

研究报告

负载噬菌体 qdvp001 的阳离子脂质体的制备及热稳定性和抗菌活性

张家岳, 林洪, 王静雪*

中国海洋大学食品科学与工程学院, 山东 青岛 266000

张家岳, 林洪, 王静雪. 负载噬菌体 qdvp001 的阳离子脂质体的制备及热稳定性和抗菌活性[J]. 微生物学通报, 2022, 49(3): 1067-1075

Zhang Jiayue, Lin Hong, Wang Jingxue. Preparation, thermal stability, and antibacterial activity of cationic liposomes encapsulating bacteriophage qdvp001[J]. Microbiology China, 2022, 49(3): 1067-1075

摘要:【背景】副溶血弧菌噬菌体 qdvp001 在防治副溶血弧菌污染方面具有巨大的应用潜力, 但其对温度的敏感性较高, 在较高的温度环境下会失活。【目的】利用阳离子脂质体包埋保护噬菌体 qdvp001 以提高其热稳定性, 同时探究其脂质体包被液的抗菌活性。【方法】制备和表征负载副溶血弧菌噬菌体 qdvp001 的阳离子脂质体, 测定阳离子脂质体包埋下的噬菌体经高温处理后的效价, 并对脂质体包被液的杀菌活力进行测定。【结果】相对于未添加十八胺(octadecylamine, ODA, 带正电的胺类化合物)的中性脂质体, ODA 的添加使脂质体的表面带正电荷。脂质体平均粒径随着表面电荷绝对值的增加呈现减小的趋势, 不同脂质体的多分散系数(polydispersity index, PDI)均在 0.7 以下, 表明其具有较好的均匀性。负载副溶血弧菌噬菌体 qdvp001 的阳离子脂质体在 50、60 和 70 °C 条件下表现出较好的热稳定性, 随着脂质膜表面电荷的不断增大, 其对噬菌体的热保护性也逐渐提升。此外, 负载噬菌体 qdvp001 的阳离子脂质体也表现出比中性脂质体更好的抗菌活性。【结论】负载噬菌体 qdvp001 的阳离子脂质体在高温下对噬菌体有很好的保护性, 同时具备更优良的抗菌活性, 使噬菌体 qdvp001 有更好的应用前景。

关键词: 阳离子脂质体; 噬菌体; 热稳定性; 抗菌活性

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFC1600703); 中国农业研究系统项目(CARS-47)

Supported by: National Key Research and Development Program of China (2017YFC1600703); Project of China Agriculture Research System (CARS-47)

*Corresponding author: E-mail: snow@ouc.edu.cn

Received: 2021-09-27; Accepted: 2021-10-26; Published online: 2021-12-20

Preparation, thermal stability, and antibacterial activity of cationic liposomes encapsulating bacteriophage qdvp001

ZHANG Jiayue, LIN Hong, WANG Jingxue*

College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266000, Shandong, China

Abstract: [Background] The bacteriophage qdvp001 has a great potentiality in preventing *Vibrio parahaemolyticus* contamination. However, the phage is highly sensitive to temperature and will be deactivated under high temperature. [Objective] We encapsulated qdvp001 in cationic liposomes to improve its thermal stability and explored the antibacterial activities of the cationic liposomes encapsulating qdvp001. [Methods] The cationic liposomes encapsulating qdvp001 were prepared and characterized, and their thermal stability and bactericidal activity were investigated. [Results] Compared with the neutral liposome without octadecylamine (ODA, a positively charged amine compound), the addition of ODA contributed to the positive charging of the liposome surface. The average particle size of liposomes decreased with the increase in the absolute value of surface charge. The polydispersity index (PDI) of different liposomes were all below 0.7, indicating the good uniformity of these liposomes. Besides, the cationic liposomes encapsulating qdvp001 showed good thermal stability at 50, 60 and 70 °C. The heat preventive effects of liposomes to bacteriophage gradually improved with the increase in the surface positive charges of the liposomes. In addition, the cationic liposomes encapsulating qdvp001 had stronger antibacterial activities than the neutral liposomes encapsulating the bacteriophage. [Conclusion] The cationic liposomes encapsulating qdvp001 can protect the phage at high temperature and have good antibacterial activity. It makes qdvp001 have a better application prospect.

