

# 藏黄连多糖-硒纳米颗粒的制备、结构表征及体外抗炎活性

高飞<sup>1</sup>, 李友英<sup>2</sup>, 范潇<sup>1</sup>, 张衍坤<sup>1</sup>, 候冉冉<sup>1\*</sup>

(1. 青岛农业大学化学与药学院, 山东青岛 266109) (2. 甘孜藏族自治州畜牧业科学研究所, 四川甘孜 626000)

**摘要:** 该研究通过绿色合成中药多糖-硒纳米颗粒, 筛选具有抗氧化、抗炎功能的富硒中药多糖保健食品, 满足人们生活水平不断提高的要求和养生保健的愿望。通过藏黄连多糖 (CTP) 绿色还原亚硒酸钠成功构建藏黄连多糖-硒纳米颗粒 (CTP-SeNPs), 表征其结构, 并探索其体外抗氧化与抗炎活性。结果表明, 通过 FT-IR 和 XRD 验证该研究中成功构建了 CTP-SeNPs; EDS-SEM 和 DLS 显示, CTP-SeNPs 呈现厚片状, 边缘圆润, 硒含量为 11.66%, 粒径约 101.96 nm; 体外抗氧化试验显示, 在 0~10 mg/mL 浓度范围内, 随 CTP-SeNPs 浓度的增加, 其清除自由基能力逐渐增大, 最大清除率均能达到 60% 以上, 且体外抗氧化效果优于 CTP 组; 体外细胞试验显示, 在 250~500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  浓度范围内, CTP-SeNPs 促进 RAW264.7 细胞增殖的能力显著优于 CTP, 在 250~1 000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  浓度范围内, CTP-SeNPs 抗炎效果显著高于 CTP。综上所述, 藏黄连多糖绿色还原亚硒酸钠成功构建的藏黄连多糖-硒纳米颗粒具有抗氧化、促抗炎的活性, 可为研发富硒中药多糖保健食品提供理论依据。

**关键词:** 藏黄连多糖; 硒纳米颗粒; 抗氧化; 抗炎; 保健食品

文章编号: 1673-9078(2022)11-175-184

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.11.0050

## Preparation, Structural Characterization, and *in Vitro* Anti-inflammatory Activity of *Coptis teeta* Polysaccharide-selenium Nanoparticles

GAO Fei<sup>1</sup>, LI Youying<sup>2</sup>, FAN Xiao<sup>1</sup>, ZHANG Yankun<sup>1</sup>, HOU Ranran<sup>1\*</sup>

(1. College of Chemistry and Pharmaceutical, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China)

(2. Animal Husbandry Research Institute of Ganzi Tibetan Autonomous Prefecture, Ganzi 626000, China)

**Abstract:** The green synthesis of the traditional Chinese medicine, polysaccharide-selenium nanoparticles, was investigated to screen for selenium-rich polysaccharide health foods with antioxidant and anti-inflammatory functions to meet the increasing standards of living and the demand for better health. *Coptis teeta*-selenium nanoparticles (CTP-SeNPs) were prepared using the green reduction of sodium selenite by CTP and characterized and investigated for their *in vitro* antioxidant and anti-inflammatory properties. The results of Fourier transform infrared spectrometry and X-ray diffraction revealed that the CTP-SeNPs were successfully constructed. Energy dispersive X-ray spectroscopy-scanning electron microscopy and dynamic light scattering showed that the CTP-SeNPs appeared as thick flakes with rounded edges and had a selenium content of 11.66% and a particle size of about 101.96 nm. *In vitro* antioxidant assays showed that the free radical-scavenging ability of CTP-SeNPs gradually increased with an increase in the concentration in the range of 0~10 mg/mL, and the maximum scavenging rate was over 60%. The *in vitro* antioxidant effect of CTP-SeNPs was better than that of the CTP group. *In vitro* cell assays showed that CTP-SeNPs significantly promoted the proliferation of RAW264.7 cells as compared with CTP in the concentration range of 250~500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . The anti-inflammatory activity of CTP-SeNPs in the concentration range of 250~1 000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  was better than that of CTP. In conclusion,

引文格式:

高飞, 李友英, 范潇, 等. 藏黄连多糖-硒纳米颗粒的制备、结构表征及体外抗炎活性[J]. 现代食品科技, 2022, 38(11): 175-184

GAO Fei, LI Youying, FAN Xiao, et al. Preparation, structural characterization, and *in vitro* anti-inflammatory activity of *Coptis teeta* polysaccharide-selenium nanoparticles [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(11): 175-184

收稿日期: 2022-01-15

基金项目: 山东省重点研发计划项目 (2021CXGC011305); 国家自然科学基金青年基金项目 (31802229); 青岛农业大学高层次基金 (6631121044)

作者简介: 高飞 (1995-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 天然产物活性, E-mail: 447622785@qq.com

通讯作者: 候冉冉 (1989-), 男, 博士研究生, 讲师, 研究方向: 天然产物活性/兽药研发, E-mail: rhou@qau.edu.cn

CTP-SeNPs exhibits antioxidant and anti-inflammatory properties that may be potentially useful for the development of selenium-rich traditional Chinese medicine polysaccharide health foods.

**Key words:** *Coptis teeta* polysaccharide; selenium nanoparticles; antioxidation; anti-inflammatory; health supplement

随着社会的飞速发展,我国已经逐步进入老龄化社会,人口老龄化问题是我国当今亟待解决的关键问题。人体免疫力随年龄增加而呈现降低趋势,因此,老年病就容易趁虚入侵老年人。那么,要解决我国老龄化所带来的问题,首先就是要降低我国老年人老年病的发病率,其中,提高老年人口机体免疫力是最重要的一环。青少年是祖国的未来,青少年时期身体快速发育,当机体免疫力出现问题时,身体容易受到外邪侵染,威胁机体健康,所以,不论是老年或是少年,提高机体免疫力都是预防疾病和保持身体健康的根本。现如今,“治未病”的健康观念越来越被人们了解与接受,而保健食品可调节身体功能,可作为膳食调节剂,增强机体免疫力,维持身体健康<sup>[1-3]</sup>。

微量元素是动植物体不可缺少的重要成分,硒是这些微量元素中尤为重要的一种,具有调节免疫、抗炎等多种药理活性<sup>[4,5]</sup>。因此,硒的缺乏会导致机体产生一系列的不良症状,如免疫系统损伤、心血管疾病、甲状腺激素代谢异常甚至增加癌症产生的风险。为满足人体对硒的日常需求,补硒是必要的途径,尤其是对于硒含量水平低的人群和缺硒地区。部分无机硒和有机硒如亚硒酸盐、硒代氨基酸等可用于人体硒补充剂,然而,无机硒使用的安全窗口窄,生物转化的天然有机硒制备耗时且产量低,无法满足人民日益对硒的营养需求。近年来,随着纳米技术在医药领域的快速发展,硒纳米颗粒的制备和活性逐渐引起科研工作者的关注。与其他无机硒和有机硒化合物相比,硒纳米颗粒具有更高的抗癌、抗氧化、低毒等效果,但硒纳米颗粒极易聚集沉淀,很难用于临床或作为食品添加剂<sup>[6]</sup>。作为自然界四大生命活动物质之一的多糖,种类多、来源广。大量研究证实,天然多糖具有调节免疫、抗病毒、抗炎症、抗氧化等生物活性<sup>[2,3]</sup>。多糖结构复杂,分子内含有大量亲水基团,为了克服硒纳米颗粒不稳定、易聚沉的缺陷,可利用多糖修饰硒纳米颗粒形成稳定的多糖-硒纳米颗粒。由于天然多糖具有无毒性、生物相容性良好、可生物降解等特点,且制备得到的多糖硒纳米颗粒稳定性较好,使得多糖在功能化硒纳米颗粒的制备中的应用越来越广泛<sup>[7]</sup>。天然多糖-硒纳米颗粒与其他无机硒或硒单质比,具有粒径小、生物活性更高、毒性较低的优点<sup>[8]</sup>。本研究中所采用的藏黄连,为玄参科植物兔耳草属多年生草本植物圆穗兔耳草 *Lagotis brachystachys* Maxim.和全缘叶兔耳草

