

引用格式:马风伟,陈江旭,杨露芳,等. 硒化天麻多糖纳米粒的制备及清除自由基和调节免疫活性研究[J]. 贵州师范大学学报(自然科学版),2026,44(3):114-121. [Ma Fengwei, Chen Jiangxu, Yang Lufang, et al. Preparation of nano-sized selenized *Gastrodia elata* polysaccharide and its free radical scavenging, immunoregulatory activity[J]. Journal of Guizhou Normal University (Natural Sciences),2026,44(3):114-121.]

## 硒化天麻多糖纳米粒的制备及清除自由基和调节免疫活性研究

马风伟<sup>1,2</sup>, 陈江旭<sup>1</sup>, 杨露芳<sup>1</sup>, 唐银裕<sup>1</sup>, 许 粟<sup>1</sup>, 邓青芳<sup>2,3\*</sup>

(1. 贵阳学院 食品科学与工程学院, 贵州 贵阳 550005; 2. 贵州师范大学 贵州省山地环境信息系统与生态环境保护重点实验室, 贵州 贵阳 550025; 3. 贵州师范大学 贵州省药物质量控制及评价技术工程实验室, 贵州 贵阳 550025)

**摘要:**通过单因素结合正交试验对硒化天麻多糖介孔二氧化硅(SeGEP-MSNs)纳米粒的制备工艺进行优化,并开展清除自由基、免疫活性研究。单因素试验分别考察介孔二氧化硅的浓度、硒化天麻多糖与介孔二氧化硅体积比、超声时间等因素对包裹硒化天麻多糖的影响,在此基础上进行正交试验,筛选出包封率最高的硒化天麻多糖纳米粒制剂。研究结果发现,当介孔二氧化硅的浓度为 25 mg/mL,介孔二氧化硅与硒化天麻多糖的体积比为 1:2,超声时间为 4 h 时,所测得的包封率最高为 (65.31 ± 1.29)%。ABTS<sup>+</sup> 自由基清除试验结果显示 SeGEP-MSNs 纳米粒在浓度为 0.2 ~ 1.0 mg/mL 浓度可显著清除 ABTS<sup>+</sup> 自由基,活性高于单独的 SeGEP。免疫活性研究发现 SeGEP-MSNs 纳米粒在 10 ~ 300 μg/mL 浓度范围内可显著诱导 RAW264.7 巨噬细胞分泌 NO,且呈剂量依赖性,具有免疫增强活性。

**关键词:** 硒化天麻多糖; 介孔二氧化硅; 纳米制剂制备工艺; 清除自由基; 免疫

中图分类号: R9 文献标识码: A 文章编号: 1004—5570(2026)03—0114—08

DOI: 10.16614/j.gznunj.zrb.2026.03.014

## Preparation of nano-sized selenized *Gastrodia elata* polysaccharide and its free radical scavenging, immunoregulatory activity

Ma Fengwei<sup>1,2</sup>, Chen Jiangxu<sup>1</sup>, Yang Lufang<sup>1</sup>,  
Tang Yinyu<sup>1</sup>, Xu Su<sup>1</sup>, Deng Qingfang<sup>2,3\*</sup>

(1. School of Food Science and Engineering, Guiyang University, Guiyang, Guizhou 550005, China; 2. Key Laboratory for Information System of Mountainous Areas and Protection of Ecological Environment of Guizhou Province, Guizhou Normal University, Guiyang, Guizhou 550025, China; 3. Guizhou Engineering Laboratory for Quality Control & Evaluation Technology of Medicine, Guizhou Normal University, Guiyang, Guizhou 550025, China)

**Abstract:** The preparation of selenated *Gastrodia elata* polysaccharide mesoporous silica (SeGEP-

收稿日期: 2024-11-19

基金项目: 贵州省科技厅基础研究计划青年引导项目(黔科合基础[2024]青年351); 贵州师范大学学术新苗基金项目(黔师新苗[2022]B03号); 贵阳学院专项资金(GYU-KY-[2021]); 2023年大学生创新创业项目(202310976065、202310976077、S202310976066)

作者简介: 马风伟(1984-),男,博士,副教授,研究方向:药食同源植物开发与利用, E-mail: mfw200422501212@163.com.

\* 通信作者: 邓青芳(1988-),女,博士,讲师,研究方向:药食同源植物开发与利用, E-mail: dengqf6772@163.com.

MSNs) nanoparticles were studied in this study. Preparation factors including MSNs concentration, SeGEP MSNs ratio, ultrasonic time were screened by single factor test, then were optimized through a three-factor, three-level orthogonal experimental design with encapsulation rate as the evaluation index. After that, the free radical scavenging and immune activity were studied. The optimal preparation conditions for SeGEP-MSNs were as follows: MSNs concentration 25 mg/mL, SeGEP MSNs ratio 1:2, and ultrasound time 4 h. Under these conditions, the encapsulation rate reached  $(65.31 \pm 1.29)\%$ . The *in vitro* ABTS<sup>+</sup> free radical scavenging test showed that SeGEP-MSNs could significantly scavenge ABTS<sup>+</sup> free radicals at 0.2 ~ 1.0 mg/mL concentration, and the activity was higher than that of SeGEP alone. Immunoactivity studies revealed that SeGEP-MSNs could significantly induce RAW 264.7 macrophages secrete NO in a dose-dependent manner in the concentration range of 10 ~ 300  $\mu\text{g/mL}$ , which were superior to that of SeGEP.