Keywords: cationic liposomes; bacteriophage; thermal stability; antibacterial activity

副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)属于革兰氏阴性菌,是一种典型的海洋性食源致病菌,感染后的临床症状包括急性起病、腹痛、呕吐及腹泻等。近年来,该菌一直是我国特别是沿海地区引起细菌性食物中毒的首要致病菌^[1],因此对其进行防治显得尤为重要。噬菌体是一类以细菌为宿主的病毒,具有高度的宿主专一性,在多菌群系统中只侵染特定的菌群(种、属或者系统^[2]),这使得其在致病菌的防治方面具有独特的优势。

副溶血弧菌噬菌体 qdvp001 是本实验室分离得到的一株以副溶血弧菌为宿主菌且具有高

效裂解性的噬菌体,具有较为宽泛的裂解谱^[3]。然而该噬菌体对温度的敏感性较高,在较高的温度环境下其活性会发生大幅度降低^[3],这限制了噬菌体 qdvp001 的应用。为此,需要找到一种手段或技术来有效提高噬菌体 qdvp001 的热稳定性。脂质体是指由脂质分子构成、有类生物膜结构(双分子层)的囊泡^[4-5],具有良好的生物相容性和缓释性^[6-8],还可使被包埋物避开不利的环境,从而提高被包埋物的稳定性。Zhou 等^[9]研究证明了脂质体的包埋可以提高虾青素的光、热和酸稳定性及生物利用率。除此之外,Singla 等^[10]利用脂质体包埋噬菌体来避开巨噬细胞中和抗

体的干扰,有利于噬菌体清除成熟生物膜。添加阳离子成分制备而成的阳离子脂质体具备了表面正电荷,进一步增加了脂质体的稳定性和生物黏附性^[11-12]。万蒙等^[13]用十八胺(octadecylamine, ODA)制备的阳离子脂质体负载角鲨烯制备疫苗佐剂,具有良好的贮藏稳定性和佐剂效应。阳离子脂质体中的辅助脂质一般为中性脂质,主要包括 1,2-二酰基甘油-磷脂酰胆碱、胆固醇(cholesterol, Chol)等^[14],它们能起到稳定脂质双层膜和降低阳离子脂质的毒性等作用。

目前阳离子脂质体的研究主要集中在其靶向性输送应用^[15]以及多功能阳离子脂质体的开发等相关研究,但关于应用脂质体以提高噬菌体在不利环境下稳定性的研究报道较少。本研究制备了负载副溶血弧菌噬菌体 qdvp001 的阳离子脂质体,并测定了负载噬菌体的阳离子脂质体在不同温度下的热稳定性及噬菌体包被液的抗菌活性,以期探究阳离子脂质体包埋对噬菌体 qdvp001 的热保护性及对抗菌活性的影响。

1 材料与方法

1.1 样品

副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*) ATCC 17802 由中国海洋大学食品安全实验室提供,副溶血弧菌噬菌体 qdvp001 由中国海洋大学食品安全实验室保存。

1.2 主要试剂和仪器

大豆卵磷脂(phosphatidyl choline, PC),纯度大于 70%,上海阿拉丁试剂有限公司;胆固醇(Chol),北京索莱宝科技有限公司;十八胺(ODA),纯度≥90%,上海麦克林生化科技有限公司;食品级吐温-80 (Tween-80),济南圣和化工有限公司;2216E 肉汤、2216E 琼脂,青岛海博生物技术有限公司;TCBS 琼脂,北京陆桥技术股份有限公司;其余试剂如氯仿、甲醇、

Triton X-100 等均为国产分析纯。旋转蒸发仪,Heidolph 公司;循环水式多用真空泵,郑州长城科工贸有限公司;静音超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司;电热恒温培养箱,上海跃进医疗器械厂;恒温培养振荡器,上海智城分析仪器制造有限公司;电位分析仪,马尔文仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 阳离子脂质体膜的制备

参照 Chadha 等^[16]的方法并部分修改后进行操作:将 PC、Chol、Tween-80 和 ODA 按照表 1 中的比例混合并溶解在含有 10 mL 氯仿与甲醇(2:1, 体积比)混合体系的圆底烧瓶中,圆底烧瓶(提前进行 40 °C 预热)接入到旋转蒸发仪,以 40 °C、75 r/min 的条件进行真空旋转蒸发,使混合有机溶剂挥发,在烧瓶的内壁上得到均匀的阳离子脂质膜。