*Lagotis integra* W.W.Smith.的根,别名洪连、洪轮、兔耳草等,具有清热解毒、利湿平肝、行血调经之功效。用于发热烦渴、头痛眩晕、月经不调、药食中毒等。本研究从藏黄连中提取分离藏黄连多糖(*Coptesteeta* Polysaccharide, CTP),绿色还原亚硒酸钠合成藏黄连多糖-硒纳米颗粒(CTP-SeNPs)<sup>[9]</sup>,探究其结构表征、抗氧化活性和抗炎活性,为研发富硒中药多糖保健食品奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

藏黄连,购于四川甘孜,经鉴定为藏黄连正品;透析袋,截留分子量 8 000-12 000 u,上海源叶生物科技有限公司;DPPH(1,1-二苯基-2-苦基肼)、ABTS(2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)、总还原力试剂盒(FRAP),购自上海碧云天生物技术有限公司;胎牛血清、DMEM、青链霉素(PS)、地塞米松,购自 Sigma;其他试剂均为分析纯。

### 1.2 仪器与设备

BC-J80s CO<sub>2</sub>培养箱、YXQ-LS-30S 立式压力灭菌器,上海博讯有限公司;CKX41 倒置显微镜, Olympus Corporation; LGJ-18 真空冷冻干燥机,北京亚星仪科技发展有限公司;TDL-4C 差速离心机,上海安亭电子仪器有限公司;MK3 酶标仪, Thermo Multiskan; Mastersizer 3000 粒度仪, Malvern Panalytical; Nicolet iS5 红外光谱仪, Thermo Fisher; SU3800 扫描电子显微镜, Hitachi; ARL3000 X 射线衍射仪, 760CRT Thermo Scientific 紫外可见光谱仪,上海仪电分析仪器有限公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 藏黄连多糖的提取分离

取 500 g 藏黄连,粉碎,过 80 目筛,加 15 倍量蒸馏水,浸泡过夜,煎煮 2.5 h,重复三次,离心合并滤液。将滤液置于真空旋转蒸发仪中,65 °C 浓缩至 500 mL,冷却至室温后,加入 2 L 无水乙醇,搅拌后静置于 4 °C 冰箱中,过夜。5 000 r/min 离心 10 min,收集沉淀,冷冻干燥,收集藏黄连多糖<sup>[10]</sup>。

#### 1.3.2 Seville 法除蛋白

Seville 法除蛋白方法参考文献<sup>[11]</sup>。配制藏黄连多

糖浓度为 10 mg/mL 的溶液 1 740 mL, 加入 60 mL Seville 混合液 ( $V_{\text{正丁醇}}:V_{\text{三氯甲烷}}=1:4$ )。搅拌 45 min, 静置 30 min 后分层, 保留上层弃去下层, 重复 8 次。浓缩, 冷冻干燥, 得去蛋白藏黄连多糖 (CTP)。

### 1.3.3 多糖得率的测定

依据参考文献, 采用苯酚-硫酸法测多糖含量, 标准曲线方程为:

$$y=0.0228 5x+0.016 9, R^2=0.997 8 \quad (1)$$

式中:

$x$ ——质量浓度,  $\mu\text{g/mL}$ ;

$y$ ——吸光度。

配制多糖溶液, 检测其吸光度, 并带入标准曲线方程计算出质量浓度, 根据文献公式计算多糖得率<sup>[12]</sup>:

$$B=\frac{c \times n \times V}{m \times 1000} \times 100\% \quad (2)$$

式中:

$B$ ——多糖得率, %;

$c$ ——质量浓度,  $\mu\text{g/mL}$ ;

$n$ ——稀释倍数;

$V$ ——体积, mL;

$m$ ——藏黄连质量, g。

### 1.3.4 藏黄连多糖-硒纳米颗粒 (CTP-SeNPs) 的制备

#### 1.3.4.1 藏黄连多糖浓度的筛选

分别将 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mg/mL 的 CTP 溶液, 等体积逐滴加入到 20 mL 的 50 mmol/L  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  溶液中, 避光搅拌 3 h 后, 滴加 50 mmol/L 的 20 mL 抗坏血酸溶液, 超纯水补至总体积 200 mL, 继续避光搅拌 12 h。反应结束, 将混合液装入截留分子量为 8 000~12 000 u 透析袋, 4  $^{\circ}\text{C}$  下避光蒸馏水透析 72 h, 取透析后的反应液测量粒径, 真空冷冻干燥得藏黄连-硒纳米颗粒 (CTP-SeNPs), 备用。

#### 1.3.4.2 pH 值的测定

蒸馏水配制 3 份 CTP-SeNPs (10 mg/mL), 使用数字 pH 计测定样品溶液的 pH 值。

#### 1.3.4.3 保水能力和保油能力测定

分别将样品粉末 (500 mg) 与蒸馏水 (5 g) 或大豆油 (5 g) 混合, 室温放置 1 h, 每隔 10 min 搅拌一次, 12 000 r/min 离心后除去上清液, 称量残渣, 测定 WRC/ORC。按每克干样品的水/大豆油克数计算<sup>[13]</sup>。

### 1.3.5 CTP-SeNPs 的结构表征

#### 1.3.5.1 粒径分布

配制浓度为 1 mg/mL 的 CTP-SeNPs 溶液, 使用纳米颗粒度仪检测其粒径分布。

#### 1.3.5.2 红外光谱分析

分别称取 2 mg CTP、CTP-SeNPs、SeNPs, 将适量研磨均匀、干燥的溴化钾粉末与样品混合, 再次研磨均匀后压片, 置于红外光谱仪中, 在 400~4 000  $\text{cm}^{-1}$  范围进行扫描<sup>[14]</sup>。

#### 1.3.5.3 扫描电子显微镜分析 (SEM)

分别取 2 mg 干燥好的 CTP、CTP-SeNPs, 喷金后于扫描电镜下分析<sup>[14]</sup>。

#### 1.3.5.4 X 射线衍射分析 (XRD)

将 2 mg 干燥的 CTP-SeNPs 置于玻片上, 铺匀压紧, 放入仪器样品室, 检测其元素峰。

#### 1.3.5.5 紫外可见吸收光谱

分别配制 1 mg/mL CTP、CTP-SeNPs 和 SeNPs 溶液, 置于紫外分光光度计中, 在 200~800 nm 范围内全波长扫描<sup>[14]</sup>。

#### 1.3.5.6 刚果红测试

2.0 mL 刚果红溶液 (0.2 mol/L)、4.0 mL 不同浓度的 NaOH 溶液 (0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mol/L) 与 2 mL CTP (2.0 mg/mL) 混合, 室温避光搅拌 15 min。分别取各混合溶液于紫外分光光度计中, 在 200~800 nm 范围内全波长扫描, 记录最大吸收波长, 记作  $\lambda_{\text{max}}$ 。用 2.0 mg/mL 的凝胶多糖 (Curdlan) 替代 CTP, 作为对照。

