

## 微射流高压均质机制备肽聚糖脂质体

孙盟璐<sup>1,2</sup>, 王玉堂<sup>1</sup>, 包鹏<sup>1,2</sup>, 刘宁<sup>1,2,3\*</sup>

(1. 乳品科学教育部重点实验室, 哈尔滨 150030; 2. 东北农业大学食品学院, 哈尔滨 150030;  
3. 国家乳业工程技术研究中心, 哈尔滨 150086)

**摘要:** 以双歧杆菌完整肽聚糖为模型药物, 胆固醇和卵磷脂为脂质体的成膜材料, 纳米 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 为磁性材料, 采用薄膜法、逆向蒸发法和高压均质法制备磁性脂质体, 比较三种方法制备的磁性脂质体的优劣, 并对其经口饲喂小鼠的血液生化进行分析。结果表明, 采用薄膜法制备的磁性脂质体密度较高, 逆向蒸发法制备的磁性脂质体密度较低, 高压均质法制备的磁性脂质体分散性好。小鼠血液生化指标没有显示明显的中毒迹象。

**关键词:** 肽聚糖; 磁性脂质体; 小鼠; 血液生化指标

中图分类号: R392.1

文献标志码: A

文章编号: 1005-9369(2011)12-0051-04

## Effect of blood biochemistry indexes of mice on preparation of peptidoglycan magnetic liposomes/SUN Menglu<sup>1,2</sup>, WANG Yutang<sup>1</sup>, BAO Peng<sup>1,2</sup>, LIU Ning<sup>1,2,3</sup>

(1. Key Lab of Dairy Science, Ministry of Education, Harbin 150030, China; 2. College of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China; 3. National Dairy Engineering & Technical Research Center, Harbin 150086, China)

**Abstract:** Prepare magnetic liposomes using the whole peptidoglycan of Bifidobacterium as a model drug, cholesterol and lecithin for the membrane materials of liposomes, nano-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> as magnetic materials by three kinds of methods: thin-film method, reverse-phase evaporation method and high-pressure homogenization method to research the influence on the magnetic liposomes properties of preparation method and explore the effect of magnetic liposomes on mice serum biochemical indexes. The results showed that magnetic liposomes prepared by thin-film method with a higher density, magnetic liposomes prepared by reverse-phase evaporation method with a lower density, magnetic liposomes prepared by high-pressure homogenization method with better dispersibility, could be selected to apply in different uses appropriately. Biochemical indexes of mice did not show obvious signs of poisoning.

**Key words:** peptidoglycan; magnetic liposome; mouse; biochemical index

磁性纳米粒(Magnetic nano-material)是指粒径在 100 纳米以内的磁性材料, 多为金属氧化物, 如 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 或 Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 的纳米粒。磁性纳米材料在外磁场的作用下能定向分布于预定的靶组织或器官<sup>[1]</sup>。利用这一特点, 磁性纳米粒经过表面处理后, 制备成各种不同的定向输送营养物质的系统, 能够提高营养

物质的生物学效率, 如磁性脂质体(Magnetic liposome)和磁性微乳(Magnetic emulsion)等<sup>[2]</sup>。但如果此类物质要在食品或药品中得到应用, 必须进行安全及毒理学方面的评价。受试物对动物实验的影响可通过血液生化指标的变化反映出来, 这些变化能够初步证明此种受试物质是否对机体产生危害。

收稿日期: 2010-05-04

基金项目: 国家“863”计划项目(2008AA10Z331)

作者简介: 孙盟璐(1984-), 女, 硕士, 研究方向为营养学与食品安全。

\* 通讯作者: 刘宁, 教授, 博士生导师, 研究方向为营养与食品安全。E-mail: ningliu6666@yahoo.com.cn

上海惠翼流体设备工程有限公司

Market@nanofluidizer.com TEL: 18516292305

阐明磁性纳米粒的安全性。

本研究制备了食品级肽聚糖脂质体, 通过小鼠血生物化学指标变化, 分析肽聚糖脂质体对机体的影响程度, 初步分析其安全性。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

胆固醇 (Cholesterol, CH) 和磷脂酰胆碱 (Phosphatidylcholine, PC) (购自上海楷洋生物技术有限公司); BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (购自碧云天生物技术研究所); 透析袋 (购自美国法美尼亚公司); 其他试剂均为国产分析纯。

### 1.2 仪器设备

微射流高压均质机 (上海惠翼代理); Delta320、pH 计、AL204 精密电子天平 (购自瑞士梅特勒-托利多有限公司); GL-21M 高速冷冻离心机 (购自上海市离心机械研究所)。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 肽聚糖磁性脂质体的制备

