

岩藻多糖纳米硒的制备及其抑制肿瘤细胞增殖的研究

陈博文¹, 陈建平^{1,2*}, 黄文浩¹,
钟赛意^{1,2}, 李瑞^{1,2}, 宋兵兵^{1,2}, 刘晓菲^{1,2}, 汪卓^{1,2}

¹广东海洋大学食品科技学院 广东省水产品加工与安全重点实验室, 湛江 524088;

²大连工业大学海洋食品精深加工关键技术省部共建协同创新中心, 大连 116034

摘要:探索岩藻多糖纳米硒 (fucoidan-selenium nanoparticles, FD-SeNPs) 的制备工艺条件, 并进一步对其进行结构表征和抑制肿瘤细胞增殖的研究。以岩藻多糖 (fucoidan, FD) 为模板, 采用抗坏血酸 (ascorbic acid, Vc) 还原亚硒酸钠 (Na_2SeO_3) 制备 FD-SeNPs, 通过单因素和响应面实验优化其工艺参数。采用傅里叶变换红外光谱仪 (FT-IR)、扫描电子显微镜 (SEM)、能量色散 X 射线谱仪 (EDX)、透射电子显微镜 (TEM) 和 X 射线衍射仪 (XRD) 对其进行结构表征; 运用 MTT 法测定其对 HepG2 肝癌细胞和 A549 肺癌细胞存活率的影响。结果表明, FD-SeNPs 的最佳制备工艺参数为: 反应时间为 1 h、反应温度为 35 °C、抗坏血酸与亚硒酸钠的摩尔比为 14:1、FD 浓度为 0.8 mg/mL, 在此条件下制备得到的 FD-SeNPs 粒径为 (83.40 ± 0.55) nm、电位为 (-31.89 ± 0.47) mV、含硒量达 29.93%。经鉴定, FD-SeNPs 的表面形貌为均一的球形, 由 77.59% Se、17.70% C 和 3.41% O 元素组成。MTT 实验结果表明, FD-SeNPs 能显著抑制 HepG2 肝癌细胞和 A549 肺癌细胞的增殖, 具有良好的剂量效应。上述结果表明, 已成功制备 FD-SeNPs 并表现出一定的抑制肿瘤细胞增殖的能力, 为其在抗肿瘤临床药物的应用开发提供了一定的技术手段和理论数据参考。

关键词:岩藻多糖; 纳米硒; 结构表征; 抑制肿瘤细胞增殖

中图分类号: R735.7

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2023)12-2117-10

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2023.12.011

Preparation of selenium nanoparticles decorated by fucoidan and its inhibition effect on tumor cells growth

CHEN Bo-wen¹, CHEN Jian-ping^{1,2*}, HUANG Wen-hao¹,
ZHONG Sai-yi^{1,2}, LI Rui^{1,2}, SONG Bing-bing^{1,2}, LIU Xiao-fei^{1,2}, WANG Zhuo^{1,2}

¹College of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University, Guangdong Provincial Key Laboratory of Aquatic Product Processing and Safety, Zhanjiang 524088, China;

²Dalian Polytechnic University, Collaborative Innovation Center of Seafood Deep Processing, Dalian 116034, China

Abstract: This study was to explore the preparation technology conditions of fucoidan-selenium nanoparticles (FD-SeNPs), and to further characterize their structure and investigate their inhibition effects on tumor cells growth. Using fucoidan (FD) as a template, ascorbic acid (Vc) was used to reduce sodium selenite (Na_2SeO_3) to prepare FD-SeNPs, and the process parameters were optimized by single factor design and response surface experiments. Fourier transform infrared spectrometer (FT-IR), scanning electron microscope (SEM), energy dispersive X-ray spectroscopy (EDX), transmission electron microscope (TEM) and X-ray diffraction (XRD) were used to characterize its structure. The MTT method was used to determine its effect on the survival rates of HepG2 hepatoma cells and A549 lung cancer cells. The results showed that the optimal conditions of FD-SeNPs were list as follows: the reaction time of 1 h, the reaction temperature of 35 °C, molar ratio of Vc to Na_2SeO_3 of 14:1, and FD concentration of 0.8 mg/mL. Under these conditions, the FD-SeNPs with particle size of $(83.4 \pm$

收稿日期: 2023-05-15 接受日期: 2023-09-26

基金项目: 广东省自然科学基金面上项目 (2021A1515012455); 湛江市科技计划 (2022A01045); 广东海洋大学“南海学者计划” (002029002009); 广东省普通高校创新团队项目 (2021KCXTD021)

* 通信作者 E-mail: cjp516555989@126.com

0.55) nm, Zeta potential of (-31.89 ± 0.47) mV and selenium content of 29.93 % was obtained. After identification, its surface morphology was uniform spherical, which was composed of 77.59% Se, 17.70% C and 3.41% O elements. The results of MTT assay showed that FD-SeNPs could significantly inhibited the proliferation of HepG2 cells and A549 lung cancer cells, and had a good dose effect. The above results showed that the FD-SeNPs had been successfully prepared and exhibited certain inhibitory effects on tumor cells growth, which provided a certain technical means and theoretical data reference for the application and development of anti-tumor clinical drugs.

Key words: fucoidan; selenium nanoparticles; structural identification; inhibition effect on tumor cells growth

目前,除心血管疾病外,癌症已成为第二大人类死亡的诱因,由于其治疗难度大、周期长和治疗费用高,为人民的生活带来沉重的负担^[1]。化疗是现代西方医学治疗癌症的主要方法之一,但由于化疗药物往往存在严重的副作用和耐药性等原因,导致治疗效果不理想。因此,研发一种广谱的具有高效无毒副作用的抗肿瘤药物仍是目前亟待解决的问题。