**Keywords:** selenized *Gastrodia elata* polysaccharide; mesoporous silica; nanometer preparation technology; free radical scavenging; immunoregulatory activity

## 0 引言

天麻别名有赤箭、定风草等,为兰科(Orchidaceae)多年生草本植物天麻(*Gastrodia elata* Blume)的干燥块茎,是常用的药食同源植物<sup>[1]</sup>。天麻在中国、日本、韩国、印度等东南亚地区广泛分布,在我国其主要分布在贵州、四川、云南等地,其中贵州是野生天麻的遗传多样性中心之一,也是乌天麻的主要产区<sup>[2]</sup>。天麻无根无叶,不能进行光合作用,其种子萌发需要小菇属萌发菌(*Mycena*)的参与,其生长需要蜜环菌(*Armillaria mellea* (Vahl) P. Kumm.)提供营养<sup>[3]</sup>。天麻多糖(*Gastrodia elata* polysaccharide, GEP)是天麻中重要的活性成分之一<sup>[4]</sup>,具有抗炎<sup>[5]</sup>、增强免疫力<sup>[6]</sup>、改善记忆力<sup>[7]</sup>、调节肠道菌群<sup>[8-9]</sup>等多种生理功能。硒(Se)元素是一种人体必需的微量元素<sup>[10]</sup>,在人体中发挥着重要的作用。笔者课题组已通过化学修饰法(硝酸-亚硒酸钠法)制备了硒化天麻多糖(Selenized *Gastrodia elata* polysaccharide, SeGEP),其硒含量约为0.38%,具有良好的补硒制剂开发前景<sup>[11]</sup>。硒化天麻多糖的硒化位点主要发生在其单糖组成的C-6位上,不改变其三股螺旋结构,硒化修饰后,由于亚硒酸基团的引入使得天麻多糖的抗氧化性增强,铁还原力增大,其原因除硒元素本身的活性外,硒化修饰后的天麻多糖粒径变小(从647 nm减小为486 nm),电负性增强(从-12.92 mV变为-15.83 mV)也是重要的原因之一<sup>[11]</sup>。

纳米药物具有颗粒小(尺寸为1~1 000 nm)、比表面积大、反应活性强等特性<sup>[12]</sup>,可以改善药物

的溶解度、生物利用度,延长药物的体内半衰期,以及实现药物的靶向递送等<sup>[13]</sup>作用。介孔二氧化硅纳米粒(Mesoporous silica nanoparticles, MSNs)含有稳定的网状结构,具有比表面积高、抗压强度大、粒径小、孔体积适中(孔径2~50 nm)、吸附效果好、成本低和生物相容性好等优点<sup>[14-15]</sup>,作为药物载体,其孔道内部可负载药物<sup>[16]</sup>。与此同时,MSNs表面上有大量硅羟基,药物可通过氢键、范德华力及静电作用力等使药物吸附在其表面上,进而使药物的稳定性增加,溶解性增强,实现机体内特别是淋巴系统的靶向递送<sup>[17]</sup>。陈立弟<sup>[18]</sup>采用溶液扩散吸附法制备了石斛多糖的MSNs,使其抗氧化活性得到提升;王晶等<sup>[19]</sup>利用浸制吸附法制备了白术多糖的MSNs,白术多糖纳米化后可增加小鼠腹腔巨噬细胞RAW264.7的吞噬能力。

虽然硒化修饰天麻多糖可以在一定程度上提高天麻多糖溶液体系的稳定性、分散性,但天麻多糖的固有溶解度较低,虽然经硒化修饰有所改善,但仍然无法明显改善硒化天麻多糖胶体溶液久置易团聚沉淀的缺点。同时有研究表明多糖溶液纳米化后可增加其抗氧活性并可增强其免疫活性<sup>[18-19]</sup>,因此将硒化天麻多糖与介孔二氧化硅作用制备成MSNs纳米微粒是改善其溶解度并提高活性的可行途径之一。本研究拟通过单因素结合正交试验,以包封率为指标,考察MSNs浓度、SeGEP与MSNs体积比和超声时间对SeGEP-MSNs包封率的影响,优化硒化天麻多糖介孔二氧化硅纳米粒(SeGEP-MSNs)的制备工艺,同时考察其粒径与Zeta电位,并对其体外清除自由基活性及免疫调节活性进行评价,为SeGEP-MSNs的深入开发与利用

提供参考。

## 1 实验材料

### 1.1 材料与试剂

硒化天麻多糖(实验室自制);介孔二氧化硅(MSNs)、苯酚、二甲基亚砷(DMSO)、过硫酸钾(均为上海阿拉丁生化科技股份有限公司);ABTS<sup>+</sup>自由基(上海麦克林生化科技有限公司);浓硫酸(成都市科隆化学品有限公司);葡萄糖对照品(天津市永大化学试剂有限公司);磷酸氢二钠、磷酸二氢钠(国药集团化学试剂有限公司);铁氰化钾(成都金山化学试剂有限公司)。

小鼠 RAW264.7 单核巨噬细胞(武汉普诺塞生命科技有限公司);脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)、胎牛血清、DMEM 培养基、青霉素、硫酸链霉素、硬脂酸(均为美国 Sigma 公司);MTT(德国 Merck 公司);Griess 检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司)。

### 1.2 仪器

XMTD-204 恒温水浴锅(上海梅香仪器有限公司);DF-101S 恒温加热磁力搅拌器(巩义市予华仪器有限公司);RE-52A 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);FA124 电子天平(上海舜宇恒平科学仪器有限公司);TGL-16 M 台式高速冷冻离心机、LC-12N-50A 真空冷冻干燥机(均为上海力辰邦西仪器科技有限公司);Cary60UV-Vis 紫外光谱仪(安捷伦科技有限公司);NS-90 纳米粒度及电位分析仪(珠海欧美仪器有限公司);KQ-800 DB 数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);ESCO CCL-170B-8 型 CO<sub>2</sub> 细胞培养箱(新加坡 Esco 公司)。

