

红色单质硒/DOX-淀粉复合颗粒的 制备及抗肿瘤协同效果分析

肖苏尧,赵力超,刘晓娟,曾颖,庄濠宇,曹庸*

(华南农业大学食品学院,广东广州 510642)

摘要:合成了红色单质硒-多柔比星-淀粉复合纳米颗粒,并作用于肝癌 BEL7404 细胞,采用 MTT 法检测其对细胞的生长抑制情况。将 Na_2SeO_3 还原成红色单质硒,然后通过疏水作用结合到装载有多柔比星(DOX)的淀粉纳米颗粒的表面,形成红色单质硒-多柔比星-淀粉复合颗粒(Se/DOX-StNP);采用 Zeta-size 粒度仪检测其颗粒分布和表面电荷,颗粒直径范围为 50~80nm,表面电荷为 -13.9mV;透射电镜结果显示具有明显核壳结构;颗粒作用于肝癌 BEL7404 细胞,其细胞生长抑制率比相当量的红色单质硒和 DOX-淀粉纳米颗粒(DOX-StNP)的细胞抑制率总和高出 15%,展现了红色单质硒促进 DOX 抗肿瘤活性的协同效果。结果表明,复合制剂实现不同药物的同时给药,有较好的抗肿瘤效果,这将为抗肿瘤药物的药剂学研究提供新的思路。

关键词:红色单质硒,多柔比星,复合纳米颗粒,抗肿瘤,协同效果

Synthesis and synergetic anti-tumor effect of Se/DOX-StNP

XIAO Su-yao, ZHAO Li-chao, LIU Xiao-juan, ZENG Ying, ZHUANG Hao-yu, CAO Yong*

(College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Drug-loaded Se-StNP with size of 50~80nm was obtained by conversion of red element Se on the surface of DOX-loaded StNP, which had obvious shell-core structure, and the surface charge was -13.9mV. Drug-loaded Se-StNPs were incubated with liver cancer BEL7404 cell, and MTT assay was used to detect the cell growth-inhibition ratio. The result showed that the growth-inhibition ratio of Drug-loaded Se-StNPs was higher by 15% than the summation of growth-inhibition ratios of element Se and DOX-StNP. This indicated that the synergetic anti-tumor effect was achieved by using DOX-loaded Se-StNPs. The possible reasons for the synergetic anti-tumor effect of complex nanoparticles were the follows: the first was that the speed of drug-release was slowed down because of the protection of shell-core structure. The second was that element Se eliminated the oxidated material around cells, and inhibited the speed of tumor cell division. In addition the permeability of cell membrane was improved and was available for drug's transporting into cell. The final reason was that the negative element Se increased the electronegation of cell membrane and the permeability of cell membrane was thus improved further.

Key words: red element selenium; doxorubicin; complex nanoparticles; tumor inhibition; cooperating effect

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2012)12-0114-04

硒元素是人体内不可缺少的重要物质,具有重要的生理功能,参与体内多种代谢活动、抗氧化作用和抗癌作用等^[1-5]。美国 Clark 博士^[6]领导的研究小组通过长期的研究表明,合理地补充硒能使癌症发病率和死亡率显著降低。Nuttal^[7]曾提出胶体状态红色元素硒具有抑制肿瘤和提高免疫功能的生物学活性,高学云等^[8-10]将硒化合物应用纳米技术制备得到红色硒纳米颗粒,通过灌喂荷瘤小鼠,可显著抑制荷瘤小鼠的瘤重和瘤重/体重指标,并可显著提高小鼠的脾脏天然杀伤细胞活性和腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞能力。硒的抑癌作用主要是由于其抗氧化

作用和提高系统免疫力而实现的,另外它还能杀伤肿瘤细胞,而且对受到损害的 DNA 进行修复、影响细胞增殖周期,是一种具有防癌抗癌功能的无机元素^[11-14]。但是,由于硒为无机物质,很难以单方使用,而且在体内的使用剂量受到限制,抑癌效果发挥不了,因此影响了在癌症治疗上的广泛应用。为了扩展硒在癌症治疗中的应用,充分发挥其抗癌功能,本文考虑将亚硒酸盐还原为具有生物活性的红色硒,与常用抗癌药物多柔比星(DOX)联合,采用纳米制备手段研制出红色单质硒/多柔比星-淀粉复合纳米颗粒,并检验其对肝癌细胞的体外抑制效果,进而探讨其阻止癌细胞出现抗药耐药性的效果。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