硒(selenium, Se)是一种人体必需的微量元素,在合成谷胱甘肽过氧化物酶、硫氧还蛋白还原酶等过程中扮演着重要角色,参与人体的多种生命活动,对人体健康具有重要意义^[2]。同时,硒还具有抗氧化、抗肿瘤等多种功能活性^[3]。研究发现,肿瘤患者体内硒含量缺乏,摄入足够的Se能够保护正常细胞,减少癌症的发生^[4]。然而,Se在生物体内能够使用的安全剂量范围很窄,很容易因使用过量而造成中毒,因此,探究与研发安全的Se形态,降低Se的毒性至关重要^[5]。研究发现,与传统的Se形式相比,纳米硒(selenium nanoparticles, SeNPs)由于其独特的尺寸效应和表面效应具有更低的毒性和较好的生物利用度^[6]。然而,SeNPs因其表面缺少邻近配位的原子导致活性较高,在常温下极不稳定,易聚集形成毒性更大的单质Se^[7,8]。因此,在制备SeNPs的过程中一般会使用分散剂来增加SeNPs的分散性。多糖类分子结构中具有羟基,能通过分子间氢键与Se结合,防止SeNPs聚集,因此多糖常被用于分散SeNPs^[9]。目前,已经报道的用于纳米硒修饰剂的多糖包括黄芪多糖、魔芋葡聚糖等^[10,11]。

岩藻多糖(fucoidan, FD)是来源于褐藻的天然水溶性多糖,由硫酸化的岩藻糖、甘露糖、阿拉伯糖、葡萄糖醛酸等单糖组成^[12]。研究人员发现,岩藻多糖具有抗肿瘤、抗氧化、抗炎等多种功能活性^[13]。然而,目前还未见岩藻多糖修饰纳米硒的相关报道。因此,本文以FD作为稳定剂,通过氧化还原反应制备岩藻多糖纳米硒(fucoidan-selenium nanoparticles, FD-SeNPs),利用单因素和响应面实验优化其制备工艺参数,并进一步对其进行结构鉴定和抑制肿瘤

细胞增殖的研究,为FD-SeNPs作为肿瘤细胞抑制剂的开发应用提供理论数据支持。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

岩藻多糖(来源于墨角藻,批号:F8190,纯度为95%)和亚硒酸钠(批号:S5261,纯度 $\geq 98\%$)购于Sigma公司;抗坏血酸(批号:S13001,纯度为99%)购于上海源叶生物技术有限公司;胎牛血清(批号:10270-106)、Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)高糖培养基(批号:8123270)、0.25%胰蛋白酶溶液(批号:25200072)和双抗溶液(批号:15140122)购于美国Gibco公司;二甲基亚砜(Dimethyl sulfoxide, DMSO), (批号:R012316,纯度99.17%,上海易恩化学技术有限公司);HepG2人肝癌细胞、A549人肺癌细胞(美国ATCC细胞库);LO2人正常肝细胞(中国科学院(上海)细胞库)。

1.2 仪器与设备

Zetasizer Nano ZSE 马尔文纳米粒度电位仪(上海马尔文帕纳科公司);Varioskan Flash全自动酶标仪、Talos F200X G2透射电子显微镜(美国Thermo Scientific公司);Bruker Tensor-2傅里叶变换红外光谱仪(德国Bruker公司);FD8508真空冷冻干燥机(韩国ILSHIN公司);N-4000旋转蒸发仪(日本Tokyo Rikakikai公司);Agilent 7500CX电感耦合等离子体质谱仪(美国Agilent公司);蔡司Sigma 300扫描电子显微镜、Smartedx能量色散X射线能谱仪(德国Zeiss公司);Rigaku SmartLab 9 kW X射线衍射仪(日本Rigaku理学公司)。

1.3 方法

1.3.1 FD-SeNPs的制备

参考Zhang等^[5]的方法制备FD-SeNPs。具体制备过程如下:将一定量的FD溶于蒸馏水中得到不同浓度的FD溶液。将Vc溶液与 Na_2SeO_3 溶液加入FD溶液中, Na_2SeO_3 溶液、Vc溶液和FD溶液的体积比为4:4:1,在不同温度下搅拌不同时间后,将反应液经透析袋(截留分子量为8 000~14 000)

透析 48 h。通过粒径分析,确定了 FD-SeNPs 的最佳制备工艺,最终的溶液经旋蒸后冻干,得到 FD-SeNPs。

1.3.2 单因素实验

在 FD 浓度为 0.6 mg/mL、反应温度为 45 ℃ 和 Vc 与 Na₂SeO₃ 摩尔比为 8:1 的条件下,采用马尔文纳米粒度电位仪考察不同时间(1、2、3、4 和 5 h)对 FD-SeNPs 粒径的影响;在 FD 浓度为 0.6 mg/mL、反应时间为 2 h 和 Vc 与 Na₂SeO₃ 摩尔比为 8:1 的条件下,采用马尔文纳米粒度电位仪考察不同温度(25、35、45、55 和 65 ℃)对 FD-SeNPs 粒径的影响;在 FD 浓度为 0.6 mg/mL、反应温度为 45 ℃ 和反应时间为

2 h 的条件下,采用马尔文纳米粒度电位仪考察不同 Vc 与 Na₂SeO₃ 摩尔比(Vc: Na₂SeO₃ = 2:1、4:1、8:1、16:1、32:1)对 FD-SeNPs 粒径的影响;在反应温度为 45 ℃、反应时间为 2 h 和 Vc 与 Na₂SeO₃ 摩尔比为 16:1 的条件下,采用马尔文纳米粒度电位仪考察不同浓度(0.2、0.4、0.6、0.8 和 1.0 mg/mL)的 FD 对 FD-SeNPs 粒径的影响。

1.3.3 响应面实验

在单因素的基础上,以岩藻多糖浓度、摩尔比、反应时间和反应温度为因素,FD-SeNPs 的粒径为评价指标,设计四因素三水平的响应面实验,响应面实验因素水平见表 1。

表 1 响应面实验因素水平

Table 1 Factors and levels of response surface test

水平 Level	因素 Factor			
	A 岩藻多糖浓度 FD dosage (mg/mL)	B 反应温度 Reaction temperature (°C)	C 反应时间 Reaction time (h)	D 摩尔比 Molar ratio
-1	0.4	35	1	8:1
0	0.6	45	2	16:1
1	0.8	55	3	24:1

1.3.4 FD-SeNPs 的结构鉴定

1.3.4.1 硒含量的测定

参照 Chen 等^[14]的方法进行测定。具体过程如下:冻干的样品在双氧水和硝酸的作用下进行微波消解,然后采用电感耦合等离子体质谱仪测定样品中的硒含量,具体参数如下:入射功率为 1 550 W,等离子体气体流量为 15 L/min,氦流量为 4.0 mL/min,雾化室温度为 2 ℃。

