

## 山慈菇葡甘露聚糖硒纳米粒的制备、表征及抗肿瘤研究

张子琪<sup>1,2</sup>, 王向涛<sup>1,2\*</sup>

1. 黑龙江中医药大学 药学院, 黑龙江 哈尔滨 150000

2. 中国医学科学院 北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193

**摘要:** **目的** 制备山慈菇葡甘露聚糖(PBP)的硒纳米粒, 初步评价其体内外抗肿瘤活性。**方法** 以原位生成的硒作为交联剂, 制备山慈菇葡甘露聚糖的纳米粒(PBP-SeNPs), 使用单因素实验和 Box-Behnken 响应面法优化 PBP-SeNPs 的处方及制备工艺, 通过动态光散射法测定其平均粒径、多分散性指数(PDI)、 $\zeta$  电位, 透射电子显微镜(TEM)观察其外观形态, 同时考察纳米粒在生理介质及室温放置下的粒径变化。采用 MTT 法评估 PBP-SeNPs 对 4T1 细胞的体外毒性, 并通过 4T1 荷瘤小鼠模型研究其体内抗肿瘤效果。**结果** 最优处方及制备工艺为 PBP、亚硒酸钠( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ )、抗坏血酸以质量比为 9.79 : 1 : 3 投料, PBP 的质量浓度为  $5.4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 反应温度为  $24^\circ\text{C}$ , 反应时间为 2.7 h 时, PBP-SeNPs 的粒径为  $(126.400 \pm 6.402) \text{ nm}$ , PDI 为  $0.197 \pm 0.021$ ,  $\zeta$  电位为  $(-8.17 \pm 0.35) \text{ mV}$ , 含硒量 1.2%, 载药量为 55.0%; TEM 观察 PBP-SeNPs 呈均一的球形, PBP-SeNPs 在 0.9% 氯化钠溶液、PBS、5% 葡萄糖溶液或小鼠血浆中孵育 12 h 粒径没有显著增加, 室温放置 15 d 仍稳定。体外细胞毒实验证实 PBP-SeNPs 能显著抑制 4T1 乳腺癌细胞的增殖, 对 4T1 细胞的生长抑制作用比同浓度 PBP 更强[半数抑制浓度( $\text{IC}_{50}$ ),  $62.64 \text{ vs } 189.10 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ]; 体内抗肿瘤实验中, PBP-SeNPs 对荷瘤小鼠的抑瘤率明显优于阳性药阿霉素注射液( $68.3\% \text{ vs } 33.6\%$ ,  $P < 0.05$ )和 PBP 溶液( $68.3\% \text{ vs } 49.7\%$ ,  $P < 0.05$ ), 且小鼠的体质量和脏器指数均未出现显著下降( $P > 0.05$ )。**结论** 成功制备稳定性良好的 PBP-SeNPs, 较 PBP 溶液显著提高体内外抗肿瘤活性。

**关键词:** 山慈菇; 葡甘露聚糖; 纳米粒; 抗肿瘤; 增效

**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674 - 6376(2025)05 - 1211 - 13

**DOI:** 10.7501/j.issn.1674-6376.2025.05.013

## Preparation, characterization, and anti-tumor study of *Pleione bulbocodioides* glucomannan-selenium nanoparticles

ZHANG Ziqi<sup>1,2</sup>, WANG Xiangtao<sup>1,2</sup>

1. College of Pharmacy, Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150000, China

2. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193, China

**Abstract: Objective** To prepare *Pleione bulbocodioides* glucomannan (PBP)-selenium nanoparticles and preliminarily evaluate their anti-tumor activity *in vitro* and *in vivo*. **Methods** PBP nanoparticles (PBP-SeNPs) were synthesized using in situ-generated selenium as a crosslinker. The formulation and preparation process were optimized through single-factor experiments and Box-Behnken response surface methodology. The optimized PBP-SeNPs were characterized by dynamic light scattering (DLS) for average particle size, polydispersity index (PDI), and  $\zeta$  potential, while their morphology was observed via transmission electron microscopy (TEM). Their particle size changes in physiological media and during the storage at room temperature were monitored for stability assessment. MTT assay was used to evaluate their *in vitro* cytotoxicity against 4T1 breast cancer cells, and the *in vivo* anti-tumor efficacy was investigated in 4T1 tumor-bearing mice. **Results** The optimal formulation was the feeding mass ratio of PBP-sodium selenite ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ )-ascorbic acid being 9.79 : 1 : 3 with the PBP concentration of  $5.4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , and the system was reacted at  $24^\circ\text{C}$  for 2.7 h. The resultant PBP-SeNPs showed a particle size of  $(126.400 \pm 6.402) \text{ nm}$ , a PDI of  $(0.197 \pm 0.021)$ , a  $\zeta$  potential of  $(-8.17 \pm 0.35) \text{ mV}$ , with a selenium content of 1.2% and a drug loading content of 55.0%. Transmission electron microscopy (TEM) showed that PBP-SeNPs were uniform

收稿日期: 2025-02-14

基金项目: 北京市自然科学基金非共识项目(F251029); 中国医学科学院医学与健康创新工程(2021-I2M-1-071)

作者简介: 张子琪, 女, 硕士研究生, 研究方向为中药新药开发。E-mail: zzq384567148@163.com

\*通信作者: 王向涛, 男, 研究员, 主要从事药物新剂型研究。E-mail: xtaowang@163.com

spherical. PBP-SeNPs were stable in normal saline, PBS, 5% glucose solution or plasma with no significant particle size enlargement within 12 h, and remained stable at room temperature for 15 days as well. In MTT assay, PBP-SeNPs demonstrated significantly stronger growth inhibition against 4T1 cells than free PBP ( $IC_{50}$ , 62.64 vs 189.10  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). In the *in vivo* study, PBP-SeNPs exhibited higher tumor inhibition rate over doxorubicin injections (68.3% vs 33.6%,  $P < 0.05$ ) and PBP solution (68.3% vs 49.7%,  $P < 0.05$ ), without inducing obvious body weight loss or organ index alterations ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** PBP-SeNPs with good stability were successfully prepared and significantly improved their anti-tumor activity *in vitro* and *in vivo* compared with PBP solution.

**Key words:** *Pleione bulbocodioides* (Franch.) Rolfe; glucomannan; nanoparticle; anti-tumor; improve treatment effect

山慈菇为传统常用中药,始载于《本草拾遗》,其味甘、微辛、性凉,具有清热解毒、化痰散结的功效,在肿瘤临床治疗领域应用广泛<sup>[1-2]</sup>。大量研究表明,山慈菇对肝癌<sup>[3]</sup>、甲状腺癌<sup>[4]</sup>、肠癌<sup>[5]</sup>、肺癌<sup>[6]</sup>等均显示出一定的治疗作用。在司函瑞等<sup>[1]</sup>收集的 455 张乳腺癌患者的处方中,山慈菇的使用频次高达 284 次,凸显其在乳腺癌治疗中的重要地位。其抗肿瘤作用机制主要涉及调控细胞的增殖与凋亡、干扰侵袭及迁移、抑制新血管生成等多靶点<sup>[7]</sup>。

多糖作为山慈菇主要的水溶性成分,已被证明具有抗肿瘤作用<sup>[8-9]</sup>。其中分离获得的葡甘露聚糖(相对分子质量为  $1.11 \times 10^5$ )兼具抗肿瘤、抗炎和抗糖尿病等多种生物活性<sup>[10]</sup>。近年来,葡甘露聚糖的抗肿瘤作用引起较多关注,如甘露糖的乙酰基在 C-2 和 C-3 位点的线性葡甘露聚糖(指定为 BOP)表现出潜在的抗肿瘤活性<sup>[11-13]</sup>。鉴于多糖口服生物利用度低,且很多多糖被发现是通过肠道菌群发挥作用<sup>[14]</sup>。虽已有 ip 葡甘露聚糖体内抗肿瘤作用的报道<sup>[9]</sup>,但 iv 的山慈菇葡甘露聚糖(PBP)抗肿瘤研究尚未见报道,纳米技术对山慈菇多糖抗肿瘤活性的增效作用亟待探索<sup>[15]</sup>。

在多糖纳米粒的制备方法中,硒纳米粒是较为成熟和通用的技术。现有多糖-硒纳米粒多以多糖为辅料合成纳米硒,用于有机硒补充<sup>[16]</sup>。和其他硒制剂相比,纳米硒<sup>[17]</sup>展现出更高的生物利用度、生物活性及更低的毒性<sup>[18-20]</sup>,而且常能提高多糖的抗肿瘤作用<sup>[21-23]</sup>。其合成方法涵盖物理制备法、生物合成法、化学还原法,需借助蛋白质<sup>[24]</sup>、多糖<sup>[25]</sup>、多酚等大分子作为稳定剂或分散剂,以提高纳米硒体系的稳定性。多糖分子丰富的羟基集团可通过氢键和硒结合,有效抑制硒的聚集<sup>[16]</sup>。然而,常规的多糖-硒纳米粒,因以硒补充为主要目的,硒用量较高,而硒摄入安全范围很窄,过量易引起中毒。

本研究创新性地以硒作为交联剂制备 PBP 的

纳米粒,在保证纳米粒稳定性的同时,着力降低硒用量。采用抗坏血酸还原亚硒酸钠( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ),在 PBP 溶液中原位交联制备山慈菇葡甘露聚糖-硒纳米粒(PBP-SeNPs)对其进行结构鉴定和表征,结合体内外肿瘤增殖抑制实验,验证纳米剂型对多糖抗肿瘤活性的提升作用,为 PBP-SeNPs 作为肿瘤抑制剂的开发应用提供参考。