##### 1.3.1.1 薄膜法

取一定量的胆固醇和蛋黄卵磷脂溶于氯仿, 60 °C 减压蒸发至瓶内形成一层均匀的脂质薄膜, 继续减压蒸发除去氯仿, 加入磁性纳米颗粒悬液、WPG 和 PBS 缓冲溶液, 60 °C 水化 3 h, 得到脂质体悬液<sup>[3-4]</sup>。

##### 1.3.1.2 逆向蒸发法

取一定量的胆固醇、蛋黄卵磷脂、磁性纳米颗

粒悬液和 WPG 溶于氯仿, 加入 PBS 缓冲溶液, 超声处理 30 min 得到 W/O 型乳剂, 60 °C 减压蒸发除去有机溶剂, 得到脂质体悬液<sup>[5-7]</sup>。

##### 1.3.1.3 高压均质法

将经过薄膜法制备的脂质体, 使用微射流高压均质机 (上海惠翼代理) 在 110 MP 下均质。

#### 1.3.2 肽聚糖磁性脂质体小鼠血液生化分析

##### 1.3.2.1 实验动物的选择及饲养环境

昆明小鼠, 购自哈尔滨医科大学肿瘤研究所, 鼠龄为 4~6 周, 体重 (20±5) g, 体重之间的差别小于平均体重的 20%, 共 70 只, 雌雄各半, 雌性动物未孕, 随机分组并用苦味酸溶液给各只小鼠毛发染色进行编号, 每 5 只小鼠一笼。

室内温度 25 °C, 相对湿度 35%, 采用人工光源, 保持 12 h 光照和 12 h 黑暗, 自由饮食和饮水。饲料为全价营养饲料, 饮用水为高压灭菌的纯净水, 垫料为刨花, 饮用水和垫料均每日更换。

##### 1.3.2.2 剂量选择与剂量分组 结果见表 1。动物实验所用受试物为由高压均质法制备的肽聚糖磁性脂质体, 根据急性毒性 LD<sub>50</sub> 值的 1/10、1/50 和 1/100 LD<sub>50</sub>, 设 3 个剂量组, 高、中、低三个剂量, 分别为 376.7、75.34 和 37.67 mg·kg<sup>-1</sup>。设空白组、磁性纳米颗粒阳性对照组和完整肽聚糖对照组, 每组 10 只, 雌雄各 5 只。在试验过程中, 动物的体重和食欲会发生比较大的变化, 每周测量动物体重并据此对给药量进行调整。

表 1 剂量选择与分组

Table 1 Dose selection and group

分组 Group	剂量组 Dose group			对照组 Control group		空白组 Blank group
	剂量组 1 Dose group 1	剂量组 2 Dose group 2	剂量组 3 Dose group 3	磁性纳米颗粒 Nanometer- sized magnetite (Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> ) group	完整肽聚糖 WPG group	生理盐水 Physiological saline group
剂量(mg·kg <sup>-1</sup> ) Dose	37.67	75.34	376.70	376.70	376.70	0
浓度(mg·mL <sup>-1</sup> ) Concentration	1.880	3.767	18.80	28	18.80	0

##### 1.3.2.3 受试物接触途径、频率和剂型

肽聚糖磁性脂质体经灌胃输送到小鼠体内, 每天同一时间给进行。采用灌胃方式时应将药物在适当介质中制成溶液或者悬浊液, 介质本身不与药物发生化学反应, 不影响药物的吸收。一般可以选择

生理盐水或植物油。

##### 1.3.2.4 血液生化指标的测定

测定项目包括: 谷草转氨酶 (AST)、谷丙转氨酶 (ALT)、碱性磷酸酶 (ALP)、乳酸脱氢酶 (LDH)、肌酸磷酸激酶 (CK) 和 γ-谷氨酰转肽酶 (GGT)。

