

分 类 号：Q 81
密 级：公开

单位代码：10363
学 号：220520114

pH 响应型载药纳米硒颗粒的构建及其靶向治疗肝
癌的研究

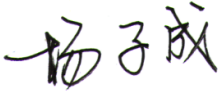
Fabrication of pH-Responsive Drug-Loaded Selenium
Nanoparticles for Targeted Therapy of Hepatocellular
Carcinoma

学 生 姓 名：	<u>杨子成</u>
校 内 导 师：	<u>钱森和 副教授</u>
校 外 导 师：	<u>刘志刚</u>
专 业：	<u>生物与医药</u>
研 究 方 向：	<u>生物载体材料工程</u>

论文答辩日期：2025 年 5 月 15 日

安徽工程大学学位论文原创性声明

本人郑重声明：我恪守学术道德，崇尚严谨学风。所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已明确注明和引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品及成果的内容。论文为本人亲自撰写，我对所写的内容负责，并完全意识到本声明的法律后果由本人承担。

学位论文作者名： 
日期： 2025 年 3 月 21 日

安徽工程大学学位论文版权使用授权书

学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅或借阅。本人授权安徽工程大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编本学位论文。

保密☐，在____年解密后适用本版权书。

本学位论文属于

不保密☒.

学位论文作者签名：



日期：2025 年 03 月 21 日

指导教师签名：



日期：2025 年 03 月 21 日

pH 响应型载药纳米硒颗粒靶向治疗肝癌的研究

摘要

肝癌是威胁我国人民生命健康的恶性疾病之一，目前肝癌的治疗手段主要有手术切除、肝移植、化学治疗等，但是这些治疗手段均有各自的局限性。化疗是适用范围最广也是最常见的治疗手段，但是化疗药物治疗相关的不良反应以及肝功能衰竭患者对药物毒性的低耐受性限制了化疗药物的用药剂量与疗效发挥，如何高效精准地把化疗药物运送到病灶部位是一个备受关注的焦点。近年来，纳米载体材料相关研究的火热为肝癌治疗研究带来了新鲜血液。

硒（Selenium, Se）是维持人体生命活动不可或缺的微量元素，硒的缺乏可能引发人体 40 余种疾病的发生，缺硒还会导致人体患癌的概率大幅提高。硒纳米颗粒（Selenium Nanoparticles, SeNPs）具有良好的抗肿瘤活性和较大的比表面积，是一种优良的抗肿瘤药物载体，在抗肿瘤药物研发方面具有巨大的应用潜力。但是无定形的红色单质 SeNPs 十分不稳定，容易聚集形成黑色大颗粒硒晶体而失去生物活性。采用化学还原法合成纳米硒，加入诸如多糖、蛋白质以及表面活性剂等具有生物活性的模板可以提高 SeNPs 的稳定性的生

物活性。因此，本课题利用茶多糖（Tea Polysaccharide, TP）为模板开发一种稳定的纳米硒颗粒（TP-SeNPs, TPS）用以负载抗肿瘤药物盐酸多柔比星（Doxorubicin, DOX），与之形成协同作用杀伤肿瘤细胞，得到了载药颗粒 DOX/TP-SeNPs（DTPS），并通过金属沸石咪唑骨架（ZIF-8）包裹实现酸敏靶向效果，提高药物的运送效率和生物安全性。本文研究了纳米药物 DOX/TP-Se@ZIF-8（DTPSZ）的最佳制备条件、表征及体内外抗肿瘤活性。研究结果如下：

（1）DTPSZ的合成和表征。通过超声波辅助水提醇沉法从云南普洱茶中提取 TP，得率为 3.17%，以 TP 为模板采用化学还原法合成了茶多糖纳米硒颗粒 TP-SeNPs（TPS），并优化了 TPS 的合成条件。TPS 的最佳合成条件为模板浓度 0.3 mg/mL，亚硒酸钠与 L-抗坏血酸摩尔量配比为 1:4。合成温度为常温（25℃）。采用一锅法合成的 DTPSZ，其 DOX 载药率约为 1.8%。表征结果表明，DTPSZ 为平均粒径 166 nm 的不规则颗粒，Zeta 电位为 23 mV；红外光谱、紫外光谱和 X 射线衍射均证实了 DTPSZ 的成功制备；体外释放实验表明 DTPSZ 在弱酸环境（pH5.5、pH6.5）下具有缓释效果；稳定性研究发现 DTPSZ 在 4℃水相环境中可稳定存在一周以上。

（2）体外抗肿瘤实验及体外生物安全性研究。CCK-8 检测和细胞活死染色实验研究表明，相较于对照组，DTPSZ 具有更明显的抑制 HepG2 增殖的效果；细胞摄取实验结果证实了 DTPSZ 能够被

HepG2 摄取进入细胞内；划痕实验结果表明，DTPSZ 能够抑制肿瘤细胞的迁移；活性氧检测结果表明 DTPSZ 能够诱导 HepG2 产生活性氧从而促进细胞凋亡；流式凋亡检测结果表明，相较于对照组，DTPSZ 能够诱导更多的 HepG2 细胞凋亡；CCK-8 细胞毒性检测结果表明，DTPSZ 对正常细胞 L929 没有明显的毒性；同时溶血实验表明，DTPSZ 在等效 DOX 浓度小于 12 $\mu\text{g/mL}$ 时不会引发溶血，证明 DTPSZ 具有良好的生物安全性。

(3) 体内抗肿瘤实验及体内生物安全性研究。通过荷瘤小鼠模型对 DTPSZ 的体内抗肿瘤效果、体内靶向性和体内生物安全性进行研究。IVIS 活体成像结果显示，DTPSZ 具有良好的体内靶向能力。肿瘤 H&E 染色切片和 TUNEL 染色切片结果表明，DTPSZ 具有良好的抗肿瘤活性。免疫组化结果显示，DTPSZ 能够增加 Caspase-3 蛋白的表达水平的同时降低 Ki67 阳性细胞占比，以此达到抑制肿瘤细胞增殖并诱导肿瘤细胞凋亡的目的。以上的这些研究结果可以说明，DTPSZ 是一种具有潜力的优质的肿瘤治疗药物。小鼠主要器官 H&E 切片和血液生化指标检测结果表明，DTPSZ 具有良好的体内生物安全性。

综上所述，本研究构建的一种具有靶向效果的纳米抗肝癌药物 (DTPSZ)，通过体内外的实验证明了 DTPSZ 的抗肝癌活性以及生物安全性，有望开发成为一种抗肝癌的新型药物。

关键词：纳米硒，茶多糖， ZIF-8，阿霉素，肝癌

STUDY ON TARGETED THERAPY OF HEPATOCELLULAR CARCINOMA WITH PH-RESPONSIVE DRUG-LOADED SELENIUM NANOPARTICLES

ABSTRACT

Liver cancer is one of the malignant diseases that threaten the life and health of the Chinese people, and the current treatment methods for liver cancer mainly include surgical resection, liver transplantation, chemotherapy, etc., but these treatment methods have their own limitations. Chemotherapy is the most widely applicable and most common treatment, but the adverse reactions associated with chemotherapy drugs and the low tolerance of drug toxicity in patients with liver failure limit the dosage and efficacy of chemotherapy drugs. In recent years, the research on nano-carrier materials has brought fresh blood to the research on the treatment of liver cancer.

Selenium (Selenium, Se) is an indispensable trace element to maintain human life activities, and the deficiency of selenium may cause the occurrence of more than 40 kinds of diseases in the human body, and the

lack of selenium will also lead to a significant increase in the probability of cancer in the human body. Selenium nanoparticles (SeNPs) have good antitumor activity and large specific surface area, which are excellent carriers of anti-tumor drugs and have great application potential in the research and development of anti-tumor drugs. However, the amorphous red elemental SeNPs are very unstable and easily aggregate to form large black selenium crystals and lose their biological activity. The synthesis of selenium nanoparticles by chemical reduction method and the addition of biologically active templates such as polysaccharides, proteins and surfactants can improve the stability and biological activity of SeNPs. Therefore, in this project, a stable selenium nanoparticles (TP-SeNPs, TPS) were developed using Tea Polysaccharide (TP) as a template to load the antitumor drug Doxorubicin hydrochloride (DOX), and formed a synergistic effect with it to kill tumor cells, and obtained drug-loaded particles DOX/TP-SeNPs (DTPS), which were wrapped by a metal zeolite imidazole backbone (ZIF-8) to achieve acid-sensitive targeting effect. Improve the efficiency and biosafety of drug delivery. In this paper, the optimal preparation conditions, characterization and anti-tumor activity of nanomedicine DOX/TP-Se@ZIF-8 (DTPSZ) in vitro and in vivo were studied. The results of the study are as follows:

(1) Synthesis and characterization of DTPSZ. The yield of TP was 3.17%, and the tea polysaccharide selenium nanoparticles (TP-SeNPs, TPS) were synthesized by chemical reduction using TP as template, and the synthesis conditions of TPS were optimized. The optimal synthesis conditions for TPS were a template concentration of 0.3 mg/mL with a 1:4 ratio of sodium selenite to L-ascorbic acid. The synthesis temperature is room temperature (25°C). The DOX loading rate of DTPSZ, which was

synthesized by the one-pot method, was about 1.8%. The result showed that the DTSPZ was an irregular particle with an average particle size of 166 nm and a zeta potential of 23 mV. Infrared spectroscopy, ultraviolet spectroscopy, and X-ray diffraction all confirmed the successful preparation of DTSPZ; In vitro release experiment showed that DTSPZ had a sustained release effect in a weak acid environment (pH 5.5, pH 6.5). Stability studies have found that DTSPZ can be stable for more than one week in an aqueous environment at 4°C.

(2) In vitro anti-tumor experiment and in vitro biosafety studies. The experimental result of CCK-8 assay and cell viability staining showed that DTSPZ had a more obvious effect on inhibiting the proliferation of HepG2 than the control group. The result of cell uptake experiment confirmed that DTSPZ could be taken up by HepG2 cells. The result of scratch assay showed that DTSPZ could inhibit the migration of tumor cells. The result of reactive oxygen species detection showed that DTSPZ could induce the production of reactive oxygen species from HepG2, thereby promoting apoptosis. The result of apoptosis assay showed that DTSPZ could induce more apoptosis in HepG2 cells than in the control group. The result of CCK-8 cytotoxicity showed that DTSPZ had no obvious toxicity to L929. At the same time, hemolysis experiment showed that DTSPZ did not induce hemolysis when the equivalent DOX concentration was less than 12 µg/mL, indicating that DTSPZ had good biosafety.

(3) In vivo anti-tumor experiment and in vivo biosafety studies. The in vivo anti-tumor efficacy, in vivo targeting, and in vivo biosafety of DTSPZ were studied by a tumor-bearing mouse model. IVIS in vivo imaging result showed that DTSPZ had good in vivo targeting

capabilities. The results of H&E stained sections and TUNEL stained sections showed that DTPSZ had good anti-tumor activity. Immunohistochemistry results showed that DTPSZ could increase the expression level of Caspase-3 protein and reduce the proportion of Ki67-positive cells, thereby inhibiting tumor cell proliferation and inducing tumor cell apoptosis. These results can show that DTPSZ is a potential high-quality cancer treatment drug. The results of H&E sections and blood biochemical indexes of major organs of mice showed that DTPSZ had good in vivo biological safety.

In summary, a nano-anti-liver cancer drug (DTPSZ) with targeted effect constructed in this study has demonstrated the anti-liver cancer activity and biosafety of DTPSZ through in vitro and in vivo experiments, and is expected to be developed into a new anti-liver cancer drug.

Yang Zicheng (Biological and Pharmaceutical Engineering)

Supervised by Qian Senhe

KEY WORDS: selenium nanoparticles, tea polysaccharides, ZIF-8, doxorubicin, liver cancer

目录

摘要.....	I
ABSTRACT.....	V
第一章 绪论	1
1.1 肝癌的概述.....	1
1.2 化疗药物.....	2
1.3 纳米药物.....	2
1.3.1 靶向性与精准治疗.....	2
1.3.2 缓释性与长效作用.....	3
1.3.3 改善药物性能.....	3
1.4 硒元素的概述.....	4
1.5 纳米硒的概述.....	4
1.5.1 纳米硒的合成.....	5
1.5.2 纳米硒在生物学方面的应用.....	6
1.6 茶多糖的概述.....	7
1.7 金属沸石咪唑骨架在抗肿瘤方面的应用.....	8
1.8 选题意义和研究内容.....	9
1.8.1 选题意义.....	9
1.8.2 研究内容.....	9
第二章 DTPSZ 的制备与表征	11
2.1 引言.....	11

2.2 实验材料.....	13
2.2.1 实验材料.....	13
2.2.2 实验试剂和仪器.....	13
2.3 实验方法.....	15
2.3.1 TP 的提取	15
2.3.2 TP 的得率计算	16
2.3.3 TPS 的制备及反应条件优化.....	16
2.3.4 DTPS 的制备	17
2.3.5 DTPSZ 的制备及优化	18
2.3.6 DTPSZ 的表征	19
2.3.7 DTPSZ 的体外释放情况和稳定性观察	19
2.3.8 统计分析.....	19
2.4 结果与分析.....	19
2.4.1 TP 的提取和得率	19
2.4.2 TPS 的制备和反应条件优化.....	19
2.4.3 DTPSZ 的制备和优化	23
2.4.4 DTPSZ 的表征	24
2.4.5 DTPSZ 的体外释放情况和稳定性观察	27
2.5 本章小结.....	28
第三章 DTPSZ 的体外抗肿瘤研究	29
3.1 引言.....	29

3.2 实验部分.....	29
3.2.1 细胞培养.....	29
3.2.2 DTPSZ 的体外细胞实验	30
3.2.3 流式细胞术.....	32
3.2.4 DTPSZ 的体外生物安全性研究	33
3.3 结果和分析.....	34
3.3.1 体外细胞实验.....	34
3.3.2 流式细胞术检测细胞凋亡.....	39
3.3.3 DTPSZ 的体外生物安全性研究	40
3.4 本章小结.....	41
第四章 DTPSZ 的体内抗肿瘤研究	43
4.1 前言.....	43
4.2 实验方法.....	43
4.2.1 HepG2 肿瘤模型的构建	43
4.2.2 DTPSZ 体内抗肿瘤效果的研究	43
4.2.3 DTPSZ 体内靶向效果的研究	44
4.2.4 肿瘤组织学和免疫组化检测.....	44
4.2.5 DTPSZ 的体内生物安全性研究	44
4.3 结果和分析.....	45
4.3.1 DTPSZ 体内抗肿瘤效果的研究	45
4.3.2 DTPSZ 体内靶向效果的研究	46

4.3.3 肿瘤组织学和免疫组化.....	47
4.3.4 DTPSZ 的体内生物安全性分析	48
4.4 本章小结.....	50
第五章 结论与展望.....	52
5.1 结论.....	52
5.2 展望.....	53
参考文献.....	54
攻读硕士学位期间研究成果.....	62
致谢.....	63

中英文缩略词对照表

缩略词	英文全称	中文名称
HCC	Hepatocellular Carcinoma	肝细胞癌
EPR	Enhanced permeability and retention effect	高渗透性和滞留效应
DLS	Dynamic Light Scattering	动态光散射
XRD	X-Ray Diffraction	X 射线衍射
SEM	Scanning electron microscope	扫描电子显微镜
TEM	Transmission Electron Microscope	透射电子显微镜
UV-Vis	Ultraviolet-visible Spectrophotometer	紫外-可见分光光度计
FTIR	Fourier transform infrared spectrometer	傅里叶变换红外光谱仪
L929	NCTC clone 929	小鼠成纤维细胞
IVIS	In Vivo Imaging Systems	体内成像系统
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium	杜氏改良 Eagle 培养基
FBS	Fetal Bovine Serum	胎牛血清
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute 1640	罗斯维尔公园肿瘤研究所 1640 培养基
HepG2	Human hepatocellular carcinomas	人肝癌细胞
H&E	Hematoxylin-Eosin staining	苏木精/伊红染色实验
TUNEL	Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP Nick End Labeling	原位末端转移酶标记技术
Caspase-3	CysteinyI aspartate specific proteinases-3	半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3
ALT	Alanine transaminase	谷丙转氨酶
AST	Aspartate aminotransferase	门冬氨酸氨基转移酶
CREA	Creatinine	肌酐
BUN	blood urea nitrogen	血尿素氮

第一章 绪论

1.1 肝癌的概述

癌症（Cancer），亦称恶性肿瘤，由细胞恶性增生引发，具侵袭性和转移性。主要分类包括癌、肉瘤及癌肉瘤三种。癌症的发病原因通常是由于机体受到化学、物理、病毒等多种因素的长期共同作用，发生基因异常改变，包括原癌基因激活、抑癌基因失活、多种基因异常的累积等。肝癌（Liver Cancer）即肝脏恶性肿瘤，可分为原发性和继发性两大类。原发性肝癌主要包括肝细胞癌和肝内胆管癌，其中肝细胞癌（HCC）是肝癌的主要病理学类型，据统计，肝细胞癌占原发性肝癌的比例为 75%~85%，由于 HCC 早期患者没有明显症状，通常发现时就是中晚期，患者的五年生存率仅为 18%，HCC 也是全球癌症死亡的第三大原因^[1]。原发性肝癌的病因及确切作用机制尚不明确，主流观点认为其发病是多因素、多步骤的复杂过程，受环境和饮食双重因素影响。流行病学及实验研究资料表明，病毒性肝炎感染、黄曲霉素、酒精、亚硝胺类物质等都是可能诱发肝癌的因素^[2]。继发性肝癌又称转移性肝癌，系指全身多个器官起源的恶性肿瘤通过血液、淋巴液等途径侵犯至肝脏。

据世界卫生组织统计，2022 年全球约有 866136 例肝癌新发病例，约 758725 例死于原发性肝癌^[3]。2022 年中国肝癌新发病例数 37 万例，位居第 4 位，肝癌死亡病例数 32 万例，位居第 2 位^[4]。

目前原发性肝癌的主要治疗手段包括手术切除、肝移植、化学治疗和免疫治疗等^[5-7]。对于早期肝癌患者，手术切除是根治性治疗的首选方法。但手术切除仅适用于肝功能良好且肿瘤局限的患者，术后复发率较高，且对肝功能有一定损害。肝移植是最有效的治疗手段，术后五年生存率高，但问题是难以寻找到合适配体。免疫治疗通过激活免疫系统为肝癌治疗带来突破，但治疗效果与患者的体质相关，且费用高昂^[8]。化疗是较为常见且应用较广的传统癌症治疗手段，然而，毒副作用大、易产生耐药性、患者依从性差、易复发等缺点^[9-12]，

极大限制了临床应用。因此，开发高效、低毒的新型化疗药物具有非常重要的意义。

1.2 化疗药物

常见化疗药物有很多种，如表柔比星、丝裂霉素、紫杉醇、顺铂和多柔比星等。多柔比星也称阿霉素（Doxorubicin, DOX），是一种临床上常用的广谱抗肿瘤抗生素，可抑制 RNA 和 DNA 的合成，对 RNA 的抑制作用最强，抗癌谱较广，对多种肿瘤均有作用^[9,11,13]，因此在临床治疗中应用广泛，适用于急性白血病、膀胱癌、甲状腺癌、前列腺癌、头颈部鳞癌、睾丸癌、胃癌和肝癌等^[14]。然而，DOX 具有抑制骨髓造血功能、延缓性心脏毒性、导致脱发等多种毒副作用^[9,11]，除此之外，长时间使用 DOX 进行肿瘤治疗，还会导致肿瘤细胞产生对 DOX 的耐药性。因此，如何在不增加 DOX 用量的同时提高药物的治疗效果是当前抗肿瘤纳米药物的一个研究方向。目前的主要手段主要为引入其他低毒性活无毒的抗肿瘤物质与 DOX 形成协同治疗，或是采取靶向递送手段提高肿瘤细胞对 DOX 的吸收率等。

1.3 纳米药物

近年来，在生物与医药领域关于纳米材料的研究十分火热。纳米药物是一种利用纳米技术将药物分子包裹或吸附于纳米级载体（1-1000 nm）的新型药物递送系统，其核心优势在于通过物理化学性质优化和生物学功能设计，显著提升治疗效果并降低副作用。纳米技术在癌症治疗中的应用是近年来医学研究的热点领域，通过利用纳米材料的独特性质，为癌症的诊断、治疗和预防提供了新的可能性。

1.3.1 靶向性与精准治疗

纳米药物载体可以通过 EPR 效应或是表面修饰实现对肿瘤的精准靶向。肿瘤组织的“增强渗透和滞留效应”是纳米药物递送和癌症治疗中的一个重要概念。肿瘤血管内皮细胞间隙较大（通常为 100-2000 nm），且血管壁不完整，使得纳

米颗粒和大分子药物更容易从血管渗出，同时，肿瘤组织的淋巴系统功能不全，导致渗出的药物或纳米颗粒无法被有效清除，从而在肿瘤部位滞留^[15-17]。除此之外，还可以通过表面修饰靶向分子（如抗体或配体），使纳米药物可特异性识别肿瘤组织并靶向递送^[18,19]。通过纳米载体的靶向递送，可以有效减少药物在正常器官内的积累从而减少毒副作用。

1.3.2 缓释性与长效作用

纳米载体可控制药物释放速率，延长药物在体内的循环时间，减少给药频率。通过调节纳米颗粒的尺寸或形态，可精确控制药物释放速率和摄取率^[20]。Ahmed等^[21]使用乳酸-羟基乙酸共聚物包裹5-氟尿嘧啶和槲皮素制备出了对结肠癌具有靶向缓释作用的纳米粒。部分纳米载体还可通过pH值、温度或光等外部刺激触发药物释放，实现精准时空控制。Zheng等^[22]通过一锅法合成了负载DOX的DOX@ZIF-8颗粒，并通过透析法测得DOX@ZIF-8颗粒在pH 5.0-6.0的微酸环境下会逐渐释放其中的DOX。