## 1 材料

### 1.1 仪器

Zetasizer Nano-ZS 型纳米粒径电位分析仪,英国马尔文仪器有限公司;JEM-1400 80KV 型透射电子显微镜(TEM),日本电子株式会社;Alpha-4LD plus 型真空冷冻干燥机,德国 Christ 公司;Tecan infinite M200 Pro 型多功能酶标仪,瑞士 Tecan 公司;AL204 电子天平,上海梅特勒-托利仪器有限公司;DL-CJ-2ND 型超级洁净工作台,北京东联哈尔仪器制造有限公司;NexION 300D 电感耦合等离子体质谱仪,美国 Perkin Elmer 公司;Nicolet 6700 傅里叶变换红外光谱仪,美国 Nicolet 公司;Cary 紫外-可见(UV-Vis)分光光度计,美国 Agilent 公司。

### 1.2 试剂与药品

PBP(质量分数 $\geq 90\%$ ),中国医学科学院药物研究所李帅课题组提供; $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ (货号 2332679),西格玛上海贸易有限公司;抗坏血酸(货号 BC4635),北京索来宝科技有限公司;胎牛血清(货号 16000044)、0.25%胰酶(货号 25200056)、青霉素和链霉素混合物(货号 15140122),美国 Gibco 公司,RPMI-1640(货号 C22400500BT),美国 Thermo Fisher Scientific 公司。

### 1.3 动物和细胞

Balb/c 小鼠,雌性,体质量 16~20 g,由北京维通利华公司提供,SPF 级,许可证号 SLXD-20240610011。SPF 级,SD 大鼠,雄性,体质量 200~400 g,由北京斯贝福公司提供,许可证号 SLXD-

20240517006。小鼠乳腺癌 4T1 细胞，由北京协和医学院细胞中心提供。动物实验由中国医学科学院药用植物研究所 IMPLAD 伦理委员会批准（批准号 SLXD-20240610011 和 SLXD-20240517006）。

## 2 方法与结果

### 2.1 PBP-SeNPs 的制备

基于 Zhang 等<sup>[26]</sup>报道的纳米组装策略进行 PBP-SeNPs 的制备。精确称定质量的 PBP 并分散于去离子水中制备具有浓度梯度的 PBP 分散体系。同时分别精密称取抗坏血酸和 Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> 用去离子水配制成溶液，按照 PBP 与 Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> 预设的质量比，依次将 Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>、抗坏血酸与 PBP 溶液以 1 : 2 : 4 的体积比进行混合，不同温度下搅拌不同时间后，将反应液以去离子水透析 48 h（截留相对分子质量  $8 \times 10^3 \sim 1.4 \times 10^4$ ，每 12 小时更换 1 次透析外液）除去残留的 Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> 和抗坏血酸，将透析内液冻干即得 PBP-SeNPs。

### 2.2 粒径、多分散指数（PDI）及ζ电位的测定

取制备好的纳米粒溶液，基于动态光散射（DLS）的原理，利用 Zetasizer Nano - ZS 马尔文粒径电位分析仪，来测定粒径、PDI 及 ζ 电位，每个样品重复测定 3 次。

### 2.3 单因素实验考察

以粒径、多分散指数（PDI）及ζ电位为评价指标，从 Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> 与 PBP 不同质量比（1 : 5、1 : 10、1 : 15、1 : 20）、不同 PBP 质量浓度（1、3、5、10 mg·mL<sup>-1</sup>）、不同反应时间（1、2、3、4 h）、不同反应温度（25、35、45、55 °C）4 个方面对“2.1”项下制备 PBP-SeNPs 的处方工艺进行单因素考察。

**2.3.1 Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> 与 PBP 质量比考察** 反应温度 25 °C、PBP 质量浓度为 5 mg·mL<sup>-1</sup>、反应时间为 2 h，按照“2.1”项下方法分别在 Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> 与 PBP 质量比分别为 1 : 5、1 : 10、1 : 15、1 : 20 的条件下制备 PBP-SeNPs，由表 1 可知，Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> 与 PBP 的质量比为 1 : 10 时，PBP-SeNPs 的粒径最小，ζ 电位绝对值最高，PDI 也较小，故选择 Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> 与 PBP 质量比 1 : 10 进行后续实验。

**2.3.2 PBP 浓度考察** 在反应温度为 25 °C、反应时间为 2 h、Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> 与 PBP 质量比为 1 : 10 的条件下，按“2.1”项下方法分别在 PBP 质量浓度为 1、3、5、10 mg·mL<sup>-1</sup> 条件下制备 PBP-SeNPs，结果如表 2，PBP 质量浓度为 5 mg·mL<sup>-1</sup> 时，纳米粒的粒径和 PDI 最小，ζ 电位绝对值最高，故选择 PBP 质量浓度为 5 mg·mL<sup>-1</sup> 进行后续实验。

表 1 Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> 与 PBP 质量比的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 1 Effect of reaction mass ratio of Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> to PBP ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

| 质量比    | 粒径/nm         | PDI           | ζ 电位/mV      |
|--------|---------------|---------------|--------------|
| 1 : 5  | 361.30 ± 1.56 | 0.381 ± 0.021 | -5.76 ± 0.01 |
| 1 : 10 | 138.50 ± 0.11 | 0.232 ± 0.043 | -8.65 ± 0.15 |
| 1 : 15 | 156.20 ± 0.13 | 0.218 ± 0.013 | -6.71 ± 0.12 |
| 1 : 20 | 276.10 ± 0.14 | 0.315 ± 0.057 | -7.13 ± 0.14 |

表 2 PBP 质量浓度的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 2 Effect of PBP concentrations ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

| PBP 质量<br>浓度/<br>(mg·mL <sup>-1</sup> ) | 粒径/nm         | PDI           | ζ 电位/mV      |
|-----------------------------------------|---------------|---------------|--------------|
| 1                                       | 258.50 ± 0.35 | 0.278 ± 0.019 | -7.18 ± 0.11 |
| 3                                       | 274.10 ± 0.46 | 0.251 ± 0.017 | -6.37 ± 0.15 |
| 5                                       | 153.10 ± 0.12 | 0.213 ± 0.014 | -9.31 ± 0.18 |
| 10                                      | 285.10 ± 0.74 | 0.237 ± 0.015 | -8.17 ± 0.13 |

**2.3.3 反应时间考察** 在反应温度为 25 °C，PBP 质量浓度为 5 mg·mL<sup>-1</sup>、Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> 和 PBP 质量比为 1 : 10 的条件下，按“2.1”项下方法分别反应 1、2、3、4 h 制备 PBP-SeNPs。由表 3 可知，ζ 电位随反应时间变化不大；反应时间为 2 h 时，纳米粒的粒径和 PDI 最小，继续延长时间粒径反而增大，故选择反应时间 2 h 进行后续实验。

表 3 不同反应时间的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 3 Effect of reaction time ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

| 时间/h | 粒径/nm          | PDI           | ζ 电位/mV      |
|------|----------------|---------------|--------------|
| 1    | 203.60 ± 14.28 | 0.219 ± 0.031 | -7.24 ± 0.75 |
| 2    | 138.50 ± 6.40  | 0.212 ± 0.041 | -8.76 ± 3.10 |
| 3    | 159.30 ± 2.30  | 0.286 ± 0.031 | -9.46 ± 0.61 |
| 4    | 250.10 ± 4.19  | 0.368 ± 0.012 | -8.75 ± 0.31 |

**2.3.4 反应温度考察** 在反应时间为 2 h、PBP 质量浓度为 5 mg·mL<sup>-1</sup>、Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> 与 PBP 质量比为 1 : 10 的条件下，按“2.1”项下方法分别在 25、35、45、55 °C 条件下制备 PBP-SeNPs，由表 4 可知，反应温度为 25 °C，纳米粒的粒径和 PDI 最小，ζ 电位绝对值也较高，故选择反应温度 25 °C 进行后续实验。

表 4 不同反应温度的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 4 Effect of reaction temperature ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

| 温度/°C | 粒径/nm         | PDI           | ζ 电位/mV      |
|-------|---------------|---------------|--------------|
| 25    | 168.30 ± 5.07 | 0.185 ± 0.031 | -8.95 ± 0.03 |
| 35    | 205.10 ± 2.06 | 0.310 ± 0.054 | -7.24 ± 0.32 |
| 45    | 306.10 ± 1.78 | 0.286 ± 0.061 | -8.43 ± 0.54 |
| 55    | 328.60 ± 0.27 | 0.341 ± 0.012 | -9.76 ± 0.02 |

## 2.4 Box-Behnken 设计-效应面法 (BBD-RSM) 优化处方工艺

2.4.1 实验方案设计与结果 在单因素考察的基础上, 利用 Design Expert 13 软件, 以粒径 ( $Y$ ) 为

因变量, 反应温度 ( $X_1$ )、反应时间 ( $X_2$ )、PBP 质量浓度 ( $X_3$ )、 $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  与 PBP 质量比 ( $X_4$ ) 为自变量, 设计 BBD-RSM 优化处方工艺, 自变量水平、实验方案设计及结果见表 5。

