

氧化铈团簇酶仿生合成及其对急性肝损伤治疗的研究

严弥迦^{1,2}, 张佳乐^{1,2}, 张秋红¹, 陈航榕^{1,2}

(1. 国科大杭州高等研究院, 化学与材料科学学院, 杭州 310024; 2. 中国科学院 上海硅酸盐研究所, 上海 200050)

摘要: 对乙酰氨基酚(Acetaminophen, APAP)过量服用是临床上急性肝损伤(Acute Liver Injury, ALI)的常见诱因, 主要病理特征为大量活性氧(Reactive Oxygen Species, ROS)累积和炎症细胞浸润。本研究通过仿生矿化工艺制备了一种超小尺寸(约 1.3 nm)氧化铈团簇酶(CeO₂ Clusterzymes, CeCs), 该材料具有高的氧空位含量(52.6%)和高 Ce³⁺/Ce⁴⁺比例(1.06), 对多种 ROS(包括自由基)具有优异的吸附和清除能力, 可用于肝细胞保护。动物体内实验进一步证实 CeCs 可以实现 APAP 诱导的 ALI 的高效干预治疗, 显著延长治疗窗口和逆转无菌炎症, 表现出潜在的临床应用价值。

关键词: 氧化铈; 团簇酶; 急性肝损伤; 抗氧化; 抗炎

中图分类号: R318 文献标志码: A 文章编号: 1000-324X(2026)02-0245-08

CeO₂ Clusterzymes: Biomimetic Synthesis and Treatment for Acute Liver Injury

YAN Mijia^{1,2}, ZHANG Jiale^{1,2}, ZHANG Qiuhong¹, CHEN Hangrong^{1,2}

(1. School of Chemistry and Materials Science, Hangzhou Institute for Advanced Study, University of Chinese Academy of Sciences, Hangzhou 310024, China; 2. Shanghai Institute of Ceramics, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200050, China)

Abstract: Acetaminophen (APAP) overdose is a common cause of acute liver injury (ALI) in clinical settings, characterized by accumulation of reactive oxygen species (ROS) and infiltration of inflammatory cells. In this study, CeO₂ clusterzymes (named as CeCs) with ultra-small size (around 1.3 nm) was synthesized by a biomimetic mineralization process. The obtained CeCs presented a high oxygen vacancy content (52.6%) and a high Ce³⁺/Ce⁴⁺ ratio (1.06), showing excellent adsorption and removal abilities to various ROS (including free radicals), which could be used for hepatocyte protection. *In vivo* animal experiments further confirmed that CeCs provided highly effective therapeutic intervention for APAP-induced ALI, extending the therapeutic window, and reversing sterile inflammation, underscoring their potential for clinical application.

Key words: cerium oxide; clusterzyme; acute liver injury; antioxidant; anti-inflammatory

ALI 引发的肝脏疾病在过去几十年中的发病率 的常见类型, 主要病理特征为大量 ROS 积累^[4-5], 和死亡率逐年攀升^[1-3]。APAP 过量使用是引发 ALI 治疗不及时或疗效差, 容易发展为急性肝衰竭等严

收稿日期: 2025-02-26; 收到修改稿日期: 2025-03-21; 网络出版日期: 2025-06-10

基金项目: 国科大杭州高等研究院科研基金(B03006C01600407, A05006C019014); 关键陶瓷材料全国重点实验室开放课题(SKL202412SIC)

Research Funds of Hangzhou Institute for Advanced Study, UCAS (B03006C01600407, A05006C019014); Opening Project of State Key Laboratory of Advanced Ceramics (SKL202412SIC)

作者简介: 严弥迦(1999-), 女, 硕士研究生. E-mail: yanmijia22@mails.ucas.ac.cn

YAN Mijia (1999-), female, Master candidate. E-mail: yanmijia22@mails.ucas.ac.cn

通信作者: 张秋红, 副研究员. E-mail: zhangqh@ucas.ac.cn

ZHANG Qiuhong, associate professor. E-mail: zhangqh@ucas.ac.cn

重后果。APAP 过量后产生的大量 ROS 引起广泛的肝细胞坏死^[4], 坏死细胞释放损伤相关分子模式 (Damage Associated Molecular Patterns, DAMPs), 激活肝脏巨噬细胞, 进而引发无菌炎症反应和炎症细胞浸润^[6-7]。N-乙酰半胱氨酸(N-acetylcysteine, NAC)是天然抗氧化剂谷胱甘肽(Glutathione, GSH)的生成前体, 通过增加细胞内 GSH 含量来应对氧化应激状况, 是目前唯一获得美国食品药品监督管理局批准用于治疗药物性肝损伤的解毒剂^[8]。然而临床试验表明, NAC 解毒仅对数小时内出现症状的患者有效, 对于迟发症状的患者疗效较差^[9-10], 发现时可能已发生大面积肝坏死, 失去了 NAC 治疗作用基础。因此, 亟需开发能够延长治疗窗口并增强疗效的新型药物, 以有效应对 ALI。

氧化铈(CeO_2)纳米颗粒(Nano Particles, NPs)因其类酶活性, 在生物医学研究中受到了广泛关注^[11-12]。在抗炎作用上, Im 等^[13]利用 CeO_2 NPs 作为铜离子的抗氧化剂载体, 构建的 CuCe NPs 通过调节 STAT 1、STAT 6 信号通路来促进巨噬细胞的 M2 型极化, 显著改善了缺血性血管疾病的炎症环境。在清除 ROS 方面, 与传统抗氧化剂相比, CeO_2 NPs 通过 Ce^{3+} 和 Ce^{4+} 离子之间的瞬时交换, 展现出持久的清除 ROS 活性^[14-15]。一般说来 Ce^{3+} 在 CeO_2 晶格中的含量与粒径密切相关^[16], 因为小尺寸效应容易形成更高比例的低配位表面原子和更弱的原子间键合。研究表明, 构建金属纳米团簇酶 (Metal Nanocluster Enzymes, MNCs), 使其处于原子与纳米粒子之间的过渡状态, 可赋予其特殊的理化性能, 例如增强的光致发光、离散的电子能级、超常的催化性能等^[17-18]。基于此, 本研究采用白蛋白介导的仿生矿化法, 合成了一种超小尺寸的 CeCs。同时研究发现, 仅仅通过调整反应过程中氯化铈的加入量即可调控氧化铈的粒径。为更好说明 CeCs 在 ALI 治疗中的作用, 选取粒径约 12 nm 的氧化铈纳米颗粒(CeO_2 Nano Particles, CeNPs)作为对照进行性能比较与生物学机制分析。本研究可为 ALI 的高效治疗提供一条可参考的新途径。