1.3.4.2 粒径及电位的测定

采用马尔文纳米粒度电位仪对样品的粒径及电位进行检测。具体过程如下:取适量透析后的反应液置于样品池中,在检测温度为 25 ℃,平衡时间为 120 s 的条件下进行检测。

1.3.4.3 扫描电子显微镜及能量色散 X 射线谱仪测定

取少量样品置于导电胶上固定,经喷金处理后,在扫描电子显微镜中进行不同放大倍数观察,并使用 Smartedx 能量色散 X 射线谱仪对样品的表面元素进行分析。

1.3.4.4 透射电子显微镜测定

采用透射电子显微镜观察样品的形态大小。将样品溶液滴入铜膜网格上,用去离子水洗涤,待干燥

后,观察其形态。

1.3.4.5 傅里叶变换红外光谱仪测定

将溴化钾置于红外灯下干燥 4 h,然后将溴化钾与样品以 100:1 的比例进行研磨,混合均匀后,在油压机上进行压片,在 4 000 ~ 400 cm⁻¹ 的波数下对样品进行扫描。

1.3.4.6 X 射线衍射仪测定

取适量样品装进样品池,采用铜靶作为测试靶材,设定 X 射线衍射仪的波长为 0.154 nm,电压 40 kV,电流 40 mA,扫描范围为 5° ~ 90°,扫描速度为 5°/min 对样品进行测量。

1.3.5 FD-SeNPs 抑制肿瘤细胞增殖的活性测定

1.3.5.1 细胞培养

将复苏后的 A549 细胞、HepG2 细胞和 LO2 细胞置于含 10% 胎牛血清和 1% 双抗溶液的 DMEM 高糖完全培养基中,然后放置在 5% CO₂、37 ℃ 的培养箱中培养,经换液、传代稳定后,取对数生长期细胞用于 MTT 实验。

1.3.5.2 FD-SeNPs 对 HepG2 细胞和 A549 细胞存活率的影响

将细胞密度为 4 × 10⁴ 个/mL 的细胞悬液接种于 96 孔板,每孔 100 μL,并将其放入 37 ℃、浓度

5%的CO₂培养箱中培养24 h。实验组中往96孔板加入不同浓度(250、500 μg/mL)的SeNPs、FD和FD-SeNPs溶液,每孔100 μL。而空白组和对照组中每孔分别加入100 μL高糖DMEM培养基和100 μL的细胞悬液。经不同方式处理的细胞继续放入培养箱中培养48 h后,加入20 μL MTT(5 mg/mL)避光孵育4 h,去除上清液,加入150 μL DMSO,震荡10 min后,在570 nm处用酶标仪测样品的OD值。设阴性对照组的OD值为100%,计算公式如下:

细胞存活率 =

$$\frac{(OD_{\text{处理组}} - OD_{\text{空白组}})}{(OD_{\text{对照组}} - OD_{\text{空白组}})} \times 100\%$$

1.3.6 数据统计分析

实验数据以样本均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s, n = 3$)表示。采用IBM SPSS Statistics 26进行统计学分析,组间数据采用单因素ANOVA显著性分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 制备FD-SeNPs的单因素实验

固定FD浓度为0.6 mg/mL,反应温度为45 °C,Vc与Na₂SeO₃摩尔比为8:1,考察反应时间对FD-SeNPs粒径的影响,实验结果如图1A所示。由图1A可知,当反应时间为2 h时,FD-SeNPs的粒径最小。进一步延长反应时间,FD-SeNPs粒径反而增大,这可能是由于SeNPs的聚集导致粒径增大,故选择2 h作为最佳的反应时间。固定FD浓度为0.6 mg/mL,反应时间为2 h,Vc与Na₂SeO₃摩尔比为8:1,考察反应温度对FD-SeNPs粒径的影响,实验结果

如图1B所示。由图1B可知,当反应温度从25 °C升高到45 °C时,FD-SeNPs粒径呈逐渐下降的趋势,随后,进一步提高温度到55 °C和65 °C时,其粒径呈上升趋势,这可能是温度过高导致体系中粒子运动加快,使产物更易聚集和沉淀,从而使粒径变大,该结果与Song等^[15]的研究结果一致。因此,选择45 °C作为最佳反应温度。固定FD浓度为0.6 mg/mL,反应温度为45 °C,反应时间为2 h,考察Vc与Na₂SeO₃的摩尔比对FD-SeNPs粒径的影响,实验结果如图1C所示。由图1C可知,当摩尔比从2:1增加到16:1时,FD-SeNPs的粒径呈逐渐下降趋势,这可能是一定范围内过量Vc可以增加反应的接触面积,加快反应速度,从而形成较小尺寸的纳米颗粒^[16]。然而,当进一步增加摩尔比,其粒径显著增大,这可能是过量的Vc附着在SeNPs表面,导致SeNPs互相集聚,从而使粒径增大,故选择16:1作为最佳反应摩尔比。固定反应温度为45 °C,反应时间为2 h,摩尔比为16:1,考察FD浓度对FD-SeNPs粒径的影响,实验结果如图1D所示,当FD浓度从0.2 mg/mL增加至0.6 mg/mL时,FD-SeNPs的粒径呈逐渐下降趋势,但当FD浓度大于0.6 mg/mL时,体系中的纳米硒的粒径会显著增大,这可能是过量的FD集聚在纳米硒表面,导致其颗粒尺寸变大^[17]。因此,选择0.6 mg/mL的FD作为最佳制备浓度。根据上述单因素实验得到最佳的制备工艺参数为反应时间为2 h、反应温度为45 °C、反应摩尔比为16:1和FD浓度为0.6 mg/mL。