表 5 Box-Behnken 试验设计与结果 ( $n=3$ )  
Table 5 Experimental design and results of Box-Behnken ( $n=3$ )

| 试验号 | $X_1/^\circ\text{C}$ | $X_2/\text{h}$ | $X_3/(\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1})$ | $X_4$      | $Y/\text{nm}$ | 试验号 | $X_1/^\circ\text{C}$ | $X_2/\text{h}$ | $X_3/(\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1})$ | $X_4$  | $Y/\text{nm}$ |
|-----|----------------------|----------------|--------------------------------------|------------|---------------|-----|----------------------|----------------|--------------------------------------|--------|---------------|
| 1   | 20 (-1)              | 3 (1)          | 5 (0)                                | 1 : 10 (0) | 142.3         | 15  | 25                   | 3              | 7                                    | 1 : 10 | 148.7         |
| 2   | 25 (0)               | 3              | 3 (-1)                               | 1 : 10     | 152.1         | 16  | 25                   | 2              | 7                                    | 1 : 8  | 173.9         |
| 3   | 25                   | 1 (-1)         | 7 (1)                                | 1 : 10     | 153.2         | 17  | 25                   | 1              | 5                                    | 1 : 8  | 237.2         |
| 4   | 25                   | 2 (0)          | 7                                    | 1 : 12 (1) | 201.9         | 18  | 25                   | 3              | 5                                    | 1 : 12 | 198.4         |
| 5   | 25                   | 1              | 3                                    | 1 : 10     | 205.1         | 19  | 30                   | 2              | 3                                    | 1 : 10 | 160.4         |
| 6   | 25                   | 3              | 5                                    | 1 : 8 (-1) | 162.5         | 20  | 25                   | 2              | 3                                    | 1 : 12 | 191.6         |
| 7   | 30 (1)               | 3              | 5                                    | 1 : 10     | 144.7         | 21  | 25                   | 1              | 5                                    | 1 : 12 | 186.2         |
| 8   | 30                   | 2              | 5                                    | 1 : 12     | 205.2         | 22  | 20                   | 2              | 3                                    | 1 : 10 | 180.8         |
| 9   | 30                   | 2              | 7                                    | 1 : 10     | 155.5         | 23  | 20                   | 2              | 5                                    | 1 : 8  | 198.8         |
| 10  | 30                   | 1              | 5                                    | 1 : 10     | 164.6         | 24  | 20                   | 1              | 5                                    | 1 : 10 | 174.5         |
| 11  | 20                   | 2              | 7                                    | 1 : 10     | 143.3         | 25  | 25                   | 2              | 5                                    | 1 : 10 | 129.6         |
| 12  | 25                   | 2              | 3                                    | 1 : 8      | 230.3         | 26  | 25                   | 2              | 5                                    | 1 : 10 | 134.3         |
| 13  | 20                   | 2              | 5                                    | 1 : 12     | 183.5         | 27  | 25                   | 2              | 5                                    | 1 : 10 | 127.6         |
| 14  | 30                   | 2              | 5                                    | 1 : 8      | 201.1         |     |                      |                |                                      |        |               |

2.4.2 数学模型与方差分析 根据表 5 实验数据, 拟合得到二次回归方程:  $Y=2722.81-34.9165X_1-226.639X_2+123.99X_3-316.846X_4+0.615X_1X_2+0.791X_1X_3+0.485X_1X_4+6.0625X_2X_3+10.8687X_2X_4+4.1687X_3X_4+0.5007X_1^2+14.4817X_2^2+4.4451X_3^2+13.0298X_4^2$ ,  $R^2=0.9880$ , 模型  $P<0.0001$  极具显著性差异; 而失拟  $P$  值  $=0.3303$  无

显著性差异 ( $P>0.05$ ), 说明建立的数学模型可用于 PBP-SeNPs 处方工艺研究。方差分析见表 6, 因素  $X_2$  和  $X_3$  的  $P<0.0001$ ,  $X_4$  的  $P<0.05$ , 影响较显著,  $F$  值越大, 对粒径的影响越强<sup>[27]</sup>, 所以各因素对粒径的影响顺序为:  $X_2>X_3>X_4>X_1$ 。对二次多项式统计检验发现,  $X_1X_3$ 、 $X_2X_3$ 、 $X_2X_4$ 、 $X_3X_4$ 、 $X_1^2$ 、 $X_2^2$ 、 $X_3^2$ 、 $X_4^2$  具显著性差异 ( $P<0.05$ 、 $0.0001$ )。

表 6 回归模型方差分析  
Table 6 Analysis of variance of regression model

| 项目       | 平方和       | 自由度 | 均方       | $F$ 值 | $P$ 值    | 项目      | 平方和       | 自由度 | 均方        | $F$ 值  | $P$ 值    |
|----------|-----------|-----|----------|-------|----------|---------|-----------|-----|-----------|--------|----------|
| 模型       | 22 892.73 | 14  | 1 635.19 | 64.80 | <0.000 1 | $X_1^2$ | 767.50    | 1   | 767.50    | 30.42  | 0.000 2  |
| $X_1$    | 5.95      | 1   | 5.95     | 0.236 | 0.636 6  | $X_2^2$ | 1 094.18  | 1   | 1 094.18  | 43.36  | <0.000 1 |
| $X_2$    | 2 466.77  | 1   | 2 466.77 | 97.76 | <0.000 1 | $X_3^2$ | 1 548.46  | 1   | 1 548.46  | 61.37  | <0.000 1 |
| $X_3$    | 1 416.89  | 1   | 1 416.89 | 56.15 | <0.000 1 | $X_4^2$ | 14 172.56 | 1   | 14 172.56 | 561.67 | <0.000 1 |
| $X_4$    | 114.39    | 1   | 114.39   | 4.53  | 0.046 7  | 残差      | 277.56    | 11  | 25.23     |        |          |
| $X_1X_2$ | 37.82     | 1   | 37.82    | 1.50  | 0.246 4  | 失拟项     | 253.90    | 9   | 28.21     | 2.38   | 0.330 3  |
| $X_1X_3$ | 156.42    | 1   | 156.42   | 6.20  | 0.030 0  | 纯误差     | 23.66     | 2   | 11.83     |        |          |
| $X_1X_4$ | 94.09     | 1   | 94.09    | 3.73  | 0.079 6  | 总差      | 23 170.29 | 25  |           |        |          |
| $X_2X_3$ | 588.06    | 1   | 588.06   | 23.31 | 0.000 5  |         |           |     |           |        |          |
| $X_2X_4$ | 1 890.08  | 1   | 1 890.08 | 74.91 | <0.000 1 |         |           |     |           |        |          |
| $X_3X_4$ | 1 112.22  | 1   | 1 112.22 | 44.08 | <0.000 1 |         |           |     |           |        |          |

各因素交互作用结果如图 1 所示, 在  $X_1$  或  $X_3$  一定的条件下, 响应面图中的粒径随着另一个因素的增大, 呈现先减小后增大的趋势; 在  $X_3$  一定的条件下, 粒径随着反应时间的增大而减小,  $X_2$  一定时, 粒径随着  $X_3$  的增大而先减小后增大; 在  $X_4$  一定的条件下, 粒径随着反应时间的增大而减小,  $X_2$  一定时, 粒径随着质量比的增大, 先减小再增大; 在  $X_3$

一定的条件下, 粒径随着质量比的增大而先减小后增大,  $X_4$  一定时, 粒径随着  $X_3$  增大而先减小后增大; 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 PBP-SeNPs 最佳处方确定条件为: 反应温度 24℃、反应时间 2.7 h、 $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  与 PBP 的质量比为 1:9.79、PBP 的质量浓度为 5.4  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 预测平均粒径为 126.30 nm。

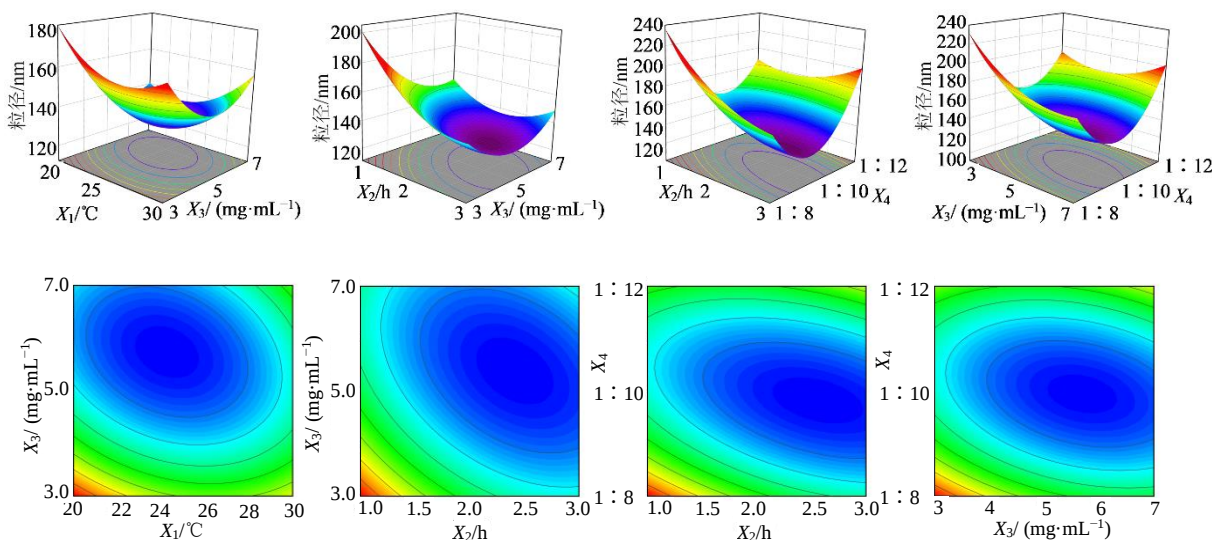


图 1 各因素与响应值的三维图

Fig. 1 Three-dimensional plot of independent factors and response values

## 2.5 工艺验证

根据优化后的处方工艺在反应温度为 24℃、反应时间为 2.7 h、 $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  与 PBP 的质量比为 1:9.79、PBP 的质量浓度为 5.4  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  的条件下, 制备 3 批 PBP-SeNPs, 测定粒径、PDI 与  $\zeta$  电位。结果见表 7, 平均粒径为 126.4 nm, PDI 为 0.197, 均与理论预测值接近, RSD 为 3.9%, 说明建立的该响应面模型可信度良好, 预测性较优。