1 实验方法

1.1 药品及试剂

牛血清白蛋白(Bovine Serum Albumin, BSA)购自上海 BBI 生命科学有限公司; 七水氯化铈($\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)、氢氧化钠(NaOH)、2,2'-偶氮-双(3-乙基苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐(ABTS)、过硫酸钾

($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$)、过氧化氢(H_2O_2)溶液、4-乙酰氨基酚(APAP)和 N-乙酰基-L-半胱氨酸(NAC)均购自上海麦克林生化科技有限公司。

1.2 氧化铈团簇酶 CeCs 的合成

将 250 mg BSA 溶解于 8.75 mL 超纯水中, 缓慢加入 250 μL $\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 水溶液(100 mmol/L), 待搅拌均匀后再加入 505 μL NaOH 水溶液(1 mol/L), 在 37 $^\circ\text{C}$ 水浴条件下连续搅拌 2 h。混合物稳定后, 将所得溶液转移至透析袋(MW 14 kDa)中纯化 12 h, 最后以 6000 r/min 转速离心 10 min, 收集上清液, 获得稳定的 CeCs 水溶液。

1.3 氧化铈纳米颗粒 CeNPs 的合成

CeNPs 与 CeCs 的合成方法仅区别于 $\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 的加入量, 即通过改变 Ce^{3+} 加入量来调控纳米颗粒的尺寸大小。将 250 mg BSA 溶解于 8 mL 超纯水中, 缓慢加入 1000 μL $\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 水溶液(100 mmol/L), 待搅拌均匀后再加入 505 μL NaOH 水溶液(1 mol/L), 在 37 $^\circ\text{C}$ 水浴条件下连续搅拌 2 h。混合物稳定后, 将所得溶液转移至透析袋(MW 14 kDa)中纯化 12 h, 最后以 6000 r/min 转速离心 10 min, 收集上清液, 获得稳定的 CeNPs 水溶液。

1.4 材料表征

使用 120 kV 透射电子显微镜(Transmission Electron Microscope, TEM, Thermo Scientific Talos L120C G2)观察 CeCs 和 CeNPs 形貌。使用纳米粒度电位仪(Zetasizer Ultra, Malvern)测量 CeCs 和 CeNPs 的水合动力学粒径和 Zeta 电位。使用 X 射线光电子能谱仪(X-ray Photoelectron Spectroscopy, XPS, ThermoFisher Scientific ESCALAB Xi+)表征 CeCs 和 CeNPs 中 Ce 价态。使用流式细胞仪(BD LSR Fortessa)获得细胞流式结果。

1.5 羟基自由基($\cdot\text{OH}$)清除实验

将 CeCs、CeNPs(Ce 质量浓度为 0.5~8 $\mu\text{g/mL}$)分别与 1.7 mL ABTS 水溶液(400 $\mu\text{mol/L}$)、200 μL H_2O_2 水溶液(1 mmol/L)和 100 μL 辣根过氧化物酶水溶液(0.04 mg/mL)混合, 置于 37 $^\circ\text{C}$ 摇床中孵育 30 min, 然后用酶标仪测定 734 nm 处的吸光度。

1.6 过氧化氢(H_2O_2)清除实验

将 CeCs、CeNPs(Ce 质量浓度为 0.5~8 $\mu\text{g/mL}$)分别加入 H_2O_2 水溶液(100 $\mu\text{mol/L}$)中, 孵育 1 h 后将混合物转移到超滤管(MW 30 kDa)中, 通过离心分离材料和溶液。采用过氧化氢测试试剂盒(碧云天, S0038)测定取超滤管内溶液中剩余 H_2O_2 量。

1.7 ABTS 自由基(ABTS·)清除实验

将等体积的 7 mmol/L ABTS 溶液与 2.9 mmol/L 过硫酸钾溶液在室温下避光反应 12 h 生成 ABTS·, 然后用去离子水稀释 25 倍获得 ABTS·溶液。将不同浓度的 CeCs、CeNPs(Ce 质量浓度为 0.5~8 µg/mL) 分别与 ABTS·溶液混合, 避光放置 30 min, 然后用酶标仪测定 734 nm 处的吸光度。按照式(1)计算 ABTS·清除率(%):

$$\text{Free radical scavenging ratio} = \left(\frac{A_{\text{blank}} - A_{\text{test}}}{A_{\text{blank}}} \right) \times 100\% \quad (1)$$

其中, A_{blank} 为不加抗氧化剂时的吸光度, A_{test} 为与抗氧化剂反应后的吸光度。

1.8 细胞相容性测试

采用 CCK-8 比色法考察 CeCs 的细胞相容性。将 BNL CL2 细胞(小鼠胚胎肝细胞)以 1×10^4 细胞/孔的密度接种在 96 孔板中培养过夜, 加入不同浓度(Ce 质量浓度为 0~2 µg/mL)的 CeCs 培养 12 h, 加入 CCK-8 处理后用酶标仪测定溶液在 450 nm 处的吸光度。

1.9 对 APAP 诱导损伤细胞的保护作用测试

采用 CCK-8 比色法考察 CeCs 对 APAP 诱导损伤细胞的保护能力。将 BNL CL2 细胞以 1×10^4 细胞/孔的密度接种在 96 孔板中培养过夜, 然后加入 APAP 水溶液(6 mmol/L)孵育 12 h。12 h 后, 去除旧培养基, 更换新的基本培养基并加入不同浓度的 CeCs(Ce 质量浓度为 0~2 µg/mL)培养 6 h, 加入 CCK-8 处理后用酶标仪测定溶液在 450 nm 处的吸光度。