1.3.3 改善药物性能

纳米载体能够有效改善药物的多项性能，包括药物的水溶性和药物的稳定性等^[23,24]。药物的水溶性是影响其吸收、分布和生物利用度的重要因素，提高药物的水溶性能够有效提高药物的生物利用度。药物进入人体之后必须首先在体液中溶解，才能通过生物膜进入血液循环，因此，水溶性差的药物会因为难以溶解，导致吸收不完全或延迟，降低生物利用度。纳米载体通过增加比表面积或形成水分散体系显著改善溶解性。Zheng等^[25]合成了适配体修饰的介孔二氧化硅，通过其负载血卟啉和精氨酸用于肺癌的靶向治疗，介孔二氧化硅独特的介孔结构和良好的生物相容性使其成为靶向药物的优良载体。通过纳米技术可以将水溶性差的药物包裹或分散，提高其溶解度和生物利用度以改善难溶性药物的递送效率。田会婷等^[26]制备了姜黄素-明胶纳米复合物，改善了姜黄素的水溶性和稳定性。除此之外，纳米载体包封技术还可保护光敏、热敏或易降解药物，提升其稳定性（如脂质体包裹核酸）。

1.4 硒元素的概述

硒元素是瑞典化学家贝采里乌斯于 1817 年在铅室法硫酸生产中发现，早期被视为有毒元素。直至 1951 年，德国科学家施瓦茨通过小鼠实验证实硒的保肝作用，其生物学价值才被重新认识。当前更深入的科学研究使得人们对硒元素有了更加深刻的认识。

硒是人体的必需营养素之一，从膳食中摄取后主要在小肠内被吸收，在人体内与蛋白质结合为“含硒蛋白”后发挥生理作用，主要表现在抗氧化、调节甲状腺激素、维持正常免疫功能和预防与硒缺乏相关地方病（克山病和大骨节病）等功能。硒营养状况还与多种癌症的发病有关，膳食硒摄入 $>55\text{ }\mu\text{g/d}$ 能有效降低食道癌、肝癌、胰腺癌的发病率，但增加皮肤癌的发病风险；补充硒能降低结肠癌、肺癌和前列腺癌的发病率^[27-30]。

硒主要有有机硒、无机硒以及单质硒三类，有机硒和无机硒都可以被人体吸收和利用，但无机硒通常具有易补充过量、稳定性差、毒性高等特性，而有机硒补充剂因体现出效率及安全性高等特性故已在临床及日常生活中成为关注的热点。硒单质存在六种同素异形体，主要分为无定形硒和结晶硒两大类，无定形硒为红色粉末、黑色玻璃状或胶状固体，结晶硒主要有红色单斜晶体和灰色六方晶体两类种。红色单斜晶体呈深红色，结构不稳定，加热后迅速转变为灰色六方晶体。灰色六方晶体为三角晶系（六方密堆积），是自然界中最稳定的硒形态。

1.5 纳米硒的概述

纳米硒（selenium nanoparticles, SeNPs）作为一种新型单质硒，是采用化学、物理或生物方法将硒离子还原为纳米级（1-100 nm）单质硒颗粒，具有红色胶态特征。相比传统无机硒（如亚硒酸钠）和有机硒（如硒代蛋氨酸），SeNPs 毒性显著降低且生物活性提升；此外，作为药物载体，具有生物相容性好、负载率高、毒性低、易合成、易储存等优点。

1.5.1 纳米硒的合成

SeNPs 的合成方法主要有三类：化学合成法、物理合成法以及生物法。化学合成法是采用还原剂将高价态的含硒化合物还原为单质硒，化学合成法是合成纳米硒最简单也最为常用的方法。物理合成法是指通过光催化或激光灼烧等手段使硒靶材激发和释放电子从而合成单质纳米硒，该方法较少采用。生物法是指采用产硒微生物代谢将含硒化合物转化为 SeNPs^[31,32]。关于这些合成方法的具体介绍如下。

1.5.1.1 化学还原法

化学还原法是采用还原剂将高价态硒源还原合成 SeNPs，常见的还原剂有抗坏血酸、没食子酸和硼氢化钠等，而常用的硒源有亚硒酸钠、亚硒酸、二氧化硒等。该方法为水相合成 SeNPs，但是合成的 SeNPs 不稳定，在水溶液中易聚集，从红色无定形硒转化为灰色晶体硒。因此，化学合成法制备纳米硒通常会搭配软模板进行反应。目前有许多生物模板可以调节 SeNPs 的活性和稳定性，如糖类、蛋白质、表面活性剂等已被用于稳定 SeNPs。这些模板包含大量的羟基、碳基和其他官能团，使其能够与 SeNPs 相互作用，从而避免了 SeNPs 的聚集和沉淀。Zeng 等^[33]使用 Na_2SeO_3 和 Vc 为原料，以壳聚糖为模板合成了 CTPS-SeNPs，并通过研究发现 CTPS-SeNPs 具有抗糖尿病活性。Xia 等^[34-36]分别采用 RGD 肽、半乳糖、透明质酸为模板制备了纳米硒颗粒用于负载 DOX，获得了 RGDfC-Se@DOX、GA-Se@DOX、HA-Se@DOX，分别用于治疗肺癌、肝癌和宫颈癌。He 等^[37]以香菇多糖为模板采用 Vc 还原 Na_2SeO_3 合成了 LNT-SeNPs，并通过合成条件的优化实现了 LNT-SeNPs 的 250 L 级工业化量产。

1.5.1.2 物理合成法

物理法合成 SeNPs 主要是采用物理手段（如高能激光、高温蒸发、机械粉碎、射线等）直接制备纳米级硒颗粒，无需使用化学还原剂或溶剂，具有产物纯度高、无化学残留等优势。常见的激光灼伤法是利用高能激光脉冲轰击固态硒靶材，使其表面瞬间气化并形成等离子体，随后在惰性气体环境中快速冷

凝生成纳米颗粒。Guisbiers 等^[38]通过脉冲激光灼烧在去离子水中制备出了 60 nm 左右的纯硒纳米颗粒。激光灼烧法工艺简单、适合批量生产，缺点是能耗高、颗粒易团聚、需后续分散处理。Mosallam 等^[39]使用二氧化硒和米曲霉发酵羽扇豆提取物为原料在伽马射线的辅助下合成了粒径 115 nm 左右的 SeNPs，并通过实验发现通过该方法获得的 SeNPs 对醋酸不动杆菌、金黄色葡萄球菌、黄曲霉以及白色念珠菌均具有抑制能力。机械球磨法是通过高能球磨机的冲击和剪切力，将微米级硒粉破碎为纳米颗粒。机械球磨法成本低、可规模化生产，但其缺点是颗粒分布宽、易引入杂质（磨球磨损）、晶格缺陷多等。

1.5.1.3 生物法

生物法合成 SeNPs 是利用某些微生物的自身代谢酶或分泌的代谢产物将硒酸盐还原为 SeNPs 的特性来获取 SeNPs。例如，酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）可以通过硫代谢途径（如硫氧还蛋白还原酶）还原 Se^{4+} ，生成 SeNPs（粒径 30-200 nm）。但是生物法合成的 SeNPs 粒径均一度较差，还有纯化步骤复杂、易残留菌体碎片等问题。Cui 等^[40]以 Na_2SeO_3 为硒源，利用嗜热四膜虫 SB210（*Tetrahymena thermophila* SB210）合成了粒径 50~500 nm，掺杂着不规则硒颗粒的球形纳米硒。Faramarzi 等^[41]以 Na_2SeO_3 为硒源，采用酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）合成了粒径 75~709 nm 的 SeNPs，并通过研究发现适度的增加硒源能够促进酿酒酵母菌的生长。

1.5.2 纳米硒在生物学方面的应用

SeNPs 因其低毒性、高生物活性和稳定性，已在多个领域展现出重要应用价值。纳米硒在抗菌、抗肿瘤、抗氧化以及补硒保健品等方面均有应用。

1.5.2.1 纳米硒在抗肿瘤方面的应用

陈填烽课题组的深入研究发现，纳米硒在不同氧化还原环境下会发生不同的转化，在氧化环境中主要转化为细胞毒性亚硒酸盐，而在正常细胞中主要转化为含硒氨基酸用于调控硒蛋白表达，肿瘤氧化还原水平检测结果表明肿瘤细胞具有较高氧化水平，从而使纳米硒发生氧化代谢，增强其选择性^[42]。Liu 等^[43]

制备了 5-氟尿嘧啶修饰的 SeNPs 颗粒，并通过研究发现 5FU-SeNPs 能够通过促进活性氧的产生诱导癌细胞凋亡。

1.5.2.2 纳米硒在抗氧化方面的应用

SeNPs 能够清除自由基，增强抗氧化酶活性，因此可用于治疗糖尿病、神经系统疾病及氧化应激损伤。Giriprasad 等^[44]以南非红茶为模板合成了 SeNPs，并通过后续研究发现所合成的 SeNPs 表现出了优异的抗炎和抗糖尿病效果。

1.5.2.3 纳米硒在抗菌方面的应用

SeNPs 因其独特的物理化学性质（如高比表面积、表面活性位点及光响应性）和良好的生物相容性，在抗菌领域展现出显著潜力。其抗菌机制多样，且与传统抗生素相比，具有不易诱导耐药性、低毒性和广谱抗菌等优势。ElSheikh 等^[45]合成了 SeNPs 树脂复合物，并将其用于龋齿的修复，结果发现，SeNPs 能够显著增加龋齿修复树脂的抗菌能力。Vahdati 等^[46]通过研究发现 SeNPs 与溶菌酶一起使用可对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌起到协同抗菌作用。

1.6 茶多糖的概述

茶多糖（Tea Polysaccharides, TP）是从茶叶中提取的一类天然活性多糖的总称，由多种单糖（如葡萄糖、阿拉伯糖、半乳糖等）通过糖苷键连接形成，常与蛋白质、多酚等结合形成糖蛋白复合物。其分子量范围较广（10-400 kDa），具有显著的生物活性，是茶叶中继茶多酚、茶氨酸之后的又一研究热点。研究发现产多糖具有调节血糖与血脂代谢、调节肠道菌群、调节免疫功能、抗氧化与抗衰老以及抗癌等多种疗效^[47-49]。Zhao 等^[50]研究发现，TPS 可以通过调节肠道菌群的结构，增强肠道菌群中阴道粘液乳杆菌的相对丰度，并促进结肠组织中短链脂肪酸，从而缓解氟化物诱导的结肠炎。Wang 等^[51]通过热水萃取从白茶中提取 TPS，并研究了白茶多糖对癌细胞增殖、克隆、迁移、凋亡、活性氧含量和线粒体膜电位的影响，得出白茶多糖能够抗癌的结论。吴以龙等^[52]从普洱

茶中提取 TPS，并通过分离纯化检测 TPS 中各成分的生物活性，发现 TPS 的总糖含量、糖醛酸含量和酯化程度是影响 TPS 生物活性的主要指标。

1.7 金属沸石咪唑骨架在抗肿瘤方面的应用

金属沸石咪唑骨架 (Zeolitic Imidazolate Frameworks, ZIFs) 是一类具有沸石拓扑结构的金属有机骨架材料 (MOFs)，由过渡金属离子 (如 Zn^{2+} 、 Co^{2+}) 与咪唑类有机配体通过配位键连接形成，其独特的孔隙结构、高比表面积和化学稳定性使其在催化、能源存储、气体吸附等领域展现出广泛应用潜力^[53]。

金属沸石咪唑酯骨架-8 (ZIF-8) 是由锌离子和 2-甲基咪唑通过配位反应生成的一种多孔材料。ZIF-8 纳米颗粒除了具有比表面积大、孔隙率高、热稳定性好及表面易修饰等优点外，还兼具酸敏感性、良好生物相容性及低细胞毒性等特点，研究显示 ZIF-8 自身可诱导细胞焦亡或释放 Zn^{2+} ，增强抗肿瘤免疫反应，拓展了其治疗功能^[53-55]。

德国生理学家奥托·瓦伯格 (Otto Warburg) 于 1924 年提出的瓦伯格效应 (Warburg Effect) 是癌症代谢领域的核心概念之一，该效应描述了癌细胞即使在氧气充足的条件下，仍优先通过糖酵解而非线粒体氧化磷酸化来获取能量的现象^[56]。由于瓦伯格效应的存在，相比于正常细胞肿瘤细胞内乳酸更容易堆积，同时肿瘤组织的血管结构紊乱，无法及时将乳酸等酸性物质排出，最终导致肿瘤微环境呈现酸性。这一代谢特征不仅是癌症的标志性特征，也为肿瘤诊断和治疗提供了重要靶点。研究表明，人体内正常组织的 pH 值为 7.2-7.4，而肿瘤微环境 pH 值为 6.72-7.01，深处 pH 值甚至可达到 5.3^[57]。ZIF-8 纳米颗粒具有酸敏特性，在酸性环境中会崩解，同时 ZIF-8 具有良好的生物相容性，由于这些特性，使得 ZIF-8 作为抗肿瘤药物的优良载体而得到广泛应用^[53,54]。

1.8 选题意义和研究内容

1.8.1 选题意义

随着人类社会的工业化，人们的生活水平大幅度提高，然而物质生活水平的提高也带来了更多的健康隐患，肝癌的患病率连年攀升，现有的肝癌治疗方法均有各自的局限性，目前肝癌的治疗仍是以化疗为主。通过纳米技术增强化疗药物的靶向性和提高药物利用率来提高药物治疗效果和减少毒副作用对于肿瘤的化疗具有重要的意义。本论文以天然茶多糖为模板，合成一种稳定的载药 SeNPs 颗粒，通过 DOX 和 SeNPs 的协同作用提高抗肿瘤效果，并通过酸敏靶向外壳的包裹提升药物利用率，对抗肿瘤药物的开发具有一定的促进作用。

1.8.2 研究内容

硒的纳米颗粒具有良好的抗肿瘤活性和载药能力，但是单纯的 SeNPs 不稳定，容易聚集，通常现需要搭配软模板提高其稳定性和生物活性，本研究通过超声波辅助水提醇沉法从云南普洱茶中提取出了 TP，并以 TP 为模板合成了茶多糖纳米硒（TP-SeNPs，TPS），并将其用于负载传统肿瘤化疗药物 DOX，然后通过一锅法合成 ZIF-8 将他们包覆，成功制得了 DTPSZ，并对其体内体外抗癌活性进行了研究。具体研究内容如下：

（1）DTPSZ 的制备和表征。采用超声波辅助水提醇沉法从云南普洱茶中提取到了 TP，并测定了获得的 TP 纯度。利用单因素实验确定合成 TPS 最佳的反应温度，最佳的 TP 添加量，以及最佳的亚硒酸钠和 L-抗坏血酸的摩尔量配比，利用单因素实验确定了 DTPSZ 合成中载 DOX 的茶多糖纳米硒（DOX/TP-SeNPs，DTPS）的最佳添加量。利用 Zeta 电位和激光粒度仪、傅里叶变换红外光谱仪、UV-Vis 紫外可见分光光度计、SEM、TEM 以及 Mapping 能谱对 DTPSZ 进行了表征。

（2）研究 DTPSZ 在体外对癌细胞的抑制能力。采用 CCK-8 试剂盒以及溶血实验检验了 DTPSZ 的生物安全性；CCK-8 试剂盒测定了 DTPSZ 对 HepG2 细

细胞的杀伤作用；并利用细胞荧光染色实验进一步验证了 DTPSZ 对癌细胞的杀伤作用。采用流式细胞术检测了 DTPSZ 诱导 HepG2 细胞凋亡的情况；DAPI 染色法以及流式细胞术检测了 HepG2 对 DTPSZ 的摄取；ROS 活性氧试剂盒和流式细胞仪检测了药物诱导 HepG2 产生 ROS 的影响；划痕实验检测了药物抑制 HepG2 迁移的能力。

（3）研究 DTPSZ 的体内抗肿瘤效果。在 BALB/c-nude 裸鼠腋下注射 HepG2 细胞，建立荷瘤小鼠模型。将小鼠分为五组，成瘤后分别注射 PBS、DOX、TPS、DTPS 以及 DTPSZ 进行治疗，并记录相关数据。采用 IVIS 动物活体成像仪检测 DTPSZ 在小鼠体内的靶向效果以及在各器官的积累状况。治疗结束后，将小鼠解剖并进行血液，H&E、TUNEL 以及免疫组化切片检测。

第二章 DTPSZ 的制备与表征

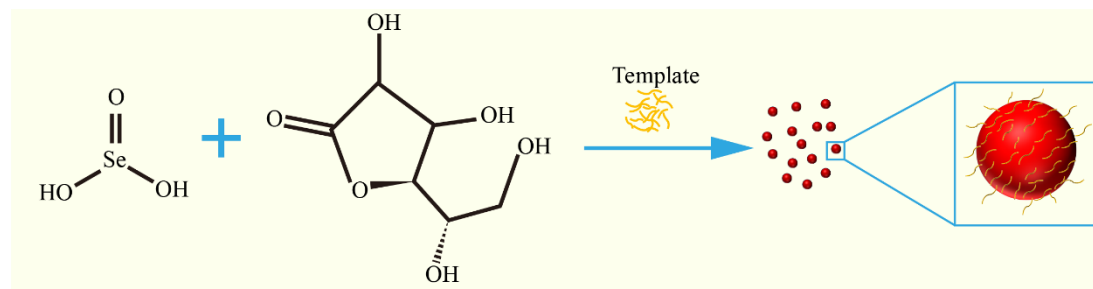
2.1 引言

DTPSZ 的合成主要分为以下几个部分，TP 的提取，TPS 的合成及优化，DTPS 的合成，DTPSZ 的合成。

TP 常见的提取方法主要有水提法、有机溶剂提取法、超临界流体萃取法（SFE）、超声波辅助法、微波辅助法、CTAB 沉淀法等^[58,59]。实际提取过程中为了提高提取率通常将不同的提取工艺与辅助方法相结合，本研究采用超声波辅助水提醇沉法提取 TP。

本研究采用化学还原法合成 TPS 颗粒，模板是 SeNPs 形成和稳定的关键，模板的作用主要有控制纳米硒的形状和大小，提高 SeNPs 的稳定性，功能化修饰等，使用不同的模板会得到大小形状不同的 SeNPs，这和有机模板的大小和添加量有关。

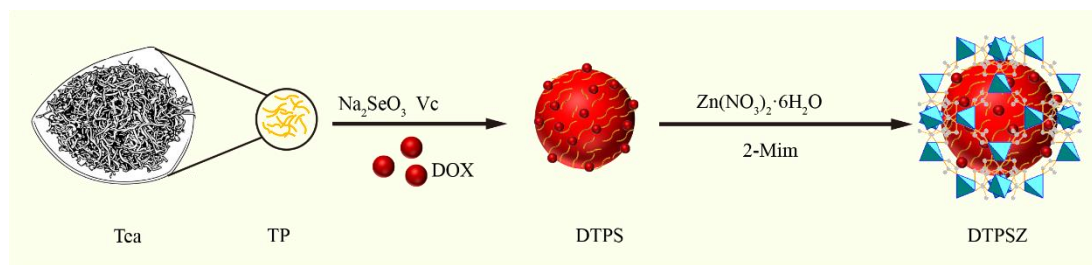
除了不同的模板种类，影响 SeNPs 粒径大小的反应条件还有很多，如反应温度、反应的 pH、模板的添加量、反应物的配比等。



原理图 2-1 SeNPs 的合成过程。
Scheme 2-1 Synthesis process of SeNPs.

DTPSZ 载药纳米颗粒的构建：经过 TP 修饰的 SeNPs，拥有较高的稳定性和较大的比表面积，是优良的药物载体，可通过静电吸附将小分子药物负载到表面，但是这种没有化学键连接的负载方式在所处环境发生变化时容易脱吸附。ZIF-8 具有高比表面积，同时具有酸敏特性，是抗肿瘤药物的优良载体。研究显

示，根据负载方式的不同，ZIF-8 对不同药物的载药率在 5%~30% 之间^[60]。小分子药物可通过包封或孔径吸附的方法负载于 ZIF-8，大分子或是纳米颗粒通常采用一锅法将 ZIF-8 包覆到表面。



原理图 2-2 DTPSZ 的合成过程。
Scheme 2-2 Synthesis process of DTPSZ.

