

双孢菇壳聚糖纳米脂质体的制备 及体外降血糖功效研究

陈彦之¹ 张嘉文² 张默澜¹ 游丽君¹

(1. 华南理工大学食品科学与工程学院, 广东 广州 510640;

2. 墨尔本大学农业、食品与生态系统科学学院, 澳大利亚 维多利亚州 3052)

摘要: [目的] 为改善盐酸二甲双胍 (metformin hydrochloride, MET) 口服利用受限及常规脂质体递送效率不足的问题, 构建双孢菇壳聚糖 (*Agaricus bisporus* chitosan, ACS) 修饰的载 MET 纳米脂质体 (ACS-modified liposomes (A-M-L)), 并评价其理化性质、贮藏稳定性、细胞相容性及对 HepG2 细胞葡萄糖消耗的影响。[方法] 以 ACS 替代甲壳类壳聚糖, 采用薄膜分散—超声技术制备载 MET 的纳米脂质体。通过傅里叶变换红外光谱 (FTIR) 和透射电子显微镜 (TEM) 观察其结构特征与微观形貌, 并测定粒径、PDI、Zeta 电位、包封率、贮藏稳定性、细胞毒性及葡萄糖消耗量。[结果] ACS 修饰改善了脂质体的理化性能, 0.5% ACS 修饰组的粒径约为 159.45 nm, 多分散性指数 (PDI) 低至 0.10, 初始包封率达 87.46%; 微观表征证实药物成功包载; 在 4 °C 冷藏 21 d 后, 体系粒径仅增长 1.8%, 包封率仍维持在 83.1%, 在研究贮藏条件下表现出较好的稳定性; 体外试验表明, 1.0% ACS 修饰组能促进 HepG2 细胞葡萄糖消耗, 提高葡萄糖代谢水平, 其葡萄糖消耗量高达 4.9 mmol/L, 高于盐酸二甲双胍原药组 (3.5 mmol/L) 及未修饰脂质体组 (2.3 mmol/L), 并有效缓冲了原药的细胞毒性。[结论] ACS 修饰载 MET 纳米脂质体可改善脂质体分散性、包封率和贮藏稳定性, 并在体外提高 HepG2 细胞葡萄糖消耗量。

关键词: 双孢菇; 壳聚糖; 纳米脂质体; 盐酸二甲双胍; 葡萄糖消耗

Preparation of *Agaricus bisporus* chitosan nanoliposomes and their *in vitro* hypoglycemic effects

Chen Yanzhi¹ Zhang Jiawen² Zhang Molan¹ You Lijun¹

(1. School of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou, Guangdong 510640, China; 2. School of Agriculture, Food and Ecosystem Sciences, University of Melbourne, VIC 3052, Australia)

Abstract: [Objective] To address the limited oral utilization of metformin hydrochloride (MET) and the insufficient delivery efficiency of conventional liposomes, MET-loaded nanoliposomes modified with *Agaricus bisporus* chitosan (ACS) (ACS-modified liposomes, A-M-L) were developed, and their physicochemical properties, storage stability, cytocompatibility, and effects on glucose consumption by HepG2 cells were evaluated. [Methods] ACS was used as a substitute for crustacean chitosan to prepare MET-loaded nanoliposomes using the thin-film dispersion-ultrasonication method. The structural characteristics and microscopic morphology were observed by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and transmission electron microscopy (TEM), and particle size, polydispersity index (PDI), zeta potential, encapsulation efficiency, storage stability, cytotoxicity, and glucose consumption were determined. [Results] ACS modification improved the physicochemical properties of the liposomes. The 0.5% ACS-modified group exhibited a particle size of approximately 159.45 nm, a low

基金项目: “十四五”国家重点研发计划重点专项 (编号: 2024YFE0109500)

通信作者: 游丽君 (1982—), 女, 华南理工大学教授, 博士。E-mail: feyoulijun@scut.edu.cn

收稿日期: 2026-04-02 **改回日期:** 2026-08-03

引用格式: 陈彦之, 张嘉文, 张默澜, 等. 双孢菇壳聚糖纳米脂质体的制备及体外降血糖功效研究[J]. 食品与机械, 2026, 42(8): 140-148.

Citation: Chen Yanzhi, Zhang Jiawen, Zhang Molan, et al. Preparation of *Agaricus bisporus* chitosan nanoliposomes and their *in vitro* hypoglycemic effects[J]. Food & Machinery, 2026, 42(8): 140-148.

PDI of 0.10, and an initial encapsulation efficiency of 87.46%. Microscopic characterization indicated the successful encapsulation of the drug. After storage at 4 °C for 21 days, the particle size increased by only 1.8%, while the encapsulation efficiency remained at 83.1%, indicating good stability under the storage conditions used in this study. *In vitro* experiments demonstrated that the 1.0% ACS-modified group promoted glucose consumption by HepG2 cells and enhanced glucose metabolism, with glucose consumption reaching 4.9 mmol/L, higher than that in the MET drug group (3.5 mmol/L) and the unmodified liposome group (2.3 mmol/L). In addition, ACS modification effectively attenuated the cytotoxicity of the free drug. [Conclusion] ACS-modified MET-loaded nanoliposomes can improve the dispersibility, encapsulation efficiency, and storage stability of liposomes and increase glucose consumption by HepG2 cells *in vitro*.

Keywords: *Agaricus bisporus*; chitosan; nanoliposomes; metformin hydrochloride; glucose consumption

盐酸二甲双胍(metformin hydrochloride, MET)在临床上被用于治疗2型糖尿病^[1]。该药物通过抑制肝糖异生、改善外周胰岛素抵抗来降低血糖,其价格低廉且单独使用无低血糖风险^[2]。然而,该药物的口服生物利用度偏低(约50%~60%),且容易引发明显的胃肠道刺激反应^[3-4]。而纳米脂质体(nanoliposomes, LPs)作为一种亲水性药物递送系统,能够利用磷脂双分子层高效包裹MET^[5-6]。这层脂质保护膜可以抵御胃肠道酶的降解,延长药物的体内滞留时间^[7]。但口服脂质体在肠道内面临着黏液层与上皮细胞层的双重阻碍。肠道黏液的致密网状结构会通过空间位阻和静电排斥限制颗粒的扩散^[8-9]。上皮细胞的药物摄取效率又高度依赖于载体的表面理化特性。这两个生理屏障共同影响常规脂质体的递送效率,难以从根本上解决二甲双胍吸收率低的问题。构建兼具稳定性和表面调控能力的脂质体修饰体系,是提高MET递送性能的可行思路^[10-11]。