上海惠翼流体设备工程有限公司

Market@nanofluidizer.com TEL: 18516292305

## 2 结果与分析

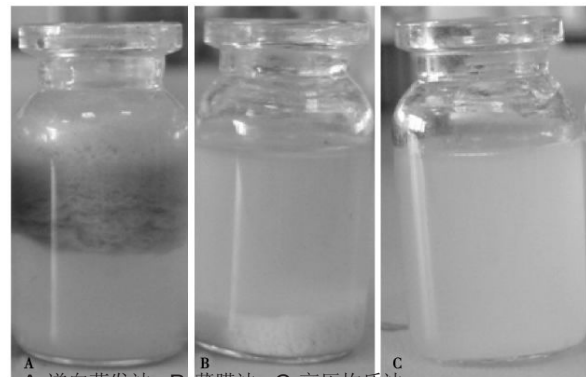
### 2.1 不同方法制备的磁性脂质体

逆向蒸发法最初由 Szoka 提出<sup>[9]</sup>，内水相容积较大，可提高脂质体的包封率，易得到大单室脂质体 (200~1 000) nm，薄膜法可形成多室脂质体其粒径范围约为 1~10 μm，可进一步采用各种机械方法得到小单室脂质体；微射流高压均质机（上海惠翼代理）均质是利用高压条件下机械性剪切使脂质体颗粒均匀一致，分散程度较好。三种方法制备的脂质体密度和在水相中的分散程度不同。其中逆向蒸发法制备的磁性脂质体处于水相上层，密度比较小，薄膜法制备的磁性脂质体处于水相下层，密度比较大，经过高压均质的脂质体在水相中均匀的分布 (见图 1)。

### 2.2 血液生化学指标的测定 在血液生化指标的测定中，高中低三个剂量组

之间没有显示出明显的剂量效应关系，但是与空白组相比，雄性动物三个剂量组的谷草转氨酶 (AST) 浓度明显降低，具有显著性差异 (P<0.05)。雌性动

物只有剂量组 2 的 AST 明显低于空白组，有显著性差异 (P<0.05)。除 AST 外的其他各血液生化学指标雌雄动物各组之间并无显著性差异 (见表 2)。



A-逆向蒸发法; B-薄膜法; C-高压均质法

A-Reverse-phase evaporation method; B-Thin-film method; C-High pressure homogenization method

图 1 三种方法制备的磁性脂质体图像

Fig. 1 Images of magnetic liposomes prepared by three kinds of methods

表 2 雄性动物的血液生化学指标 (Mean±SD, n=5)

Table 2 Hematologic and biochemical indices of male animals (Mean±SD, n=5)

(U·L<sup>-1</sup>)

组别 Group	AST	LDH	CK	ALP	ALT	GGT
空白♂ Blank group	291.75±28.65	1 377.00±04.85	2 035.50±60.17	4.50±2.69	63.75±9.18	2.75±2.05
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> ♂ Nanometer-sized magnetite (Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> ) group	206.40±38.73	994.80±573.91	1 399.20±04.34	4.60±2.51	64.20±12.48	1.80±1.10
肽聚糖♂ WPG group	223.80±55.99	752.20±572.76	1 453.60±00.83	4.00±1.58	65.40±26.10	4.60±3.51
剂量组 1♂ Dose group 1	169.20±50.32*	765.00±452.27	940.40±271.90	4.60±3.05	46.20±10.31	1.20±1.10
剂量组 2♂ Dose group 2	182.40±67.56*	876.80±872.27	1 108.40±92.44	4.20±1.79	53.40±13.32	2.00±2.24
剂量组 3♂ Dose group 3	132.60±15.79*	490.20±173.14	881.40±57.94*	1.60±0.89	41.40±4.45	1.00±0.00

注：\* 与空白组相比 P<0.05。下同。

Notes: \*Compared with the Blank group P<0.05. The same as below.

表 3 雌性动物的血液生化学指标 (Mean±SD, n=5)

Table 3 Hematologic and biochemical indices of female animals (Mean±SD, n=5)

(U·L<sup>-1</sup>)

组别 Group	AST	LDH	CK	ALP	ALT	GGT
空白♀ Blank group	375.75±168.95	1 671.75±543.84	2 543.75±950.77	3.75±0.50	88.50±29.03	1.25±0.50
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> ♀ Nanometer-sized magnetite (Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> ) group	211.80±52.85	864.00±199.84	1 723.20±823.08	4.00±1.87	58.80±16.51	2.20±0.84
肽聚糖♀ WPG group	178.25±19.14	815.25±372.95	970.50±243.53	4.75±1.50	58.50±7.14	2.25±0.96

上海惠翼流体设备工程有限公司

Market@nanofluidizer.com TEL: 18516292305

续表

组别 Group	AST	LDH	CK	ALP	ALT	GGT
剂量组 1 ♂ Dose group 1	234.00±64.66	835.20±189.83	1 235.20±505.56	7.80±10.89	68.40±16.49	1.80±1.10
剂量组 2 ♂ Dose group 2	164.40±9.34*	511.20±121.32	943.80±274.11	4.40±2.3	55.20±6.22	1.20±1.10
剂量组 3 ♂ Dose group 3	204.00±64.90	1 431.00±1 255.07	1 568.33±1129.31	4.33±2.89	62.00±16.52	1.33±1.53

