

doi: 10.3969/j.issn.0490-6756.2018.05.024

SeMet/CS 纳米复合微球的制备、 缓释性能及抑制肿瘤活性

冉青¹, 商龙臣², 吴少尉¹, 李光大³, 刘信平¹

(1. 湖北民族学院化学与环境工程学院, 恩施 445000; 2. 湖北民族学院生物科学与技术学院, 恩施 445000;
3. 河南科技大学医学技术与工程学院, 洛阳 471003)

摘要: 研究 SeMet 硒化物的可控缓释系统. 以 CS 为壁材、SeMet 为药物模型, 采用乳化交联法制备 SeMet/CS 纳米复合微球, 以单因素实验和正交试验优化制备工艺, 结合原子荧光光谱、IR、热重分析及 SEM 对产物的形貌、结构及性能进行评价和表征, 并对其体外缓释和抑制人乳腺癌细胞 MCF-7 细胞生长等性能进行研究. 结果表明: 最优工艺条件(0.1%的投药量、2%的交联剂用量、50 °C 交联 10 min)制备的 SeMet/CS 微球, 形貌优良, 包封率和载药量分别为 31.94% 和 0.54%, 体外缓释硒的性能良好, 对 MCF-7 细胞的生长抑制率随微球缓释时间增加而增加. SeMet/CS 缓释硒复合微球有效避免了硒的突释效应, 实现了硒剂量的把控, 可作为硒化药物或硒补充剂应用于医疗、食品和精细化工等相关行业.

关键词: SeMet/CS 微球; 制备表征; 性能

中图分类号: O627.6

文献标识码: A

文章编号: 0490-6756(2018)05-1057-10

Preparation and sustained-release property of SeMet/CS microsphere and its inhibitory effects on cancer cells

RAN Qing¹, SHANG Long-Chen², WU Shao-Wei¹, LI Guang-Da³, LIU Xin-Ping¹

(1. College of Chemistry and Environment Engineering, Hubei Minzu University, Enshi 445000, China;

2. College of Biological Science and Technology, Hubei Minzu University, Enshi 445000, China;

3. College of Medical Technology and Engineering, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China)

Abstract: SeMet/CS Nanocomposite microspheres were prepared by using emulsion crosslinking with SeMet as a core material and chitosan(CS) as a wall material. The work in this paper focused on the indicators of microspheric form, drug-loading rate, entrapment efficiency and slow-release property using the single-factor and orthogonal test to optimize the preparation technology. During the processes, a scanning electron microscope, a Fourier infrared spectrometer, a thermal analyzer and double-channel atomic fluorescence were applied for detection, analysis and characterization. Furthermore, in vitro tests, such as for the selenium-releasing property and anticancer activity, were studied for the prepared selenium microsphere. The data indicated that the SeMet/CS microsphere prepared under the optimum conditions of 0.1% dosage and 2% dosage of crosslinking agent were crosslinked at 50 °C for 10 min. The obtained SeMet/CS microspheres exhibited superior features, with an excellent morphology and an embed-

收稿日期: 2018-03-20

基金项目: 国家自然科学基金(21461009, 81402225, 21565013)

作者简介: 冉青(1990-), 女, 湖北恩施人, 硕士, 主要从事化学材料的研究与开发. E-mail: 1483804446@163.com

通信作者: 刘信平. E-mail: xingping-liu@163.com

ding ratio and drug loading of 31.94% and 0.59%, respectively. They displayed excellent sustained-release capability in an SBF model. Regarding anticancer activity, they showed a significant inhibitory effect on MCF-7 human breast cancer cells, and there was a positively correlated between the inhibition rate and the content of selenium in the sustained-release liquid. The SeMet/CS microsphere can effectively avoid a burst effect for selenium, allowing a controlled selenium dose. Thus, it can be used in selenide or selenium supplements for further application in medical, food and fine chemical industries.

Keywords: SeMet/CS microsphere; Preparation and characterization; Property

1 引言

随着近代对人体微量营养元素硒的抗肿瘤、抗氧化等多种生理活性功能^[1,2]研究的深入,硒化物在医药、食品、精细化工等多领域备受关注^[3,4].但硒与其他人体必需微量元素一样具有两面性^[5,6],适量有益,超量中毒有害,如何把控有效硒剂量尺度,成为目前硒化物应用中亟待解决的瓶颈.有机硒 SeMet (Selenomethionine, 硒代蛋氨酸)是当前相对较好的补硒源,但应用中存在着需存储于-20 °C 的低温环境(避免释放至环境引发高浓度硒中毒)和量的难控性问题,抑制了其广泛应用.载药缓释材料因能实现药物靶向治疗、剂量控制、安全稳定等优良性质成为近年来研究热点^[7,8].CS(Chitosan,壳聚糖)不仅具有抑菌、止血、抗癌、降脂、增强免疫等多种生理功能,且因其良好的吸附性、成膜性和生物相容性,被广泛用作研发载药缓释材料的壁材,载药壳聚糖微球的研究已取得一定进展^[9-13],但可控缓释硒微球材料的研究国内外尚少见报道,文献报道将单质硒或亚硒酸离子直接涂层成镀硒钛材料^[14],用作载骨质疏松修复材料,该硒的负载方式存在突释效应.

针对 SeMet 应用中存在的存储和控量问题,本文结合 CS 和 SeMet 的优良特性,将 SeMet 包裹于 CS 壁材内,制备安全稳定的 SeMet/CS 缓释硒复合微球,实现硒剂量的长效控释,可作为食品、医药、精细化工等相关行业的补硒材源.本研究结果以期为硒化物应用中有效硒剂量的把控、后期体内抗肿瘤试验在剂量范围等方面奠定必要的实验基础,同时为缺硒人群提供一条新的科学补硒途径.