### 1.3.6 CTP 和 CTP-SeNPs 体外抗氧化活性

#### 1.3.6.1 DPPH 自由基清除

用无水乙醇配制浓度为 0.05 mmol/L DPPH 溶液备用。分别将 1 mL 不同浓度 (0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 mg/mL) 的 CTP、CTP-SeNPs 和抗坏血酸 (Vc) 溶液置于试管中, 分别加入 2 mL DPPH 溶液, 使用涡旋仪混匀, 置于室温下避光静置 30 min, 之后测量混合液 517 nm 处吸光度, 记录吸光度值, 记为  $A_{\text{样品}}$ ; 测定不同浓度 CTP、CTP-SeNPs、Vc 的吸光度, 记为  $A_0$ ; 取 1 mL 蒸馏水于试管中, 加入 2 mL DPPH 溶液, 测定其吸光度, 记为  $A_1$ <sup>[15]</sup>。DPPH 自由基清除率 ( $B$ , %) 的计算:

$$B=\left(1-\frac{A_{\text{样品}}-A_0}{A_1}\right) \times 100\% \quad (3)$$

#### 1.3.6.2 羟自由基清除

用蒸馏水配制浓度为 70 mmol/L 的  $\text{FeSO}_4$  溶液、用无水乙醇配制浓度为 70 mmol/L 水杨酸-乙醇溶液、将 CTP、CTP-SeNPs 和抗坏血酸 (Vc) 配制成为 0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 mg/mL 的六个浓度, 向试管中依次加入 1 mL  $\text{FeSO}_4$  溶液、1 mL 水杨酸-乙醇溶液、1 mL 样品溶液 (CTP、CTP-SeNPs、Vc), 最后加入 1 mL 体积分数 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  溶液, 使用涡旋仪混匀, 在室温条件下, 静置 30 min, 测量在 510 nm 下吸光度。羟自由基清除能力的计算:

$$C = \left(1 - \frac{A_{\text{样品}} - A_0}{A_1}\right) \times 100\% \quad (4)$$

式中:

C——羟自由基清除率, %;

$A_{\text{样品}}$ —— $\text{FeSO}_4$ +水杨酸+样品+ $\text{H}_2\text{O}_2$ ;

$A_0$ —— $\text{FeSO}_4$ +水杨酸+样品+蒸馏水(1 mL);

$A_1$ —— $\text{FeSO}_4$ +水杨酸+蒸馏水+ $\text{H}_2\text{O}_2$ 。

### 1.3.6.3 ABTS<sup>+</sup>自由基清除

用蒸馏水配制浓度为 2 mmol/L 的 ABTS 溶液和浓度为 70 mmol/L 的  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$  溶液。取配制的 ABTS 溶液与  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$  溶液以 1:4 的比例混合均匀, 在室温避光条件下静置 12~16 h, 得到 ABTS<sup>+</sup>·溶液, 再使用 PBS 溶液稀释 ABTS<sup>+</sup>·溶液直至该溶液在 Abs=734 nm 处吸光度为(0.70±0.02)。将 CTP、CTP-SeNPs 和抗坏血酸(Vc) 分别配制成 0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 mg/mL 六个浓度。

分别将 10 μL 的不同浓度的 CTP、CTP-SeNPs 和抗坏血酸(Vc) 加入 96 孔细胞板中, 每个浓度重复三个孔, 向每个孔加入 200 μL 孵育好的 ABTS<sup>+</sup>·溶液, 混匀 6 min 后检测各孔在 734 nm 处的吸光度( $A_2$ ); 空白孔加入 10 μL 的不同样品溶液和 200 μL 的 PBS 溶液, 混匀 6 min 后检测其在 734 nm 处的吸光度( $A_0$ ); 对照孔加入 210 μL 的 ABTS<sup>+</sup>·溶液, 检测其吸光度( $A_1$ )<sup>[16]</sup>。ABTS<sup>+</sup>·清除率(D, %) 计算:

$$D = \left(1 - \frac{A_2 - A_0}{A_1}\right) \times 100\% \quad (5)$$

### 1.3.6.4 总抗体氧化能力检测(FRAP法)

用蒸馏水配制浓度为 0.15、0.3、0.6、0.9、1.2 和 1.5 mmol/L 的  $\text{FeSO}_4$  标准溶液与 Trolox 溶液备用, 分别将 CTP、CTP-SeNPs 和抗坏血酸(Vc) 配置成 2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 mg/mL 的五个浓度。在 96 孔细胞培养板中, 每孔加入 180 μL FRAP 工作液, 设置空白对照孔、标准曲线检测孔、样品检测孔、阳性对照孔, 分别加入 5 μL 蒸馏水、 $\text{FeSO}_4$  标准溶液(0.15、0.3、0.6、0.9、1.2、1.5 mmol/L)、样品、Trolox 溶液(0.15~1.5 mmol/L), 震荡混匀。在 37 °C 条件下, 静置 3~5 min 后, 测定各混合液 593 nm 处吸光度值, 根据标准曲线计算出样品的总抗氧化能力。

## 1.3.7 CTP 和 CTP-SeNPs 体外活性研究

### 1.3.7.1 CTP 和 CTP-SeNPs 细胞增殖活性

5 000 个 RAW264.7 细胞(100 μL) 分别加入 96 孔板细胞培养板中, 置于 37 °C, 体积分数 5%  $\text{CO}_2$  的细胞培养箱培养 12 h 后分别将用 PBS 配制的 1.0 mg/mL 的 CTP 和 CTP-SeNPs 倍比稀释后(100 μL) 加入至细胞中, 置于细胞培养箱中培养 24 h, 每孔加

入 20 μL MTT 溶液(5 mg/mL), 继续置于细胞培养箱中培养, 4 h 后弃去孔中溶液, 每孔加入 150 μL DMSO 溶液, 震荡 10 min, 酶标仪检测 OD<sub>570</sub><sup>[17]</sup>。

### 1.3.7.2 CTP 和 CTP-SeNPs 抗炎活性

5 000 个 RAW264.7 细胞(100 μL) 分别加入 96 孔细胞培养板中, 置于 37 °C, 体积分数 5%  $\text{CO}_2$  的细胞培养箱中培养 12 h, 每孔加入 100 μL LPS 溶液(0.2 μg/mL), 继续置于细胞培养箱中培养 12 h 后, 分别将用 PBS 配制的 1.0 mg/mL 的 CTP 和 CTP-SeNPs 倍比稀释后(100 μL) 加入到细胞中, 培养 24 h 后, 每孔加入 20 μL MTT 溶液(5 mg/mL), 培养 4 h 后弃去孔中溶液, 每孔加入 150 μL DMSO 溶液, 震荡 10 min, 酶标仪检测 OD<sub>570</sub>。同样地, 药物加入细胞中, 培养 24 h 后, 取上清液, 根据 ELISA 试剂盒说明书测定上清中的 IL-6 的含量。

## 1.4 数据处理

采用 IBM SPSS Statistics 26 软件进行单因素方差分析(one-way ANOVA), 使用 GraphPad 8.0.2 与 Origin 2018 进行数据处理和分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 CTP 的制备及理化性质

藏黄连多糖的得率为 11.84%, 去蛋白藏黄连多糖(CTP) 得率为 7.72%。CTP 的 pH 值为 6.42±0.05, 保水能力最高值为 12.07 g/g, 保油能力为 11.28 g/g。

### 2.2 刚果红试验

如图 1 所示, 随着 NaOH 浓度的增大, 凝胶多糖的  $\lambda_{\text{max}}$  也随之增加(红移), 凝胶多糖是可行的具有三螺旋结构的多糖, 而试验中藏黄连多糖也表现出相同红移情况<sup>[18]</sup>。因此, 推测 CTP 可能具有三螺旋构象。

