

专题研究专栏

编者按:食源性活性物质在调控人体健康方面具有重要作用,但普遍存在溶解性不好、稳定性差、生物利用度低等问题。构建稳态化递送载体有助于突破活性物质利用的瓶颈,是功能食品领域研究的新热点及难点。本期的3项研究工作针对姜黄素、花色苷和 EGCG 等常见活性物质的应用难题,研制双重乳液、乳液凝胶和脂质体等递送载体,主要在载体可控构建、稳态化机理、控制释放、抗炎与抗氧化等方面开展了一系列基础性研究工作,提出了提升活性物质稳定性和生物利用度的新策略,以期稳态化递送载体在功能食品中的广泛应用开辟新途径。

(主持人:谭晨教授)

doi:10.12301/spxb202300255

文章编号:2095-6002(2024)02-0032-14

引用格式:马德雪,闫晓佳,刘夫国,等.共递送姜黄素和 EGCG 脂质体的构建及其对神经炎症的作用[J].食品科学技术学报,2024,42(2):32-45.



MA Dexue, YAN Xiaojia, LIU Fuguo, et al. Construction of co-delivered curcumin and EGCG liposomes and their effects on neuroinflammation[J]. Journal of Food Science and Technology, 2024,42(2):32-45.

共递送姜黄素和 EGCG 脂质体的构建及其对神经炎症的作用

马德雪, 闫晓佳, 刘夫国*, 刘学波*

(西北农林科技大学食品科学与工程学院, 陕西 杨凌 712100)

摘要:为克服姜黄素和表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)两种生物活性成分在稳定性和代谢动力学方面的局限性,进一步发挥其协同抗氧化和抗炎作用,采用薄膜超声法构建共递送姜黄素和 EGCG 的脂质体。以粒径、PDI 和电位为评价指标,分析磷脂与胆固醇质量比、磷脂与吐温 80 质量比、水合时间及超声时间对脂质体的影响,并通过静电吸附作用对脂质体进行乳铁蛋白和透明质酸修饰。使用脂多糖构建 BV2 小胶质细胞炎症模型,探讨乳铁蛋白和透明质酸修饰的共递送姜黄素和 EGCG 的脂质体对神经炎症的改善作用。在磷脂与胆固醇质量比为 10:1,磷脂与吐温 80 质量比为 10:3,水合时间 40 min,以及超声时间 15 min 时,成功制备了呈均匀球形、平均粒径为(131.53 ± 0.258) nm 的共递送姜黄素和 EGCG 的脂质体,在乳铁蛋白体积为 0.3 mL,透明质酸体积为 0.5 mL 时对脂质体进行修饰。实验结果显示,乳铁蛋白和透明质酸修饰的共递送姜黄素和 EGCG 的脂质体显著提高了姜黄素和 EGCG 的稳定性和抗氧化特性,抑制了脂多糖诱导的细胞形态的改变,恢复线粒体功能障碍,降低细胞内活性氧的产生,改善了脂多糖诱导的 BV2 小胶质细胞的炎症作用。研究结果旨在为进一步开发具有神经保护作用的功能食品提供新的思路。

关键词:姜黄素; EGCG; 脂质体; 乳铁蛋白; 神经炎症

中图分类号: TS201.4

文献标志码: A

收稿日期:2023-04-30

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(21808187)。

Foundation: National Natural Science Foundation of China Youth Science Fund Project(21808187)。

第一作者:马德雪,女,博士研究生,研究方向为食品营养与健康。

* 通信作者:刘夫国,男,教授,博士,主要从事食品化学与营养方面的研究;

刘学波,男,教授,博士,主要从事食品营养与健康方面的研究。

姜黄素 (curcumin, CUR) 是从姜黄根茎中提取的具有生物学活性的物质,是一种疏水性多酚。姜黄素含有多种官能团,包括 β -二酮基、碳-碳双键和含有不同数量羟基和甲氧基取代基的苯基环^[1]。研究表明,姜黄素具有广泛的生物活性,如抗氧化和抗炎等。姜黄素的天然抗炎活性与类固醇药物和非类固醇药物(吲哚美辛和苯丁胺酮等)不相上下,但后者具有危险的副作用。姜黄素发挥抗炎作用的途径,可能是通过抑制 COX-2, iNOS 和细胞因子(干扰素 IFN 和肿瘤坏死因子 TNF 等)以及激活转录因子(NF- κ B 和 AP-1 等)的产生来实现的。绿茶多酚是一种具有神经保护作用的多酚,其中表没食子儿茶素没食子酸酯[(-)-epigallocatechin gallate, EGCG] 为主要组成成分。EGCG 已显示出增加细胞活力、减少活性氧^[2] 和内质网应激标志物以及凋亡标志物的表达水平的作用^[3-4]。EGCG 也可以改善脑部炎症和神经元损伤,进而延缓症状的发生^[5-7]。研究表明,姜黄素和 EGCG 在疾病预防和健康促进方面具有协同作用。Rahman 等^[8] 研究表明,与单用 EGCG 或姜黄素相比,联合使用 EGCG 和姜黄素能显著改善小鼠海马组织中谷胱甘肽、超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、高级氧化蛋白产物、一氧化氮和脂质过氧化物的水平。Ruzicka 等^[9] 研究表明,姜黄素和 EGCG 联合使用可增加轴突萌发,减少神经胶质疤痕的形成,并改变巨噬细胞炎症蛋白 1- α 、白细胞介素-1 β 、白细胞介素-4 和白细胞介素-6 细胞因子的水平。目前,对于姜黄素和 EGCG 的研究只是简单地将二者混合使用,没有解决姜黄素和 EGCG 的代谢动力学差异的局限性和二者的生物活性问题。

脂质体是具有类脂质双分子层结构的微囊,可以包封亲水性和疏水性的食品功能因子,且包封后的功能因子能够更有效地到达靶向部位^[10-14];同时,对于不同的递送环境,可根据环境的特异性,对脂质体进行特定修饰,以达到高效和靶向递送的目的^[15-17]。小胶质细胞是中枢神经系统中的常驻巨噬细胞,是先天免疫反应的关键参与者。异常激活的小胶质细胞通过分泌多种促炎细胞因子和介质,包括 TNF- α 、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6 (IL-6) 等^[17],显著增加神经炎症和神经毒性^[18]。因此,小胶质细胞常被用作神经炎症的细胞实验模型。

为了提高姜黄素和 EGCG 的稳定性,更好地发挥其生物活性,克服二者在代谢动力学方面的局限性,本研究拟采用 BV2 小胶质细胞建立脂多糖

(LPS) 诱导的神经炎症模型,构建同时包封姜黄素和 EGCG 的脂质体系统,探究姜黄素和 EGCG 共递送体系对神经炎症的干预作用。本研究旨在为姜黄素和 EGCG 的生物利用度的提高,以及相关功能食品的研发提供一定的技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

蛋黄磷脂 (EYPC) 和胆固醇,上海艾伟拓医药科技有限公司;乳铁蛋白(纯度 > 96%),新西兰 Westland 公司;透明质酸、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH) (纯度为 95%) 和噻唑蓝 (MTT), Sigma-Aldrich 公司;姜黄素标品(纯度为 95%) 和 EGCG 标准品(纯度为 99%),北京纵横科技公司;RPMI-1640 培养基,美国 HyClone 公司;胎牛血清,美国 Gemini 生物科技有限公司;胰酶消化液,美国赛维尔生物科技有限公司;活性氧检测试剂盒、JC-1 线粒体膜电势检测试剂盒、LPS,上海索莱宝生物公司;吐温 80 (Tween 80)、二甲基亚砜 (DMSO),美国 MP 公司。

1.2 仪器与设备

DZKW-4 型电子恒温水浴锅,北京市中兴伟业仪器有限公司;RE-501 型旋转蒸发器,上海况胜实业发展有限公司;HC-3018R 型高速冷冻离心机,安徽中科中佳科学仪器有限公司;Nano-ZEN 3600 型激光纳米粒度仪,英国 Malvern 仪器有限公司;LGJ-25C 型真空冷冻干燥器,北京四环仪器厂;JEM-1400 PLUS 型透射电子显微镜,日本电子公司;Model 680 型多功能酶标仪,美国 Bio-Rad 公司;IX71 型倒置荧光显微镜,日本 Olympus 公司;LC-CB-650E 型超声细胞破碎仪,上海沪析实业有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 负载姜黄素和 EGCG 的脂质体的制备

采用薄膜超声法制备负载姜黄素和 EGCG 的脂质体。将不同质量比例的蛋黄磷脂 (EYPC)、胆固醇、吐温 80 (Tween 80) 和姜黄素溶解在氯仿和乙醇(体积比 2:1) 的混合溶剂中。磷脂与胆固醇的质量比设置为 2:1、6:1、10:1、14:1 和 18:1,磷脂与 Tween 80 的质量比为 10:1、10:2 和 10:3,充分溶解后转移到圆底烧瓶中。利用旋转蒸发器将溶剂蒸发干,将样品放到真空干燥箱中过夜,将有机试剂彻底蒸发。向制备所得样品中加入 EGCG 水溶液,旋蒸水合样