## 2 实验方法

### 2.1 SeGEP-MSNs 的制备及单因素考察

采用溶液扩散吸附自组装法制备 SeGEP-MSNs,其原理是通过分子间的相互作用力(如范德华力、氢键作用力、静电作用力等)使分子自组装成有序结构,并可通过改变溶液中的温度、浓度、pH 值等条件来控制分子的组装方式<sup>[20]</sup>。具体操作为:1)取 SeGEP 样品 100 mg 溶于 10 mL 水中搅拌 5 min,配置成浓度为 10 mg/mL 的 SeGEP 溶液;2)另取 MSNs 200 mg 于 10 mL 水中超声 15 min,配置成浓度为 20 mg/mL 的混悬液;3)在搅拌状态下

将 MSNs 溶液缓慢加到硒化天麻多糖溶液中( $V_{\text{SeGEP}}:V_{\text{MSNs}}=1:2$ ),继续超声 3 h;4)以 10 000 r/min 离心 30 min 将纳米粒和游离多糖进行分离,吸弃上层溶液,将下层纳米粒真空冷冻干燥 24 h,即得 SeGEP-MSNs 纳米粒。

本研究探究 MSNs 浓度、SeGEP 与 MSNs 体积比和超声时间对 SeGEP-MSNs 包封率的影响,以包封率为指标,对不同因素及水平进行考察,包括 MSNs 浓度分别为 5、10、15、20、25 mg/mL;SeGEP 与 MSNs 体积比为 1:1、1:2、1:3、1:4、1:5;时间为 1、2、3、4、5 h。

### 2.2 正交试验设计

根据单因素试验结果,确定各因素用量的大致范围,采用正交试验法对工艺进行优化。选择 MSNs 浓度(A)、SeGEP 与 MSNs 体积比(B)以及载药超声时间(C)这 3 个参数作为自变量,以包封率作为因变量,设计 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交试验,重复 3 次,因素水平见表 1。

表 1 正交实验设计因素及水平

Tab. 1 Experimental factors and levels of orthogonal experimental design

水平	因素		
	MSNs 浓度 /(mg·mL <sup>-1</sup> )	Se-GEP 与 MSNs 溶液体积比	超声时间 /h
1	15	1:2	2
2	20	1:3	3
3	25	1:4	4

### 2.3 SeGEP-MSNs 纳米粒包封率、载药率的测定

精密称取干燥至恒重(105 °C, 5 h)的葡萄糖标准品 0.100 4 g,置于 100 mL 的容量瓶中,加水稀释溶解至刻度线,再取 10 mL 置于 100 mL 的容量瓶中,加水至刻度。分别精密吸取 200、400、600、800、1 000 μL 标准品溶液置于具塞试管中,分别加蒸馏水使成 2 mL,加入 5% 苯酚水溶液 1 mL,迅速加入浓硫酸 5 mL,摇匀后在室温下放置 5 min,再将其放入沸水中加热 10 min 后,将其冷却至室温;再另取蒸馏水 2 mL 加入苯酚及硫酸,同上述操作为空白对照,于 490 nm 波长下测定其吸光度。以葡萄糖浓度为横坐标,吸光度值为纵坐标,绘制标准曲线<sup>[21]</sup>。

1)包封率。取上述 2.1 节过程上清液适量,加蒸馏水使成 2 mL,按照上述操作测定吸光度值 A,计算上清液中葡萄糖浓度 C<sub>1</sub>。采用上述同样方法,按照 2.1 节制备 SeGEP-MSNs 方法,用蒸馏水

代替 MSNs, SeGEP 直接与蒸馏水超声操作,取上清液测定吸光度值  $A$ , 计算上清液中葡萄糖浓度  $C_0$ 。并根据以下公式计算 SeGEP-MSNs 包封率

$$B_{\text{包封率}} = \frac{(C_0 - C_1)}{C_0} \times D \times 100\%$$

式中,  $C_0$ 、 $C_1$  分别为根据吸光度值计算出的制备 SeGEP-MSNs 溶液中上清液葡萄糖浓度,  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ;  $D$  为溶液稀释倍数。

2) 载药率。取 SeGEP-MSNs 约 500 mg, 精密称定后置于 1 000 mL 容量瓶中, 先加入少量蒸馏水分散, 然后稀释至刻度, 摇匀, 备用。吸取混悬液 2.0 mL 置于 10 mL 具塞试管中, 加入 1 mL 苯酚水溶液(质量浓度为 5%) 并迅速加入浓硫酸 5 mL, 按照上述操作对 SeGEP-MSNs 载药率进行测定。另取空白 MSNs 500 mg 同上述操作作为空白对照, 测定其吸光度。并根据以下公式计算 SeGEP-MSNs 载药率:

$$Z_{\text{载药率}} = \frac{C \times D}{m \times 1\,000} \times 100\%$$

式中,  $C$  为根据吸光度值计算出的 SeGEP-MSNs 溶液中葡萄糖浓度,  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ;  $D$  为溶液稀释倍数;  $m$  为 SeGEP-MSNs 取样量, mg。

#### 2.4 SeGEP-MSNs 纳米粒形态观察

将 SeGEP-MSNs 纳米粒冷冻干燥后用蒸馏水溶解稀释到 1 mg/mL, 同法配制空白介孔二氧化硅溶液, 在 25 °C 条件下, 观察溶液形态及冻干样品的宏观状态。