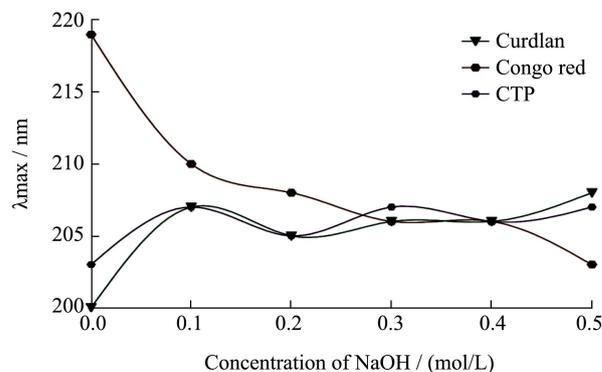


图 1 刚果红检测

Fig.1 Congo red test

### 2.3 CTP-SeNPs 的表征

#### 2.3.1 CTP-SeNPs 粒径分布

各浓度藏黄连多糖合成 CTP-SeNPs 纳米颗粒, 如图 2a 所示, 当 CTP 浓度为 1.5 mg/mL 时, CTP-SeNPs 的粒径分布相对比较集中且较小, 因此, 筛选 1.5 mg/mL 的 CTP 作为最佳浓度。如图 2b 所示, 结果分析, CTP-SeNPs 的平均粒径为 101.96 nm。在前人<sup>[5,8,16]</sup>的研究中, 合成多糖-硒纳米颗粒平均在 60 nm~120 nm 之间, CTP-SeNPs 的平均粒径与其研究结果大致符合。

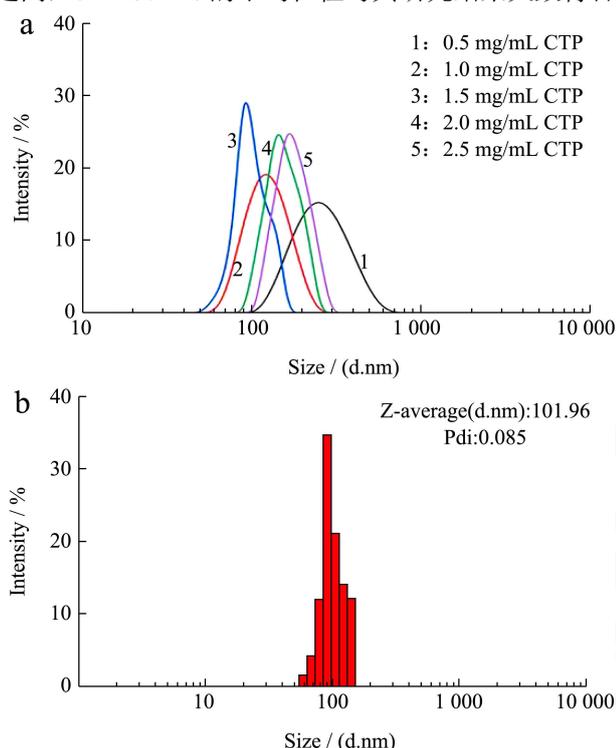


图 2 藏黄连多糖溶液制备 CTP-SeNPs

Fig.2 Preparation of CTP-SeNPs from Coptesteeta polysaccharide solution

注: 图 a 为各浓度藏黄连多糖溶液制备 CTP-SeNPs 粒径分布; 图 b 为 1.5 mg/mL CTP 合成 CTP-SeNPs 的粒径分布。

#### 2.3.2 CTP-SeNPs 的紫外可见吸收光谱

如图 3 显示, CTP-SeNPs 最大吸收峰值出现位置小于 200 nm, 而 SeNPs 在 480 nm 处有最大吸收峰值, 其位于可见光区, 说明 SeNPs 呈现橙黄色<sup>[19]</sup>。有文献报道, 当纳米颗粒粒径约 200 nm 时在紫外光谱的 600 nm 左右有最大吸收峰; 当纳米颗粒粒径小于 100 nm 左右时, 其在红外光谱的最大吸收峰低于 300 nm<sup>[20,21]</sup>。本研究经 DLS 检测 CTP-SeNPs 的平均粒径为 101.96 nm, 这与文献报道相似。研究表明, 核酸紫外最大吸收峰出现在 260 nm 处<sup>[21]</sup>, 在 CTP 和 CTP-SeNPs 的全波长扫描图谱中, 在 260 nm 处均未出现吸收峰, 表明 CTP 中核酸含量较低。蛋白质紫外最大

吸收峰出现在 280 nm 处<sup>[22]</sup>, 在 CTP 的全波长扫描图谱中, CTP 在 280 nm 处未表现出吸收峰, 说明 CTP 中无蛋白存在, 而 CTP-SeNPs 在 280 nm 附近出现吸收峰, 表明 SeNPs 与 CTP 相互作用形成复合物 CTP-SeNPs。在 Wang<sup>[14]</sup>的研究中显示, 与 RTFP-3 (刺梨多糖) 相比, RP3-SeNPs (刺梨多糖硒纳米颗粒) 在 278 nm 处有吸收峰, 推测 SeNPs 与 RTFP-3 相互作用形成了复合物, 该结果与本研究结果相似。

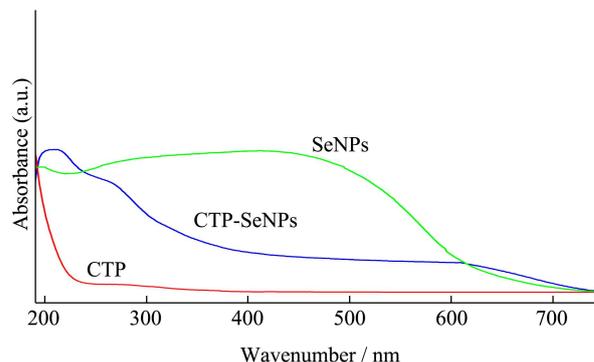


图 3 CTP、CTP-SeNPs 和 SeNPs 的紫外全波长扫描

Fig.3 Full-wavelength UV scanning of CTP, CTP-SeNPs and SeNPs

#### 2.3.3 红外光谱分析

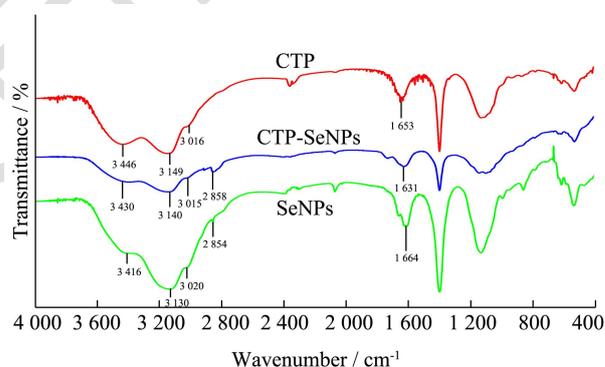


图 4 FT-IR 图谱分析

Fig.4 FT-IR spectrum analysis

CTP、SeNPs 和 CTP-SeNPs 红外光谱见图 4。CTP 在 3 446 cm<sup>-1</sup>、1 653 cm<sup>-1</sup> 处的振动吸收峰分别为-OH、-C=O 的振动吸收峰, 3 016 cm<sup>-1</sup> 的吸收峰是由于 CH<sub>2</sub> 基团的 C-H 伸缩和弯曲振动所形成的, 以上表明 CTP 中有多糖的特征吸收峰的存在。CTP-SeNPs 中-OH 拉伸震动形成的吸收峰和-C=O 吸收峰分别为 3 430 cm<sup>-1</sup>、1 631 cm<sup>-1</sup>, 表明 CTP-SeNPs 中有多糖的存在。CTP-SeNPs 在 2 858 cm<sup>-1</sup> 附近的吸收峰与 SeNPs 在 2 854 cm<sup>-1</sup> 附近的吸收峰类似, 表明合成的 CTP-SeNPs 中有 SeNPs 的存在。与 CTP 相比, CTP-SeNPs 的-OH 吸收峰从 3 446 cm<sup>-1</sup> 移至 3 430 cm<sup>-1</sup>, C=O 吸收峰从 1 653 cm<sup>-1</sup> 移至 1 631 cm<sup>-1</sup>, C-O-C 吸收峰从 1 253 cm<sup>-1</sup> 移至 1 251 cm<sup>-1</sup>, 均发生小幅度蓝移, 推测 SeNPs 的