肝癌细胞 BEL7404 本实验室提供;盐酸多柔比星 Doxorubicin · HCl, DOX, Sigma 公司; RPMI1640 完全培养基 北京鼎国生物公司;

收稿日期:2012-02-09 *通讯联系人

作者简介:肖苏尧(1974-),女,博士,讲师,研究方向:纳米功能材料和天然活性物质。

基金项目:国家自然科学基金(31100433);“林业重大公益性行业科研专项”(201104003-03)。

Na_2SeO_3 、Vc、罗丹明 B、甲苯等试剂 均为国产分析纯。

19HW-1 恒温磁力搅拌器 中国江苏; 高速离心机 日本, 日立公司; F2500 荧光分光光度计 日本, Hitachi; JSM-5600LV 透射电子显微镜 日本 JEOL 公司; UV-1600 型紫外可见分光光度计 北京瑞利公司; Zeta-Sizer 电位分析仪 英国 Malvern 公司; CO_2 细胞培养箱 美国 Nuair AutoFlow; 酶标仪 美国 Thermo Electron。

1.2 实验方法

1.2.1 以淀粉为内核的红色单质硒纳米颗粒 (Se/StNP) 的制备及清除自由基活性检测 称取按照文献[15]制备成的淀粉纳米颗粒 (StNP) 300mg 悬浮于双蒸水溶液中, 并依次溶入 50mg Na_2SeO_3 、100mg Vc, 1000r/min 的速度搅拌 30min, 得到红色透亮的溶液。再加入 100mg 的 PEG4000 终止反应。18000r/min 离心 1h, 超纯水洗涤, 真空冷冻干燥, 得到红色硒淀粉纳米颗粒 Se/StNP。

采用荧光法^[16], 通过 Fenton 试剂和罗丹明 B 的体系, 检测 Se/StNP 的清除自由基能力。

1.2.2 以载 DOX 淀粉为内核的红色单质硒 (Se/DOX-StNP) 复合纳米颗粒的合成 称取 300mg StNP 溶于 50mL 去离子水中, 在溶液中再加入一定量除去盐酸的抗肿瘤药物 DOX, 使得溶液中 DOX 的浓度分别为 0.5、1.0、1.5、2.0mg/mL, 室温下振荡共孵育一定时间; 在反应液中依次溶入 Na_2SeO_3 、过量 Vc, 1000r/min 搅拌 30min, 得到红色透亮的溶液, 再加入 PEG4000 中止反应。18000r/min 离心 1h, 超纯水洗涤, 真空冷冻干燥, 得到红色纳米颗粒 Se/DOX-StNP。

1.2.3 Se/DOX-StNP 复合纳米颗粒的表征及药物释放检测 Se/DOX-StNP 的形态学表征及稳定性检测: 上述制备的纳米颗粒分散悬浮于双蒸水中, 取少量滴加在透射电子显微镜专用铜片上, 红外光烘烤至完全干燥, 用透射电子显微镜检测颗粒的形态。再将纳米颗粒分散悬浮于双蒸水中, 用 Zeta-Sizer 粒度分析仪进行颗粒大小和电性检测。

Se/DOX-StNP 的 DOX 含量及释放检测: 取 50mg 制备的 Se/DOX-StNP 悬浮于 10mL 水中, 加入 (-淀粉酶, 37℃ 振荡温浴 6h, 使颗粒内淀粉内核完全降解, 冷却, 准确定容, 然后用紫外可见分光光度计检测消化液中 DOX 的量, 检测波长为 480nm, 硒、淀粉和淀粉酶在该波长处无吸收。以 DOX 的水溶液做标准曲线。10mg Se/DOX-StNP 复合物悬浮于 PBS (pH7.4) 中, 用透析袋进行透析, 透析液为 50mL 的 PBS (pH7.4), 于 37℃ 下以 100r/min 的转速振荡, 每隔一定时间取出 5 mL 透析液, 再加入 5mL PBS 以维持透析液的体积。用紫外可见分光光度计检测透析液中 DOX 的量, 检测波长为 480nm, 以 DOX 的 PBS 溶液做标准曲线。