品,水合时间选择 30、40、50 min,将其置于超声细胞破碎仪中使体系分散,超声时间选择 5、10、15、20 min,得到均匀分散的脂质体。用 0.22 μm 的滤膜过滤,除去未包封的姜黄素和 EGCG,整个过程避光处理,得到的样品用氮气封装。同时设置空白脂质体对照样品(与负载姜黄素和 EGCG 脂质体的制备方法相同,但不添加姜黄素和 EGCG)。

1.3.2 负载姜黄素和 EGCG 的复合脂质体的制备

准确称取适量的乳铁蛋白溶于蒸馏水,配制成质量浓度为 15 mg/mL 的乳铁蛋白溶液。将溶液置于超声细胞破碎仪中,超声 2 h 使乳铁蛋白充分溶解。分别取体积为 0、0.1、0.3、0.5、0.7、0.9 mL 的乳铁蛋白溶液逐滴添加到脂质体溶液中,然后将整个体系置于磁力搅拌器(600 r/min)中搅拌 1.5 h,使脂质体溶液充分反应。

准确称取适量的透明质酸溶于蒸馏水,配制成质量浓度为 1 mg/mL 的溶液。待透明质酸溶液完全溶解后,分别取体积为 0、0.1、0.3、0.5、0.7、0.9 mL 的透明质酸逐滴添加到乳铁蛋白修饰后的脂质体溶液中,将其置于磁力搅拌器(600 r/min)中搅拌 1.5 h,使其充分反应,最终制备的脂质体称为复合脂质体。

1.3.3 脂质体粒径、Zeta 电位、多分散性系数的测定

在 25 $^{\circ}\text{C}$,使用 Zeta 电位仪测量脂质体的粒径、Zeta 电位和多分散性系数(PDI)。在测量前,将脂质体在蒸馏水中稀释 10 倍,使激光散射衰减度(Attn)值为 5~10。

1.3.4 脂质体的颗粒形态观察

将样品稀释 5 倍,并将 1 滴样品滴在碳网上,待样品风干后,用体积分数为 2% 的磷钨酸染色 5 min。将多余的样品用滤纸除去并在 25 $^{\circ}\text{C}$ 下干燥。在加速电压为 200 kV 的条件下,用透射电子显微镜观察脂质体颗粒的形态。

1.3.5 脂质体稳定性的测定

将脂质体在黑暗中于密封容器中,4 $^{\circ}\text{C}$ 储存 15 d,观察脂质体的变化。

1.3.6 DPPH 自由基清除能力的测定

准确称取适量的 DPPH 粉末溶解于体积分数为 75% 的乙醇溶液中,配制成 0.1 mol/L 的 DPPH 溶液,避光保存。每组样品各取 1 mL 加入离心管中,分别加入 2 mL DPPH 溶液,混匀后置于暗处,室温下反应 30 min。以 3 000 r/min 离心 10 min,使用分光光度计,在波长为 517 nm 下测定上清液的吸光度

A。将 1 mL 的蒸馏水加入 2 mL DPPH 溶液中作为空白样品,测得吸光度 $A_{\text{空白}}$;没有加入 DPPH 溶液时的样品测得吸光度 $A_{\text{样品}}$ 。DPPH 自由基清除率的计算方法见式(1)。

DPPH 自由基清除率 =

$$\left[1 - (A - A_{\text{样品}}) / A_{\text{空白}}\right] \times 100\% \quad (1)$$

1.3.7 细胞活力检测

采用 MTT 法检测游离姜黄素和 EGCG 悬浮液及空白脂质体、负载姜黄素和 EGCG 的脂质体和负载姜黄素和 EGCG 的复合脂质体对 BV2 小胶质细胞活力的影响^[19]。将 BV2 小胶质细胞培养在 RPMI 1640 培养基(含有 10% 胎牛血清和 1% 双抗)中,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数为 5% 的 CO_2 培养箱中。待细胞密度生长至 80%~90% 时进行胰酶消化,细胞计数后,将其以 1×10^4 个/孔密度接种于 96 孔板中。细胞贴壁后更换为含不同浓度姜黄素和 EGCG 的无血清培养基,将 96 孔板置于培养箱中孵育 4 h,用无菌磷酸盐缓冲液(PBS)清洗后加入含有 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS 的无血清培养基处理 12 h。弃去旧培养基,每孔加入 100 μL MTT(0.5 mg/mL)溶液,将 96 孔板置于培养箱中继续孵育 4 h,小心吸弃反应液。为了充分溶解蓝紫色甲瓚结晶物,每孔加入 100 μL 的 DMSO,将 96 孔板置于摇床振荡 10 min,选择波长 560 nm,用多功能酶标仪测定 OD 值,并根据式(2)计算 BV2 小胶质细胞活力。

$$\text{细胞活力} = A_{\text{实验}} / A_{\text{对照}} \times 100\% \quad (2)$$

式(2)中, $A_{\text{实验}}$ 为实验组吸光度; $A_{\text{对照}}$ 为对照组吸光度。

1.3.8 细胞形态观察

将 BV2 小胶质细胞均匀地接种于 6 孔细胞培养板($1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 个/孔)中,置于细胞培养箱中培养。待 6 孔细胞培养板中的细胞贴壁后,吸弃旧培养基,添加含游离姜黄素和 EGCG(CE)、空白脂质体(LIP)、负载姜黄素和 EGCG 的脂质体(CE-LIP)及复合脂质体(HA-LF-CE-LIP)的无血清培养基,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 恒温恒湿培养箱中孵育 4 h。加入 1 mL PBS 溶液清洗后,加入含 LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的无血清培养基处理 12 h。处理结束后使用 PBS 溶液清洗一遍,使用光学显微镜在明场下观察 BV2 细胞的形态。

1.3.9 细胞线粒体膜电势的检测

参照 Liu 等^[20]的方法,利用 JC-1 荧光染料检测细胞线粒体膜电势。由于线粒体内膜两侧的质子和

其他离子浓度不对称,造成的电位差异即为线粒体膜电势(MMP)。细胞出现凋亡或损伤,使线粒体膜电势异常。按照 JC-1 试剂盒说明书所述方法测定 MMP,采用红/绿荧光的相对比值衡量线粒体去极化的比例。

细胞前处理。将 BV2 小胶质细胞同时接种于 6 孔细胞培养板和 96 孔细胞培养板中。BV2 细胞的处理方式同 1.3.8。

细胞染色。待 LPS 处理细胞 12 h 后,吸弃培养基,用无菌 PBS 清洗一遍,加入 1 mL 细胞培养基。向 6 孔细胞培养板中加入 JC-1 染色工作液(每 50 万~100 万细胞加入 0.5 mL JC-1 染色工作液,一般 6 孔板需要 1 mL 工作液),充分混合后再孵育 20 min。孵育结束后吸弃上清液,用 PBS 洗涤 2 次。加入 2 mL 细胞培养基,在荧光显微镜下进行观察。

1.3.10 细胞内活性氧含量测定

参照 Wang 等^[21]的方法,采用 DCFH-DA 探针法检测细胞内活性氧(ROS)含量。

细胞前处理。实验前将 BV2 细胞接种于 6 孔板中,BV2 细胞所受的药物刺激处理方式同 1.3.8。LPS 处理细胞 12 h 后吸弃培养基。

探针加入及孵育。用无血清培养基将 DCFHDA 稀释为终浓度 10 $\mu\text{mol/L}$,避光条件下将特异性荧光染料 DCFH-DA 探针加入无血清培养基中。于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育细胞 0.5~1.0 h,为了使探针与细胞充分接触,间隔 3~5 min 轻轻摇晃混匀。

收集细胞。孵育结束吸弃培养基,用无血清培养基或无菌 PBS 清洗两遍,于荧光显微镜下拍照。

ROS 含量测定。拍照后将细胞轻轻吹打下来,直至培养皿底部由半透明转为透明,细胞层几乎全部吹打到无血清培养基或无菌 PBS 中。将细胞悬液快速点入 96 孔板中,用荧光酶标仪进行荧光强度测定,设置激发波长为 500 nm,发射波长为 525 nm。

1.3.11 RNA 的提取与逆转录

LPS 处理细胞 12 h 后,将 BV2 细胞从 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中取出,每加入 1 mL Trizol 试剂,按照说明书进行 RNA 的提取。用双蒸水调细胞 RNA 至统一浓度。按照康为世纪公司的 mRNA 反转录试剂盒的说明书,将样品稀释到所需浓度并与反转录试剂混合,利用普通 PCR 扩增仪将提取的 mRNA 反转录为 cDNA。反转录程序:37 $^{\circ}\text{C}$ 持续 15 min(反转录反应);85 $^{\circ}\text{C}$ 持续 5 s(反转录酶的失活反应);冷却至室温,样品用无酶水稀释 5 倍,最终样品保存在 -80 $^{\circ}\text{C}$ 条件下待用。