利用动态光散射法(Dynamic light scattering, DLS)法进行纳米粒度及电位分析, DLS 是基于布朗运动原理测定胶束颗粒的粒径, 通过分析散射光的强度随时间的波动特性, 测量胶束颗粒的扩散系数进而计算粒径大小<sup>[22]</sup>。吸取 SeGEP-MSNs 纳米粒和空白介孔二氧化硅(1.0 mg/mL) 1 mL 进行上样检测, 测量温度设定为 25.0 ± 1.0 °C, 每个样品重复测量 3 次。

#### 2.5 SeGEP-MSNs 纳米粒清除 ABTS<sup>+</sup> 自由基活性研究

ABTS<sup>+</sup> 自由基溶液制备操作: 将 ABTS<sup>+</sup> 母液(7 mmol/L) 与过硫酸钾溶液(2.45 mmol/L) 等体积混合, 然后在室温下避光反应, 反应 16 h 后用磷酸盐缓冲液(10 mmol/L, pH 6.6) 稀释, 在 734 nm 处检测吸光度值, 直至吸光度为 0.70 ± 0.02, 即得到 ABTS<sup>+</sup> 工作液。配制 SeGEP 溶液(0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg/mL) 及 SeGEP-MSNs 纳米粒混悬

液(根据正交试验结果载药率 11.36% 折算浓度分别为: 1.76、3.52、5.28、7.01、8.80 mg/mL); 分别取上述液体 1 mL 置于比色皿中, 然后加入 2 mL ABTS<sup>+</sup> 工作液, 轻轻摇匀, 室温下暗反应 6 min, 然后在 734 nm 处测定吸光度。根据下列方程式计算 ABTS<sup>+</sup> 自由基清除率:

$$Q_{\text{ABTS}^+ \text{自由基清除率}} = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100\%$$

式中,  $A_1$  为供试品与 ABTS<sup>+</sup> 工作液混合的吸光值;  $A_2$  为供试品与蒸馏水混合后的吸光值;  $A_0$  为 ABTS<sup>+</sup> 工作液与蒸馏水混合后的吸光值。

#### 2.6 体外免疫活性

##### 2.6.1 细胞培养与模型建立

将 RAW264.7 巨噬细胞孵育在含 10% 胎牛血清、1% 青霉素-链霉素双抗的 DMEM 培养基中, 置于 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中在 37 °C 培养。试验分组如下: 空白对照组(MSNs, 浓度为 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ); 阳性对照组(1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  LPS 处理组); 样品组(SeGEP-MSNs 纳米粒不同质量浓度处理)

##### 2.6.2 细胞活力测试

取对数生长期的 RAW264.7 细胞, 以每孔细胞数约为  $5 \times 10^3$  个接种于 96 孔板, 随后在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 12 h, 每孔再加入不同质量浓度的 SeGEP-MSNs 纳米粒(终浓度为 10、20、50、100、150、200、250、300、500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), 继续培养 24 h。然后每孔加入 10  $\mu\text{L}$  MTT 溶液(浓度为 5 mg/mL), 并在培养箱中继续孵育 4 h, 孵育完成后取出 96 孔板, 吸弃上层液体, 随后加入 150  $\mu\text{L}$  DMSO, 放置在摇床上震荡 15 min, 最后分别在 490 nm 和 570 nm 处测定吸光度, 并根据下列方程式计算细胞存活率:

$$X_{\text{细胞存活率}} = \frac{(A_s - A_b)}{(A_c - A_b)} \times 100\%$$

式中,  $A_s$  为试验孔吸光度值(内含细胞、培养基、MTT 溶液和 SeGEP-MSNs 纳米粒);  $A_c$  为对照孔吸光度值(内含细胞、培养基、MTT 溶液, 不含 SeGEP-MSNs 纳米粒);  $A_b$  为空白孔吸光度值(内含培养基、MTT 溶液, 不含细胞、SeGEP-MSNs 纳米粒)。

##### 2.6.3 NO 分泌量的测定

参照韩晓云等<sup>[23]</sup>的方法进行细胞试验, 取对数生长期的 RAW264.7 巨噬细胞, 以每孔约  $5 \times 10^3$  个细胞密度, 接种于 96 孔细胞培养板中, 分别用 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  MSNs, 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 LPS 和不同质量浓度的 SeGEP-MSNs 纳米粒样品(10、20、50、100、

150、200、250、300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 处理细胞并培养 24 h 后,采用 Griess 检测试剂盒参考说明书操作,在酶标仪 540 nm 波长下测定吸光度值,根据 NO 标准曲线计算细胞上清液中的 NO 分泌量。

### 2.7 数据处理

以上试验数据均采用 Origin 2021、IBM SPSS Statistics 26、GraphPrism 8.0 等进行分析统计和绘图,其中  $P < 0.05$  为统计学差异显著, $P < 0.01$  为差异极显著。

## 3 结果与讨论

### 3.1 标准曲线及制备工艺单因素试验结果

#### 3.1.1 标准曲线

以吸光度值为纵坐标,葡萄糖浓度为横坐标绘制标准曲线,如图 1 所示,总糖标准曲线回归方程为  $y = 0.0586x + 0.0018$ ,  $R^2 = 0.9946$ ,说明葡萄糖浓度在 2.51 ~ 12.55  $\mu\text{g}/\text{mL}$  范围内与吸光度线性关系良好。

#### 3.1.2 单因素试验结果

单因素考察结果如图 2(A) 所示,在 MSNs 浓度在 5 ~ 20  $\text{mg}/\text{mL}$  范围内,SeGEP-MSNs 包封率显著增加( $P < 0.05$ ),所得包封率最大值为(51.22  $\pm$  0.79)%,当 MSNs 浓度大于 20  $\text{mg}/\text{mL}$  时,包封率