Se 原子与 CTP 的 O 原子相结合<sup>[14]</sup>。穆静静等<sup>[5]</sup>的研究中, 普洱茶多糖-纳米硒的谱图中无新吸收峰产生, 推测以天然多糖为模板制备多糖硒纳米颗粒时, 天然粗多糖的多糖部分和蛋白质部分的-OH、-C=O 等基团通过非共价键的形式与硒原子结合, 形成稳定的多糖-硒纳米颗粒复合物。前期<sup>[23,24]</sup>也有相似的研究报道。

### 2.3.4 SEM-EDS 分析

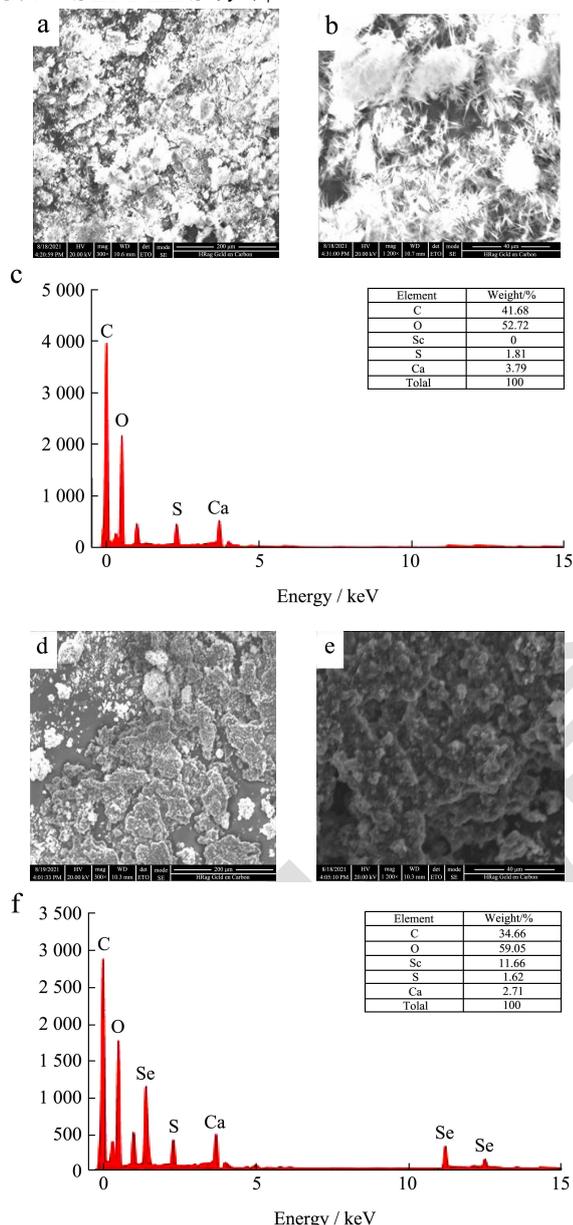


图5 CTP 和 CTP-SeNPs 的 SEM-EDS 图谱

Fig.5 SEM-EDS spectra of CTP and CTP-SeNPs

注: a 为 CTP×300; b 为 CTP×1200; c 为 CTP 的 EDS 图谱; d 为 CTP-SeNPs×300; e 为 CTP-SeNPs×1200; f 为 CTP-SeNPs 的 EDS 图谱。

扫描电镜观察 CTP/CTP-SeNPs 的表观形态。图 5a、5b 为藏黄连多糖在 300 倍与 1 200 倍下的扫描图, 结果显示藏黄连多糖表面为片状, 边缘呈针状;

图 5d、5e 为 CTP-SeNPs 在 300 倍和 1 200 倍下的扫描图, 结果显示 Se 纳米颗粒覆盖在 CTP 表面, 片状加厚, 边缘圆润。CTP 和 CTP-SeNPs 能谱结果, 如图 5c 和 5f 所示, 藏黄连多糖-硒纳米颗粒中 Se 在五种元素 (C、O、Se、S、Ca) 中的质量百分数为 11.66%。Xiao 等<sup>[25]</sup>报道冬虫夏草多糖-硒纳米颗粒中 Se 的质量百分数仅为 9.86%, Zhu 等<sup>[26]</sup>研究多糖-硒纳米颗粒中 Se 的质量百分数为 78.4%, 而 Chen 等<sup>[27]</sup>研究中的多糖-硒纳米颗粒中 Se 的质量百分数为高达 90.96%, 由此, 不同多糖-硒纳米颗粒中 Se 的质量百分数不等, 究其原因可能是多糖-硒纳米颗粒的制备方法以及多糖与硒纳米间的结合方式有关。本研究中藏黄连多糖-硒纳米颗粒的硒含量相对文献报道偏低, 这有助于在应用藏黄连多糖-硒纳米颗粒时对硒含量的控制, 避免过多的硒产生毒性作用而影响其生物活性。

### 2.3.5 XRD 分析

如图 6 所示, CTP-SeNPs 的 XRD 结果与标准 Se 比色卡 (PDF: 32-0992) 对比, 标准硒的  $2\theta$  在  $24^\circ$  和  $31^\circ$  处有两个强烈的反射峰, 表明硒的存在。CTP-SeNPs 显示出与标准 Se 有相似的反射峰, 在前人的研究<sup>[25,28]</sup>结果中, 多糖-硒纳米颗粒都表现出与 Se 比色卡相似的强烈反射峰, 表明 CTP-SeNPs 中有 Se 存在, CTP-SeNPs 被合成成功。