对于脂质体递送系统,多糖修饰能够显著改善其在胃肠道环境压力下的物理稳定性^[12]。壳聚糖分子中丰富的羟基和氨基能够与脂质体外层的负电荷基团发生静电结合,在脂质体表面构建一层稳定的高分子保护膜^[13-15]。这不仅能抵御胃肠道消化酶的破坏,还能提升颗粒在复杂生理环境中的体外消化稳定性^[16-17]。壳聚糖的正电荷特性理论上能够中和肠道黏液层中的阴离子黏蛋白,进而瓦解黏液的致密网状结构^[18-19];此外,其固有的黏膜黏附性也有助于延长纳米脂质体在肠道内的物理滞留时间^[20]。

相比于传统虾蟹甲壳来源壳聚糖,双孢菇壳聚糖(*Agaricus bisporus* chitosan, ACS)来源于真菌细胞壁,其制备过程无需脱除大量矿物质和蛋白质,杂质含量较低,提取条件较温和,且能够避免甲壳类原料可能带来的过敏原残留问题,因此具有原料来源稳定、致敏风险较低和良好的生物相容性等优势^[21-23]。此外,ACS分子链富含氨基和羟基等活性基团,可通过静电作用、氢键等非共价相互作用与脂质体表面发生作用,从而改善脂质体的表面性质和分散稳定性,并具有良好的成膜性能^[24-25]。已

有研究^[26-27]表明,食药菌来源多糖能够调节 α -葡萄糖苷酶活性、肠道菌群及糖代谢相关过程,在糖代谢调控方面具有一定生物学活性。因此,ACS不仅可作为天然脂质体修饰材料^[28],还有望改善脂质体递送体系的理化性能,并为其在功能性递送体系中的应用提供新的研究思路^[29]。

研究拟以双孢菇壳聚糖为基础原料,采用薄膜分散—超声技术制备载盐酸二甲双胍纳米脂质体,并对其理化性质、微观形态和贮藏稳定性进行表征,同时采用HepG2细胞模型评价复合递送体系的体外细胞相容性和葡萄糖消耗活性,旨在为MET脂质体递送体系的进一步优化提供试验依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

双孢菇:河南省食用菌微生物控制工程技术研究中心;

盐酸二甲双胍、氯仿、胆固醇、卵磷脂、氢氧化钠:分析纯,阿拉丁生化科技有限责任公司;

细胞计数试剂盒-8(CCK-8):广州诺莱希生物科技有限公司;

葡萄糖胺(GlcN):上海麦克林生化科技有限公司;

葡萄糖(GLU)试剂盒(葡萄糖氧化酶法):南京建成生物工程研究所;

试验所用其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

旋转冷凝蒸发器:RE-52型,郑州华辰仪器有限公司;
冷冻干燥机:SCIENTZ-12N/A型,杭州西溪生物技术有限公司;

脂质体挤出器:610000型,美国Avanti公司;

超声波细胞粉碎机:JY92-II N型,宁波新芝生物科技股份有限公司;

紫外分光光度计:UV-2600型,日本岛津公司;

多功能酶标仪:Neo2型,安捷伦科技有限公司;

激光粒度分析仪:NANO-ZS90型,英国Malvern公司;

傅里叶变换红外光谱仪:Nicolet iS50 型,美国赛默飞世尔科技公司;

透射电子显微镜:Talos L120c 型,美国赛默飞世尔科技公司。

1.3 双孢菇壳聚糖(ACS)的提取

取干燥双孢菇,经超微粉碎机粉碎后过 200 目筛,得到双孢菇超微粉。按照料液比 1:20 (g/mL)加入 5% NaOH 溶液,升温进行回流反应,回流反应温度为 80 ℃,回流反应的次数为 1 次,共 4 h,去除脂质、粗蛋白等杂质,过滤,用蒸馏水洗涤沉淀至中性;将所述沉淀按照料液比 1:15 (g/mL)加入 3% H₂O₂ 溶液,室温避光搅拌 60 min,去除色素等杂质,过滤,用蒸馏水洗净沉淀至 H₂O₂ 完全除去,得脱色几丁质;将上述脱色几丁质按照料液比 1:20 (g/mL)加入 50% NaOH 溶液,150 ℃油浴搅拌 3 h,室温下 8 000 r/min 离心 15 min,所得沉淀用蒸馏水洗涤至中性,用 1% 冰醋酸溶解,冻干得 ACS 粉末。

1.4 纳米脂质体的制备

采用薄膜分散-超声法制备双孢菇壳聚糖纳米脂质体,取大豆卵磷脂、胆固醇按照质量比 4:1 加入氯仿作为有机相,使用旋转冷凝蒸发器置于 30 ℃水浴下减压旋转蒸发,直至形成均匀透明的脂质薄膜;另取适量盐酸二甲双胍,加入 10 mL PBS 搅拌混匀作为水相,将其倒入旋蒸瓶水合 1 h,形成空白纳米脂质体混悬液;随后采用超声波细胞粉碎机对混悬液进行超声处理,超声功率 200 W,超声时间 10 min(超声 2 s、间歇 2 s),获得粒径均匀的空白纳米脂质体;取 ACS 粉末,用 1% 醋酸溶液溶解并磁力搅拌至完全透明,配制成质量浓度为 0.1,0.5,1.0 g/100 mL 的 ACS 溶液,将其缓慢加入空白纳米脂质体混悬液中,调节体系 pH 至 5.0~5.5,室温下静置 30 min 后,将混悬液置于高速离心机中,10 000 r/min 离心 30 min,弃去上清液中的游离药物和未结合的 ACS,收集沉淀,用 PBS 重悬洗涤 2~3 次,再次离心后,将沉淀重悬于 PBS 中,即得双孢菇壳聚糖纳米脂质体(A-M-L)。未加入盐酸二甲双胍以及 ACS 的脂质体命名为 Control-LP(CON-LP),加入盐酸二甲双胍但未添加 ACS 修饰的脂质体命名为 Metformin-LP(MET-LP),使用商业壳聚糖进行修饰的脂质体命名为 Chitosan-LP(CS-LP)。上述所有样品制备完毕后放入 4 ℃冷藏密封保存备用。