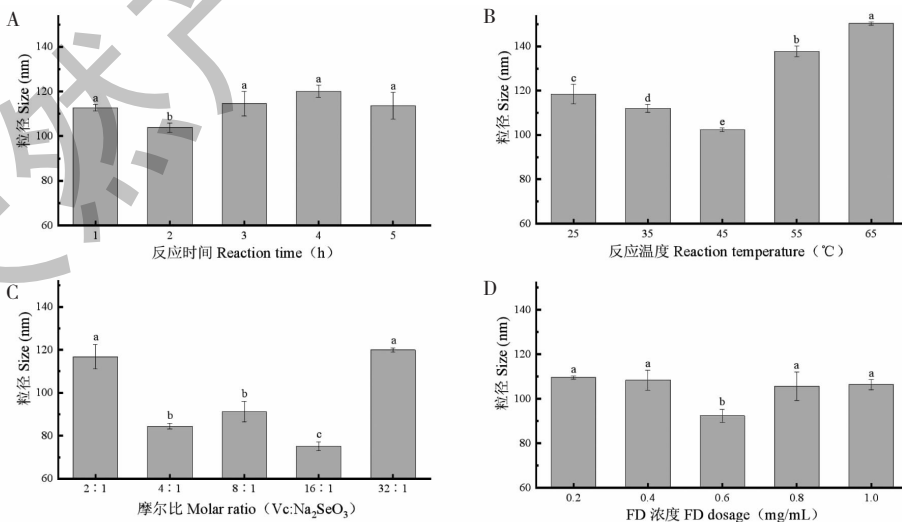


图1 不同反应条件对FD-SeNPs粒径的影响

Fig. 1 Effect of different reaction conditions on particle size of FD-SeNPs

注:不同字母代表差异显著($P < 0.05$)。Note: Different letters represent significant differences ($P < 0.05$).

2.2 制备 FD-SeNPs 的响应面实验

2.2.1 响应面实验方差分析

根据表 1 开展实验,得到响应面结果如表 2 所示。利用 Design Expert 13 软件对表 2 结果进行回归分析,建立了 FD-SeNPs 粒径(Y)与岩藻多糖浓度(A)、反应温度(B)、反应时间(C)、摩尔比(D)与的二次回归方程: $Y = 93.65 + 0.085A + 6.50B + 6.86C$

$+ 3.94D - 1.75AB + 6.73AC - 3.50AD - 4.92BC + 0.095BD - 4.71CD - 0.4452A^2 + 0.7048B^2 + 7.59C^2 + 8.54D^2$ 。方差分析结果显示,实验模型显著,失拟项不显著,因素 B 、 C 、 D 的 $P < 0.01$,表明反应温度、反应时间、摩尔比对粒径的影响较显著,各因素对粒径的影响顺序为反应温度、反应时间 > 摩尔比 > FD 浓度。

表 2 回归模型方差分析
Table 2 Analysis of variance of regression model

方差来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 df	均方 Mean square	F 值 F -value	P 值 P -value	显著性 Significance
模型 Model	2 476.29	14	176.88	13.83	<0.000 1	**
A	0.086 7	1	0.086 7	0.006 8	0.935 5	-
B	507.26	1	507.26	39.67	<0.000 1	**
C	564.03	1	564.03	44.11	<0.000 1	**
D	186.52	1	186.52	14.59	0.001 9	**
AB	12.22	1	12.22	0.955 3	0.345 0	-
AC	181.04	1	181.04	14.16	0.002 1	**
AD	49.00	1	49.00	3.83	0.070 5	-
BC	96.92	1	96.92	7.58	0.015 5	*
BD	0.036 1	1	0.036 1	0.002 8	0.958 4	-
CD	88.64	1	88.64	6.93	0.019 7	*
A^2	1.29	1	1.29	0.100 5	0.755 9	-
B^2	3.22	1	3.22	0.252 0	0.623 5	-
C^2	373.29	1	373.29	29.19	<0.000 1	**
D^2	473.47	1	473.47	37.03	<0.000 1	**
残差 Residual	179.02	14	12.79	-	-	-
失拟项 Lack of fit	166.00	10	16.60	5.10	0.065 2	-
纯误差 Pure error	13.02	4	3.26	-	-	-
总回归 Cor total	2 655.31	28	-	-	-	-

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

2.2.2 各因素响应面图分析

各因素交互作用结果如图 2 所示,反应时间与 FD 浓度对粒径交互影响中,在浓度一定时,响应面图中的粒径随着时间的增大而先减小后增大,当反应时间一定时,粒径随着 FD 浓度的增大而减小;在反应温度或时间一定的条件下,粒径随着另一个因素的增大而增大;在反应时间与摩尔比对粒径的交互影响中,在反应时间一定的条件下,粒径随着摩尔比的增大先减小后增大,当摩尔比一定时,粒径随着时间的增大而增大。各因素间的等高线图趋向椭

圆,表明因素间的交互影响较大。分析响应面实验结果可知,FD-SeNPs 的最佳工艺参数如下:反应温度为 35 °C、反应时间为 1 h、抗坏血酸与亚硒酸钠的摩尔比为 13.64:1、FD 浓度为 0.8 mg/mL,此时的粒径的理论值为 77.58 nm。

2.2.3 验证实验

为了实际实验的可操作性,设置反应温度为 35 °C、反应时间为 1 h、抗坏血酸与亚硒酸钠的摩尔比为 14:1、FD 浓度为 0.8 mg/mL,在此条件下进行三次平行实验,结果显示 FD-SeNPs 粒径为 $(83.40 \pm$

