

## 壳聚糖-磷虾油纳米脂质体共轭物的制备及对斑马鱼胚胎生长发育的影响

郑炆凡, 陈艺煊, 陈娟, 赵嘉雯, 余慧琳, 赵燕, 李泓浩, 朱加进\*  
(浙江大学生物系统工程与食品科学学院 杭州 310058)

**摘要** 南极磷虾油富含虾青素和不饱和脂肪酸,是南极大磷虾提取物中具有较高开发价值的产品之一,然而,其在水中的难溶性限制了其在食品中的应用。壳聚糖作为一种高分子多糖,常被用作一些药物的载体,可以达到控制药物释放,增强疗效,减少不良反应的作用。本文通过响应面优化法研究磷脂胆固醇比、磷脂磷虾油比和壳聚糖共轭质量分数 3 个因素对壳聚糖-磷虾油纳米脂质体共轭物的影响,并探究优化产物对丙烯酰胺诱导的斑马鱼胚胎氧化应激模型在生长发育方面的影响。结果表明:在卵磷脂:胆固醇为 5:1,卵磷脂:磷虾油为 19.6:1,壳聚糖质量分数为 0.146%的条件下,粒径适中为 145 nm,且包封率最高为 98.1%。此外,其对氧化应激损伤造成的生长发育抑制,具有明显的改善作用,且在一定范围内呈剂量依赖性。

**关键词** 壳聚糖共轭; 响应面优化; 磷虾油; 斑马鱼; 生长发育

**文章编号** 1009-7848(2022)10-0210-11 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2022.10.023

南极大磷虾(*Euphausia superba*)是南大洋生物圈里一种非常关键的物种<sup>[1-2]</sup>,目前是世界上生物资源量最大的单种生物之一<sup>[3]</sup>,其蛋白质含量高(16.31%),脂肪含量低(1.3%)且矿物质含量丰富,因此可以利用其开发活性蛋白肽、磷虾油、虾青素和甲壳素等高附加值海洋系列产品。其中,磷虾油因脂质组成比较特殊,以及诸多的功能而受到较高的关注<sup>[4]</sup>。磷虾油中含有磷脂以及脂肪酸这些脂类<sup>[5-6]</sup>【尤其富含二十碳五烯酸(C20:5,EPA)和二十二碳六烯酸(C22:6,DHA)这 2 种 n-3 多不饱和脂肪酸<sup>[7-9]</sup>】、虾青素、维生素、类黄酮和矿物质等。Miki 等<sup>[10]</sup>的研究表明,在抗氧化性能方面,虾青素的效果是 $\beta$ -胡萝卜素的 10 倍,与 $\alpha$ -生育酚对比更明显,高达 100 倍。此外,磷虾油对改善非酒精性脂肪肝、心血管疾病<sup>[11]</sup>、三高<sup>[12-13]</sup>、结肠癌<sup>[14-16]</sup>、经前综合症<sup>[17]</sup>、代谢综合征、炎症<sup>[18-22]</sup>,提高学习及记忆能力,注意缺陷多动障碍和保护眼睛<sup>[23-24]</sup>等都有积极作用。然而,在水中的难溶性限制了磷虾油在食品中的应用,目前往往以胶囊的形式在市场上销售<sup>[25]</sup>。而 DHA、EPA 和虾青素的高不饱和特性使它们在外界一些条件下易于发生降解,产生不好

的感官影响,尤其是磷虾油中的虾青素,具有水溶性差、熔点高、化学不稳定性和低生物利用率的特点,因此强化其利用率具有重大意义。

壳聚糖(CS 或 CHI)是一种高分子多糖,具有生物相容性、生物降解性、pH 敏感性、粘膜黏附性等有利特性,经常被用作一些药物的载体,以达到控制其释放,增强疗效和减少不良反应等作用。在生物医学和化学等领域的应用非常广泛<sup>[25]</sup>。与其它聚合物相比,壳聚糖分子的修饰因功能性氨基和羟基的丰富而相对容易实现。Ryu 等<sup>[26]</sup>制备了壳聚糖-邻苯二酚和其它相关的儿茶酚聚合物作为一种有前途的生物医学用黏合剂聚合物,其在 pH=7 的水溶液中的溶解度从 0 mg/mL 显著提高至近 60 mg/mL。Mazloomi 等<sup>[27]</sup>在探究壳聚糖包被的橙种子蛋白水解物纳米脂质体的物理、化学性质时,发现用壳聚糖包被可以增加脂质体的稳定性,降低肽的释放速率,此外,包衣脂质体还有保护、控制释放和维持肽的抗氧化活性方面的功效。甚至还有研究果胶和壳聚糖共同偶联体,对新橙皮苷纳米脂质体在递送释放过程中的作用,其缓释效果优于壳聚糖单独偶联<sup>[28]</sup>。显然,基于壳聚糖的结合物已成为一类新的生物材料,在多学科领域的各种应用中具有广阔前景。

丙烯酰胺(Acrylamide,AA)是一种水溶性的有毒物质,被证明是动物物种中的神经和生殖毒

收稿日期: 2021-10-18

作者简介: 郑炆凡(1995—),女,硕士生

通信作者: 朱加进 E-mail: jjzhu@zju.edu.cn

物及致癌物。Lindeman 等<sup>[20]</sup>的研究表明 AA 是一种已知的人类神经毒剂, 可以通过胎盘转移和母乳到达发育中的胎儿。虽然在啮齿类动物出生前, 暴露于 AA 后已观察到不利的神经发育作用, 但迄今为止尚未在人体中研究 AA 对发育中的大脑的不利作用。斑马鱼作为一种脊椎动物模式生物在近 20 年被广泛应用于发育生物学、毒理学以及人类疾病模型构建等研究领域。其胚胎发育周期短、体积小、通体透明并易于观察等都是作为动物模型的优势。

本文首先对壳聚糖-磷虾油纳米脂质体的工艺条件进行响应面优化, 针对优化后的产物, 通过建立丙烯酸酰胺诱导的斑马鱼胚胎氧化应激模型, 观察脂质体对斑马鱼胚胎生长发育的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