2.2 实验材料

2.2.1 实验材料

本研究所用普洱茶（云南大叶茶）产自中国云南省昆明市。

2.2.2 实验试剂和仪器

表 2-1 实验试剂

Table 2-1 The main reagents of the experiment

药品名称	级别	生产厂家
无水乙醇	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
三氯甲烷	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
正丁醇	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
浓硫酸	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
葡萄糖	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
亚硒酸钠	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
L-抗坏血酸	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
盐酸阿霉素	分析纯	上海阿拉丁生化科技股份有限公司
2-甲基咪唑	分析纯	上海麦克林生化科技股份有限公司
六水硝酸锌	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
DMSO	分析纯	上海阿拉丁生化科技股份有限公司
PBS	细胞用	武汉塞维尔科技有限公司
DMEM	细胞用	武汉塞维尔科技有限公司
RPMI-1640	细胞用	武汉塞维尔科技有限公司
FBS	细胞用	北京索莱宝科技有限公司
青霉素-链霉素混合液	细胞用	武汉塞维尔科技有限公司
CCK-8	细胞用	白鲨
脱纤维羊血	无菌	比克曼生物
EDTA	分析纯	国药集团化学试剂有限公司

续表 2-1 实验试剂

Continued from table 2-1 The main reagents of the experiment

药品名称	级别	生产厂家
DAPI 染液	细胞用	白鲨
ROS 活性氧检测试剂盒	细胞用	白鲨
Calcein AM/PI 细胞活死试剂盒	细胞用	碧云天
Cy5-SE	-	上海源叶生物科技有限公司
多聚甲醛	4%	白鲨
Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒	细胞用	白鲨

表 2-2 实验仪器和设备

Table 2-2 Experimental instruments and equipment

仪器	型号	厂家
旋转蒸发器	RE-52AA	上海亚荣生化仪器厂
水浴锅	HH2	上海力辰科技
超纯水机	Smart-s15	上海和泰仪器有限公司
磁力搅拌器	HO1-1A	上海驰久
粉碎机	X3A	金坛市杰瑞尔电器有限公司
超声波细胞破碎仪	JY9-IIDN	宁波新芝生物科技股份有限公司
超声波清洗机	AK-040SD	深圳钰洁清洗设备有限公司
真空冷冻干燥机	Freezone 4.5L	美国 Labconco Corporation
高速冷冻离心机	Z326k	贺默（上海）仪器科技有限公司
紫外-可见分光光度计（UV-Vis）	UV-8000	上海精密有限公司
傅里叶变换红外光谱仪（FTIR）	IRPrestige-21	日本岛津公司
Zeta 电位和激光粒径仪	NanoBrook 90 Plus PALS	美国布鲁克海文公司
扫描电子显微镜（SEM）	S4800	日本岛津公司
透射电子显微镜（TEM）	Talos F200S G2	美国赛默飞世尔科技有限公司
X 射线衍射仪（XRD）	Smartlab SE	日本理学

续表 2-2 实验仪器和设备

Continued from table 2-2 Experimental instrumenTPS and equipmenTPS

仪器	型号	厂家
二氧化碳培养箱	311GP	美国赛默飞世尔科技有限公司
超净工作台	SW-CJ-1FD	苏州净化设备公司
超低温冰箱	700LISTED	美国赛默飞世尔科技有限公司
全波长酶标仪	Multiscan GO	美国赛默飞世尔科技有限公司
倒置荧光显微镜	IX73-DP74	日本奥林巴斯株式会社
真空泵	SHZ-III	上海贤德实验仪器有限公司
立式压力蒸汽灭菌锅	YXQ-100A	上海博讯实业有限公司
全自动生化分析仪	Chemray 240	深圳雷杜生命科技
倒置显微镜	NIB 610	永新光学
电子天平	LE104E	梅特勒托利多集团
掌上离心机	SMC-5000F	武汉塞维尔
流式细胞仪	Cytoflex	美国贝克曼库尔特有限公司
动物活体成像仪	IVIS Lumina LT Serise III	美国珀金埃尔默股份有限公司

2.3 实验方法

2.3.1 TP 的提取

采用超声波辅助水提醇沉法提取 TP，具体操作如下：准确称取 20 g 茶叶，用粉碎机彻底粉碎后过 40 目筛子除去大颗粒，加入适量去离子水后搅拌均匀，用超声波细胞破碎仪破碎 30 min，60 °C 水浴加热煮 30 min，用纱布过滤分离滤液和滤渣，将滤渣再次与适量去离子水混合并于 60 °C 水浴煮 30 min，过滤弃去滤渣，合并两次滤液，12000 rpm 离心弃去沉淀得到茶多糖粗提液。采用旋转蒸发仪将粗提液浓缩至四分之一体积，将浓缩液和无水乙醇 1:3 的体积比混合后 4 °C 过夜沉淀。12000 rpm 离心后弃去上清后加适量去离子水复溶，将复溶后的多糖粗提液与 Sevag 试剂以 1:1 的体积混合（注：Sevag 试剂配制方法：将氯仿与正

丁醇按体积比 4:1 混合即可制得 Sevag 试剂), 将混合液倒入分液漏斗中充分震荡后静置至分层, 分离水相和有机相, 将水相溶液离心后弃去蛋白质沉淀, 再次通过 Sevag 试剂去除蛋白质, 共做三次; 去除蛋白质后将多糖溶液通过真空冷冻干燥机冻干, 即可获得纯度较高的 TP。

2.3.2 TP 的得率计算

2.3.2.1 TP 的得率计算

茶多糖的得率通过如下公式计算:

$$f = \frac{m_1}{m_2} \times 100\% \quad \text{公式 2-1}$$

m_1 : 所提取茶多糖的质量; m_2 : 所用茶叶的质量。

2.3.3 TPS 的制备及反应条件优化

2.3.3.1 优化反应物摩尔量配比

分别配制 0.01、0.02、0.04、0.06 以及 0.08 mol/L 的 Vc 溶液, 0.01 mol/L 的亚硒酸钠溶液, 0.5 mg/mL 的 TP 溶液。准备五个小烧杯, 在小烧杯中分别加入 5 mL 亚硒酸钠溶液和 5 mL 的 TP 溶液, 超声 5 min 加速混匀后, 分别加入 5 mL 不同浓度的 Vc 溶液, 再次超声 5 min 加速混匀, 混匀后放置到 1000 rpm 磁力搅拌器上室温反应 12 h。反应结束后 12000 rpm 离心 15 min 弃去上清, 加入去离子水重悬后离心洗涤, 洗涤三遍后再加入适量的去离子水即可获得 TPS 悬液。采用 DLS 检测并记录各组的粒径数据。

2.3.3.2 优化 TP 添加量

分别配制 0.1、0.3、0.5、1 和 2 mg/mL 的 TP 溶液, 以 2.3.3.1 中测得的最佳 Vc 浓度为参考配制相应浓度的 Vc 溶液, 并配制 0.01 mol/L 的亚硒酸钠溶液。准备五个小烧杯, 在小烧杯中分别加入 5 mL 亚硒酸钠溶液和 5 mL 不同浓度的 TP 溶液, 超声 5 min 加速混匀后分别加入 5 mL 的 Vc 溶液, 再次超声 5 min 加速混匀, 混匀后放置到 1000 rpm 磁力搅拌器上室温反应 12 h。反应结束后 12000 rpm

离心 15 min 弃去上清，加入去离子水重悬后离心洗涤，洗涤三遍后再次加入适量的去离子水即可获得 TPS 悬液。采用 DLS 检测并记录各组的粒径数据。

2.3.3.3 优化反应温度

以 2.3.3.1 中测得的最佳 Vc 浓度为参考配制相应浓度的 Vc 溶液，以 2.3.3.2 中测得的最佳 TP 浓度为参考配制相应浓度的 TP 溶液，并配制 0.01 mol/L 的亚硒酸钠溶液。准备五个小烧杯，在小烧杯中分别加入 5 mL 亚硒酸钠溶液和 5 mL 的 TP 溶液，超声 5 min 加速混匀后分别加入 5 mL 的 Vc 溶液，再次超声 5 min 加速混匀，混匀后放置到 1000 rpm 的不同温度的磁力搅拌器上（温度分别为 15°C、25°C、35°C、45°C 和 55°C）反应 12 h。反应结束后 12000 rpm 离心 15 min 弃去上清，加入去离子水重悬后离心洗涤，洗涤三遍后再次加入适量的去离子水即可获得 TPS 悬液。采用 DLS 检测并记录各组的粒径数据。

2.3.3.4 反应物添加顺序对 TPS 的影响

以 2.3.3.1 中测得的最佳 Vc 浓度为参考配制相应浓度的 Vc 溶液，以 2.3.3.2 中测得的最佳 TP 浓度为参考配制相应浓度的 TP 溶液，并配制 0.01 mol/L 的亚硒酸钠溶液。准备两个小烧杯，在第一个小烧杯中加入 5 mL 亚硒酸钠溶液和 5 mL 的 TP 溶液，超声 5 min 加速混匀后再加入 5 mL 的 Vc 溶液，再次超声 5 min 加速混匀，在另一个小烧杯中加入 5 mL 的 Vc 溶液和 5 mL 的 TP 溶液，超声 5 min 加速混匀后分别加入 5 mL 的亚硒酸钠溶液，再次超声 5 min 加速混匀，混匀后将两个烧杯放置到磁力搅拌器上，转速设置为 1000 rpm，温度设置为 2.3.3.3 中测得的最佳反应温度，反应 12 h。反应结束后 12000 rpm 离心 15 min 弃去上清，加入去离子水重悬后离心洗涤，洗涤三遍后再次加入适量的去离子水即可获得 TPS 悬液。采用 DLS 检测并记录各组的粒径数据。

2.3.4 DTSP 的制备

将 TPS 透过 800 nm 聚醚砜滤膜除去大颗粒，再配制成 0.5 mg/mL 的悬液，吸取 1 mL 加入到小烧杯中，准确称取 10 mg 的 DOX，用 20 μ L 的 DMSO 溶解

后加入到小烧杯中，将小烧杯放置到磁力搅拌器上室温避光 300 rpm 搅拌 24 h。24 h 后 12000 rpm 离心，沉淀部分即是 DTPS。

2.3.5 DTPSZ 的制备及优化

2.3.5.1 DTPSZ 的制备

将 0.1 g 六水硝酸锌溶于 0.4 mL 去离子水中，将 1 g 二甲基咪唑溶于 4 mL 去离子水中，在烧杯中加入 400 μ L 六水硝酸锌溶液，再加入 3 mL DMSO 和 500 μ L DTPS，以及 200 μ L 水，超声 5 min 后加入 4 mL 二甲基咪唑溶液后继续超声 5 min，然后在磁力搅拌器下 1200 rpm 搅拌 1 h，12000 rpm 离心 15 min，用去离子水重悬离心洗三次，真空冷冻干燥 48 h 后即可获得 DTPSZ。

2.3.5.2 DTPSZ 的载药率和包封率

(1) 通过紫外-可见分光光度计测定可知，DOX 在 480 nm 处出现特征吸收峰，分别配制浓度为 0.01、0.02、0.03、0.04 和 0.05 mg/mL 的 DOX 溶液并分别测定 480 nm 处吸光度，记录数据并绘制 DOX 标准曲线。

(2) 通过紫外可见分光光度计在 480 nm 处测定合成药物时产生的上清液的吸光度，通过以下公式可得 DTPSZ 的载药率：

$$LC\% = \frac{m_1 - m_2}{m_3} \times 100\% \quad \text{公式 2-2}$$

DTPSZ 的包封率可通过以下公式计算得到：

$$EE\% = \frac{m_1 - m_2}{m_1} \times 100\% \quad \text{公式 2-3}$$

m1: DOX 总量；m2: 上清液中含有的 DOX 质量；m3: DTPSZ 的质量。

2.3.5.3 DTPSZ 制备条件的优化

通过改变反应过程中 DTPS 的添加量探究合成 DTPSZ 时 DTPS 的最佳添加量。具体方法如下：DTPSZ 制备方法同 2.3.5.1，在四组实验中，分别添加 400 μ L、500 μ L、600 μ L 和 700 μ L 的 DTPS，加入相应体积的去离子水使各组反应体系保持一致，反应结束后 12000 rpm 离心收集上清液并测定计算上清液中 DOX 的含量，确定 DTPSZ 的最大载药量。

2.3.6 DTPSZ 的表征

采用 SEM 和 TEM 观察 DTPSZ 的形貌特征，FTIR 测定材料的红外光谱，紫外-可见分光光度计测定材料的紫外吸收光谱，DLS 纳米粒度及 ZETA 电位分析仪测定材料的粒径及 ZETA 电位，X 射线衍射仪分析材料的晶体结构。

2.3.7 DTPSZ 的体外释放情况和稳定性观察

采用透析法测定 DTPSZ 的体外释放情况，将 5 mg 的 DTPSZ 分别溶于 5 mL 的 pH7.4、pH6.5 以及 pH5.5 的 PBS 缓冲液中，并加入到分子量 3000 Da 的透析袋里，将透析袋置于装有 50 mL 相同 pH 的 PBS 缓冲液的烧杯中，然后将烧杯放到 37°C、120 rpm 的摇床中；在不同时间点取样并采用 UV-Vis 测定 480 nm 处吸光度。将 DTPSZ 分散于 PBS 缓冲溶液和添加 10% FBS 的 DMEM 中，观察并记录 DTPSZ 在这两种介质中水动力尺寸的变化。

2.3.8 统计分析

所有的试验至少重复三次，采用 Origin 2024 进行数据分析并绘制图形。数据以平均值 $\pm$ SD 表示。本研究中，各组间的统计学差异分别用 ns: no significant difference、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 表示。

2.4 结果与分析

2.4.1 TP 的提取和得率

20 g 茶叶提取纯化后最终获得 0.634 g TP，将结果带入公式 2-1 可得，本研究所采用的超声波辅助水提醇沉法提取茶多糖的得率为 3.17%。

2.4.2 TPS 的制备和反应条件优化

2.4.2.1 优化反应物摩尔量配比

不同反应物配比粒径和 PDI 结果如图 2-1 所示：

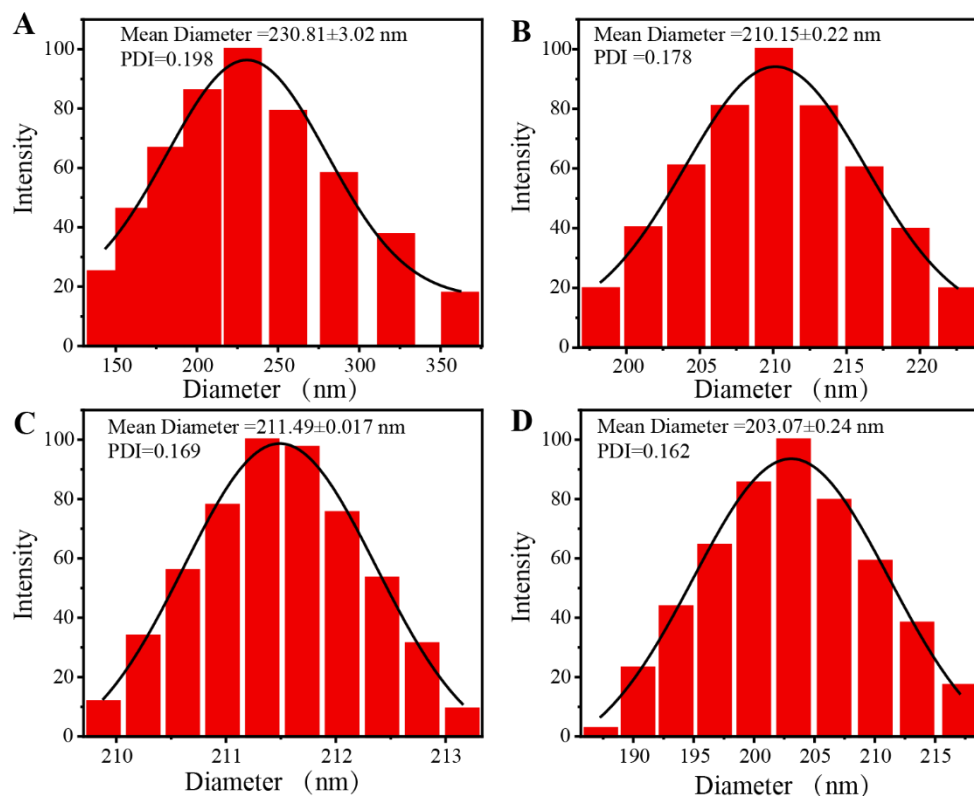


图 2-1 反应物配比优化。 Na_2SeO_3 和 Vc 摩尔量之比分别为 (A) 1:2。 (B) 1:4。 (C) 1:6。 (D) 1:8。

Figure 2-1 Optimization of reactant ratios. Sodium selenite: L-ascorbic acid ratios are (A) 1:2. (B) 1:4. (C) 1:6. (D) 1:8.

表 2-3 反应物配比优化。

Table 2-3 Optimization of reactant ratios.

Na_2SeO_3 : Vc	Diameter (nm)	PDI
1:1	-	-
1:2	230.81±3.02	0.198
1:4	210.15±0.22	0.178
1:6	211.49±0.017	0.169
1:8	203.07±0.24	0.162

由图 2-2 和表 2-3 可以看出，当 Na_2SeO_3 和 Vc 摩尔量之比为 1:1 时，反应难以正常进行，生成的 SeNPs 的量过低，DLS 动态光散射粒径仪无法正常测出粒径和 PDI。若想反应正常进行，Vc 的添加量至少要是 Na_2SeO_3 的两倍，当 Vc 的添加量是 Na_2SeO_3 的四倍时，反应生成的 SeNPs 粒径为 210.15 ± 0.22 nm，PDI 为 0.178，当 Vc 的添加量继续提高时，SeNPs 的粒径和 PDI 并没有明显的提高。因此，可以得出，四倍的 Vc 添加量足以使反应完全进行。

2.4.2.2 优化模板添加量

不同浓度的 TP 反应制得 TPS 所测粒径和 PDI 结果如图 2-3 所示：

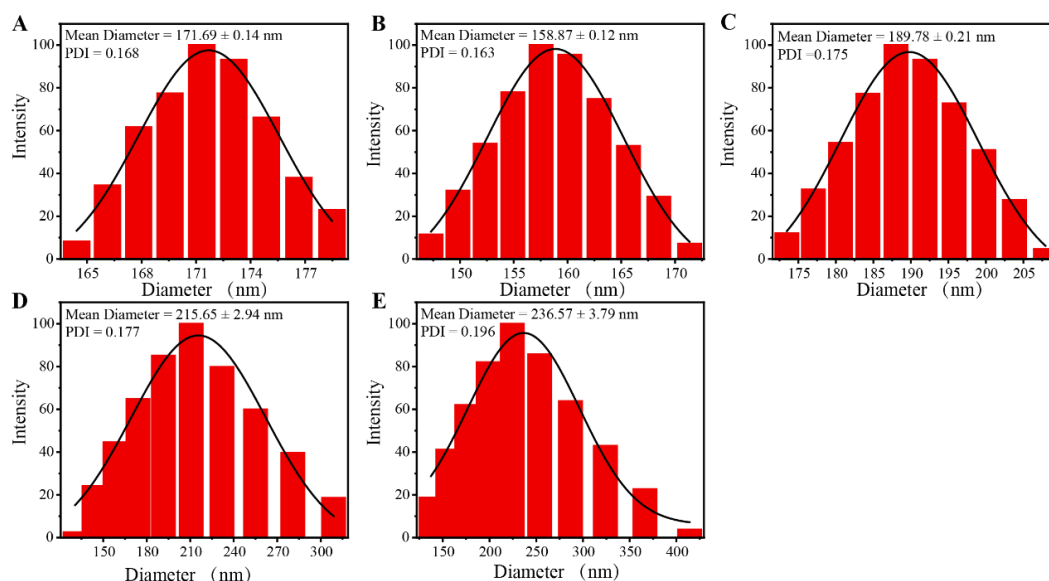


图 2-2 模板添加量优化。(A) 0.1 mg/mL。(B) 0.3 mg/mL。(C) 0.5 mg/mL。(D) 1 mg/mL。(E) 2 mg/mL。

Figure 2-2 Optimized the amount of templates added. (A) 0.1 mg/mL. (B) 0.3 mg/mL. (C) 0.5 mg/mL. (D) 1 mg/mL. (E) 2 mg/mL.

表 2-4 模版添加量优化。

Table 2-4 Optimized the amount of templates added.

TPS 浓度 (mg/mL)	Diameter (nm)	PDI
0.1	171.69±0.14	0.168
0.3	158.87±0.12	0.163
0.5	189.78±0.21	0.175
1	215.65±2.94	0.177
2	236.57±3.79	0.196

由图 2-3 和表 2-4 可以看出，当所添加模板浓度由 0.1 mg/mL 提升至 0.3 mg/mL 时，TPS 的粒径粒径变小，分散性提高，这是由于当模板添加量过低时，难以提供足够的生长核心；而当 TP 浓度提升到 0.5 mg/mL 或更高时，TPS 的粒径变大，当 TP 浓度提升至 2 mg/mL 时，粒径达到了 236.57±3.79 nm，PDI 提高到 0.196，分散性降低。因此，可以得出，制备 TPS 的最佳模板添加浓度为 0.3 mg/mL。

2.4.2.3 优化反应温度

不同反应温度条件下制备的 TPS 粒径和 PDI 结果如图 2-4 所示：

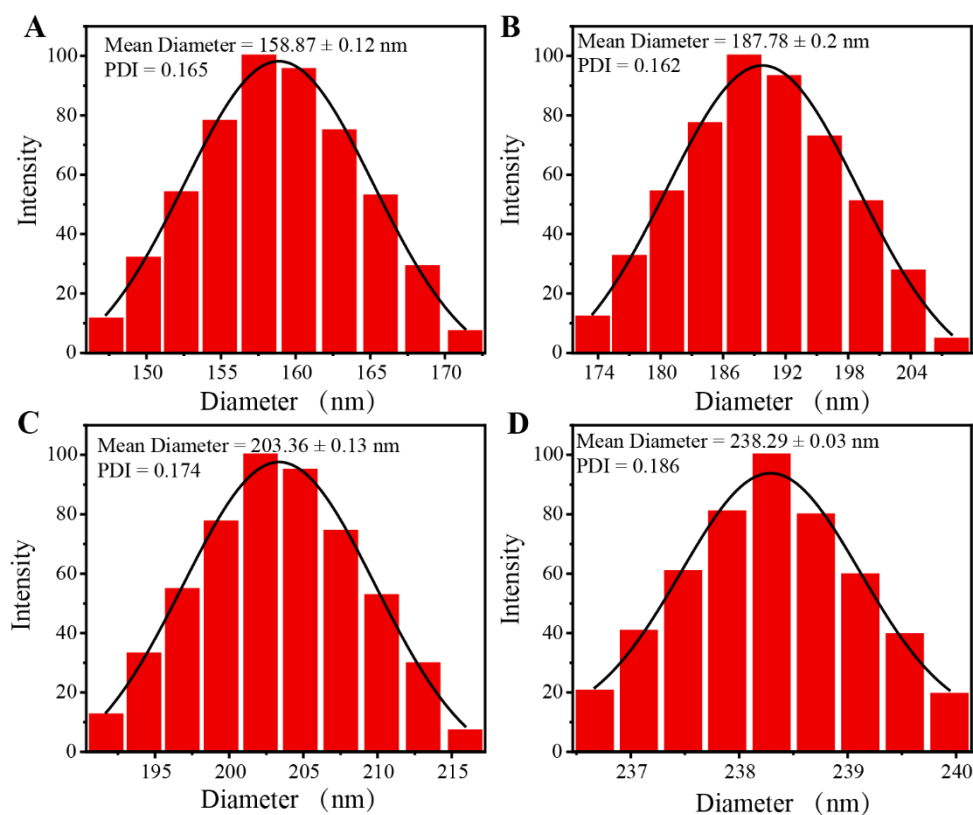


图 2-3 反应温度优化。(A) 25°C。(B) 35°C。(C) 45°C。(D) 55°C。

Figure 2-3 Optimized the temperature. (A) 25°C. (B) 35°C. (C) 45°C. (D) 55°C.

表 2-5 反应温度优化。

Table 2-5 Optimized the temperature.