1.3.12 实时定量 PCR 测定

根据康为世纪公司的实时荧光定量 PCR 试剂盒(UltraSYBR One Step RT-gPCR Kit,无 ROX)说明书中的操作顺序,配置 20 μL 反应体系,对样品进行实时荧光定量 PCR。两步法 PCR 扩增标准程序:95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s;95 $^{\circ}\text{C}$ 3 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,循环 40 次。小鼠源引物信息如表 1,选择 GAPDH 为内参基因,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 相对定量法计算目的基因的表达变化。

表 1 引物信息

Tab. 1 Primer information

小鼠基因名称	前引物	后引物
<i>COX-2</i>	GAAGTCTTTGGTCTGCTGCCT	GCTCCTGCTTGAGTATGTCC
<i>iNOS</i>	GGAGCCAGTTGTGGATTG	CCAGGAAGTAGGTGAGGG
<i>TNF-α</i>	CCCTCACACTCAGATCATCTTCT	GCTACGACGTGGGCTACAG
<i>IL-1β</i>	TGACGGACCCAAAAGATGA	CTCCACAGCCACAATGAGT

1.4 数据处理

使用 GraphPad Prism 6.0 软件对实验数据进行统计学分析,结果以平均值 \pm 标准偏差表示,两组间样本均值比较采取 *t* 检验,多组间用单因素方差分析,不同小写字母代表差异性显著。* 表示与对照组相比差异显著($P < 0.05$),** 表示与对照组相比差异极显著($P < 0.01$);# 表示与 LPS 组相比差异显著($P < 0.05$),## 表示与 LPS 组相比差异极显

著($P < 0.01$)。

2 结果与分析

2.1 脂质体的制备与表征

2.1.1 不同条件对脂质体制备工艺的影响

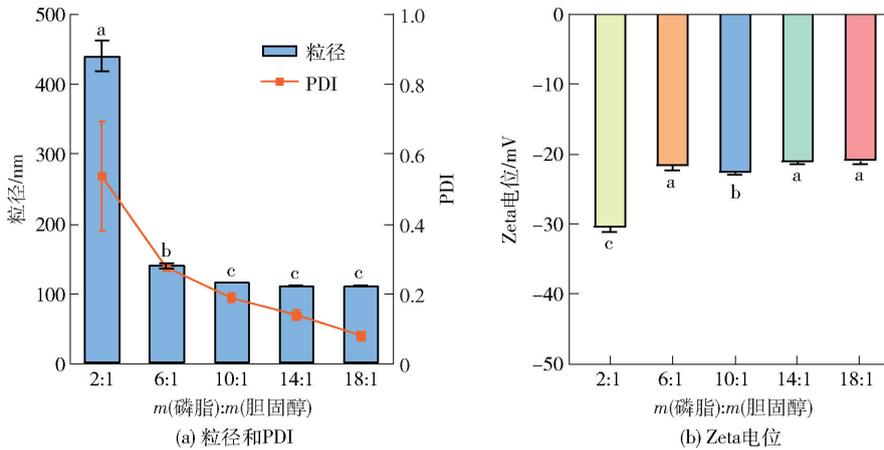
脂质体的性质取决于其粒径、多分散性系数(PDI)和电荷特性。因此,探究了不同条件下磷脂与胆固醇比例、磷脂与 Tween 80 比例、水合时间及

超声时间对脂质体的平均粒径、PDI 和电势的影响。

2.1.1.1 磷脂与胆固醇比例的影响

平均粒径和 PDI 可反应体系的稳定程度,利用马尔文粒度仪对脂质体的粒径、PDI 以及电位进行测定,实验结果见图 1。磷脂与胆固醇是构成脂质体的主要成分,二者的比例会影响脂质体的质量。由图 1 可知,在所选浓度范围内,当磷脂与胆固醇的质量比例由 2:1 变为 6:1 时,脂质体的粒径急剧下降,这与之前的发现相似^[22]。这可能是由于胆固醇通过嵌入磷脂双层中增加了其有序性,促进其更紧密的包封,并且由于其在两个相邻的酰基链之间的存在而对自由基传播反应的扩散造成空间位阻。但

是,当胆固醇的质量超过一定水平,就会开始破坏脂质体的双层结构,导致溶质分子被包裹。之前的研究也表明,胆固醇质量一定程度的降低会导致脂质体粒径的减小^[23]。当磷脂与胆固醇质量比从 10:1 变为 14:1 时,平均粒径无显著性差异。这表明,低于一定量的胆固醇对脂质体系统的粒径分布没有显著影响($P > 0.05$);而且,磷脂与胆固醇质量比由 2:1 变为 6:1 时,Zeta 电位绝对值明显减小,之后在磷脂与胆固醇质量比为 10:1 时显示出较大的 Zeta 电位绝对值,此时脂质体体系更稳定。因为在此条件下制备的脂质体显示出更优的平均粒径和 PDI,因此,选择磷脂与胆固醇质量比为 10:1 进行下一步研究。



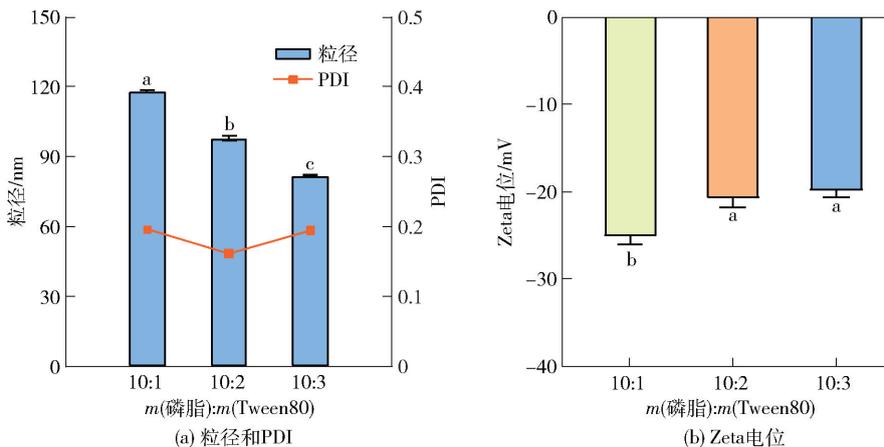
不同小写字母表示组间差异显著 ($P < 0.05$)。

图 1 不同比例的磷脂与胆固醇对脂质体粒径、PDI 和 Zeta 电位的影响

Fig. 1 Effects of different ratios of phospholipids to cholesterol on particle size, PDI and Zeta potential of liposomes

2.1.1.2 磷脂与 Tween 80 比例的影响

磷脂与 Tween 80 的比例是影响脂质体性质的重要因素,探究了不同质量比的磷脂与 Tween 80



不同小写字母表示组间差异显著 ($P < 0.05$)。

图 2 不同比例的磷脂与 Tween 80 对脂质体粒径、PDI 和 Zeta 电位的影响

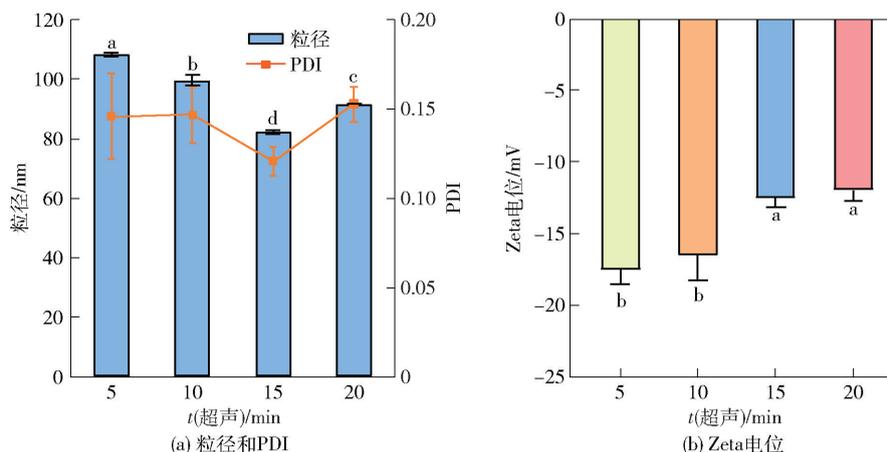
Fig. 2 Effects of different ratios of phospholipids to Tween 80 on particle size, PDI and Zeta potential of liposomes

对脂质体粒径、PDI 和 Zeta 电位的影响,实验结果见图 2。从图 2 中可以看出,改变磷脂与 Tween 80 的质量比,脂质体的平均粒径都在 80 ~ 120 nm,而