1.1.1 实验动物 雌雄斑马鱼, 浙江大学医学院公共平台。

1.1.2 试剂 磷虾油(约含磷脂 52.64%、DHA 14.8%、EPA 22.5%、250 mg/kg 虾青素, 其中 30%~65%的脂肪酸是磷脂结合型, 虾青素构成: 20%游离虾青素、34%虾青素单酯、46%虾青素双酯), 山东科芮尔生物技术公司; 卵磷脂(来自大豆, >90%), 上海麦克林生化科技有限公司; 壳聚糖, 北京华威锐科化工有限公司; 胆固醇, 上海达瑞精细化学品有限公司; 无水乙醇, 国药集团化学试剂有限公司; pH=7.4 的磷酸盐缓冲液(由磷酸二氢钾、磷酸氢二钠、氯化钠、氯化钾配制而成), 以上缓冲液配制试剂均来自阿拉丁生化科技有限公司; 无水硫酸钠、甲醇、甲苯、石油醚、异丙醇、硫酸, 国药集团化学试剂有限公司; 正己烷【纯度≥99%, 用于气相色谱(GC)检测】, 上海麦克林生化科技有限公司; 超滤离心管(30 ku), 浙江同力信息科技有限公司; 丙烯酸酰胺(AA), 上海阿拉丁试剂公司; 斑马鱼胚胎培养液(0.05%海盐和 0.002%亚甲基蓝)由纯净水、海盐与亚甲基蓝制备而成, 浙江大学医学院公共平台。

### 1.2 仪器与设备

AL204 型电子天平(0.1 mg), 梅特勒-托利(Mettler Toledo)公司; 磁力搅拌器、超声细胞粉碎

机, 宁波新芝生物科技有限公司; BECKMAN 冷冻离心机, 美国贝克曼公司; Zetasizer Nano ZS90 纳米粒度仪, 英国 Malven 公司; pH 计, 瑞士 mettler-toledo 托利多公司; 7890A 型气相色谱仪(附氢火焰离子化检测器), 美国 Agilent 公司; Zetasizer Nano ZS90 纳米粒度仪, 英国 Malven 公司。

### 1.3 脂质体制备工艺

采用薄膜分散-超声法制备磷虾油纳米脂质体。称取一定质量的磷虾油、卵磷脂、胆固醇加入烧杯中, 加入 40 mL 无水乙醇, 用磁力搅拌器涡旋混匀 15~30 min, 直至混合均匀, 在旋转蒸发仪 55 °C 恒温水浴中旋蒸至乙醇蒸发完毕, 使烧瓶底部形成一层脂质膜。用一定量 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液水合, 涡旋混匀 30 min, 再留 30 min 静置, 形成脂质体。然后用超声波细胞粉碎机在冰浴中超声 8 min(超声功率为全超声功率的 70%~80%), 形成纳米脂质体。

把 1% 的壳聚糖溶液稀释成所需要的浓度后, 将前面制备好的纳米脂质体以 1:6 的体积比滴加到稀释好的壳聚糖溶液中, 涡旋混匀, 静置 30 min, 使其充分结合, 用 1 mol/L HCl 和 1 mol/L NaOH 调节 pH 值至 5.5, 然后用超声细胞粉碎机超声 2 min(60%超声功率)。

### 1.4 响应面优化脂质体制备工艺

运用 Design Expert 设计 BBD 试验。取卵磷脂与胆固醇质量之比( $X_1$ )、卵磷脂与磷虾油质量之比( $X_2$ )、壳聚糖质量分数( $X_3$ )为 3 个因素, 以脂质体粒径和包封率为响应值。通过前期的单因素实验已经确定了 3 个因素比较适宜的比例分别为卵磷脂:胆固醇=4:1, 卵磷脂:磷虾油=20:1, 壳聚糖质量分数=0.1%, 然后在单因素实验的基础上决定  $X_1$  的 3 个水平为 3:1, 4:1, 5:1,  $X_2$  的 3 个水平为 18:1, 20:1, 22:1,  $X_3$  的 3 个水平为 0.1%, 0.2%, 0.3%, 用(-1, 0, 1)编码, 对应实际值如表 1 所示, BBD 试验设计及结果如表 2 所示。对结果进行方差分析后, 再对数据进行二次回归拟合, 采用式(1)二次多项式描述响应量同自变量关系的经验模型。

$$Y = \beta_0 + \beta_i \beta_j + \beta_{ii} \beta_{jj} + \beta_{ij} \beta_{ij} \quad (1)$$

式中,  $Y$ ——预测响应值;  $\beta_0$ ——常数项;  $\beta_i$ ——一次项系数;  $\beta_{ii}$  和  $\beta_{jj}$ ——二次项系数。

### 1.5 丙烯酰胺诱导的斑马鱼氧化应激模型建立

为了得到适宜斑马鱼胚胎生存的脂质体样品稀释倍数,将壳聚糖-磷虾油纳米脂质体共轭物溶液按照 0 (不含样品),1:100,1:125,1:150,1:200,1:250,1:300,1:350,1:400,1:450(与胚胎水的体积比)比例稀释分组。当胚胎孵育时间到达 7~9 hpf 时,将其随机分成 10 组,每组 60 个胚胎,转移到 96 孔板中,1 孔 1 个胚胎并加入适量胚胎水(250  $\mu$ L),从 24 hpf 开始每隔 1 d 记录各组胚胎的存活率,来确定样品的最佳稀释倍数。把准备好的斑马鱼胚胎分为对照组(只加胚胎培养液)、丙烯酰胺组以及低、中、高 3 个稀释倍数的脂质体处理组共 5 组,每组设定 3 个平行,每个平行 50 枚胚胎。

每组前期先经过一段时间暴露处理,其中空白对照组一直在胚胎培养液中培养,AA 组和实验

组的胚胎在培养 7~9 hpf 时,将培养液换成 3 mmol/L 的丙烯酰胺溶液。干预 1 h 后,丙烯酰胺组胚胎保持不变,实验组 3 组的培养液都换成同时有 3 mmol/L 丙烯酰胺溶液相应脂质体稀释倍数(0,1:400,1:350,1:300)的胚胎培养液中,直到 24 hpf。将除对照组外 4 组中的胚胎取出,漂洗 2~3 次,然后把培养液换回胚胎水一直培养到 72 hpf。

表 1 BBD 试验设计因素水平及编码

Table 1 Factor levels and coding of BBD experimental

因素	水平	因素水平		
		-1	0	1
PPL:CL	$X_1$	3:1	4:1	5:1
PPL:KO	$X_2$	18:1	20:1	22:1
壳聚糖质量分数/%	$X_3$	0.1	0.2	0.3