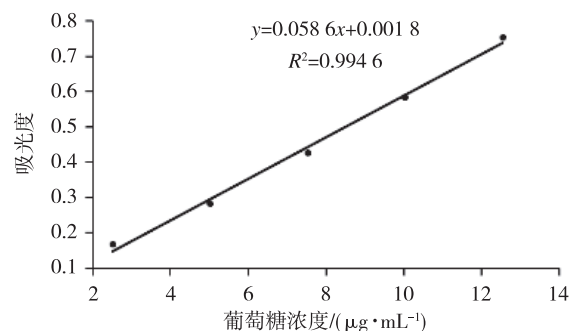


图 1 总糖标准曲线

Fig. 1 Standard curve for total sugar test

下降。这可能是因为 MSNs 在超声分散过程中分散不均匀,导致包封率下降。如图 2(B) 所示,在 SeGEP 与 MSNs 溶液体积比在 1:1 ~ 1:3 范围内,包封率显著增加( $P < 0.05$ ),包封率最大值为(57.88  $\pm$  1.01)%,当溶液体积比大于 1:3 时,包封率下降。这可能是因为 MSNs 形成空白介孔二氧化硅纳米粒的团聚,导致包封率下降。如图 2(C) 所示,在 1 ~ 3 h 范围内,SeGEP-MSNs 包封率显著增加( $P < 0.05$ ),其包封率最大值为(60.39  $\pm$  0.94)%,当超声时间大于 3 h 时,包封率略有下降。这可能是因为 MSNs 材料为孔状结构,存在孔道结构,随着超声时间延长,机械力加大,使小部分 MSNs 载体受到破坏,导致包封率下降。

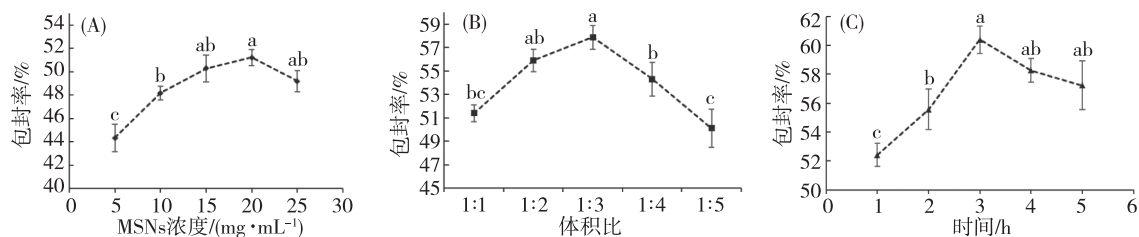


图 2 不同因素对 SeGEP-MSNs 包封率的影响

Fig. 2 Effects of different factors on the Encapsulation efficiency of SeGEP-MSNs

注:A 为 MSNs 浓度;B 为 SeGEP 与 MSNs 溶液体积比;C 为超声时间;不同字母表示各组间差异显著( $P < 0.05$ )。

### 3.2 正交试验设计及结果分析

由表 2 可知对于 SeGEP-MSNs 纳米粒的制备影响最大的因素依次为超声时间(C)、MSNs 浓度(A)、Se-GEP 与 MSNs 溶液体积比(B),最佳组合为超声时间 4 h、MSNs 浓度 25  $\text{mg}/\text{mL}$ 、Se-GEP 与 MSNs 浓度体积比 1:2。按照此正交条件制备的 SeGEP-MSNs 纳米粒包封率为(65.31  $\pm$  1.29)%,载药率为(11.36  $\pm$  0.74)%。

### 3.3 SeGEP-MSNs 纳米粒形态分析

SeGEP-MSNs 纳米粒的宏观形态如图 3(A) 所示,空白 MSNs 和 SeGEP-MSNs 纳米粒均为颗粒状

固体,在 1  $\text{mg}/\text{mL}$  浓度条件下,空白 MSNs 为白色混悬液,SeGEP-MSNs 纳米粒为浅棕色混悬液。SeGEP-MSNs 纳米粒的微观形态如图 3(B) 所示,在 1  $\text{mg}/\text{mL}$  浓度条件下,空白介孔二氧化硅的粒径为 232.6 nm,而硒化天麻多糖介孔二氧化硅纳米粒的粒径为 284.3 nm,说明硒化天麻多糖吸附在 MSNs 的内部空腔及表面,使其粒径增大;如图 3(C) 所示,在 1  $\text{mg}/\text{mL}$  浓度条件下,空白 MSNs 的电位为 -21.20 mV,而 SeGEP-MSNs 纳米粒的电位为 -17.13 mV,可能是因为发生硒化天麻多糖附着在介孔二氧化硅表面,引起表面电荷发生变化。

表2 正交试验设计及结果

Tab.2 Orthogonal experimental design and results

试验号	MSNs 浓度 /(mg·mL <sup>-1</sup> )	SeGEP 与 MSNs 体积比	超声时间 /h	包封率 /%
1	15	1:2	2	55.61
2	15	1:3	3	58.71
3	15	1:4	4	60.83
4	20	1:2	3	56.84
5	20	1:3	4	59.95
6	20	1:4	2	58.85
7	25	1:2	4	65.31
8	25	1:3	2	60.01
9	25	1:4	3	55.03
K <sub>1</sub>	175.15	177.76	174.47	
K <sub>2</sub>	175.64	178.67	170.58	
K <sub>3</sub>	180.35	174.71	186.09	
k <sub>1</sub>	58.38	59.25	58.16	
k <sub>2</sub>	58.55	59.56	56.86	
k <sub>3</sub>	60.12	58.24	62.03	
R	1.74	1.32	5.17	
因素主次顺序	C>A>B			
最优工艺组合	A3, B1, C3			