随着 Tween 80 比例的升高,脂质体的粒径呈下降趋势,这可能归因于 Tween 80 提供的空间稳定性。推测 Tween 80 的烃链可以穿透脂质双层,暴露脂质体表面的聚乙烯氧化物基团,在脂质体表面引入空间屏障,从而减少脂质体的融合,这与之前的研究结果一致^[24-25]。脂质体平均粒径大小随着 Tween 80 比例的增加而减小,但对 PDI 没有显著影响($P > 0.05$);随着 Tween 80 比例的增加,Zeta 电位绝对值先减小后趋于稳定。因为在磷脂与 Tween 80 比例为 10:3 条件下制备的脂质体平均粒径最小,因此,选择磷脂与 Tween 80 质量比为 10:3 进行下一步研究。

2.1.1.3 超声时间的影响

选取超声时间分别为 5、10、15、20 min,分析制备时间对脂质体的粒径、PDI 和 Zeta 电位的影响,



不同小写字母表示组间差异显著($P < 0.05$)。

图3 不同超声时间对脂质体粒径、PDI 和 Zeta 电位的影响

Fig. 3 Effects of different ultrasound times on particle size, PDI and Zeta potential of liposomes

2.1.1.4 水合时间的影响

磷脂的水合时间也是制备脂质体的关键因素,因此选择了水合时间分别为 30、40、50 min,分析水合时间对脂质体的理化性质的影响,实验结果见图 4。由图 4 可知,当水合时间由 30 min 变为 40 min 时,脂质体的平均粒径与 PDI 值急剧降低;当水合时间进一步延长,平均粒径和 PDI 均没有显著变化,而 Zeta 电位绝对值却在进一步减小。考虑到 Zeta 电位绝对值增加会增加体系的静电排斥作用,提高体系的稳定性,因此选择水合时间为 40 min 时进行脂质体的制备。

2.1.2 负载姜黄素和 EGCG 的脂质体制备条件的优化

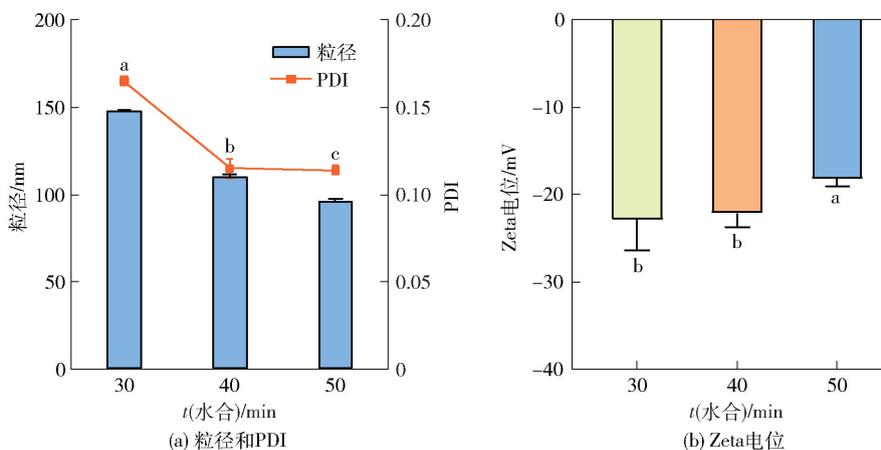
姜黄素和 EGCG 作为被包裹的成分,研究其添

加比例对脂质体理化性质的影响,有助于在体系中合理添加姜黄素和 EGCG。设置磷脂与多酚的质量比例从 14:1 到 6:1,探究不同磷脂和芯材的比例对体系粒径和电位的影响,实验结果见图 5。由图 5 可以看出,多酚比例升高,脂质体粒径升高,随着多酚比例进一步增加,粒径呈现出先降低后升高的趋势。可以看出,在磷脂与多酚质量比例为 10:1 时,脂质体的粒径最小,且具有较小的 PDI 值,具有更好的分散性;此时脂质体的 Zeta 电位绝对值更大,能有效阻止脂质体的聚集,脂质体更稳定。

2.1.3 负载姜黄素和 EGCG 的复合脂质体制备条件的优化

2.1.3.1 乳铁蛋白添加量的影响

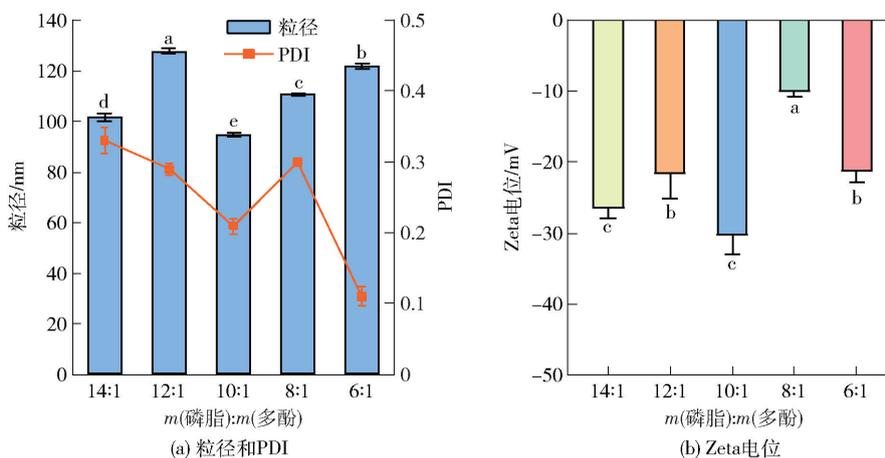
本研究中,选取了不同体积的乳铁蛋白修饰脂



不同小写字母表示组间差异显著 ($P < 0.05$)。

图4 不同水合时间对脂质体粒径、PDI 和 Zeta 电位的影响

Fig. 4 Effects of different hydration time on particle size, PDI and Zeta potential of liposomes



不同小写字母表示组间差异显著 ($P < 0.05$)。

图5 磷脂与多酚不同比例对脂质体粒径、PDI 和 Zeta 电位的影响

Fig. 5 Effects of different ratios of phospholipids to polyphenols on particle size, PDI and Zeta potential of liposomes

质体,实验结果见图6。由图6可知,在乳铁蛋白体积为0~0.3 mL时,随着乳铁蛋白含量的增加,脂质体的平均粒径先增加后降低。这可能是由于单一的脂质体体系不稳定,乳铁蛋白的添加抑制了脂质体的聚集,乳铁蛋白浓度增加,导致乳铁蛋白的修饰慢慢趋于饱和。当乳铁蛋白添加量为0.3 mL时,脂质体的平均粒径最低,此时的Zeta电位值趋于稳定,表明乳铁蛋白对脂质体的修饰达到饱和;当乳铁蛋白添加量大于0.3 mL时,脂质体粒径和Zeta电位都无显著变化。因此,选取0.3 mL的乳铁蛋白进行下一步研究。

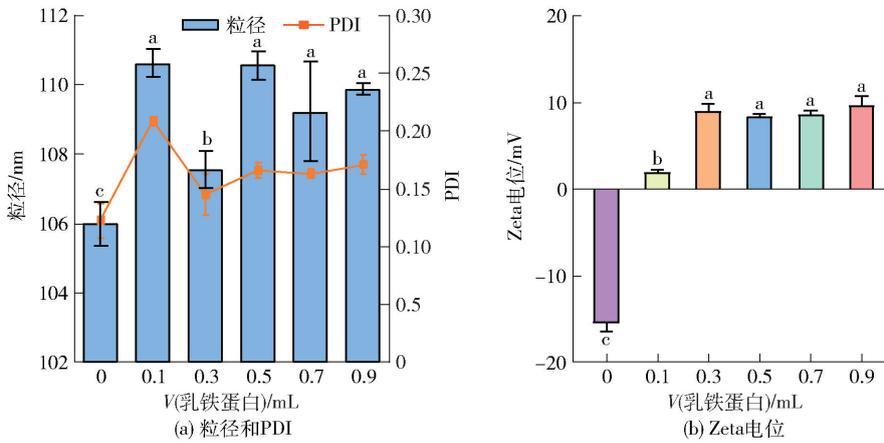
2.1.3.2 透明质酸添加量的影响

选取不同体积的透明质酸,探究透明质酸添加量对脂质体粒径、PDI 和 Zeta 电位的影响,实验结果

见图7。由图7可知,随着透明质酸含量的增加,在添加体积由0.3 mL转变为0.5 mL时,脂质体的粒径显著降低;脂质体的电位值由正变为负;随着透明质酸添加量的进一步增加,脂质体的Zeta电位值没有显著差异,表明此时脂质体表面吸附的透明质酸已接近饱和。因此选择透明质酸体积为0.5 mL进行下一步实验。