2 材料与主要试剂、仪器

CS(上海伯奥生物科技有限公司,脱乙酰度>90%),SeMet(梯希爱化成工业发展有限公司),CCK-8(同仁化学研究所),双抗(10000 Units/mL

Penicillin, 10000 μg/mL Streptomycin, Thermo Fisher Scientific), RPMI-1640 高糖培养基(江苏恩莫阿赛有限公司),胎牛血清(江苏恩莫阿赛有限公司),胰酶,EDTA 二钠,乙酸,HCl,戊二醛,液体石蜡,Span-80,石油醚,丙酮,无水乙醇,NaCl,NaHCO₃,KCl,K₂HPO₄·3H₂O,MgCl₂·6H₂O,CaCl₂,Na₂SO₄,三羟甲基氨基甲烷,人乳腺癌细胞 MCF-7(由中国医学科学院基础医学研究所细胞资源中心提供)硒标准溶液(100 μg/mL,中国计量科学研究院).所有药品或试剂均为国产分析纯或优级纯.

离心机(TDL-80-2B,上海安亭科学仪器厂),pH 计(PHSJ-3F,上海精密科学仪器有限公司),移液枪(Dragon Laboratory Instruments Limited),傅里叶红外光谱仪(Thermo Fisher Scientific,美国),微波消解仪(CEM Corporation,美国),AFS-9760 双道原子荧光光度计(北京海光仪器公司),体视荧光显微镜(Nikon,日本),扫描电镜(JSM-7001F,日本),酶标仪(Thermo Fisher Scientific 美国),超净工作台(苏州苏杰净化设备有限公司).

3 实验

3.1 SeMet/CS 纳米复合微球的制备

取 25 mL Span-80 于 500 mL 烧杯中,加入 475 mL 液体石蜡,磁力搅拌混匀,即制备微球所用油相;准确移取 5 mL 冰乙酸于 500 mL 容量瓶中,以纯水定容,摇匀得 1%(v/v)的醋酸溶液;分别称取 0.05、0.1、0.2 和 0.4 g SeMet 于烧杯中,依次加入 1%醋酸溶液 50 mL,磁力搅拌使 SeMet 完全溶解,再将 1.0 g 壳聚糖加入各烧杯中,磁力搅拌至完全溶解,得 SeMet 浓度分别为 0.1%、0.2%、0.4% 和 0.8%(m/v)的壳聚糖醋酸溶液,减压过滤后于 4 °C 冰箱中静置过夜,得制备微球所用含硒水相;取 50 mL 油相于 100 mL 烧杯中,将 10 mL 水相在不断磁力搅拌(转速为 1000 rpm)

下逐滴加入油相,加完继续 25 °C 乳化 30 min 后,转移至设定温度的水浴锅中,保持搅拌速度不变,滴加交联剂(25%的戊二醛)反应一定时间后,加入 25 mL 丙酮破乳,取出后以砂芯漏斗减压过滤,先后以丙酮和无水乙醇抽滤洗涤数次,40 °C 烘干后得微球。

单因素实验:制备过程中,保持其它的变量条件不变,依次改变投药量(0.1%、0.2%、0.4%、0.8%)、交联剂用量(0.1、0.2、0.4 和 0.8 mL)、固化温度(40、50、60 和 70 °C)和固化时间(10、20、40 和 80 min)进行单因素实验,以包封率、载药量和微球形貌为指标对制备的微球进行评价分析。

正交试验:在单因素实验基础上,设计 4 因素 3 水平的 $L_9(3^4)$ 正交实验优化微球的制备工艺。

3.2 微球的形貌、结构性能表征和测定

用光学显微镜和 SEM 扫描电镜对微球的粒径和形貌进行检测;用红外光谱仪检测其 IR 光谱;用热分析仪测定微球的热性能;样品微波消解后,用双道原子荧光法测定硒含量,并根据公式(1)、(2)计算微球的包封率和载药量:

$$\text{包封率} = \frac{\text{微球中硒的质量}}{\text{投入硒的质量}} \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{载药量} = \frac{\text{微球中硒的质量}}{\text{微球的质量}} \times 100\% \quad (2)$$

3.3 微球的体外缓释性能检测

微球释硒速率的测定:取微球 3 份,每份准确称取 0.020 g 装入透析袋中,将透析袋放入 10 mL 聚乙烯样品管中,向其中加入 10 mL 模拟体液(SBF,参照文献^[15]所述方法配制),37 °C 恒温水浴,分别在微球缓释 0.5、1、2、4、6、10、14 和 26 h 时取样 1 次,之后每隔 24 h 取样一次。每次取出缓释液 5 mL,检测硒含量并计算微球的累计释放量,并同时补加同体积和温度的 SBF,取样同时检测缓释液的 pH。

3.4 微球的体外抗肿瘤活性检测

医学上测定物质体对外细胞凋亡的抑制作用,主要采用传统的 MMT 法^[16-18]及其改良法 CCK-8^[19-21]。本文以乳腺癌细胞 MCF-7 为细胞模型,采用 CCK-8 法检测微球的体外抗肿瘤活性,SPSS 20.0 软件进行统计处理。

以 pH=7.4 的 PBS 缓冲溶液为溶剂,将胰蛋白酶配成 $2.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤,4 °C 冰箱储备;

待测微球缓释液配制:取空白微球和载药微

球各 4 份,每份准确称取 0.3 g,置于 10 mL 具塞样品管中,紫外照射 30 min 后,每管加入 6 mL 细胞培养液摇匀,移至 37 °C 培养箱中缓释。每种微球的第 1 份缓释 0.5 h、第 2 份缓释 3 h、第 3 份缓释 10 h、第 4 份缓释 50 h。缓释结束,离心取上清液, $0.2 \mu\text{m}$ 的微孔滤膜过滤除菌。

待测裸药配制:准确称取裸药(SeMet)0.010 g,以 1 mL 细胞培养液溶解并稀释,得裸药浓度分别为 200、100 和 $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的含硒培养液, $0.2 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤除菌。