1.5 ACS 得率的计算

ACS 得率按照处理前后的质量变化来计算,计算式如式(1)所示。

$$Y = \frac{m_1}{m_0} \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

Y ——得率,%;

m_0 ——提取前双孢菇粉的质量,g;

m_1 ——提取后 ACS 的质量,g。

1.6 ACS 脱乙酰度的计算

参照 Liu 等^[29]的方法并稍作修改。准确称取 0.15 g ACS 样品,加入 20 mL 0.1 mol/L 盐酸标准溶液,在 25 ℃条件下磁力搅拌 30 min,使样品充分溶解。随后加入 2~3 滴甲基橙-苯胺蓝混合指示剂,以 0.1 mol/L 氢氧化钠标准溶液进行滴定,当溶液颜色由淡紫色变为蓝绿色(终点 pH 约为 4.3)时停止滴定,记录 NaOH 标准溶液消耗体积,并根据式(2)计算样品的脱乙酰度。

$$D = \frac{(c_1 V_1 - c_2 V_2) \times 0.016}{m_3 (1 - w) \times 0.0994} \times 100\%, \quad (2)$$

式中:

D ——ACS 的脱乙酰度,%;

c_1 ——HCl 标准溶液浓度, mol/L;

c_2 ——NaOH 标准溶液浓度, mol/L;

V_1 ——溶解样品的盐酸体积, mL;

V_2 ——消耗 NaOH 标准溶液体积, mL;

m_3 ——样品克数,g;

w ——样品湿度,%。

1.7 ACS 黏均相对分子质量测定

ACS 的黏均相对分子质量采用黏度法测定,参照朱静毅等^[30]的方法并稍作修改。准确称取 0.20 g 壳聚糖样品,加入 20 mL 0.1 mol/L 乙酸溶液充分分散后,定容至 100 mL,配制成质量浓度为 2.0 mg/mL 的壳聚糖溶液,并依次稀释至 1.0,0.8,0.6,0.4,0.2 mg/mL。在 25 ℃条件下,采用乌氏黏度计(内径 0.5~0.6 mm)分别测定各浓度溶液的流出时间,计算相对黏度(η_r)和增比黏度(η_{sp}),采用外推法求得固有黏度($[\eta]$),再依据 Mark-Houwink 方程计算壳聚糖的黏均相对分子质量(M_w):

$$[\eta] = KM_w^\alpha, \quad (3)$$

式中:

$[\eta]$ ——壳聚糖溶液固有黏度, mL/g;

M_w ——ACS 的黏均相对分子质量;

K ——比例常数, 3.72×10^{-5} mL/g;

α ——分子扩张因子, 1.37。

1.8 脂质体粒径、多分散性指数与 Zeta 电位测定

参照陈麟等^[31]的方法加以修改,将制备得到的双孢菇壳聚糖纳米脂质体用 PBS 稀释 10 倍,超声分散 1 min 后,设置检测温度 25 ℃,平衡时间 2 min,使用激光粒度分析仪进行检测,测定粒径、多分散性指数(PDI)与 Zeta 电位,每个样品平行测定 3 次。

1.9 包封率测定

参照时振振等^[32]的方法加以修改,使用盐酸二甲双胍作为标准品,称量溶解定容于PBS,得到质量浓度梯度0~20 $\mu\text{g/mL}$ 的盐酸二甲双胍标准溶液。取脂质体外壳和载药脂质体溶液各1 mL,在12 000 r/min、4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下离心30 min,取上清液并加PBS稀释100倍,各取200 μL 于试管中作为待测样品溶液。96孔板每孔各加200 μL 试管溶液,设计3组平行,使用紫外分光光度计于233 nm处测定吸光度值,绘制盐酸二甲双胍标准曲线,计算上清液中游离药物浓度和质量,再按式(3)计算双孢菇壳聚糖纳米脂质体的包封率。

$$E = \frac{m_4 - m_5}{m_4} \times 100\%, \quad (4)$$

式中:

E ——双孢菇壳聚糖纳米脂质体的包封率,%;

m_4 ——投入盐酸二甲双胍的总质量,g;

m_5 ——游离盐酸二甲双胍的质量,g。

1.10 傅里叶红外光谱分析

参照于少轩等^[6]的方法,取约2 mg样品,经充分研磨后与光谱纯KBr混合均匀并压制成透明薄片,采用傅里叶变换红外光谱仪进行测试。测试参数:扫描范围4 000~500 cm^{-1} ,分辨率4 cm^{-1} 。根据所得红外光谱分析样品的特征官能团及分子间相互作用。

1.11 透射电镜(TEM)检测

参照孙思源等^[33]的方法加以修改。采用负染法制备TEM样品:取10 μL 脂质体混悬液,滴加至经等离子体清洗的铜网上,室温静置3 min使脂质体充分吸附。用滤纸吸去多余液体,滴加10 μL 2%磷钨酸溶液进行负染,室温静置2 min后再次吸去染液。将制备好的样品置于透射电子显微镜下,以加速电压120 kV观察脂质体的形貌,通过仪器自带图像分析系统拍摄不同视野下放大200倍后的透射电镜图像。

1.12 贮藏稳定性评价

将不同组别的双孢菇壳聚糖纳米脂质体置于4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下贮藏21 d,分别在0,7,14,21 d取样,使用激光粒度分析仪测定粒径,包封率变化。

1.13 HepG2细胞毒性试验

参照Lari等^[34]的方法加以修改。取传代3~5代、状态稳定的HepG2细胞,用胰酶消化后离心重悬,调整细胞数至 5×10^5 个/mL,每孔100 μL 接种于96孔板,放入37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 细胞培养箱中培养24 h,待细胞贴壁率达90%以上后,设置空白对照组(CON)、壳聚糖标准品组(CS)、双孢菇壳聚糖组(ACS)、阳性对照组(MET)、未修饰载药脂质体组(MET-LP)、0.1%质量分数双孢菇壳聚糖修饰脂质