温度 (°C)	Diameter (nm)	PDI
15	-	-
25	158.87 ± 0.12	0.165
35	187.78 ± 0.2	0.162
45	203.36 ± 0.13	0.174
55	238.29 ± 0.03	0.186

由图 2-4 和表 2-5 可以看出，当温度较低时，反应进行缓慢，生成的 TPS 颗粒过少导致 DLS 动态光散射粒径仪难以测出可用数据，当温度超过 25°C，TPS 的粒径开始增大，PDI 也提高。因此可以得出，TPS 合成的最佳温度为常温 25°C。

2.4.2.4 反应物添加顺序对 TPS 的影响

通过改变反应物 Na_2SeO_3 和 Vc 的添加先后顺序制得的 TPS 粒径和 PDI 结果如图 2-5 所示：

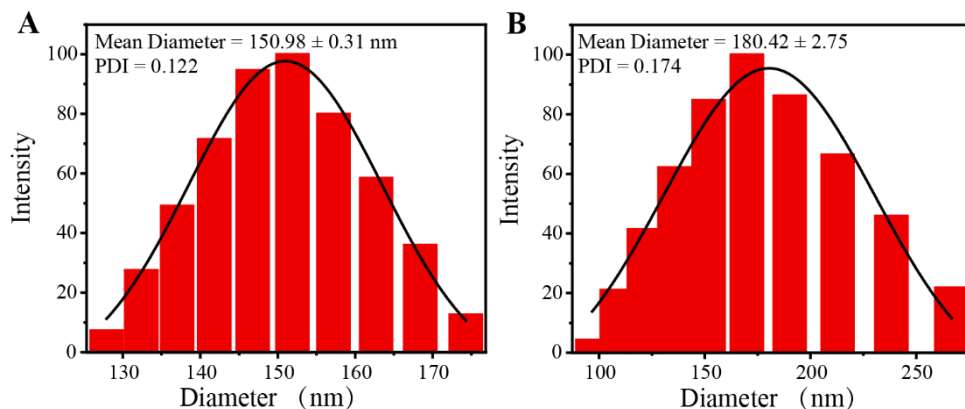


图 2-4 反应物添加顺序对 TPS 的影响。(A) 先加 Na_2SeO_3 。(B) 先加 Vc。
Figure 2-4 Effect of reaction addition order on TPS. (A) Na_2SeO_3 is added first. (B) Add Vc first.

表 2-6 反应物添加顺序对 TPS 的影响。
Table 2-6 Effect of reactant addition order on TPS.

先加	Diameter (nm)	PDI
Na_2SeO_3	150.98 ± 0.31	0.122
Vc	180.42 ± 2.75	0.174

由图 2-5 和表 2-6 可以看出，反应物 Na_2SeO_3 和 Vc 的添加先后顺序会影响到 TPS 的粒径和 PDI，先加 Na_2SeO_3 生成的 TPS 的粒径小于先加 Vc 生成的 TPS 粒径，且分散性更好，因此，制备 TPS 应先添加 Na_2SeO_3 。

2.4.3 DTPSZ 的制备和优化

2.4.3.1 DTPSZ 的载药率和包封率

DOX 在水溶液中的标曲如图 2-6 所示：

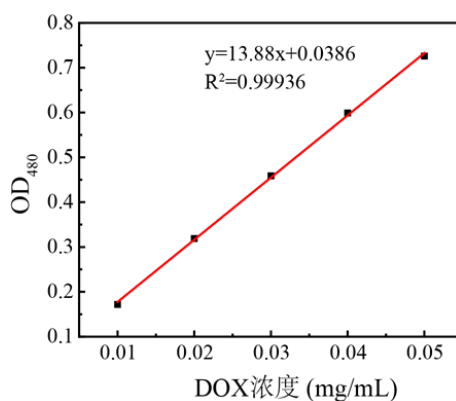


图 2-5 DOX 标准曲线

Figure 2-5 Standard curves of DOX

2.4.3.2 DTPSZ 制备条件的优化

使用 UV-Vis 测定 DTPSZ 合成后所得上清液在 480 nm 处的吸光度可以得到上清液含有的 DOX 的量 m_2 ，将 DOX 总投入量 m_1 和上清液中 DOX 的量 m_2 以及 DTPSZ 的质量 m_3 代入公式 2-2 和公式 2-3 计算可以得出 DTPSZ 的载药率和包封率，结果如表 2-7 所示：

表 2-7 DTPSZ 制备条件的优化
Table -7 Optimization of DTPSZ preparation conditions

DTPS 添加量 (μL)	包封率 (%)	对 DOX 载药率 (%)
400	82.75	1.47
500	77.43	1.68
600	65.58	1.82
800	48.89	1.87

DTPSZ 的制备优化结果如表 2-7 所示。可以看出，DTPSZ 的最大包封率为 82.75%，DTPSZ 对 DOX 的最大载药率为 1.87 mg，随着 DTPS 添加量从 400 μL 增大到 600 μL ，DTPSZ 的载药量逐渐增大，包封率逐渐减小，当 DTPS 的添加量大于 600 μL 时，DTPSZ 对 DTPS 的包封率出现了下降，而载药率却没有明显提升，说明 600 μL 的 DTPS 基本接近最大，即合成 DTPSZ 过程中 DTPS 的最佳添加量为 600 μL ，该条件下 DTPSZ 的载药率和包封率分别为 1.82% 和 65.58%。

2.4.4 DTPSZ 的表征

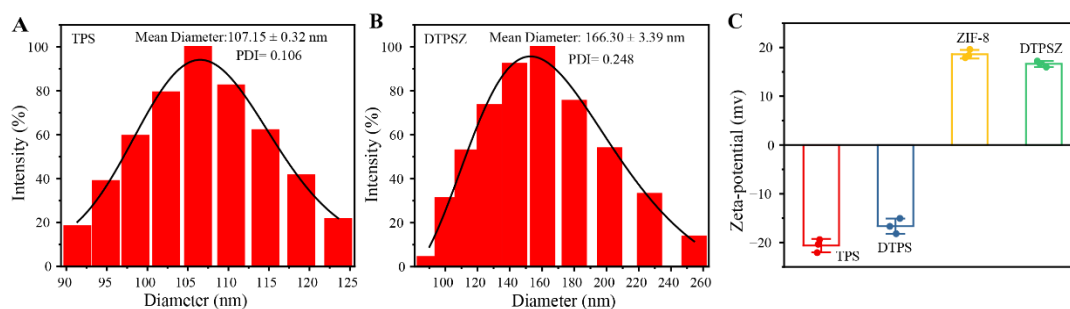


图 2-6 (A) (B) TPS 和 DTPSZ 的 DLS 粒径分布图 (经过 800 nm 滤膜过滤)。(C) TPS、DTPSZ、ZIF-8 和 DTPSZ 的 Zeta 电位。

Figure 2-6 (A) (B) DLS particle size distribution of TPS and DTPSZ (filtered through an 800 nm membrane). (C) ZETA potential of TPS, DTPSZ, ZIF-8, and DTPSZ.

经过 800 nm 滤膜过滤后的 DTPSZ 和 TPS 的 DLS 粒径分布结果如图 2-6A、B 所示, TPS 由 DLS 测得的粒径分别为 107.15 ± 0.32 nm, DTPSZ 的 DLS 粒径为 166.3 ± 3.39 nm, TPS、DTPSZ、ZIF-8 和 DTPSZ 的 Zeta 电位如图 2-7C 所示, 其 TPS、DTPSZ、ZIF-8 和 DTPSZ 的电位分别为 -21.36 ± 1.65 mV、 -17.65 ± 1.36 mV、 18.88 ± 4.88 mV 和 15.13 ± 1.52 mV, 该电位变化说明 ZIF-8 成功包裹在了 DTPSZ 表面。

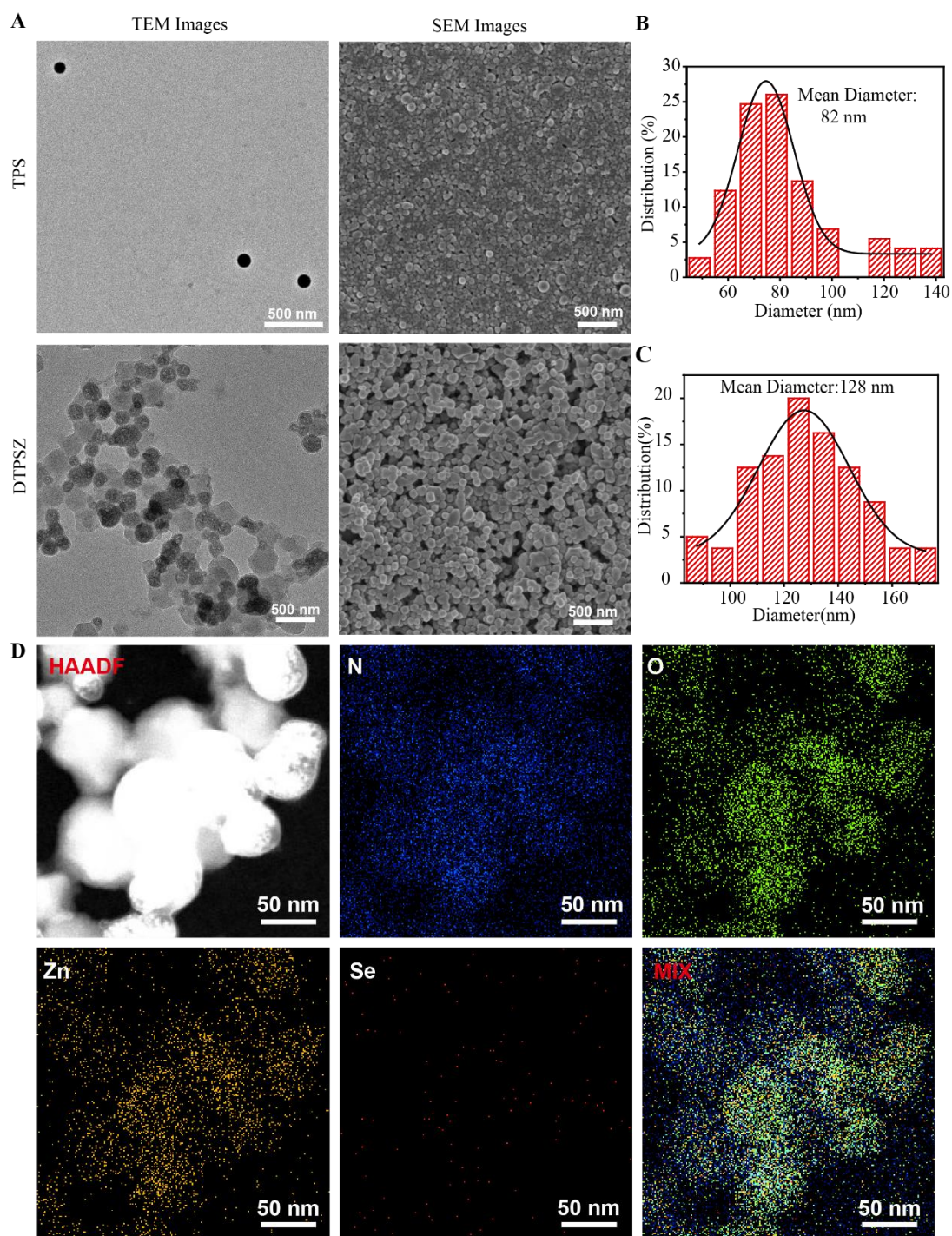


图 2-7 (A) SEM 和 TEM。(B) (C) 电镜图粒径统计。(D) DTPSZ 的 Mapping。
Figure 2-7 (A) SEM and TEM. (B) (C) Particle size statistics of electron microscopy images.
(D) Mapping of DTPSZ.

图 2-7A 为 DTPSZ 和 TPS 的 SEM 和 TEM 图像。由图可以看出, TPS 为球形颗粒, DTPSZ 为不规则颗粒, 且具有明显的核壳结构, 说明 DTPS 被成功包覆在其中。图 2-7B、C 分别为 SEM 图像中 TPS 和 DTPSZ 颗粒的粒径统计结果。可知, TPS 的平均粒径为 82 nm, DTPSZ 的平均粒径为 128 nm, 该结果与 TPS 和

DTPSZ 的 DLS 检测结果相符合。为进一步探究 DTPSZ 的结构,采用 TEM 的能谱面扫 (Mapping) 对 DTPSZ 进行元素组成分析。由图 2-8D 可以看出, DTPSZ 含有 N、O、Zn 和 Se 元素,说明 DTPSZ 的成功合成。

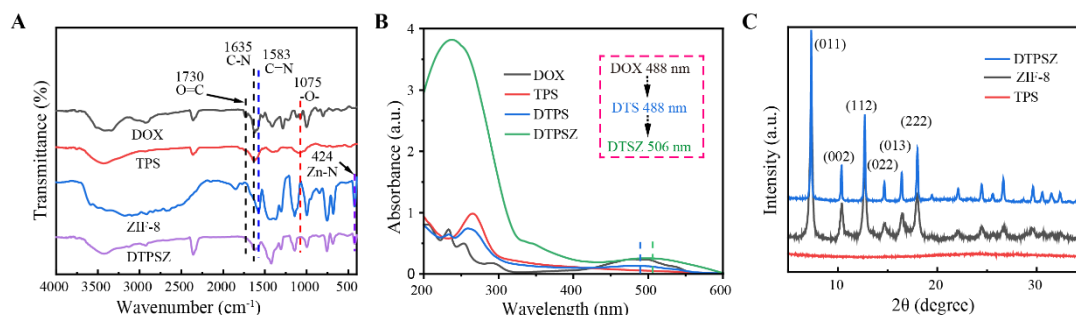


图 2-8 (A) 傅里叶变换红外光谱。(B) 紫外-可见光光谱。(C) X 射线衍射。
Figure 2-8 (A) Fourier transform infrared spectrum. (B) UV-Vis spectroscopy. (C) X-ray diffraction.

从图 2-8A DOX、TPS、ZIF-8 和 DTPSZ 的 FTIR 光谱可以看出, 1583 cm^{-1} 处出现 ZIF-8 特征吸收峰,该峰由 C=N 震动产生^[61,62]。ZIF-8 和 DTPSZ 在 424 cm^{-1} 处出现特征吸收峰,该峰由 Zn-N 震动产生^[63]; DOX 在 1730 cm^{-1} 和 1635 cm^{-1} 处出现吸收峰,这两个峰分别由 C=O 和 C-N 震动产生^[64]。由 DTPSZ 在 1730 cm^{-1} 和 1635 cm^{-1} 附近的峰图可以看出, DOX 的特征吸收峰发生了红移,证明 DTPS 被成功包裹在 ZIF-8 内。图 2-8B 为 DOX、TPS、DTPS、DTPSZ 的 UV-Vis 光谱。可以看出, TPS 在 266 nm 处出现特征吸收峰, DOX 在 488 nm 处具有特征吸收峰^[65], TPS 负载 DOX 之后在 488 nm 处也显示出了特征峰,说明 DOX 被成功负载在 TPS 上,而 DTPSZ 中 DOX 的峰发生了红移^[22],证明 DTPS 被成功包封进 ZIF-8。图 2-8C 的 XRD 结果显示 ZIF-8 在 $2\theta=8^\circ$ 、 10° 、 12° 、 14° 、 16° 和 18° 的峰依次对应 ZIF-8 晶体结构 (011)、(002)、(112)、(022)、(013) 和 (222)^[66-68] 的晶面峰; DTPSZ 的峰与 ZIF-8 基本相同,说明 DTPS 被成功包裹在 ZIF-8 中,而 TPS 没有尖锐的吸收峰,证明成功合成了无定形红色 SeNPs。

2.4.5 DTPSZ 的体外释放情况和稳定性观察

DTPSZ 的体外释放曲线如图 2-9A 所示。可以看出, DTPSZ 在三种 pH 条件下,在前 4 h 内均能快速释放,释放率分别为 10.6%、57.26% 和 68.4%; 4 h 后释放速度均放缓,在 12 h 的释放率分别为 13.9%、65.7% 和 76.81%; 12 h 后药物缓

慢释放，最终 24 h 的释放率分别为 14.7%、67.8% 和 81.97%，该结果证明 DTSPZ 具有缓释效果。图 2-9B 为 DTSPZ 纳米颗粒在 PBS 缓冲溶液和添加 10% FBS 的 DMEM 介质中的 DLS 水动力尺寸随时间变化。可以看出，DTSPZ 在这两种环境下具有良好的稳定性，可以在水相溶液中稳定存在一周以上。

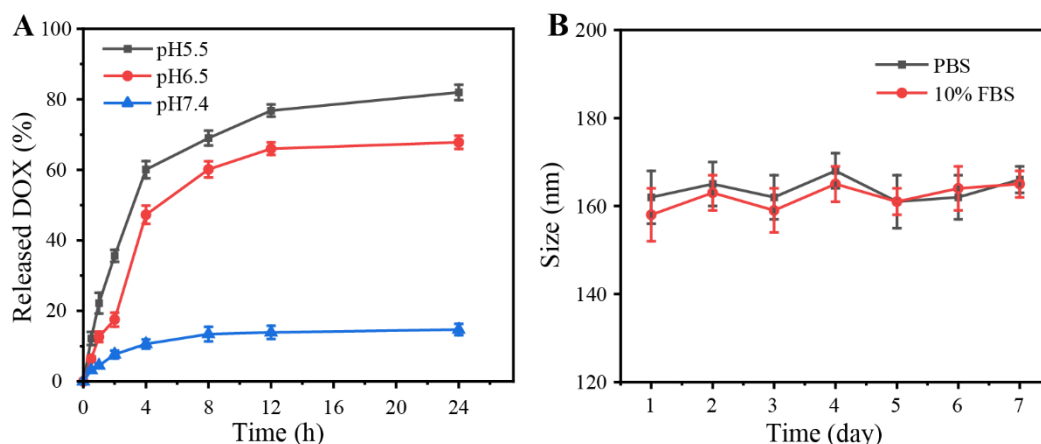


图 2-9 (A) DTSPZ 在不同 pH 环境中的释放曲线。(B) DTSPZ 在 PBS 和含有 10% FBS 的 DMEM 培养基中的水动力尺寸变化曲线。

Figure 2-9 (A) Release curves of DTSPZ in different pH environments. (B) Hydrodynamic size curves of DTSPZ in PBS and DMEM medium containing 10% FBS.

2.5 本章小结

以 TP 为模板，采用化学还原法成功合成了 TPS，并通过单因素实验优化了 TPS 的制备条件，最终获得了形态均一、分散性良好的 TPS 颗粒；将 TPS 负载 DOX 获得了 DTSP，并成功在 DTSP 表面包裹上了酸敏靶向外壳 ZIF-8，获得了 DTSPZ 纳米颗粒。采用 Zeta 电位、FTIR、UV-Vis、XRD、SEM、TEM 以及 Mapping 等表征手段证实了 DTSPZ 的成功合成。采用透析法验证了 DTSPZ 在弱酸环境（pH 5.5、pH 6.5）中具有缓释效果。通过测定 DTSPZ 在 PBS 和含有 10% FBS 的 DMEM 中的 DLS 水动力尺寸变化，得出了 DTSPZ 在水相环境中能够稳定存在一周以上的结论。

第三章 DTPSZ 的体外抗肿瘤研究

3.1 引言

在第一章中，我们成功制备出了 DTPSZ，并对 DTPSZ 进行了表征以及体外释放和稳定性的测试。在这一章，我们将借助人肝癌细胞 HepG2 进行体外实验，检测 DTPSZ 对 HepG2 细胞的杀伤作用，HepG2 细胞对 DTPSZ 的摄取，以及 DTPSZ 对正常细胞的毒性及其血液安全性。

3.2 实验部分

3.2.1 细胞培养

3.2.1.1 细胞及其培养条件

人肝癌细胞 HepG2 和小鼠成纤维细胞 L929 均购于海星生物，二者培养基分别为 DMEM 和 RPMI-1640 培养基，二者培养基均添加 10% FBS 及 1% 青霉素-链霉素混合液，培养条件均为 37℃、5%的二氧化碳培养箱中培养。

3.2.1.2 细胞复苏

将细胞冻存管从-80℃冰箱中取出后迅速放到 37℃水浴锅中水浴解冻，解冻后向冻存管表面喷 75%酒精消毒并放入无菌工作台内。用 1 mL 移液器将细胞悬液吸出，加入到盛有 3 mL 完全培养基的 5 mL 无菌离心管内，1000 rpm 离心 5 min，弃去上清。用 1 mL 完全培养基将细胞沉淀吹匀重悬后，将细胞悬液移入 T25 细胞培养瓶中，并加入 5 mL 完全培养基，摇匀后放入 37℃、5%二氧化碳培养箱中培养。

3.2.1.3 细胞换液

当培养瓶中培养基颜色由红色变为略显黄色时，若细胞尚未达到传代密度，则需要更换培养基，具体操作如下：将原有培养基吸出，向培养瓶中加入 2 mL

PBS 缓冲液后轻轻摇晃清洗，然后将 PBS 缓冲液吸出，重复以上过程，共清洗两遍，清洗完成后加入全新的完全培养基 6 mL。

3.2.1.4 细胞传代

当细胞汇合度达到 80%时可以进行传代或铺板操作，具体操作如下：将培养基吸出后用 PBS 缓冲液清洗两遍，向瓶中加入 1 mL 0.25%的胰蛋白酶消化液，摇匀后放入二氧化碳培养箱中静置消化，消化时间由细胞种类决定，通常为 1~3 min，若无法确定也可将细胞消化一定时间后放到显微镜下观察，当细胞形态变圆时，向培养瓶中加入 3 mL 完全培养基终止消化。用移液枪吸取瓶内的胰酶培养基混合液轻轻将瓶壁上的细胞吹打下来，将细胞悬液移入 5 mL 无菌离心管中，1000 rpm 离心 5 min，弃去上清，加入适量完全培养基将细胞吹匀重悬，传代比例根据细胞而定。