2.1.4 复合脂质体的微观形貌观察结果

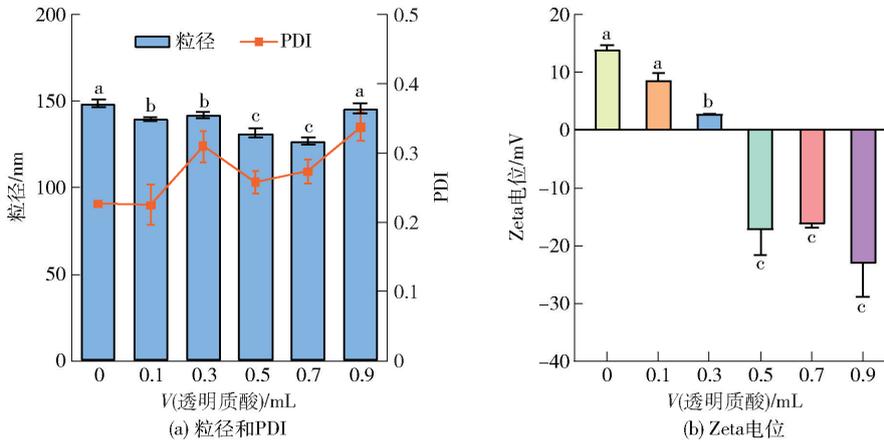
采用透射电子显微镜观察脂质体的微观形貌,实验结果见图8。由图8可以看出,所有的脂质体外观呈圆球形,脂质体未出现团聚结块现象,分散均匀。乳铁蛋白修饰后的脂质体并未明显变化,而在透明质酸修饰后,脂质体的平均直径呈现明显的增加,整体结果与动态光散射(DLS)测量值相比略小,



不同小写字母表示组间差异显著 ($P < 0.05$)。

图 6 乳铁蛋白添加量对脂质体粒径、PDI 和 Zeta 电位的影响

Fig. 6 Effects of different additive amount of lactoferrin on particle size, PDI and Zeta potential of liposomes



小写字母表示组间差异显著 ($P < 0.05$)。

图 7 透明质酸添加量对脂质体粒径、PDI 和 Zeta 电位的影响

Fig. 7 Effects of additive amount of hyaluronic acid on particle size, PDI and Zeta potential of liposomes

这可能是因为在电镜样品制备过程中脂质体脱水导致的。

2.1.5 复合脂质体的 DPPH 自由基清除率分析

为了进一步探究不同脂质体的抗氧化活性,对不一样品的 DPPH 自由清除率进行了测定,实验结果见图 9。由图 9 可知,姜黄素和 EGCG 具有较强的 DPPH 自由基清除能力,空白的脂质体显示出较低 DPPH 自由基清除能力。与混悬液中的姜黄素和 EGCG 相比,包封在脂质体中的姜黄素和 EGCG 显示出更高的 DPPH 自由基清除能力。这是因为包封可能会改善姜黄素和 EGCG 的分散性,使其在体系中更好地分散。乳铁蛋白和透明质酸修饰的包封姜黄素和 EGCG 脂质体的 DPPH 自由基清除率最高,这可能是由于乳铁蛋白和透明质酸本身具有的抗氧化活性也发挥了一定作用。

2.1.6 复合脂质体的稳定性分析

将不同脂质体置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下贮藏,通过测定储存过程不同样品的外观变化,对不同脂质体的物理稳定性进行了评估,实验结果见图 10。由图 10 可以看出,新制备的脂质体体系澄清,含有姜黄素的脂质体呈黄色,复合脂质体在贮藏之后的外观没有显著的变化。随着时间的推移,空白脂质体、CUR/EGCG-LIP、LF-CUR/EGCG-LIP 的体系变化幅度很小,HA-LF-CUR/EGCG-LIP 也未发生明显变化,这些现象表明氧气等环境因素未使透明质酸与脂质体间的聚合网络结构发生改变,体系未出现团聚现象。

2.2 复合脂质体对 BV2 小胶质细胞的干预作用

2.2.1 姜黄素和 EGCG 对 LPS 诱导的 BV2 小胶质细胞活力的干预作用

为了探究姜黄素和 EGCG 对 LPS 诱导的细胞

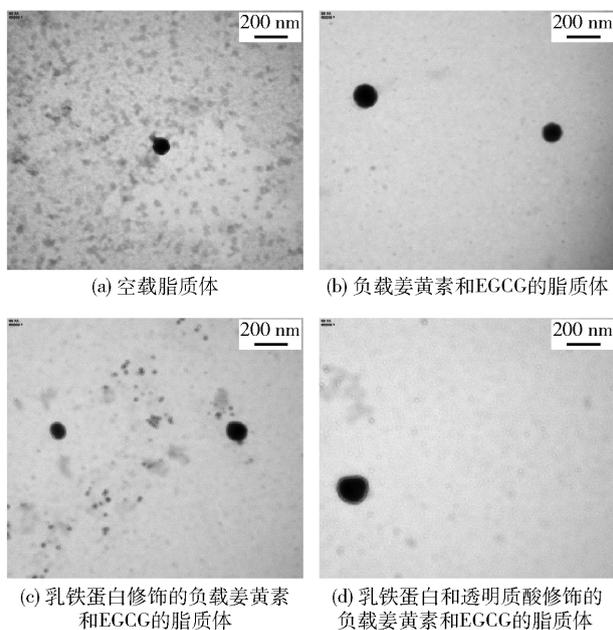
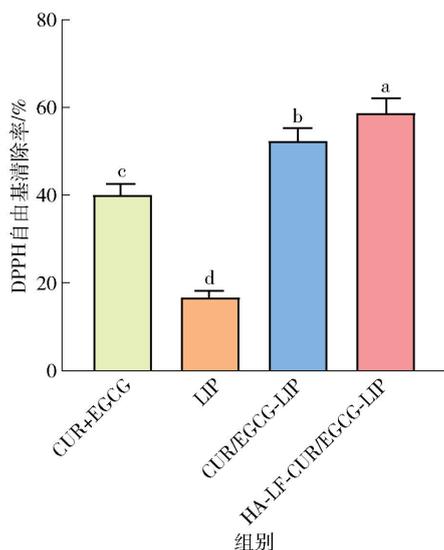


图8 透射电镜下的脂质体的形貌

Fig. 8 Morphology of liposomes under transmission electron microscopy

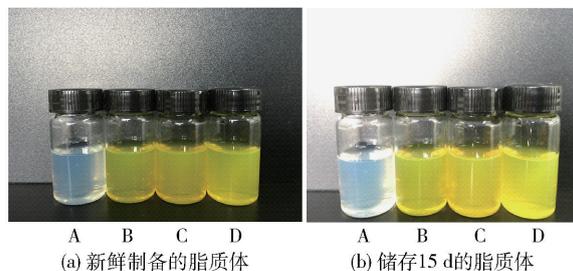


CUR + EGCG 为 CUR 和 EGCG 的混悬液, LIP 为空白脂质体, CUR/EGCG-LIP 为共递送姜黄素和 EGCG 的脂质体, HA-LF-CUR/EGCG-LIP 为透明质酸和乳铁蛋白修饰的共递送姜黄素和 EGCG 的脂质体。不同小写字母表示组间差异显著 ($P < 0.05$)。

图9 不同样品的 DPPH 自由基清除率

Fig. 9 DPPH free radical scavenging rate of different samples

活力的影响,分别用不同浓度的姜黄素和 EGCG 混悬液(0、20、40、80 $\mu\text{mol/L}$)处理 BV2 细胞 4 h,实验结果见图 11。由图 11 可知,姜黄素和 EGCG 混悬液对 BV2 小胶质细胞活力无明显影响,说明姜黄素

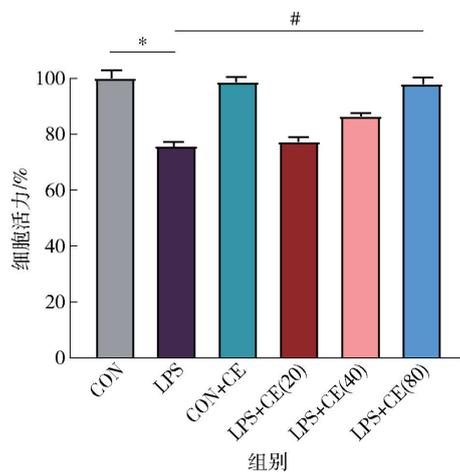


A 为空白脂质体, B 为负载姜黄素和 EGCG 的脂质体, C 为乳铁蛋白修饰的负载姜黄素和 EGCG 的脂质体, D 为乳铁蛋白和透明质酸修饰的负载姜黄素和 EGCG 的脂质体。

图10 新鲜制备和储存 15 d 后脂质体样品的外观

Fig. 10 Appearance of samples at different storage times

和 EGCG 对 BV2 小胶质细胞没有毒性; LPS 处理使 BV2 细胞的活力降低至 75.80%, 姜黄素和 EGCG 混悬液能够抑制 LPS 导致的细胞活力的降低; 而 80 $\mu\text{mol/L}$ 混悬液预孵可增加细胞活力至 98.09% ($P < 0.05$)。