通过粒径及 Zeta 电位的数值变化表明 SeGEP 成功吸附于 MSNs 的表面, SeGEP-MSNs 纳米粒成功制备, 将硒化天麻多糖与 MSNs 作用, 纳米粒化后其粒径较 SeGEP 小(从 486 nm 减小为 284 nm), 电负性增强(从 -15.83 mV 变为 -17.13 mV)<sup>[11]</sup>, 提示 SeGEP-MSNs 纳米粒在溶液中稳定性增加、分散性增强, 这为硒化天麻多糖开发成液体制剂提供了一种可行性方案和数据支撑。

### 3.4 SeGEP-MSNs 纳米粒清除 ABTS<sup>+</sup> 自由基活性评价

ABTS<sup>+</sup> 作为一种过氧化氢酶底物, 其能与氧化物反应生成稳定的绿色 ABTS<sup>+</sup> 自由基, 并在 734 nm 波长处有最大吸收<sup>[24]</sup>。当其与还原物(抗氧化剂)反应时, ABTS<sup>+</sup> 自由基与 1 个游离电子配对变成非自由基形式, 此时溶液由绿色变为无色, 因此通过检测 734 nm 处吸光度值的变化可以计算供试品的 ABTS<sup>+</sup> 自由基清除率并评价抗氧化能力。SeGEP-MSNs 纳米粒对 ABTS<sup>+</sup> 自由基清除率如图 4 所示,

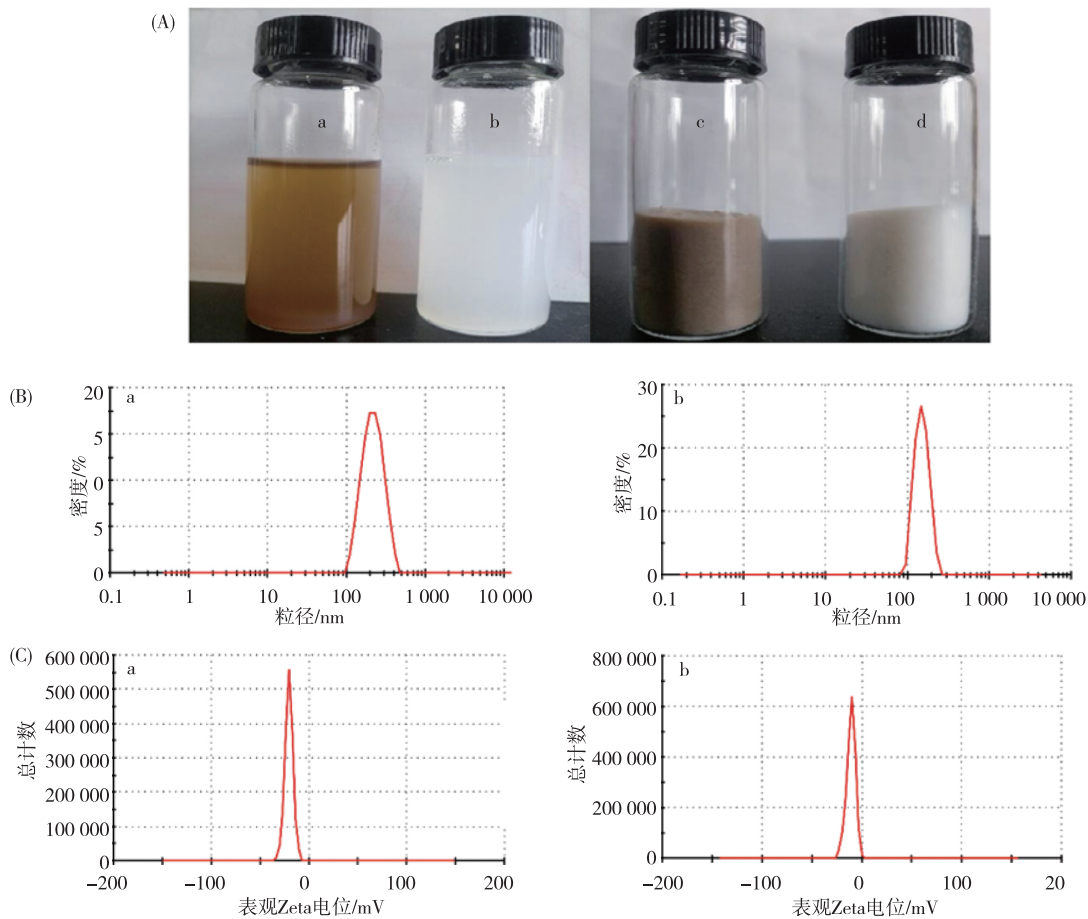


图3 SeGEP-MSNs 纳米粒的形态分析

Fig.3 Morphological analysis of SeGEP-MSNs nanoparticles

注:A 为外观形态(a、c 为 SeGEP-MSNs 纳米粒, b、d 为空白 MSNs); B 为粒径分析; C 为 Zeta 电位。

在 0.2 ~ 1.0 mg/mL 的浓度范围内将 SeGEP 制成 SeGEP-MSNs 纳米粒后,其 ABTS<sup>+</sup> 自由基清除能力明显提高,当浓度为 1.0 mg/mL 时,SeGEP、SeGEP-MSNs 纳米粒的 ABTS<sup>+</sup> 自由基清除率分别为 (97.80 ± 2.40)%、(99.05 ± 1.04)%。SeGEP-MSNs 纳米粒在低浓度表现出较 SeGEP 更强的 ABTS<sup>+</sup> 自由基清除活性,其原因可能是低浓度时纳米粒分散更均匀,比表面积更大,更多的活性羟基(-OH)基团可以提供于 ABTS<sup>+</sup> 自由基;而浓度高时,混悬液中硒化天麻多糖的浓度大,可提供的活性羟基(-OH)基团足够丰富,因此表现为 ABTS<sup>+</sup> 自由基清除率均较高。

