ω-3 多不饱和脂肪酸甘油酯纳米乳的制备及其在肝损伤治疗中的应用

韩雯雯[1,2]，李耀威[1,2]，张馨欣[2*]

（1. 南京中医药大学新中药学院，江苏南京 210023；2. 中国科学院上海药物研究所，上海 201203）

摘要：采用高速剪切 - 高压均质法制备了具有不同含量 ω-3 多不饱和脂肪酸甘油酯的纳米乳并考察其在肝损伤治疗中的作用。通过单因素试验筛选出的优化工艺参数组合为：油相和水相以 8 000 r/min 的剪切速度，在 60 ℃下剪切 5 min，然后以 60 000 kPa 的均质压力循环 6 次。以优化工艺参数制备的纳米乳为白色均匀乳状液，平均粒径约为 200 nm，pH 值约为 7.4，各项指标均符合质量要求。细胞摄取试验结果显示，所制备的纳米乳可以被人正常肝细胞（LO2 细胞）有效摄取，且摄取量与 ω-3 多不饱和脂肪酸含量呈正相关。在胆汁淤积性肝损伤小鼠模型中，尾静脉注射纳米乳可有效改善小鼠肝损伤，且 ω-3 多不饱和脂肪酸甘油酯含量高的纳米乳对肝损伤小鼠的治疗作用较好。该研究制备的 ω-3 多不饱和脂肪酸甘油酯纳米乳可显著改善肝损伤，具有良好的临床应用潜力，可为注射型甘油酯纳米乳药物的优化设计提供有效参考。

关键词：ω-3 多不饱和脂肪酸；甘油酯；纳米乳；质量评价；肝损伤

中图分类号：R575；R944.9　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2024)09-1220-09

引用：韩雯雯 , 李耀威 , 张馨欣．ω-3 多不饱和脂肪酸甘油酯纳米乳的制备及其在肝损伤治疗中的应用 [J]．中国医药工业杂志 , 2024, 55(9): 1220-1228．DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2024.09.008

Preparation of Omage-3 Polyunsaturated Fatty Acid Glyceride Nanoemulsion and Its Application in the Treatment of Liver Injury

HAN Wenwen[1,2], LI Yaowei[1,2], ZHANG Xinxin[2*]

(*1. School of Chinese Materia Medica, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023; 2. Shanghai Institute of Materia Medical, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203*)

ABSTRACT: Several nanoemulsions with different contents of ω-3 polyunsaturated fatty acid glyceride were prepared by the high-speed shearing and high-pressure homogenization method and their effects on the treatment of liver injury were investigated. The combination of optimized process parameters selected through the experiment of single factor was as follows: the oil phase and the water phase were sheared at a shearing speed of 8 000 r/min for 5 min at 60 ℃ , and then homogenized at a pressure of 60 000 kPa for 6 cycles. The nanoemulsion prepared with the optimized process parameters presented a white emulsion appearance, with an average particle size of approximately 200 nm and a pH value of approximately 7.4, and all indicators met the quality requirements. The results of the cell uptake test showed that the prepared nanoemulsions could be effectively taken up by human fetal hepatocyte cell line (LO2 cell), and the uptake amount was positively correlated with the ω-3 polyunsaturated fatty acid content. As for the cholestatic liver injury model mouse, tail vein injection of nanoemulsions could effectively improve liver injury, and the nanoemulsions with a high ω-3 polyunsaturated fatty acid glyceride content showed a better therapeutic effect on liver-injured mice. In conclusion, the ω-3 polyunsaturated fatty acid glyceride nanoemulsions prepared in this study had a significant improvement effect on liver injury and good clinical application potential, providing an effective reference for the optimal design of injectable glyceride nanoemulsion drugs.

Key Words: omage-3 polyunsaturated fatty acid; glyceride; nanoemulsion; quality evaluation; liver injury

肝脏具有代谢、排毒、造血和免疫功能，是维持人体生命活动的重要器官之一[1]。肝脏容易受到体内外的刺激而病变。肝脏相关疾病由于发病率高、病因复杂、发病机制不明确，已成为世界性公共卫生问题之一。全世界患有肝脏相关疾病的人数高达13亿。中国也是“肝病大国”，截至2022年底，我国各类肝病患者数约为4.47亿。慢性肝脏疾病如果不能及时干预，就会进一步发展为肝纤维化、肝硬化，甚至肝癌。随着医疗技术的迅速发展，许多治疗肝损伤的药物被开发并应用于临床实践，但大多数药物的治疗作用有限且存在众多不良反应。所以，迫切需要开发安全、有效的药物来预防和治疗肝脏疾病。近年来的研究[2]结果显示，特殊脂肪酸在肝脏疾病的防治中具有高效、安全的特点，在临床预防和治疗肝脏疾病方面发挥了重要作用。

在ω-3多不饱和脂肪酸（polyunsaturated fatty acid，ω-3-PUFA）的化学结构中，距离末端甲基的3个碳原子处存在1个双键，是动物脂质代谢的重要组成部分[3]。已有研究表明，ω-3-PUFA具有抗炎[4]、抗氧化[5]以及辅助改善记忆[6]等药理作用。