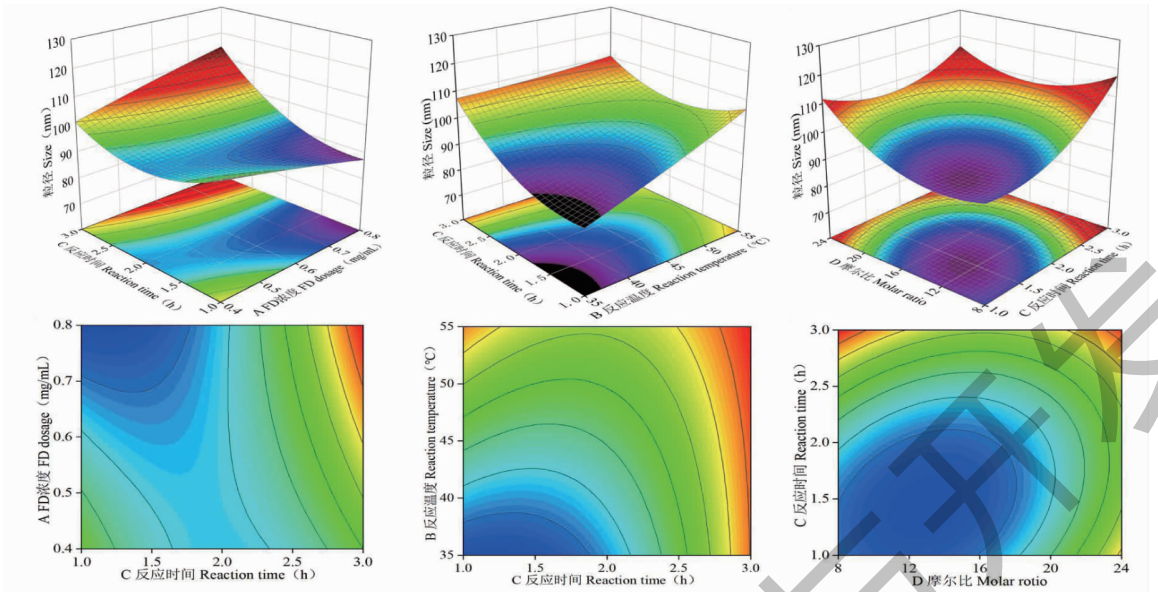


图2 不同因素间交互作用对 FD-SeNPs 粒径影响的响应面图与等高线图

Fig. 2 Response surface and contour diagrams of the effects of interactions between different factors on the particle size of FD-SeNPs

0.55) nm, 该值与理论预测值(77.58 nm)接近, 表明建立的该响应面模型能较好地优化各因素对其粒径的影响。在此条件下, 制备得到的 FD-SeNPs 电位为 (-31.89 ± 0.47) mV, 经 ICP-MS 检测硒含量为 29.93%, 该结果相比 Jiao 等^[10] 得到的黄芪多糖纳米硒复合物中的硒含量更高。

2.3 FD-SeNPs 的结构表征

2.3.1 FD-SeNPs 的粒径与电位分布

FD-SeNPs 和 SeNPs 的粒径与电位分布如图 3 所示。由图 3A 可知, SeNPs 的粒径分布出现在 68 ~ 142 nm 和 255 ~ 712 nm 范围内, 说明其粒径大小

分布较宽且不均一。而 FD-SeNPs 的粒径分布只在 44 ~ 190 nm 出现, 说明其粒径分布比较集中且大小比较均一。同时, SeNPs 的平均粒径为 848.90 nm, 经过 FD 修饰之后, SeNPs 的平均粒径从 848.90 nm 降低到 83.45 nm, 表明 FD 能够阻止 SeNPs 的聚集从而降低其粒径。而且, FD-SeNPs 的电位 (-32.80 mV) 绝对值大于 SeNPs 的电位 (-24.40 mV) 绝对值 (见图 3B), 表明 FD 修饰 SeNPs 后能显著提高 SeNPs 的稳定性。

2.3.2 SEM 分析 FD-SeNPs 的表面形貌

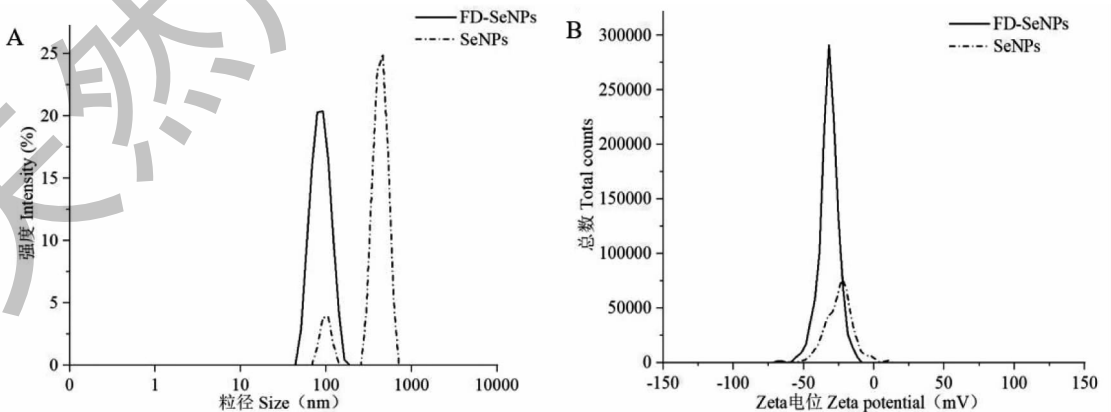


图3 FD-SeNPs 和 SeNPs 的粒径(A)与电位(B)分布图

Fig. 3 Particle size(A) and Zeta potential(B) distributions of FD-SeNPs and SeNPs

采用 SEM 对 FD-SeNPs 的表面形貌进行分析,

实验结果如图 4 所示。由图 4A 可知, SeNPs 呈现不

规则的棒状聚集体,表明 SeNPs 易聚集,分散性差,与 Mu^[8] 报道的结果相符。而 FD 呈现出表面疏松的片状结构(见图 4B),经 FD 修饰 SeNPs 之后呈现

出单个完整分散的球形纳米粒(见图 4C),表明 FD 能够有效阻止 SeNPs 聚集。

2.3.3 TEM 分析 FD-SeNPs 的微观形态

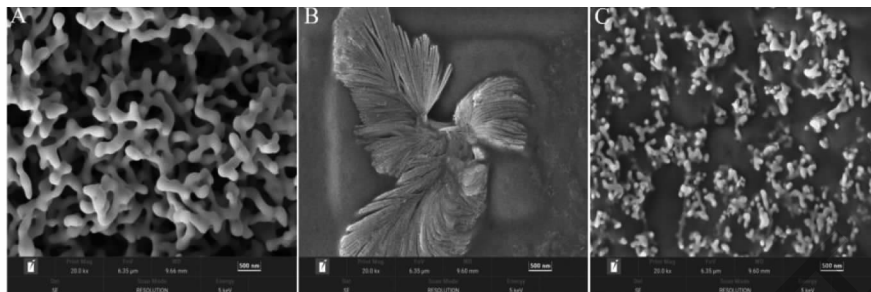


图 4 SeNPs(A)、FD(B) 和 FD-SeNPs(C) 的扫描电镜图

Fig. 4 SEM photographs of SeNPs(A), FD(B) and FD-SeNPs(C)

采用 TEM 对 FD-SeNPs 的微观形态进行分析,实验结果如图 5 所示。由图 5A 可知,SeNPs 呈现不规则的棒条状结构,且粒子之间相互黏连,这与 SEM 的实验结果(见图 4A)相一致。而 FD 呈现出