表 7 PBP-SeNPs 最优处方纳米粒的表征 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )  
Table 7 Preparation of optimal prescription nanoparticles for PBP-SeNPs ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

| 批次 | 粒径/nm       | PDI         | $\zeta$ 电位/mV |
|----|-------------|-------------|---------------|
| 1  | 126.80±6.15 | 0.195±0.014 | -9.34±0.51    |
| 2  | 135.50±1.27 | 0.206±0.058 | -8.72±0.35    |
| 3  | 116.90±7.23 | 0.192±0.007 | -8.74±0.56    |

## 2.6 PBP-SeNPs 的表征

**2.6.1 硒含量和载药量测定** 依照 Chen 等<sup>[28]</sup>的方法, 将冻干的 PBP-SeNPs 在双氧水和硝酸的作用下进行微波消解处理。随后, 使用电感耦合等离子体

质谱仪 (ICP-MS) 设定入射功率为 1 550 W, 冷却气体流量为 18  $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ , 辅助气体流量为 1.2  $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ , 测定样品中硒的含量 ( $W_i$ )。

$$W_i = C \times V / m$$

$C$  为硒的质量浓度 ( $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ );  $V$  为体积 ( $\text{mL}$ );  $m$  为 PBP-SeNPs 冻干粉取样质量 ( $\text{mg}$ )

采用苯酚-硫酸法<sup>[29]</sup>测定多糖浓度, 绘制标准曲线, 拟合标准曲线为  $Y=4.15X+0.049\ 9$ ,  $R^2=0.997\ 5$ , 线性范围为 31.25  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\sim 1\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。称取 10 mg PBP-SeNPs, 加入 50 mL 去离子水超声溶解, 取 1 mL PBP-SeNPs 水溶液, 加入 1 mL 苯酚溶液 (0.06  $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), 最后加入 5 mL 浓硫酸, 震荡摇匀, 100℃下水浴 15 min, 在 490 nm 波长下检测吸光度 ( $A$ ) 值, 计算多糖载药量。

$$\text{载药量} = C \times V / W$$

$C$  为标准曲线计算的 PBP-SeNPs 多糖质量浓度 ( $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ );  $V$  为溶剂体积 ( $\text{mL}$ );  $W$  为纳米粒冻干粉理论质量 ( $\text{mg}$ )

经 ICP-MS 技术检测, PBP-SeNPs 中硒元素的质量分数为 1.2%。研究显示, 多糖纳米硒复合物中

的硒含量存在较大波动范围,大多集中在 5%~20%,该差异主要受测量方法、多糖性质、制备工艺以及纳米硒粒径等因素影响<sup>[30-31]</sup>。此外,所制备的纳米粒中多糖载药量为 55%,表明以原位生成的硒作为交联剂制备的多糖纳米粒,不仅工艺简单,并且具有高载药量<sup>[32]</sup>,推测原因可能是多糖的疏水区域与硒之间的物理交联作用,显著增强了纳米载体的药物负载能力<sup>[33]</sup>。

**2.6.2 粒径、PDI 与 $\zeta$ 电位表征** 取制备好的纳米粒溶液,按“2.2”项下方法测定,结果如图 2 所示,PBP 水溶液的粒径为  $(1\,389 \pm 336)$  nm, PDI 为  $0.811 \pm 0.222$ ,主要分布在 3 个波段内,说明其粒径大小分布范围较宽且不均一。PBP-SeNPs 平均粒径为  $(126.400 \pm 6.402)$  nm, PDI 为  $0.197 \pm 0.021$ , $\zeta$ 电位为  $(-8.17 \pm 0.35)$  mV,主要在 1 个波段内均匀分布,接近单一分布,说明颗粒分散性好。粒径是评价 PBP-SeNPs 特征的一个重要指标<sup>[34]</sup>。PBP-SeNPs 的粒径越小,其稳定性越强,生物活性和利用度也越高<sup>[35]</sup>,而肿瘤治疗理想纳米颗粒的粒径在 30~150 nm<sup>[36]</sup>。结果表明制备得到的 PBP-SeNPs 适合后续的抗肿瘤研究。

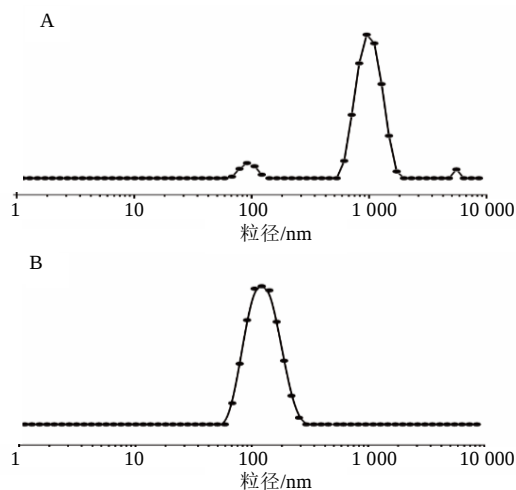


图 2 PBP (A) 和 PBP-SeNPs (B) 的粒径分布 ( $n=3$ )  
Fig. 2 Particle size distributions of PBP(A) and PBP-SeNPs (B) ( $n=3$ )

**2.6.3 PBP-SeNPs 的 TEM 观察** 称取 PBP 和 PBP-SeNPs 各 10 mg,分别溶于 10 mL 去离子水中,再用去离子水稀释 1 倍得到  $0.5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  的 PBP 和 PBP-SeNPs 溶液。各取 10  $\mu\text{L}$  的 PBP 和 PBP-SeNPs 滴到 300 目的测量铜网上,室温晾 10 min,用滤纸沿边缘吸去多余水分,滴入 8  $\mu\text{L}$  的 2%磷钨酸静置染

色 5 min,自然晾干。可见与 PBP 相比,PBP-SeNPs 在 TEM 下均匀分布在视野里,呈较规则的球形结构(图 3)。

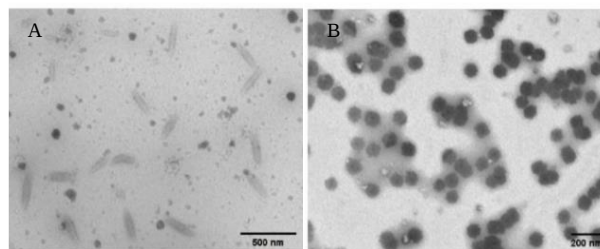


图 3 PBP (A) 和 PBP-SeNPs (B) 的 TEM 图  
Fig. 3 TEM photos of PBP (A) and PBP-SeNPs (B)

**2.6.4 紫外光谱分析** 精密称取 PBP-SeNPs 和 PBP 各 10 mg,分别溶于 10 mL 去离子水中,再用去离子水稀释 2 倍,得到  $0.5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  的 PBP-SeNPs 和 PBP 溶液。采用紫外-可见分光光度计在 200~800 nm 波长扫描,以去离子水为参比,测定 PBP 水溶液和 PBP-SeNPs 的紫外-可见吸收光谱。

如图 4 所示,与 PBP 水溶液相比,PBP-SeNPs 在 260 nm 附近出现显著吸收峰,该特征峰与硒纳米晶体的激子激发行为相关<sup>[37-38]</sup>。研究表明,当纳米硒的粒径约 100 nm 时,其在 300 nm 波长范围内会有 1 个明显的吸收峰<sup>[16]</sup>。

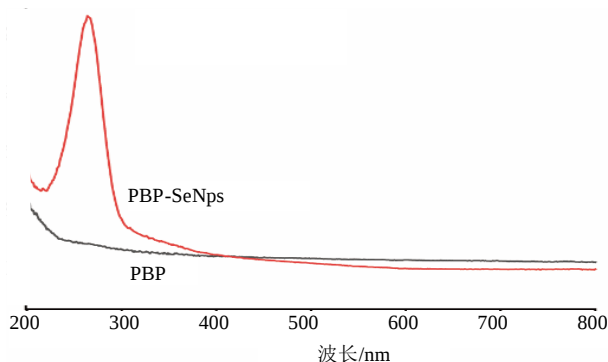


图 4 PBP 和 PBP-SeNPs 的紫外-可见全波长光谱图  
Fig. 4 UV-Vis spectra of PBP solution and PBP-SeNPs

**2.6.5 红外光谱法(FT-IR)分析** 用 FT-TR 对 PBP 和 PBP-SeNPs 进行对比考察。称取 1 mg 干燥 PBP 和 PBP-SeNPs 样品分别与 150 mg 溴化钾(KBr)在研钵中一起磨成粉末并搅拌均匀,压片后迅速装入红外光谱仪,在  $4\,000\sim 400\text{ cm}^{-1}$  扫描来获取多糖的红外光谱,并用 Origin 2021 软件作图与分析。

由图 5 可知,PBP 在  $3\,358.1\text{ cm}^{-1}$  处出现了羟基 O-H 的伸缩振动峰,PBP-SeNPs 在  $3\,332.2$ 、 $2\,888.2$ 、