自20世纪90年代以来，基于ω-3-PUFA甘油酯制备的纳米乳已被广泛用于肠外营养等领域[7]。由于含有丰富的ω-3-PUFA，该类纳米乳在降低促炎因子的释放和对器官损害的保护等方面都比传统脂肪乳剂具有优势[8]。现有的甘油酯纳米乳以肠外营养乳剂为主。德国费森尤斯卡比公司的鱼油甘油三酯乳剂（Omegaven）是1种含有ω-3-PUFA的静脉注射乳剂，在2019年被美国FDA批准上市，作为肠外营养相关性胆汁淤积儿童患者的卡路里与脂肪酸补充剂[9]，并在治疗早产儿的肠衰竭相关性肝病（intestinal failure-associated liver disease，IFLDA）方面有良好的应用前景[10]。但是，Omegaven采用的鱼油原料中ω-3-PUFA含量（约为40%）较低，只作为肠外营养相关性胆汁淤积儿童患者的抢救性治疗药物，对于肝损伤的疗效有限，并未大规模应用。

ω-3-PUFA含量对其相关制剂在肝损伤治疗中的影响有待进一步探究。本研究选取了具有不同含量ω-3-PUFA甘油酯的3种原料——2020TG（含有约40% ω-3-PUFA）、3322TG（含有约55% ω-3-PUFA）、6015TG（含有约75% ω-3-PUFA），采用高速剪切-高压均质法制备了ω-3-PUFA甘油酯纳米乳（ω-3 polyunsaturated fatty acid glyceride nanoemulsion，ω-3EM），表征其形貌、粒径、稳定性，并系统评价ω-3EM的质量，考察肝细胞对纳米乳的摄取情况。另外，采用α-异硫氰酸萘酯（α-naphthyl isothiocyanate，ANIT）建立小鼠胆汁淤积性肝损伤模型，探讨ω-3EM对胆汁淤积性肝损伤的治疗作用。

1 仪器与试药

T25型高速剪切机（广州艾卡仪器设备有限公司）；APV2000型高压均质机（德国APV公司）；Zeta Sizer Nano ZS型粒度仪（英国马尔文公司）；EXPRESS 20型超纯水仪（美国Millipore公司）；1260型高效液相色谱仪、7890A型气相色谱仪均购自美国安捷伦公司；T50型电位滴定仪（瑞士Mettler Toledo公司）；Tecnai G2 Spirit 120kV型透射电镜（美国FEI公司）；Allegra 64R型高速冷冻台式离心机、CytoFLEX型流式细胞仪均购自美国Beckman Coulter公司；IVIS Lumina Ⅲ型小动物活体光学成像系统（美国Perkin-Elmer公司）；FV1000型激光共聚焦显微镜（日本Olympus公司）；YXQ-LS-18ST型高压灭菌锅（日本SANYO公司）；JCA-BM6010/C型全自动血液指标分析仪（日本希森美康株式会社）。

2020TG（四川欣美加生物医药股份有限公司，含约40% ω-3-PUFA，批号220601）；3322TG（英国Croda集团，含约55% ω-3-PUFA，批号220701）；6015TG（挪威Epax公司，含约75% ω-3-PUFA，批号220801）；二十碳五烯酸甲酯（eicosapentaenoic acid，EPA）、二十二碳六烯酸甲酯（docosahexaenoic acid，DHA）、二十三烷酸甲酯［西格玛奥德里奇（上海）贸易有限公司］；供注射用蛋黄卵磷脂（德国Lipoid公司）；甘油（汕头市佳禾生物科技有限公司）；α-生

收稿日期：2024-02-19

基金项目：国家自然科学基金（82222066）、国家药典委药品标准制修订课题（2021Y19、2022Y30）、国家药品监督管理局化学药品制剂质量分析重点实验室开放研究课题（ZJ-KF-2023-1）

作者简介：韩雯雯（1998—），女，硕士研究生，专业方向：新型脂质制剂。

通信作者：张馨欣（1982—），女，博士生导师，研究员，从事注射用脂质制剂的研究和开发。

E-mail：xinxinzhang@simm.ac.cn

育酚（浙江新和成股份有限公司）；油酸钠（南京威尔药业集团股份有限公司）；丙二醛（malondialdehyde，MDA）试剂盒（批号 230903）、超氧化物歧化酶（superoxide dismutase，SOD）检测试剂盒（批号 231002）、谷胱甘肽过氧化物酶（批号 231003）均购自上海瀚鸿生物科技有限公司；0.5％多聚甲醛固定液、PBS（pH 7.2 ～ 7.4）（大连美仑生物技术有限公司）；4',6- 二脒基 -2- 苯基吲哚（4',6-diamidino-2-phenylindole，DAPI）染色液（碧云天生物技术有限公司）；RPMI 1640 培养基、胎牛血清（fetal bovine serum，FBS）（美国 Gibco 公司）；青霉素、链霉素（美国 Amresco 公司）；ANIT（上海沃凯药业有限公司）；香豆素 6、橄榄油、乙醚、冰乙酸、三氯甲烷、碘化钾、硫代硫酸钠滴定液、淀粉指示液、高氯酸等试剂均购自国药集团化学试剂有限公司。

人正常肝细胞（LO2 细胞）购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。

SPF 级雄性 ICR 小鼠，体质量（25±3）g，20 只，购自上海斯莱克实验动物有限公司，生产许可证编号 SCXK（沪）2017-005。由中国科学院上海药物研究所动物实验中心提供并饲养，所有的动物试验均符合上海药物研究所实验动物管理与使用委员会（Institutional Animal Care & Use Committee，IACUC）的规定，IACUC 审批编号为 2022-09-GY-64。

