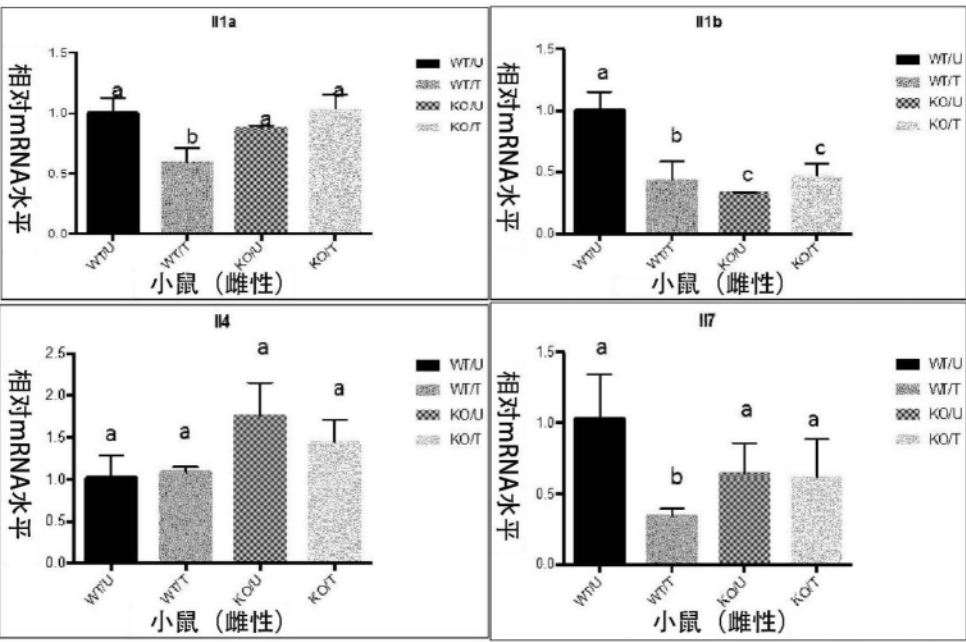


图59

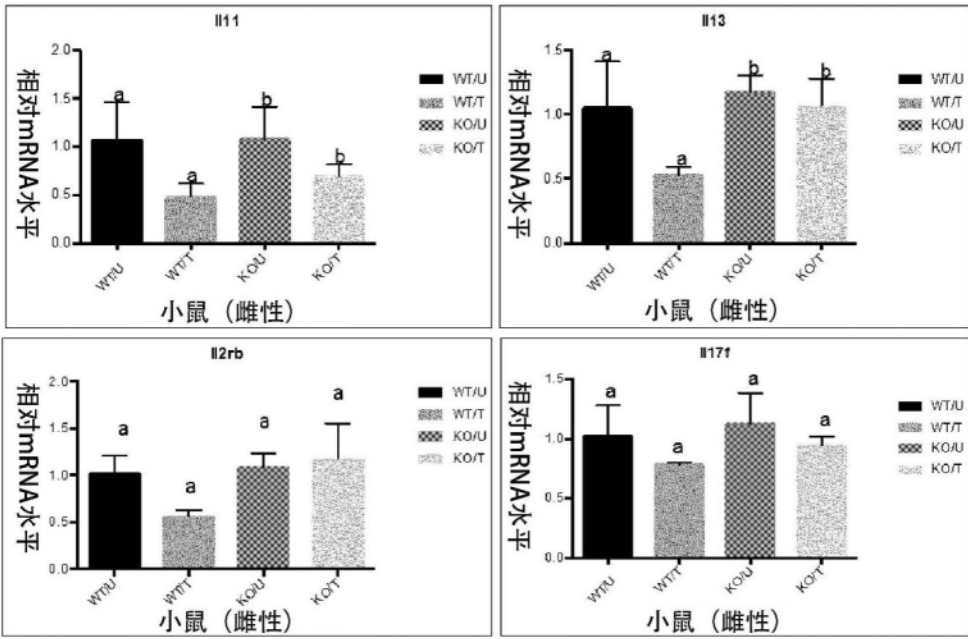


图60

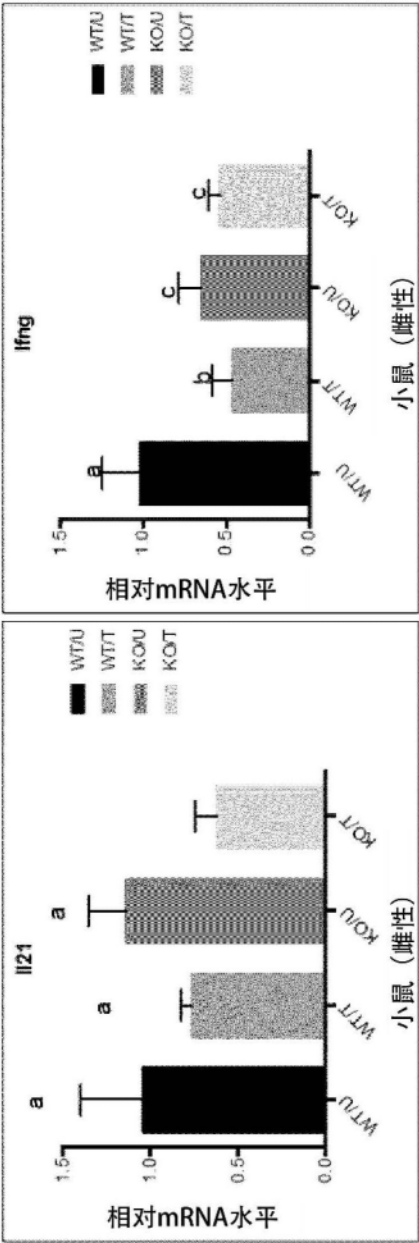