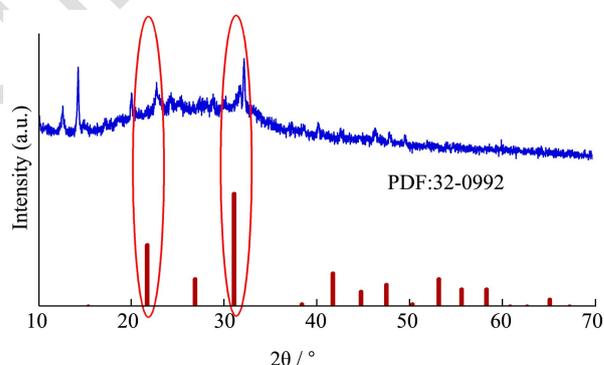


图6 CTP-SeNPs 的 XRD 分析

Fig.6 XRD analysis of CTP-SeNPs

## 2.4 CTP 和 CTP-SeNPs 体外抗氧化活性

### 2.4.1 ABTS<sup>+</sup> 自由基清除实验

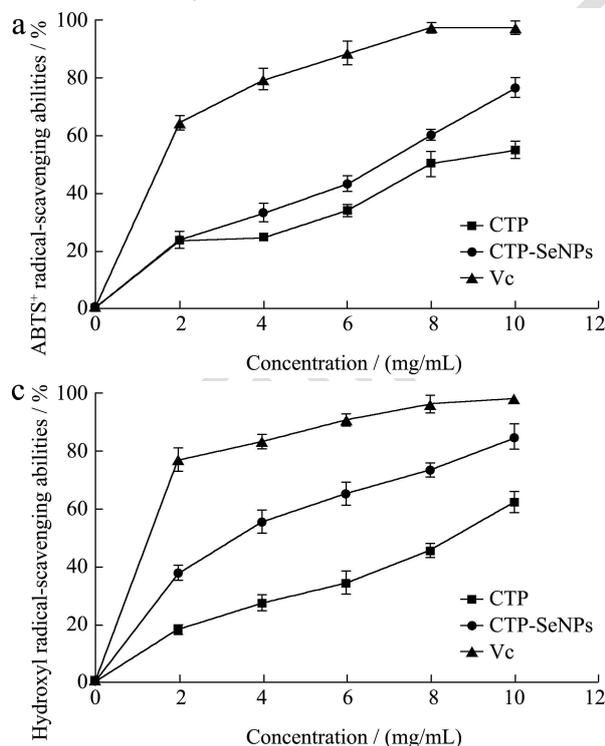
由图 7a 可知, 随 CTP、CTP-SeNPs 浓度的升高, 其对 ABTS<sup>+</sup> 自由基清除能力逐渐提高, 且在 10 mg/mL 时达到最高为 76.52%, 而 CTP 对 ABTS<sup>+</sup> 自由基清除能力与 CTP-SeNPs 相比较弱, 最高为 54.98%, 表明硒纳米颗粒可以增强 CTP 对 ABTS<sup>+</sup> 自由基清除能力。抗坏血酸 (Vc) 为天然抗氧化剂、食品添加剂, 常常作为抗氧化实验中的阳性对照; 如图 7a 结果所示, 在同浓度下 Vc 清除 ABTS<sup>+</sup> 自由基能力高于 CTP 和

CTP-SeNPs。在 Cai 等<sup>[29]</sup>的研究中, LRP-SeNPs (犀木多糖硒纳米颗粒子) 的 ABTS<sup>+</sup>自由基能力最大可达 80%以上; Zhai 等<sup>[30]</sup>的研究中, CS-SeNPs (壳聚糖硒纳米颗粒子) 的 ABTS<sup>+</sup>自由基能力最大可达 87.45%, 均表现出较高的 ABTS<sup>+</sup>自由基清除能力。

### 2.4.2 DPPH 自由基清除

由图 7b 可知, 当浓度为 2~10 mg/mL 时, CTP-SeNPs 清除 DPPH 自由基能力随着浓度的升高逐渐增加, 且在 10 mg/mL 时达到最高为 66.85%, 而 CTP 对 DPPH 自由基清除能力与 CTP-SeNPs 相比较弱, 最高达到 47.35%; 如图 7b 结果所示, 在同浓度下 Vc 清除 DPPH 自由基能力高于 CTP 和 CTP-SeNPs。在 Cai 等<sup>[29]</sup>的研究中, LRP-SeNPs (犀木多糖硒纳米颗粒子) 的 DPPH 自由基能力最大可达 50%以上; Zhai 等<sup>[30]</sup>的研究中, CS-SeNPs (壳聚糖硒纳米颗粒子) 的 DPPH 自由基能力最大可达 40%以上, 硒可中断自由基链式反应以增强抗氧化活性, 与 CTP-SeNPs 的结果基本一致, 表明硒纳米颗粒子可以增强 CTP 对 DPPH 自由清除能力。

### 2.4.3 羟自由基清除



由图 7c 可知, 各浓度 CTP-SeNPs 均有清除羟自由基能力, 随着浓度的升高, 其对羟自由基清除能力逐渐增加, 且在 10 mg/mL 时达到最高为 84.92%, 而 CTP 对羟自由基清除能力与 CTP-SeNPs 相比较弱, 最高可达 62.29%; 如图 7c 结果所示, 在同浓度下 Vc 清除羟自由基能力高于 CTP 和 CTP-SeNPs。同样地, Mao 等<sup>[31]</sup>研究表明硒纳米颗粒子可以增强灰树花菌多糖 (GP) 对羟自由基清除能力。

### 2.4.4 总还原能力

由图 7d 可知, 当浓度为 6.0~10.0 mg/mL 时, CTP-SeNPs 总还原能力达到 1 级以上, 随着浓度的升高, 总还原能力逐渐提高, 且在 10 mg/mL 时达到最高接近于 2 级, 而 CTP 总还原能力弱于 CTP-SeNPs, 最高仅能达到 1 级; Vc 同样表现出较高的抗氧化能力。Wu 等<sup>[32]</sup>的研究报告, 果胶包封的 SeNPs@Cur (包裹姜黄素的果胶硒纳米颗粒) 可使果胶的总还原能力增强, 出现这种现象可能是因为 SeNPs 可以有效减少空间位阻, 并改善姜黄素与二价铁络合物的反应, 从而在结果中显示出最高的还原能力, 该结果与 CTP-SeNPs 一致, 表明硒纳米颗粒子可以增强 CTP 的还原性。

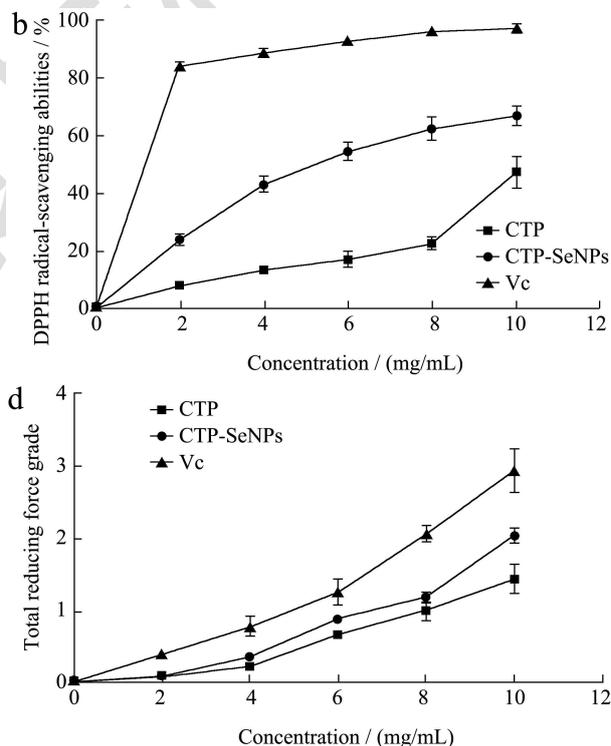


图7 CTP 和 CTP-SeNPs 体外抗氧化

Fig.7 CTP and CTP-SeNPs antioxidant activity *in vitro*

注: a 为 ABTS<sup>+</sup>清除实验结果; b 为 DPPH 清除实验结果; c 为羟自由基清除实验结果; d 为总还原能力测定结果。

## 2.5 藏黄连多糖和 CTP-SeNPs 体外试验

### 2.5.1 CTP 和 CTP-SeNPs 细胞毒性

如图 8 所示, CTP 在 500~1 000 μg/mL、CTP-SeNPs

在 250~500 μg/mL 浓度范围内均能显著促进 RAW264.7 的增殖; CTP-SeNPs 在 1 000 μg/mL 浓度时, 对 RAW264.7 细胞的增殖作用显著下降, 但并未表现出抑制作用, 其原因是其中的硒纳米颗粒浓度也随之增大,