2　方法与结果

2.1　ω-3EM 的制备工艺筛选

纳米乳的制备工艺对乳剂的稳定性有重要影响。高速剪切可使分散相颗粒分散化、细小化和均匀化[11]；高压均质可通过剪切力、冲击力及孔内爆炸力的组合作用，使溶液颗粒细微化，形成均匀、稳定的体系[12]。因此，本研究采用高速剪切 - 高压均质法制备纳米乳。工艺参数可影响纳米乳的物理化学特征、减小粒度、增强稳定性[13]，故以下以 6015TG 制备的 ω-3EM（6015ω-3EM）为模型，采用单因素试验筛选 ω-3EM 的制备工艺参数。

称取处方量（以下均为质量分数）的 6015TG（10％）和 α- 生育酚（0.03％），在氮气保护下搅拌至形成均一的油相；称取磷脂（1.2％）、甘油（2.25％）和油酸钠（0.03％）溶解于处方量的水相（86.49％）中，搅拌至形成均匀分散的水相；用氢氧化钠溶液将水相调至 pH 10，再将油相加至水相中并水浴加热至 50 ℃，用高剪切机以 8 000 r/min 的转速剪切 5 min 制备初乳，然后用高压均质机以 50 000 kPa 的压力均质 5 次，制得 6015ω-3EM。通过单因素法，分别考察高速剪切时的转速、时间、温度，以及高压均质时的压力和循环次数对纳米乳的粒径和 PDI 的影响。单因素试验考察因素的工艺条件如表 1 所示，同时其他工艺参数如上设置。

在纳米乳的制备过程中，高速运转的转子产生动态流动效应，促进稳定乳液的形成。如图 1A 所示，当剪切转速从 6 000 r/min 增加到 9 000 r/min，纳米乳的粒径逐渐降低，继续增加到 10 000 r/min，粒径几乎不变；随着转速的升高，PDI 先减小后增大，当转速为 8 000 r/min 时，PDI 较小。原因可能是转速低于 8 000 r/min 时，随着转速的升高，纳米乳受到剪切、摩擦、撞击以及物料间的相互碰撞和摩擦作用，内部的大颗粒物变得细小化、分散化和均匀化，使粒径不断减小。当转速为 8 000 r/min 时，粒径较小；当转速高于 8 000 r/min 时，纳米乳的粒径却开始增大，可能是转速过快导致温度升高，使纳米乳聚集。

如图 1B 所示，增加剪切时间，纳米乳的粒径和 PDI 均先减小后增大，当纳米乳的剪切时间为 5 min 时，粒径较小。这可能是由于剪切过程中，纳米乳不断接受能量输入，液滴不断发生碰撞，使粒径和 PDI 逐渐减小，但随着剪切时间延长，液滴会逐渐聚集，导致粒径和 PDI 增大。

如图 1C 所示，提高剪切温度，纳米乳的粒径和 PDI 均先减小后增大。当剪切温度为 60 ℃时，粒径和 PDI 较小。这可能是由于剪切过程中产生的高温会使脂质发生氧化和水解，乳化能力降低，导致纳

表 1　单因素试验中考察的工艺参数

Tab.1　Process Parameters Investigated in the Single Factor Test

工艺参数	筛选条件
高速剪切转速 /（r·min^{-1}）	6 000、7 000、8 000、9 000、10 000
高速剪切时间 /min	3、4、5、6、7
高速剪切温度 /℃	25、40、50、60、70
高压均质压力 /kPa	30 000、40 000、50 000、60 000、70 000
高压均质循环次数 / 次	3、4、5、6、7

米乳的粒径和 PDI 增大。

如图 1D 所示，在高压均质的作用下，纳米乳的粒径不断减小。当压力从 30 000 kPa 增加到 60 000 kPa 时，纳米乳的粒径和 PDI 不断减小，可能是由于纳米乳受到不断增强的压力、撞击力等综合作用，颗粒被不断细化。继续增加压力至 70 000 kPa 时，粒径和 PDI 几乎不变。

如图 1E 所示，增加均质次数，纳米乳的粒径和 PDI 均先减小后增加；当循环次数为 6 次时，粒径和 PDI 较小。造成这种现象可能的原因是，次数低于 6 次时，随着均质次数的增加，纳米乳因受到反复的剪切、摩擦、撞击以及其他作用的影响，大分子颗粒物不断细碎化，表现为粒径不断减小。当均质次数再增加，乳粒受到的剪切力和撞击力增大、温度升高、乳粒间的相互作用增强，造成乳粒聚集，纳米乳内部体系变得不稳定。

综上所述，通过单因素试验，以纳米乳粒度分布为评价指标筛选得到的优化工艺参数组合为：油相和水相以 8 000 r/min 的剪切速度在 60 ℃下剪切 5 min，然后以 60 000 kPa 的均质压力循环 6 次。