1.10 急性肝损伤治疗研究

动物实验所采用的小鼠由杭州医学院提供。所有动物实验研究均按照《实验动物护理与使用指南》(中国科学技术部, 2013, OACUC-2013-012)进行, 并经杭州师范大学动物伦理委员会批准(No.HSD-20230919-02)。将 32 只 BALB/c 鼠(8 周龄, 体重 20 g, 雌鼠)和 32 只 C57BL/6 鼠(8 周龄, 体重 20 g, 雌鼠)随机分组。提前禁食不禁水 15 h 后, 通过腹腔注射 300 µL APAP 水溶液(300 mg/kg)建立 ALI 模型。然后分别在 2 和 6 h 后通过尾静脉注射治疗药物, 包括 NAC、CeNPs、CeCs。建立疾病模型 24 h 后, 采血分析肝脏生化指标谷氨酸氨基转移酶(Glutamate Aminotransferase, ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(Aspartate Aminotransferase, AST)水平。

1.11 流式细胞测定

用流式细胞术检测肝脏内中性粒细胞和不同表型的巨噬细胞。将小鼠肝脏切成小块后用肝组织解离试剂处理 45 min, 所得细胞通过 70 µm 过滤网, 用磷酸盐缓冲溶液(PBS)洗涤, 制得单细胞悬液。将所得细胞与红细胞裂解缓冲液孵育以裂解红细胞。然后用抗小鼠 CD 16/32 抗体预孵育细胞 5 min 后获得 Fc 受体封闭的单细胞悬液。随后用抗 CD45 (APC-CY7)和 Ly-6G(BV650)染色中性粒细胞, 用抗 CD11b(FITC)、抗 F4/80(BV421)、抗 CD86(APC)和抗 CD206(PE)染色巨噬细胞后, 采用流式细胞仪检测中性粒细胞、M1 型巨噬细胞和 M2 型巨噬细胞的数量, 并用 FlowJo 软件分析。

1.12 统计学分析

所得数据均以平均值±标准差的形式展示。统计学分析判定方法为单因素方差法。*为 $p < 0.05$, **为 $p < 0.01$, ***为 $p < 0.001$, ****为 $p < 0.0001$, 均表明差异有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 氧化铈团簇酶的制备与理化性能表征

本研究采用 BSA 介导的仿生矿化法一步合成了 CeCs, 利用 BSA 丰富的官能团与 Ce^{3+} 离子结合, 形成稳定的纳米团簇^[19-20], 同时, 使用天然的 BSA 大分子修饰能够避免引入难以去除的有毒溶剂, 也无需复杂的表面修饰即能得到生物相容性良好的纳米团簇酶。TEM 照片(图 1(a))显示, 黑色颗粒为合成的 CeCs, 尺寸均一且分布均匀。粒径测试结果进一步证实成功合成了团簇酶(图 1(b)), CeCs 平均粒径为 1.3 nm, 而 CeNPs 平均粒径为 11.2 nm。Zeta 电位结果(图 1(c))表明, CeCs 的表面电位为 (-29.01 ± 5.42) mV, CeNPs 的表面电位为 (-34.73 ± 4.72) mV, 这一结果证实 BSA 大分子的天然修饰赋予纳米材料良好的电负性, 这有利于延长纳米颗粒的血液循环半衰期^[21]。

如图 1(d, g)所示, CeCs 和 CeNPs 的 XPS 全谱表明主要组成元素中存在 Ce3d 峰。Ce3d 的高分辨 XPS 图谱经拟合后显示(图 1(e, h)), 880、885、900、903 eV 处的峰归属于 Ce^{3+} , 882、887、898、901、906、916 eV 处的峰对应于 Ce^{4+} , 并且 $\text{Ce}^{3+}/\text{Ce}^{4+}$ 比例由 CeNPs 中的 0.54 显著提升至 CeCs 中的 1.06, Ce^{3+} 含量较高有利于提升材料的催化活性, 提高对 ROS 的清除能力^[15]。进一步对比 CeCs 和 CeNPs