表 2 BBD 试验设计及其结果

Table 2 Design and results of BBD experimental

组别	$X_1$ (PPL:CL)	$X_2$ (PPL:KO)	$X_3$ (壳聚糖质量分数/%)	$Y_1$ (粒径/d·nm)	$Y_2$ (包封率/%)
1	4:1(0)	20:1(0)	0.2(0)	156.2	92.87
2	3:1(-1)	22:1(1)	0.2(0)	158	99.12
3	5:1(1)	18:1(-1)	0.2(0)	277.9	86.52
4	4:1(0)	22:1(1)	0.3(0)	164.2	98.94
5	4:1(0)	20:1(0)	0.2(0)	158.7	91.59
6	3:1(-1)	20:1(0)	0.3(0)	155.1	99.12
7	3:1(-1)	20:1(0)	0.1(0)	332	93.93
8	5:1(1)	20:1(0)	0.3(0)	152	99.12
9	3:1(-1)	18:1(-1)	0.2(0)	229.2	93.10
10	4:1(0)	18:1(-1)	0.3(0)	209.7	91.39
11	5:1(1)	22:1(1)	0.2(0)	161.9	94.11
12	5:1(1)	20:1(0)	0.1(0)	189.3	93.07
13	4:1(0)	18:1(-1)	0.1(0)	163.7	84.87
14	4:1(0)	20:1(0)	0.2(0)	219.6	97.84
15	4:1(0)	22:1(1)	0.1(0)	126.4	87.13

### 1.6 生长发育相关指标测定

从 24 h 开始陆续观察自主运动、心率、畸形率、孵化率和第 5 天体长等生长发育相关指标。

1.6.1 自主运动 自 24 h 开始,每组取 24 枚胚胎,在体式显微镜下观测各组胚胎在 30 s 内自主运动的次数,每 24 h 观察记录 1 次,观察至 72 h。

1.6.2 心率 自 48 h 开始,每组取 30 枚胚胎,在体式显微镜下观测胚胎 15 s 内的心率(心跳次

数),然后在 72 h 再观察 1 次。

1.6.3 致畸率 自 24 h 开始,观察和记录每组斑马鱼胚胎畸形情况,每 24 h 记录 1 次直到 72 h,再对数据进行统计分析。

1.6.4 孵化率 自 24 h 开始,观察和记录每组斑马鱼胚胎的孵化数量,每 24 h 记录 1 次直到 72 h,再对数据进行统计分析。

1.6.5 第 5 天体长 斑马鱼孵化至第 5 天时,用

合适浓度的麻醉剂将斑马鱼胚胎麻醉后在体式显微镜下观测体长并拍照,之后利用测量软件记录体长(mm)。不同浓度组和对照组还有丙烯酰胺组各测量 18 条幼鱼的体长作为平行,取平均值作为每组第 5 天的体长。

### 1.7 统计分析

用 SPSS 软件对数据进行方差分析和显著性分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 响应面优化分析

2.1.1 以粒径为响应值的响应面优化结果 脂质体粒径系数显著性检验结果显示,该模型非常显著( $P < 0.01$ )。失拟项( $P = 0.0722$ )不显著,表明模型与试验结果的拟合度比较好。相关系数  $R^2 = 0.9913$ ,说明试验结果中 99.13%的实际值与模型中的预测值对应,关联度很高,校正系数  $R_{Adj}^2 = 0.9758$ ,表明有 2.42%的变异是不能用该模型去解释的。运用方差分析对模型方程的适用性进行

评估,结果证明该模型拟合较好,预测脂质体粒径是适合的。C.V.(变异系数)=4.52%,该值越低表明试验的结果越可靠。

经过该模型的方程回归系数显著性检验,卵磷脂磷虾油比( $X_2$ )和壳聚糖质量分数( $X_3$ )对脂质体粒径的线性效应较显著( $P < 0.01$ ),而卵磷脂胆固醇比( $X_1$ )对脂质体粒径的线性效应不显著;卵磷脂胆固醇比( $X_1$ )、卵磷脂磷虾油比( $X_2$ )和壳聚糖质量分数( $X_3$ )的二次项的  $P$  值都小于 0.05,其中壳聚糖质量分数( $X_3$ )的二次项  $P$  值小于 0.01,说明对响应值的曲面效应较显著。制备过程表明,粒径与内部配方比例相关联,因此不同配比会在一定程度上影响粒径的大小。磷脂胆固醇比、磷脂磷虾油比和壳聚糖质量分数能够对粒径大小造成直接影响。壳聚糖质量分数( $X_3$ )的一次项回归系数(43.05)在 3 个因素的一次项回归系数中最高,表明在试验范围内,壳聚糖质量分数( $X_3$ )对响应值的影响最大。

表 3 壳聚糖-磷虾油纳米脂质体共轭物粒径响应面二次系数显著性分析

Table 3 Response surface fitting quadratic coefficient significance test of the size of chitosan-krill oil nanoliposomes conjugate

方差来源	平方和	df	均方	F 值	P 值 Prob > F
模型	42 321.41	9	4 702.38	63.65	0.0001**
$X_1$ -PPL:CL	177.66	1	177.66	2.40	0.1817
$X_2$ -PPL:KO	1 981.35	1	1 981.35	26.82	0.0035**
$X_3$ -CH%	14 826.42	1	14 826.42	200.68	<0.0001***
$X_1 \times X_2$	1 239.04	1	1 239.04	16.77	0.0094**
$X_1 \times X_3$	6 699.42	1	6 699.42	90.68	0.0002**
$X_2 \times X_3$	1 085.70	1	1 085.70	14.70	0.0122*
$X_1^2$	1 151.32	1	1 151.32	15.58	0.0109*
$X_2^2$	702.31	1	702.31	9.51	0.0274*
$X_3^2$	14 277.29	1	14 277.29	193.25	<0.0001**
残差	369.40	5	73.88		
失拟项	351.40	3	117.13	13.01	0.0722
误差	18.01	2	9.00		

注:\*\*\*,  $P < 0.001$ , \*\*,  $P < 0.01$ , \*,  $P < 0.05$ 。

表 4 壳聚糖-磷虾油纳米脂质体共轭物粒径响应面二次模型方差分析

Table 4 Analysis of variance of quadratic model of response surface experiment for the size of chitosan-krill oil nanoliposomes conjugate

参数	数值	参数	数值
标准偏差	8.60	相关系数	0.9913
平均值	190.26	校正系数	0.9758
变异系数/%	4.52	相关系数预测值	0.8674
预测残差平方和	5 662.87	信噪比	27.541



单因素之间的交互作用也会对试验结果(脂质体粒径)产生影响,从结果可以看到 $X_1X_2$ 、 $X_1X_3$ 和 $X_2X_3$ 都满足 $P<0.05$ ,且 $X_1X_2$ 和 $X_1X_3$ 的 $P<0.01$ ,表明三者之间两两交互对壳聚糖-磷虾油纳米脂质体共轭物粒径都有显著影响,且磷脂胆固醇比(PPL:CL)与磷脂磷虾油比(PPL:KO)、磷脂胆固醇比(PPL:CL)与壳聚糖质量分数(CH%)的交互