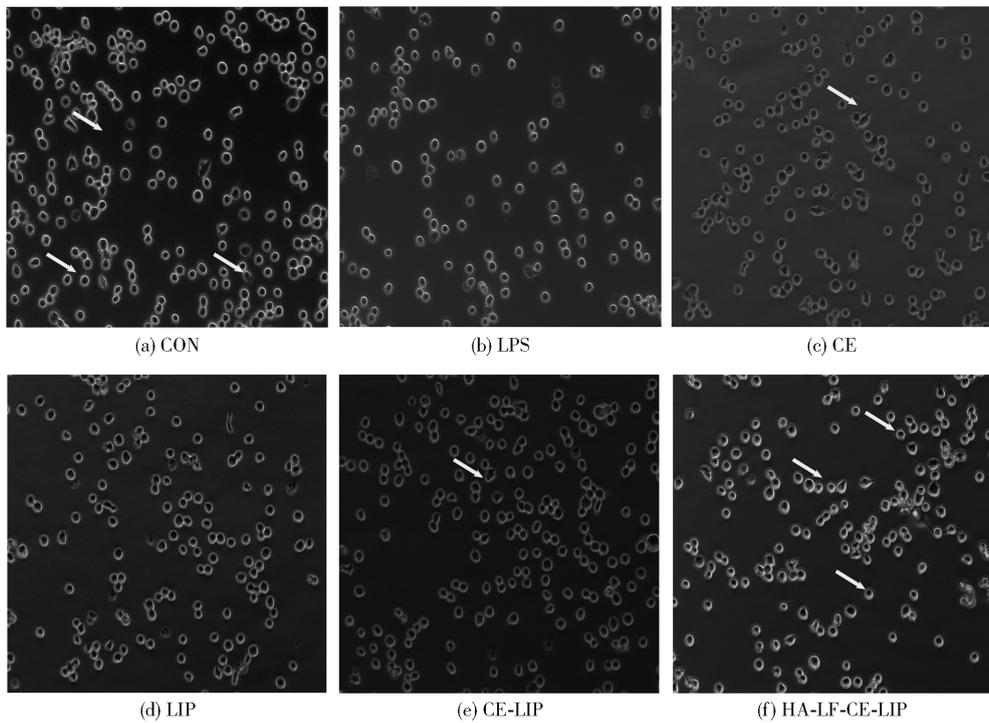
CON 为对照组, LPS 为脂多糖干预组, CON + CE 为对照组添加姜黄素和 EGCG 组, LPS + CE (20) 为脂多糖添加姜黄素和 EGCG (浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$) 组, LPS + CE (40) 为脂多糖添加姜黄素和 EGCG (浓度为 40 $\mu\text{mol/L}$) 组, LPS + CE (80) 为脂多糖添加姜黄素和 EGCG (浓度为 80 $\mu\text{mol/L}$) 组。* 表示与对照组相比差异显著 ($P < 0.05$), # 表示与 LPS 组相比差异显著 ($P < 0.05$)。

图11 姜黄素和 EGCG 对 LPS 诱导的 BV2 小胶质细胞活力的影响

Fig. 11 Effects of curcumin and EGCG on viability of LPS-induced BV2 microglia

2.2.2 对细胞形态的干预作用

研究表明, LPS 干预小胶质细胞, 能够诱导细胞产生炎症, 进一步导致细胞凋亡^[29], 不同处理对小胶质细胞形态的影响, 实验结果见图 12。由图 12 可知, 与对照组相比, LPS 处理组的 BV2 小胶质细



CON 为对照组, LPS 为脂多糖处理组, CE 为 CUR 和 EGCG 混悬液, LIP 为空白脂质体, CE-LIP 为负载 CUR 和 EGCG 的脂质体, HA-LF-CE-LIP 为透明质酸和乳铁蛋白修饰的负载 CUR 和 EGCG 的复合脂质体。箭头表示细胞分支, 放大倍数为 200 倍。

图 12 复合脂质体对 LPS 诱导的 BV2 小胶质细胞形态的影响

Fig. 12 Effects of complex liposomes on cell morphology in LPS-induced BV2 microglia

胞形态学变化明显, 细胞分支明显变少, 形态出现异常, 这与之前的研究一致^[30]。空白脂质体处理对小胶质细胞的形态变化没有明显影响, 而复合脂质体预孵育可明显抑制 LPS 诱导的细胞形态的改变, 细胞分支显著增多, 形态与对照组一致。

2.2.3 对细胞线粒体功能紊乱的干预作用

在正常情况下, 线粒体通过释放 cAMP、Ca²⁺ 等第二信使参与细胞的多种信号转导过程, 进而调节细胞内代谢系统的酶活性, 而线粒体呼吸链则是 ROS 的主要生产场所, 因此线粒体很容易受到 ROS 的攻击^[31]。进一步研究了复合脂质体对 LPS 诱导的 BV2 小胶质细胞线粒体膜电势的影响。

不同处理对 LPS 诱导的 BV2 小胶质细胞线粒体膜电势影响的实验结果见图 13。由图 13 可知, 与对照组相比, LPS 处理显著降低了 BV2 细胞的红色荧光强度与绿色荧光强度比例, 而乳铁蛋白和透明质酸修饰的负载姜黄素和 EGCG 脂质体可显著缓解 LPS 诱导的 BV2 小胶质细胞线粒体膜电势的降低。故 LPS 在诱导细胞炎症的同时造成了线粒体内膜两侧电势差缩小, 产生了线粒体功能障碍, 而复

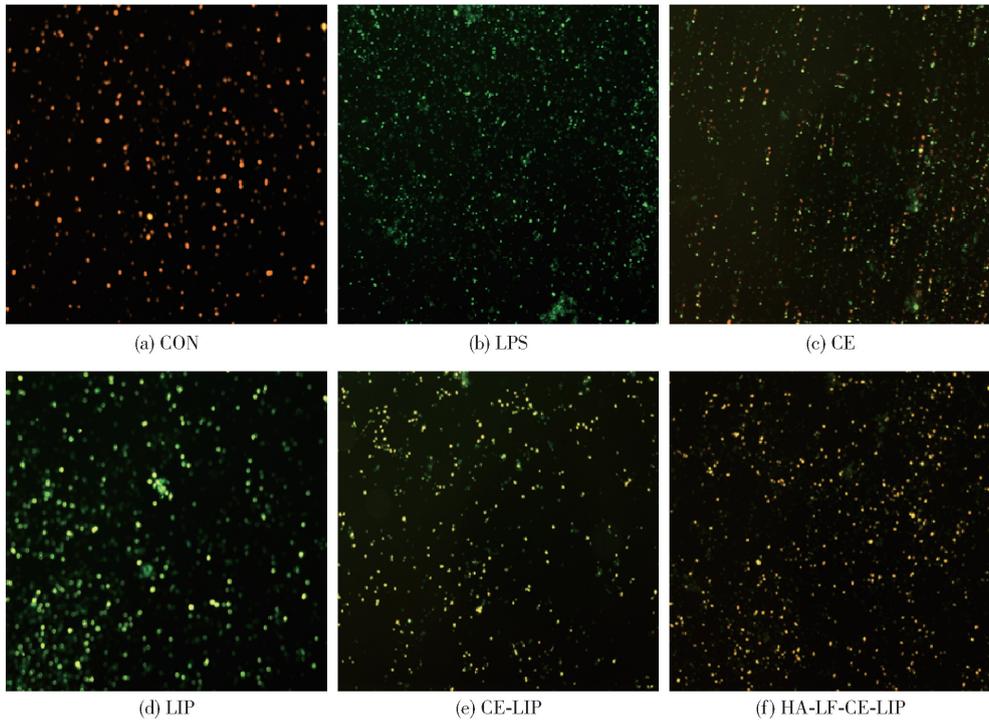
合脂质体干预后能够有效提升线粒体内膜两侧电势差, 一定程度恢复线粒体功能。

2.2.4 对细胞氧化还原状态的干预作用

各种外源性或内源性刺激会促进机体 ROS 的过度释放^[32], 复合脂质体对细胞内 ROS 产生的影响结果见图 14。由图 14 可知: 与对照组相比, LPS 模型组极显著促进了细胞内 ROS 的产生 ($P < 0.01$); 游离的姜黄素和 EGCG 的混悬液以及空白脂质体干预对于 ROS 的产生都没有显著的抑制作用 ($P > 0.05$); 负载姜黄素和 EGCG 的脂质体处理则显著降低了细胞内 ROS 的产生; 乳铁蛋白和透明质酸修饰的负载姜黄素和 EGCG 的脂质体预孵育使 ROS 含量已显著低于 LPS 模型组 ($P < 0.05$), 与正常组相比没有显著差异。实验结果说明, 复合脂质体能够显著降低细胞内 ROS 的产生。