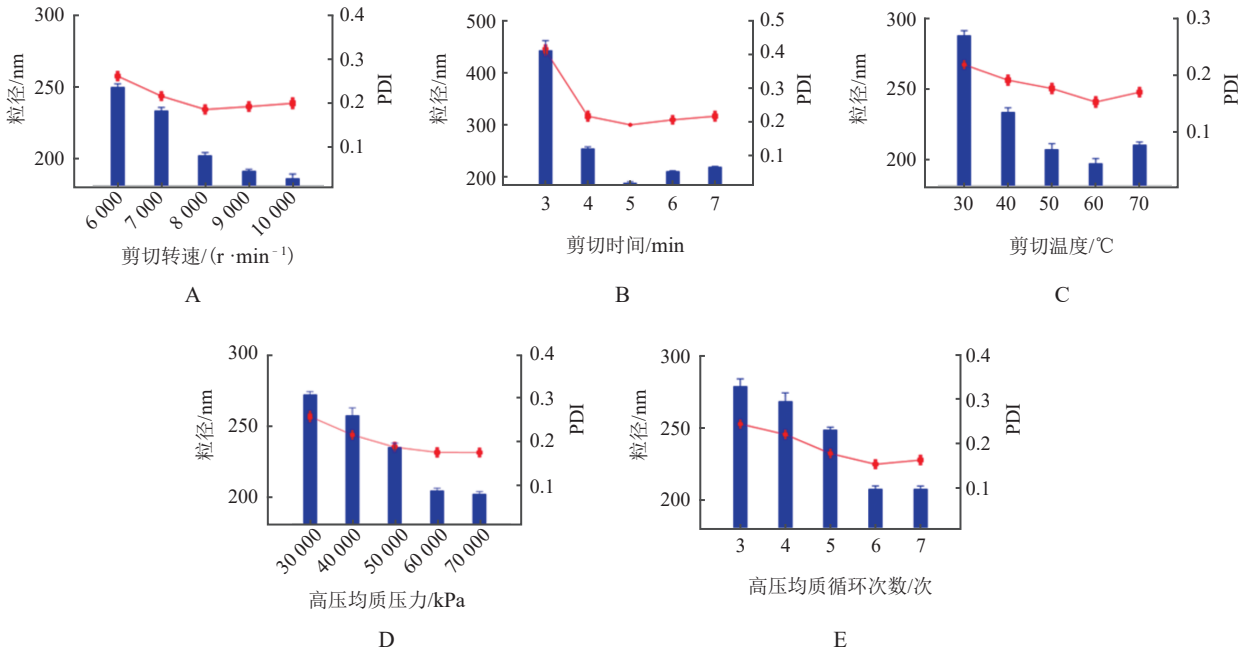
2.2 ω-3EM 的制备和表征

分别采用 2020TG、3322TG、6015TG 为原料，按“**2.1**”项下的优化处方工艺制备纳米乳，分别记为 2020ω-3EM、3322ω-3EM 和 6015ω-3EM。所得纳米乳充氮灌装后在 121 ℃条件下灭菌 10 min 备用。

2.2.1 外观形貌

ω-3EM 的外观如图 2 所示，呈乳白色，离心（1 600×*g*）15 min 后未观察到分层，表明其较为均一、稳定。

用 TEM 观察 2020ω-3EM、3322ω-3EM 和 6015ω-3EM 的微观形貌。取各样品 5 μL 滴于铜网上，静置 1 min，用滤纸沿铜网边缘吸去样品液体，滴加乙酸铀溶液 5 μL，静置负染 1 min，用滤纸吸去染液，自然晾干或在红外灯下烘干 10 min，在加速电压为 120 kV 的条件下，置透射电镜下观察制品的微观形态。结



A—剪切转速；B—剪切时间；C—剪切温度；D—高压均质压力；E—高压均质循环次数。

—粒径；● —PDI。

图 1 不同因素对纳米乳粒度分布的影响（*n*=3）

Fig.1 Effects of Different Factors on Particle Size Distribution of Nanoemulsions (*n*=3)



A　　B　　C

图 2　2020ω-3EM（A）、**3322ω-3EM**（B）、**6015ω-3EM**（C）**的外观**

Fig.2　Appearances of the 2020ω-3EM (A), 3322ω-3EM (B), and 6015ω-3EM (C)

果显示，2020ω-3EM、3322ω-3EM 和 6015ω-3EM 的乳滴在透射电镜下呈球形，形态完整（图 3）。

2.2.2　粒径、PDI 及 ζ 电位

取 2020ω-3EM、3322ω-3EM 和 6015ω-3EM 样品适量，用纯水稀释至澄清透明，采用粒度仪检测粒径、PDI 和 ζ 电位，结果如表 2 所示。可见，三者粒度分布均一，具有较好的稳定性。

表 2　不同 ω-3EM 制品的粒径、PDI 及 ζ 电位（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Tab.2　Particle Size, PDI and ζ Potential of Different ω-3EM Products ($\bar{x}\pm s$, n=3)

制剂	粒径 /nm	PDI	ζ 电位 /mV
2020ω-3EM	207.4±1.2	0.15±0.04	－35.7±1.1
3322ω-3EM	213.5±0.8	0.16±0.07	－36.4±0.9
6015ω-3EM	201.6±1.1	0.15±0.05	－34.9±1.2