取对数生长期的人乳腺癌 MCF-7 细胞,消化后制成细胞悬液,以细胞计数板对其计数后,调整细胞浓度至 4.375×10^4 个/mL,接种至 96 孔板中,每孔 200 μL ,放入培养箱中预培养 24 h。取出,小心吸去培养液,取待测微球缓释液和待测裸药溶液各 200 μL 加入到 96 孔板中,每个试样设置 3 个复孔,同时设置对照孔和空白孔。将培养板转移至培养箱中分别培养 24、48 和 72 h 后,每孔加入 20 μL CCK-8 试剂,放回培养箱孵育 40 min 后取出,用酶标仪测定其在 450 nm 处的吸光度,计算各试样对乳腺癌细胞 MCF-7 的生长抑制率。数据以 $x \pm s$ 表示,以 SPSS 20.0 软件进行统计处理,采用单因素方差分析比较组间差异的显著性水平,抑制率按公式(3)计算:

$$\text{抑制率} = \frac{(A_c - A_s)}{(A_c - A_b)} \times 100\% \quad (3)$$

式中, A_s 为实验孔的吸光度; A_c 为对照孔的吸光度; A_b 为空白孔的吸光度。

4 结果与分析

4.1 各因素的不同变量水平对微球包封率的影响

图 1 为各因素不同变量水平对微球包封率的影响。由图 1 可知,当投药量和交联剂用量分别为 0.2%(g/mL)和 0.2 mL 时,包封率分别达到最大值,过高或者过低的投药量及交联剂用量在一定程度上降低微球的包封率。主要原因在于,随着芯材投入量和交联剂用量的倍增,形成微球壁的醛胺缩合反应并未随之成倍增长,故产物微球也未倍增。因此,只有适量的芯材投入量和交联剂用量才有利于提高微球的包封率;当固化温度和固化时间分别为 50 °C 和 20 min 时,其包封率分别达到最大值,过低或过高的固化温度以及过短或过长的固化时间,都不利于微球包封率的提高。其主要原因在于,温度和时间会影响微球形成的

醛胺缩合反应, 固化温度过低或者固化时间过短, 不利于微球的形成, 降低微球包封率. 固化温度

过高或者固化时间过长, 会导致微球过度交联, 球壁太厚反而降低芯材的包埋.

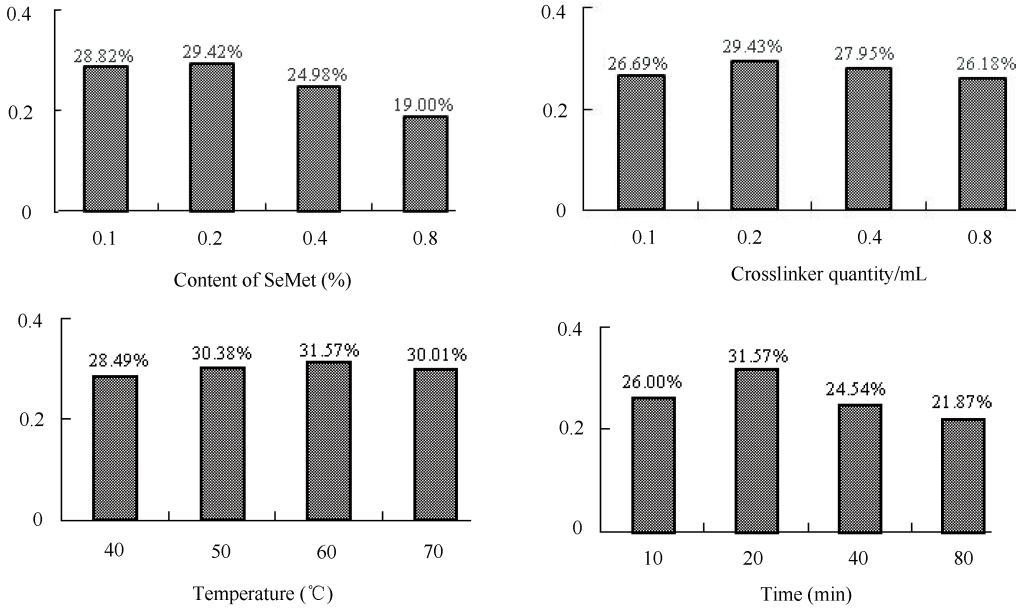


图 1 各因素不同变量水平载硒微球包封率的影响

Fig. 1 Effects of different variable levels on the encapsulation efficiency of SeMet/CS microsphere

4.2 各因素的不同变量水平对微球载药量的影响

图 2 为各因素不同变量水平对微球载药量的影响, 由图可知, 微球载药量随投药量的增加而增加. 但微球包埋的芯材并未随着投药量的倍增而倍增, 说明投药量的过度增加, 芯材的利用率反降低; 交联剂用量为 0.2 mL 时载药量达到了最

大值, 随着交联剂用量的增加, 微球的载药量并未使之增加, 因为过多的戊二醛会与芯材 SeMet 发生醛胺缩合反应, 消耗了芯材, 使得微球的载药量降低; 固化温度和固化时间对两种微球载药量的影响较一致, 过度的交联反应会消耗 SeMet, 而适当的交联反应则会一定程度的提高微球载药量.