1.3.2 噬菌体 qdvp001 的脂质体包埋及包封率测定

阳离子脂质膜处理:将含阳离子脂质膜的圆底烧瓶放入常压恒温烘箱(设定温度为 60 °C)中干燥 2 h。

噬菌体的处理:将效价为 10^{10} PFU/mL 的噬菌体 qdvp001 的悬液与 PBS 缓冲液(pH 7.51)以 1:9 的体积比配制成 10 mL 混合液,放入 4 °C 冰箱备用。

表 1 不同比例的大豆卵磷脂、胆固醇、吐温-80 和十八胺制备的阳离子脂质体膜

Table 1 Different ratios of soy lecithin, cholesterol, Tween-80 and octadecylamine used for various cationic liposome membranes

Sample	PC:Chol:Tween-80:ODA	Serial No.
Contrast liposome	8:2:1:0	zzt-0
Cationic liposome-1	8:2:1:0.5	zzt-1
Cationic liposome-2	8:2:1:1	zzt-2
Cationic liposome-3	8:2:1:1.5	zzt-3

脂质体包埋:将混合液添加至含阳离子脂质膜的圆底烧瓶中(40 °C 预热),在 40 °C、70 r/min 条件下旋蒸 10 min,使阳离子脂质膜与玻璃壁分离,充分水化到噬菌体混合液中,将获得的分散体混合液置于超声波清洗器中,设定温度为 25 °C、频率为 40 Hz,进行超声水浴处理 2 h,即获得噬菌体 qdvp001 脂质体包被液,置于 4 °C 条件下保存。

包封率的测定:参考 Leung 等^[17]和 Singla 等^[18]的方法并进行部分修改,包封率的计算公式为:

$$EE(\%) = \frac{E_0 - E_1}{E_0} \times 100\%$$

式中 E_0 : 脂质体包被液中所包含的噬菌体总量(效价),单位为 PFU/mL; E_1 : 未被包埋的噬菌体量(效价),单位为 PFU/mL。

噬菌体总量:吸取 300 μ L 噬菌体 qdvp001 脂质体包被液于 1.5 mL EP 管中,再加入等体积的 0.02%的 Triton X-100,涡旋混匀后置于常温反应 1 h,用 PBS 缓冲液梯度稀释后用双层琼脂平板法测定效价;未被包埋的噬菌体量:吸取 1 mL 阳离子脂质体包埋液装入 1.5 mL EP 管中,用双层琼脂平板法测定效价。

1.3.3 噬菌体 qdvp001 脂质体包被液表征测定

需要测定的表征主要有 3 项:平均粒径、多分散系数(polydispersity index, PDI)及 Zeta 电位。

根据动态光散射技术,运用纳米激光粒度分析仪分析阳离子脂质体的平均粒径及 PDI,测定条件:设定温度为 25 °C,吸取阳离子脂质体包被液样品 1 mL,每个样品重复测 3 次,每次测定 10 个循环。所得数据取平均值。

采用荧光法运用纳米激光粒度分析仪测定阳离子脂质体的 Zeta 电位,测定条件:设定温度为 25 °C,准确吸取阳离子脂质体包被液样品 0.8 mL,每个样品分别测量 3 次。所得数据取平

均值。

1.3.4 不同温度下噬菌体 qdvp001 脂质体包被液的稳定性测定

实验设置 3 个温度点(50、60、70 °C)和 3 个时间点(20、40、60 min)^[3];取 300 μ L 噬菌体 qdvp001 脂质体包被液加入到 1.5 mL EP 管中,加入等体积的 0.02%的 TritonX-100,涡旋混匀置于常温下反应 1 h,随后 12 000 r/min 离心 10 min,吸取上清液,用 PBS 缓冲液稀释并用双层琼脂平板法测定阳离子脂质体所包埋的噬菌体量(效价);每份脂质体包埋样品(zzt-0、zzt-1、zzt-2 和 zzt-3)设置 3 个实验组 A、B、C,每组设置 3 个 1.5 mL 的 EP 管,各加入 300 μ L 脂质体包被液,分别置于 50 °C (A)、60 °C (B)、70 °C (C)环境下,分别于 20、40、60 min 这 3 个时间点取样一次,每管样品液加入等量 0.02%的 TritonX-100,涡旋混匀置于常温下反应 1 h,随后 12 000 r/min 离心 10 min,吸取上清液,用 PBS 缓冲液稀释至合适浓度,用双层琼脂平板法测定残余的噬菌体量(效价),实验设置 3 个平行。选择未添加阳离子的 zzt-0 包埋组为空白对照组。