3.2.1.5 细胞冻存

细胞冻存操作与传代类似，区别在于细胞离心弃去上清后的操作，向离心管加入 1 mL 专用冻存液将细胞吹匀重悬，然后把冻存管放入-80℃冰箱即可完成细胞冻存操作。

3.2.2 DTPSZ 的体外细胞实验

3.2.2.1 细胞药敏检测

采用 CCK-8 细胞增殖-毒性检测试剂盒测定不同浓度的药物对人肝癌细胞 HepG2 活力的影响^[64]，具体操作如下：将汇合度达到 80%的 HepG2 细胞消化后，按照每孔 5000 个的密度接种于 96 孔板中，每孔培养基 100 μ L。培养 24 h 后，弃去培养基，按照等效 DOX 浓度 0、0.75、1.5、3、6、12 μ g/mL 分别加入基础培养基配制的 TPS、DTPS、DTPSZ 以及 DOX（TPS 按照与 DTPS 所含 TPS 等量添加），在培养箱中继续培养孵育 12 h，对照组加入等量的基础培养基。孵育完成后，吸出含有药物的培养基，用 100 μ L 的 PBS 清洗三遍，清洗完成后向每孔加入 100 μ L 含有 10% CCK-8 的基础培养基，在没有细胞的孔里加入等量的

含 10% CCK-8 的培养基作为空白组，再在培养箱中避光孵育 1~4 h（孵育时间可根据实际情况调整，孵育至孔板内培养基变为橙黄色即可），孵育完成后用酶标仪测定每孔在 450 nm 处的吸光度。使用如下公式计算细胞存活率：

$$Cell\ Vitality = \frac{OD_{sample} - OD_{blank}}{OD_0 - OD_{blank}} \times 100\% \quad \text{公式 3-1}$$

OD_{samples}：具有培养基、细胞、CCK-8 溶液和药物溶液的孔的吸光度。

OD_{blank}：具有培养基、CCK-8 溶液、药物溶液，没有细胞的孔的吸光度。

OD₀：具有细胞、培养基、CCK-8 溶液，没有药物溶液的孔的吸光度。

3.2.2.2 细胞摄取实验

采用 DAPI 染色法观测 DTPSZ 被细胞摄取的情况^[69]。将汇合度达到 80% 的 HepG2 细胞消化后以每孔 1×10^6 个的密度接种至 6 孔板上，每孔培养基为 2 mL，培养 24 h 后弃去培养基，加入 2 mL 用基础培养基配制的等效 DOX 浓度为 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 的 DTPSZ 分别处理不同时间（2、4、8 和 12h）后弃去培养基，每孔用 1 mL PBS 缓冲液洗涤三遍，然后用 1 mL 冰甲醇固定 15 min，固定完成后每孔加入 1 mL 即用型 DAPI 染液对细胞进行染色，染色 5 min 后弃去 DAPI 染液，用 PBS 洗涤三遍，洗去残留的染色液，然后采用倒置荧光显微镜在 DAPI 通道和 PE 通道下观察并记录结果。

3.2.2.3 活细胞和死细胞的荧光染色

使用 Calcein-AM/PI 活细胞/死细胞染色试剂盒对 DTPSZ 的抗肿瘤活性进行检测^[70]。具体操作如下：将汇合度达到 80% 的 HepG2 细胞消化后以每孔 1×10^6 个接种至 6 孔板上，每孔加 2 mL 完全培养基培养 24 h 后弃去完全培养基，再分别加入 2 mL 用基础培养基配制的等效 DOX 浓度分别为 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 的 DTPS、DTPSZ、DOX 和 TPS（TPS 按照与 DTPS 所含 TPS 等量添加），加药后避光孵育 12 h，孵育完成后弃去含有药物的培养基，用 PBS 洗涤三遍后向每孔加入 1 mL Calcein-AM/PI 工作液进行染色，染色完成后采用倒置荧光显微镜分别在 FITC 和 PE 通道下观察活细胞和死细胞并记录结果。

3.2.2.4 细胞活性氧检测

使用 DCFH-DA 探针检测细胞产活性氧情况^[71]，具体操作如下：将汇合度达到 80% 的 HepG2 细胞消化后以每孔 1×10^6 个接种至 6 孔板上培养 24 h 后弃去培养基，再分别加入用基础培养基配制的等效 DOX 浓度分别为 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 的 DTPS、DTPSZ、DOX 和 TPS（TPS 按照与 DTPS 所含 TPS 等量添加），加药后孵育 12 h，孵育完成后弃去含有药物的培养基，PBS 洗涤三遍后用无血清基础培养基按照 1:1000 稀释 DCFH-DA 探针，使其浓度为 10 μM ，向六孔板内每孔分别加入 1 mL DCFH-DA 荧光探针稀释液，置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 二氧化碳培养箱内避光孵育 30 min，孵育完成后用倒置荧光显微镜 FITC 通道下观察并记录结果。

3.2.2.5 细胞划痕实验

通过划痕愈合试验，研究纳米颗粒对细胞迁移和增殖的影响^[72]。具体方法如下：将汇合度达到 80% 的 HepG2 细胞消化后以每孔 1×10^6 个的密度接种至 6 孔板上培养 24 h 后弃去培养基。用 1 mL 枪头尖端在每孔中间的细胞表面划出均匀的划痕，用 PBS 洗去被划掉的细胞，再分别加入用无血清基础培养基配制的等效 DOX 浓度分别为 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 的 DTPS、DTPSZ、DOX 和 TPS（TPS 按照与 DTPS 所含 TPS 等量添加），加药后用倒置荧光显微镜明场拍摄记录各孔的图像，孵育 12 h，孵育完成后再次拍摄并记录，使用 ImageJ 软件计算细胞迁移的程度，并以条形图的形式表示。

3.2.3 流式细胞术

3.2.3.1 流式细胞术检测细胞凋亡

通过流式细胞术检测 TPS、DTPS、DTPSZ 及 DOX 诱导 HepG2 细胞凋亡的情况。流式细胞仪对荧光的检测十分灵敏，在含有 DOX 的药物不能使用与其光谱通道较为接近的 PI 染料进行染色。因此，在本实验中使用 7-AAD 染料取代 PI 染液对死细胞进行染色。7-AAD 是一种核酸染料，染色原理与 PI 类似，能够与 DNA 结合并发出红色荧光，但是其光谱通道较窄，不易被干扰。凋亡实验具体操作如下：将生长至 80% 的细胞消化后接种在六孔板中培养 24 h 后弃去完全培养基，分别加入用无血清基础培养基配制的等效 DOX 浓度为 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 的

TPS、DTPS、DTPSZ 及 DOX (TPS 按照与 DTPS 所含 TPS 等量添加), 加药后孵育 12 h, 孵育完成后弃去含有药物的培养基, 用 PBS 洗涤三遍后用不含 EDTA 的胰酶消化下来, 采用 Annexin V-FITC/7-AAD 试剂盒进行染色, 染色完成后用流式细胞仪进行检测, 并通过 FlowJo 10.10.0 软件对结果进行分析。

3.2.3.2 流式细胞术检测细胞摄取

DOX 本身能够发出红色荧光, 因此细胞对含 DOX 药物的摄取可以通过流式细胞仪的 PE 通道直接进行检测。具体操作如下: 将汇合度达到 80% 的 HepG2 细胞消化后以每孔 1×10^6 个的密度接种至 6 孔板上培养 24 h, 用无血清基础培养基配制的等效 DOX 浓度为 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 的 DTPSZ 分别处理不同时间 (2、4、8 和 12h) 后弃去培养基, 用 PBS 洗涤三遍后用不含 EDTA 的胰酶消化下来, 采用流式细胞仪 PE 通道进行检测, 并通过 FlowJo 10.10.0 软件对结果进行分析。

3.2.3.3 流式细胞术检测细胞活性氧

检测方法同 3.2.2.4, 但染色部分略有区别。药物孵育完成后弃去含药物的培养基, 用 PBS 洗涤三遍后用不含 EDTA 的胰酶将细胞消化下来, 再使用 DCFH-DA 荧光探针进行染色, 染色完成后使用流式细胞仪 FITC 通道进行检测, 并通过 FlowJo 10.10.0 软件对结果进行分析。

3.2.4 DTPSZ 的体外生物安全性研究

3.2.4.1 细胞毒性检测

使用小鼠成纤维细胞 L929 检测 TPS、DTPS 和 DTPSZ 对正常细胞的毒性, 操作方法同 3.2.2.1, 细胞活力相较于对照组低于 80% 即视为有明显的细胞毒性。

3.2.4.2 体外溶血实验

血红蛋白在 570 nm 附近具有特征吸收峰, 尤其在溶血后释放的游离血红蛋白会显著增强该波长处的吸光度。因此, 可以通过将纳米药物与红细胞共孵育, 然后检测红细胞破裂的情况, 从而确定药物的血液安全性。具体操作方法如下: 取无菌脱纤维绵羊血 5 mL, 加入 0.2 mL 乙二胺四乙酸 (EDTA) 处理后, 1000

rpm 离心 10 min，弃去血清，加入适量 PBS 缓冲液重悬后再次 1000 rpm 离心 10 min 洗涤，重复此过程直到上清液完全澄清为止，弃去上清液，取下层红细胞，用 PBS 缓冲液定容到 50mL 混匀后即可得到浓度为 2% 的红细胞悬液。将 DTPSZ 用 PBS 配置为等效 DOX 浓度 0、0.75、1.5、3、6、12 $\mu\text{g/mL}$ 的悬液。分别取各浓度样品 1 mL 与 1mL 的红细胞悬液混合均匀，阴性对照组加入等量的 PBS，阳性对照组加入等量的去离子水，37°C 孵育 3 h，孵育完成后 2000 rpm 离心 10 min，取上清液检测。采用紫外-可见分光光度计检测样品在 570 nm 处的吸光度，溶血率超过 5% 即视为阳性（具有溶血毒性）。溶血率计算公式如下：

$$\text{Hemolysis Rate} = \frac{OD_{\text{sample}} - OD_{\text{negative}}}{OD_{\text{positive}} - OD_{\text{negative}}} \times 100\% \quad \text{公式 3-2}$$

OD_{positive}：阳性对照吸光度；OD_{negative}：阴性对照吸光度；OD_{sample}：样品吸光度。

3.3 结果和分析

3.3.1 体外细胞实验

3.3.1.1 细胞药敏检测

通过 CCK-8 法检测 DTPSZ、DTPS、TPS 和 DOX 对 HepG2 细胞的活力影响，结果如图 3-1 所示。从结果可以看出，当等效 DOX 浓度达到 1.5 $\mu\text{g/mL}$ 时，使用 DTPSZ、DTPS、TPS 和 DOX 处理过的 HepG2 的细胞活力分别为 58.85%、60.3%、72.62% 和 75.63%；当等效 DOX 浓度达到 3 $\mu\text{g/mL}$ 时，使用 DTPSZ、DTPS、TPS 和 DOX 处理过的 HepG2 的细胞活力分别为 42.46%、44.48%、57.6% 和 62.89%；当等效 DOX 浓度达到 6 $\mu\text{g/mL}$ 时，使用 DTPSZ、DTPS、TPS 和 DOX 处理过的 HepG2 的细胞活力分别为 27.18%、29.72%、47.18% 和 44.09%。DTPSZ 的 IC₅₀ 约为 1.5~3 $\mu\text{g/mL}$ 等效 DOX 浓度，后续实验 DTPSZ 将采用 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 等效 DOX 浓度。

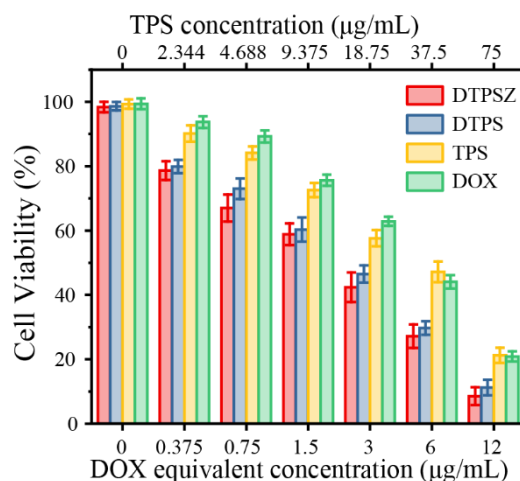


图 3-1 细胞药敏检测。

Figure 3-1 Cell antimicrobial susceptibility testing.

3.3.1.2 细胞摄取实验

使用纳米药物治疗肿瘤，影响治疗效果的不仅有药物本身对肿瘤细胞的杀伤和抑制能力，还有肿瘤细胞能够内吞的纳米药物的量，通过已有研究可知，纳米颗粒可以通过 EPR 效应被肿瘤细胞摄取，但本研究所制备的 DTPSZ 能否被 HepG2 细胞摄取仍需通过实验进行验证。DOX 本身能够发出红色荧光，DAPI 能够给细胞核染色，使用荧光显微镜观察两种荧光的重合程度确定肿瘤细胞对 DTPSZ 的摄取作用，用 ImageJ 软件对荧光强度进行半定量分析，结果如图 3-2A、B 所示。由图可以看出，在给药时间 0 h 时，细胞内未检测出 DOX 的荧光，给药时间 2 h 到 8 h，细胞内 DOX 的荧光强度随时间而迅速提升，给药时间 8 h 到 12 h，细胞对 DTPSZ 的摄取速度放缓，12 h 时细胞对 DTPSZ 的摄取量达到最大，说明 DTPSZ 可以被 HepG2 细胞摄取至细胞内。采用流式细胞术进一步对细胞摄取进行检测，检测结果如图 3-3C 所示，由图 3-3C 可知，流式检测结果与荧光显微镜检测结果相符。

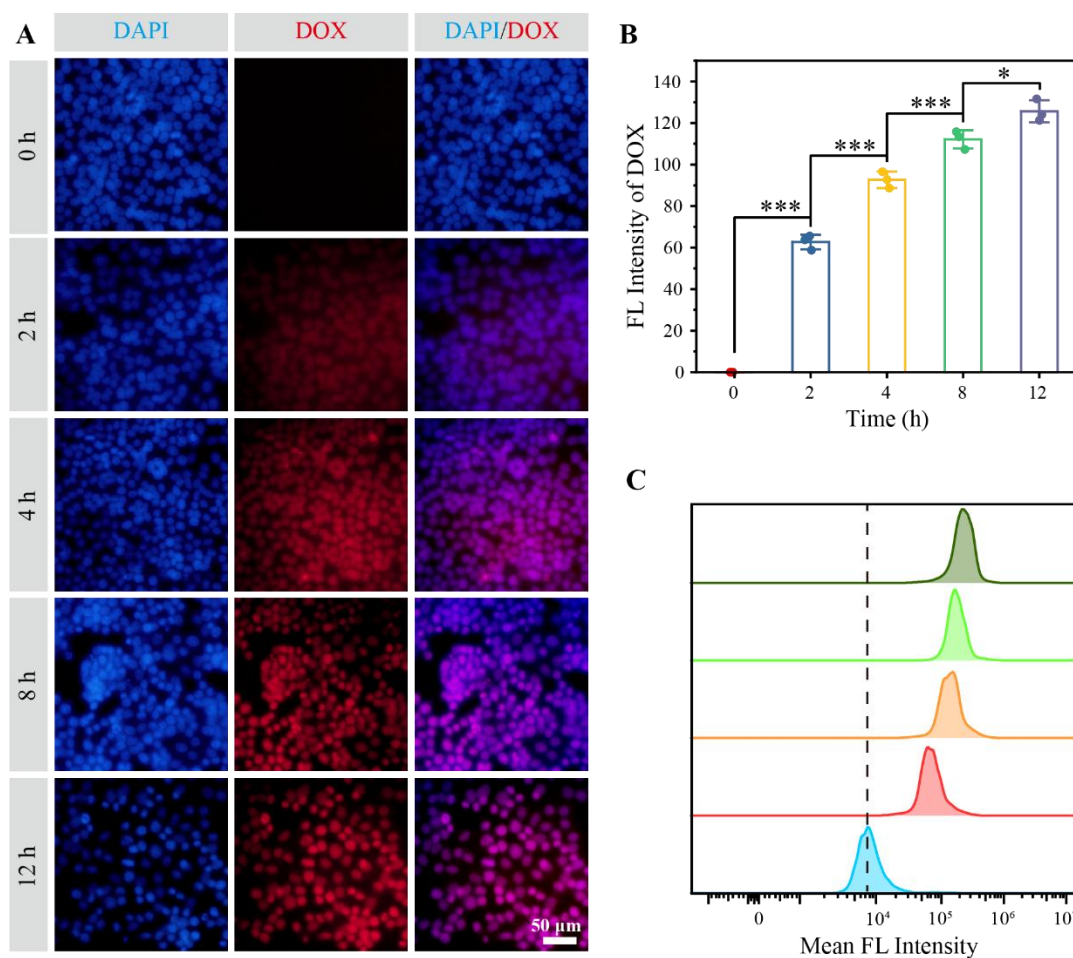


图 3-2 细胞摄取实验。(A) 细胞摄取荧光图像。(B) 细胞摄取荧光半定量分析。(C) 细胞摄取的流式分析。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 、ns, 无显著性差异。

Figure 3-2 Cell uptake experiment. (A) Fluorescence image of cell uptake. (B) Fluorescent semi-quantitative analysis of cell uptake. (C) Flow cytometric analysis of cell uptake * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, ns, no significant difference.

3.3.1.3 活细胞和死细胞染色

活细胞和死细胞染色结果如图 3-3 所示。由图可以看出, Control 组只有极少量的死细胞, DOX 和 TPS 组有部分死细胞, 而 DTPS 和 DTPSZ 组有大量的死细胞, 该结果与药敏实验结果相符。

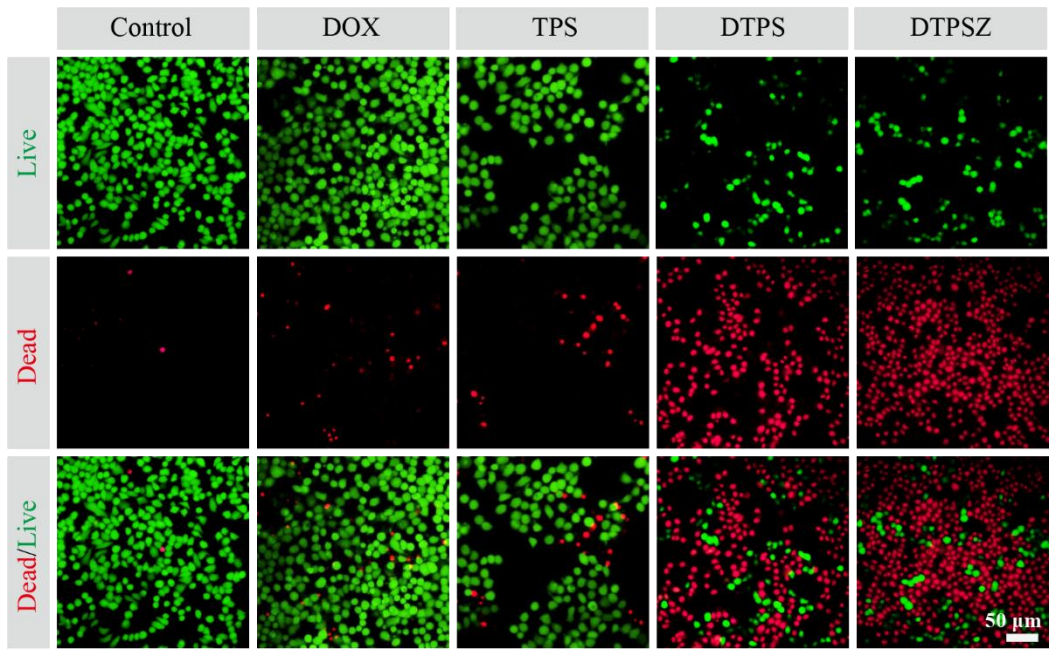


图 3-3 活细胞和死细胞染色。

Figure 3-3 Fluorescent staining of live and dead cells.

3.3.1.4 细胞活性氧检测

癌细胞中 ROS 水平的升高会触发线粒体途径凋亡，同时会释放损伤相关因子，增强机体免疫应答。采用 DCFH-DA 荧光探针检测药物诱导细胞产 ROS 的情况，荧光显微镜图像和流式检测结果如图 3-4 所示。由图可以看出，DTPSZ 处理组检测出比对照组更高的 ROS 荧光强度，说明 DTPSZ 能够通过诱导细胞 ROS 的产生促进细胞凋亡。

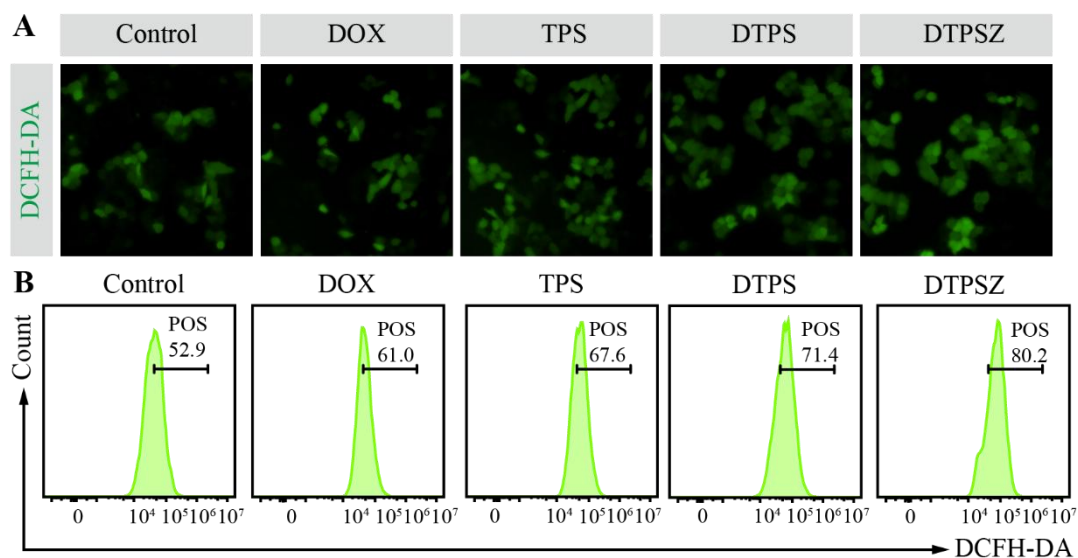


图 3-4 活性氧检测。(A) 活性氧荧光图像。(B) 活性氧流式检测。

Figure 3-4 Reactive oxygen species detection. (A) Reactive oxygen species fluorescence image. (B) Reactive oxygen species flow cytometry detection.