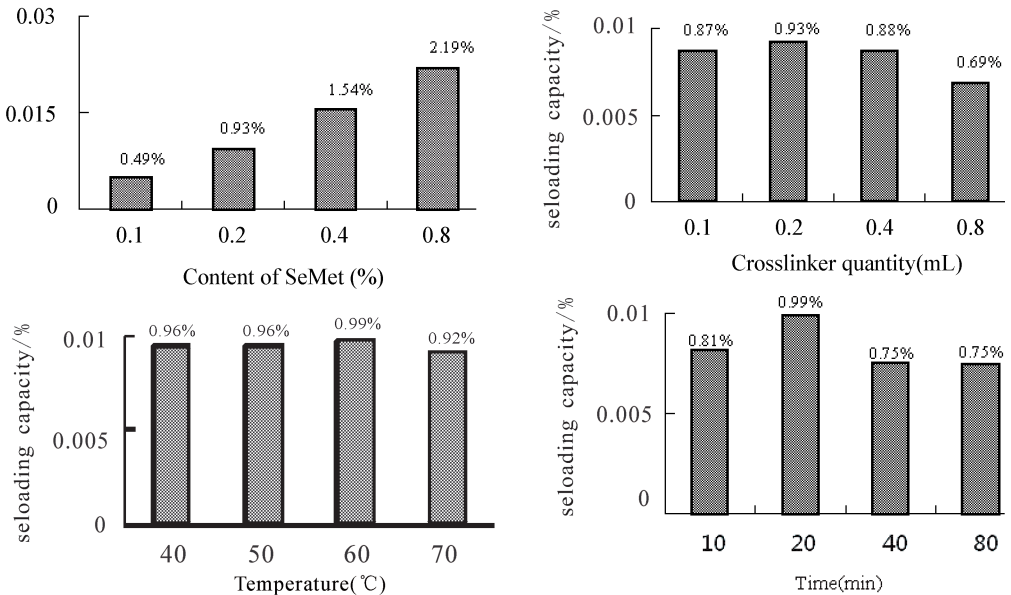


图 2 各因素不同变量水平对乳化交联法载硒微球载药量的影响

Fig. 2 Effects of different variable levels on the drug loading capacity of SeMet/CS microsphere

4.3 不同变量水平对微球形貌的影响

图 3 为不同变量水平对微球形貌的影响, 由图可知, 不同变量水平制备的 SeMet/CS 微球, 平均粒径为 10 μm , 外观大多呈光滑的球状, 只有极少数外观粗糙、不规则块状物, 这些块状物主要是一些未球的壳聚糖碎块。

投药量对微球形貌的影响差异较小, 各个投药量水平下制备的微球外观较为一致; 但交联剂的

用量对微球形貌的影响有显著差异, 随着交联剂用量的增多, 能较多的形成大小均一、球形外观好、色泽随之加深的 SeMet/CS 微球, 且微球间的粘连也相应减少; 对于温度和时间变量的不同水平对微球外观的影响, 变化趋势与交联剂的相似。由此可推断: 交联化程度对微球的外观有较大的影响, 在其他条件不变的前提下, 微球交联度越大, 微球的形貌越规则, 色泽愈深, 粘连越少。

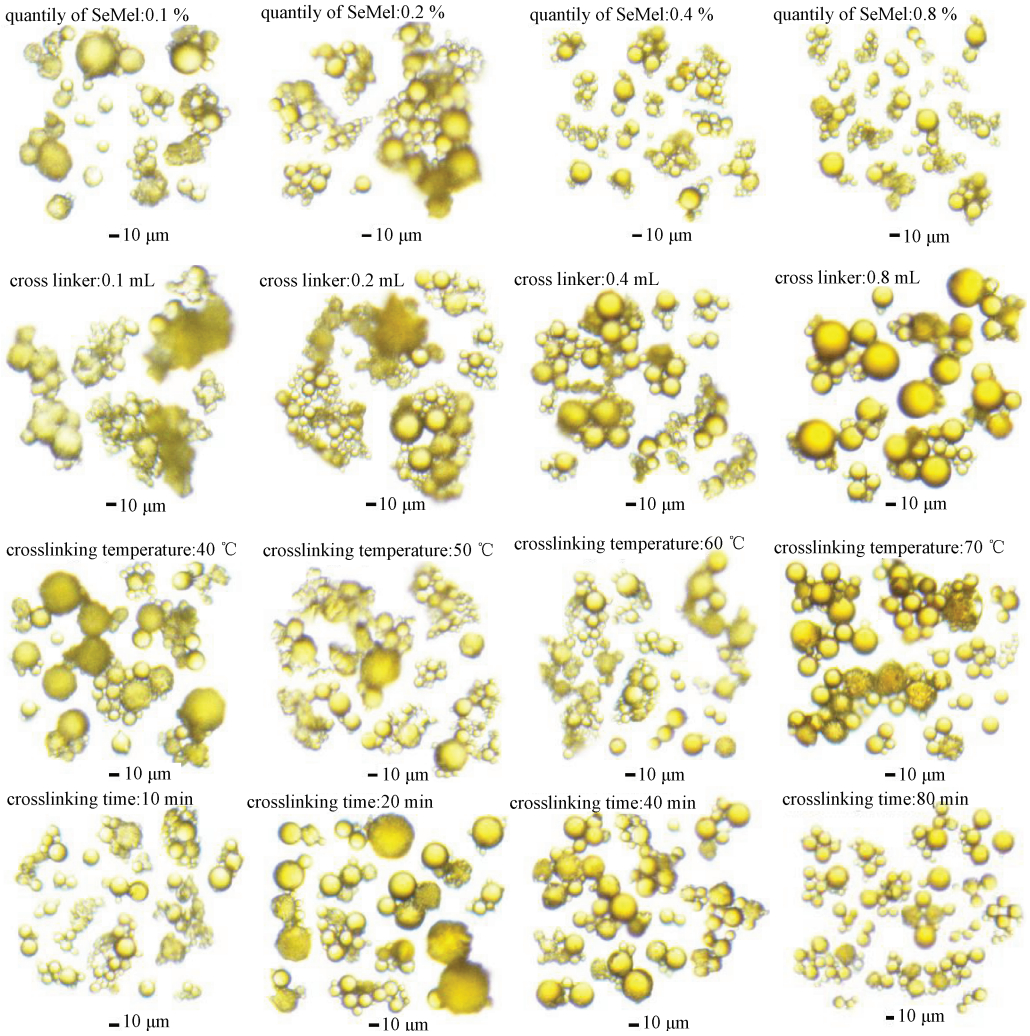


图 3 不同变量水平对 SeMet/CS 微球形貌的影响
Fig. 3 Effects of different variable levels on the appearance of SeMet/CS microsphere