不规则的片状结构(见图 5B)。SeNPs 经 FD 修饰后呈现出分散性较好的均一球性颗粒(见图 5C),表明 FD 的加入能阻止 SeNPs 聚集并提高其分散性。

2.3.4 FD-SeNPs 的表面元素分析

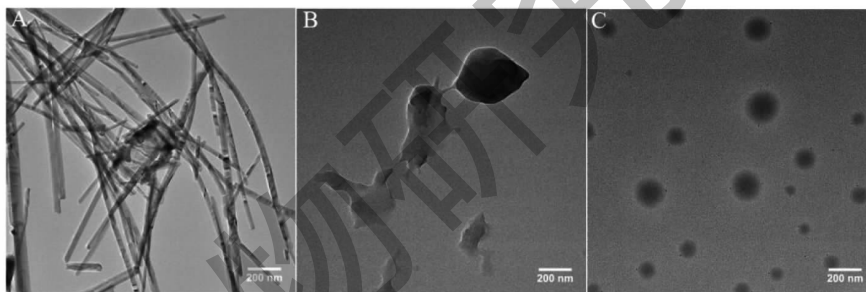


图 5 SeNPs(A)、FD(B) 和 FD-SeNPs(C) 的透射电镜图

Fig. 5 TEM photographs of SeNPs(A), FD(B) and FD-SeNPs(C)

对 FD-SeNPs 的表面元素进行分析,实验结果如图 6 所示。由图 6A 可知,SeNPs 中 C、O 和 Se 百分比分别为 8.52%、0.43% 和 90.99%。FD-SeNPs 中

C、O 和 Se 元素百分比分别为 17.70%、3.41% 和 77.59% (见图 6B),表明添加 FD 修饰 SeNPs 之后升高了 C 和 O 元素的百分比,进一步证实了 FD 成

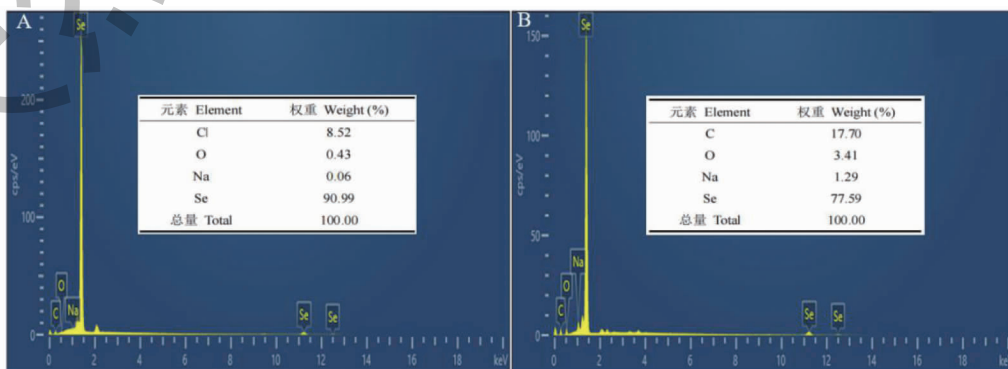


图 6 SeNPs(A) 和 FD-SeNPs(B) 的元素分析

Fig. 6 EDX spectra of SeNPs(A) and FD-SeNPs(B)

功地结合在 SeNPs 的表面上^[18]。

2.3.5 FT-IR 分析 FD 与 SeNPs 的结合形式

由图 7 可知,FD 在 3450 cm^{-1} 处出现了羟基 O-H 的伸缩振动峰,在 1637 和 1394 cm^{-1} 附近出现了羰基 C=O 和羧基 COO-的伸缩振动峰,表明 FD 存在糖醛酸^[14,19]。在 1254 、 842 和 581 cm^{-1} 附近分别出现了 S=O 的伸缩振动峰、C-4 轴向位置硫酸盐引起的特征吸收峰和 O=S=O 的弯曲振动峰,表明 FD 含有硫酸基团^[20-22]。FD-SeNPs 在 3418 、 1614 、 1393 、 1225 、 824 和 587 cm^{-1} 出现了与 FD 相似的吸收峰,表明 FD 与 SeNPs 之间没有形成新的共价键。然而,FD-SeNPs 中有部分峰出现了红移,O-H 的伸缩振动峰从 3450 cm^{-1} 移至 3418 cm^{-1} ,推测 FD 的 O-H 通过共轭效应与硒结合,稳定分散纳米硒。

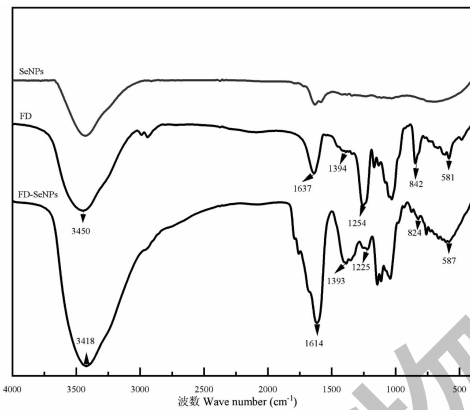


图 7 SeNPs、FD 和 FD-SeNPs 的傅里叶变换红外光谱图

Fig. 7 FT-IR diagrams of SeNPs, FD and FD-SeNPs

2.3.6 XRD 分析 FD-SeNPs 的晶型

X 射线衍射峰的强度和锐度可在一定程度上反映样品的结晶性质,因此在红外光谱的基础上,进一步采用 XRD 表征 FD-SeNPs 的形成,实验结果由图

8 所示。由图 8 可知,SeNPs 的 X 射线衍射图在 $20\sim 40^\circ$ 和 $40\sim 60^\circ$ 的范围内出现两个峰形较宽的衍射峰,表明 SeNPs 以无定形的形式存在,这结果与 Chen 等^[14]的研究结果一致。同时,FD 在 $15\sim 30^\circ$ 范围内出现一个宽的衍射峰,表明 FD 也是无定形结构,这与其他植物多糖的研究结果一致^[23]。而 FD-SeNPs 的峰形与 FD 类似,说明 FD-SeNPs 也主要以无定形的形式存在,但是相比 FD 和 SeNPs,其衍射峰的位置和强度都发生了变化,这表明 FD 与 SeNPs 结合后形成了 FD-SeNPs。