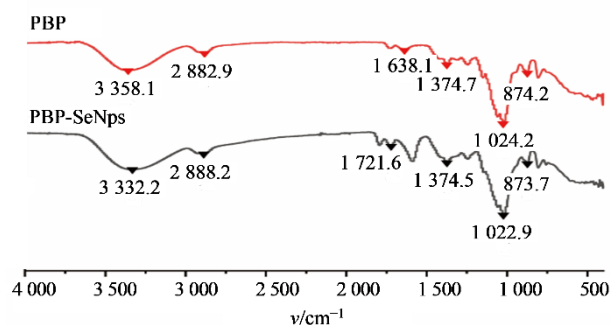


图 5 PBP 溶液和 PBP-SeNPs 的 FT-IR 图

Fig. 5 FT-IR spectra of PBP solution and PBP-SeNPs

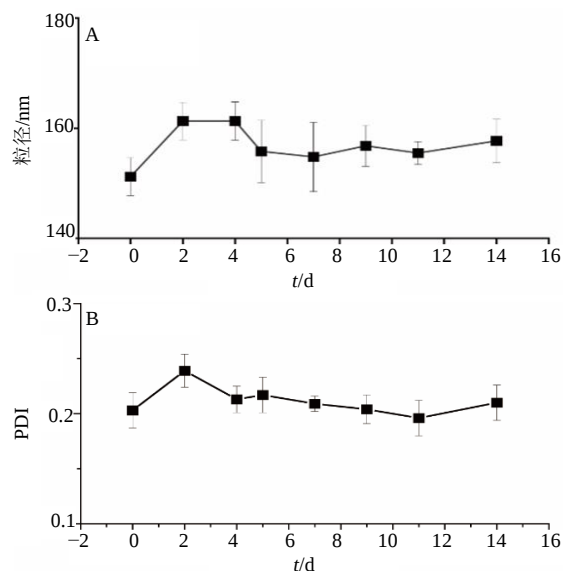
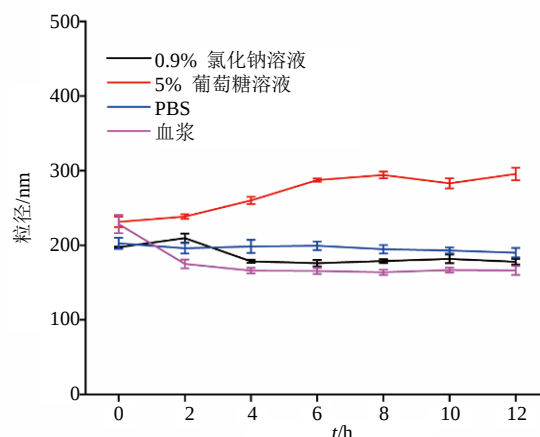
1 721.6、1 374.5、1 022.9、873.7  $\text{cm}^{-1}$  出现了与 PBP 相似的吸收峰,显示 PBP-SeNPs 中多糖与硒之间没有形成新的共价键。然而, PBP-SeNPs 中部分峰出现红移, O-H 的伸缩振动峰从 3 358.1  $\text{cm}^{-1}$  移至 3 332.2  $\text{cm}^{-1}$ , 推测 PBP 的部分羟基与硒发生了相互作用。

#### 2.6.6 PBP-SeNPs 的稳定性考察

(1) 室温放置稳定性: 取制备好的 PBP-SeNPs 于室温放置 14 d, 每天于相同时间点取样测定粒径, 同时观察纳米粒中是否有聚集、沉淀等现象出现。如图 6 所示, PBP-SeNPs 可以在室温储存 15 d 而粒径不发生明显改变, 保持在 200 nm 以下, 且 PDI 也基本在 0.2 左右, 整个过程中未见聚集、浑浊、沉淀、分层的情况出现, 可见其具有良好的放置稳定性, 可以进行后续实验。

(2) 生理介质稳定性: 小鼠摘眼球取血到抗凝管中, 随后以 3 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  速度于 4℃ 低温条件下离心 10 min, 分离上层血浆与红细胞层。将新制备的 PBP-SeNPs 按照 1:1 的体积比与 1.8% 的氯化钠溶液、10% 的葡萄糖溶液、浓度为 0.02  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的磷酸盐缓冲液 (PBS) 混合, 1:4 的体积比与小鼠血浆混合, 在 37℃ 孵育, 于 0、2、4、6、8、10、12 h 取样测定平均粒径和粒度分布, 同时观察是否有聚集、沉淀的现象。如图 7 所示, PBP-SeNPs 在不同介质中的粒径变化较小, 说明可以稳定分散在 0.9% 氯化钠溶液、PBS 或 5% 葡萄糖溶液介质中, 12 h 内均没有出现浑浊或沉淀现象, 粒径也没有显著增加, 有利于后续给药进行体内研究。

**2.6.7 溶血性** 大鼠腹主动脉取血到抗凝管中, 室温下放置 30 min, 随后以 1 500  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  于 4℃ 低温条

图 6 PBP-SeNPs 室温放置 14 d 粒径 (A) 和 PDI (B) 变化图 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )Fig. 6 Particle size (A) and PDI (B) change of PBP-SeNPs placed at room temperature for 14 d ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )图 7 PBP-SeNPs 在不同生理介质中的粒径变化 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )Fig. 7 Particle size change of PBP-SeNPs in different physiological medias ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

件下离心 20 min, 弃去上清, 收集红细胞, PBS 洗涤至离心后上清无色透明, 收集沉淀的红细胞, 用 20 倍体积的 PBS 重悬得到 5% 的红细胞悬液。用 PBS 将 PBP-SeNPs 冻干粉配制成 10  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的悬液, 以 PBS 稀释成质量浓度分别为 8.000、5.000、2.500、1.250、0.625  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的样品, 以 1:1 的体积比加入 5% 的红细胞悬液为实验组, 阴性组为等

量的 PBS 与 5% 红细胞悬液混合, 阳性组为等量的去离子水与 5% 红细胞悬液混合。以上各组于 37℃ 水浴孵育 4 h, 3 500 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min 后对比观察。如图 8 所示, 不同浓度梯度的 PBP-SeNPs 悬液与 5% 的红细胞孵育 4 h 后的上清, 和 PBS 阴性组在颜色上非常相似, 离心后红细胞均大量沉积在底部, 显示其几乎没有溶血作用。结合“2.6.6 (2)”项在 PBS 和血浆中稳定性的结果, 说明制备的 PBP-SeNPs 适合用于静脉给药。



从左到右依次为阴性对照组、PBP-SeNPs 质量浓度 10.000、8.000、5.000、2.500、1.250、0.625 mg·mL<sup>-1</sup>、阳性对照组。  
From left to right were negative group, PBP-SeNPs concentration 10.000, 8.000, 5.000, 2.500, 1.250, 0.625 mg·mL<sup>-1</sup>, positive group.

图 8 各组的溶血性实验结果

Fig. 8 Hemolytic experiment results of different groups

## 2.7 体外细胞毒性考察

采用 MTT 法检测 PBP 水溶液和 PBP-SeNPs 的体外细胞毒性。取对数生长期的 4T1 乳腺癌细胞, 经胰酶消化后, 以每孔  $8 \times 10^3$  个的密度接种于 96 孔板, 并在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 24 h, 弃去原培养基。实验组分别加入 200 μL 以 RPMI-1640 培养基稀释的质量浓度(以 PBP 计算)为 78.125、156.250、312.500、625.000 μg mL<sup>-1</sup> 及 1.25、2.50 mg·mL<sup>-1</sup> PBP 溶液, 或 200 μL 以 RPMI-1640 培养基稀释的质量浓度为 0.25、0.5、5、50、100、200、400、800 μg·mL<sup>-1</sup> 的 PBP-SeNPs 溶液, 每组平行 5 个重复孔。空白对照组加入 200 μL 无血清基础培养基。孵育 72 h 后, 每孔注入 20 μL MTT 溶液 (5 mg·mL<sup>-1</sup>), 孵育 4 h 诱导甲臢合成。吸弃孔内培养上清液, 每孔加入 200 μL DMSO 裂解体系, 微量振荡仪震荡 10 min 充分混匀, 酶标仪于 570 nm 处测定吸光度 (*A*) 值。计算细胞抑制率, 并用 GraphPad Prism 8.0 软件进行剂量-效应曲线拟合, 进而计算 PBP 和 PBP-SeNPs 的半数抑制浓度 (IC<sub>50</sub>) 值。

$$\text{细胞抑制率} = 1 - A_{\text{实验}} / A_{\text{对照}}$$

MTT 法测定结果如图 9 所示, 4T1 细胞系经

PBP 溶液与 PBP-SeNPs 共培养 72 h 后, PBP 溶液的 IC<sub>50</sub> 值为 189.10 μg·mL<sup>-1</sup>, PBP-SeNPs 的 IC<sub>50</sub> 值为 62.64 μg·mL<sup>-1</sup>, 为 PBP 溶液的 1/3, 说明将 PBP 制备成纳米粒后提高了对 4T1 细胞的毒性和体外抗肿瘤效果, 其原因可能是纳米粒增加了肿瘤细胞对 PBP 的摄取。