4.4 正交试验结果及其方差分析

表 1 为正交试验方案和结果, 以包封率为评价指标, 采用 SPSS 20.0 统计软件对表 1 进行方差分析, 结果见表 2 和表 3。

由表 2 的方差结果可知, $F_A=47.472$, $F_B=10.690$, $F_C=26.040$, $F_D=28.682$, 因素 A、B、C、D 的显著性水平均小于 0.01 ($P_A=0.000$, $P_B=0.004$, $P_C=0.000$, $P_D=0.000$), 说明 4 个因素, 尤

其是因素 A、C、D 对微球的包封率的影响极显著。

由表 3 的 Duncan 多重比较结果可知, A 因素 1、2 水平较好, 两者之间差异不显著, 因此选择 1 水平即 0.1% 的投药量可节约芯材的使用量; B 因素 2、3 水平较好, 两者之间差异不显著, 因此选择 2 水平即 0.2 mL 的戊二醛用量可降低残存戊二醛对人体毒性的可能性; C 因素 1、2 水平较好, 两者之间差异不显著, 因此选择较低温度即 50 $^{\circ}\text{C}$ 的固化温

度更能节约能量;D 因素的第 1 水平最好,因此选择 1 水平即 10 min 的固化时间,耗时短,包封率高.

综上所述,正交优化后的试验组合为 $A_1B_2C_1D_1$,即 0.1% 的投药量、0.2mL 交联剂用量、50 °C 交联 10 min.

表 1 SeMet/CS 微球正交试验方案及结果($L_9(3^4)$)

Tab.1 Orthogonal experimental scheme ($L_9(3^4)$) and its results of SeMet/CS microsphere

试验号	投药量	交联剂用量	固化温度	固化时间	包封率	
	A	B	C	D	1	2
1	1(0.1%)	1(0.1 mL)	1(50 °C)	1(10 min)	0.3121	0.3208
2	1	2(0.2 mL)	2(60 °C)	2(20 min)	0.2847	0.2800
3	1	3(0.4 mL)	3(70 °C)	3(30 min)	0.2674	0.2691
4	2(0.2%)	1	2	3	0.2585	0.2867
5	2	2	3	1	0.2901	0.2932
6	2	3	1	2	0.3099	0.3119
7	3(0.4%)	1	3	2	0.2042	0.2082
8	3	2	1	3	0.2457	0.2497
9	3	3	2	1	0.2981	0.2757

表 2 SeMet/CS 微球正交试验方差分析

Tab.2 Orthogonal test and variance analysis of SeMet/CS microsphere

因素	Ⅲ平方和	自由度	均方	F	Sig.
投药量 A	0.008	2	0.004	47.472	0.000
交联剂用量 B	0.002	2	0.001	10.690	0.004
固化温度 C	0.004	2	0.002	26.040	0.000
固化时间 D	0.005	2	0.002	28.682	0.000
误差 e	0.001	9	7.979E-005		
总计	1.389	18			
校正总计	0.019	17			

表 3 不同变量对 SeMet/CS 微球包封率影响的 Duncan 多重比较结果

Tab.3 Effects of different variables on the encapsulation efficiency of SeMet/CS microsphere through the Duncan multiple comparison

因素及其水平	N	Subset	
		1	2
投药量 A(%)	0.1	6	0.2890
	0.2	6	0.2917
	0.4	6	0.2496
交联剂用量 B(mL)	0.1	6	0.2651
	0.2	6	0.2739
	0.4	6	0.2887
固化温度 C(°C)	50	6	0.2916
	60	6	0.2806
	70	6	0.2554
固化时间 D(min)	6	6	0.2983
	20	6	0.2665
	40	6	0.2628

4.5 最优工艺条件制备的微球形貌、性能

微球形貌:以正交试验优化后的最优工艺条件制备的微球,微球包封率和载药量为 66.35% 和 2.21%,平均粒径 10 μm ,外形独立完整呈球状(图 4),外观上与空白微球无明显差别,这说明壁材的成球反应是影响微球的主要因素,而芯材对微球的形貌影响并不明显.缓释后,微球的形貌由规则的球形变成了不规则的图形,光滑表面塌陷变成皱褶粗糙,且微球间相互粘连增加,这证明微球的缓释效应显著.

IR 光谱:微球缓释前后的 IR 光谱如图 5 所示,由图可知:CS(4)曲线在 898、1032、1070、1154、1320、1380、1429、1650、2880、2921 及 3420 cm^{-1} 附近有明显的吸收峰,这些吸收峰主要为壳聚糖的特征吸收峰.其中,898 cm^{-1} 为壳聚糖环的伸缩振动,1032、1070 cm^{-1} 为 C-O 的伸缩振动,1154 cm^{-1} 为醚氧键的伸缩振动,1320 cm^{-1} 为 C-N 的伸缩振动和 N-H 的弯曲振动(酰胺键),1380 cm^{-1} 为 C-H 的伸缩振动,1429 cm^{-1} 为 C-H 的弯曲振动,2880 cm^{-1} 、2921 cm^{-1} 为-CH 的伸缩振动,3420 cm^{-1} 为-OH 的伸缩振动.1650 cm^{-1} 为 C=O 的伸缩振动(酰胺键),该处的红外吸收相对较弱,表明制备微球的壳聚糖中残存的甲壳素较少,即壳聚糖的脱乙酰程度较为彻底;

由 SeMet 的红外图谱(曲线 1)可知,在 1600 ~400 cm^{-1} 范围类有十分明显的红外吸收峰,而 Se-CH₃ 的特征吸收峰出现在 1260 和 540 cm^{-1} 附近.其中 1260 cm^{-1} 为 Se-CH₃ 中 C-H 的变形振

动吸收峰, 而 540 cm^{-1} 处为 Se-CH_3 中 Se-C 的伸缩振动吸收峰. 在 SeMet 微球的红外图谱中的相

应位置出现明显的吸收峰, 表明载 SeMet 微球中存在的 SeMet.