1.3.5 噬菌体 qdvp001 脂质体包被液的抗菌活性测定

配制宿主菌-脂质体共培养体系(5 mL):将宿主菌副溶血弧菌 vp17802 接种到 2216E 液体中,培养 12–14 h 至对数生长期(OD_{600} 为 0.3),吸取 50 μ L 菌液,加入到 15 mL 的无菌试管中,再分别添加终浓度为 1%的脂质体包被液,用 2216E 液体稀释至 5 mL,涡旋混匀。

按上述操作分别配制出 zzt-0、zzt-1、zzt-2 和 zzt-3 包埋组的共培养体系,放置于恒温培养振荡器中,以 37 °C、200 r/min 的条件共培养 2 h 后吸取 100 μ L 混合培养液,在 TCBS 固体平板上进行涂布,置于 37 °C 培养箱中培养过夜,进

行菌落计数, 实验设置 3 个平行。设置未添加脂质体包被液的一组为空白对照组。

1.4 数据处理

采用 Origin (V 8.5)、GraphPad Prism (V 8.0) 和 Excel 2003 进行数据分析和图表绘制。

2 结果与讨论

2.1 噬菌体 qdvp001 脂质体包被液的包封率

从表 2 中可以看出, zzt-0 包埋组的包封率最高, 约为 80%; 而 zzt-1、zzt-2 和 zzt-3 包埋组包封率较为接近, 均在 50% 左右。包埋率的实验结果说明添加 ODA 显著降低了脂质体对噬菌体的包封率。ODA 是一种带正电的胺类化合物, ODA 的添加可能影响水化介质中脂质体成分与噬菌体的静电相互作用, 造成体系的稳定性发生改变, 噬菌体不能有效地包埋进脂质体的磷脂双分子层内, 从而导致包封率下降^[19]。

2.2 噬菌体 qdvp001 脂质体包被液的平均粒径、多分散系数和 Zeta 电位

如表 3 所示, zzt-0、zzt-1、zzt-2 和 zzt-3 这 4 份样品的 PDI 均在 0.7 以下, 说明分散性是较为均匀的。相较于 zzt-0 包埋组[平均粒径: (217.00±4.40) nm], 添加 ODA 显著提高了 zzt-1 包埋组的平均粒径[(977.60±29.70) nm]。因为大豆卵磷脂本身带有负电, 所以 zzt-0 组在水化介质(PBS 缓冲液)中的 Zeta 电位为负值^[19-20]。ODA 的添加导致脂质体的 Zeta 电位绝对值减小, 使得脂质成分间的静电相互作用减弱, 增大

了脂质体间的相互碰撞及融合的几率, 也就造成了脂质体粒径的大幅度增加^[12]。这是由于带正电 ODA 的添加增强了脂质体间的静电斥力, 使得脂质体更趋向于形成小分子结构, 粒径减小^[21], 而这一变化直接导致了脂质体微粒的表面积下降, 从而降低了脂质体携带的表面电荷, 最终又引起了 Zeta 电位的下降。因此, 随着脂质体膜中 ODA 的质量进一步增加, 脂质体的平均粒径持续下降, 而脂质体的 Zeta 电位先增大后减小。

2.3 噬菌体 qdvp001 脂质体包被液在不同温度条件下的稳定性

图 1 为不同温度下处理不同时间后噬菌体 qdvp001 脂质体包被液的效价变化结果。各组的初始效价大约为 2.42×10^{10} PFU/mL, 如图 1A 所示, 在 50 °C 处理 60 min 后, zzt-0、zzt-1、zzt-2 和 zzt-3 包埋组的效价分别下降了 2.41×10^{10} 、 2.23×10^{10} 、 1.66×10^{10} 和 2.20×10^{10} PFU/mL。带正电的阳离子脂质体包埋组的效价下降幅度要小于带负电的脂质体包埋组, 表明 50 °C 条件下, 相较于带负电的脂质体包埋组, 阳离子脂质体包埋对噬菌体 qdvp001 的热保护性更为显著 ($P < 0.01$)。从图 1B 可以看出, 在经 60 °C 处理 60 min 后, 不同脂质体组的效价发生了不同程度的下降, 其中 zzt-0 包埋组效价下降最大, 降低了 2.61 Log₁₀, 而 zzt-1、zzt-2 和 zzt-3 包埋组在经过相同的处理时间后, 效价分别降低了 1.11、