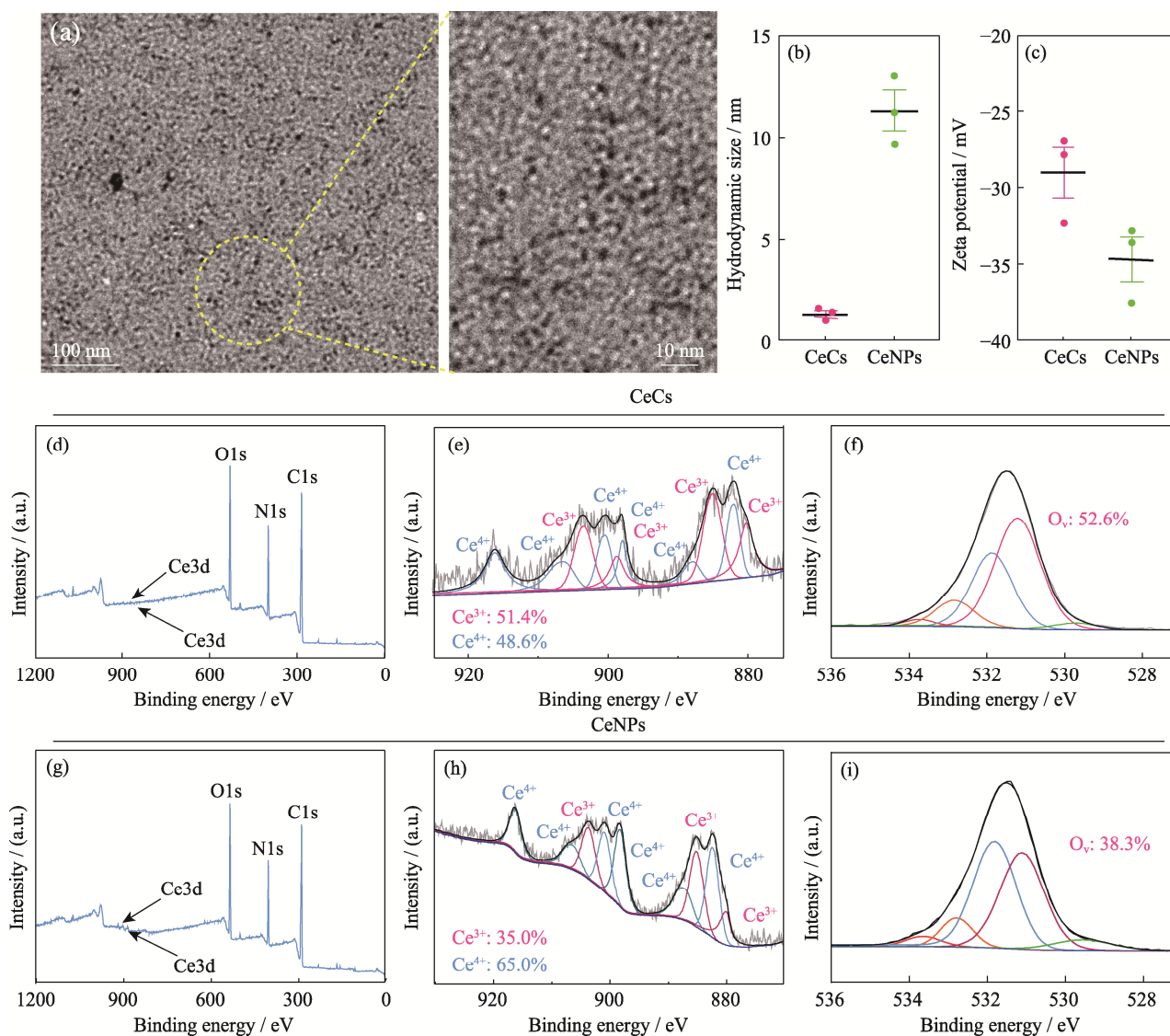


图 1 CeCs 和 CeNPs 的理化性能表征

Fig. 1 Physical and chemical properties of CeCs and CeNPs

(a) TEM images of CeCs; (b) Hydrodynamic size of CeCs and CeNPs; (c) Zeta potential of CeCs and CeNPs; (d) XPS total spectrum of CeCs; (e, f) High resolution XPS spectra on Ce3d (e) and O1s (f) of CeCs; (g) XPS total spectrum of CeNPs; (h, i) High resolution XPS spectra on Ce3d (h) and O1s (i) of CeNPs

的氧空位含量(图 1(f, i)), 可以发现, CeCs(52.6%)较 CeNPs(38.3%)具有更高的氧空位比例, 这与 CeCs 中具有更高比例的 Ce³⁺有关, 即 Ce⁴⁺被还原为 Ce³⁺过程中伴随形成了氧空位, 而更多氧空位有利于吸附 ROS 物种^[22]。

2.2 ROS 清除性能评价

Ce 的类酶活性与其表面 Ce³⁺/Ce⁴⁺比例及氧缺陷含量密切相关, 因此在溶液层面对比研究了 CeCs 和 CeNPs 作为清除剂对·OH、H₂O₂ 和 ABTS·的清除性能。如图 2(a)所示, 当 Ce 质量浓度为 8 μg/mL 时, CeCs 对·OH 的清除率高达 92%, 是 CeNPs(65%清除率)的 1.4 倍。并且在 0.5 μg/mL 的极低剂量下, CeCs 的清除率达到 31%, 与 CeNPs 在 4 μg/mL Ce 质量浓度

下的清除能力相当。图 2(b)显示, Ce 质量浓度为 8 μg/mL 时, CeCs 对 H₂O₂ 的清除率达到 87%, 是 CeNPs(51%清除率)的 1.7 倍。为进一步评估两种纳米材料在总抗氧化能力上的差异, 采用 ABTS·作为反应底物。ABTS 与过硫酸钾反应后所产生的 ABTS·溶液在 734 nm 处有明显的特征吸收峰, 当其与抗氧化剂混合反应后, 特征吸收峰值迅速下降。如图 2(c)所示, 当 Ce 质量浓度为 8 μg/mL 时, CeCs 对 ABTS·的清除率为 92%, 是 CeNPs(68%清除率)的 1.4 倍。CeCs 表现出比 CeNPs 更高的酶催化活性, 这是由于超小尺寸的 CeCs 暴露了更多催化位点, 提高了 Ce³⁺比例和氧空位含量。缺陷增加为清除 ROS 提供了更多可用的局部能级, 并且氧空位作为

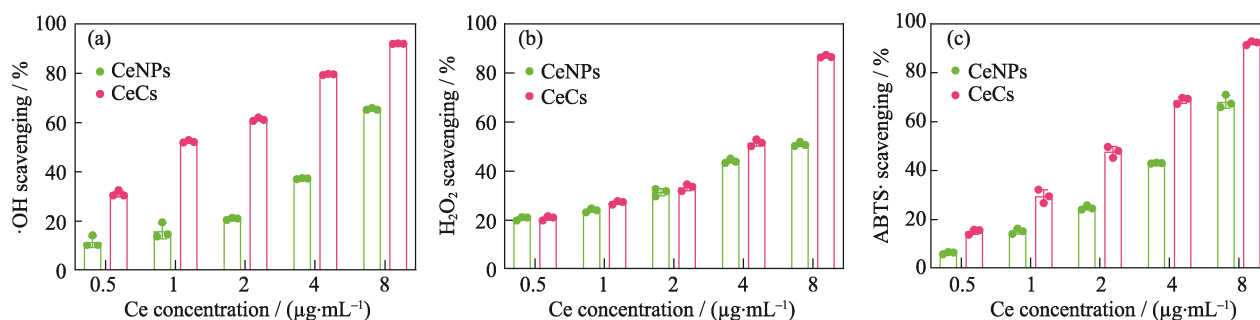


图2 CeCs 和 CeNPs 对多种 ROS 的清除能力

Fig. 2 Scavenging capability of CeCs and CeNPs to various ROS

(a) ·OH; (b) H₂O₂; (c) ABTS·⁻. Corlorful figures are available on website

结合位点稳定结合 ROS, 通过 Ce³⁺被氧化为 Ce⁴⁺的过程, 将 ROS 转化为分子氧而清除毒性。

2.3 细胞内抗氧化活性与肝细胞保护

细胞实验选用 BNL CL.2 细胞。通过 CCK-8 比色法考察 CeCs 的细胞毒性。如图 3(a)所示, Ce 质量浓度在 2 μg/mL 以内, 材料对细胞没有产生明显毒性。进一步验证 CeCs 对肝细胞的保护作用, 研究表明, APAP 经由细胞色素 P450 代谢后, 会转化为有毒的中间代谢物 *N*-乙酰苯亚胺基醌(*N*-acetyl-p-benzo-quinone Imine, NAPQI), 在正常生理状况下, NAPQI 会与肝脏内的 GSH 共价结合, 形成无毒物质, 经由肾脏排出^[23]。当 APAP 过量时, 大量产生的有毒 NAPQI 会很快耗竭 GSH, 并破坏细胞膜, 影响线粒体的正常生理功能, 产生大量 ROS, 破坏细胞内氧化还原平衡, 导致肝细胞损伤甚至凋亡^[6, 24]。