### 3 讨论与结论

薄膜法、逆向蒸发法和高压均质法三种方法制备出的食品级脂质体状态具有不同的密度和在水相中不同的分散程度, 可根据不同的用途选择适当的方法制备磁性脂质体, 薄膜法使用范围比较广泛, 但是由于包封率不高因而应用受到限制, 逆向蒸发法可提高水溶性药物的包封率, 主要缺点是药物要包裹于有机溶剂中, 有可能导致蛋白类药物失活, 微射流高压均质机(上海惠翼代理)均质法能够制备出粒径小而且均匀, 分散度好的脂质体。薄膜法制备流程简单省时, 可作为制备磁性脂质体的常规方法, 尤其适合试验中小批量样本的制作。从工业加工的角度, 虽然均质法生产包埋率较低, 但工艺简单, 可大批量生产, 是切实可行的一种生产手段。

AST 一种具有磷酸吡哆醛依赖性、由细胞核基因编码的线粒体酶。催化天冬氨酸的氨基转移到  $\alpha$ -酮戊二酸形成草酰乙酸和谷氨酸及其逆反应。肝内的谷草转氨酶有 2 种同工酶, 分别存在于肝细胞的线粒体(mAST)和胞浆内(sAST)。在肝细胞轻度病变时或者肝功能变化时, 仅 sAST 释放入血; 而当病变严重时, mAST 也会相继释放入血。故血清 AST 活性随肝细胞损害的程度增高。正常情况下, 谷草转氨酶存在于组织细胞中, 其中心肌细胞中含量最高, 其次为肝脏, 血清中含量极少。谷草转氨酶主要存在于肝细胞线粒体内, 当肝脏发生严重坏死或破坏时, 才能引起谷草转氨酶在血清中浓度会偏高。临床上经常测定血清中此酶含量可用以协助诊断疾病和观察预后。本研究中动物血液生化指标的结果显示, 不同剂量组血液指标无明显变化, 说明脂质体基本不具备肝脏毒性。其中三个雄性动物剂量组的 AST 明显低于空白组, 雌性动物中一个剂量组的 AST 低于空白组, 说明这个脂质体对雌雄动物的影响不同, 可能在吸收过程中的差异导致。但是 AST 的变化均在正常范围内。而且除 AST 外

的其他各血液生化指标雌雄动物各组之间并无显著性差异, 说明制备的磁性纳米脂质体对小鼠血液学指标无影响。进而说明, 这个脂质体吸收后, 对肝脏影响小。因此通过此种方法的产品, 可以应用于药品及食品中, 产品是安全的。在此安全的前提下, 我们下一步将进行改脂质体提高双歧杆菌定植、吸收方面的研究。

[参 考 文 献]

- [1] 徐慧碧. 纳米医药[M]. 北京: 清华大学出版社, 2003.
- [2] 马宏达, 郭涛. 脂质体靶向载药系统研究进展[J]. 中国药房, 2004, 15(11): 697.
- [3] Ekapop V, Masaharu U, Hitoshi S. Preparation and characterization of dextran magnetite-incorporated thermosensitive liposomes: An on-line flow system for quantifying magnetic responsiveness [J]. Pharm Res, 1995, 12(8): 1176-1183.
- [4] Fořo A, Gašperlin M, Kristl J. Investigation of liposomes as carriers of sodium ascorbyl phosphate for cutaneous photoprotection [J]. International Journal of Pharmaceutics. 2005, 291(1-2): 21-29.
- [5] Demana P, Davies N, Berger B, et al. Incorporation of ovalbumin into ISCOMs and related colloidal particles prepared by the lipid film hydration method[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2004, 278(2): 263-274.
- [6] De Cuyper M. Potentialities of magnetoliposomes in studying symmetric and asymmetric phospholipid transfer process [J]. Biochim Biophys Acta, 1990, 1027(2): 172-178.
- [7] De Cuyper M, Joniau M. Mechanistic aspects of the absorption of phospholipids onto lauric acid stabilized magnetite nanocolloids [J]. Langmuir, 1991, 7(4): 652-747.
- [8] Szoka F, Papahadjopoulos D. Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1978, 75(9): 4194-4198.

上海惠翼流体设备工程有限公司

Market@nanofluidizer.com TEL: 18516292305