1.2.4 Se/DOX-StNP 复合颗粒作用于肝癌细胞 将 Se/DOX-StNP 作用于肝癌细胞, 考察其细胞抑制效果, 找出最佳抑制浓度。肝癌细胞 BEL7404 接种于 96 孔培养板中, 加入 RPMI1640 完全培养液于 CO_2

培养箱中培养 24h。然后在培养板中加入实验药物, 实验组分为 DOX 组、Se/StNP 组和 Se/DOX-StNP 组和空白组, 每组设 4 个浓度梯度, 每个浓度设 4 个平行孔, 空白组加入 BEL7404 培养基 10 μL /孔, 各组分别设空白孔调零。在培养箱中继续培养 12h, 然后加入 1mg/mL MTT 溶液 20 μL /孔继续培养 4h, 将培养基倒掉, 用 D-hanks 洗涤一次, 再加入 100 μL DMSO, 使细胞完全溶解, 用酶标仪在波长为 570nm 处测吸光值 A 值。该实验重复 4 次。按公式计算药物对细胞生长抑制的影响: 细胞生长抑制率 (%) = (1 - 处理组 A 值/对照组 A 值) × 100。

以 Se/DOX-StNP 的最佳抑制浓度为实验浓度, 并以相当量的 DOX 和 Se/StNP 为对照浓度, 进行协同效果比较, 实验方法如上所述。

1.2.5 数据分析 数据采用 SPSS18.0 进行统计, 数值以平均值 ± 标准差表示。

2 结果与讨论

2.1 Se/StNP 颗粒清除自由基活性检测

Se/StNP 清除自由基活性结果如图 1 所示, 在该实验浓度范围内, Se/StNP 的自由基清除率明显高于无机硒盐 Na_2SeO_3 , 并稍高于常用抗氧化剂 Vc, 结果显示 Se/StNP 具有较强的抗自由基活性, 这为红色单质硒结合到载药颗粒上与药物进行联合治疗提供了理论依据。

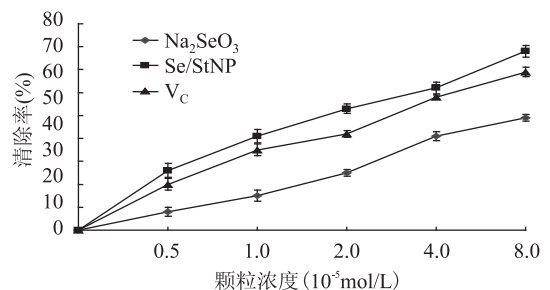


图1 红色单质硒/淀粉纳米颗粒自由基清除活性测定

Fig.1 Effect of scavenging compared between different antioxidants

2.2 Se/DOX-StNP 制备条件选择

考察了合成体系中药物与 Na_2SeO_3 含量对颗粒载药量和颗粒直径的影响, 结果如表 1 所示, DOX 在溶液中的浓度对载药量有直接的影响, 浓度越大, 载药量越高, 但是浓度在 2mg/mL 以上时, 载药量没有大的变化, 可能是因为颗粒载药达到饱和; Na_2SeO_3 的量非常显著地影响颗粒直径, 因为量越大, 被还原的单质硒越多, 过多的硒附着在淀粉纳米颗粒表面, 自然就增加了颗粒的直径。透射电镜观察显示, 硒层厚度适中时, 颗粒可观察到明显的核壳结构, 硒层过厚, 颗粒被包裹得过于严实, 观察不到颗粒的核壳结构, 不利于药物的释放。通过上述因素的讨论及透射电镜检测效果, 我们选择了方案 5 作为制备颗粒的条件, 即以在加有 100mg 淀粉纳米颗粒的水溶液中, 药物浓度为 2mg/mL、 Na_2SeO_3 为 10mg 作为颗粒的制备条件。

表1 载药红色单质硒/淀粉纳米颗粒制备影响因素

Table 1 The factors affected on Se/DOX-StNP synthesis

实验号	多柔比星 (mg/mL)	亚硒酸钠 (mg)	载药量 ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	颗粒直径 (nm)
1	1	5	18 ± 2	65
2	1	10	19 ± 4	72
3	1	20	21 ± 3	105
4	2	5	32 ± 4	66
5	2	10	36 ± 2	71
6	2	20	38 ± 5	112
7	3	5	38 ± 3	64
8	3	10	39 ± 5	75
9	3	20	38 ± 3	108