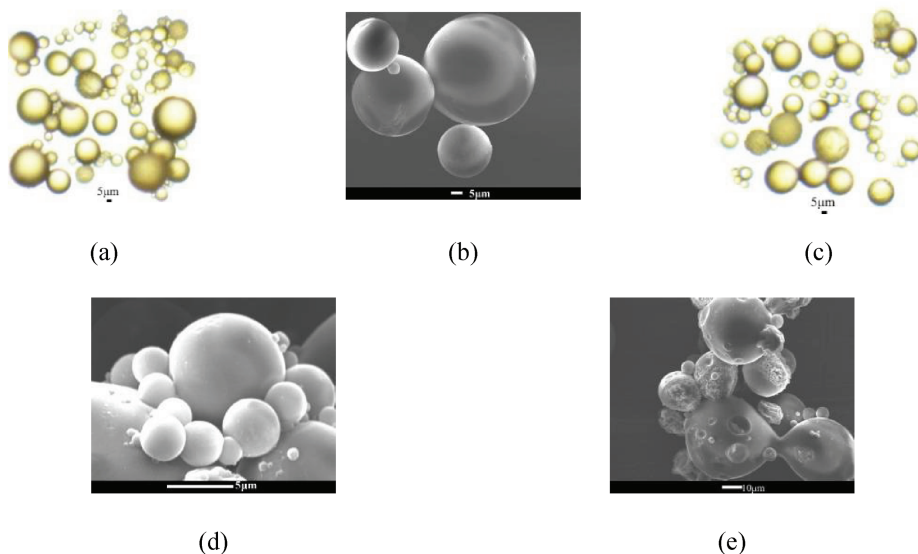


图 4 空白和载硒微球的光学显微镜图和 SEM 电镜图: (a) 空白微球光学显微镜图; (b) 空白微球 SEM 图; (c) SeMet/CS 微球光学显微镜图; (d) SeMet/CS 微球缓释前 SEM 图; (e) SeMet/CS 微球缓释后 SEM 图

Fig. 4 Pictures of optical microscope and SEM for blank and SeMet/CS microspheres: (a) optical microscope picture of blank microspheres; (b) SEM picture of blank microspheres; (c) optical microscope picture of SeMet/CS microspheres; (d) SEM picture of SeMet/CS microspheres before sustained release; (e) SEM picture of SeMet/CS microspheres after sustained release

同 CS 相比, 空白微球在 $1690\sim 1640\text{ cm}^{-1}$ 范围内并无明显吸收, 没有出现理论上应有的 C=N 吸收峰, 这主要是由于微球的交联化程度较低, 使得球壁中因醛胺缩合反应生成的 C=N 不够多, 难以在红外图谱上观察到.

结合 CS 的红外光谱图可知, 缓释后的微球仍存在较为明显的壳聚糖特征吸收峰, 但难以发现芯材的特征吸收峰, 主要是因为微球经缓释后, SeMet 残余量少, 使得 SeMet 微球红外光谱与壳聚糖的红外光谱图无明显差异.

4.6 热性能分析

图 6、7 为各样品的热重 (TG) 及微商热重 (DTG) 曲线, 由图可知, 各样品的 DTG 曲线有两个峰, 其中第一个峰是由于样品中的水分吸热挥发所致; 第二个峰则因样品的剧烈分解所致. 壳聚糖、乳化交联空白微球在 $110\text{ }^\circ\text{C}$ 左右出现失水峰, SeMet 微球的失水峰出现在 $53.23\text{ }^\circ\text{C}$, 温度相对较低, 这主要是因为所用乳化交联 SeMet 微球质量较小使得水分较易挥发所致; 壳聚糖的起始分解温度为 $213.51\text{ }^\circ\text{C}$, 分解峰温为 $300.21\text{ }^\circ\text{C}$, 单位质量分解速率较大, 每分钟约受热分解 10.14% ; 空白微球和载 SeMet 微球的起始分解温度较低分别

为 181.67 和 $176.36\text{ }^\circ\text{C}$, 其分解的峰温分别为 244.68 和 $278.72\text{ }^\circ\text{C}$, 其单位质量的分解速率也较小, 每分钟受热分解分别为 5.57% 和 4.95% , 表明交联剂戊二醛与壳聚糖发生的醛胺缩合反应是导致微球热稳定性改变的主要因素.

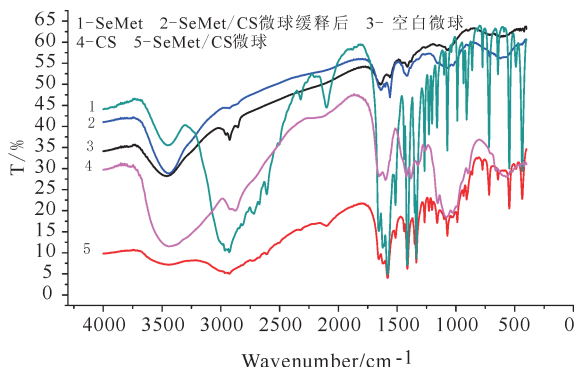


图 5 原材料、SeMet/CS 微球缓释前后的 IR 光谱曲线
Fig. 5 IR curves of raw materials and SeMet/CS microspheres before and after sustained Se release

缓释后的微球热稳定性有所下降, 其起始分解温度和分解峰温分别降低了 2.9 和 $2.5\text{ }^\circ\text{C}$, 最大分解速率有所增大, 每分钟分解 6.51% 且的最终剩余质量减少了 11.61% . 说明经过一定时间的