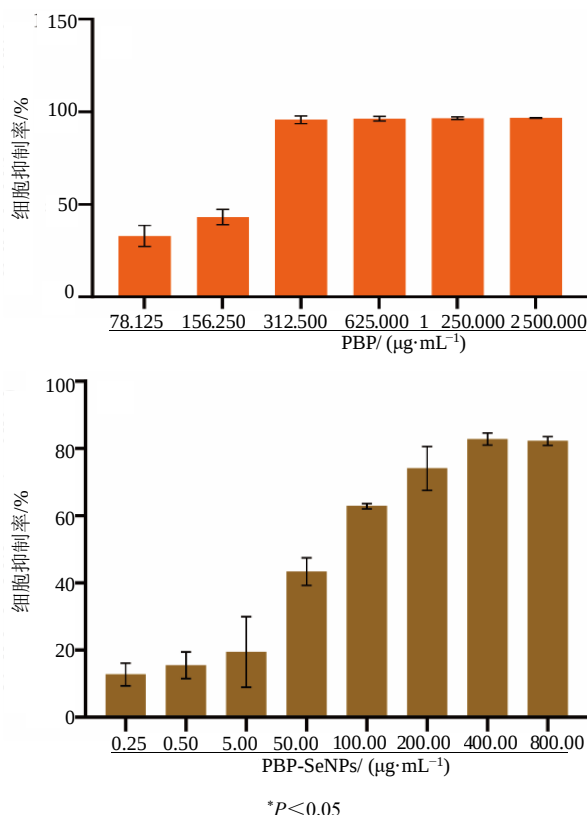


图 9 PBP 溶液和 PBP-SeNPs 对 4T1 细胞的抑制作用 ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Fig. 9 Inhibition of different PBP and PBP-SeNPs on 4T1 cells ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

## 2.8 荷瘤鼠体内抗肿瘤活性考察

通过 4T1 Balb/c 小鼠模型评估 PBP-SeNPs 的体内抗肿瘤效果。选取体质量为 (18±2) g、6 周龄左右的 Balb/c 小鼠, 经过 1 周适应性饲养后, 于小鼠腋下接种 0.2 mL 的 4T1 细胞悬液 ( $1 \times 10^6$  个细胞)。当肿瘤平均体积达到约 100 mm<sup>3</sup> 时, 选取肿瘤体积相当的 4T1 荷瘤小鼠, 并随机分为 4 组, 每组 7 只。对照组 (尾 iv 0.2 mL 0.9% 氯化钠溶液)、阳性对照组 (阿霉素盐酸盐注射液, DOX, 2 mg·kg<sup>-1</sup>)、PBP 溶液组 (50 mg·kg<sup>-1</sup> PBP)、PBP-SeNPs 组 (50 mg·kg<sup>-1</sup> PBP) [9], 考察各组小鼠体内肿瘤生长的抑制情况。除正常饮食外, 各组小鼠均每隔 2 天经尾 iv 给药 1 次, 共给药 7 次, 并记录

每只小鼠的体质量, 计算肿瘤体积 ( $V$ )、肿瘤抑制率及各脏器指数。

$$V = L \times W^2 / 2$$

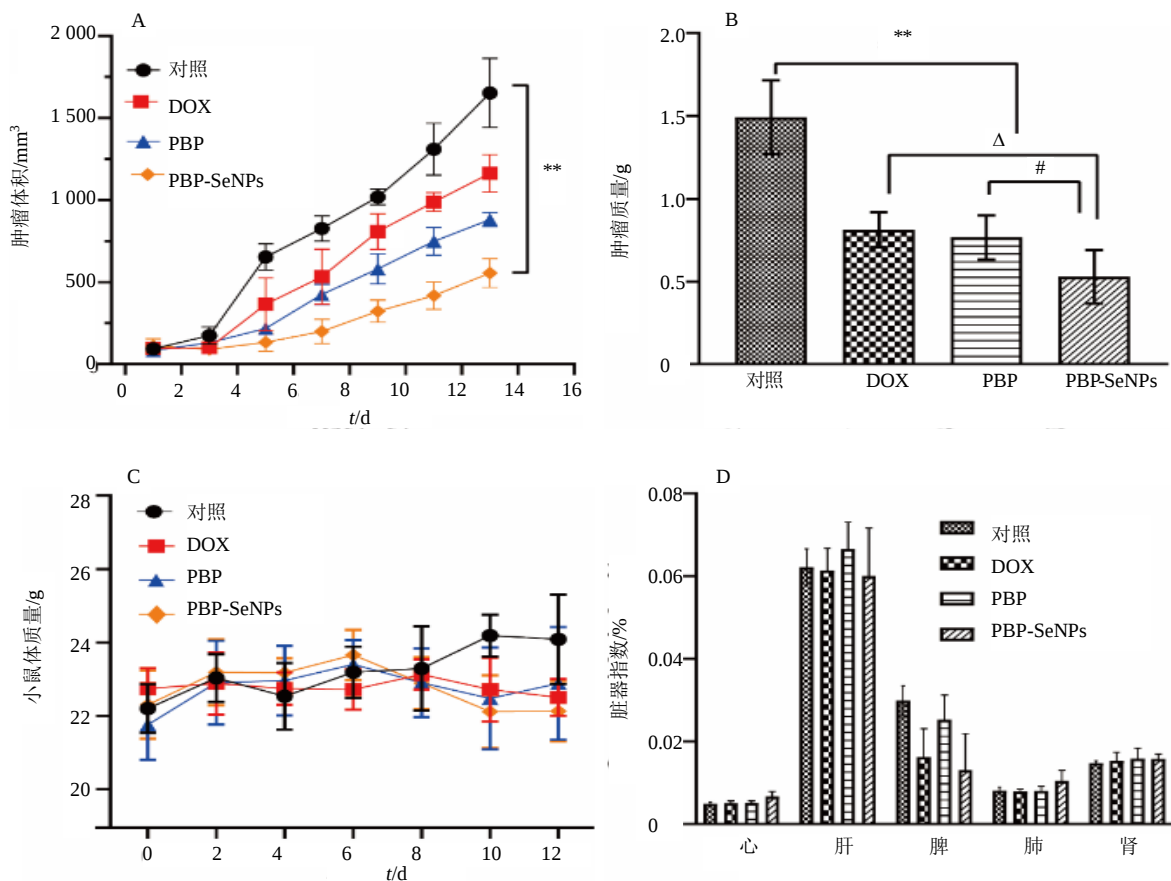
$L$  为瘤组织的最大直径,  $W$  为最小直径

肿瘤抑制率 =  $1 - \text{实验组肿瘤质量} / \text{阴性对照组肿瘤质量}$

脏器指数 = 脏器质量 / 小鼠体质量

各组小鼠的肿瘤体积随时间的变化如图 10-A 所示, 实验结束后称量的各组瘤质量情况如图 10-B。其中 PBP-SeNPs 组肿瘤体积、质量均与对照组

有显著性差异 ( $P < 0.01$ ); 抑瘤率数据显示, PBP-SeNPs 的抑瘤率为 68.3%, 明显大于游离 PBP 的 49.7% ( $P < 0.05$ ), 也明显优于阳性药组 (33.6%,  $P < 0.05$ )。在整个给药期间, PBP-SeNPs 组小鼠在后两次给药中体质量略有下降, 但波动不明显, 保持在 22 g 左右, 各组小鼠体质量之间没有显著性差异 (图 10-C)。在解剖后称量各个主要器官的质量如图 10-D 所示, 各组脏器指数都没有显著性差异 ( $P > 0.05$ )。



与对照组比较: \*\* $P < 0.01$ ; 与 DOX 组比较:  $\Delta P < 0.05$ ; 与 PBP 组比较:  $\#P < 0.05$ 。

\*\* $P < 0.01$  vs control group;  $\Delta P < 0.05$  vs DOX group;  $\#P < 0.05$  vs PBP group.

图 10 各组小鼠肿瘤体积 (A)、肿瘤质量 (B)、体质量 (C)、脏器指数 (D) ( $\bar{x} \pm s, n=7$ )

Fig. 10 Tumor volume (A), tumor mass (B), body weight (C), and organ index (D) of mice in each group ( $\bar{x} \pm s, n=7$ )

### 3 讨论

作为除蛋白质、核酸之外的第三类生物大分子, 多糖在自然界分布广泛, 含量较高, 在中药和天然植物中也普遍存在<sup>[39]</sup>。多糖曾一度被认为是无效成分而在中成药制备过程中被醇沉除去<sup>[40]</sup>, 然而, 近 20 年来, 多糖日益被发现具有广泛的生物活性, 现已被公认为中药发挥作用中必不可少的物质基础, 相关研究随即成为研究热点<sup>[41-42]</sup>。目前, 关

于多糖的研究<sup>[41,43]</sup>主要集中在均一多糖的分离、结构鉴定、生物活性及机制研究, 以多糖作为治疗性药物的给药系统研究相对匮乏。

#### 3.1 硒交联与活性多糖的纳米制备

多糖-硒纳米粒已有较多研究<sup>[44]</sup>, 大多是以多糖为辅料制备纳米硒<sup>[45-46]</sup>, 用于给机体补充有机硒。这样的纳米硒中, 硒的含量较高, 如岩藻多糖硒纳米粒中硒含量 29.93%<sup>[27]</sup>, 辣木叶多糖硒纳米粒

粒中硒含量 12%<sup>[47]</sup>, 蛹虫草多糖硒纳米颗粒中硒含量 20%<sup>[48]</sup>, 用于少量给药。

作为微量元素, 硒的安全范围较窄, 过量易引发中毒<sup>[44]</sup>, 而多糖的给药剂量要高的多, 故要借助硒交联技术实现对活性多糖的口服等给药, 必须控制硒的含量, 才能在满足多糖所需给药剂量下, 保证适当的安全性。