2.3 Se/DOX-StNP 的透射电子显微镜检测和粒度分析

以透射电子显微镜检测 Se/DOX-StNP 复合颗粒(图2),颗粒呈圆球形,分散性好,颗粒直径绝大部分在 50~80nm 之间。Zeta-Sizer 粒度分析仪检测得到 Se/DOX-StNP 颗粒直径范围为 40~100nm,平均直径为 71nm,与透射电镜所得结果基本一致。从透射电镜还可以看出颗粒的核壳结构:小颗粒可以明显地看到内核为白色,外周为黑色的圈;大颗粒一般颜色都较深,可能附着较厚的硒层。这初步说明了在所选择的反应条件下颗粒的形成过程为: Na_2SeO_3 被 V_c 氧化后生成红色单质 Se,Se 再快速结合到溶液中已经存在的 DOX-StNP 上,并形成规则的单层结构。若反应体系中形成的 Se 过量,或搅拌不均匀,就会在部分颗粒表面形成较厚的壳层,增加颗粒的直径,即形成图中直径较大、颜色较深的颗粒。Zeta-Sizer 粒度分析仪同时检测得到 Se/DOX-StNP 带负电,平均带电荷为 -13.9mV,可能的原因是表面的单质 Se 带有大量的外层电子所致。

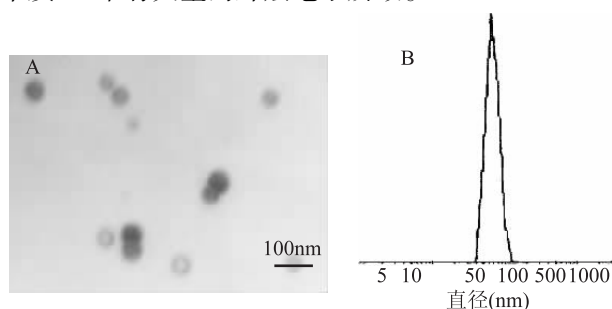


图2 载药红色单质硒/淀粉纳米颗粒的透射电镜图(A, $\times 10^5$)和颗粒直径分布图(B)

Fig.2 TEM image cure

of diameter diffribution of Se/DOX-StNP

2.4 复合颗粒载药量及药物释放检测

DOX 在波长 480nm 处有最大吸收峰,以标准曲线法检测到颗粒最大装载药物的量为 $39\mu\text{g}/\text{mg}$,明显大于对照颗粒 DOX-StNP 中装载药物的含量($28\mu\text{g}/\text{mg}$),可能的原因是单质硒附着在载药颗粒外表面的过程中,包裹进了一些药物,另外,硒壳层也保护了非特异性吸附在颗粒上的药物不会在颗粒洗涤过程中被洗脱,从而增加了药物的装载量。

将载药颗粒在 PBS (pH7.4) 缓冲液中透析,检测

药物释放,结果如图3所示,与对照相比,Se/DOX-StNP 出现了更加明显的药物缓慢释放现象:DOX 溶液在 5h 左右就很快地完全释放;DOX-StNP 的药物释放一半所需的时间 $T_{1/2}$ 为 12h,而 Se/DOX-StNP 的药物半释放时间 $T_{1/2}$ 为 19h;透析 48h 后,DOX-StNP 的药物释放量为 77%,而 Se/DOX-StNP 只有 63%。由此可知,硒壳层对内核中的药物具有一定控制释放的作用,有利于延长药物的作用时间。

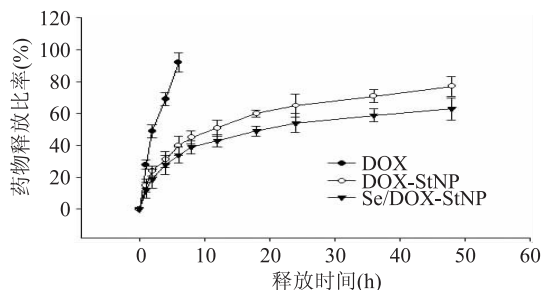


图3 载药红色单质硒/淀粉纳米颗粒药物释放曲线

Fig.3 Drug release curve of Se/DOX-StNP

2.5 Se/DOX-StNP 对肝癌细胞的协同作用考察

2.5.1 Se/DOX-StNP 对肝癌细胞的生长抑制 以不同浓度的 Se/DOX-StNP 作用于肝癌细胞,用 MTT 法检测颗粒对细胞的生长抑制效果,结果如图4所示,当复合颗粒浓度小于 100mg/L 时,细胞抑制率随浓度增加呈线性增加,浓度大于 100mg/L 时,细胞抑制率趋于稳定,因此我们选择载药颗粒在培养基中浓度为 100mg/L 进行下一步研究。