表 3 噬菌体 qdvp001 脂质体包被液的平均粒径、多分散系数和 Zeta 电位

Table 3 Average particle size, polydispersity coefficient, zeta potential of liposomes encapsulated bacteriophage qdvp001

Serial No.	Average particle size (nm)	PDI	Zeta potential (mV)
zzt-0	217.00±4.40	0.27±0.07	-2.63±0.79
zzt-1	977.60±29.70	0.30±0.02	1.77±0.84
zzt-2	325.40±9.40	0.57±0.04	4.75±0.49
zzt-3	171.20±2.40	0.55±0.02	2.47±0.61

表 2 噬菌体 qdvp001 脂质体包被液包封率

Table 2 Encapsulation rates of liposomes encapsulated bacteriophage qdvp001

Serial No.	Encapsulation rates (%)
zzt-0	81.18
zzt-1	49.80
zzt-2	50.12
zzt-3	51.22

0.49 和 1.30 Log_{10} 。这些数据说明在 60 °C 条件下阳离子脂质体包埋对噬菌体 qdvp001 的保护性要明显优于未添加阳离子的脂质体, 其中 zzt-2 包埋组(PC:ODA=8:1, 质量比)经 60 °C 处理后的效价变化最低($P<0.01$), 表现出的保护性最好。图 1C 表明, 在 70 °C 处理 20 min 后, zzt-0 和 zzt-3 包埋组的噬菌体效价全部为 0, 而 zzt-1 和 zzt-2 包埋组的噬菌体效价保持在 10^9 PFU/mL 左右, 表现出显著的热保护性($P<0.001$)。处理 40 min 以后, zzt-1 包埋组的效价下降至 10^8 PFU/mL 左右, 而 zzt-2 包埋组的效价基本保持不变(2.30×10^9 PFU/mL)。处理 60 min 后, zzt-2 包埋组的效价仍保持在 10^9 PFU/mL, 而其余 3 组噬菌体效价均为 0。这些结果说明 zzt-1 和 zzt-2 包埋组在 70 °C 条件下能够为噬菌体 qdvp001 提供有效的保护, 其中 zzt-2 包埋组(PC:ODA=8:1, 质量比)的保护性最高。

脂质体的双分子膜结构可以有效地隔绝外界环境, 保护内部物质不受外界不利因素的干扰, 同时其内部的水相可以保证被包埋物的稳定环境, 两者可为被包埋物提供稳定的保护^[22]。然而高温会加速脂质体膜内磷脂的分子运动, 增加微粒碰撞几率和分子聚集现象, 使得整个体系趋于不稳定, 增加了脂质体絮凝和沉淀的几率, 从而导致被包埋物发生泄漏^[23-25]。脂质体表面正电荷的增加能提高脂质体微粒之间的静电斥力, 在一定程度上避免了絮凝和沉淀, 提高了脂质体的稳定性^[26]。热稳定性实验结果显示, 阳离子脂质体包埋组的效价要高于未添加阳离子的脂质体包埋组, 证明 ODA 的添加提高了脂质体的表面 Zeta 电位, 并且脂质体的热稳定性随 Zeta 电位的增加而增加, 说明 ODA 的添加能提高脂质体的稳定性和对噬菌体的热保护性。