作用对脂质体粒径相对来说影响更加显著。如图1a,在一定范围内,当PPL:CL和PPL:KO向最优点增加时,脂质体的粒径明显变小,而当PPL:CL和PPL:KO通过最优点后继续增加,脂质体粒径则明显变大,因素 $X_1X_3$ 和 $X_2X_3$ 的交互关系对粒径的影响同 $X_1X_2$ 。

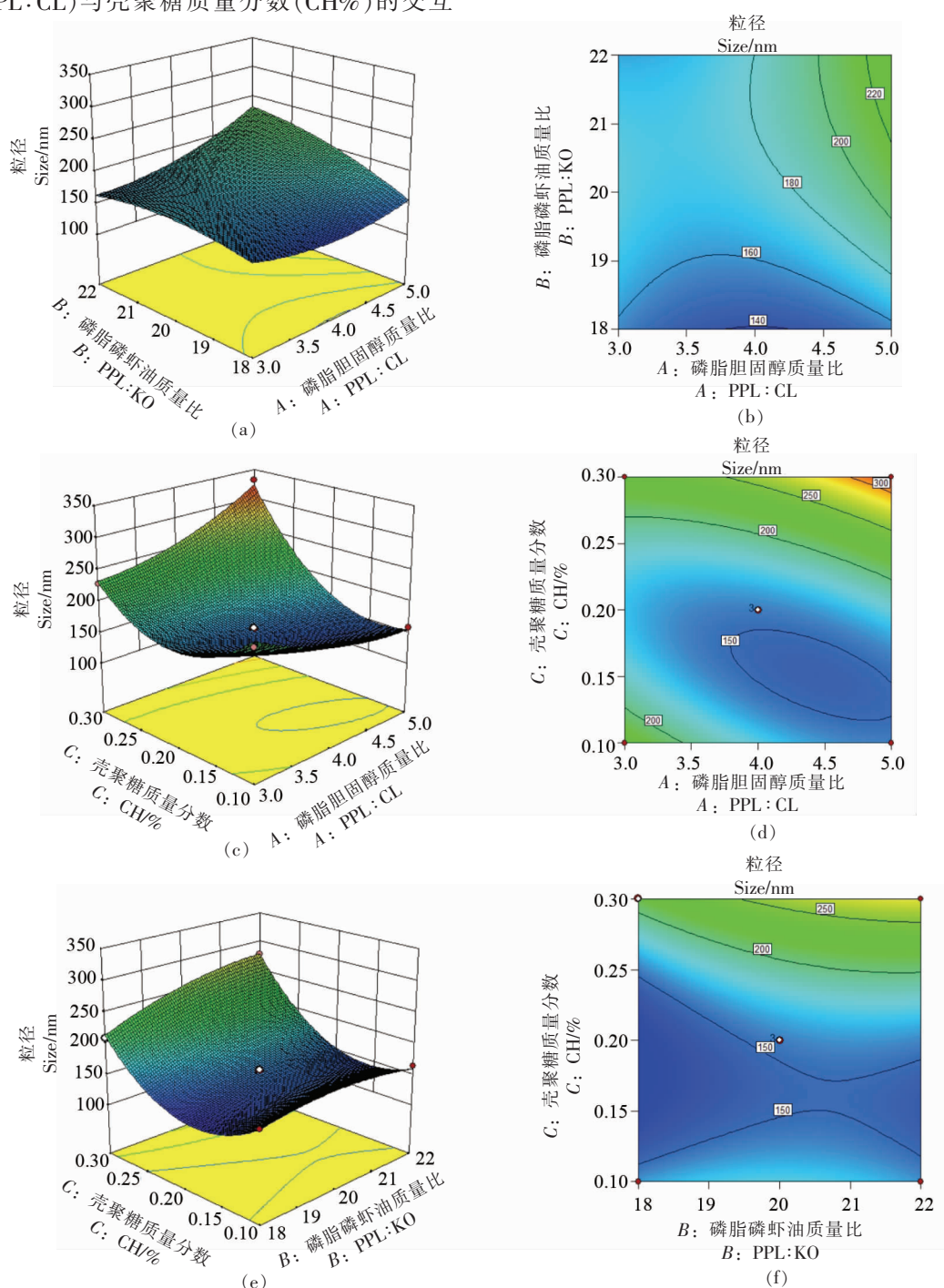


图1 交互作用对脂质体粒径影响的三维曲面图

Fig.1 3D surface plots and contour plots of interaction effect on the size of chitosan-krill oil nanoliposomes conjugate

2.1.2 以包封率为响应值的响应面优化结果 脂质体包封率系数显著性检验结果显示,该模型  $P < 0.01$ ,说明非常显著。失拟项不显著 ( $P=0.9096$ ),表明模型与试验结果的拟合度比较好。相关系数  $R^2 = 0.9534$ ,说明试验结果中 95.34%的实际值与模型中的预测值一致,关联度很高,校正系数  $R_{Adj}^2 = 0.8694$ ,表明 13.06%的变异不能用该模型去解释。运用方差分析对方程适用性进行评估,结果证明该模型拟合较好,预测脂质体包封率是适合的。C.V.(变异系数)=0.47%,该值越低表明试验的结果越可靠性。

经过该模型的方程回归系数显著性检验,卵

磷脂胆固醇比( $X_1$ )、卵磷脂磷虾油比( $X_2$ )和壳聚糖质量分数( $X_3$ )对脂质体包封率的线性效应都不显著; $X_1^2$ 和 $X_2^2$ 皆 $P < 0.01$ ,表明对响应结果的曲面效应很显著,而壳聚糖质量分数( $X_3$ )的二次项对响应值的曲面效应不显著。制备过程表明,包封率是与内部配方比例相关联的,因此不同的配比也会在一定程度上影响包封率的高低。磷脂胆固醇比、磷脂磷虾油比和壳聚糖质量分数能够对包封率的高低造成直接影响。壳聚糖质量分数( $X_3$ )的一次项回归系数(0.39)在3个因素的一次项回归系数中最高,表明在试验范围内,壳聚糖质量分数( $X_3$ )对响应值的影响最大。

表5 壳聚糖-磷虾油纳米脂质体共轭物包封率响应面二次系数显著性分析

Table 5 Response surface fitting quadratic coefficient significance test of the encapsulation efficiency of chitosan-krill oil nanoliposomes conjugate