3.3.1.5 细胞划痕实验

通过细胞划痕实验检测 DTPSZ 对抑制肿瘤细胞转移的作用, 结果如图 3-5 所示。由图可以看出, 相较于对照组, 实验组均具有一定的抑制肿瘤细胞迁移的作用, 其中 DTPSZ 组的抑制迁移效果最强, 说明 DTPSZ 具有抑制肿瘤细胞迁移的作用。

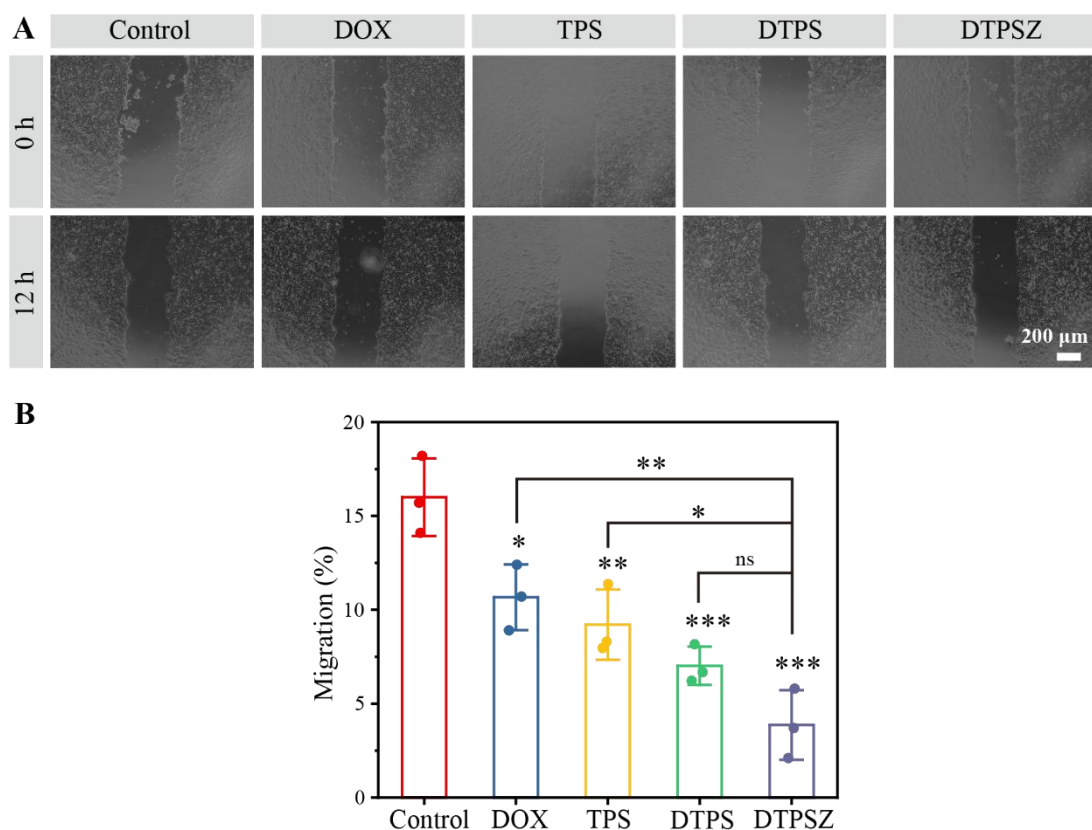


图 3-5 细胞划痕实验。(A) 不同时间点细胞划痕的显微镜明场图像。(B) 划痕面积定量分析统计图。与对照组相比, * $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 。

Figure 3-5 Cell scratch experiment. (A) Microscopic brightfield images of cell scratches at different time point TPS. (B) Statistical chart of quantitative analysis of scratch area. * $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$, ns, no significant difference, vs. control group.

3.3.2 流式细胞术检测细胞凋亡

通过流式细胞术检测 DTPSZ 导致细胞凋亡的情况, 结果如图 3-6 所示。从中可以看出, 对照组仅有少量细胞凋亡, 应为消化造成的机械损伤, 可以忽略不计; 相较于对照组、DOX 组和 TPS 组, DTPS 组和 DTPSZ 组导致了更多的细胞凋亡, 该结果与药敏试验和活死染色实验结果相符。

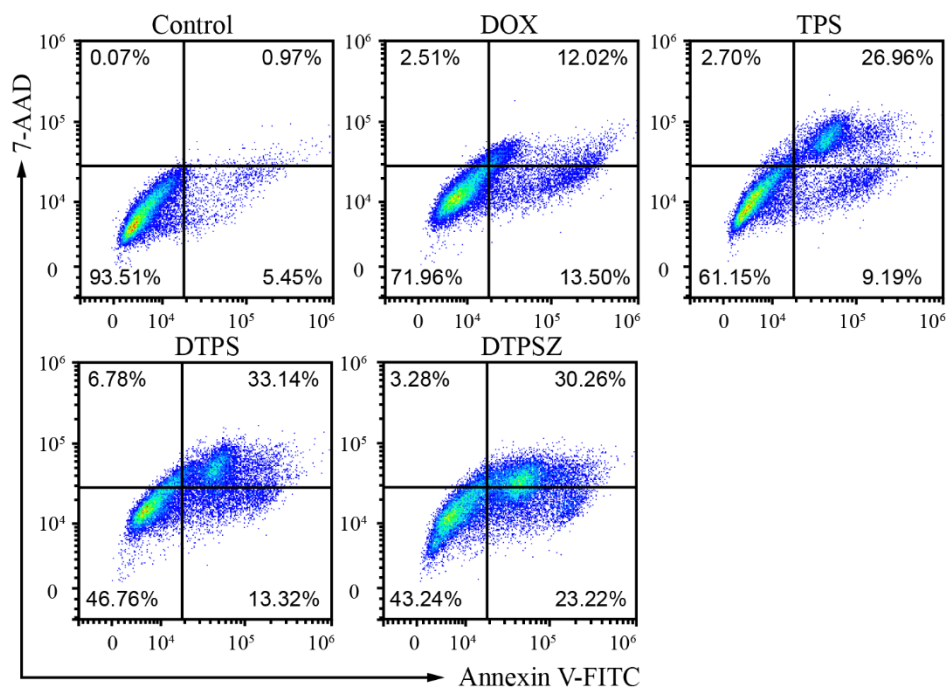


图 3-6 流式细胞术检测细胞凋亡。

Figure 3-6 Flow cytometry to detect apoptosis.

3.3.3 DTPSZ 的体外生物安全性研究

3.3.3.1 细胞毒性检测

通过 CCK-8 法检测 DTPSZ、DTPS 和 TPS 对 L929 细胞的活力影响，结果如图 3-7 所示。从中可以看出，随着 DTPSZ、DTPS 和 TPS 的浓度增大，细胞的活力逐渐降低，但各组细胞活力都保持在 80% 以上，说明该计量下的 DTPSZ、DTPS 和 TPS 对 L929 细胞没有明显的毒害作用。

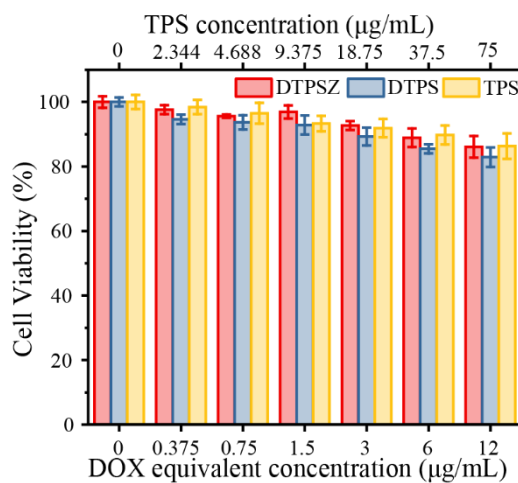


图 3-7 细胞毒性检测。

Figure 3-7 Cytotoxicity test.

3.3.3.2 体外溶血实验

溶血实验时检测纳米颗粒生物安全性的常用方法，材料血液毒性高会导致红细胞破裂，对机体造成损害。DTPSZ 的溶血实验结果如图 3-8 所示，从结果可以看出，当 DTPSZ 的等效 DOX 浓度在 $6\ \mu\text{g/mL}$ 以下时，溶血率均在 5% 以下，即没有明显的溶血现象产生，当 DTPSZ 的等效 DOX 浓度为 $12\ \mu\text{g/mL}$ 时，溶血率达到了 7.74%，发生了明显的溶血现象，因此，在给药时，药物的血液浓度需保持在 $12\ \mu\text{g/mL}$ 以下。

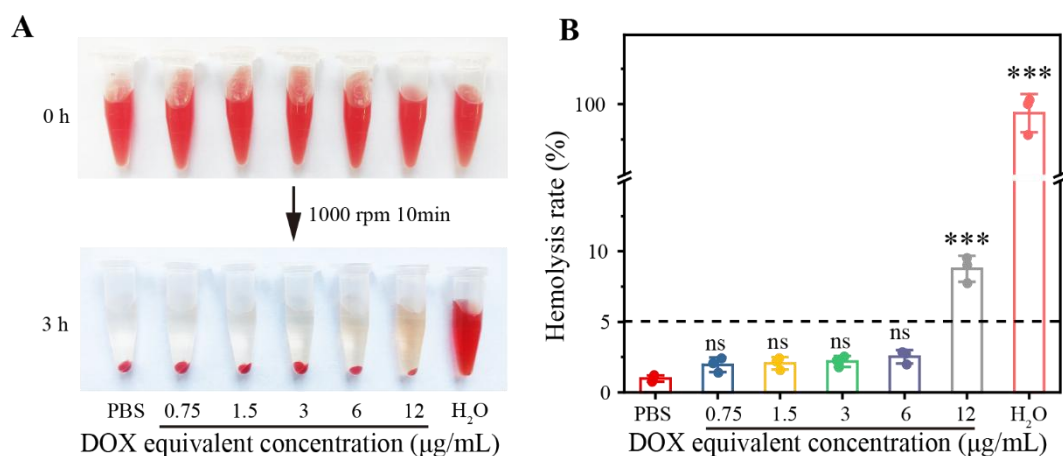


图 3-8 溶血实验。*** $p < 0.001$, ns, 无显著性差异，与对照组相比。

Figure 3-8 Hemolysis experiment. *** $p < 0.001$, ns, no significant difference, vs. control group.

3.4 本章小结

在上一章中，介绍了 DTPSZ 纳米粒的合成，本章对合成的 DTPSZ 纳米粒进行体外抗肿瘤活性和生物安全性的检测。首先采用 CCK-8 检测了 DTPSZ 对 HepG2 的抑制作用，证实了 DTPSZ 在体外具有抗肿瘤活性。为了检验 DTPSZ 的生物安全性，采用 CCK-8 检测了 DTPSZ 对 L929 细胞的活力影响，结果表明，DTPSZ 具有较好的生物安全性；溶血实验进一步证明 DTPSZ 在血液中的浓度小于 $12\ \mu\text{g/mL}$ 没有溶血风险。细胞荧光染色和流式检测结果表明，随着时间的进行，HepG2 的荧光强度会逐渐升高，表明 DTPSZ 纳米粒可以被肿瘤细胞吸收。活死染色实验以及流式凋亡检测表明，DTPSZ 具有诱导 HepG2 凋亡的作用；

ROS 活性氧检测表明, DTPSZ 能够诱导肿瘤细胞产生更多的活性氧从而诱导细胞凋亡。细胞划痕实验表明 DTPSZ 能够抑制肿瘤细胞的转移。综上所述, 体外细胞实验证实了 DTPSZ 对肿瘤细胞的抑制作用。

第四章 DTPSZ 的体内抗肿瘤研究

4.1 前言

在第三章中，本课题通过体外实验对 DTPSZ 的体外抗肿瘤活性以及生物安全性进行了检测。但是 DTPSZ 在复杂的体内环境中是否具有抗肿瘤活性以及靶向效果仍然有待验证。在这一章本课题将通过建立小鼠荷瘤模型对 DTPSZ 的体内靶向、体内抗肿瘤活性以及体内生物安全性进行检测。

4.2 实验方法

4.2.1 HepG2 肿瘤模型的构建

实验动物购自杭州子源实验动物科技有限公司，经杭州医学院检测并颁发实验动物合格证。准备 20 只 5 周龄 BALB/c Nude 裸鼠，在 SPF 环境中饲养一周使小鼠适应环境，在小鼠右侧腋下通过皮下注射 1×10^7 个 HepG2 细胞（100 μL ），每隔一天注射一次，连续注射一周时间后停止注射，在肿瘤生长至约 200 mm^3 后将小鼠分为五组（每组四只）进行实验。

4.2.2 DTPSZ 体内抗肿瘤效果的研究

荷瘤模型建立后对小鼠进行治疗，分别采用 PBS 配制 TPS、DTPS、DTPSZ 及 DOX（TPS 按照与 DTPS 所含 TPS 等量配制）溶液，按照等效 DOX 浓度为 2.5 mg/kg 的给药量通过腹腔注射对小鼠进行给药，对照组注射等量的 PBS，总治疗周期为 14 天。治疗期间每天记录小鼠肿瘤的长度（L）和宽度（W）以及小鼠的体重直至死亡或肿瘤体积大于 1000 mm^3 ，采用如下公式计算肿瘤体积：

$$V = \frac{L \times W^2}{2} \quad \text{公式 4-1}$$

4.2.3 DTPSZ 体内靶向效果的研究

Cy 系列荧光染料 (Cyanine dyes) 具有长波长、低生物毒性等特点, 被广泛应用于活体成像领域。因此, 本研究中采用 Cy5 SE 荧光染料来标记 DTPSZ。将 DTPSZ 分散于 PBS 中, 加入适量 Cy5 SE 荧光染料后避光搅拌 24 h, 12000 rpm 离心后得到的沉淀即是 DTPSZ-Cy5。将 DTPSZ-Cy5 用适量的 PBS 重悬, 通过尾静脉注射注入小鼠体内。采用 IVIS (激发波长: 649 nm; 发射波长: 670 nm) 活体成像仪记录注射后 0 h、2 h、4 h、8h、12 h 和 24 h 时的体内荧光分布图像和荧光强度数据。24 h 后通过脊柱脱位处死小鼠并进行解剖, 取出主要器官和肿瘤, 采用活体成像仪检测并记录心脏、肝脏、脾脏、肺、肾脏和肿瘤的荧光强度图像和数据。

4.2.4 肿瘤组织学和免疫组化检测

治疗结束后, 摘取眼球采血并通过脊柱脱位处死小鼠, 对小鼠进行解剖取出肿瘤组织, 将肿瘤用 PBS 缓冲液清洗去残留的血液后用 4%多聚甲醛固定 48 h, 然后将它们包埋在石蜡中, 切片脱蜡后进行 H&E 染色、TUNEL 染色, 采用免疫组织化学方法检测 Ki 67 和 Caspase-3 在肿瘤组织中的表达。

4.2.5 DTPSZ 的体内生物安全性研究

4.2.5.1 小鼠主要器官 H&E 染色

操作同 4.2.4。

4.2.5.2 小鼠血液生化指标检测

治疗结束后, 通过摘取眼球收集血液并通过脊柱脱位处死小鼠, 将血液静置 1 h 后, 用离心机 3000 rpm 离心 15 min 取血清, 使用全自动生化仪自动测定 ALT、AST、CREA 和 BUN 等肝肾功能指标。

4.3 结果和分析

4.3.1 DTPSZ 体内抗肿瘤效果的研究

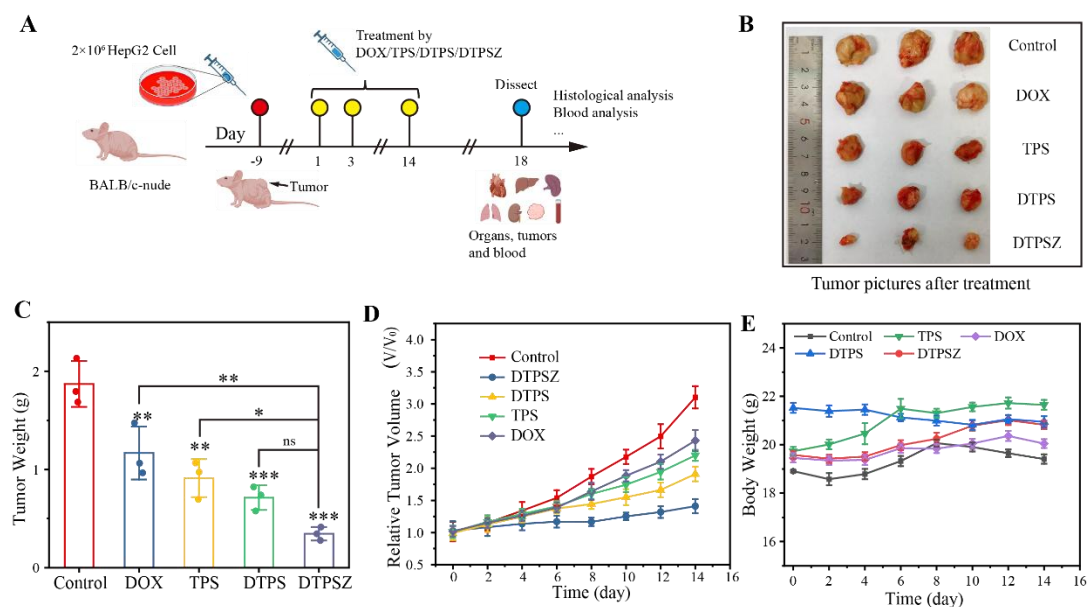


图 4-1 DTPSZ 的体内抗肿瘤效果。(A) 小鼠实验流程图。(B) 治疗后结束后的小鼠肿瘤图。(C) 治疗结束后各组小鼠肿瘤质量图。(D) 治疗期间小鼠肿瘤体积随时间变化折线图。(E) 治疗期间小鼠体重变化图。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ ，ns，无显著性差异，与对照组相比。

Figure 4-1 In vivo anti-tumor effect of DTPSZ. (A) Flow chart of mouse experiment. (B) Mouse tumor diagram after the end of treatment. (C) Tumor mass map of mice in each group after treatment. (D) Line plot of mouse tumor volume over time during treatment. (E) Diagram of body weight changes in mice during treatment. * $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ ，ns, no significant difference, vs. control group.

小鼠的荷瘤及治疗过程如图 4-1A 所示，治疗结果如图 4-1C、D、E，由图可以看出，相较于对照组，DTPSZ 治疗组的肿瘤尺寸和肿瘤质量更小，说明 DTPSZ 具有更加的显著的抑制肿瘤生长的效果，而 DOX 组和 TPS 组的治疗效果较弱，这是由于游离的 DOX 不具备肿瘤靶向作用，相当一部分无法到达肿瘤部位被肿瘤细胞吸收，而 TPS 容易被肝脏代谢掉。另外，DTPS 在体内抗肿瘤效果较 DTPSZ 明显更弱，而在体外实验中，DTPS 和 DTPSZ 对肿瘤细胞的抑制效果较为接近，这是由于在体内血液中 DOX 容易脱离 TPS 的吸附从而减弱 DTPS 的疗效，而 DTPSZ 的酸敏靶向外壳能够更好地把药物运输至肿瘤部位。在治疗过程中，对小鼠体重进行了检测和记录，结果如图 4-1E。由图可以看出，相较

于对照组，治疗组的小鼠体重没有出现明显的下降，该结果表明 DTPSZ 对小鼠的健康没有损害。

4.3.2 DTPSZ 体内靶向效果的研究

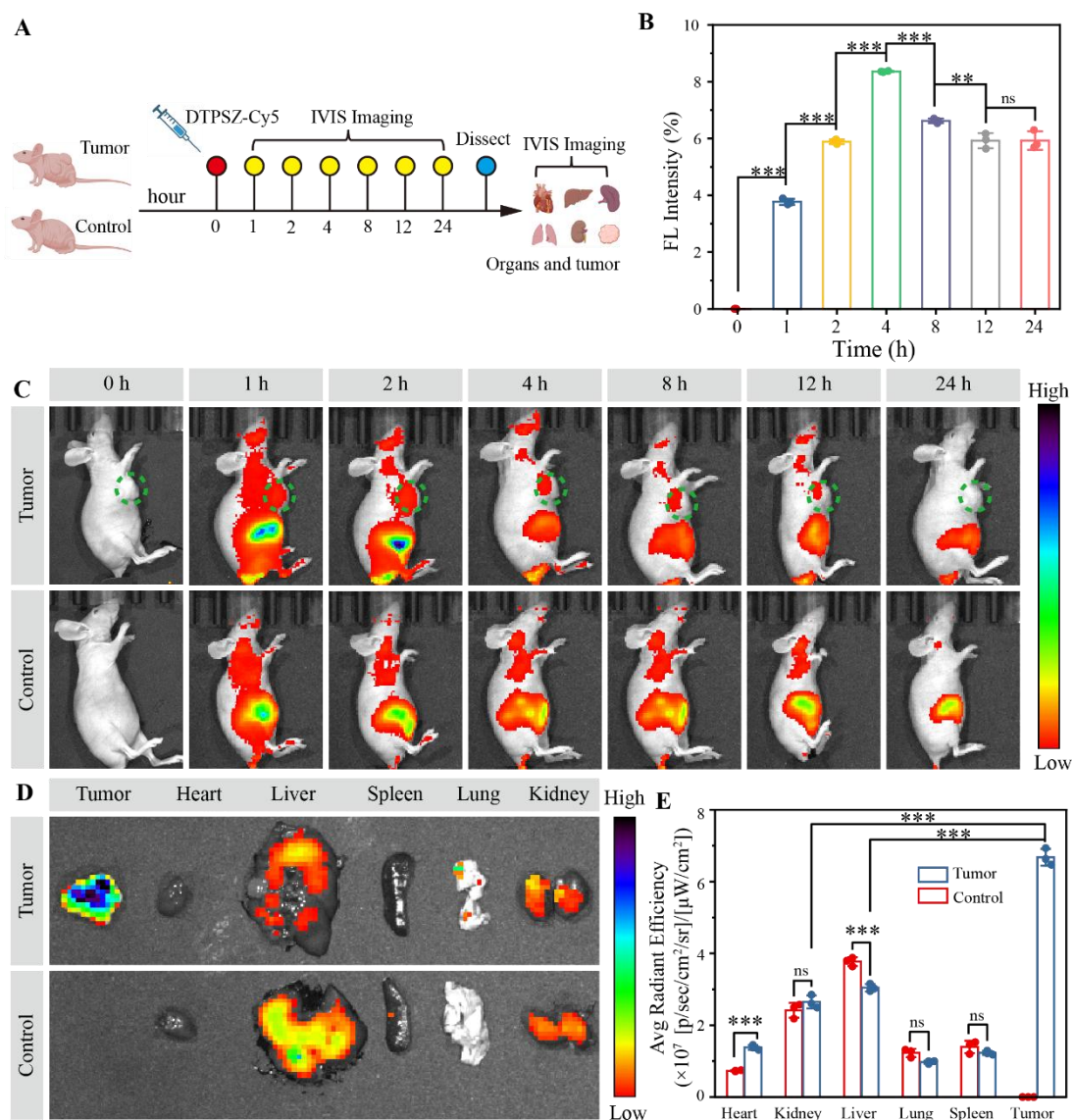


图 4-2 DTPSZ 体内靶向效果的研究。(A) 实验流程图。(B) 在各时间点小鼠肿瘤部位荧光强度占小鼠全身荧光强度的比例统计图。(C) 注射 DTPSZ 后各时间点小鼠体内荧光分布图。(D) DTPSZ 注射 24 h 后小鼠主要器官和肿瘤的荧光分布图。(E) 小鼠主要器官和肿瘤平均荧光强度定量统计图。** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$, ns, 无显著性差异。

Figure 4-2 Study of the in vivo targeting effect of DTPSZ. (A) Experimental flow chart. (B) Statistical chart of the proportion of fluorescence intensity of mouse tumor site to the whole body fluorescence intensity of mice at each time point. (C) Fluorescence distribution in mice at each time point after DTPSZ injection. (D) Fluorescence distribution of major organs and tumors of mice 24 h after DTPSZ injection. (E) Quantitative statistical plot of mean fluorescence intensity of major organs and tumors in mice. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, ns, no significant difference.