缓释,微胶球溶胀使得其热稳定性降低了。

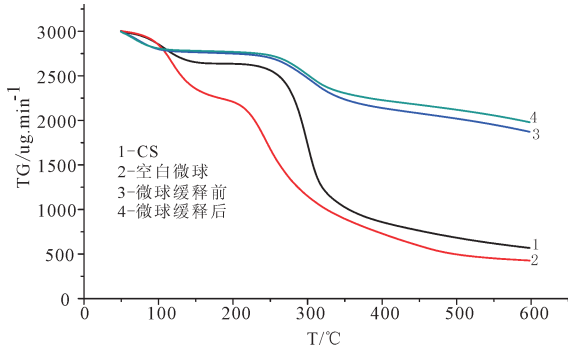


图 6 SeMet/CS 微球缓释前后的 TG 曲线

Fig. 6 TG Curves of sustained release fore-and-aft for SeMet/Cs microspheres

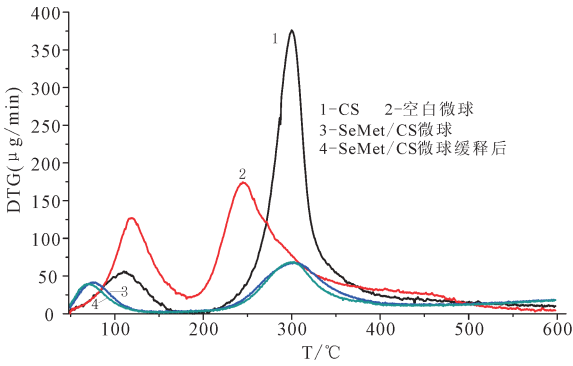


图 7 载硒微球缓释前后的 DTG 曲线

Fig. 7 DTG Curves of sustained release fore-and-aft for SeMet/CS microspheres

4.7 微球的体外累计释放率及释放介质的 pH 响应

微球在 SBF 中的缓释效果如图 8 所示,由图可知,微球具有明显的缓释效应.缓释过程中,随着微球的缓慢溶胀,芯材也逐渐渗入到 SBF 中,在缓释初期,靠近球壁侧的芯材较易溶出,导致其累计释放率增加明显,26 h 时达到 21.06%,之后,微球中心的芯材缓慢渗出,其累计释放率也稳定的增长,400 h 后增长较为缓慢,500 h 时,其累计释放率为 40.32%

图 9 所示为微球缓释过程中环境 pH 的变化曲线.由图 9 可知,微球缓释环境的 pH 变化并不明显,pH 仅在 7.3~7.4 范围内有较小的波动,表明微球在释药过程中对释放介质的 pH 影响较小.但是在缓释初期,释放介质的 pH 波动相对较大,且 pH 有所降低,这主要是由于缓释初期,微球与介质有较为明显的物质交换,如溶解壁材的残余醋酸会进入介质从而降低 pH.

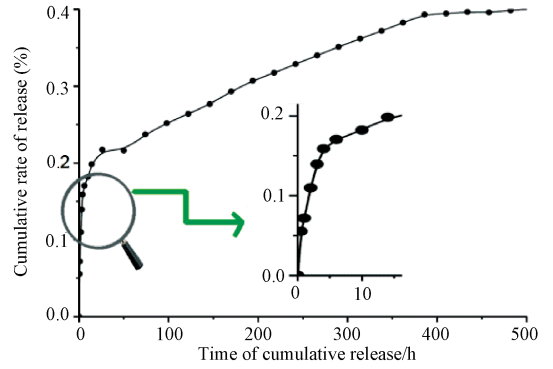


图 8 SeMet/CS 微球缓释曲线

Fig. 8 Sustained release selenium curve of SeMet/CS microspheres

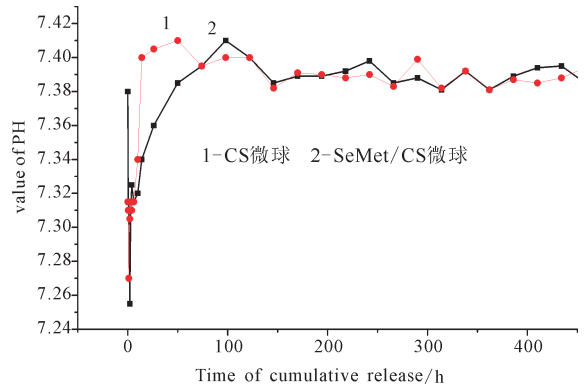


图 9 SeMet/CS 微球缓释过程中介质的 PH 变化曲线

Fig. 9 PH Curve of during the sustained release process of SeMet/CS microspheres

4.8 SeMet/CS 微球对人乳腺癌细胞 MCF-7 的抑制作用

以不同浓度的 SeMet 以及缓释不同时间的微球缓释液作用于人乳腺癌细胞 MCF-7 24、48、72 h 后, CCK-8 法测定,数据以 $x \pm s$ 表示.以 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 紫杉醇为阳性对照组,不加样品的细胞为空白对照组,各实验组对 MCF-7 乳腺癌细胞生长的抑制率如表 4 所示.

实验结果显示,与对照组相比,芯材及微球缓释液均对人乳腺癌细胞 MCF-7 有一定的抑制作用且差异极显著,且抑制率随着硒浓度的增加而增加.在处理 48 h 后普遍达到最大值, SeMet 的最大抑制率为 $65.85 \pm 0.18\%$,微球缓释液的最大抑制率为 $32.62 \pm 0.24\%$.

5 结论

本研究表明,采用乳化交联法可制备缓释性能优良的 SeMet/CS 缓释微球,制备工艺最优条

件为0.1%的投药量、0.2 mL交联剂、50℃交联10 min,该条件下制备的SeMet/CS微球的包封率为31.94%,载药量为0.54%。在SBF模拟体液中具有良好的缓释性能,对人乳腺癌MCF-7细胞增殖具有一定的抑制作用。SeMet/CS缓释复合微球有效避免了硒的突释效应,实现了硒剂量的把控,为SeMet作为硒化药物或硒补充剂应用于医疗、食品和精细化工等相关行业奠定了必要的基础。

表4 样品对人乳腺癌细胞MCF-7 24、48、72 h的抑制率
Tab.4 Percentage inhibitions of samples against the growth of human breast cancer cell MCF-7 for 24, 48 and 72 h