2.3　ω-3EM 的质量研究

2.3.1　EPA 和 DHA 含量的测定

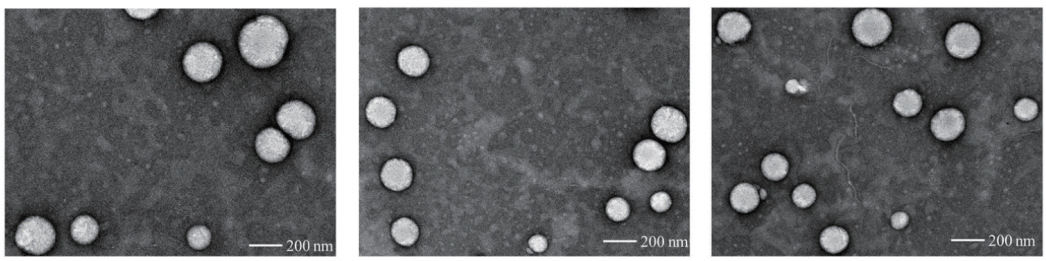
采用气相色谱法测定不同 ω-3EM 制品中 ω-3 脂肪酸所含的 EPA 和 DHA，以 6015ω-3EM 为例对测定方法进行方法学验证。

色谱条件：色谱柱 HP-88 毛细管柱（60 m×0.25 mm×0.2 μm）；进样温度 250 ℃；检测器温度 270 ℃；柱温　采用程序升温，起始温度为 170 ℃，以 3.5 ℃ /min 的速度升至 240 ℃，保持 10 min；氦气流速 1.0 mL/min；控制分流比 10 ∶ 1。

在本色谱条件下，EPA、DHA 的峰面积（A）与质量浓度（c）线性关系良好，线性回归方程分别为：A_{EPA}=1.071 2c_{EPA}+0.338，R^2=0.998 8；A_{DHA}=1.000 4c_{DHA}+0.466 4，R^2=0.999 6。低、中、高质量浓度 EPA 样品的方法回收率分别为 97.5%、95.7%和 95.9%，RSD 小于 5%。低、中、高质量浓度 DHA 样品的方法回收率分别为 96.8%、97.7%和 95.1%，RSD 小于 5%，表明该法准确度良好。EPA 样品溶液的 RSD 为 0.70%，DHA 样品溶液的 RSD 为 0.80%，不同时间点的样品浓度 RSD 小于 2%，表明该方法精密度良好。

2.3.2　ω-3EM 的质量评价

外观、pH 值、粒径、游离脂肪酸、过氧化值等是评价 ω-3EM 质量的主要指标。外观、粒径可以判断稳定性，过氧化值体现氧化程度，游离脂肪酸反映油脂水解程度。照 ChP 2020 年版丙泊酚乳状注射液规定的方法，分别对 2020ω-3EM、3322ω-3EM 和



A　　B　　C

A—2020ω-3EM；B—3322ω-3EM；C—6015ω-3EM。

图 3　不同 ω-3EM 制品的 TEM 照片（×50 000）

Fig.3　TEM Images of Different ω-3EM Products (×50 000)

6015ω-3EM 进行测定。结果如表 3 所示，可见各项指标均符合乳剂的质量要求。

表 3 ω-3EMs 的质量评价结果（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Tab.3 Quality Evaluation Results of ω-3EMs ($\bar{x}\pm s$, n=3)

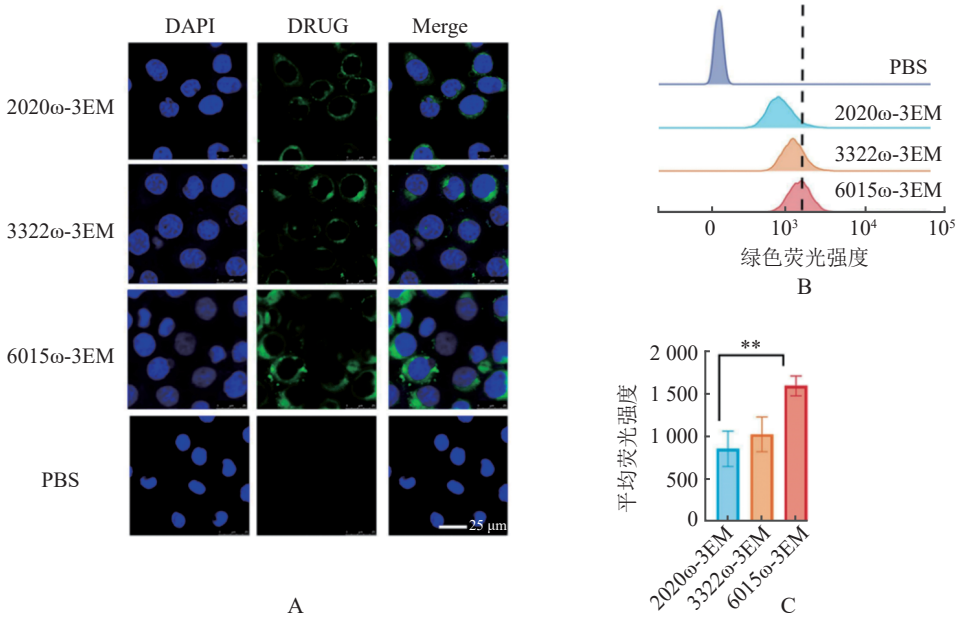
测定项目	种类		
	2020ω-3EM	3322ω-3EM	6015ω-3EM
外观	乳白色	乳白色	乳白色
pH 值	7.41±0.1	7.40±0.1	7.40±0.1
渗透压 /(mOsmol·kg^{-1})	303±2	302±3	304±3
过氧化值 /(mmol·kg^{-1})	1.0±0.2	1.6±0.1	1.4±0.2
总甘油三酯 /(g·L^{-1})	196.34±2.1	198.48±1.8	199.52±2.3
游离脂肪酸 /(mmol·L^{-1})	4.8±0.2	5.2±0.1	5.0±0.2
EPA 含量 /%	19±2	32±1	58±2
DHA 含量 /%	18±1	19±3	14±1
总 ω-3 含量 /%	37±2	51±3	72±2