表现出对多糖的促细胞增殖活性的抑制,但并未表现出毒性效果。Tamiru 等<sup>[33]</sup>研究报道,纳米形态的 SeNPs 不会影响硒的生物利用度,无机硒和 SeNPs 均能升高硒诱导的谷胱甘肽过氧化物酶 (GPx) 活性和 GPx1 转录水平,但无机硒 (亚硒酸钠) 的毒性可以通过其被还原为硒纳米颗粒 (SeNPs) 来减轻。结合本研究数据,我们推测纳米态硒在一定浓度范围内对正常细胞具有促增殖效果,但当其浓度超过一定限度时,其可抑制与之结合的多糖的促细胞增殖活性,此时多糖与 SeNPs 的已无协同作用。

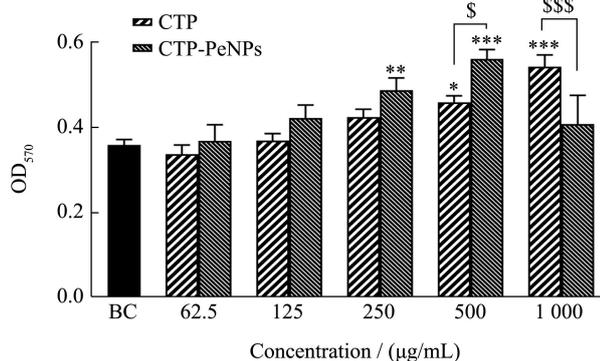


图 8 CTP 和 CTP-SeNPs 体外刺激 RAW264.7 细胞增殖

Fig.8 CTP and CTP-SeNPs stimulate RAW264.7 cell proliferation *in vitro*

注: BC 为空白对照组; \*、\*\*、\*\*\*分别为与空白对照组相比  $p < 0.05$ 、 $p < 0.01$ 、 $p < 0.001$ ; \$和\$\$\$分别为 CTP 与 CTP-SeNPs 相比  $p < 0.05$  和  $p < 0.001$ 。

### 2.5.2 CTP 和 CTP-SeNPs 抗炎活性

IL-6 是一种多效性细胞因子,可影响多种免疫和生理过程,如急性期蛋白生成、炎症、抗原特异性免疫反应<sup>[34]</sup>。在正常细胞中,IL-6 浓度非常低,在炎症条件下,IL-6 的浓度会急剧上升,而 LPS 刺激下的细胞表现出 IL-6 分泌升高,呈现炎症状态<sup>[35]</sup>。如图 9a,与 LPS 组相比,CTP 在浓度为 1 000 µg/mL 时,显著缓解 RAW264.7 细胞 IL-6 的释放,表现出抗炎效果;而 CTP-SeNPs 在 250~1 000 µg/mL 范围内,均具有显著缓解炎症效果。同时,在 250~1 000 µg/mL 浓度范围内,同一浓度时 CTP-SeNPs 抗炎效果显著高于 CTP,表明硒纳米颗粒可显著增强 CTP 的抗炎效果。如图 9b 所示,CTP 在 1 000 µg/mL 浓度时、CTP-SeNPs 在 250~1 000 µg/mL 范围内均能显著促进 LPS 刺激下的 RAW264.7 细胞的增殖。由上可知,当细胞受到外源物质如 LPS 刺激后,一定浓度的 CTP-SeNPs 可诱导并启动细胞增殖和活性的恢复,从而缓解 LPS 的刺激损伤,减少炎症因子 IL-6 的释放,表现出较好的抗炎活性。

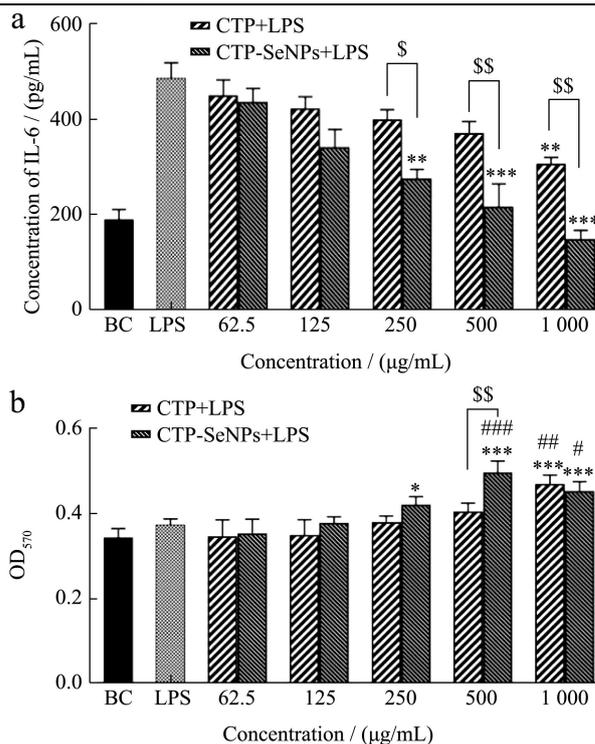


图 9 CTP 和 CTP-SeNPs 的抗炎活性

Fig.9 The anti-inflammatory activities of CTP and CTP-SeNPs

注: BC 为空白对照组; \*、\*\*、\*\*\*分别为与空白对照组相比  $p < 0.05$ 、 $p < 0.01$ 、 $p < 0.001$ ; #、##、###分别为与 LPS 组相比  $p < 0.05$ 、 $p < 0.01$ 、 $p < 0.001$ ; \$ 和 \$\$ 分别为 CTP+LPS 与 CTP-SeNPs+LPS 相比  $p < 0.05$  和  $p < 0.01$ 。

### 3 结论

硒是人体和动物体必需的微量元素,然而其在机体中的有效剂量和中毒剂量十分接近,因此较难把握有效剂量,单质硒以纳米态存在时毒性较无机硒和天然有机硒有所降低,而生物活性较无机硒和天然有机硒有所提高。由于纳米硒尺寸小,表面能大,较易聚集成大颗粒,它的促细胞增殖作用和抗炎活性随着粒径的增加而逐渐降低,因此需要在纳米硒表面加以修饰,以阻止纳米颗粒子的聚集。多糖具有高度复杂的分支结构和活泼的羟基基团,能吸附和包裹还原反应中形成的纳米硒,进而阻止纳米硒颗粒的团聚,多糖亦具有良好的生物活性,是制备纳米硒的良好调控剂。

本研究从藏黄连中提取藏黄连多糖,用于合成藏黄连多糖-硒纳米颗粒,通过粒径分析、紫外光谱、红外光谱、SEM-EDS、XRD 试验对其进行了表征,结果表明藏黄连多糖可成功合成藏黄连多糖-硒纳米颗粒;通过 DPPH 自由基清除、ABTS<sup>+</sup>自由基清除、羟自由

基清除能力、总还原力试验测定了 CTP 与 CTP-SeNPs 的体外抗氧化效果,结果表明,CTP-SeNPs 的体外抗氧化效果优于 CTP,可能是硒纳米颗粒增强了藏黄连多糖的抗氧化能力。体外细胞毒性试验和抗炎试验表明,与 CTP 相比,CTP-SeNPs 在 250~500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  范围内有显著的促细胞增殖作用,在 250~1 000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  范围内有显著的抗炎效果,硒纳米颗粒增强了藏黄连多糖的促细胞增殖和抗炎的效果,其抗炎效果的分子机制需待进一步研究。CTP-SeNPs 具有抗氧化、抗炎、低毒生物活性,可作为一种新型的富硒中药多糖保健品。