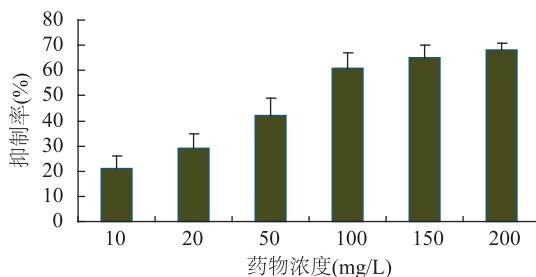


图4 载药红色单质硒/淀粉纳米颗粒对肝癌细胞的生长抑制

Fig.4 Inhibiting affect on liner cancer of Se/DOX-StNP

2.5.2 Se/DOX-StNP 复合颗粒的协同效果考察

MTT 法检测结果如图5所示,单独 Se/StNP 的细胞生长抑制率为 15%,单独 DOX-StNP 的细胞抑制率为 34%,而复合颗粒 Se/DOX-StNP 的细胞抑制率达到 64%,比前二者抑制率的总和还高出 15%,由此可以初步判断,Se/DOX-StNP 中的 Se 与 DOX 之间具有一定程度的协同作用。分析出现协同作用原因可能有如下三点:a.单质硒壳层保护了颗粒装载的抗癌药物 DOX,使之释放的速度减缓,从而延长了药物作用细胞的时间;b.红色单质硒的抗自由基活性消除了细胞周围的氧化性物质,降低了肿瘤细胞的分裂速度;c.单质硒晶体表面的负电荷加强了细胞膜的电负性,进一步改善了细胞膜的通透性,从而使药物更容易进入到细胞内部,加强了对细胞的抑制作用。

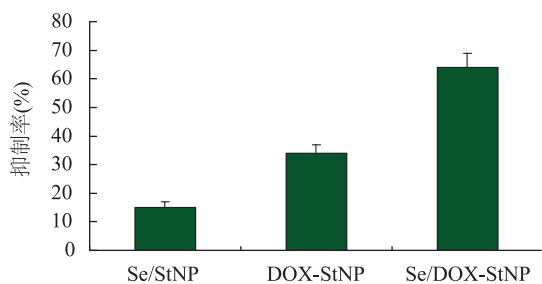


图5 载药红色单质硒/淀粉纳米颗粒的癌细胞生长抑制效果比较

Fig.5 Scavenging effect comparing between anti-drugs

3 结论

将高价硒通过氧化还原反应得到具有抗氧化性的红色单质硒,并使之结合到装载有抗肿瘤药物DOX的淀粉纳米颗粒表面,首次成功制备了具有明显核壳结构的红色单质硒-淀粉复合纳米药物载体。该复合载药颗粒作用于肝癌细胞,肝癌细胞生长抑制作用明显增强,红色单质硒与抗肿瘤药物之间出现了明显的协同效果。分析其原因,一方面是硒壳层增强了载药颗粒的稳定性,减缓了药物的释放,延长了药物与细胞的作用时间,另一方面可能为红色单质硒的抗氧化作用和表面的大量游离电子改善了肝癌细胞膜的通透性^[9-11],使更多的载药颗粒进入到细胞内部,增加了细胞内药物的浓度,从而增强了药物的疗效。利用淀粉纳米颗粒作为载体,将对肿瘤细胞作用机制完全不同的抗肿瘤药物结合到同一个药物载体上,实现不同药物的同时给药,并获得了抗肿瘤药物之间的协同效果。这将为抗肿瘤药物的药剂学研究提供新的思路。但是Se与DOX之间以多大的比例结合才能达到最好的协同效果,以及将复合颗粒作用于活体肿瘤能否起到同样的效果,这些工作还有待于我们更进一步研究探讨。