故本研究, 尝试以硒为辅料制备 PBP 纳米粒, 通过控制  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  用量, 以抗坏血酸还原  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  原位生成硒原子交联 PBP, 所制备的 PBP-SeNPs, 硒含量只有 1.2%, 有效地维持了 PBP 稳定的纳米结构, 冻干后加水振摇即可复溶成纳米粒。

### 3.2 基于“硒交联”和“降硒”策略的纳米技术, 可赋能活性多糖的体内增效

纳米技术在提高难溶性小分子化疗药物的体内外抗肿瘤药效方面卓有成效<sup>[49]</sup>, 但多糖是水溶性大分子, 在结构和性质方面与难溶性小分子差异巨大, 而且很多多糖, 其溶液本身就是一个包含分子溶液到多分子聚集体的粒径从数纳米到数十微米的多相体系, 如本研究的 PBP (图 2-A)。将其制备成纳米粒后, 能在多大程度上提高多糖的抗肿瘤活性, 缺乏直接对比研究的证据。

本研究体外实验, PBP-SeNPs 对 4T1 乳腺癌细胞的  $\text{IC}_{50}$  值约是游离 PBP 溶液的 3 倍 ( $\text{IC}_{50}$ :  $62.64 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} < 189.10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), 证明硒纳米化可显著增强水溶性多糖大分子的体外抗肿瘤活性, 推测其机制可能是因为增加了活性多糖的细胞摄取效率。体内荷瘤鼠模型中, PBP-SeNPs iv 的抑瘤率高达 68.3%, 远超 PBP 溶液的 49.7% 和阳性药阿霉素的 33.6%, 显著提高了 PBP 的抗肿瘤作用, 这一结果与纳米药物通过 EPR (增强的通透性和滞留效应) 增强肿瘤靶向的普遍规律一致<sup>[50]</sup>。整个动物实验过程中, PBP-SeNPs 组在后 2 次给药中体质量略有下降, 与 PBP 溶液组相比没有显著性差异, 提示耐受性尚可。

本研究以 PBP 为例, 为其他活性多糖通过硒交联制备高载药纳米粒和增效研究提供了借鉴。很多多糖都有制备纳米硒的先例<sup>[51-52]</sup>, 制备方法也较简单。需要注意的是在尽量降低硒的用量和所得多糖纳米中硒含量的同时, 能有效维持多糖的纳米结构。本课题组推测, 硒交联纳米多糖, 可基于纳米给药系统的优势提高口服多糖的吸收和生物利用度, iv 给药改善多糖的药动学和组织分布, 并由于

纳米粒对肿瘤 EPR 向肿瘤中聚集, 从而推动中药活性多糖的广泛应用和健康产品的研发。

### 3.3 硒有助于抗肿瘤

在小鼠模型中, 硒缺乏会导致免疫力下降和肿瘤快速生长<sup>[53]</sup>, 揭示微量营养素硒与肿瘤进展之间的相关性。最近有报道, 硒纳米颗粒可通过激活硒蛋白驱动的免疫调节增强非小细胞肺癌临床化疗疗效<sup>[54]</sup>。未来, 抗肿瘤多糖、硒交联、纳米粒, 再联合装载化疗药物, 可能会成为一个有前景的研究方向。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

### 参考文献

- [1] 司函瑞, 司雨, 焦玉凤, 等. 山慈菇化学成分及其药理作用研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2020, 22(5): 151-155.  
Si H R, Si Y, Jiao Y F, et al. Research progress on chemical constituents and clinical application of *pseudobulbus cremastrae seu pleiones* [J]. J Liaoning Univ Tradit Chin Med, 2020, 22(5): 151-155.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2020.  
Pharmacopoeia of the People's Republic of China [S]. Volume I. 2020.
- [3] 芦艺凡, 王宇, 姜婷月, 等. 山慈菇水提物抗肝癌有效部位筛选及其对肝癌小鼠肿瘤血管生成的影响 [J]. 中草药, 2025, 56(5): 1607-1616.  
Lu Y F, Wang Y, Jiang T Y, et al. Screening of anti-hepatocarcinoma active fraction from water extract of *Cremastrae Pseudobulbus Pleiones Pseudobulbus* and its effect on tumor angiogenesis in mice with hepatocarcinoma [J]. 2025, 56(5): 1607-1616.
- [4] 于治凡, 刘英华, 肖均财, 等. 山慈菇对甲状腺癌 SW579 细胞增殖及凋亡的影响 [J]. 癌症进展, 2018, 16(10): 1292-1294, 1298.  
Yu Z F, Liu Y H, Xiao J C, et al. Effect of *Cremastra appendiculata* makino on proliferation and apoptosis of thyroid cancer SW579 cells [J]. Oncol Prog, 2018, 16(10): 1292-1294, 1298.
- [5] 于林楠, 翟宏颖. 山慈菇提取物对结肠癌 HT29 细胞凋亡的影响 [J]. 中国民族民间医药, 2016, 25(16): 17-19.  
Yu L N, Zhai H Y. Effects of *Cremastra appendiculata* extract on the apoptosis of human colon cancer HT29 cells [J]. Chin J Ethnomed Ethnopharm, 2016, 25(16): 17-19.
- [6] 阮小丽, 施大文. 山慈菇的抗肿瘤及抑菌作用 [J]. 中草药, 2009, 32(12): 1886-1888.  
Ruan X L, Shi D W. Anti-tumor and bacteriostatic effects

- of cremastrae pseudobulbus pleiones pseudobulbus [J]. J Chin Med Mater, 2009, 32(12): 1886-1888.
- [7] 刘颖, 张子英, 马丽杰. 山慈菇抗乳腺癌的作用机制研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2019, 34(3): 863-866.
- Liu Y, Zhang Z Y, Ma L J. Research progress on anti-breast cancer mechanism of *Iphigenia indica* [J]. Drugs Clin, 2019, 34(3): 863-866.
- [8] Wang X M, Lu G J, Cui L Y, et al. *In vitro* degradation and biocompatibility of vitamin C loaded Ca-P coating on a magnesium alloy for bioimplant applications [J]. Corros Commun, 2022, 6: 16-28.
- [9] Deng W Q, Han S W, Shao S Y, et al. Elucidation of the fine structure and anti-breast tumor activity of a glucomannan from the pseudobulbs of *Pleione bulbocodioides* [J]. Carbohydr Polym, 2025, 351: 123062.
- [10] Shi X D, Yin J Y, Cui S W, et al. Plant-derived glucomannans: Sources, preparation methods, structural features, and biological properties [J]. Trends Food Sci Technol, 2020, 99: 101-116.
- [11] Niu J F, Wang S P, Wang B L, et al. Structure and anti-tumor activity of a polysaccharide from *Bletilla ochracea* Schltr [J]. Int J Biol Macromol, 2020, 154: 1548-1555.
- [12] Tao S C, Lei Z X, Huang K W, et al. Structural characterization and immunomodulatory activity of two novel polysaccharides derived from the stem of *Dendrobium officinale* Kimura et Migo [J]. J Funct Foods, 2019, 57: 121-134.
- [13] Tao S C, Huang C L, Tan Z H, et al. Effect of the polysaccharides derived from *Dendrobium officinale* stems on human HT-29 colorectal cancer cells and a zebrafish model [J]. Food Biosci, 2021, 41: 100995.
- [14] 黄媛媛, 陈华国, 谢文, 等. 多糖与肠道菌群相互作用及其构效关系研究进展 [J]. 微生物学通报, 2022, 49(6): 2325-2346.
- Huang Y Y, Chen H G, Xie W, et al. Interaction between polysaccharide and intestinal flora and its structure-effect relationship: A review [J]. Microbiol China, 2022, 49(6): 2325-2346.
- [15] De Jong W H, Borm P J A. Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazards [J]. Int J Nanomed, 2008, 3(2): 133-149.
- [16] Cao B L, Zhang Q, Guo J, et al. Synthesis and evaluation of *Grateloupia Livida* polysaccharides-functionalized selenium nanoparticles [J]. Int J Biol Macromol, 2021, 191: 832-839.
- [17] 单荣, 许晓义, 尹永奎, 等. 多糖纳米硒制备和生物活性研究进展 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(18): 376-383.
- Shan R, Xu X Y, Yin Y K, et al. Research progress in the preparation and biological activity of polysaccharide nano-selenium [J]. Sci Technol Food Ind, 2024, 45(18): 376-383.
- [18] Mal J, Veneman W J, Nancharaiyah Y V, et al. A comparison of fate and toxicity of selenite, biogenically, and chemically synthesized selenium nanoparticles to zebrafish (*Danio rerio*) embryogenesis [J]. Nanotoxicology, 2017, 11(1): 87-97.
- [19] Zhang J S, Wang X F, Xu T W. Elemental selenium at nano size (Nano-Se) as a potential chemopreventive agent with reduced risk of selenium toxicity: Comparison with selenomethylselenocysteine in mice [J]. Toxicol Sci, 2008, 101(1): 22-31.
- [20] Estevez H, Carlos Garcia-Lidon J, Luque-Garcia J L, et al. Effects of chitosan-stabilized selenium nanoparticles on cell proliferation, apoptosis and cell cycle pattern in HepG2 cells: Comparison with other selenospecies [J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2014, 122: 184-193.
- [21] Zhao S, Yu Q Q, Pan J L, et al. Redox-responsive mesoporous selenium delivery of doxorubicin targets MCF-7 cells and synergistically enhances its anti-tumor activity [J]. Acta Biomater, 2017, 54: 294-306.
- [22] Sonkusre P, Cameotra S S. Biogenic selenium nanoparticles induce ROS-mediated necroptosis in PC-3 cancer cells through TNF activation [J]. J Nanobiotechnol, 2017, 15(1): 43.
- [23] Li K, Li J, Zhang S S, et al. Amorphous structure and crystal stability determine the bioavailability of selenium nanoparticles [J]. J Hazard Mater, 2024, 465: 133287.
- [24] Rayman M P. The importance of selenium to human health [J]. Lancet, 2000, 356(9225): 233-241.
- [25] 刘晓庆, 魏凌峰, 贾继来, 等. 纳米硒多糖载体的构建及其抗肿瘤应用的研究进展 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(21): 454-460.
- Liu X Q, Wei L F, Jia J L, et al. Research progress of constructing selenium nanoparticles by polysaccharide carriers and their application in anti-tumor [J]. Sci Technol Food Ind, 2022, 43(21): 454-460.
- [26] 窦晨, 赵声兰, 丁雄, 等. Box-Behnken 响应面法优化葡萄籽原花青素柔质体的制备工艺 [J]. 西北药学杂志, 2022, 37(3): 1-7.
- Dou C, Zhao S L, Ding X, et al. Optimization of the preparation of grape seed proanthocyanidins flexible nanoliposomes by Box-Behnken response surface methodology [J]. Northwest Pharm J, 2022, 37(3): 1-7.
- [27] Zhang X, Yan H H, Ma L, et al. Preparation and characterization of selenium nanoparticles decorated by