方差来源	平方和	df	均方	F值	P值 Prob > F
模型	20.94	9	2.33	11.36	0.0078**
$X_1$ -PPL:CL	0.20	1	0.20	0.99	0.3651
$X_2$ -PPL:KO	0.11	1	0.11	0.56	0.4874
$X_3$ -CH%	1.19	1	1.19	5.81	0.0609
$X_1 \times X_2$	0.45	1	0.45	2.20	0.1985
$X_1 \times X_3$	0.28	1	0.28	1.39	0.2920
$X_2 \times X_3$	3.44	1	3.44	16.79	0.0094**
$X_1^2$	9.34	1	9.34	45.62	0.0011**
$X_2^2$	3.64	1	3.64	17.78	0.0084**
$X_3^2$	1.10	1	1.10	5.38	0.0681
残差	1.02	5	0.20		
失拟项	0.21	3	0.069	0.17	0.9096
误差	0.82	2	0.41		

注:\*\*.  $P < 0.01$ ,\*.  $P < 0.05$ 。

单因素之间的交互作用也会对试验结果(包封率)产生影响, $X_2X_3$ 的结果说明卵磷脂磷虾油比和壳聚糖质量分数两两交互对壳聚糖-磷虾油纳米脂质体共轭物包封率有显著影响( $P < 0.01$ ),而交互项 $X_1X_2$ 和 $X_1X_3$ 对响应值无显著影响。如图

2a所示,在试验条件范围内,当卵磷脂磷虾油比和壳聚糖质量分数向最优点增加时,脂质体包封率显著升高,而当卵磷脂磷虾油比和壳聚糖质量分数通过最优点后继续增加,脂质体包封率则显著降低。

表6 壳聚糖-磷虾油纳米脂质体共轭物包封率响应面二次模型方差分析

Table 6 Analysis of variance of quadratic model of response surface experiment for the encapsulation efficiency of chitosan-krill oil nanoliposomes conjugate

参数	数值	参数	数值
标准偏差	0.45	相关系数	0.9534
平均值	96.69	校正系数	0.8694
变异系数/%	0.47	相关系数预测值	0.7660
预测残差平方和	5.14	信噪比	11.554

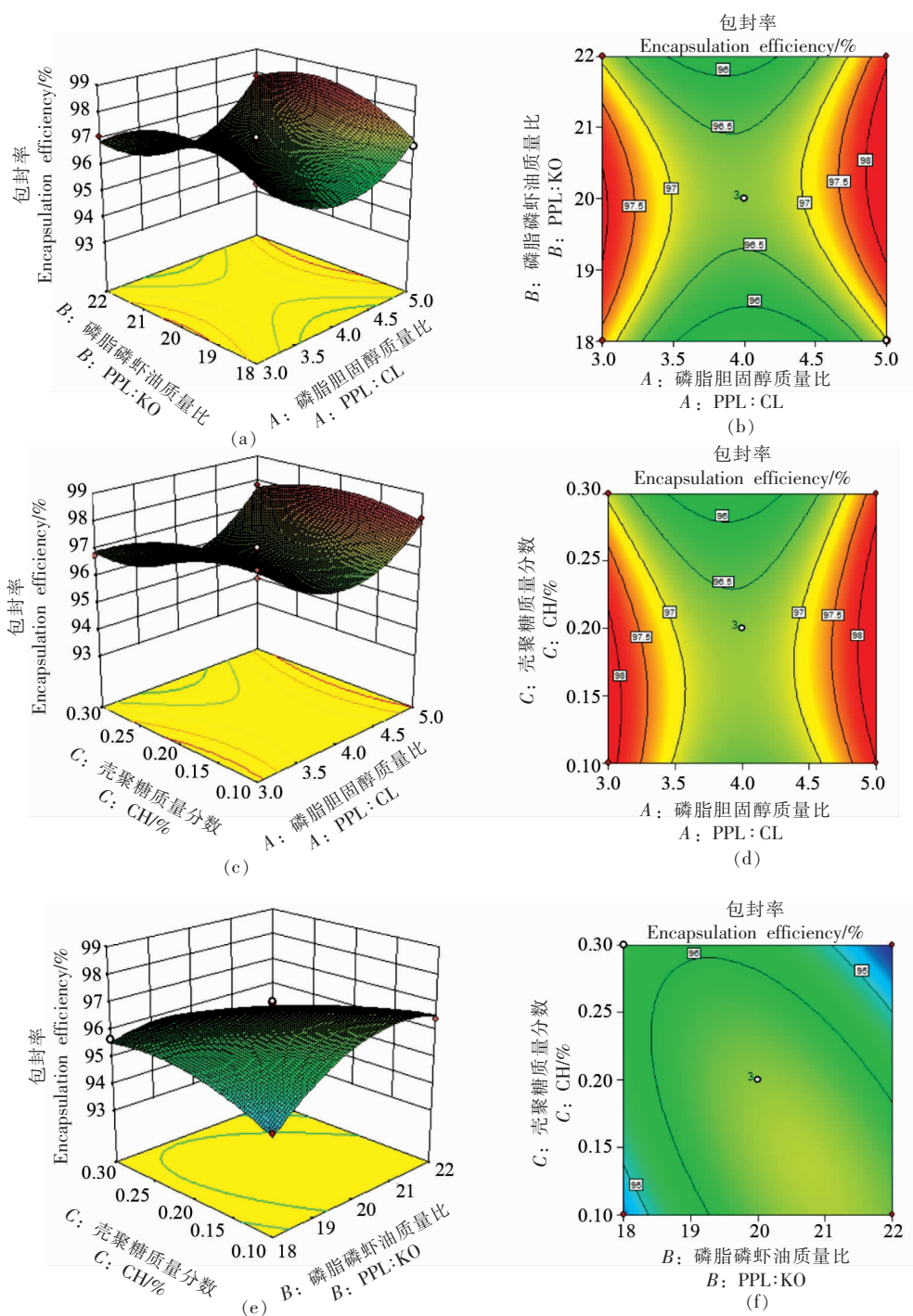


图2 交互作用对脂质体封装率影响的三维曲面图

Fig.2 3D surface plots and contour plots of interaction effect on the encapsulation efficiency of chitosan-krill oil nanoliposomes conjugate

2.1.3 响应面模型验证 通过软件分析,制备壳聚糖-磷虾油纳米脂质体的最佳工艺条件为:卵磷脂:胆固醇=5:1,卵磷脂:磷虾油=19.6:1,壳聚糖质量分数=0.146%,在此条件下粒径为145 nm,包

封率为98.1%。为了验证优化工艺参数的可靠性,结合实际操作方便性,将工艺参数调整为卵磷脂:胆固醇=5:1,卵磷脂:磷虾油=20:1,壳聚糖质量分数为0.15%的条件下进行3次平行试验,得

到脂质体粒径为 146.3 nm,包封率为 97.2%,与该模型的理论值误差小于 2%,说明由响应面优化得到的最佳工艺条件具有高度的可靠性。

2.2 脂质体浓度对斑马鱼胚胎存活率影响

在前文方法中设计了 10 组壳聚糖-磷虾油纳米脂质体共轭物浓度组,然而由于 1:100~1:200 间的浓度组 120 h 后的存活率为 0,因此未在表 7 中进行统计分析。