2.4 ω-3EM 的细胞摄取

取绿色荧光探针香豆素 6 1 mg 溶于乙醇 0.5 mL，然后加入油相，按“**2.1**”项下处方，以优化工艺制备绿色荧光标记的 2020ω-3EM、3322ω-3EM 和 6015ω-3EM。取 LO2 细胞，以每孔 5.0×10^4 个细胞的密度接种于 12 孔板，于含有 10% FBS 和 1% 青霉素、链霉素的 1640 培养液中，在 37 ℃、5% CO_2 条件下培养 24 h；吸出培养基，剩余物中分别加入用 1640 培养基稀释 100 倍的 PBS(pH 7.2 ～ 7.4)、2020ω-3EM、3322ω-3EM 和 6015ω-3EM 各 100 μL，再孵育 4 h。用预冷的 PBS 洗 3 次，再用 0.5% 多聚甲醛固定液 500 μL 固定细胞，避光放置 10 min，弃去固定液后用 PBS 洗 2 遍，加入 DAPI 染色液 (10 μg/mL)300 μL，染色 3 min；最后用 PBS 洗涤 2 次，用激光共聚焦显微镜对图像进行观察和拍摄。

同法培养 4 组细胞，孵育 4 h 后用胰酶消化细胞，离心 (300×g)3 min，收集细胞沉淀物，重悬于 4 ℃ 预冷的 PBS 0.5 mL 中，用流式细胞术检测细胞内荧光强度。

结果如图 4 所示。激光共聚焦显微镜结果表明，PBS 组中没有明显的绿色荧光，而 2020ω-3EM、3322ω-3EM 和 6015ω-3EM 组可在细胞中观察到较为明显的绿色荧光；其中，随着 ω-3-PUFA 含量的增加，绿色荧光强度增加。流式细胞术的定量检测结果与荧光显微镜的定性观察结果一致。与 2020ω-3EM 处理组相比，6015ω-3EM 处理组细胞的荧光强度提高



A—激光共聚焦显微镜图像；B—流式细胞术分析（虚线表示在 6015ω-3EM 组占比最多的细胞荧光强度数值下，其他组别的细胞占比对比线）；C—流式细胞术的平均荧光强度定量分析（** 表示 P<0.01，n=3）。

图 4 ω-3EM 的细胞摄取

Fig.4 Cellular Uptake of ω-3EM

了 80%，提示 ω-3-PUFA 含量的增加可以增强细胞对纳米乳的摄取作用。

2.5 体内药效学评价

小鼠按体质量随机分为 5 组，每组 3 只。其中 4 组（分别作为胆汁淤积性肝损伤模型组和 2020ω-3EM、3322ω-3EM 和 6015ω-3EM 给药组）禁食、不禁水，12 h 后采用口服 ANIT 100 mg/g 的造模方式建立胆汁淤积性肝损伤模型；分别通过尾静脉注射给予 0.9% 氯化钠溶液、2020ω-3EM、3322ω-3EM 和 6015ω-3EM，剂量均为 12 μL/g，连续 3 d 给药，每天 1 次。另取 1 组小鼠作为空白组，禁食、不禁水，12 h 后口服等量橄榄油，每天尾静脉注射等量 0.9% 氯化钠溶液。

将 1.5 mL 离心管、取血毛细管等提前用含 1% 肝素钠的 PBS 润洗。给药结束后，于眼眶采集各组小鼠血液 0.3 mL，置干净的试管中，4 ℃离心（1 500×*g*）10 min，吸取上层血清，用全自动血液生化分析仪测定血清中的谷草转氨酶（glutamic-oxaloacetic transaminase，GOT）、谷丙转氨酶（glutamic-pyruvic transaminase，GPT）、碱性磷酸酶（alkaline phosphatase，ALP）、总胆汁酸（total bile acid，TBA）的水平。

末次给药后脱椎处死小鼠，摘取各治疗组小鼠的肝脏，切取右叶，用多聚甲醛固定液固定后进行病理切片染色、分析。

血液生化指标 GOT、GPT、ALP、TBA 的检测结果如图 5 所示。与空白组相比，模型组小鼠血清中 GOT、GPT、ALP、TBA 含量显著升高，表明模型组小鼠具有明显的肝损伤。与模型组相比，ω-3EM 给药组均能显著降低血液生化指标；与其他 2 个给药组相比，6015ω-3EM 处理组小鼠的血液生化指标显著降低（P<0.05）。上述说明 ω-3-PUFA 含量越高对肝损伤的治疗效果越好。