如图 4-2A 为小鼠活体成像实验流程，DTPSZ-Cy5 注射后不同时间点小鼠体内荧光分布如图 4-2B、C 所示，由图可以看出，小鼠在注射 DTPSZ-Cy5 后的前四个小时，肿瘤部位的荧光强度占小鼠全身的荧光强度的比例逐渐上升，说明 DTPSZ-Cy5 在小鼠体内具有显著的靶向效果；4 h 后荧光强度略有下降并趋于平稳，可能是因为前期到达肿瘤部位的 DTPSZ-Cy5 进入了肿瘤深处。由图 4-2D、E 可以看出，小鼠肿瘤部位单位面积上具有更强的荧光，即 DTPSZ-Cy5 在肿瘤部位聚集，说明 DTPSZ-Cy5 具有明显的肿瘤靶向效果，除肿瘤之外，荷瘤小鼠主要器官中肝脏和肾脏的荧光强度最高，并且无瘤小鼠主要器官中肝脏和肾脏的荧光要显著高于荷瘤小鼠，这些现象说明 DTPSZ 主要通过肝脏和肾脏代谢^[73]。

4.3.3 肿瘤组织学和免疫组化

通过 H&E 和 TUNEL 染色对药物疗效进行进一步分析，H&E 结果（图 4-3A）表明，对照组的肿瘤组织紧密，未出现明显坏死现象，而治疗组小鼠肿瘤组织均出现不同程度细胞坏死现象，并且相较于其他治疗组，DTPSZ 组导致了肿瘤组织更多的细胞坏死^[74-77]。TUNEL 染色结果（图 4-3B、C）表明，DTPSZ 实验组具有更高的 TUNEL 阳性率，即 DTPSZ 导致了更多的肿瘤细胞凋亡。

Ki 67 是一种存在于细胞核中的增殖相关蛋白，肿瘤样本中 Ki 67 阳性细胞的比例可以反映出肿瘤细胞的增殖活性；Caspase-3 阳性细胞占比是评估细胞凋亡水平及治疗反应的重要参数^[78-83]。图 4-3D 为免疫组化染色检测肿瘤组织中 Ki67 和 Caspase-3 的表达水平。由图可知，相较于对照组和其他给药组，DTPSZ 组的 Caspase-3 蛋白的表达水平明显更高，同时 DTPSZ 组的 Ki67 阳性细胞占比更低，该结果表明 DTPSZ 能够抑制细胞增殖并诱导细胞凋亡^[36]。

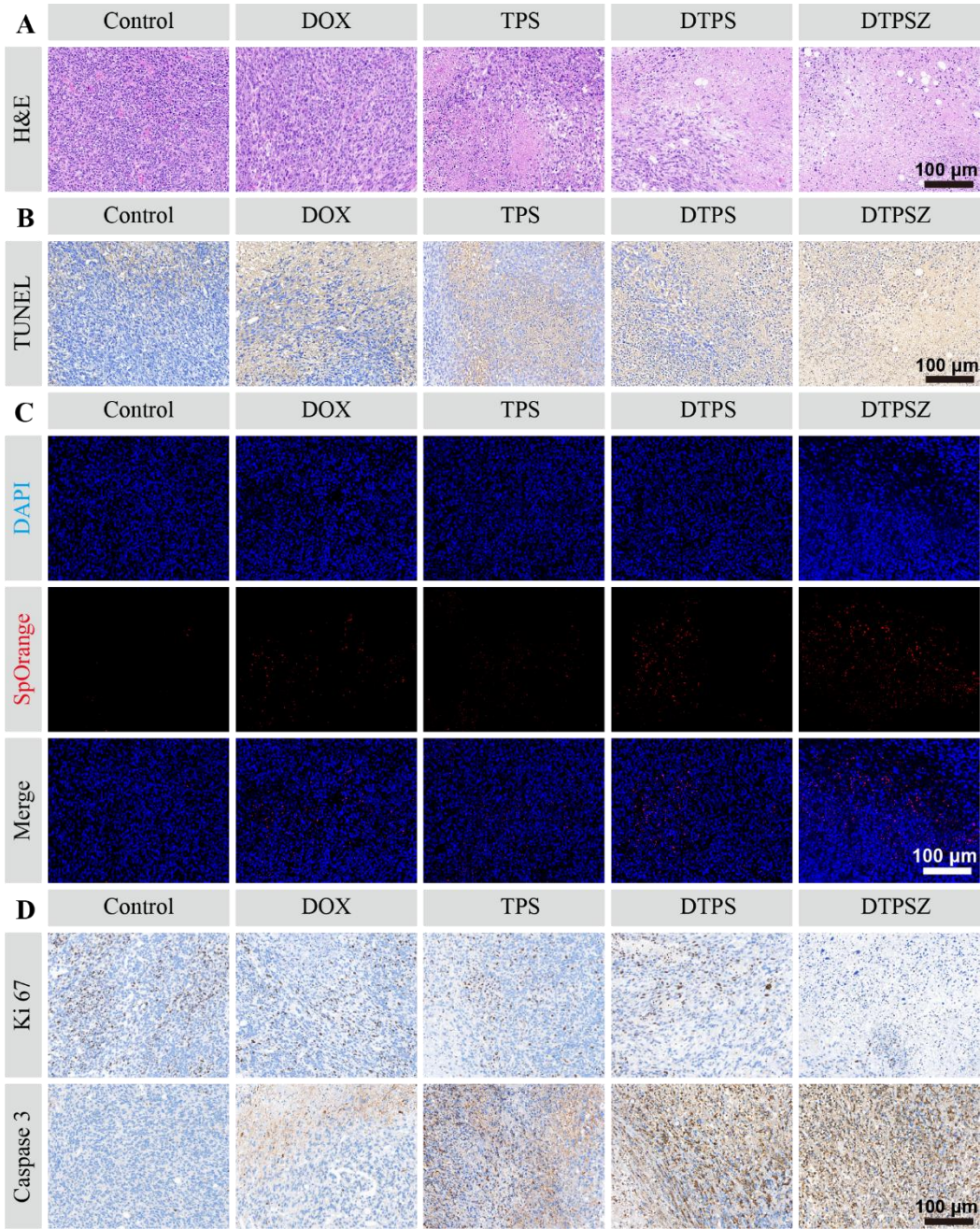


图 4-3 肿瘤组织学和免疫组化。(A) 肿瘤组织 H&E 染色。(B) 肿瘤组织 TUNEL 染色。
(C) 肿瘤组织 TUNEL 荧光染色。(D) 肿瘤组织免疫组化。
Figure 4-3 Tumor histology and immunohistochemistry. (A) H&E staining of tumor tissues. (B)
TUNEL staining of tumor tissue. (C) TUNEL fluorescent staining of tumor tissue. (D)
Immunohistochemistry of tumor tissues.

4.3.4 DTPSZ 的体内生物安全性分析

4.3.4.1 小鼠主要器官 H&E 染色

通过观察小鼠主要器官（心、肝、脾、肺、肾）的组织形态学染色切片可以看出药物是否对小鼠的内脏造成损伤，以排除潜在的生物安全性问题。由图 4-4 可以看出，与对照组相比，各治疗组的主要器官切片在组织形态和炎症细胞聚集方面并没有显示出明显差异，该结果进一步表明 DTSPZ 具有出色的生物安全性^[84-86]。

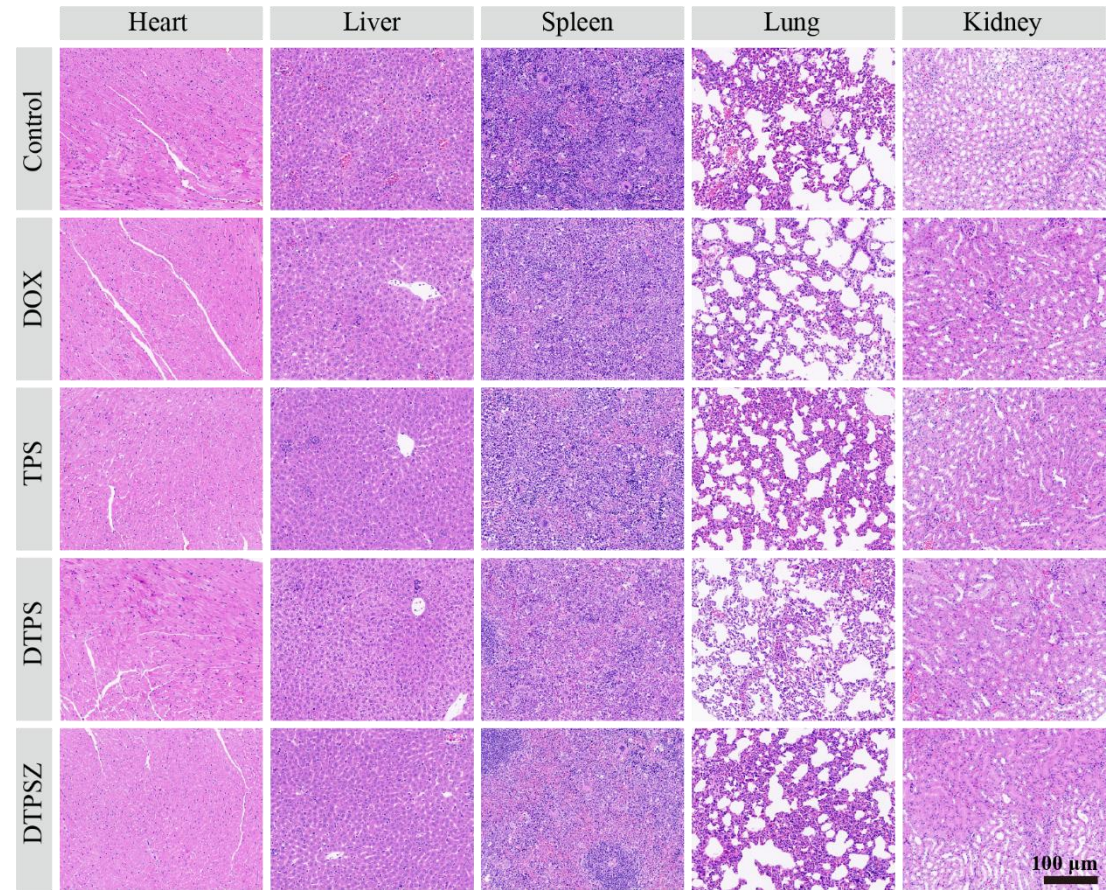


图 4-4 小鼠主要器官 H&E 染色。

Figure 4-4 H&E staining of major organs of mice.

4.3.4.2 小鼠血液生化指标检测

血液中的 ALT 和 AST 水平与肝脏损伤密切相关；CREA 和 BUN 水平是评估肾脏功能的重要指标，其含量的变化同样与肾脏损伤密切相关。图 4-5 是各实验组小鼠血液 ALT、AST、CREA 和 BUN 含量的检测结果。由图可以看出，各治疗组小鼠血液的相关指标数据均在正常范围内，说明 DTSPZ 对肝肾器官没有毒害作用^[87,88]。

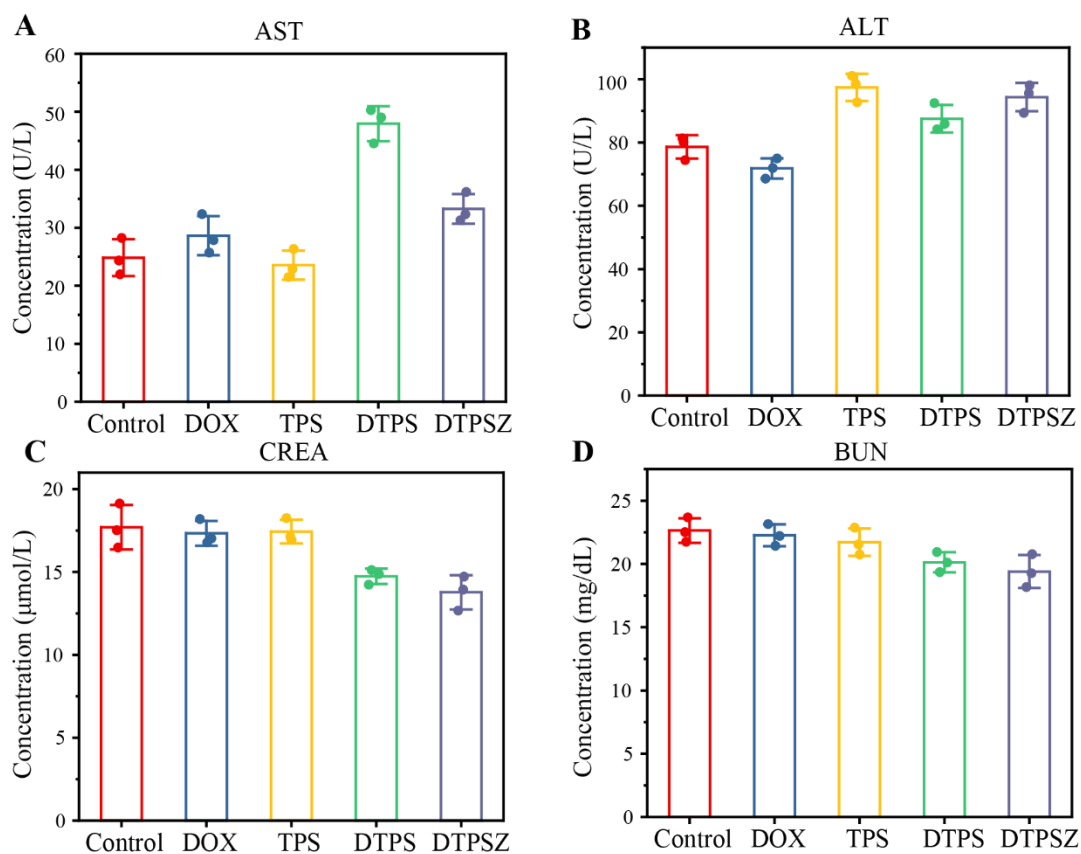


图 4-5 小鼠血液生化指标检测。

Figure 4-5 Detection of blood biochemical indexes in mice.

表 4-1 小鼠血液生化指标正常值参考范围

Table 4-1 Reference range of normal values of mouse blood biochemical indexes

指标	正常值参考范围
ALT	10.06-96.47 U/L
AST	36.31-235.48 U/L
CREA	10.91-85.09 μmol/L
BUN	10.81-34.74 mg/dL

注：血液生化指标参考值由于动物品种、来源、年龄、体重、饲养环境、营养状况、检查方法等条件的不同会存在相当大的差异。

4.4 本章小结

本章通过建立荷瘤小鼠模型对 DTPSZ 的体内抗肿瘤活性、体内靶向性和体内生物安全性进行了探究。体内抗肿瘤实验结果显示，DTPSZ 在体内具有比对

照组和其他治疗组更好的抗肿瘤疗效；同时治疗期间小鼠体重并未出现明显的下降，说明 DTPSZ 没有对小鼠的健康造成危害。IVIS 活体成像结果显示，DTPSZ 在肿瘤部位的累积要明显多于小鼠的肝肾等主要器官，说明 DTPSZ 具有明显的体内肿瘤靶向效果，且 DTPSZ 是通过肝脏和肾脏进行代谢的。肿瘤 H&E 切片和 TUNEL 切片结果显示，相较于对照组和其他治疗组，DTPSZ 导致了更多的肿瘤组织细胞的坏死和凋亡；Ki 67 和 Caspase-3 免疫组化结果表明，DTPSZ 具有抑制肿瘤细胞增殖和促进肿瘤细胞凋亡的效果，这些切片检测表明了 DTPSZ 具有优秀的体内抗肿瘤效果。而小鼠主要器官（心、肝、脾、肺、肾）的 H&E 切片和血液肝肾损伤相关指标的检测结果表明，在治疗过程中 DTPSZ 不会对小鼠产生毒害作用。

第五章 结论与展望

5.1 结论

本研究以云南普洱茶中提取的 TP 为模板，通过化学还原法成功合成了 TPS，随后通过单因素实验优化了 TPS 的合成条件，最终获得了粒径 100 nm 左右（经 800 nm 滤膜过滤后）分散性良好的 TPS 颗粒，并将其用于负载抗肿瘤药物 DOX 从而制得了 DTPS，最后采用一锅法将酸敏靶向外壳 ZIF-8 包覆在 DTPS 表面，获得了具有酸敏靶向效果的载药纳米硒颗粒 DTPSZ。通过 DLS、Zeta-potential、SEM、TEM、Mapping、FTIR、UV-Vis 以及 XRD 等表征手段证明了 DTPSZ 的成功合成。通过透析法检测了 DTPSZ 不同 pH 环境中的释放情况，结果表明 DTPSZ 具有酸敏释放以及缓释的效果；检测了 DTPSZ 的 DLS 水动力尺寸，和 DTPSZ 的稳定性，结果表明 DTPSZ 可在水相环境中稳定存在一周以上。

探究了 DTPSZ 的生物安全性和体外抗肿瘤活性。采用 DAPI 染色和流式检测证实了 DTPSZ 能够被癌细胞摄取；CCK-8 检测、活死染色、流式凋亡检测、ROS 检测结果均表明 DTPSZ 对 HepG2 细胞具有抑制作用。通过划痕实验探究了 DTPSZ 抑制肿瘤细胞迁移的能力，结果表明 DTPSZ 具有抑制肿瘤细胞转移的作用。体外 CCK-8 细胞毒性实验和溶血实验表明了 DTPSZ 具有良好的生物安全性。

通过构建荷瘤小鼠模型探究 DTPSZ 的体内抗肿瘤活性、体内靶向性和体内生物安全性。体内抗肿瘤治疗结果表明，DTPSZ 治疗组具有比其他治疗组更加显著的治疗效果，IVIS 活体成像结果表明了 DTPSZ 在小鼠体内具有明显的肿瘤靶向效果，且 DTPSZ 是通过肝脏和肾脏进行代谢的。H&E 切片和 TUNEL 切片结果表明，相较于其他治疗组，DTPSZ 治疗组导致了肿瘤组织更多的坏死和凋亡；另外，Ki 67 和 Caspase-3 免疫组化结果也表明，DTPSZ 能够促进癌细胞凋亡的同时抑制癌细胞增殖从而达到抗肿瘤的效果。小鼠主要器官的 H&E 切片和血液肝肾毒性相关指标的检测结果表明，DTPSZ 具有较好的食物安全性。

5.2 展望

综上所述，本论文构建了一种用于抗肿瘤的酸敏靶向的载药纳米硒颗粒，并验证了该纳米颗粒具有体内外抗肿瘤活性，但仍有如下一些问题需要解决：

- （1） 本材料所使用的外壳 ZIF-8 具有酸敏靶向性，同时具有良好的生物相容性，但它所具有的靶向性只是一种被动的靶向，其靶向效果与主动靶向相比仍然具有一定的差距，在今后的研究中可以采用具有主动靶向作用的外壳，例如细胞膜等。
- （2） 在本研究中，TP 的替代物有很多，可以使用透明质酸、叶酸等物质组成双重靶向，或许能够获得抗肿瘤性能更强的纳米药物。
- （3） 对于纳米硒和 DOX 协同抗肿瘤的研究仅限于抗肿瘤活性，未对其抗肿瘤机理进行更深入的研究。

参考文献

- [1] Han B, Zheng R, Zeng H, *et al.* Cancer incidence and mortality in China, 2022[J]. Journal of the National Cancer Center, 2024, 4(1): 47-53.
- [2] POL S. Carcinome Hépatocellulaire (CHC)[J]. Médecine Tropicale et Santé Internationale, 2024, 4(4): mTPSi.v4i4.2024.614.
- [3] 张正, 张莉芳, 刘彦廷, 等. 《2022 全球癌症统计报告》解读[J]. 中国医院统计, 2024: 1-8.
- [4] Chen W, Xia C, Zheng R, *et al.* Disparities by province, age, and sex in site-specific cancer burden attributable to 23 potentially modifiable risk factors in China: a comparative risk assessment[J]. The Lancet Global Health, 2019, 7(2): e257-e269.
- [5] Magyar C T J, Rajendran L, Li Z, *et al.* Precision surgery for hepatocellular carcinoma[J]. The Lancet Gastroenterology & Hepatology, 2025, 10(4): 350-368.
- [6] Zhong B Y, Fan W, Guan J J, *et al.* Combination locoregional and systemic therapies in hepatocellular carcinoma[J]. The Lancet Gastroenterology & Hepatology, 2025, 10(4): 369-386.
- [7] Dudzinski S O, Newman N B, McIntyre J, *et al.* Emerging evidence-based role for external-beam radiation therapy in hepatocellular carcinoma[J]. The Lancet Gastroenterology & Hepatology, 2025, 10(4): 387-398.
- [8] Shao Y Y, Akhmetzhanov A R. Demographics and immunotherapy efficacy for advanced hepatocellular carcinoma: a systematic review and meta-analysis of phase III clinical trials[J]. Liver Cancer, 2024: 1-9.
- [9] 时长淮. 阿霉素毒副作用机制及其防治研究进展[J]. 实用临床医药杂志, 2013, 17(3): 107-110.
- [10] Yang Y, Sun J, Wu M, *et al.* Chinese expert consensus on immunotherapy for hepatocellular carcinoma (2021 edition)[J]. Liver Cancer, 2022, 11(6): 511-526.
- [11] Wang L, Chen Q, Qi H, *et al.* Doxorubicin-induced systemic inflammation is driven by upregulation of toll-like receptor TLR4 and endotoxin leakage[J]. Cancer Research, 2016, 76(22): 6631-6642.
- [12] Ben Slama S, Bacha D, Sassi A, *et al.* Pathological response of colorectal liver metastases treated after induction treatment[J]. La Tunisie Medicale, 2017, 95(10): 854-858.
- [13] 张之琦. 紫檀芪对阿霉素诱导肾脏损伤的保护作用研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2023.