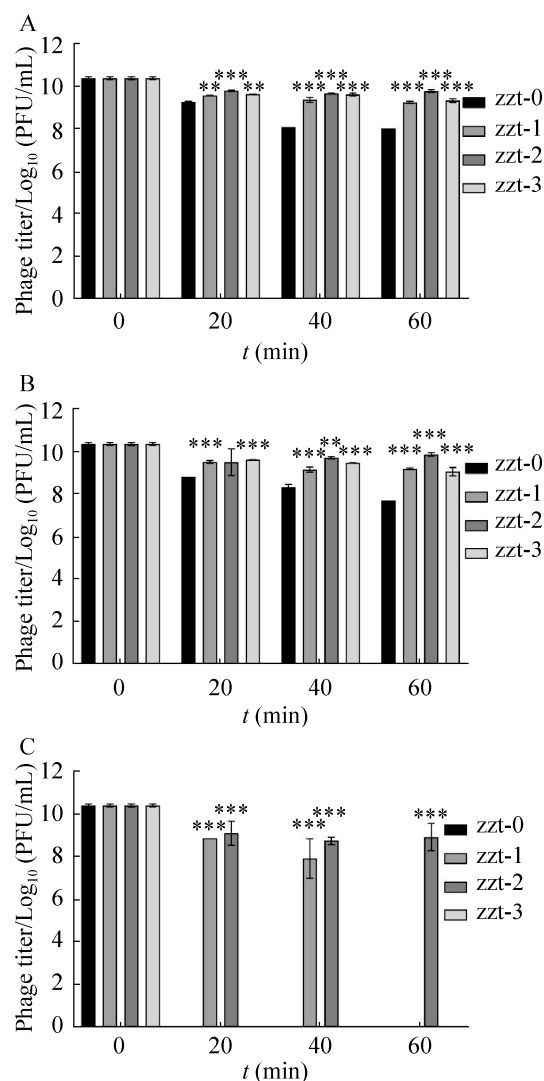


图 1 不同温度处理后噬菌体 qdvp001 脂质体包被液的效价变化 A: 50 °C 处理后噬菌体 qdvp001 脂质体包被液的效价变化; B: 60 °C 处理后噬菌体 qdvp001 脂质体包被液的效价变化; C: 70 °C 处理后噬菌体 qdvp001 脂质体包被液的效价变化。**: $P<0.01$; ***: $P<0.001$

Figure 1 The titer of liposomes encapsulated bacteriophage qdvp001 after treatments at different temperatures. A: Titer changes of liposomes encapsulated bacteriophage qdvp001 after 50 °C treatment; B: Titer changes of liposomes encapsulated bacteriophage qdvp001 after 60 °C treatment; C: Titer changes of liposomes encapsulated bacteriophage qdvp001 after 70 °C treatment. **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$.

2.4 噬菌体 qdvp001 脂质体包被液的抗菌活性

由图 2 可以看出, zzt-0、zzt-1、zzt-2 和 zzt-3 脂质体包被液均对 vp17802 有抗菌活性。在与 1%浓度的各脂质体包被液共培养 2 h 后, 除了 zzt-0 (杀菌率为 72.92%)以外, 其余各脂质体包被液的杀菌率均在 90%以上。脂质体具有良好的缓释性, 可以使被包埋物缓慢而又持续地释放出去^[27]。由于阳离子脂质体表面正电荷的存在, 使其可以通过电荷作用与带有阴离子的组织或细胞靶向性结合^[28]。抗菌活性实验的结果显示, 噬菌体 qdvp001 脂质体仍可以发挥杀菌作用, 证明噬菌体 qdvp001 可以通过脂质体的缓释性进入环境中杀菌。阳离子脂质体包被液的杀菌率要明显高于未添加阳离子的脂质体包被液, 证明了 ODA 的添加可以显著提高脂质体包被液的杀菌率($P<0.05$), 这使得脂质体表面具备了正电荷, 可以定向与带有阴离子的副溶血弧菌外膜相结合, 有利于噬菌体 qdvp001 的有效吸附, 从而更高效地发挥作用。

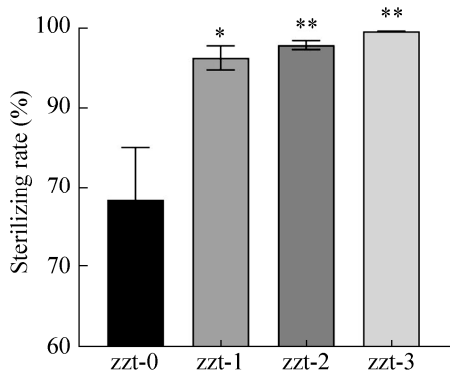


图 2 各阳离子脂质体包被液对副溶血弧菌 vp17802 的杀菌效力

Figure 2 The bactericidal efficacy of each liposome encapsulated bacteriophage qdvp001 against *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802. *: $P<0.05$; **: $P<0.01$.

3 结论

本研究制备了负载噬菌体 qdvp001 的阳离子脂质体并研究了其热稳定性和抗菌活性。同非阳离子脂质体相比, ODA 的添加给予脂质体表面正电荷的同时, 也提高了脂质体表面的 Zeta 电位, 增强了脂质体间的静电斥力, 提高了脂质体体系的稳定性和对噬菌体的热保护性; 而且脂质体表面具备的正电荷可以使其定向与带有负电荷的副溶血弧菌外膜实现靶向性结合, 有利于噬菌体 qdvp001 进行有效吸附, 从而使脂质体表现出更好的抗菌活性。其中在 PC:ODA 的质量比为 8:1 时, 制备出的阳离子脂质体的热稳定性及抗菌活性最优。因此, 用阳离子脂质体包埋噬菌体可有效解决噬菌体在高温条件下其活性下降甚至丧失的问题, 其具有更好更广的应用前景。