体组(0.1% A-M-L)、0.5%质量分数双孢菇壳聚糖修饰脂质体组(0.5% A-M-L)以及1.0%质量分数双孢菇壳聚糖修饰脂质体组(1.0% A-M-L)。每组设置3个复孔以减少试验误差,各给药组加入对应浓度的药物(空白对照组仅补加等量DMEM高糖培养基,总体系保持200 μL),继续孵育24 h后,每孔加入10 μL CCK8试剂,避光孵育2 h,用酶标仪在450 nm下检测各孔吸光度值,计算细胞存活率。

1.14 HepG2细胞降血糖活性试验

参照Alaaeldin等^[35]的方法加以修改。取传代3~5代、贴壁状态良好的HepG2细胞,调整细胞数至 5×10^5 个/mL,每孔100 μL 接种于96孔板,放入37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 细胞培养箱中培养24 h,待细胞贴壁生长良好后,更换为无血清DMEM培养基进行饥饿培养12 h,以消耗细胞内储存的葡萄糖、消除血清对试验结果的干扰。随后进行诱导造模处理,向模型组、阳性对照组以及脂质体组孔中加入20 mmol/L葡萄糖胺造模液,诱导18 h。然后加入上述CCK8毒性试验确定的安全浓度药物,分组与毒性试验保持一致,每组设置3个复孔以减少试验误差,继续孵育24 h后,吸取各孔细胞上清液,采用葡萄糖检测试剂盒检测上清液中剩余葡萄糖含量,通过对比各组葡萄糖消耗差值,明确运载体系对HepG2细胞葡萄糖代谢的影响,进而评价其降血糖活性。

1.15 数据统计

所有试验数据均重复3次,以平均值 $\pm$ 标准误差平均值表示。数据使用SPSS软件(SPSS 23)进行方差分析(ANOVA)和Duncan检验,以确定各值之间的显著性差异($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 ACS的基础理化性质

ACS的得率、脱乙酰度及黏均相对分子质量测定结果分别由式(1)、式(2)以及式(3)计算得到:ACS得率为3.3%,脱乙酰度为85.5%,黏均相对分子质量为 1.56×10^5 。脱乙酰度是评价壳聚糖理化性质的重要指标,较高的脱乙酰度意味着分子链上具有更多游离氨基,有利于提高壳聚糖的溶解性及其与其他组分之间的相互作用能力。通常认为,脱乙酰度高于80%的壳聚糖具有较好的成膜性和生物相容性,可满足药物递送材料的应用要求^[36]。研究获得的ACS脱乙酰度为85.5%,表明脱乙酰反应较为充分,所得壳聚糖能够满足后续脂质体表面修饰的需要。

壳聚糖的相对分子质量对其溶液黏度、成膜性能及纳米载体的构建具有重要影响。适中的相对分子质量既能够保证壳聚糖具有良好的成膜性能,又可避免因分子链过长导致溶液黏度过高而影响脂质体的分散性。研究

制备的 ACS 黏均相对分子质量为 1.56×10^5 , 属于中等分子量壳聚糖, 与文献[23]报道的真菌来源壳聚糖相对分子质量范围基本一致, 适用于纳米脂质体的表面修饰^[28]。综上, 研究制备的 ACS 具有较高的脱乙酰度和适宜的黏均相对分子质量, 为后续构建 ACS 修饰载盐酸二甲双胍纳米脂质体提供了材料基础。

2.2 ACS 修饰对纳米脂质体基础理化性质的优化

脂质体的粒径大小、多分散性指数(PDI)以及表面电位直接影响药物递送体系的分散状态和细胞相互作用^[37]。未修饰 CON-LP 粒径为 113.47 nm, MET-LP 粒径为 113.20 nm; 加入 ACS 后, 不同浓度修饰组粒径发生变化, 其中 0.5% A-M-L 粒径增至 159.45 nm, 仍处于纳米级范围(100~200 nm)^[38]。与 0.5% CS-LP 组相比, 0.5% A-M-L 粒径较大, 但 PDI 较低(0.10), 说明 ACS 修饰后体系

粒径分布更集中。与 0.1% 和 1.0% A-M-L 组相比, 0.5% A-M-L 组在粒径、PDI 和包封率之间表现出较好的综合平衡。PDI 降低提示壳聚糖高分子层可能在脂质体表面形成空间位阻效应, 减少囊泡之间的碰撞与融合, 从而改善颗粒分散性^[39]。

微粒的表面电位(Zeta 电位)变化进一步印证了包覆过程的成功。未修饰的空白脂质体表面携带负电荷, Zeta 电位为 -10.4 mV。经过 ACS 修饰后, 各组脂质体的 Zeta 电位均转为正值并呈上升趋势。这种电荷反转现象归因于壳聚糖分子链上大量质子化的游离氨基^[40]。表面正电荷的增加赋予了脂质体更强的静电排斥力, 显著提升了胶体体系的物理稳定性。同时, 带正电的脂质体理论上更容易与带有负电荷的细胞膜发生静电吸附, 这为延长药物在生理环境中的滞留时间提供了关键的物理基础^[41]。

表 1 双孢菇壳聚糖纳米脂质体的表征[†]

Table 1 Characterization of *Agaricus bisporus* chitosan liposomes

样品	粒径/nm	PDI	Zeta 电位/mV	包封率/%
CON-LP	113.47 ± 2.25^d	0.23 ± 0.02^a	-10.40 ± 1.26^c	
MET-LP	113.20 ± 1.25^d	0.17 ± 0.02^{bc}	0.17 ± 0.26^b	76.76 ± 2.58^c
0.1% A-M-L	116.00 ± 1.08^d	0.20 ± 0.00^{ab}	0.04 ± 0.16^a	85.21 ± 0.91^{ab}
0.5% A-M-L	159.45 ± 2.36^a	0.10 ± 0.01^d	0.69 ± 0.18^a	87.46 ± 3.34^{ab}
1.0% A-M-L	135.13 ± 1.53^c	0.11 ± 0.02^d	1.35 ± 0.18^a	88.54 ± 1.09^a
0.5% CS-LP	140.47 ± 2.25^b	0.13 ± 0.02^{cd}	1.04 ± 1.26^a	82.46 ± 0.88^b