- [14] Sritharan S, Sivalingam N. A comprehensive review on time-tested anticancer drug doxorubicin[J]. Life Sciences, 2021, 278: 119527.
- [15] Luo Z, Chen C Y, Li S. Improving tumor targeting and penetration for nanoparticle-mediated cancer therapy[J]. Small Methods, 2025: e2401860.
- [16] Wu J. The enhanced permeability and retention (EPR) effect: the significance of the concept and methods to enhance iTPS application[J]. Journal of Personalized Medicine, 2021, 11(8): 771.
- [17] Sun R, Xiang J, Zhou Q, *et al.* The tumor EPR effect for cancer drug delivery: current status, limitations, and alternatives[J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2022, 191: 114614.
- [18] Liu J, Liu C, Tang J, *et al.* Synergistic cerium oxide nanozymes: targeting DNA damage and alleviating tumor hypoxia for improved NSCLC radiotherapy efficiency[J]. Journal of Nanobiotechnology, 2024, 22(1): 25.
- [19] Purohit M P, Kar A K, Kumari M, *et al.* Heparin Biofunctionalized Selenium Nanoparticles as Potential Antiangiogenic-Chemotherapeutic Agent for Targeted Doxorubicin Delivery[J]. ACS applied materials & interfaces, 2023, 15(16): 19904-19920.
- [20] Zhang W, Taheri-Ledari R, Ganjali F, *et al.* Effect of morphology and size of nanoscale drug carriers on cellular uptake and internalization process: a review[J]. RSC Advances, 13(1): 80-114.
- [21] Abosalha A Kh, Islam P, Boyajian J L, *et al.* Colon-targeted sustained-release combinatorial 5-fluorouracil and quercetin poly(lactic-co-glycolic) acid (PLGA) nanoparticles show enhanced apoptosis and minimal tumor drug resistance for their potential use in colon cancer[J]. ACS Pharmacology & Translational Science, 2024, 7(9): 2612-2620.
- [22] Zheng H, Zhang Y, Liu L, *et al.* One-pot synthesis of metal-organic frameworks with encapsulated target molecules and their applications for controlled drug delivery[J]. Journal of the American Chemical Society, 2016, 138(3): 962-968.
- [23] Cheng Z, Lian Y, Kamal Z, *et al.* Nanocrystals technology for pharmaceutical science[J]. Current Pharmaceutical Design, 2018, 24(21): 2497-2507.
- [24] Da Silva F L O, Marques M B D F, Kato K C, *et al.* Nanonization techniques to overcome poor water-solubility with drugs[J]. Expert Opinion on Drug Discovery, 2020, 15(7): 853-864.
- [25] Zheng F, Zhang P, Zhang Y, *et al.* Aptamer-modified mesoporous silica nanoparticle for nitric oxide-enhanced targeted sonodynamic therapy against lung cancer[J]. ACS Applied Nano Materials, 2025, 8(10): 5179-5192.

- [26] 田会婷, 朱晔, 郭呈斌, 等. 姜黄素-明胶纳米复合物改善药物水溶性和稳定性的研究[J]. 河南大学学报 (医学版), 2019, 38(1): 10-15.
- [27] Genchi G, Lauria G, Catalano A, *et al.* Biological activity of selenium and iTPS impact on human health[J]. International journal of molecular sciences, 2023, 24(3): 2633.
- [28] Rayman M P. Selenium and human health[J]. Lancet (London, England), 2012, 379(9822): 1256-1268.
- [29] Bai S, Zhang M, Tang S, *et al.* Effect of selenium on human health, a review[J]. Molecules (basel, Switzerland), 2024, 30(1): 50.
- [30] Vinceti M, Filippini T, Del Giovane C, *et al.* Selenium for preventing cancer[J]. The Cochrane Database of Systematic Reviews, 2018, 1(1): CD005195.
- [31] Maiyo F, Singh M. Selenium nanoparticles: potential in cancer gene and drug delivery[J]. Nanomedicine, 2017.
- [32] Bisht N, Phalswal P, Khanna P K. Selenium nanoparticles: a review on synthesis and biomedical applications[J]. Materials Advances, 2022, 3(3): 1415-1431.
- [33] Zeng S, Ke Y, Liu Y, *et al.* Synthesis and antidiabetic properties of chitosan-stabilized selenium nanoparticles[J]. Colloids and Surfaces, B: Biointerfaces, 2018, 170: 115-121.
- [34] Xia Y, Chen Y, Hua L, *et al.* Functionalized selenium nanoparticles for targeted delivery of doxorubicin to improve non-small-cell lung cancer therapy[J]. International Journal of Nanomedicine, 2018, 13: 6929-6939.
- [35] Xia Y, Zhong J, Zhao M, *et al.* Galactose-modified selenium nanoparticles for targeted delivery of doxorubicin to hepatocellular carcinoma[J]. Drug Delivery, 2019, 26(1): 1-11.
- [36] Xia Y, Xiao M, Zhao M, *et al.* Doxorubicin-loaded functionalized selenium nanoparticles for enhanced antitumor efficacy in cervical carcinoma therapy[J]. Materials Science and Engineering C, 2020, 106: 110100.
- [37] He L, Zhang Z, Tang Z, *et al.* Industrial-level production of ultrastable selenium nanoparticles using a confined coordination synthetic strategy[J]. Cell Reports Physical Science, 2024, 5(12): 102303.
- [38] Van Overschelde O, Guisbiers G, Snyders R. Green synthesis of selenium nanoparticles by excimer pulsed laser ablation in water[J]. APL Materials, 2013, 1: 42114.
- [39] Mosallam F M, El-Sayyad G S, Fathy R M, *et al.* Biomolecules-mediated synthesis of selenium nanoparticles using *aspergillus oryzae* fermented lupin

- p>extract and gamma radiation for hindering the growth of some multidrug-resistant bacteria and pathogenic fungi[J]. Microbial Pathogenesis, 2018, 122: 108-116.
- [40] Cui Y H, Li L L, Zhou N Q, *et al.* *In vivo* synthesis of nano-selenium by *tetrahymena thermophila* SB210[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2016, 95: 185-191.
- [41] Faramarzi S, Anzabi Y, Jafarizadeh-Malmiri H. Nanobiotechnology approach in intracellular selenium nanoparticle synthesis using *saccharomyces cerevisiae*—fabrication and characterization[J]. Archives of Microbiology, 2020, 202(5): 1203-1209.
- [42] Xiong Z, He L, Pi F, *et al.* Intracellular Redox Environment Determines Cancer-normal Cell Selectivity of Selenium Nanoclusters[J]. Angewandte Chemie (International Ed. in English), 2025, 64(4): e202416006.
- [43] Liu W, Li X, Wong Y S, *et al.* Selenium nanoparticles as a carrier of 5-fluorouracil to achieve anticancer synergism[J]. ACS Nano, 2012, 6(8): 6578-6591.
- [44] Giriprasad M, Mariraj I, Rajeshkumar S, *et al.* Evaluation of antidiabetic and anti-inflammatory action of selenium nanoparticles mediated through *aspalathus linearis* - an in vitro study[J]. Medical Journal of Malaysia, 2025, 80(Suppl 1): 29-36.
- [45] ElSheikh S K, Eid E S G, Abdelghany A M, *et al.* Physical/mechanical and antibacterial properties of composite resin modified with selenium nanoparticles[J]. BMC Oral Health, 2024, 24(1): 1245.
- [46] Vahdati M, Tohidi Moghadam T. Synthesis and characterization of selenium nanoparticles-lysozyme nanohybrid system with synergistic antibacterial properties[J]. Scientific Reports, 2020, 10(1): 510.
- [47] 曾鸿哲, 文帅, 方雯雯, 等. 茶叶活性成分健康功能研究新进展[J]. 中国茶叶, 2025, 47(2): 1-13.
- [48] Du L L, Fu Q Y, Xiang L P, *et al.* Tea polysaccharides and their bioactivities[J]. Molecules, 2016, 21(11): 1449.
- [49] Nie S P, Xie M Y. A review on the isolation and structure of tea polysaccharides and their bioactivities[J]. Food Hydrocolloids, 2011, 25(2): 144-149.
- [50] Zhao C, Chen G, Huang Y, *et al.* Alleviation of fluoride-induced colitis by tea polysaccharides: insight into the role of *limosilactobacillus vaginalis* and butyric acid[J]. Journal of Hazardous Materials, 2024, 476: 134858.

- [51] Wang P, Zhao B, Yin Z, *et al.* Structure elucidation and anticancer activity of a heteropolysaccharide from white tea[J]. Carbohydrate Polymers, 2024, 333: 121976.
- [52] 吴以龙, 税再坤, 王燕, 等. 普洱茶多糖不同纯化组分的理化性质与体外抗氧化、抗肿瘤活性关系分析[J]. 食品工业科技, 2024: 1-15.
- [53] Wang Y, Tang Y, Guo L, *et al.* Recent advances in zeolitic imidazolate frameworks as drug delivery systems for cancer therapy[J]. Asian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2025, 20(1): 101017.
- [54] Akhtar H, Amara U, Mahmood K, *et al.* Drug carrier wonders: synthetic strategies of zeolitic imidazolate frameworks (ZIFs) and their applications in drug delivery and anti-cancer activity[J]. Advances in Colloid and Interface Science, 2024, 329: 103184.
- [55] Yan X, Chen C, Ren Y, *et al.* A dual-pathway pyroptosis inducer based on Au-Cu₂-xSe@ZIF-8 enhances tumor immunotherapy by disrupting the zinc ion homeostasis[J]. Acta Biomaterialia, 2024, 188: 329-343.
- [56] Liberti M V, Locasale J W. The warburg effect: how does it benefit cancer cells?[J]. Trends in Biochemical Sciences, 2016, 41(3): 211-218.
- [57] Feng Q, Bennett Z, Grichuk A, *et al.* Severely polarized extracellular acidity around tumour cells[J]. Nature Biomedical Engineering, 2024, 8(6): 787-799.
- [58] 李春雷, 步召胜, 李志鹏. 茶多糖提取分离工艺综述[J]. 中国茶叶加工, 2015(1): 43-47.
- [59] 刘芷珊, 石玉涛, 肖蕌月, 等. 茶多糖研究进展与展望[J]. 中国茶叶加工, 2023(4): 65-73.
- [60] Rahman M, Kabir M, Islam T, *et al.* Curcumin-loaded ZIF-8 nanomaterials: exploring drug loading efficiency and biomedical performance[J]. ACS Omega, 2025, 10(3): 3067-3079.
- [61] Wu A, Han M, Ni Z, *et al.* Multifunctional Sr/Se co-doped ZIF-8 nanozyme for chemo/chemodynamic synergistic tumor therapy via apoptosis and ferroptosis[J]. Theranostics, 2024, 14(5): 1939-1955.
- [62] Zhang S, Li J, Yan L, *et al.* Zeolitic imidazolate framework-8 (ZIF-8) as a drug delivery vehicle for the transport and release of telomerase inhibitor BIBR 1532[J]. Nanomaterials, 2023, 13(11): 1779.
- [63] Tao K, Song S, Ding J, *et al.* Carbonyl groups anchoring for the water dispersibility of magnetite nanoparticles[J]. Colloid and Polymer Science, 2011, 289(4): 361-369.

- [64] Hu C, Wang J, Gao X, *et al.* Pluronic-Based Nanoparticles for Delivery of Doxorubicin to the Tumor Microenvironment by Binding to Macrophages[J]. ACS Nano, 2024, 18(22): 14441-14456.
- [65] Huang J, Yang J, Yang Y, *et al.* Mitigating doxorubicin-induced cardiotoxicity and enhancing anti-tumor efficacy with a metformin-integrated self-assembled nanomedicine[J]. Advanced Science, n/a(n/a): 2415227.
- [66] Wei R, Chi H Y, Li X, *et al.* Aqueously cathodic deposition of ZIF-8 membranes for superior propylene/propane separation[J]. Advanced Functional Materials, 2020, 30(7): 1907089.
- [67] Bhattacharjee S, Jang M S, Kwon H J, *et al.* Zeolitic imidazolate frameworks: synthesis, functionalization, and catalytic/adsorption applications[J]. Catalysis Surveys from Asia, 2014, 18(4): 101-127.
- [68] Hayashi H, Côté A P, Furukawa H, *et al.* Zeolite A imidazolate frameworks[J]. Nature Materials, 2007, 6(7): 501-506.
- [69] Gao Y, Wang J, Zhang W, *et al.* Application of capsaicin and calcium phosphate-loaded MOF system for tumor therapy involving calcium overload[J]. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 2024, 60: 102759.
- [70] Li X, Wang J, Li W, *et al.* Combined photothermal/combination chemotherapeutic approach using zif-8-supported artesunate and gold nanorods[J]. ACS Applied Nano Materials, 2024, 7(10): 11587-11598.
- [71] Zhang J, Luo H, Ma W, *et al.* Semiconducting open-shell radicals for precise tumor activatable phototheranostics[J]. Advanced Science, n/a(n/a): 2500293.
- [72] Xu J, Liu Z, Zhang S, *et al.* Anti-hepatoma immunotherapy of Pholiota adiposa polysaccharide-coated selenium nanoparticles by reversing M2-like tumor-associated macrophage polarization[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 277(Pt 1): 133667.
- [73] Hu B, Song N, Cao Y, *et al.* Noncanonical amino acids for hypoxia-responsive peptide self-assembly and fluorescence[J]. Journal of the American Chemical Society, 2021, 143(34): 13854-13864.
- [74] Zhou Q M, Lu Y F, Zhou J P, *et al.* Self-amplification of oxidative stress with tumour microenvironment-activatable iron-doped nanoplatfrom for targeting hepatocellular carcinoma synergistic cascade therapy and diagnosis[J]. Journal of Nanobiotechnology, 2021, 19: 361.
- [75] Kong N, Tao W, Ling X, *et al.* Synthetic mRNA nanoparticle-mediated restoration of p53 tumor suppressor sensitizes p53-deficient cancers to mTOR inhibition[J]. Science Translational Medicine, 2019, 11(523): eaaw1565.

- [76] Yang Y, Liu Q, Wang M, *et al.* Genetically programmable cell membrane-camouflaged nanoparticles for targeted combination therapy of colorectal cancer[J]. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2024, 9: 158.
- [77] Dai J, Li J, Zhang Y, *et al.* GM-CSF augmented the photothermal immunotherapeutic outcome of self-driving gold nanoparticles against a mouse CT-26 colon tumor model[J]. *Biomaterials Research*, 2023, 27: 105.
- [78] La Rosa S. Diagnostic, prognostic, and predictive role of Ki67 proliferative index in neuroendocrine and endocrine neoplasms: past, present, and future[J]. *Endocrine Pathology*, 2023, 34(1): 79-97.
- [79] Yang Y, Shao X, Li Z, *et al.* Prognostic heterogeneity of Ki67 in non-small cell lung cancer: a comprehensive reappraisal on immunohistochemistry and transcriptional data[J]. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2024, 28(14): e18521.
- [80] Zilenaite-Petrulaitiene D, Rasmusson A, Valkiuniene R B, *et al.* Spatial distributions of CD8 and Ki67 cells in the tumor microenvironment independently predict breast cancer-specific survival in patient TPS with ER+HER2– and triple-negative breast carcinoma[J]. *PLOS One*, 2024, 19(11): e0314364.
- [81] Eskandari E, Eaves C J. Paradoxical roles of caspase-3 in regulating cell survival, proliferation, and tumorigenesis[J]. *Journal of Cell Biology*, 2022, 221(6): e202201159.
- [82] Zhu C, Fan F, Li C Y, *et al.* Caspase-3 promotes oncogene-induced malignant transformation via EndoG-dependent src-STAT3 phosphorylation[J]. *Cell Death and Disease*, 2024, 15(7): 486.
- [83] Basu V, Shabnam, Murghai Y, *et al.* ONC212, alone or in synergistic conjunction with navitoclax (ABT-263), promotes cancer cell apoptosis via unconventional mitochondrial-independent caspase-3 activation[J]. *Cell Communication and Signaling : CCS*, 2024, 22: 441.
- [84] Li J, Lv W, Han Z, *et al.* Mitoxantrone-encapsulated ZIF-8 enhances chemo-immunotherapy via amplified immunogenic cell death[J]. *Advanced Science*, n/a(n/a): 2501542.
- [85] Yang P, Liu S, Chen Z, *et al.* Proton nanomodulators for enhanced Mn²⁺-mediated chemodynamic therapy of tumors via HCO₃[–] regulation[J]. *Journal of Nanobiotechnology*, 2024, 22: 670.
- [86] Yun W S, Yang W, Shim M K, 等. Accurately Controlled Tumor Temperature with Silica-Coated Gold Nanorods for Optimal Immune Checkpoint Blockade Therapy[J]. *Biomaterials Research*, 28: 24.

- [87] Li H, Pei P, He Q, *et al.* Nanozyme-coated bacteria hitchhike on CD11b⁺ immune cells to boost tumor radioimmunotherapy[J]. *Advanced Materials* (deerfield Beach, Fla.), 2024, 36(8): e2309332.
- [88] Wang Z, Zhu M, Dong R, *et al.* TH-302-loaded nanodrug reshapes the hypoxic tumour microenvironment and enhances PD-1 blockade efficacy in gastric cancer[J]. *Journal of Nanobiotechnology*, 2023, 21: 440.

攻读硕士学位期间研究成果

- (1) **Yang Zicheng**, Li Rongyu, Wang Ruonan, Qian Senhe. Enhancing Healing of Infected Wounds with Glycerin-Modified Sodium Alginate/Silk Sericin Composite Film Functionalized with Polygonatum sibiricum Polysaccharide Capped Silver Nanoparticles [J]. Chemistry Select, 2024. DOI: 10.1002/slct.202400566
- (2) **杨子成**, 晏程, 许腾龙, 阮永海, 钱森和. 高产多糖大球盖菇的 ARTP 诱变筛选及其菌丝培养条件优化[J]. 中国食用菌, 2024. DOI: 10.13629/j.cnki.53-1054.2024.02.007
- (3) Ruonan Wang, Rongyu Li, Peng Zheng, **Zicheng Yang**, Cheng Qian, Zhou Wang, Senhe Qia. Silver Nanoparticles Modified with Polygonatum sibiricum Polysaccharide Improve Biocompatibility and Infected Wound Bacteriostasis [J]. Journal of Microbiology, 2023. doi.org/10.1007/s12275-023-00042-8

致谢

时光荏苒，岁月如梭，不知不觉间三年的研究生生涯也即将接近尾声了，在这三年里我收获了许多美好回忆，也学到了很多有用的知识，在此，我要表达一下对那些帮助过我的人的感激。

首先我要感谢的是我的导师钱森和老师，钱老师是一位治学严谨、工作认真的优秀导师，钱老师为我课题的制定付出了很多精力，对于实验的指导也很认真，在论文的数据处理、图片绘制以及撰写等方面都给了我很大的帮助。钱老师不止在学术方面给了我很大的帮助，也在人生选择方面给我指明了道路，使我摆脱困惑。

其次，我要感谢师兄郑鹏、师姐王若男、师弟阮永海以及同学方旭娟等人的帮助，师兄师姐曾手把手教我实验，师弟和同学在实验方面给了我很大的帮助，有些实验需要多人配合才能完成，如果没有他们，我一个人恐怕难以完成课题。

还要感谢我的母校安徽工程大学，作为本校考研上岸的我，本科加研究生我已经在这所大学生活和学习了七年之久，在这七年的时间里我已经建立了对安工程深深的感情，安工程的一草一木为我构筑了美好的环境，安工程整洁的教室为我提供了良好的学习氛围，安工程的食堂为我提供了优质的饭菜，安工程的实验室为我提供了高水平的科研环境，他们都是我七年求学生涯的见证者，在此，感谢母校为我们提供的一切服务，感谢母校陪伴我们成长。

最后，还要感谢我的父母，是他们为我提供了坚实的后盾，让我能够全身心投入到研究生的科研学习当中，而没有任何后顾之忧。

研究生生涯即将结束，但我们认识道路还很长，在以后得日子里，我会永远记着在安工程渡过的七年时光，肩负着安工程学子的使命和责任在社会上发光发热。最后，在此衷心感谢在我研究生期间所有帮助过我的所有人。