表 7 不同稀释倍数壳聚糖-磷虾油纳米脂质体共轭物处理后斑马鱼胚胎存活百分比 (%)  
Table 7 The survival rate of zebrafish embryos at after fertilization in different dilution ratio of chitosan-krill oil nanoliposomes conjugate (%)

稀释倍数	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
对照组	92.16 ± 2.77	90.20 ± 2.77	88.2 ± 44.80	88.24 ± 4.80	88.24 ± 4.80
250	83.27 ± 4.80*	79.08 ± 6.60*	70.72 ± 8.84**	44.58 ± 3.24**	42.35 ± 6.38**
300	93.87 ± 0.17	91.79 ± 3.04	83.70 ± 2.72	83.70 ± 2.72	79.66 ± 2.25*
350	91.90 ± 2.61	89.67 ± 3.21	85.49 ± 6.17	83.53 ± 3.46	81.57 ± 1.11
400	91.74 ± 2.53	91.74 ± 2.53	85.43 ± 2.41	85.43 ± 2.41	85.43 ± 2.41
450	98.04 ± 2.77	96.08 ± 5.55	91.77 ± 2.51	87.73 ± 4.49	83.42 ± 2.34

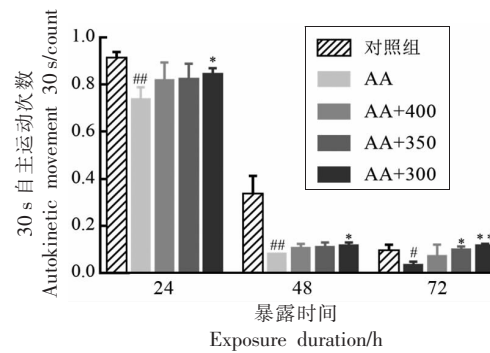
注:\*. 与对照组相比  $P < 0.05$ , \*\*. 与对照组相比  $P < 0.01$ 。

由表 7 可知,当壳聚糖-磷虾油纳米脂质体共轭物稀释倍数在 300~450 倍之间时,斑马鱼胚胎的存活率都比较高,而当稀释倍数为 250 时,存活率与对照组相比显著下降 ( $P < 0.01$ )。因此,最终选择稀释 400 倍、350 倍、300 倍的壳聚糖-磷虾油纳米脂质体共轭物溶液进行下一步试验。

2.3 脂质体浓度对斑马鱼胚胎氧化应激模型生长发育的影响

2.3.1 斑马鱼胚胎自主运动 如图 3 所示,在胚胎发育过程中,单独暴露于 3 mmol/L AA 组的斑马鱼胚胎自主运动明显受到抑制,而经过脂质体处理组对 AA 组造成的自主运动抑制都有一定程度的改善,且呈剂量依赖性。其中高浓度组有显著的改善 (24, 48 h,  $P < 0.05$ , 72 h,  $P < 0.01$ ), 斑马鱼胚胎从 24 h 到 72 h 的自主运动整体呈下降趋势,这可能是由于斑马鱼胚胎在不断孵化所致。

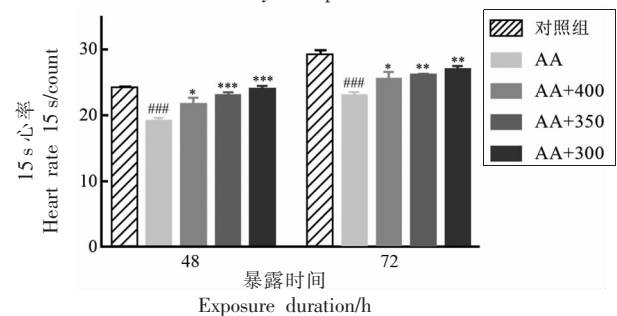
2.3.2 斑马鱼胚胎心率 如图 4 所示,在胚胎发育的过程中,单独暴露于 3 mmol/L AA 组的斑马鱼胚胎心率明显受到抑制,而经过脂质体处理组对 AA 组造成的心率降低都有显著的改善 ( $P < 0.05$  或 0.01 或 0.001),且呈剂量依赖性。其中稀释 350 倍组和稀释 300 倍组均有显著的改善 (48 h,  $P < 0.001$ , 72 h,  $P < 0.01$ ), 然而整体还是稀释 300 倍的浓度组改善效果最好。



注:将对照组作为参照, #.  $P < 0.05$ , ##.  $P < 0.01$ ; 将 AA 组作为参照, \*.  $P < 0.05$ , \*\*.  $P < 0.01$ 。

图 3 脂质体对暴露在丙烯酰胺中斑马鱼胚胎自主运动情况的影响

Fig.3 The effect of chitosan-krill oil nanoliposomes conjugate on autokinetic movement in zebrafish embryos exposed to AA



注:将对照组作为参照, ###.  $P < 0.001$ ; 将 AA 组作为参照, \*.  $P < 0.05$ , \*\*.  $P < 0.01$ , \*\*\*.  $P < 0.001$ 。

图 4 脂质体对丙烯酰胺作用下斑马鱼胚胎心率的影响  
Fig.4 Effect of chitosan-krill oil nanoliposomes conjugate on heart rate in zebrafish embryos exposed to AA



2.3.3 斑马鱼胚胎畸形率 如图5所示,在胚胎发育过程中,将对照组作为参照,AA组的单独作用对斑马鱼胚胎有显著性致畸作用( $P<0.01$ 或 $0.001$ ),斑马鱼胚胎生长发育过程中产生的畸形体现在心包水肿、充血和脊柱弯曲,然而一般不致死。观察记录斑马鱼胚胎的畸形情况累积至72 h,可以看到经过脂质体处理组对AA组造成的畸形有明显的改善,且呈剂量依赖性。其中稀释300倍组在72 h时有显著的改善作用( $P<0.01$ )。

2.3.4 斑马鱼胚胎孵化率 如图6所示,在胚胎发育过程中,与对照组相比,AA组的单独作用对斑马鱼胚胎的孵化有促进作用,这与Huang等<sup>[30]</sup>的结果一致,而经过AA和脂质体共同处理的组别对斑马鱼胚胎的孵化率有协同促进的效果,且都比AA组孵化率高。到72 h斑马鱼胚胎基本孵化完毕,因此组间无明显差别。