[†] 同列数据肩标小写字母不同表示组间差异显著($P < 0.05$)。

2.3 傅里叶红外光谱对包载结构的化学验证

在完成粒径、PDI、Zeta 电位和包封率等理化性质测定后, 利用傅里叶红外光谱(FTIR)解析了复合体系的化学结构与相互作用。如图 1 所示, ACS 在 $3\,323\text{ cm}^{-1}$ 处呈现 O—H/N—H 伸缩振动峰, 在 $1\,598\text{ cm}^{-1}$ 处表现出酰胺 I 带特征峰, 与市售壳聚糖标准品(CS)的图谱高度匹配, 证实了提取物结构的纯正^[42]。盐酸二甲双胍(MET)的图谱在 $3\,363, 3\,147\text{ cm}^{-1}$ 处存在典型的游离 N—H 伸缩振动峰, 并在 $1\,548\text{ cm}^{-1}$ 处表现出强烈的 C=N 伸缩振动特征峰。当药物被载入脂质体形成 MET-LP 后, 上述药物特征吸收信号得到明确保留, 但发生了显著的峰位移动。具体而言, 其 N—H 峰分别偏移至 $3\,339, 3\,185\text{ cm}^{-1}$, 同时 C=N 峰也移动至 $1\,564\text{ cm}^{-1}$ 。进一步引入 ACS 包覆形成 1.0% A-M-L 后, 该体系在 $3\,300\text{ cm}^{-1}$ 附近的吸收峰不仅发生显著宽化, 且进一步位移至 $3\,286\text{ cm}^{-1}$ 。上述详尽的光谱偏移数据从分子层面充分证明, MET 已被成功截留于体系中, 并且药物、脂质体与壳聚糖之间通过氢键等非共价形式产生了紧密的化学相互作用^[43]。

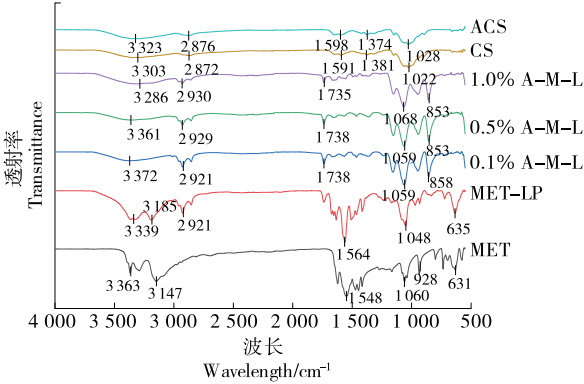


图 1 双孢菇壳聚糖(ACS)、标准壳聚糖样品(CS)、未修饰纳米脂质体(MET-LP)、双孢菇壳聚糖纳米脂质体(A-M-Ls)的傅里叶红外图谱

Figure 1 Fourier transform infrared (FTIR) spectra of *Agaricus bisporus* chitosan (ACS), standard chitosan (CS), unmodified liposomes (MET-LP), and ACS-modified liposomes (A-M-Ls)

2.4 透射电镜下的形态学观察

如图 2 所示, 未修饰的脂质体呈现出典型的类球形结构。其表面相对光滑, 但在视野局部存在轻微的颗粒聚

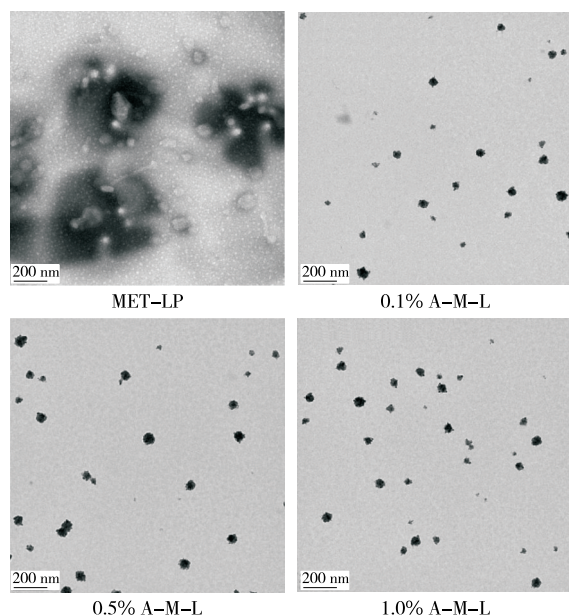


图2 未修饰脂质体(MET-LP)和双孢菇壳聚糖修饰的脂质体(A-M-Ls)的透射电子显微镜(TEM)图像

Figure 2 Transmission electron microscopy (TEM) images of unmodified liposomes (MET-LP) and ACS-modified liposomes (A-M-Ls)

集现象。这种聚集主要是因为单一的磷脂双分子层表面缺乏足够的位阻保护,颗粒在水溶液中容易因疏水相互作用而自发粘连^[44]。而经ACS修饰后,脂质体颗粒分散性得到改善,视野中不再出现明显的聚集粘连。其中0.5% A-M-L组颗粒分布较均匀,聚集现象较少;1.0% A-M-L组同样保持较好的分散状态,但局部仍可观察到少量颗粒彼此接近;0.1% A-M-L组的颗粒分布介于两者之间。高倍率观察发现,修饰后的颗粒表面粗糙度略有增加,结合FTIR分析结果可知,ACS修饰后脂质体体系

中官能团特征吸收峰发生了一定变化,说明体系内存在分子间相互作用,在脂质体表面形成了一层物理外衣,这层物理外衣不仅阻断了颗粒间的直接接触,还赋予了脂质体更优的结构稳定性。上述结果表明,ACS修饰在不改变脂质体基本囊泡结构的前提下,可改善颗粒分散状态和体系均一性,并有利于形成结构较为稳定的脂质体体系。

2.5 脂质体的贮藏稳定性评估

药物递送系统必须具备良好的长期贮藏稳定性才能满足实际应用需求。如图3(a)所示,未经ACS修饰的普通脂质体在4℃环境下存放21 d后,其粒径较初始状态显著增长了约17.3%。ACS的加入抑制了这种体积膨胀现象。其中,ACS质量浓度为0.1,0.5 g/100 mL的修饰组别表现出卓越的尺寸稳定性,存放21 d后的粒径增长率分别仅为4.6%和1.8%。粒径的稳定主要得益于高分子壳聚糖层提供的机械强度,它有效防止了磷脂囊泡在长期静置过程中的自发融合与破裂^[45]。药物包封率的衰减情况是评价载体密封性能的另一核心指标。如图3(b)所示,未修饰脂质体的初始包封率仅为76.76%,且在21 d的贮藏期内发生了严重的药物渗漏,包封率直线下降至52.2%。相比之下,各壳聚糖修饰组的包封率均得到显著提升,1.0% A-M-L组的初始包封率高达88.54%,经过21 d贮藏后依然维持在84.10%,降幅仅5.0%左右。市售壳聚糖修饰组在各个时间点的包封率均低于该配方。这一数据反差充分说明,致密的ACS涂层在脂质体外围构建了一道坚固的物理屏障,极大地限制了内部水溶性药物向外水相的扩散与渗漏^[46]。