REFERENCES

- [1] 韩小龙, 张海燕, 曹明秀, 沈晓盛. 我国海产品中副溶血性弧菌的污染现状与控制策略分析[J]. 食品与发酵工业, 2015, 41(7): 263-267
Han XL, Zhang HY, Cao MX, Shen XS. Analysis on current pollution of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood in China and its controlling strategy[J]. Food and Fermentation Industries, 2015, 41(7): 263-267 (in Chinese)
- [2] Zink R, Loessner MJ. Classification of virulent and temperate bacteriophages of *Listeria* spp. on the basis of morphology and protein analysis[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1992, 58(1): 296-302
- [3] 丁云娟, 彭勇, 林洪, 王静雪, 孔令红. 一株副溶血弧菌噬菌体的分离鉴定及生理特性[J]. 微生物学通报, 2011, 38(11): 1639-1646
Ding YJ, Peng Y, Lin H, Wang JX, Kong LH. Isolation, identification and physiological property of lytic phage against *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Microbiology China, 2011, 38(11): 1639-1646 (in Chinese)
- [4] Vélez MA, Perotti MC, Zanel P, Hynes ER, Gennaro AM. Soy PC liposomes as CLA carriers for food applications: preparation and physicochemical

- characterization[J]. Journal of Food Engineering, 2017, 212: 174-180
- [5] Yi XZ, Zheng QH, Ding BM, Pan MH, Chiou YS, Li L, Li ZS. Liposome-whey protein interactions and its relation to emulsifying properties[J]. LWT, 2019, 99: 505-512
- [6] 潘丽, 常振刚, 陈娟, 谷克仁. 虾青素的生理功能及其制剂技术的研究进展[J]. 河南工业大学学报(自然科学版), 2019, 40(6): 123-129
- Pan L, Chang ZG, Chen J, Gu KR. Research progress on the physiological functions and preparation technology of astaxanthin[J]. Journal of Henan University of Technology: Natural Science Edition, 2019, 40(6): 123-129 (in Chinese)
- [7] Gómez-Mascaraque LG, Casagrande Sipoli C, De La Torre LG, López-Rubio A. Microencapsulation structures based on protein-coated liposomes obtained through electrospraying for the stabilization and improved bioaccessibility of curcumin[J]. Food Chemistry, 2017, 233: 343-350
- [8] Liu WL, Wei FQ, Ye AQ, Tian MM, Han JZ. Kinetic stability and membrane structure of liposomes during *in vitro* infant intestinal digestion: effect of cholesterol and lactoferrin[J]. Food Chemistry, 2017, 230: 6-13
- [9] Zhou W, Liu W, Zou LQ, Liu WL, Liu CM, Liang RH, Chen J. Storage stability and skin permeation of vitamin C liposomes improved by pectin coating[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2014, 117: 330-337
- [10] Singla S, Harjai K, Katare OP, Chhibber S. Encapsulation of bacteriophage in liposome accentuates its entry in to macrophage and shields it from neutralizing antibodies[J]. PLoS One, 2016, 11(4): e0153777
- [11] Yamamoto H, Kuno Y, Sugimoto S, Takeuchi H, Kawashima Y. Surface-modified PLGA nanosphere with chitosan improved pulmonary delivery of calcitonin by mucoadhesion and opening of the intercellular tight junctions[J]. Journal of Controlled Release, 2005, 102(2): 373-381
- [12] Ishiwata H, Suzuki N, Ando S, Kikuchi H, Kitagawa T. Characteristics and biodistribution of cationic liposomes and their DNA complexes[J]. Journal of Controlled Release, 2000, 69(1): 139-148
- [13] 万蒙, 陈懿琳, 钱宇豪, 黄选, 夏廉臣, 王春维, 祝爱侠. 阳离子脂质体包埋角鲨烯佐剂的制备及理化性质研究[J]. 中国畜牧兽医, 2021, 48(4): 1431-1439
- Wan M, Chen YL, Qian YH, Huang X, Xia LC, Wang CW, Zhu AX. Preparation of cationic squalene liposome adjuvant and physical and chemical properties[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2021, 48(4): 1431-1439 (in Chinese)
- [14] 付咪, 俞佳丽, 郭亮, 李延华, 陈杰, 孟岳成. 乳酸链球菌素脂质体在不同 pH 值条件下的稳定性及其抑菌效果[J]. 食品科学, 2019, 40(21): 7-13
- Fu M, Yu JL, Guo L, Li YH, Chen J, Meng YC. Stability and antibacterial activity of nisin-loaded liposomes under different pH conditions[J]. Food Science, 2019, 40(21): 7-13 (in Chinese)
- [15] Anilkumar TS, Lu YJ, Chen HA, Hsu HL, Jose G, Chen JP. Dual targeted magnetic photosensitive liposomes for photothermal/photodynamic tumor therapy[J]. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 2019, 473: 241-252
- [16] Chadha P, Katare OP, Chhibber S. Liposome loaded phage cocktail: enhanced therapeutic potential in resolving *Klebsiella pneumoniae* mediated burn wound infections[J]. Burns, 2017, 43(7): 1532-1543
- [17] Leung SSY, Morales S, Britton W, Kutter E, Chan HK. Microfluidic-assisted bacteriophage encapsulation into liposomes[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2018, 545(1/2): 176-182
- [18] Singla S, Harjai K, Raza K, Wadhwa S, Katare OP, Chhibber S. Phospholipid vesicles encapsulated bacteriophage: a novel approach to enhance phage biodistribution[J]. Journal of Virological Methods, 2016, 236: 68-76
- [19] Yohannes G, Pystynen KH, Riekkola ML, Wiedmer SK. Stability of phospholipid vesicles studied by asymmetrical flow field-flow fractionation and capillary electrophoresis[J]. Analytica Chimica Acta, 2006, 560(1/2): 50-56
- [20] Were LM, Bruce BD, Davidson PM, Weiss J. Size, stability, and entrapment efficiency of phospholipid nanocapsules containing polypeptide antimicrobials[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51(27): 8073-8079
- [21] 叶兆伟, 承伟. 脂质体包封率测定方法及影响因素[J]. 中国生物制品学杂志, 2007, 20(10): 789-792
- Ye ZW, Cheng W. Determination of liposome entrapment rate and its influencing factors[J]. Chinese Journal of Biologicals, 2007, 20(10): 789-792 (in Chinese)
- [22] Laridi R, Kheadr EE, Benech RO, Vuilleumard JC, Lacroix C, Fliss I. Liposome encapsulated nisin Z: optimization, stability and release during milk fermentation[J]. International Dairy Journal, 2003, 13(4): 325-336