处理	细胞增殖抑制率(%)		
	24 h	48 h	72 h
空白对照	0	0	0
SeMet($\mu\text{g/mL}$)			
50	13.92 \pm 0.34 [#]	16.53 \pm 0.72 [#]	14.41 \pm 0.41 [#]
100	33.80 \pm 0.41 [#]	40.23 \pm 0.57 [#]	38.61 \pm 0.20 [#]
200	59.99 \pm 0.07 [#]	65.85 \pm 0.18 [#]	62.45 \pm 0.36 [#]
微球缓释液的SeMet含量($\mu\text{g/mL}$)			
37.28 (0.5 h)	8.62 \pm 0.02 [#]	9.76 \pm 0.07 [#]	9.49 \pm 0.00 [#]
93.91 (3 h)	24.74 \pm 0.05 [#]	26.48 \pm 0.42 [#]	24.38 \pm 0.01 [#]
122.62 (10 h)	26.16 \pm 0.05 [#]	29.59 \pm 0.22 [#]	28.78 \pm 0.01 [#]
145.56 (50 h)	29.41 \pm 0.06 [#]	32.62 \pm 0.24 [#]	30.71 \pm 0.01 [#]
0.1 $\mu\text{g/mL}$ 紫杉醇	59.68*	81.76*	80.07*

注:*与空白对照组相比,差异显著($P<0.01$);#与阳性对照组相比,差异显著($P<0.01$)

参考文献:

- [1] 史丽英. 人体必需微量元素-硒[J]. 微量元素与健康研究, 2005, 22: 61.
- [2] 徐正. 硒的独特生理活性不可替代[J]. 中老年保健, 2014, 49: 1.
- [3] 商龙臣, 李娇, 倪书萍, 等. $(\text{Hg}_m\text{Se}_n)(m=1,2,3, n=1,2)$ 分子离子团簇结构和光谱性质[J]. 四川大学学报:自然科学版, 2016, 53: 138.
- [4] 余盛萍, 范滔滔, 黄德林, 等. $(\text{ZnX})_3(X=\text{S}, \text{Se} \text{ 和 } \text{Te})$ 量子点配体效应的密度泛函李伦研究[J]. 原子与分子物理学报, 2017, 34: 329.
- [5] Iwona Z, Halina Z. Selenium interactions and toxicity: a review [J]. Cell Biol Toxicol, 2012, 28: 31.
- [6] Jela B, Dominika M, Viera V, *et al.* Selenium: a

- double-edged sword for defense and offence in cancer [J]. Arch Toxicol, 2010, 84: 919.
- [7] Tang H, Zhang H, Luan Q, *et al.* Research Progress and Prospect of Microencapsulation [J]. Farm Products processing, 2016, 21: 43.
 - [8] Kazi M, Zakir H, Uresha P. Development of microspheres for biomedical applications: a review [J]. Prog Biomater, 2015, 4: 1.
 - [9] Pornanong A, Sanong E, Rungnapha Y. The development of non-toxic ionic-crosslinked chitosan-based microspheres as carriers for the controlled release of silk sericin [J]. Biomed Microdevices, 2015, 17: 84.
 - [10] Anita G, Sullad D, Lata S, *et al.* Blend microspheres of chitosan and polyurethane for controlled release of water-soluble antihypertensive drugs [J]. Polym Bull, 2015, 72: 265.
 - [11] Hong W W, Yan X, Geng Y L. Emulsion cross-linked chitosan/nanohydroxyapatite microspheres for controlled release of alendronate [J]. J Mater Sci: Mater Med, 2014, 25: 2649.
 - [12] Bal Y S, Chavidi V P, Prabhakar M N, *et al.* Biodegradable chitosan-g-Poly(methacrylamide) microspheres for controlled release of hypertensive drug [J]. J Polym Environ, 2013, 21: 1128.
 - [13] 高艳, 王瑄, 万明, 等. 壳聚糖微球的制备及其在药物载体中的应用[J]. 功能材料, 2015, 46: 02007.
 - [14] Thiagarajan H, Gunasekaran K, Baskar S K, *et al.* Preparation and characterization of hydroxyapatite-coated selenium nanoparticles and their interaction with osteosarcoma (SaOS-2) cells [J]. Acta Metall Sin: Engl Lett, 2014, 27: 1152.
 - [15] Xu K, Zhao Y, Li H. Fabrication and evaluation of hydroxyapatite-chitosan scaffold via simulated body fluid biomimetic mineralization [J]. West China J Stomatol, 2016, 1: 6.
 - [16] 李上标, 裴淑艳, 蒋超, 等. MTT比色法研究应用进展[J]. 西北民族大学学报:自然科学版, 2013, 34: 68.
 - [17] 边兴艳. MTT比色法及其应用[J]. 国外医学临床生物化学与检验学分册, 1998, 19: 83.
 - [18] 陆钰, 徐培, 甘朝兵, 等. MMT法评价多孔纳米羟基磷灰石/壳聚糖支架材料的细胞毒性[J]. 安徽医学, 2011, 32: 1824.
 - [19] Cheng C, Jiao N, Xu R, *et al.* Significance of the research of trypan blue dye exclusion. MTT and

CCK-8 methods on the cytotoxicity of As_2O_3 [J].

China Med Herald, 2013, 10: 24.

- [20] Cai W. The comparison of MTT and CCK-8 by detecting cytotoxicity of antiviral active components in traditional Chinese medicine [J]. J Hubei Univ: Nat

Sci Ed, 2017, 39: 305.

- [21] Zhang H X, He Q Y. Optimization study on the detection of tumor cell proliferation with CCK-8 method [J]. J Pharm Res, 2016, 35: 63.

引用本文格式:

中文: 冉青, 商龙臣, 吴少尉, 等. SeMet/CS 纳米复合微球的制备、缓释性能及抑制肿瘤活性[J]. 四川大学学报: 自然科学版, 2018, 55: 1057.

英文: Ran Q, Shang L C, Wu S W, *et al.* Preparation and sustained-release property of SeMet/CS microsphere and its inhibitory effects on cancer cells [J]. J Sichuan Univ: Nat Sci Ed, 2018, 55: 1057.