2.6 脂质体对 HepG2 细胞的影响

2.6.1 脂质体对 HepG2 细胞毒性的影响 如图4(a)所示,细胞存活率数据揭示了不同配方的毒性差异。单独使用MET对HepG2细胞存在一定的固有化学毒性,导致

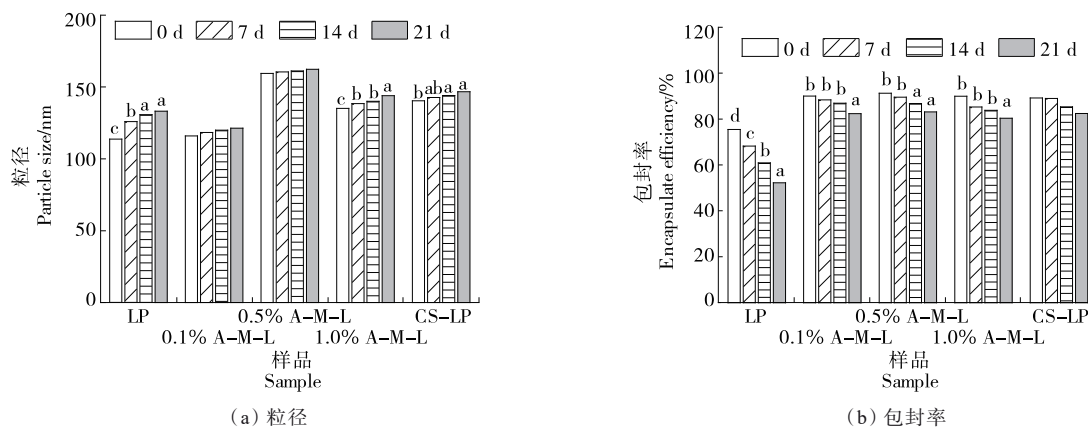
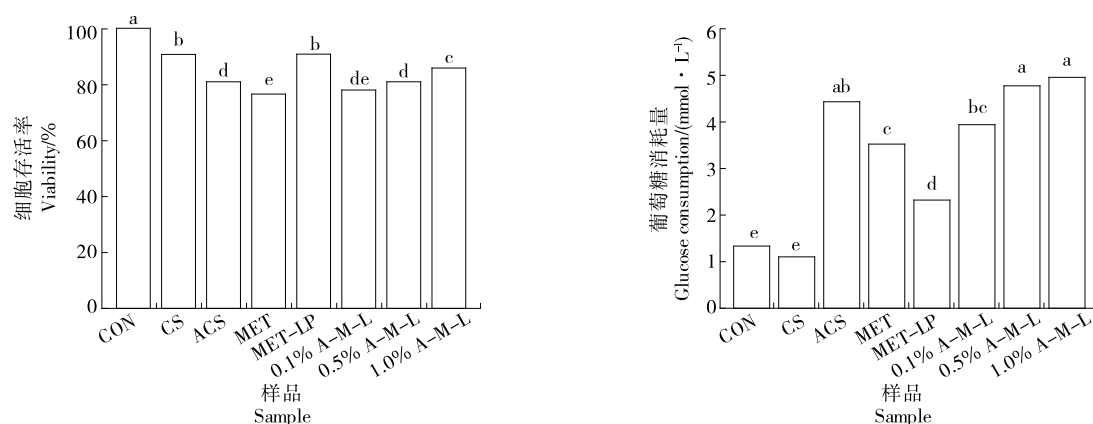


图3 4℃贮藏期间双孢菇壳聚糖纳米脂质体的稳定性

Figure 3 Stability of ACS-modified liposomes (A-M-Ls) during storage at 4℃



(a) HepG2 细胞的存活率

(b) 胰岛素抵抗 HepG2 细胞的葡萄糖消耗量

图 4 双孢菇壳聚糖纳米脂质体对 HepG2 细胞的影响

Figure 4 Effects of ACS-modified liposomes (A-M-Ls) on HepG2 cells

细胞存活率降至约 72%。将药物包裹进脂质体后,细胞存活率回升至 87% 左右。这一结果表明,脂质体外壳起到了关键的缓冲作用,它通过控制药物的缓慢释放,避免了局部高浓度药物对细胞造成的急性化学冲击^[47]。测试进一步发现,ACS 本身细胞毒性较低。随着壳聚糖修饰浓度的升高,载药脂质体的生物相容性逐步改善,1.0% 修饰组的细胞存活率恢复到了 81%。

2.6.2 脂质体对 HepG2 细胞葡萄糖消耗能力的影响 如图 4(b) 所示,模型组对葡萄糖的消耗量极低(约 1.3 mmol/L)。单独使用普通市售壳聚糖无法提升这一消耗量。未经修饰的载药脂质体虽然具有一定的葡萄糖消耗能力(2.3 mmol/L),但由于脂质体的包裹延缓了药物的释放,其短期内的葡萄糖消耗量甚至弱于盐酸二甲双胍原药(3.5 mmol/L)。将 ACS 用作修饰层后,复合载药体系产生了显著的协同增效作用。1.0% A-M-L 组的葡萄糖消耗量达到 4.9 mmol/L,显著高于游离 MET 组和未修饰的 MET-LP 组。该结果表明,ACS 不仅发挥了物理包覆作用,还能与 MET 产生协同效应,显著提升了 HepG2 细胞的体外葡萄糖摄取与代谢利用能力^[48]。