本研究采用 CCK-8 比色法分析 CeCs 对 APAP 诱导损伤肝细胞的保护作用。如图 3(b)所示, 肝细胞与 6 mmol/L 的 APAP 孵育 12 h 后, 细胞活性降低了 50%, 表明发生了严重的肝细胞凋亡。加入 CeCs 治疗 6 h 后, 肝细胞活性随 CeCs 剂量的增加逐渐提高, 当 Ce 质量浓度为 2 μg/mL 时, 肝细胞活性恢复至 98%, 显示出优异的肝细胞治疗效果。值得注意的是, 在 0.03 μg/mL 的极低剂量下, CeCs 对损伤肝细胞已经展现出明显的治疗效果。2',7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯(DCFH-DA)是一种细胞膜渗透性的氧化应激指示剂, 利用 DCFH-DA 探针检测肝细胞内 ROS 生成量发现(图 3(c)), CeCs 本身对肝细胞无毒性。APAP 诱导损伤后, 细胞内出现明显的绿色荧光, 表明有大量的 ROS 生成; 而经 CeCs 治疗后, 绿色荧光显著减少, 证明 CeCs 具有良好的细胞内 ROS

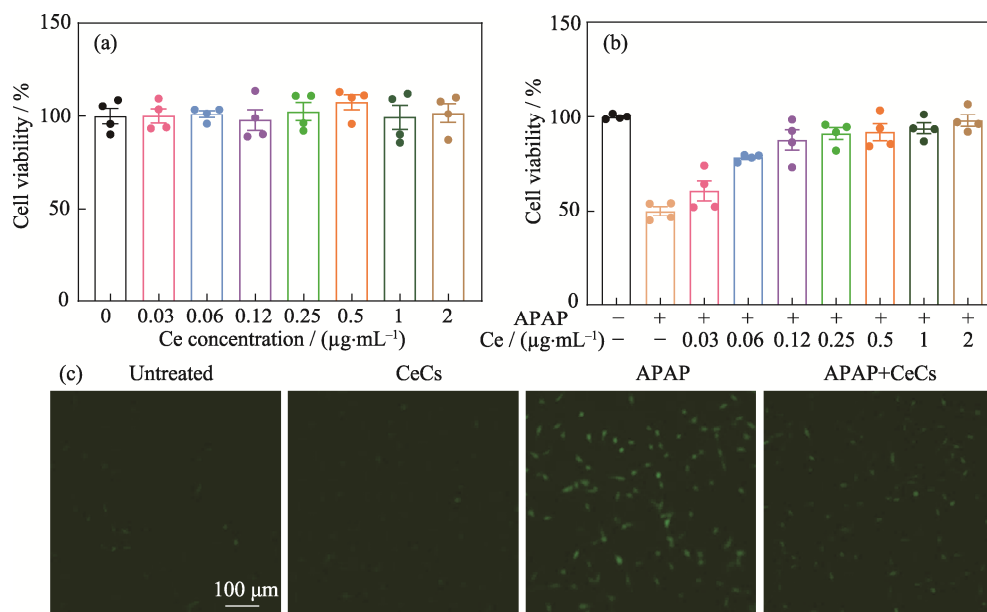


图3 细胞内抗氧化活性与肝细胞保护

Fig. 3 Intracellular antioxidant activity and hepatocytes protection

(a) Cytotoxicity profiles of different concentrations of CeCs on BNL CL.2 cells; (b) Protective effect of different concentrations of CeCs on APAP-treated cells; (c) Fluorescence images of generation of ROS by APAP-treated cells incubated with different samples APAP: Acetaminophen

清除能力。

2.4 APAP 诱导急性肝损伤小鼠治疗效果评价

通过体外实验证实 CeCs 比 CeNPs 具有更强的抗氧化作用后,进一步评估了 CeCs 的体内治疗效果。首先利用溶血实验验证了 CeCs 和 CeNPs 的血液相容性。如图 4 所示,两种纳米材料 Ce 质量浓度在 $45\text{ }\mu\text{g/mL}$ 以内的溶血率均低于 0.3%,表明 CeCs 和 CeNPs 都具有良好的血液相容性。对小鼠随机分组后禁食 15 h(允许自由饮水),随后通过腹腔注射 300 mg/kg 的 APAP 建立 ALI 模型^[25]。APAP 诱导的肝损伤表现出特有且类似于缺血的均匀肝损伤模式:当 APAP 摄入量超过 GSH 的解毒能力及其营养状态所决定的阈值时,会在短时间内迅速出现肝损伤状况^[26]。研究表明,APAP 处理 4 h 后的小鼠显示出最严重的肝脏细胞坏死^[27]。在该时间窗口之后,肝细胞逐渐出现凋亡,而延迟使用 NAC 无法有效维持原代肝细胞的正常增殖功能,解毒作用显著减弱,治疗窗口较狭窄^[10, 28]。因此,为评估 CeCs 的治疗效果,本研究选择了 2 和 6 h 两个治疗时间点,分别考察 CeCs 在疾病早期和中后期的疗效,并以 NAC 和 CeNPs 作为治疗对照。建模 24 h 后,采集小鼠血清并检测两项肝功能临床指标 ALT 和 AST。图 5(a, b)是对 BALB/c 小鼠的治疗效果评价,其中 NAC 使用剂量为 150 mg/kg , CeNPs 和 CeCs 使用剂量均为 0.03 mg/kg 。APAP 建模后,小鼠的 ALT 和 AST 水平迅速升高,表明发生严重的肝损伤。在 2 h 治疗组中, CeCs 使 ALT 水平下降至 APAP 组的 11.8%, NAC