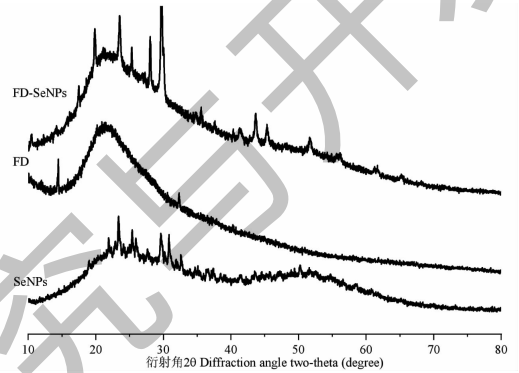


图 8 FD-SeNPs、SeNPs、FD 的 X 射线衍射图

Fig. 8 X-ray diffraction patterns of FD-SeNPs, SeNPs and FD

2.4 FD-SeNPs 的体外抗肿瘤活性测定

采用 MTT 法考察不同浓度的 FD、SeNPs 和 FD-SeNPs 对 HepG2 细胞和 A549 细胞存活率的影响,以 LO2 正常肝细胞做对照,实验结果如图 9 所示。由图 9A 和 9B 可知,在 $250\sim 500\text{ }\mu\text{g/mL}$ 范围内,SeNPs 抑制 A549 细胞和 HepG2 细胞增殖的效果不佳。然而,FD-SeNPs 能够显著抑制 A549 细胞和 HepG2 细胞的增殖。当 FD-SeNPs 浓度为 $500\text{ }\mu\text{g/mL}$ 时,A549 细胞和 HepG2 细胞的存活率分别从对

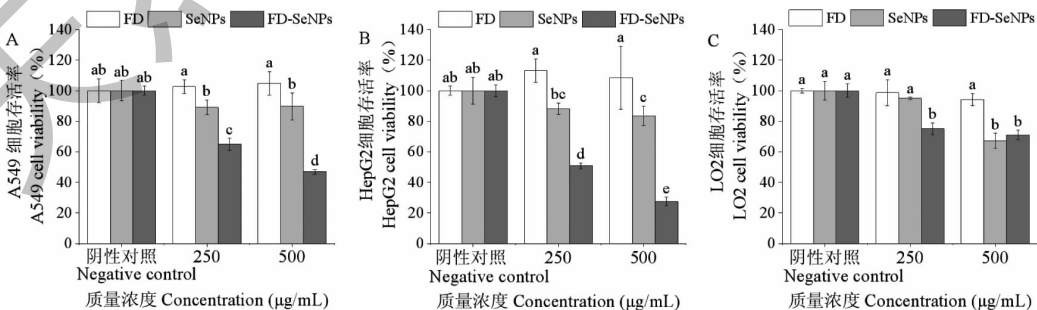


图 9 不同浓度 FD、SeNPs 和 FD-SeNPs 对不同细胞存活率的影响

Fig. 9 Effects of different concentrations of FD, SeNPs and FD-SeNPs on the cell viability of different cells

注:不同字母代表差异显著($P < 0.05$) Note: Different letters represent significant differences ($P < 0.05$)

照组的 100% 降低为 $(46.91 \pm 1.41)\%$ 和 $(27.53 \pm 2.77)\%$ 。上述结果表明,FD 修饰 SeNPs 之后能够显著提高 SeNPs 的抗肿瘤活性。同时,FD-SeNPs 对 LO2 正常肝细胞的存活率为 $(71.00 \pm 3.16)\%$, 显著高于肿瘤细胞的存活率(见图 9C),说明 FD-SeNPs 具有较好的细胞选择性。

3 讨论与结论

本文通过单因素和响应面优化实验得到了 FD-SeNPs 的最佳制备工艺参数为反应温度为 35 °C、反应时间为 1 h、抗坏血酸与亚硒酸钠的摩尔比为 14:1、FD 浓度为 0.8 mg/mL,在此条件下,测得其粒径最小为 (83.40 ± 0.55) nm,电位为 (-31.89 ± 0.47) mV,硒含量达 29.93%。进一步对其结构进行鉴定发现,FD 通过羟基吸附在 SeNPs 表面形成均一球形的纳米粒子,说明多糖的极性基团可以有效的抑制 SeNPs 的聚集^[17,24]。

目前研究发现的抗肿瘤机理主要包括抑制肿瘤细胞生长、抑制肿瘤细胞转移或侵袭、增强机体的免疫调节能力等途径实现抗肿瘤作用^[25,26]。研究表明,以多糖为模板的 SeNPs 能够促进相关凋亡蛋白和自噬标志性蛋白的表达,从而诱导肿瘤细胞凋亡和自噬^[27]。本研究的体外抗肿瘤实验发现,FD 修饰 SeNPs 能显著提高 SeNPs 抑制肿瘤细胞增殖的能力,且具有较好的细胞选择性,但其具体作用机理有待深入研究。