3 结论

研究以双孢菇壳聚糖为表面修饰材料,结合薄膜分散—超声技术,成功构建了一种新型的载盐酸二甲双胍纳米脂质体递送系统。结果表明,双孢菇壳聚糖的表面修饰显著优化了脂质体的粒径分布、多分散性指数及表面电位,并实现了高效的药物包封。该复合纳米微粒尺寸均一、结构致密,在 4 °C 贮藏 21 d 后包封率稳定在 84.1% 以上,表现出良好的贮藏稳定性。在体外 HepG2 细胞模型评估中,双孢菇壳聚糖纳米脂质体有效缓冲了盐酸二甲双胍的化学毒性,提升了递送体系的细胞相容性。

更重要的是,双孢菇壳聚糖自身与药物产生了协同增效作用,增强了体外细胞对葡萄糖的摄取与消耗能力。

该研究仍存在一定局限性。目前仅基于体外 HepG2 细胞模型评价制剂活性,尚未开展体内动物试验验证其口服降糖效果与生物安全性,也未深入阐明其调控糖代谢的具体分子机制。后续可进一步构建 2 型糖尿病动物模型验证体内药效,结合糖代谢关键通路解析作用机制,为该递送体系的后续开发提供更充分的试验支撑。

参考文献

- [1] American Diabetes Association Professional Practice Committee for Diabetes. Introduction and methodology: standards of care in diabetes—2026[J]. Diabetes Care, 2026, 49 (Supplement_1): S1-S5.
 - [2] Foretz M, Guigas B, Bertrand L, et al. Metformin: from mechanisms of action to therapies[J]. Cell Metabolism, 2014, 20 (6): 953-966.
 - [3] Graham G G, Punt J, Arora M, et al. Clinical pharmacokinetics of metformin[J]. Clinical Pharmacokinetics, 2011, 50(2): 81-98.
 - [4] Garza-Ocañas L, González-Canudas J, Tamez-De La O E, et al. Comparative bioavailability of metformin hydrochloride oral solution versus metformin hydrochloride tablets in fasting mexican healthy volunteers[J]. Advances in Therapy, 2019, 36 (2): 407-415.
 - [5] Majumdar S, Mahanti B, Kar A K, et al. Nanoliposome: as a smart nanocarrier in transdermal drug delivery system[J]. Intelligent Pharmacy, 2024, 2(6): 768-776.
 - [6] 于少轩, 逢格雨, 张子豪, 等. 共包埋姜黄素和还原型谷胱甘肽的纳米脂质体的制备、修饰与表征[J]. 食品科学, 2024, 45 (6): 32-40.
- Yu S X, Pang G Y, Zhang Z H, et al. Preparation, modification and characterization of nanoliposomes loaded with curcumin

- and reduced glutathione[J]. Food Science, 2024, 45(6): 32-40.
- [7] Wang D, Jiang Q, Dong Z F, et al. Nanocarriers transport across the gastrointestinal barriers: the contribution to oral bioavailability via blood circulation and lymphatic pathway[J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2023, 203: 115130.
- [8] Qiu Y, Zhuo Y, Ye Y Y, et al. Yolk-shell cationic liposomes overcome mucus and epithelial barriers for enhanced oral drug delivery[J]. Giant, 2024, 17: 100221.
- [9] Sobol Ź, Chiczewski R, Wątróbska-Świątlikowska D. Advances in liposomal drug delivery: multidirectional perspectives on overcoming biological barriers[J]. Pharmaceutics, 2025, 17(7): 885.
- [10] Azman M, Sabri A H, Anjani Q K, et al. Intestinal absorption study: challenges and absorption enhancement strategies in improving oral drug delivery[J]. Pharmaceutics, 2022, 15(8): 975.
- [11] Mohammed Y, Holmes A, Kwok P C L, et al. Advances and future perspectives in epithelial drug delivery[J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2022, 186: 114293.
- [12] Ni C L, Liao Q H, Ying R F, et al. Recent advances in surface-modified liposomes with polysaccharides for bioactive delivery [J]. Food Chemistry, 2025, 492: 145580.
- [13] Jiménez-Gómez C P, Cecilia J A. Chitosan: a natural biopolymer with a wide and varied range of applications[J]. Molecules, 2020, 25(17): 3 981.
- [14] 朱雨晴, 刘伟, 陈兴, 等. 叶酸-壳聚糖修饰姜黄素纳米脂质体的制备及其性质[J]. 食品科学, 2018, 39(24): 7-13.
- Zhu Y Q, Liu W, Chen X, et al. Preparation and properties of curcumin nanoliposomes modified by folic acid-chitosan complex[J]. Food Science, 2018, 39(24): 7-13.
- [15] Edo G I, Yousif E, Al-Mashhadani M H. Chitosan: an overview of biological activities, derivatives, properties, and current advancements in biomedical applications[J]. Carbohydrate Research, 2024, 542: 109199.
- [16] Pateiro M, Gómez B, Munekata P E S, et al. Nanoencapsulation of promising bioactive compounds to improve their absorption, stability, functionality and the appearance of the final food products[J]. Molecules, 2021, 26(6): 1 547.
- [17] Tang Y, Liu W, Zhang J, et al. Advances in intestinal-targeted release of phenolic compounds[J]. Nutrients, 2025, 17(16): 2 598.
- [18] Yan D Z, Li Y Z, Liu Y L, et al. Antimicrobial properties of chitosan and chitosan derivatives in the treatment of enteric infections[J]. Molecules, 2021, 26(23): 7 136.
- [19] Wani T U, Pandith A H, Sheikh F A. Polyelectrolytic nature of chitosan: influence on physicochemical properties and synthesis of nanoparticles[J]. Journal of Drug Delivery Science and Technology, 2021, 65: 102730.
- [20] Ways T M, Lau W, Khutoryanskiy V. Chitosan and its derivatives for application in mucoadhesive drug delivery systems[J]. Polymers, 2018, 10(3): 267.
- [21] Pellis A, Guebitz G M, Nyanhongo G S. Chitosan: sources, processing and modification techniques[J]. Gels, 2022, 8(7): 393.
- [22] Hussain M, Sam S T, Yaacob N D, et al. Fungal chitosan in focus: a comprehensive review on extraction methods and applications[J]. Food Research International, 2025, 220: 117103.
- [23] Terkula Iber B, Azman Kanan N, Torsabo D, et al. A review of various sources of chitin and chitosan in nature[J]. Journal of Renewable Materials, 2022, 10(4): 1 097-1 123.
- [24] Alemu D, Getachew E, Mondal A K. Study on the physicochemical properties of chitosan and their applications in the biomedical sector[J]. International Journal of Polymer Science, 2023, 2 023: 5025341.
- [25] Riaz Rajoka M S, Zhao L Q, Mehwish H M, et al. Chitosan and its derivatives: synthesis, biotechnological applications, and future challenges[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2019, 103(4): 1 557-1 571.
- [26] Guo Y X, Xu M M, Zhang J, et al. Refined regulation of polysaccharide biosynthesis in edible and medicinal fungi: from pathways to production[J]. Carbohydrate Polymers, 2025, 358: 123560.
- [27] Phimolsiripol Y, Seesuriyachan P. Polysaccharides as active ingredients, nutraceuticals and functional foods[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2022, 57(1): 1-3.
- [28] Wang Y X, Zhao Y J, Li J C, et al. Characterization of a novel acid-stable chitosanase from *Lentinula edodes* suitable for chitooligosaccharide preparation[J]. Foods, 2024, 13(19): 3 127.
- [29] Liu C Y, Wang G H, Sui W J, et al. Preparation and characterization of chitosan by a novel deacetylation approach using glycerol as green reaction solvent[J]. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2017, 5(6): 4 690-4 698.
- [30] 朱静毅, 王威, 房克慧, 等. 不同壳聚糖黏均分子量测定[J]. 中国药业, 2020, 29(23): 33-35.
- Zhu J Y, Wang W, Fang K H, et al. Determination of viscosity-average molecular weight of different chitosan samples[J]. China Pharmaceuticals, 2020, 29(23): 33-35.
- [31] 陈麟, 布海丽且姆·阿卜杜热合曼, 姜露熙, 等. 小白杏多糖的提取、结构表征及抗氧化活性分析[J]. 食品与机械, 2026, 42(2): 152-159.
- Chen L, Abudurehman B, Jiang L X, et al. Extraction and analysis of structural characterization and antioxidant activity analysis of polysaccharides from Xiaobai apricots[J]. Food & Machinery, 2026, 42(2): 152-159.