和 CeNPs 组的 19.6%和 43.5%;AST 水平下降至 APAP 组的 10.5%, NAC 和 CeNPs 的 30.3%和 66.7%。在 6 h 治疗组中, NAC 的治疗效果显著减弱,小鼠仍处于严重的肝损伤状态,而 CeCs 的治疗效果显著并优于 CeNPs 组。在注射相同 Ce 剂量情况下, CeCs 疗效显著优于尺寸更大的 CeNPs,证明 CeCs 能够在极低的剂量下实现高效的治疗,并且超小尺寸的 CeCs 表现出更稳定的血药浓度和减少的脏器积累,避免金属离子长期过量释放导致的累积毒性^[29]。不同品系小鼠具有不同的遗传背景和免疫反应特性,对药物的耐受和反应存在差异^[27, 30],为证实 CeCs 治疗效果的普适性,进一步验证在不同品系即 C57BL/6 小鼠中的治疗效果(图 4(c, d))。在 2 h 治疗组中, CeCs 与 NAC 疗效相近, CeCs 的 ALT 水平较 APAP 组下降至 22.2%, AST 水平下降至 28.6%,而 CeNPs 的治疗效果不显著。在 6 h 治疗组中, NAC 因超过治疗时间窗口而无明显疗效,但 CeCs 使 ALT 和 AST 水平较 APAP 组下降至 33.3%,表现出优异的治疗效果。上述结果表明, CeCs 不仅能高效治疗 APAP 诱导的 ALI,在不同品系小鼠中都具有稳定的治疗效果,并且显著延长治疗窗口,在疾病发展中后期仍能发挥有效治疗作用。

2.5 APAP 诱导急性肝损伤小鼠抗炎效果评价

巨噬细胞是肝脏内最主要的免疫细胞,在维持肝脏稳态中起到关键作用^[31-32]。肝损伤发生后,坏死细胞释放 DAMPs 快速激活肝脏巨噬细胞,产生各种炎症介质招募免疫细胞至损伤部位。因此,调

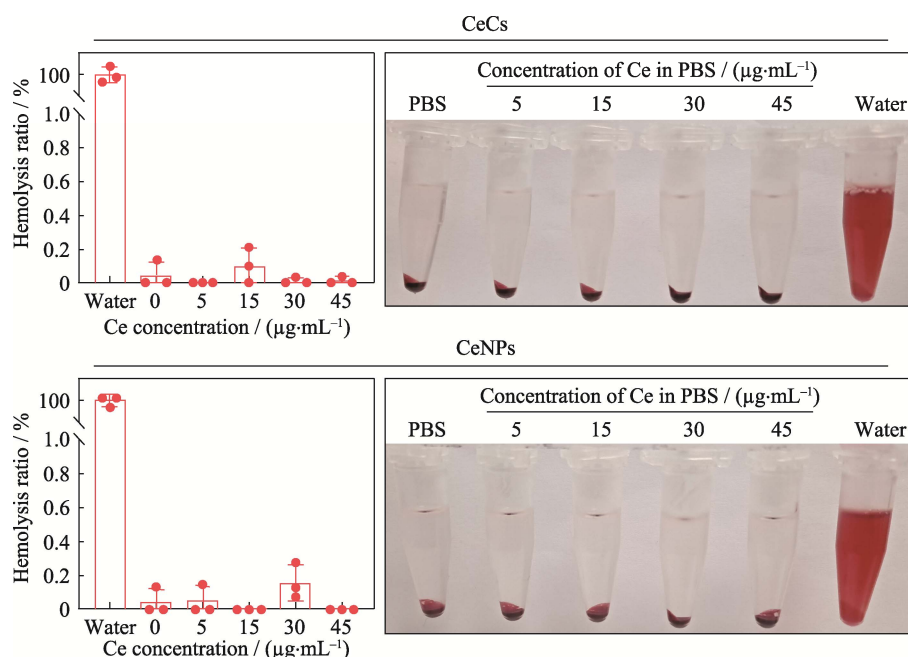


图 4 不同浓度 CeCs 和 CeNPs 的溶血实验评价

Fig. 4 Evaluation of hemolysis performance of CeCs and CeNPs at different concentrations

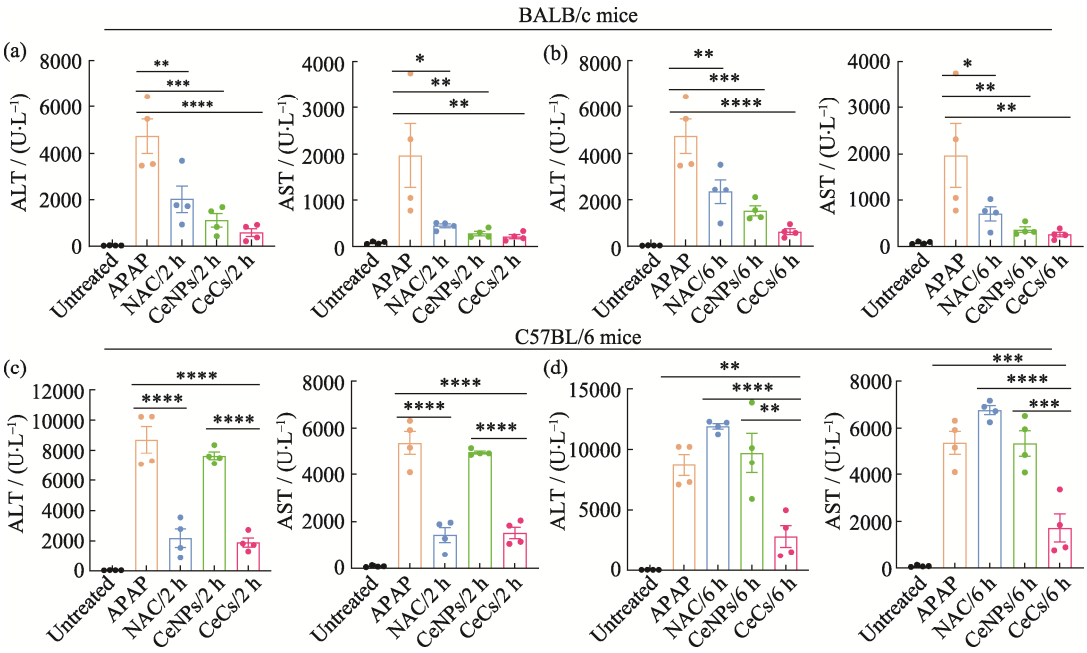


图 5 APAP 诱导急性肝损伤小鼠的治疗效果评价

Fig. 5 Evaluation of therapeutic effect of APAP-induced acute liver injury mice

(a, b) Serum levels of ALT and AST in APAP-induced acute liver injury BALB/c mice in 2 (a) and 6 h (b) treatment groups; (c, d) Serum levels of ALT and AST in APAP-induced acute liver injury C57BL/6 mice in 2 (c) and 6 h (d) treatment groups
APAP: Acetaminophen; ALT: Glutamate aminotransferase; AST: Aspartate aminotransferase