参考文献

- 1 Yuan HY, Jiang YF, Tan HT, et al. Current status and time trends of cancer incidence and mortality worldwide[J]. *Cancer Res Prev Treat*(肿瘤防治研究),2021,48:642-646.
- 2 Irons R, Carlson BA, Hatfield DL, et al. Both selenoproteins and low molecular weight selenocompounds reduce colon cancer risk in mice with genetically impaired selenoprotein expression[J]. *J Nutr*,2006,136:1311-1317.
- 3 Song H, Hur I, Park HJ, et al. Selenium inhibits metastasis of murine melanoma cells through the induction of cell cycle arrest and cell death[J]. *Immune Netw*,2009,9:236-242.
- 4 Alkhubayri AA, Wahab R, Siddiqui MA, et al. Selenium nanoparticles induce cytotoxicity and apoptosis in human breast cancer (MCF-7) and liver (HepG2) cell lines[J]. *Nanosci Nanotechnol Lett*,2020,12:324-230.
- 5 Zhang X, Yan H, Ma L, et al. Preparation and characterization of selenium nanoparticles decorated by *Spirulina platensis* polysaccharide[J]. *J Food Biochem*,2020,44:e13363.
- 6 Yan JK, Qiu WY, Wang YY, et al. Fabrication and stabilization of biocompatible selenium nanoparticles by carboxylic curdlans with various molecular properties [J]. *Carbohydr Polym*,2018,179:19-27.
- 7 Liu XQ, Wei LF, Jia JL, et al. Research progress of constructing selenium nanoparticles by polysaccharide carriers and their application in anti-tumor [J]. *Sci Technol Food Ind*(食品工业科技),2022,43:454-460.
- 8 Mu JJ. Construction, characterization and anticancer properties of teapoly-saccharide-nano-selenium [D]. Guangzhou: South China Agricultural University(华南农业大学),2019.
- 9 Cao BL. Synthesis and biological activity of *grateloupia livida* polysaccharides-functionalized selenium nanoparticles [D]. Guangzhou: Guangdong Pharmaceutical University(广东药科大学),2021.
- 10 Jiao J, Yu J, Ji H, et al. Synthesis of macromolecular *Astragalus* polysaccharide-nano selenium complex and the inhibitory effects on HepG2 cells [J]. *Int J Biol Macromol*,2022,211:481-489.
- 11 Song J, Zhou J, Li X, et al. Nano-selenium stabilized by konjac glucomannan and its biological activity *in vitro* [J]. *LWT-Food Sci Technol*,2022,161:113289.
- 12 Qin YM, Ren DD, Jiang JJ, et al. Functional properties of fucoidan and its application in foods [J]. *J Food Sci Technol*(食品科学技术学报),2021,39:26-31.
- 13 Alwarsamy M, Gooneratne R, Ravichandran R, et al. Effect of fucoidan from *Turbinaria conoides* on human lung adenocarcinoma epithelial (A549) cells [J]. *Carbohydr Polym*,2016,152:207-213.
- 14 Chen JP, Chen XH, Li JR, et al. Preparation and characterization of nano-selenium decorated by chondroitin sulfate derived from shark cartilage and investigation on its antioxidant activity [J]. *Mar Drugs*,2022,20:172.
- 15 Song X, Chen Y, Sun H, et al. Physicochemical stability and functional properties of selenium nanoparticles stabilized by chitosan, carrageenan, and gum arabic [J]. *Carbohydr Polym*,2021,255:117379.
- 16 Ye XG. Construction, characterization and application of tea nano-selenium stabilized by tea nano-aggregates [D]. Guangzhou: South China Agricultural University(华南农业大学),2018.
- 17 Ye XG, Chen ZZ, Zhang YY, et al. Construction, characterization, and bioactive evaluation of nano-selenium stabilized by green tea nano-aggregates [J]. *LWT-Food Sci Technol*,2020,129:10945.
- 18 Wu H, Li X, Liu W, et al. Surface decoration of selenium nanoparticles by mushroom polysaccharides-protein comple-

- xes to achieve enhanced cellular uptake and antiproliferative activity[J]. J. Mater. Chem, 2012, 22: 9602-9610.
- 19 Hentati F, Delattre C, Ursu AV, et al. Structural characterization and antioxidant activity of water-soluble polysaccharides from the Tunisian brown seaweed *Cystoseira compressa* [J]. Carbohydr Polym, 2018, 198: 589-600.
- 20 Tai MR, Cai HY, Li R, et al. Physicochemical properties and immunomodulatory effects of fucoidan from different brown algae[J]. J Guangdong Ocean Univ (广东海洋大学学报), 2022, 42: 62-71.
- 21 Cui YX, Liu X, Li SF, et al. Extraction, characterization and biological activity of sulfated polysaccharides from seaweed *Dictyopteris divaricata* [J]. Int J Biol Macromol, 2018, 117: 256-263.
- 22 Sun YJ, Gong GP, Guo YM, et al. Purification, structural features and immunostimulatory activity of novel polysaccharides from *Caulerpa lentillifera* [J]. Int J Biol Macromol, 2018, 108: 314-323.
- 23 Gao X, Li XF, Mu JJ, et al. Preparation, physicochemical characterization, and anti-proliferation of selenium nanoparticles stabilized by *Polyporus umbellatus* polysaccharide [J]. Int J Biol Macromol, 2020, 152: 605-615.
- 24 Bai K, Hong B, Huang W, et al. Selenium-nanoparticles-loaded chitosan/chitooligosaccharide microparticles and their antioxidant potential; a chemical and *in vivo* investigation [J]. Pharmaceutics, 2020, 12: 43.
- 25 Shi AK, Chen Y. Research progress on anti-tumor metastasis-mechanism of natural polysaccharides [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2022, 34: 1802-1809.
- 26 Ren L, Zhang J, Zhang T. Immunomodulatory activities of polysaccharides from *Ganoderma* on immune effector cells [J]. Food Chem, 2021, 340: 127933.
- 27 Yang CC. Preparation of selenium nanoparticles decorated by *Astragalus* polysaccharins and its growth inhibition on human breast carcinoma cells [D]. Taiyuan: Shanxi Medical University (山西医科大学), 2020.

(上接第 2116 页)

- 22 Liu H, Yan Y, Zhang F, Wu Q. The immuno-enhancement effects of Tubiechong (*Eupolyphaga sinensis*) lyophilized powder in cyclophosphamide-induced immunosuppressed mice [J]. Immunol Invest, 2019, 48: 844-859.
- 23 Qi ZX, Li SQ, Yu T. *Eupolyphaga sinensis*-containing serum influences the adipogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells [J]. Chin J Tis Eng Res (中国组织工程研究), 2013, 17: 2597-2602.
- 24 Hwang SI, Yoon YJ, Sung SH, et al. Toxic animal-based medicinal materials can be effective in treating endometriosis: a scoping review [J]. Toxins, 2021, 13: 145.
- 25 Guo JL, Lin H, Wang JC, et al. Recent advances in bio-affinity chromatography for screening bioactive compounds from natural products [J]. J Pharmaceut Biomed, 2019, 165: 182-197.
- 26 Guangdong Food and Drug Administration. Standards for Chinese Materia Medica in Guangdong Province (Volume II) (广东省中药材标准(第二册)) [M]. Guangzhou: Guangdong Science & Technology Press, 2010: 203.
- 27 Chen WT, Liu MY, Li YX, et al. Improvement of thin-layer chromatography identification method of *Opisthoptalia orientalis* Burm. [J]. Lishizhen Med Materia Medica Res (时珍国医国药), 2020, 31: 872-874.