- [32] 时振振, 白新鹏, 岳宜静. 椰子油基胆盐脂质体的制备及工艺优化[J]. 食品与机械, 2021, 37(8): 207-211.
- Shi Z Z, Bai X P, Yue Y J. Preparation and process optimization of coconut oil-based bile salt liposomes[J]. Food & Machinery, 2021, 37(8): 207-211.
- [33] 孙思源, 孔令杰, 朱和权, 等. 蜂胶脂质体制备工艺优化及抗氧化活性分析[J]. 食品与机械, 2024, 40(6): 192-198, 232.
- Sun S Y, Kong L J, Zhu H Q, et al. Optimization of the preparation process for propolis liposome and antioxidant activity analysis[J]. Food & Machinery, 2024, 40(6): 192-198, 232.
- [34] Lari A S, Zahedi P, Ghourchian H, et al. Microfluidic-based synthesized carboxymethyl chitosan nanoparticles containing metformin for diabetes therapy: *in vitro* and *in vivo* assessments [J]. Carbohydrate Polymers, 2021, 261: 117889.
- [35] Alaaeldin R, Abdel-Rahman I A M, Ali Hassan H, et al. Carpachromene ameliorates insulin resistance in HepG2 cells via modulating IR/IRS1/PI₃K/Akt/GSK3/FoxO1 pathway[J]. Molecules, 2021, 26(24): 7 629.
- [36] Younes I, Rinaudo M. Chitin and chitosan preparation from marine sources: structure, properties and applications[J]. Marine Drugs, 2015, 13(3): 1 133-1 174.
- [37] Danaei M, Dehghankhold M, Ataei S, et al. Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems[J]. Pharmaceutics, 2018, 10(2): 57.
- [38] Thamizhchelvan A M, Wells K, Pham J, et al. Nanomaterial-enabled modulation of tumor-associated macrophages and dendritic cells to enhance cancer immunotherapy[J]. Nanomaterials, 2026, 16(3): 172.
- [39] Frank L A, Onzi G R, Morawski A S, et al. Chitosan as a coating material for nanoparticles intended for biomedical applications[J]. Reactive and Functional Polymers, 2020, 147: 104459.
- [40] Sebaaly C, Trifan A, Sieniawska E, et al. Chitosan-coating effect on the characteristics of liposomes: a focus on bioactive compounds and essential oils: a review[J]. Processes, 2021, 9 (3): 445.
- [41] Zhao F, Nayyar D, Hwang Y S, et al. Effect of positive charges on liposome stability, uptake efficacy and impact on cells[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2025, 681: 125881.
- [42] Fernandes Queiroz M, Melo K, Sabry D, et al. Does the use of chitosan contribute to oxalate kidney stone formation? [J]. Marine Drugs, 2015, 13(1): 141-158.
- [43] Bissantz C, Kuhn B, Stahl M. A medicinal chemist's guide to molecular interactions[J]. Journal of Medicinal Chemistry, 2010, 53(14): 5 061-5 084.
- [44] Wang W J, Xue C H, Mao X Z. Chitosan: structural modification, biological activity and application[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 164: 4 532-4 546.
- [45] Phan H T, Haes A J. What does nanoparticle stability mean?[J]. The Journal of Physical Chemistry C, 2019, 123(27): 16 495-16 507.
- [46] Gholami R, Ahmadi E, Ahmadi S. Investigating the effect of chitosan, nanopackaging, and modified atmosphere packaging on physical, chemical, and mechanical properties of button mushroom during storage[J]. Food Science & Nutrition, 2020, 8(1): 224-236.
- [47] 黎俏灵, 李鹤年, 郭静科, 等. 灌胃纳米超氧化物歧化酶脂质体对小鼠溃疡性结肠炎的改善作用[J]. 食品科学, 2023, 44 (1): 166-174.
- Li Q L, Li H N, Guo J K, et al. Ameliorative effect of orally administered nano-superoxide dismutase liposomes on ulcerative colitis in mice[J]. Food Science, 2023, 44(1): 166-174.
- [48] Balan V, Dodi G, Mihai C T, et al. Biotinylated chitosan macromolecule based nanosystems: a review from chemical design to biological targets[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 188: 82-93.