- Spirulina platensis* polysaccharide [J]. J Food Biochem, 2020, 44(9): e13363.
- [28] Chen J P, Chen X H, Li J R, 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(3): 172.
- [29] 曾婷, 周芳, 汤嫣然, 等. 紫外-可见分光光度法测定多花黄精多糖含量 [J]. 湖南中医杂志, 2018, 34(9): 167-169.  
Zeng T, Zhou F, Tang Y R, et al. Content determination of polysaccharides in *Polygonatum cyrtoneura* Hua by ultraviolet-visible spectrophotometry [J]. Hunan J Tradit Chin Med, 2018, 34(9): 167-169.
- [30] Shi X D, Tian Y Q, Wu J L, et al. Synthesis, characterization, and biological activity of selenium nanoparticles conjugated with polysaccharides [J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2021, 61(13): 2225-2236.
- [31] Perfilova A I, Tsivileva O M, Nozhkina O A, et al. Effect of natural polysaccharide matrix-based selenium nanocomposites on *Phytophthora cactorum* and rhizospheric microorganisms [J]. Nanomaterials (Basel), 2021, 11(9): 2274.
- [32] 甘慧琴, 梅陈松, 关志宇, 等. 葛根多糖载葛根素纳米粒温敏凝胶的制备及其药动力学研究 [J]. 中草药, 2024, 55(21): 7238-7247.  
Gan H Q, Mei C S, Guan Z Y, et al. Preparation of *Pueraria* polysaccharides-loaded puerarin nanoparticles thermosensitive gel and its pharmacokinetics [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2024, 55(21): 7238-7247.
- [33] Shehata N S, Elwakil B H, Elshewemi S S, et al. Selenium nanoparticles coated bacterial polysaccharide with potent antimicrobial and anti-lung cancer activities [J]. Sci Rep, 2023, 13(1): 21871.
- [34] 刘欣欣, 黄甜甜, 付婧欣, 等. Box-Behnken 效应面法优化小豆蔻明纳米混悬剂处方工艺及其体外抗肿瘤活性研究 [J]. 中草药, 2023, 54(5): 1419-1428.  
Liu X X, Huang T T, Fu J X, et al. Optimization of cardamonin nanosuspensions prescription process based on Box-Behnken response surface method and *in vitro* antitumor activity [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2023, 54(5): 1419-1428.
- [35] Song X X, Chen Y Y, Sun H B, et al. Physicochemical stability and functional properties of selenium nanoparticles stabilized by chitosan, carrageenan, and gum Arabic [J]. Carbohydr Polym, 2021, 255: 117379.
- [36] Liu Y T, Huang W M, Han W Y, et al. Structure characterization of *Oudemansiella radicata* polysaccharide and preparation of selenium nanoparticles to enhance the antioxidant activities [J]. LWT, 2021, 146: 111469.
- [37] 范艳丽, 郑国强, 刘安军. 龙须菜酸性多糖对 H22 荷瘤小鼠的抗肿瘤作用 [J]. 现代食品科技, 2014, 30(9): 7-12, 141.  
Fan Y L, Zheng G Q, Liu A J. Anti-tumor effect of an acid polysaccharide from *Gracilaria lemaneiformis* in H22-bearing mice [J]. Mod Food Sci Technol, 2014, 30(9): 7-12, 141.
- [38] Ji H Y, Yu J, Liu A J. Structural characterization of a low molecular weight polysaccharide from *Grifola frondosa* and its antitumor activity in H22 tumor-bearing mice [J]. J Funct Foods, 2019, 61: 103472.
- [39] Zhao T, Yang M, Ma L N, et al. Structural modification and biological activity of polysaccharides [J]. Molecules, 2023, 28(14): 5416.
- [40] 丁天宇, 侯小涛, 郝二伟, 等. 基于药效因素设计的中药醇沉工艺研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2019, 30(8): 1959-1961.  
Ding T Y, Hou X T, Hao E W, et al. Research progress on alcohol precipitation technology of traditional Chinese medicine [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2019, 30(8): 1959-1961.
- [41] Liang X F, Liu M Q, Wei Y, et al. Structural characteristics and structure-activity relationship of four polysaccharides from *Lycii fructus* [J]. Int J Biol Macromol, 2023, 253(Pt 5): 127256.
- [42] Cao W, Wu J P, Zhao X Y, et al. Structural elucidation of an active polysaccharide from *Radix Puerariae lobatae* and its protection against acute alcoholic liver disease [J]. Carbohydr Polym, 2024, 325: 121565.
- [43] He Y, Li L, Chang H, et al. Research progress on extraction, purification, structure and biological activity of *Dendrobium officinale* polysaccharides [J]. Front Nutr, 2022, 9: 965073.
- [44] 郝雨, 王慧, 杨文娟, 等. 猴头菇多糖-纳米硒的制备、结构表征及其生物活性研究 [J]. 陕西科技大学学报, 2024, 42(2): 53-61.  
Hao Y, Wang H, Yang W J, et al. Study on preparation, structural characterization and biological activity of selenium nanoparticles conjugated with *Hericium erinaceus* polysaccharides [J]. J Shaanxi Univ Sci Technol, 2024, 42(2): 53-61.
- [45] Malinowska E, Lapienis G, Szczepańska A, et al. Selenium-enriched polysaccharides from *Lentinula edodes* *Mycelium*: Biosynthesis, chemical characterisation, and assessment of antioxidant properties [J]. Polymers, 2025,

- 17(6): 719.
- [46] Zhu Z Y, Liu F, Gao H, et al. Synthesis, characterization and antioxidant activity of selenium polysaccharide from *Cordyceps militaris* [J]. Int J Biol Macromol, 2016, 93(Pt A): 1090-1099.
- [47] Dong F, Wang J Y, Li M Z, et al. Preparation and activity study of selenium nanoparticles from polysaccharides of *Moringa oleifera* leaves [J]. J Food Meas Charact, 2025, 19(2): 1011-1021.
- [48] 武童, 汪振炯, 吴雨龙, 等. 蛹虫草基质多糖纳米硒复合物的制备研究 [J]. 食品工业科技, 2017, 38(5): 49-53, 59.
- Wu T, Wang Z J, Wu Y L, et al. Study on the preparation of *Cordyceps militaris* polysaccharide/Nano-Selenium complex [J]. Sci Technol Food Ind, 2017, 38(5): 49-53, 59.
- [49] Zhang F Y, Zhuang J, Li Z X, et al. Nanoparticle-modified microrobots for *in vivo* antibiotic delivery to treat acute bacterial pneumonia [J]. Nat Mater, 2022, 21(11): 1324-1332.
- [50] 夏宇, 王小欢, 韩美华, 等. 以枸杞多糖为载体的紫杉醇纳米粒的制备及治疗乳腺癌的研究 [J]. 中草药, 2024, 55(17): 5812-5821.
- Xia Y, Wang X H, Han M H, et al. Preparation of paclitaxel nanoparticles used *Lycium barbarum* polysaccharide as carrier and study on the treatment of breast cancer [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2024, 55(17): 5812-5821.
- [51] Bhiri N, Masquelez N, Nasri M, et al. Synthesis, characterization, and stability study of selenium nanoparticles coated with purified polysaccharides from *Ononis natrix* [J]. Nanomaterials (Basel), 2025, 15(6): 435.
- [52] Ye S Y, Sun S W, Cai J Y, et al. Advances in the synthesis and bioactivity of polysaccharide selenium nanoparticles: A review [J]. Mini Rev Med Chem, 2024, 24(16): 1535-1554.
- [53] Zhou J J, Zhang D, Lv X Q, et al. Green synthesis of robust selenium nanoparticles *via* polysaccharide-polyphenol interaction: Design principles and structure-bioactivity relationship [J]. ACS Sustainable Chem Eng, 2022, 10(6): 2052-2062.
- [54] Yu Y Z, Xie B, Wang J L, et al. Translational selenium nanoparticles promotes clinical non-small-cell lung cancer chemotherapy *via* activating selenoprotein-driven immune manipulation [J]. Adv Mater, 2025: e2415818.

[责任编辑 孙英杰]