### 参考文献

- [1] 李丽辉,林亲录,陈海军.硒的生理学功能及富硒强化食品的研究进展[J].现代食品科技,2005,3:198-200
- [2] 任颖朗,季德胜,张云林,等.龙须菜多糖的提取及其免疫调节活性研究[J].现代食品科技,2017,33(10):45-51
- [3] LI Siqian, Shah Nagendra P. Characterization, antioxidative and bifidogenic effects of polysaccharides from *Pleurotus eryngii* after heat treatments [J]. Food Chemistry, 2016, 4(197): 240-249
- [4] HUANG Shiyu, YANG Wenjian. Preparation and activities of selenium polysaccharide from plant such as *Grifola frondosa* [J]. Carbohydrate Polymers, 2020, 8(242): 116409
- [5] 穆静静,叶锡光,陈忠正,等.茶多糖-纳米硒复合物的制备及表征[J].现代食品科技,2019,35(12):225-231
- [6] 周文君,池建伟,易阳,等.龙眼、枸杞和红枣多糖的理化性质及其协同益生活性[J].现代食品科技,2021,37(11):58-67
- [7] Gurinder Kaur, Mohammad Iqbal, Mandeep Singh Bakshi. Biomineralization of fine selenium crystalline rods and amorphous spheres [J]. The Journal of Physical Chemistry, 2009, 113(13): 13670-13676
- [8] WU Shanshan, SUN Kang, WANG Xin, et al. Protonation of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) results in massive aggregation and reduced oral bioavailability of EGCG-dispersed selenium nanoparticles [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(30): 7268-7275
- [9] ZENG Delong, ZHAO Jianfu, Luk Kar-Him. Potentiation of *in vivo* anticancer efficacy of selenium nanoparticles by mushroom polysaccharides surface decoration [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(10): 2865-2876
- [10] 杨杰,李迎秋.香菇多糖的提取、分离及应用研究综述[J].江苏调味副食品,2017,2:6-9
- [11] 田晓静,景冰玉,王彩霞.枸杞多糖提取方法的研究进展[J].食品安全质量检测学,2017,8(2):439-445
- [12] 郭慧静.蒲公英多糖的提取、分离纯化、鉴定及其生物活性的初步研究[D].石河子:石河子大学,2019
- [13] ZHANG Fusheng, RAN Chunxia, ZHENG Jiong, et al. Polysaccharides obtained from bamboo shoots (*Chimonobambusa quadrangularis*) processing by-products: New insight into ethanol precipitation and characterization [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 112: 951-960
- [14] WANG Lei, LI Chao, HUANG Qiang, et al. Biofunctionalization of selenium nanoparticles with a polysaccharide from *Rosa roxburghii* fruit and their protective effect against  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induced apoptosis in INS-1 cells [J]. Food & Function, 2019, 10(2): 539-553
- [15] GUO Xiao, SHANG Xiaofei, ZHOU Xuzheng, et al. Ultrasound-assisted extraction of polysaccharides from *Rhododendron aganniphum*: Antioxidant activity and rheological properties [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2017, 38: 246-255
- [16] CHEN Wanwen, LI Yanfang, YANG Shuo, et al. Synthesis and antioxidant properties of chitosan and carboxymethyl chitosan-stabilized selenium nanoparticles [J]. Carbohydrate Polymers, 2015, 132: 574-581
- [17] LI Hongyan, LIU Dandan, LI Shenghui, et al. Synthesis and cytotoxicity of selenium nanoparticles stabilized by alpha-D-glucan from *Castanea mollissima* Blume [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 129: 818-826
- [18] XU Xiaofei, YAN Huidan, ZHANG Xuewu, et al. Structure and immuno-stimulating activities of a new heteropolysaccharide from *Lentinula edodes* [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 11(46): 11560-11566
- [19] 李丹倩,梁嘉怡,钟晓晴,等.火龙果皮发酵物对脂多糖诱导 RAW264.7 细胞炎症的缓解作用[J].现代食品科技,2021,37(5):23-30,16
- [20] LIN Zonghong, WANG Chris. Evidence on the size-dependent absorption spectral evolution of selenium nanoparticles [J]. Materials Chemistry and Physics, 2005, 92: 591-594
- [21] AN Changhua, TANG Kaibin, LIU Xianming, et al. Large-scale synthesis of high quality trigonal selenium nanowires [J]. European Journal of Inorganic Chemistry, 2003, 5(17): 3250-3255
- [22] FENG Haibo, FAN Jing, BO Hongquan, et al. Selenylation modification can enhance immune-enhancing activity of *Chuanminshen violaceum* polysaccharide [J]. Carbohydrate Polymers, 2016, 153: 302-311
- [23] TANG Shuo, WANG Ting, JIANG Meiyun, et al. Construction

- of arabinogalactans/selenium nanoparticles composites for enhancement of the antitumor activity [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 128: 444-451
- [24] ZHA Shenghua, ZHAO Qingsheng, CHEN Jinjin, et al. Extraction, purification and antioxidant activities of the polysaccharides from maca (*Lepidium meyenii*) [J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 111: 584-587
- [25] XIAO Yidong, HUANG Qilin, ZHENG Zhaomin, et al. Construction of a *Cordyceps sinensis*-exopolysaccharide-conjugated selenium nanoparticles and enhancement of their antioxidant activities [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 99: 483-491
- [26] ZHU Chenghui, ZHANG Shuimei, SONG Chengwei, et al. Selenium nanoparticles decorated with *Ulva lactuca* polysaccharide potentially attenuate colitis by inhibiting NF- $\kappa$ B mediated hyper inflammation [J]. Journal of Nanobiotechnology, 2017, 15(1): 20
- [27] CHEN Tianfeng, WONG Yum-Shing, ZHENG Wenjie, et al. Selenium nanoparticles fabricated in *Undaria pinnatifida* polysaccharide solutions induce mitochondria-mediated apoptosis in A375 human melanoma cells [J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2008, 67(1): 26-31
- [28] LUO Li, ZHENG Sisi, HUANG Yifan, et al. Preparation and characterization of Chinese yam polysaccharide PLGA nanoparticles and their immunological activity [J]. International Journal of Pharmaceutics, 2016, 511(1): 140-150
- [29] CAI Wenfei, HU Ting, Amr M Bakry, et al. Effect of ultrasound on size, morphology, stability and antioxidant activity of selenium nanoparticles dispersed by a hyperbranched polysaccharide from *Lignosus rhinocerotis* [J]. Ultrasonice Sonochemistry, 2018, 42: 823-831
- [30] ZHAI Xiaona, ZHANG Chunyue, ZHAO Guanghua, et al. Antioxidant capacities of the selenium nanoparticles stabilized by chitosan [J]. Journal of Nanobiotechnology, 2017, 15(1): 4
- [31] MAO Guanghua, ZOU Ye, FENG Weiwei, et al. Extraction, preliminary characterization and antioxidant activity of Se-enriched maitake polysaccharide [J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 101: 213-219
- [32] WU Yan, LIU Hong, LI Zhihua, et al. Pectin-decorated selenium nanoparticles as a nanocarrier of curcumin to achieve enhanced physicochemical and biological properties [J]. IET Nanobiotechnology, 2019, 13(8): 880-886
- [33] Tamiru N Alkie, Jondavid de Jong, Emily Moore, et al. Phytoglycogen nanoparticle delivery system for inorganic selenium reduces cytotoxicity without impairing selenium bioavailability [J]. International Journal Nanomedicine, 2020, 15: 10469-10479
- [34] Toshio Tanaka, Masashi Narazaki, Tadimitsu Kishimoto. IL-6 in inflammation, immunity, and disease [J]. Cold Spring Harbor Perspectives Biology, 2014, 6(10): a016295
- [35] Stefan Rose-John. Interleukin-6 family cytokines [J]. Cold Spring Harbor Perspectives Biology, 2018, 10(2): a028415