小鼠肝脏组织形态的病理切片染色结果如图 6 所示。空白组肝细胞无明显变化，肝脏结构清晰。模型组肝脏切片显示胆管内胆栓形成，胆管内及胆管周围有大量的炎症细胞浸润，表明造模成功。与模型组比较，2020ω-3EM、3322ω-3EM 和 6015ω-3EM 处理组肝细胞的形态明显改善，炎症细胞浸润减少。其中，2020ω-3EM、3322ω-3EM 处理组依然有少量炎症细胞浸润，6015ω-3EM 处理组炎症细胞较少。该结果进一步表明，ω-3EM 有助于肝损伤的改善。

3 讨论

本研究采用高速剪切 - 高压均质法制备了含量不同的 ω-3-PUFA 甘油酯纳米乳，并以制品的粒度分布为指标筛选工艺参数。结果所得优化纳米乳的粒径约为 200 nm，PDI 约为 0.15，ζ 电位为 －30 ～ －40 mV，外观呈乳白色，微观为完整的圆球形。

有研究[14]表明，脂质乳剂作为一种新型药物递送方法具有生物利用度高、起效快、个体差异小、稳定性好、药理作用持久的优点。LO2 细胞对 ω-3EM 的摄取结果显示，ω-3EM 能促进肝细胞摄取纳米乳，有效地将包载的活性药物分子递送进入细胞内。与 2020ω-3EM 处理组相比，6015ω-3EM 处理组细胞荧光强度提高了约 80%，表明 ω-3-PUFA 含量与细胞摄取能力呈正相关。脂肪酸是细胞膜结构维持完整的关键因素，ω-3-PUFA 可能通过影响细胞膜的流动性和调节细胞膜结构来影响细胞的摄取能力。

ANIT 能对胆管上皮细胞产生毒性作用，影响胆汁转运，导致胆汁淤积，常在动物试验中用于诱导肝内胆汁淤积型肝损伤。GOT、GPT、ALP、TBA 可反映肝功能的整体状况，是评价肝功能损伤严重程度的重要指标。GOT、GPT 与肝细胞膜的损伤程度有关，能反映肝细胞损伤程度；ALP 可间接反映动物胆道的损伤情况；TBA 可反映胆汁的代谢状态，其水平随着肝损伤病程进展逐渐升高，早期干预 TBA 对疾病进展和预后有着积极的影响[15]。本研究采用 ANIT 建立了胆汁淤积性肝损伤小鼠模型，并探究 ω-3EM 对胆汁淤积性肝损伤的治疗作用。结果表明，ω-3EM 给药有助于肝损伤的改善。这可能是由于 ω-3-PUFA 甘油酯纳米乳对胆汁淤积性肝损伤的治疗作用与 ω-3-PUFA 含量呈正相关。但本研究采用的动物模型为急性胆汁淤积性肝损伤模型，具有一定的自愈性，不能很好

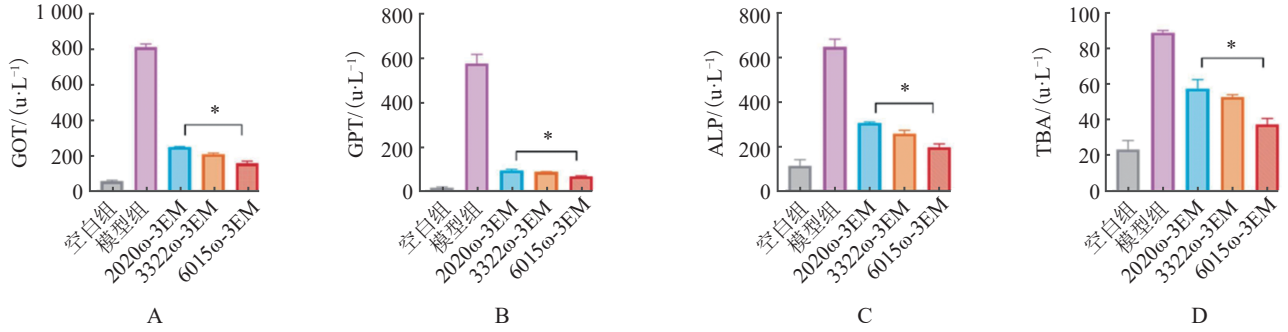


图 5 各组小鼠的 GOT(A)、**GPT**(B)、**ALP**(C) 和 **TBA**(D) 水平（与 2020ω-3EM 处理组相比，* 表示 $P<0.05$；$n=3$）

Fig.5 The Levels of GOT (A), GPT (B), ALP (C), and TBA (D) (Compared with 2020ω-3EM Treated Group, * Represents $P<0.05$; $n=3$)