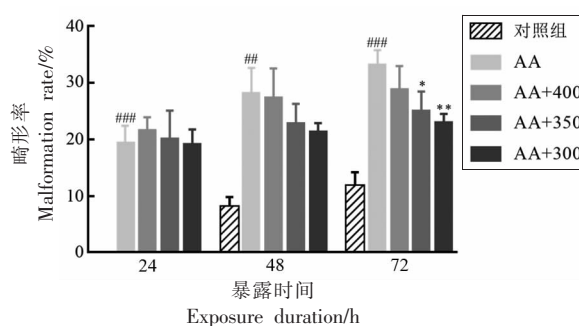
2.3.5 斑马鱼胚胎第5天体长 如图7所示,在胚胎发育过程中,与对照组相比,AA组的单独作用对斑马鱼胚胎的体长有显著的抑制作用( $P<0.001$ ),而脂质体的处理有助于改善这种情况,且呈剂量依赖性,与AA组相比,高浓度组(稀释300倍)对斑马鱼体长有明显的改善作用( $P<0.01$ )。

### 3 结论

经过响应面优化,在卵磷脂:胆固醇为5:1,卵磷脂:磷虾油为19.6:1,壳聚糖质量分数为0.146%条件下,制备的脂质体粒径适中,包封率较高,且经过验证也说明该模型的可靠性。由此条件制备的壳聚糖-磷虾油纳米脂质体共轭物,对由氧化应激损伤造成的生长发育受到抑制的斑马鱼模型,具有明显的改善作用,可改善氧化应激斑马鱼的自主运动、胎心率、体长,以及抑制畸形率等作用,且在一定范围内呈剂量依赖性。本研究为之后在食品中的应用提供了一定的参考。

### 参 考 文 献

- [1] 张建润. 南极磷虾油纳米乳的制备及其氧化稳定性研究[D]. 大连: 大连工业大学, 2018.  
ZHANG J R. Preparation and oxidation stability of Antarctic krill oil nanoemulsion[D]. Dalian: Dalian Polytechnic University, 2018.



注:将对照组作为参照,##,  $P<0.01$ ,###,  $P<0.001$ ;将AA组作为参照,\*,  $P<0.05$ ,\*\*,  $P<0.01$ 。

图5 脂质体对丙烯酰胺作用下斑马鱼胚胎畸形率的影响

Fig.5 Effect of chitosan-krill oil nanoliposomes conjugate on malformation rate in zebrafish embryos exposed to AA

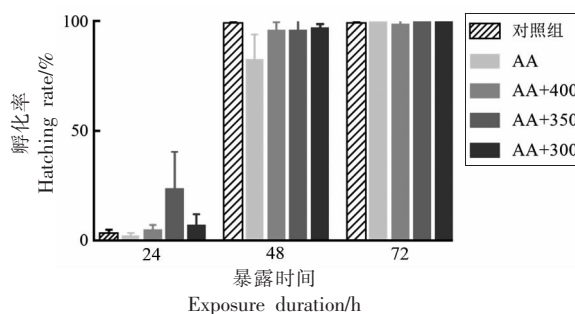
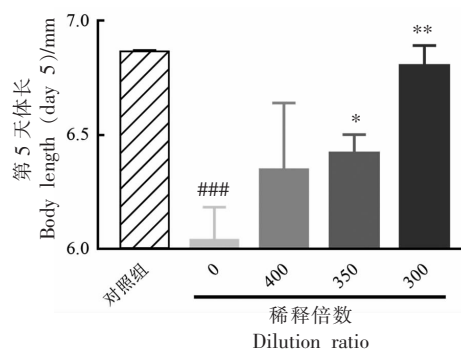


图6 脂质体对丙烯酰胺作用下斑马鱼胚胎孵化率的影响

Fig.6 Effect of chitosan-krill oil nanoliposomes conjugate on hatching rate in zebrafish embryos exposed to AA



注:将对照组作为参照,###,  $P<0.001$ ;将AA组作为参照,\*,  $P<0.05$ ,\*\*,  $P<0.01$ 。

图7 脂质体对丙烯酰胺作用下斑马鱼胚胎第5天体长的影响

Fig.7 Effect of chitosan-krill oil nanoliposomes conjugate on body length (day 5) in zebrafish embryos exposed to AA

- [2] 刘丽, 刘承初, 赵勇, 等. 南极磷虾的营养保健功效以及食用安全性评价[J]. 食品科学, 2010, 31(17): 443-447.  
LIU L, LIU C C, ZHAO Y, et al. Recent advances in the healthcare function and food safety of Antarctic krill [J]. Food Science, 2010, 31(17): 443-447.
- [3] 王亚恩. 南极磷虾油降血脂、抗氧化力及其改善记忆力功能实验研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2011.  
WANG Y E. Experimental study of the Antarctic krill oil on the serum lipids and antioxidation ability and memory ability[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2011.
- [4] VIGERUST N F, BJØRNDAL B, BOHOV P, et al. Krill oil versus fish oil in modulation of inflammation and lipid metabolism in mice transgenic for TNF- $\alpha$ [J]. European Journal of Nutrition, 2013, 52(4): 1315-1325.
- [5] PHLEGER C F, NELSON M M, MOONEY B D, et al. Interannual and between species comparison of the lipids, fatty acids and sterols of Antarctic krill from the US AMLR Elephant Island survey area[J]. Comparative Biochemistry and Physiology, Part B, 2002, 131(4): 733-747.
- [6] FRICKE H, GERCKEN G, SCHREIBER W, et al. Lipid, sterol and fatty acid composition of Antarctic krill (*Euphausia superba* Dana)[J]. Lipids, 1984, 19(11): 821-827.
- [7] KONAGAI C, TSUJI, LI, et al. Effects of krill oil containing n-3 polyunsaturated fatty acids in phospholipid form on human brain function: A randomized controlled trial in healthy elderly volunteers[J]. Clinical Interventions in Aging, 2013, 8: 1247-1257.
- [8] AWADA M, MEYNIER A, SOULAGE C O, et al. n-3 PUFA added to high-fat diets affect differently adiposity and inflammation when carried by phospholipids or triacylglycerols in mice[J]. BioMed Central, 2013, 10(1): 23.
- [9] HALS P A, WANG X, XIAO Y F. Effects of a purified krill oil phospholipid rich in long-chain omega-3 fatty acids on cardiovascular disease risk factors in non-human primates with naturally occurring diabetes type-2 and dyslipidemia[J]. Lipids in Health and Disease, 2017, 16(1): 11.
- [10] MIKI W. Biological functions and activities of animal carotenoids[J]. Pure and Applied Chemistry, 2013, 63(1): 141-146.
- [11] BALK E M, LICHTENSTEIN A H, CHUNG M, et al. Effects of omega-3 fatty acids on serum markers of cardiovascular disease risk: A systematic review [J]. Atherosclerosis, 2006, 189(1): 19-30.
- [12] RUXANDRA B, KHASSAN E F, LUISA D. Evaluation of the effects of Neptune Krill Oil on the clinical course of hyperlipidemia [J]. Alternative Medicine Review: A Journal of Clinical Therapeutic, 2004, 9(4): 420-428.
- [13] 王亚恩, 姜国良, 徐恺, 等. 南极磷虾油对高脂血症大鼠血脂和抗氧化力的影响[J]. 中国海洋药物, 2011, 30(3): 56-59.  
WANG Y E, JIANG G L, XU K, et al. Effects of the Antarctic krill oil on the serum lipids and antioxidation ability in hyperlipidemia rats[J]. Chinese Journal of Marine Drugs, 2011, 30(3): 56-59.
- [14] 宋迪, 范宁宁, 赵福江, 等. 南极磷虾油对2型糖尿病防治作用研究进展[J]. 中国卫生产业, 2011, 8(34): 171-172.  
SONG D, FAN N N, ZHAO F J, et al. Research progress on the preventive and therapeutic effects of Antarctic krill oil on T2DM[J]. China Health Industry, 2011, 8(34): 171-172.
- [15] 徐文思, 米云龙, 张建润, 等. 南极磷虾富脂蛋白的降胆固醇及降血糖活性[J]. 大连工业大学学报, 2015, 34(2): 79-83.  
XU W S, MI Y L, ZHANG J R, et al. Cholesterol-lowering and glucose-lowering effects of lipid-rich proteins from Antarctic krill (*Euphausia superba*)[J]. Journal of Dalian Polytechnic University, 2015, 34(2): 79-83.
- [16] LOBRAICO J M, DILELLO L C, BUTLER A D, et al. Effects of krill oil on endothelial function and other cardiovascular risk factors in participants with type 2 diabetes, a randomized controlled trial [J]. BMJ Open Diabetes Research & Care, 2015, 3(1): e000107.
- [17] 贺瑞坤, 罗海吉. 南极磷虾油对人类健康的作用[J]. 食品研究与开发, 2013, 34(20): 130-133.  
HE R K, LUO H J. Health benefits of Antarctic krill oil[J]. Food Research and Development, 2013, 34(20): 130-133.
- [18] CALDER P C. Polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: New twists in an old tale[J].