图61

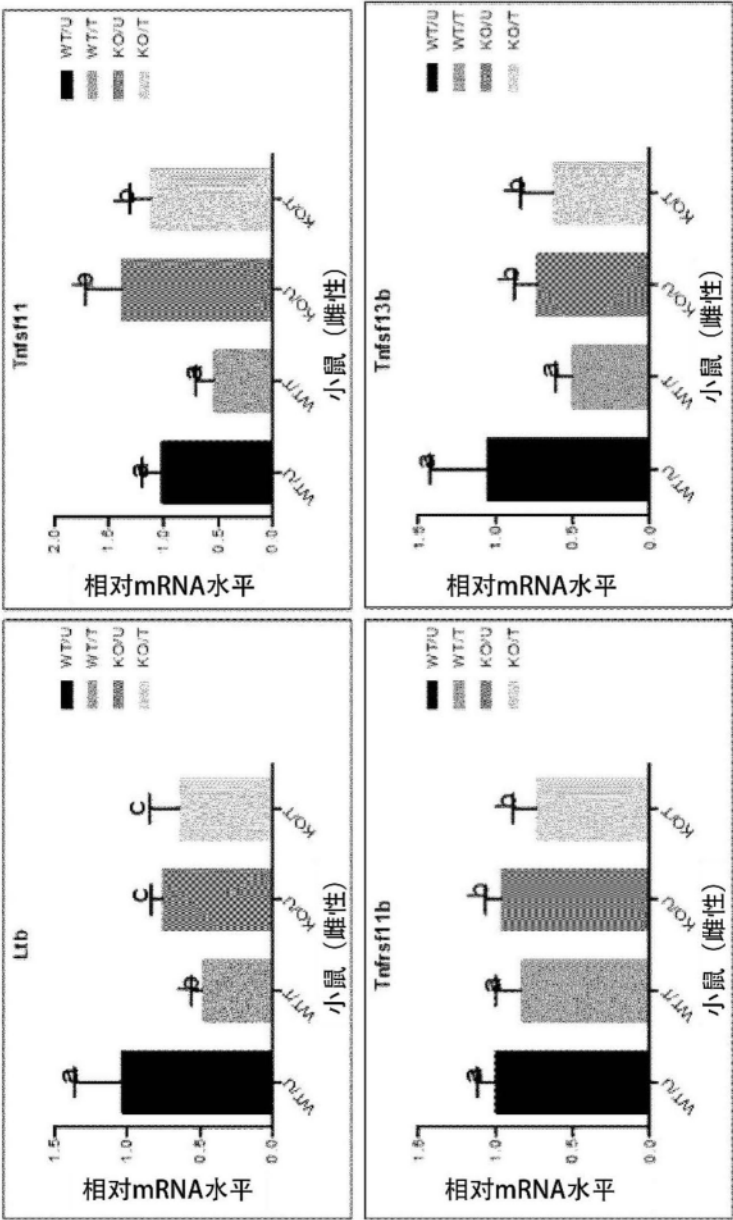


图62

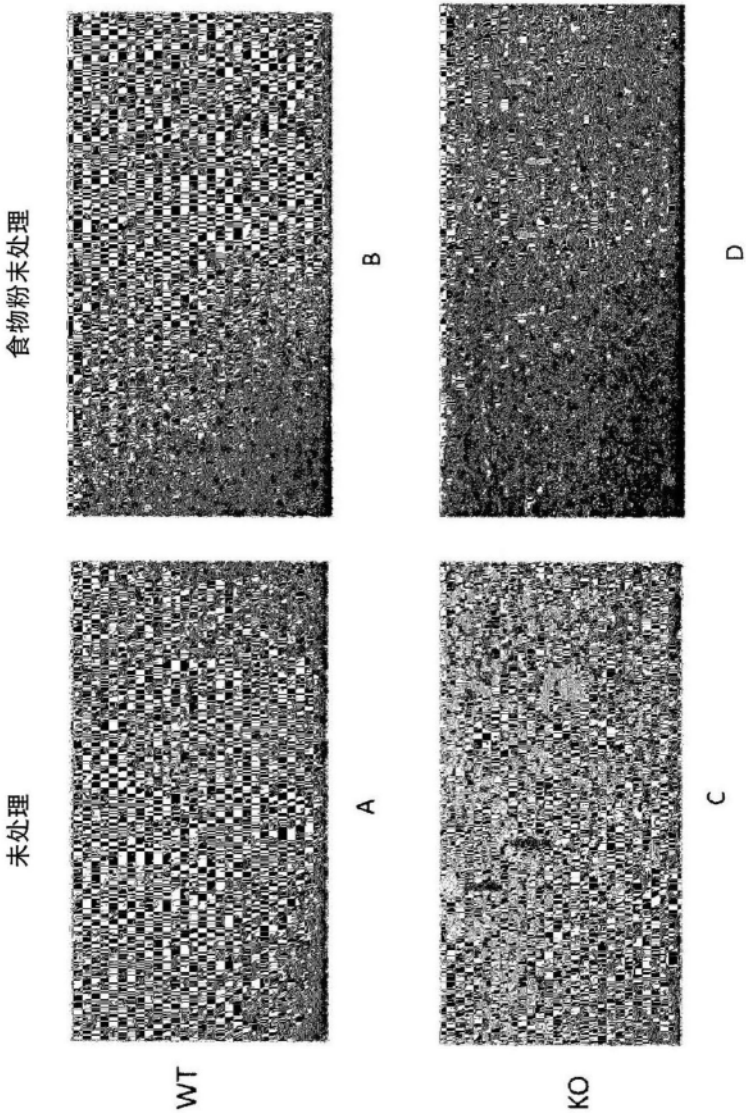


图63