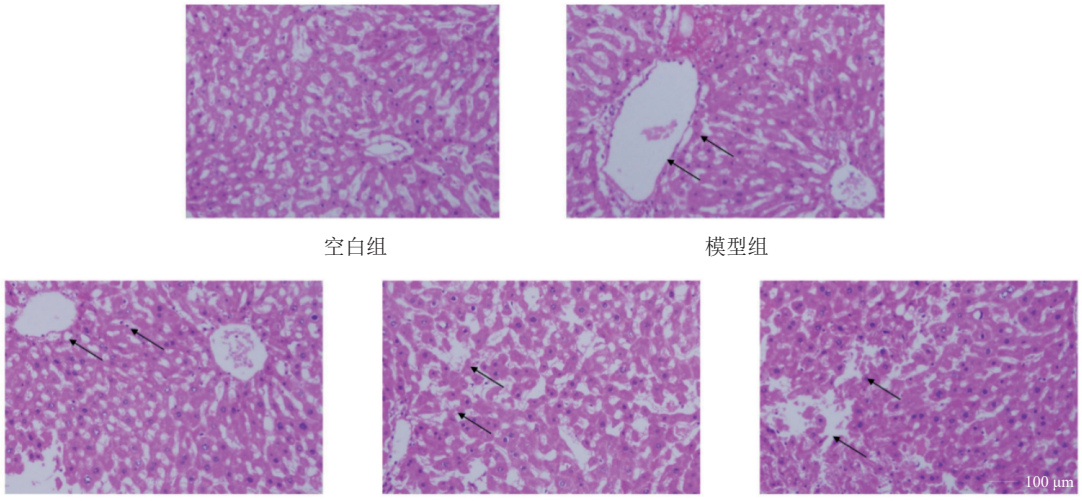


图 6 肝脏组织的病理切片染色（×100）

Fig.6 Staining of Pathological Sections of Liver Tissue (×100)

地代表临床肝损伤，后续可以优化肝损伤模型并增加其他种类肝损伤模型，探究该类纳米乳的治疗效果。本研究的结果可为注射型甘油酯纳米乳的临床应用以及药物优化设计提供有效的参考。

参考文献：

[1] 邓 艳, 刘 洪, 吴新玉, 等. 虎杖苷的保肝作用研究进展[J]. 中国比较医学杂志, 2021, **31**(9): 136-140.

[2] ALI F F, RIFAAI R A. Preventive effect of omega-3 fatty acids in a rat model of stress-induced liver injury[J]. *J Cell Physiol*, 2019, **234**(7): 11960-11968.

[3] HSU M C, HUANG Y S, OUYANG W C. Beneficial effects of omega-3 fatty acid supplementation in schizophrenia: possible mechanisms[J]. *Lipids Health Dis*, 2020, **19**(1): 159.

[4] ARSIC A, KRSTIC P, PAUNOVIC M, *et al*. Anti-inflammatory effect of combining fish oil and evening primrose oil supplementation on breast cancer patients undergoing chemotherapy: a randomized placebo-controlled trial[J]. *Sci Rep*, 2023, **13**(1): 6449.

[5] OLIVEIRA-FILHO R S, TORRINHAS R S, TESSER A, *et al*. Effect of a parenteral fish-oil-containing lipid emulsion on liver lipid perioxidation and antioxidative defenses in Lewis rats[J]. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 2023, **47**(4): 572-579.

[6] NAEEM S, ALI L, JAFFAR N, *et al*. Shark fish oil prevents scopolamine-induced memory impairment in an experimental

model［J］. *Metab Brain Dis*, 2024, **39**(1): 15-27.

［7］ ROBINSON D T, CALKINS K L, CHEN Y M, *et al*. Guidelines for parenteral nutrition in preterm infants: the American Society for Parenteral and Enteral Nutrition［J］. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 2023, **47**(7): 830-858.

［8］ SHI Y, FAN C N, LI K C, *et al*. Fish oil fat emulsion alleviates traumatic brain injury in mice by regulation of microglia polarization［J］. *Neurosci Lett*, 2023, **804**: 137217.

［9］ ZOU TT, LI J R, ZHU Y, *et al*. Fish oil-containing lipid emulsions prevention on parenteral nutrition-associated cholestasis in very low birth weight infants: a meta-analysis［J］. *World J Pediatr*, 2022, **18**(7): 463-471.

［10］ LEE S, SUNG S I, PARK H J, *et al*. Fish oil monotherapy for intestinal failure-associated liver disease on SMOF lipid in the neonatal intensive care unit［J］. *J Clin Med*, 2020, **9**(11): 3393.

［11］ FU K, LI Y Z, DAI S, *et al*. Exploration of the molecular basis of forsythia fruit in the prevention and treatment of cholestatic liver injury through network pharmacology and molecular docking［J］. *Nutrients*, 2023, **15**(9): 2065.

［12］ MA Y G, ZHANG J, HE J M, *et al*. Effects of high-pressure homogenization on the physicochemical, foaming, and emulsifying properties of chickpea protein［J］. *Food Res Int*, 2023, **170**: 112986.

［13］ 龚劲松, 袁　峰, 袁兵兵, 等. 高压均质法提取药用真菌多糖的研究［J］. 生物学杂志, 2018, **35**(4): 29-33.

［14］ WANG M, ZHANG M, FU L H, *et al*. Liver-targeted delivery of TSG-6 by calcium phosphate nanoparticles for the management of liver fibrosis［J］. *Theranostics*, 2020, **10**(1): 36-49.

［15］ KULKARNI S R, SOROKA C J, HAGEY L R, *et al*. Sirtuin 1 activation alleviates cholestatic liver injury in a cholic acid-fed mouse model of cholestasis［J］. *Hepatology*, 2016, **64**(6): 2151-2164.

广告索引

封二：上海现代药物制剂工程研究中心有限公司
封三：鲁南厚普制药有限公司
封底：中国医药工业信息中心
中彩插 1：全国药品安全宣传周
中彩插 2：《中国医药工业杂志》征订信息
1235 页：公益广告