- Biochimie, 2009, 91(6): 791–795.
- [19] COSTANZO M, CESI V, PRETE E, et al. Krill oil reduces intestinal inflammation by improving epithelial integrity and impairing adherent-invasive *Escherichia coli* pathogenicity[J]. Digestive and Liver Disease, 2016, 48(1): 34–42.
- [20] GRIMSTAD T, BJØRNDAL B, CACABELOS D, et al. Dietary supplementation of krill oil attenuates inflammation and oxidative stress in experimental ulcerative colitis in rats[J]. Scandinavian Journal of Gastroenterology, 2012, 47(1): 49–58.
- [21] DEUTSCH L. Evaluation of the effect of neptune krill oil on chronic inflammation and arthritic symptoms[J]. Journal of the American College of Nutrition, 2007, 26(1): 39–48.
- [22] LI Z R, CHOI J H, OH H J, et al. Effects of eye drops containing a mixture of omega-3 essential fatty acids and hyaluronic acid on the ocular surface in desiccating stress-induced murine dry eye[J]. Current Eye Research, 2014, 39(9): 871–878.
- [23] RASHID S, JIN Y, ECOIFFIER T, et al. Topical omega-3 and omega-6 fatty acids for treatment of dry eye[J]. Archives of Ophthalmology, 2008, 126(2): 219–225.
- [24] XIE D, GONG M, WEI W, et al. Antarctic krill (*Euphausia superba*) oil: A comprehensive review of chemical composition, extraction technologies, health benefits, and current applications[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2019, 18(2): 514–534.
- [25] ALVES N M, MANO J F. Chitosan derivatives obtained by chemical modifications for biomedical and environmental applications[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2008, 43(5): 401–414.
- [26] RYU J H, HONG S, LEE H. Bio-inspired adhesive catechol-conjugated chitosan for biomedical applications: A mini review[J]. Acta Biomaterialia, 2015, 27: 101–115.
- [27] MAZLOOMI S N, MAHOONAK A S, GHORBANI M, et al. Physicochemical properties of chitosan-coated nanoliposome loaded with orange seed protein hydrolysate[J]. Journal of Food Engineering, 2020, 280: 109976.
- [28] SHISHIR M R I, KARIM N, GOWD V, et al. Pectin-chitosan conjugated nanoliposome as a promising delivery system for neohesperidin: Characterization, release behavior, cellular uptake, and antioxidant property[J]. Food Hydrocolloids, 2019, 95: 432–444.
- [29] LINDEMAN B, JOHANSSON Y, ANDREASSEN M, et al. Does the food processing contaminant acrylamide cause developmental neurotoxicity? A review and identification of knowledge gaps[J]. Reproductive Toxicology, 2021, 101: 93–114.
- [30] HUANG M, JIAO J, WANG J, et al. Exposure to acrylamide induces cardiac developmental toxicity in zebrafish during cardiogenesis[J]. Environmental Pollution, 2018, 234: 656–666.

### Preparation of Chitosan-Krill Oil Nanoliposome Conjugate and Its Effect on the Growth and Development of Zebrafish Embryos

Zheng Yangfan, Chen Yixuan, Chen Juan, Zhao Jiawen, Yu Huilin, Zhao Yan, Li Honghao, Zhu Jiajin\*  
(College of Biosystems Engineering & Food Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058)

**Abstract** Antarctic krill oil is rich in astaxanthin and unsaturated fatty acids. It is one of the products with high development value in Antarctic krill extract. However, its insoluble water solubility limits its application in food. As a polymer polysaccharide, chitosan is often used as a carrier for some drugs, which can control its release, enhance curative effect, and reduce adverse reactions. In this paper, the response surface optimization method was used to optimize the effects of the three factors of phospholipid-cholesterol ratio, phospholipid-krill oil ratio and chitosan conjugate concentration, and further explore the effects of the optimized product on propylene. Effects of amide-induced oxidative stress on the growth and development of zebrafish embryos. The results showed that under the condition that lecithin:cholesterol is 5:1, lecithin:krill oil is 19.6:1, and the chitosan mass fraction is 0.146%, the particle size is moderately 145 nm, and the maximum encapsulation efficiency is 98.1%. In addition, it has a significant improvement effect on the inhibition of growth and development caused by oxidative stress damage, and it is dose-dependent within a certain range.

**Keywords** chitosan conjugate; response surface optimization; krill oil; zebrafish; growth and development