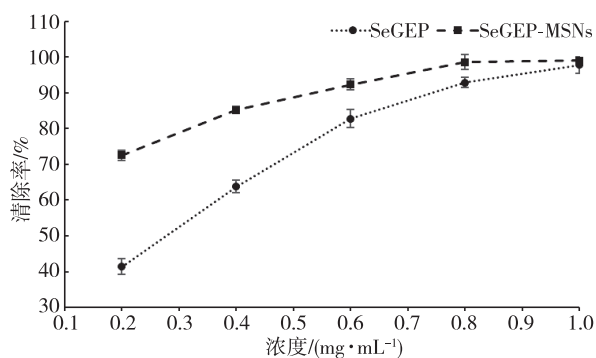


图4 SeGEP-MSNs 纳米粒对 ABTS<sup>+</sup> 自由基清除能力  
Fig. 4 Scavenging ability of SeGEP-MSNs nanoparticle to ABTS<sup>+</sup> radical

### 3.5 SeGEP-MSNs 纳米粒体外免疫调节活性评价

#### 3.5.1 细胞毒性测试

SeGEP-MSNs 纳米粒不同质量浓度对细胞活力的影响结果见图 5(A),根据 MTT 结果可知,RAW264.7 细胞存活率随 SeGEP-MSNs 纳米粒浓度的升高而降低,当 SeGEP-MSNs 纳米粒浓度为 500 μg/mL 时,细胞存活率约为 85%,在显微镜下可观察到细胞死亡后产生的漂浮碎片;当其浓度小于 300 μg/mL 时,细胞存活状态良好,显微镜下未观察到明显细胞形态的变化,见图 5(B),说明 SeGEP-MSNs 纳米粒在浓度小于 300 μg/mL 时安全性良好。

#### 3.5.2 SeGEP-MSNs 纳米粒对 RAW264.7 细胞 NO 分泌量的影响

NO 是炎症反应中的重要介质,也是用来评估免疫活性的关键指标之一<sup>[25-26]</sup>。本文采用 RAW264.7 巨噬细胞模型,以 MSNs 为阴性对照,LPS 为阳性对照,考察 SeGEP-MSNs 纳米粒的免疫调节活性。结果如图 5(B)和图 5(C)所示,与空白对照组相比(6.5 μM),LPS 组 RAW264.7 细胞中 NO 的分泌水平显著升高至 17.6 μM,说明 LPS 可显著增强 RAW264.7 细胞的免疫及炎症反应。与空白对照组相比,SeGEP-MSNs 纳米粒不同质量浓

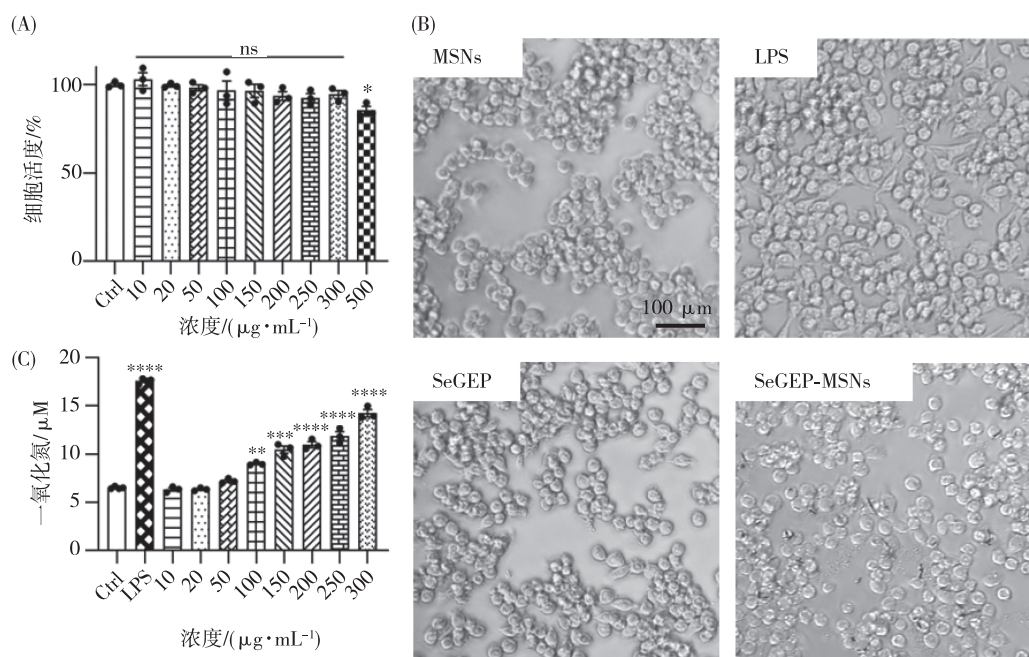


图5 体外免疫活性试验

Fig. 5 In vitro immunoregulatory activity test

备注:A 为细胞活力;B 为细胞显微图片;C 为 NO 分泌量。

度组中 NO 的分泌量高于 MSNs 组,并且随浓度增大而增强。这表明 SeGEP-MSNs 可以刺激巨噬细胞产生相应的炎症因子,具有免疫增强活性。介孔二氧化硅于 1992 年由美孚公司首次生产,广泛用于药物递送材料,具有很好的组织相容性和安全性<sup>[27]</sup>。有研究发现随着 MSNs 粒径的增大,能激活免疫细胞,诱导免疫细胞分泌细胞因子<sup>[28]</sup>。本文研究结果显示同等浓度 SeGEP-MSNs 纳米粒激活 RAW264.7 巨噬细胞活性强于单独 MSNs 或 SeGEP,提示其作用机制可能涉及纳米粒与硒化天麻多糖的协同作用如粒径改变、硒化天麻多糖抗原呈递作用以及电负性改变等共同影响。