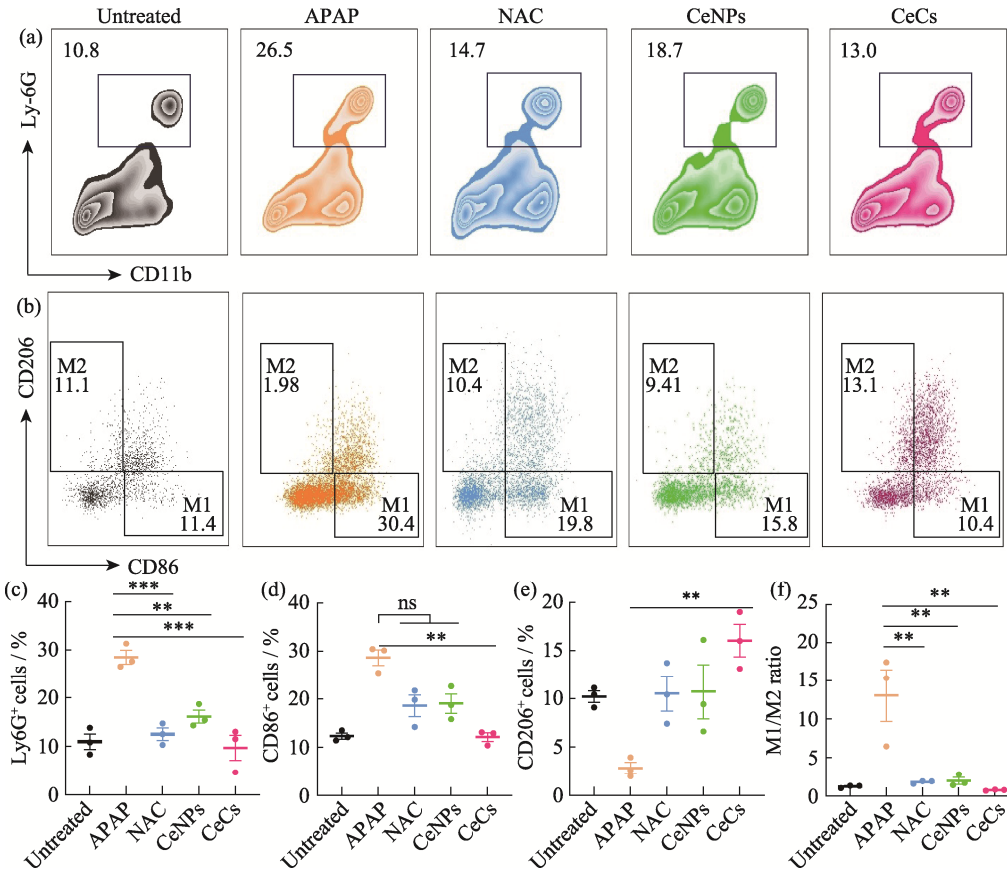


图 6 APAP 诱导急性肝损伤小鼠的抗炎效果评价

Fig. 6 Evaluation of anti-inflammatory effect of APAP-induced ALI mice

(a, b) Flow cytometry to determine expression of Ly-6G (neutrophil markers), CD86 (M1 phenotypic macrophage markers) and CD206 (M2 phenotypic macrophage markers) on liver tissues after different treatment; (c) Quantification of neutrophils; (d) M1 macrophages; (e) M2 macrophages; (f) M1/M2 ratio
APAP: Acetaminophen; ALI: Acute liver injury

控巨噬细胞表型有助于肝脏修复^[33]。本研究通过流式细胞术分析 2 h 治疗组肝脏中中性粒细胞(Ly-6G 标记)和巨噬细胞(CD86 标记 M1 型, CD206 标记 M2 型)的变化结果。如图 6(a, c)所示, APAP 组肝脏的中性粒细胞数量增加了 2.5 倍, 而 NAC、CeNPs 和 CeCs 均能不同程度地缓解这一现象, 其中 CeCs 效果最为显著。图 6(b, d, e, f)显示了巨噬细胞的统计结果, APAP 诱导 ALI 后, 促炎 M1 型巨噬细胞比例明显增加, 发生严重的炎症反应。治疗组中 CeCs 显示出最佳效果, 其能够恢复 M1 型巨噬细胞比例至正常水平, 并提高抗炎 M2 型巨噬细胞比例, 从而促进损伤肝脏的修复。上述结果表明, CeCs 在 ALI 中具有高效的抗氧化应激和抗炎作用, 能够恢复肝脏正常生理功能。

3 结论

本研究通过蛋白仿生矿化法制备了一种超小尺寸的 CeCs, 通过减小颗粒尺寸显著提高了 $\text{Ce}^{3+}/\text{Ce}^{4+}$ 比例, 增加了氧空位含量, 从而增强了其对 ROS 的吸附和清除能力。在 APAP 诱导的肝细胞中, CeCs 能够高效清除损伤过程中产生的 ROS, 恢复细胞的正常生理功能并提高存活率。体内实验进一步证实, CeCs 具有优异的肝损伤治疗和炎症调控能力, 能够协同恢复肝脏稳态。综上, 本研究合成的 CeCs 为新型纳米酶在氧化应激和炎症相关疾病中的应用提供了有益参考。

参考文献:

- [1] STRAVITZ R T, LEE W M. Acute liver failure. *The Lancet*, 2019, **394**(10201): 869.
- [2] FERNÁNDEZ J, BASSEGODA O, TOAPANTA D, *et al.* Acute liver failure: a practical update. *JHEP Reports*, 2024, **6**(9): 101131.
- [3] BERNAL W, WENDON J. Acute liver failure. *New England Journal of Medicine*, 2013, **369**(26): 2525.
- [4] DU K, RAMACHANDRAN A, JAESCHKE H. Oxidative stress during acetaminophen hepatotoxicity: sources, pathophysiological role and therapeutic potential. *Redox Biology*, 2016, **10**: 148.
- [5] WANG F, YUAN H, SHEN J, *et al.* Nanozymes with broad-spectrum scavenging of reactive oxygen species (ROS) alleviate inflammation in acute liver injury. *ACS Materials Letters*, 2024, **6**(4): 1304.
- [6] AHMED O, ROBINSON M W, O'FARRELLY C. Inflammatory processes in the liver: divergent roles in homeostasis and pathology. *Cellular & Molecular Immunology*, 2021, **18**(6): 1375.
- [7] LIU J, HAN X, ZHANG T, *et al.* Reactive oxygen species (ROS) scavenging biomaterials for anti-inflammatory diseases: from mechanism to therapy. *Journal of Hematology & Oncology*, 2023, **16**(1): 100124.
- [8] TENÓRIO M C D S, GRACILIANO N G, MOURA F A, *et al.* N-acetylcysteine (NAC): impacts on human health. *Antioxidants*, 2021, **10**(6): 967.
- [9] LI F, QIU Y, XIA F, *et al.* Dual detoxification and inflammatory regulation by ceria nanozymes for drug-induced liver injury therapy. *Nano Today*, 2020, **35**: 100925.
- [10] YANG R, MIKI K, HE X, *et al.* Prolonged treatment with

- N-acetylcysteine delays liver recovery from acetaminophen hepatotoxicity. *Critical Care*, 2009, **13**(2): R55.
- [11] MUHAMMAD F, HUANG F, CHENG Y, *et al.* Nanoceria as an electron reservoir: spontaneous deposition of metal nanoparticles on oxides and their anti-inflammatory activities. *ACS Nano*, 2022, **16**(12): 20567.
- [12] KOO S, SOHN H S, KIM T H, *et al.* Ceria-vesicle nanohybrid therapeutic for modulation of innate and adaptive immunity in a collagen-induced arthritis model. *Nature Nanotechnology*, 2023, **18**(12): 1502.
- [13] IM G B, KIM Y G, YOO T Y, *et al.* Ceria nanoparticles as copper chaperones that activate SOD1 for synergistic antioxidant therapy to treat ischemic vascular diseases. *Advanced Materials*, 2023, **35**(16): 2208989.
- [14] WANG L, ZHU B, DENG Y, *et al.* Biocatalytic and antioxidant nanostructures for ROS scavenging and biotherapeutics. *Advanced Functional Materials*, 2021, **31**(31): 2101804.
- [15] KIM Y G, LEE Y, LEE N, *et al.* Ceria-based therapeutic antioxidants for biomedical applications. *Advanced Materials*, 2023, **36**(10): 2210819.
- [16] YUN L X, WU H, SHEN Z G, *et al.* Ultrasmall CeO_2 nanoparticles with rich oxygen defects as novel catalysts for efficient glycolysis of polyethylene terephthalate. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2022, **10**(16): 5278.
- [17] 梁云燕, 孙芳营, 尚利. 基于金纳米团簇类酶活性的比色传感研究. *分析化学*, 2021, **49**(6): 931.
- [18] SUN S, LIU H, XIN Q, *et al.* Atomic engineering of clusterzyme for relieving acute neuroinflammation through lattice expansion. *Nano Letters*, 2021, **21**(6): 2562.
- [19] FU S, CHEN H, YANG W, *et al.* ROS-targeted depression therapy via BSA-incubated ceria nanoclusters. *Nano Letters*, 2022, **22**(11): 4519.
- [20] WANG Y, WU Y, LIU Y, *et al.* BSA-mediated synthesis of bismuth sulfide nanotheranostic agents for tumor multimodal imaging and thermoradiotherapy. *Advanced Functional Materials*, 2016, **26**(29): 5335.
- [21] BLANCO E, SHEN H, FERRARI M. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. *Nature Biotechnology*, 2015, **33**(9): 941.
- [22] SUN Y, LU D, ZHANG H, *et al.* Titanium oxide electrocatalytic membrane filtration: "two faces" of oxygen vacancies in generation and transformation of reactive oxygen species. *Environmental Science & Technology*, 2023, **57**(35): 13226.
- [23] KESAVARDHANA S, MALIREDDI R K S, KANNEGANTI T. Caspases in cell death, inflammation, and pyroptosis. *Annual Review of Immunology*, 2020, **38**(1): 567.
- [24] BHUSHAN B, APTE U. Liver regeneration after acetaminophen hepatotoxicity. *The American Journal of Pathology*, 2019, **189**(4): 719.
- [25] ZHAO C, LI Z, CHEN J, *et al.* Site-specific biomimicry of antioxidative melanin formation and its application for acute liver injury therapy and imaging. *Advanced Materials*, 2021, **33**(34): 2102391.
- [26] ROTUNDO L, PYRSOPOULOS N. Liver injury induced by paracetamol and challenges associated with intentional and unintentional use. *World Journal of Hepatology*, 2020, **12**(4): 125.
- [27] 郑惠星. 对乙酰氨基酚诱导小鼠急性肝损伤模型机理研究. 延吉: 延边大学硕士学位论文, 2015.
- [28] ETEMADI Y, AKAKPO J Y, RAMACHANDRAN A, *et al.* Nrf2 as a therapeutic target in acetaminophen hepatotoxicity: a case study with sulforaphane. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 2023, **37**(12): e23505.
- [29] KANG D, KIM C K, JEONG H, *et al.* Biocompatible custom ceria nanoparticles against reactive oxygen species resolve acute inflammatory reaction after intracerebral hemorrhage. *Nano Research*, 2017, **10**(8): 2743.
- [30] 于慧杰, 盛国光. 三种品系小鼠对伴刀豆球蛋白 A 所致急性肝损伤的耐受性比较研究. *实用肝脏病杂志*, 2014, **17**(2): 168.
- [31] SHAN X, LI J, LIU J, *et al.* Targeting ferroptosis by poly(acrylic) acid coated Mn_3O_4 nanoparticles alleviates acute liver injury. *Nature Communications*, 2023, **14**: 7598.
- [32] XIA F, HU X, ZHANG B, *et al.* Ultrasmall ruthenium nanoparticles with boosted antioxidant activity upregulate regulatory T cells for highly efficient liver injury therapy. *Small*, 2022, **18**(29): 2201558.
- [33] MU J, LI C, SHI Y, *et al.* Protective effect of platinum nano-antioxidant and nitric oxide against hepatic ischemia-reperfusion injury. *Nature Communications*, 2022, **13**: 2513.