2.2.5 对细胞炎症因子的干预作用

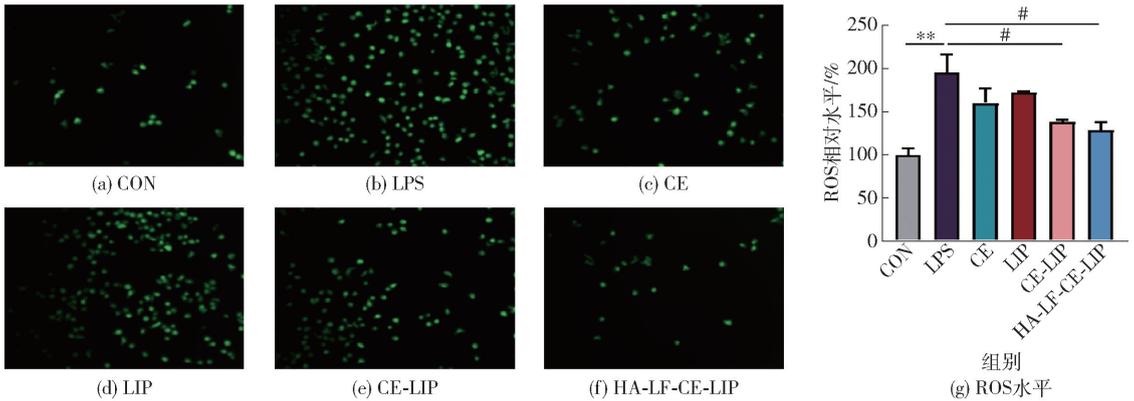
LPS 是构成革兰氏阴性杆菌细胞壁的成分, 小胶质细胞是 LPS 的主要靶细胞, LPS 可以激活小胶质细胞并使其分泌大量的炎症细胞因子。复合脂质体对细胞炎症因子影响的实验结果如图 15。



CON 为对照组, LPS 为脂多糖处理组, CE 为 CUR 和 EGCG 混悬液, LIP 为空白脂质体, CE-LIP 为负载 CUR 和 EGCG 的脂质体, HA-LF-CE-LIP 为透明质酸和乳铁蛋白修饰的负载 CUR 和 EGCG 的脂质体。放大倍数为 200 倍。

图 13 复合脂质体对 LPS 诱导的 BV2 小胶质细胞线粒体膜电势的影响

Fig. 13 Effects of complex liposomes on mitochondrial membrane potential in LPS-induced BV2 microglia



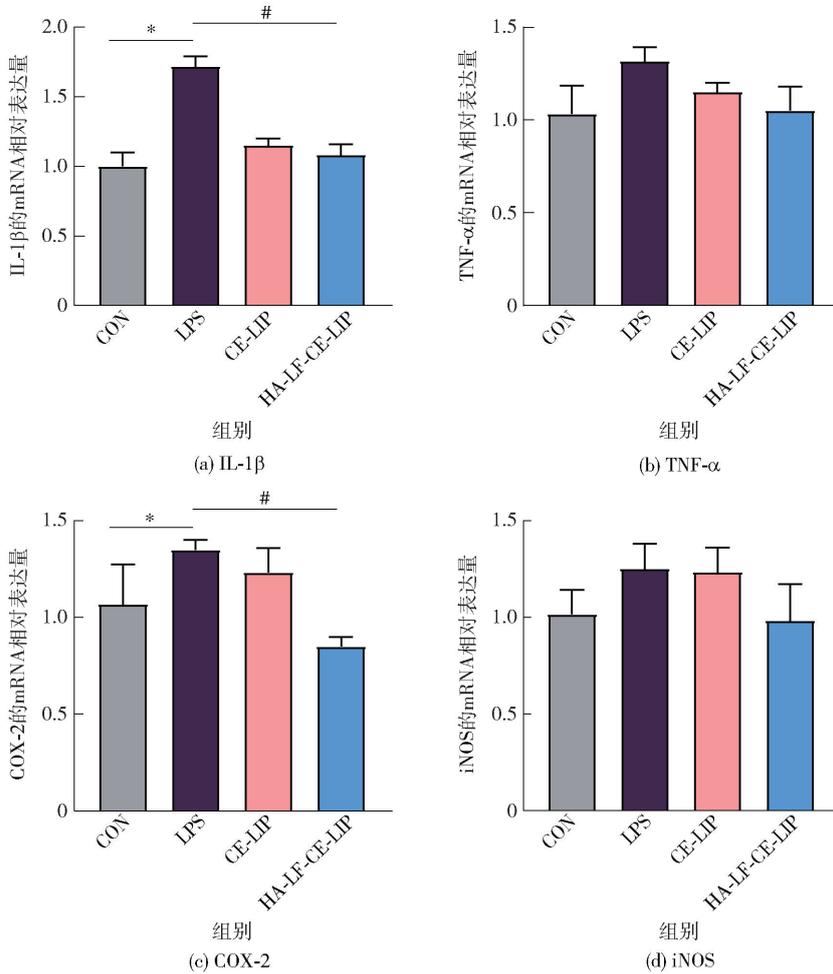
CON 为对照组, LPS 为脂多糖处理组, CE 为 CUR 和 EGCG 混悬液, LIP 为空白脂质体, CE-LIP 为负载 CUR 和 EGCG 的脂质体, HA-LF-CE-LIP 为透明质酸和乳铁蛋白修饰的负载 CUR 和 EGCG 的脂质体。放大倍数为 200 倍。** 表示与对照组相比差异极显著 ($P < 0.01$), # 表示与 LPS 组相比差异显著 ($P < 0.05$)。

图 14 复合脂质体对 LPS 诱导的 BV2 小胶质细胞内 ROS 水平的影响

Fig. 14 Effects of complex liposomes on reactive oxygen species levels in LPS-induced BV2 microglia

由图 15(a)可知, LPS 能够显著促进促炎因子 IL-1 β 的 mRNA 表达, 而复合脂质体干预可以显著抑制这一过程 ($P < 0.01$); 但由图 15(b)可知, 复合脂质体对 TNF- α 的 mRNA 表达没有显著影响。另外, 如图 15(c)所示, 复合脂质体明显抑制了 LPS 诱导的

BV2 小胶质细胞炎症标志性蛋白 COX-2 的 mRNA 表达 ($P < 0.01$); 而由图 15(d)可知, 炎症性标志蛋白 iNOS 的 mRNA 表达没有显著变化。综上, 复合脂质体抑制了 LPS 诱导的 BV2 小胶质细胞的炎症反应。



CON 为对照组, LPS 为脂多糖处理组, CE-LIP 为负载 CUR 和 EGCG 的脂质体, HA-LF-CE-LIP 为透明质酸和乳铁蛋白修饰的负载 CUR 和 EGCG 的脂质体。放大倍数为 200 倍。* 表示与对照组相比差异显著 ($P < 0.05$), # 表示与 LPS 组相比差异显著 ($P < 0.05$)。

图 15 复合脂质体对 LPS 诱导的 BV2 小胶质细胞炎症因子的影响

Fig. 15 Effects of complex liposomes on inflammatory factors in LPS-induced BV2 microglia

3 结论

本研究主要通过薄膜超声法制备了负载姜黄素和 EGCG 的脂质体。通过调整磷脂和胆固醇比例、磷脂和吐温 80 比例、水合时间以及超声时间,对脂质体的制备工艺进行了优化。电镜观察结果显示,制备的脂质体呈均匀的球形,乳铁蛋白和透明质酸修饰后的复合脂质体稳定性显著提高,且具有更高的 DPPH 自由基清除率。复合脂质体能够显著抑制 LPS 诱导的 BV2 小胶质细胞的线粒体膜电势的降低,改善细胞的线粒体功能障碍。LPS 处理使 BV2 小胶质细胞的活性氧过度产生,经复合脂质体干预后,小胶质细胞活性氧含量显著降低,炎症相关因子的表达减弱,细胞炎症情况得到改善。姜黄素和

EGCG 具有极高的生物活性,在食品领域具有广阔的应用前景。各种运载体系的构建有助于提高姜黄素和 EGCG 的稳定性,但是现有的稳态化技术仍处于初步研究阶段,更绿色、更智能的体系亟待研究和探索。

参考文献:

- [1] LLANO S, GOMEZ S, LONDONO J, et al. Antioxidant activity of curcuminoids[J]. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2019, 21(7): 3752–3760.
- [2] ZHANG X, WU M, LU F, et al. Involvement of $\alpha 7$ nAChR signaling cascade in epigallocatechin gallate suppression of beta-amyloid-induced apoptotic cortical neuronal insults[J]. *Molecular Neurobiology*, 2014, 49(1): 66–77.