## 4 结论

本研究通过单因素结合正交法优化硒化天麻多糖纳米粒 SeGEP-MSNs 的制备工艺,得到最佳制备条件:介孔二氧化硅的浓度为 25 mg/mL,介孔二氧化硅与硒化天麻多糖的体积比为 1:2,超声时间为 4 h 时,所测得的包封率最高为(65.31 ± 1.29)%。SeGEP-MSNs 纳米粒在浓度为 0.2 mg/mL 时即表现出对 ABTS<sup>+</sup> 自由基较强的清除能力,显著高于 SeGEP( $P < 0.01$ ),达到(72.58 ± 1.38)%,浓度为 0.6 mg/mL 时清除率达到 92.22%。在 10 ~ 300 μg/mL 浓度范围内 SeGEP-MSNs 纳米粒可显著诱导 RAW264.7 巨噬细胞 NO 分泌,且呈剂量依赖性,具有免疫增强活性。本研究结果可为硒化天麻多糖纳米粒的制备及后续的综合利用开发提供参考,也对于其他多糖纳米制剂的研究与开发具有一定的指导意义。

## 参考文献:

- [1] Da Chunyan, Zhao Dan, Zhang Wenping, et al. Comparative analysis of antioxidant activity and structural changes of *Gastrodiae Rhizoma* polysaccharides between sulfur-fumigation and nonsulfur-fumigation[J]. *Frontiers in Nutrition*, 2024, 11; e1477689.
- [2] 杨艺娜,王蓓蓓,金徽,等.天麻素的结构修饰及生物活性研究进展[J]. *中草药*, 2024, 55(23):8245-8255.
- [3] 赵杨,康志娇,周欣,等.药食两用植物-天麻[J]. *贵州师范大学学报(自然科学版)*, 2013, 31(4):9-12.
- [4] Zhang Yonggang, Ye Peng, Zhu Hua, et al. Neutral polysaccharide from *Gastrodia elata* alleviates cerebral ischemia-reperfusion injury by inhibiting ferroptosis-mediated neuroinflammation via the NRF2/HO-1 signaling pathway [J]. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 2024, 30(3): e14456.
- [5] Gan Qingxia, Peng Maoyao, Wei Haobo, et al. *Gastrodia elata* polysaccharide alleviates Parkinson's disease via inhibiting apoptotic and inflammatory signaling pathways and modulating the gut microbiota[J]. *Food & Function*, 2024, 15(6):2920-2938.
- [6] Guan Hao, Ling Xi, Xu Juan, et al. Structural characterization of polysaccharide derived from *Gastrodia elata* and its immunostimulatory effect on RAW264.7 cells[J]. *Molecules*, 2022, 27(22):8059.
- [7] 马风伟,邓青芳.缺血性脑卒中病理生理机制及治疗对策研究进展[J]. *贵州师范大学学报(自然科学版)*, 2022, 40(6):116-122.
- [8] Huo Jiangyan, Lei Min, Li Feifei, et al. Structural characterization of a polysaccharide from *Gastrodia elata* and its bioactivity on gut microbiota [J]. *Molecules*, 2021, 26(15):4443.
- [9] Gan Qingxia, Chen Linlin, Xian Jiacheng, et al. Digestive characteristics of *Gastrodia elata* Blume polysaccharide and related impacts on human gut microbiota in vitro[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2024, 328:118064.
- [10] 刘丹丹,马明霞,乔丹,等.苦参素联合富硒酵母于干预大鼠肝癌变进程中体征的动态变化[J]. *河南师范大学学报(自然科学版)*, 2012, 40(6):126-129.
- [11] 温启华,陆逸昊,杨露芳,等.硒化天麻多糖的制备、结构表征及其抗氧化活性评价[J]. *食品工业科技*, 2024, 45(3):18-30.
- [12] Santos A M D, Carvalho S G, Meneguim A B, et al. Oral delivery of micro/nanoparticulate systems based on natural polysaccharides for intestinal diseases therapy: challenges, advances and future perspectives [J]. *Journal of Controlled Release*, 2021, 334:353-366.
- [13] Su Hongyan, Wang Yan, Liu Shuo, et al. Emerging transporter-targeted nanoparticulate drug delivery systems[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2019, 9(1):49-58.
- [14] 赵大洲.功能化介孔二氧化硅微球对重金属离子的循环吸附研究[J]. *福建师范大学学报(自然科学版)*, 2018, 34(1):60-64.
- [15] Maleki A, Kettiger H, Schoubben A, et al. Mesoporous silica materials: from physico-chemical properties to enhanced dissolution of poorly water-soluble drugs[J]. *Journal of Controlled Release*, 2017, 262:329-347.
- [16] 郭莹,戎宇鑫,刘清泉,等.壳聚糖包覆介孔二氧化硅纳米微球的制备及其对铜离子的吸附[J]. *福建师范大学学报(自然科学版)*, 2019, 35(6):46-50.

(下转第 132 页)