- [23] Kono K, Hayashi H, Takagishi T. Temperature-sensitive liposomes: liposomes bearing poly (N-isopropylacrylamide)[J]. *Journal of Controlled Release*, 1994, 30(1): 69-75
- [24] 侯丽芬, 谷克仁, 吴永辉. 不同制剂脂质体制备方法的研究进展[J]. *河南工业大学学报(自然科学版)*, 2016, 37(5): 118-124
Hou LF, Gu KR, Wu YH. Research progress of the preparation methods of liposome about different formulations[J]. *Journal of Henan University of Technology: Natural Science Edition*, 2016, 37(5): 118-124 (in Chinese)
- [25] 安学勤. 刺激响应脂质体及其在控制释药中的应用[J]. *中国科学(化学)*, 2015, 45(4): 340-349
An XQ. Stimuli-responsive liposome and drug release[J]. *Scientia Sinica: Chimica*, 2015, 45(4): 340-349 (in Chinese)
- [26] Taylor TM, Gaysinsky S, Davidson PM, Bruce BD, Weiss J. Characterization of antimicrobial-bearing liposomes by ζ -potential, vesicle size, and encapsulation efficiency[J]. *Food Biophysics*, 2007, 2(1): 1-9
- [27] Severino P, Szymanski M, Favaro M, Azzoni AR, Chaud MV, Santana MHA, Silva AM, Souto EB. Development and characterization of a cationic lipid nanocarrier as non-viral vector for gene therapy[J]. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2015, 66: 78-82
- [28] 魏霞蔚, 张志荣. 用作基因传递系统的阳离子纳米载体的细胞毒性及其机制研究进展[J]. *药学进展*, 2016, 40(4): 243-249
Wei XW, Zhang ZR. Research advances in cytotoxicities of cationic nanocarriers as gene delivery systems and the mechanisms thereof[J]. *Progress in Pharmaceutical Sciences*, 2016, 40(4): 243-249 (in Chinese)