参考文献

- [1] Martínez-Peinado M, Noguera-López F, Arcos-Cebrián A, et al. Serum selenium levels in cirrhotic patients are not influenced by the disease severity index [J]. *Nutrition Research*, 2010, 30(8):574-578.
- [2] Zhong W X, Oberley T D. Redox-mediated effects of selenium on apoptosis and cell cycle in the LNCaP human prostate cancer cell line [J]. *Cancer Research*, 2001, 61(10):7071-7078.
- [3] Dong Y, Lisk D, Block E. Characterization of the biological activity of (- Glutamyl - Se - methylselenocysteine; a novel, naturally occurring anticancer agent from garlic [J]. *Cancer Research*, 2001, 61(4):2923-2928.

(上接第113页)

- [4] cancer—a mini review [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2008, 60(2):139-144.
- [5] Singh R P, Chidambara Murthy K N, Jayaprakash G K. Studies on the antioxidant activity of pomegranate peel and seed extracts using in vitro models [J]. *Ginkgo Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2002, 50:81-86.
- [6] Lourdes Massieu, Julio Moran, Yves Christen. Effect of ginkgo biloba (EGb 761) on staurosporine-induced neuronal death and

- [4] Chen T F, Wong Y S, Zheng W J, et al. Selenium nanoparticles fabricated in undaria pinnatifida polysaccharide solutions induce mitochondria-mediated apoptosis in A375 human melanoma cells [J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2008, 67(1):26-31.

- [5] 陈义朗,李新生,钟三子,等.两种新型有机硒化合物的合成及其抗癌活性的研究[J].*化学试剂*,2004,26(5):261-262.
- [6] Clark L C, Combs G F, Turnbull B W, et al. Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin: A randomized controlled trial [J]. *JAMA*, 1996, 276(24):1957-1963.
- [7] Nuttall K L. Elemental selenium and glutathione reductase [J]. *Med Hypotheses*, 1985, 16(2):155-159.
- [8] Gao X Y, Zhang J S, Zhang L D. Hollow sphere selenium nanoparticle: their in-vitro anti hydroxyl radical effect [J]. *Advanced Materials*, 2002, 14(4):290-292.
- [9] 高学云,张劲松,张立德,等.纳米红色元素硒抑制肿瘤和提高免疫功能的作用[J].*中国公共卫生*,2003,25(19):309-310.
- [10] Zadrožna M, Gawlik M, Nowak B, et al. Antioxidants activities and concentration of selenium, zinc and copper in preterm and IUGR human placentas [J]. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 2009, 23(2):144-148.
- [11] Zhang H X, Zhang P. Synthesis of Vitamin - selenium complex and its effects on proteins and tumor cells [J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2011, 83(1):406-410.
- [12] Vonnahme K A, Wienhold C M, Borowicz P P, et al. Supranutritional selenium increases mammary gland vascularity in postpartum ewe lambs [J]. *Journal of Dairy Science*, 2011, 94(6):2850-2858.
- [13] Shiobara Y, Ogra Y, Suzuki K T. Exchange of endogenous selenium for dietary selenium as 82 Se-enriched selenite in brain, liver, kidneys and testes [J]. *Life Science*, 2000, 67(14):3041-3049.
- [14] Sanchez V, Camarero J, O'Shea E. Differential effect of dietary selenium on the long-term neurotoxicity induced by MDMA in mice and rats [J]. *Neuropharmacology*, 2003, 44(3):449-461.
- [15] Xiao S Y, Liu X M, Tong C Y, et al. Studies of poly-l-lysine-starch nanoparticle preparation and its application as gene carrier [J]. *Science in China Ser B Chemistry*, 2005, 48(2):162-166.
- [16] 童春义,薛昌刚,刘选明,等.荧光法-MTT法检测红色纳米硒的抗氧化活性[J].*分析化学*,2006(12):1752-1754.

- caspace activity in cortical cultured neurons [J]. *Brain Research*, 2004, 1002:76-85.

- [7] Kumaran A, Karunakaran R J. Activity-guided isolation and identification of free radical-scavenging components from an aqueous extract of *coleus aromaticus* [J]. *Food Chemistry*, 2007, 100(1):356-361.
- [8] 苗利利,仇农学,庞福科.石榴籽油的理化性质及清除自由基能力研究[J].*食品工业科技*,2010,31(1):155-157.