- [3] HAN J, WANG M, JING X, et al. (-)-Epigallocatechin gallate protects against cerebral ischemia-induced oxidative stress via Nrf2/ARE signaling [J]. *Neurochemical Research*, 2014, 39(7): 1292–1299.
- [4] YAO C, ZHANG J, LIU G, et al. Neuroprotection by (-)-epigallocatechin-3-gallate in a rat model of stroke is mediated through inhibition of endoplasmic reticulum stress [J]. *Molecular Medicine Reports*, 2014, 9(1): 69–76.
- [5] AKTAS O, PROZOROVSKI T, SMORODCHENKO A, et al. Green tea epigallocatechin-3-gallate mediates T cellular NF-kappa B inhibition and exerts neuroprotection in autoimmune encephalomyelitis [J]. *Journal of Immunology*, 2004, 173(9): 5794–5800.
- [6] HERGES K, MILLWARD J M, HENTSCHEL N, et al. Neuroprotective effect of combination therapy of glatiramer acetate and epigallocatechin-3-gallate in neuroinflammation [J]. *PLoS One*, 2011, 6(10): e25456.
- [7] KOH S H, LEE S M, KIM H Y, et al. The effect of epigallocatechin gallate on suppressing disease progression of ALS model mice [J]. *Neuroscience Letters*, 2006, 395(2): 103–107.
- [8] RAHMAN M A, SHUVO A A, APU M, et al. Combination of epigallocatechin 3 gallate and curcumin improves D-galactose and normal-aging associated memory impairment in mice [J]. *Scientific Reports*, 2023, 13(1): 12681.
- [9] RUZICKA J, URDZIKOVA L M, SVOBODOVA B, et al. Does combined therapy of curcumin and epigallocatechin gallate have a synergistic neuroprotective effect against spinal cord injury? [J]. *Neural Regeneration Research*, 2018, 13(1): 119–127.
- [10] VUILLEMARD J C. Recent advances in the large-scale production of lipid vesicles for use in food products: microfluidization [J]. *Journal of Microencapsulation*, 1991, 8(4): 547–562.
- [11] VEMURI S, RHODES C T. Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review [J]. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, 1995, 70(2): 95–111.
- [12] HE H, LU Y, QI J, et al. Biomimetic thiamine-and niacin-decorated liposomes for enhanced oral delivery of insulin [J]. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2018, 8(1): 97–105.
- [13] GAO C, LIU C, CHEN Q, et al. Cyclodextrin-mediated conjugation of macrophage and liposomes for treatment of atherosclerosis [J]. *Journal of Controlled Release*, 2022, 349: 2–15.
- [14] ZHANG Y, PU C, TANG W, et al. Gallic acid liposomes decorated with lactoferrin: characterization, *in vitro* digestion and antibacterial activity [J]. *Food Chemistry*, 2019, 293: 315–322.
- [15] AMIN M, MANSOURIAN M, BURGERS P C, et al. Increased targeting area in tumors by dual-ligand modification of liposomes with RGD and TAT peptides [J]. *Pharmaceutics*, 2022, 14(2): 458.
- [16] YE Z, GASTFRIEND B D, UMLAUF B J, et al. Antibody-targeted liposomes for enhanced targeting of the blood-brain barrier [J]. *Pharmaceutical Research*, 2022, 39(7): 1523–1534.
- [17] WENG L, ZHANG H, LI X, et al. Ampelopsin attenuates lipopolysaccharide-induced inflammatory response through the inhibition of the NF-kappaB and JAK2/STAT3 signaling pathways in microglia [J]. *International Immunopharmacology*, 2017, 44: 1–8.
- [18] LONG-SMITH C M, SULLIVAN A M, NOLAN Y M. The influence of microglia on the pathogenesis of Parkinson's disease [J]. *Progress in Neurobiology*, 2009, 89(3): 277–287.
- [19] WU W, LI Y, WU Y, et al. Lutein suppresses inflammatory responses through Nrf2 activation and NF-kappaB inactivation in lipopolysaccharide-stimulated BV-2 microglia [J]. *Molecular Nutrition and Food Research*, 2015, 59(9): 1663–1673.
- [20] LIU Z, SONG G, ZOU C, et al. Acrylamide induces mitochondrial dysfunction and apoptosis in BV-2 microglial cells [J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2015, 84: 42–53.
- [21] WANG H, JOSEPH J A. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader [J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 1999, 27(5/6): 612–616.
- [22] CHEN W, ZOU M, MA X, et al. Co-encapsulation of EGCG and quercetin in liposomes for optimum antioxidant activity [J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2019, 84(1): 111–120.
- [23] BRIUGLIA M L, ROTELLA C, MCFARLANE A, et al. Influence of cholesterol on liposome stability and on *in vitro* drug release [J]. *Drug Delivery and Translational Research*, 2015, 5(3): 231–242.
- [24] YANG T, CUI F D, CHOI M K, et al. Enhanced solubility and stability of PEGylated liposomal paclitaxel: *in vitro* and *in vivo* evaluation [J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2007, 338(1/2): 317–326.
- [25] YOUNUS M, HAWLEY A, BOYD B J, et al. Bulk and dispersed aqueous behaviour of an endogenous lipid, selachyl alcohol: effect of Tween 80 and Pluronic F127 on nanostructure [J]. *Colloids and Surfaces B: Biointer-*

- faces, 2018,169:135 – 142.
- [26] PINILLA C M, NORENA C P, BRANDELLI A. Development and characterization of phosphatidylcholine nanovesicles, containing garlic extract, with antilisterial activity in milk[J]. *Food Chemistry*, 2017,220:470 – 476.
- [27] LI X B, LIU A, YANG L, et al. Antidepressant-like effects of translocator protein (18 kDa) ligand ZBD-2 in mouse models of postpartum depression [J]. *Molecular Brain*, 2018,11(1):12.
- [28] HUANG M, LIANG C, TAN C, et al. Liposome co-encapsulation as a strategy for the delivery of curcumin and resveratrol[J]. *Food Function*, 2019,10(10):6447 – 6458.
- [29] ZIELEN S, TRISCHLER J, SCHUBERT R. Lipopolysaccharide challenge: immunological effects and safety in humans[J]. *Expert Review of Clinical Immunology*, 2015,11(3):409 – 418.
- [30] DAI X J, LI N, YU L, et al. Activation of BV2 microglia by lipopolysaccharide triggers an inflammatory reaction in PC12 cell apoptosis through a toll-like receptor 4-dependent pathway[J]. *Cell Stress Chaperones*, 2015,20(2):321 – 331.
- [31] GALLEY H F. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in sepsis[J]. *British Journal of Anaesthesia*, 2011,107(1):57 – 64.
- [32] RAHMAN I. Dietary polyphenols mediated regulation of oxidative stress and chromatin remodeling in inflammation[J]. *Nutrition Reviews*, 2008,66:s42 – s45.

Construction of Co-Delivered Curcumin and EGCG Liposomes and Their Effects on Neuroinflammation

MA Dexue, YAN Xiaojia, LIU Fuguo*, LIU Xuebo*

(College of Food Science and Engineering, Northwest A&F University, Yangling 712100, China)

Abstract: To overcome the limitations of two bioactive components, curcumin and epigallocatechin gallate (EGCG), in terms of stability and metabolic kinetics, and to further exploit their synergistic antioxidant and anti-inflammatory effects, liposomes co-delivering curcumin and EGCG were constructed by thin-film sonication. The effects of phospholipid to cholesterol ratio, phospholipid to Tween 80 ratio, hydration time and sonication time on the liposomes were analysed using particle size, PDI and potential as evaluation indexes, and the liposomes were modified with lactoferrin and hyaluronic acid by electrostatic adsorption. A BV2 microglia inflammation model was constructed using lipopolysaccharide (LPS) to explore the interventional effects of liposomes modified with lactoferrin and hyaluronic acid for co-delivering of curcumin and EGCG on neuroinflammation. The results showed that liposomes co-delivering curcumin and EGCG in a uniform spherical shape with an average particle size of (131.53 ± 0.258) nm were successfully prepared at phospholipid to cholesterol ratio of 10:1, phospholipid to Tween 80 ratio of 10:3, hydration time of 40 min, and ultrasound time of 15 min. The liposomes were modified at a volume of 0.3 mL of lactoferrin and 0.5 mL of hyaluronic acid. The experimental results showed that the liposomes modified with lactoferrin and hyaluronic acid for co-delivery of curcumin and EGCG significantly improved the stability and antioxidant properties of curcumin and EGCG, inhibited LPS-induced alterations in cellular morphology, restored mitochondrial dysfunction, reduced intracellular reactive oxygen species production, and ameliorated the inflammatory effects of LPS-induced BV2 microglia. The results aimed to provide new ideas for further development of functional foods with neuroprotective effects.

Keywords: curcumin; EGCG; liposome; lactoferrin; neuroinflammation