

# 无金属黑色素纳米酶用于肝纤维化治疗

李婷婷<sup>1,2</sup>, 岳彩凤<sup>1</sup>, 霍媛青<sup>1</sup>, 纪慧芳<sup>1</sup>, 张瑞平<sup>3</sup>

(1. 山西医科大学药学院, 太原 030001;

2. 山西医科大学第三医院, 山西白求恩医院, 山西医学科学院, 同济山西医院, 太原 030032;

3. 山西省人民医院放射科, 山西医科大学第五医院, 太原 030012)

**摘要** 以5,6-二羟基吲哚为单体,通过自由基聚合反应合成了无金属黑色素纳米酶(MeNPs),并探究了其治疗肝纤维化的作用.结果表明,MeNPs纳米酶为单分散球形结构,粒径为(91.3±2.6) nm,具有类超氧化物歧化酶(SOD)和类过氧化氢酶(CAT)活性,其催化活性遵循典型的Michaelis-Menten动力学,Michaelis-Menten常数( $K_m$ )和最大反应速度( $V_{max}$ )分别为1.01 mmol/L和 $8.49 \times 10^{-6}$  mol/(L·s).细胞计数试剂盒(CCK-8)等体外细胞实验结果证实MeNPs对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的氧化应激具有细胞保护作用.经MeNPs纳米酶治疗的肝纤维化小鼠的炎症因子IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ 和趋化因子CXCL-1水平显著降低;肝脏损伤指标ALT, AST和肝组织H&E染色均显示MeNPs干预肝纤维化的良好疗效.本文研究结果对于构建安全、高效的自由基清除纳米酶具有一定的指导意义,也为肝纤维化的治疗提供了理论依据和物质基础.

**关键词** 黑色素; 无金属纳米酶; 类超氧化物歧化酶; 类过氧化氢酶; 肝纤维化

中图分类号 O623; R313

文献标志码 A

doi: 10.7503/cjcu20230411

## Metal-free Melanin Nanoenzymes for the Treatment of Liver Fibrosis

LI Tingting<sup>1,2</sup>, YUE Caifeng<sup>1</sup>, HUO Yuanqing<sup>1</sup>, JI Huifang<sup>1</sup>, ZHANG Ruiping<sup>3\*</sup>

(1. College of Pharmacy, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China;

2. the Third Hospital of Shanxi Medical University, Shanxi Bethune Hospital, Shanxi Academy of Medical Science, Tongji Shanxi Hospital, Taiyuan 030032, China;

3. The Radiology Department of Shanxi Provincial People's Hospital, the Fifth Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030012, China)

**Abstract** Metal-free Melanin nanoenzymes (MeNPs) were synthesized *via* the free radical polymerization of 5, 6-dihydroxyindole as monomer, and its therapeutic effect on liver fibrosis was explored. The results showed that the MeNPs nanoenzymes had monodisperse spherical structure with a particle size of (91.3±2.6) nm, with superoxide-like dismutase (SOD) and catalase-like (CAT) activities, and their catalytic activities followed typical Michaelis-Menten kinetics with Michaelis-Menten constant ( $K_m$ ) and maximum reaction velocity ( $V_{max}$ ) of 1.01 mmol/L and  $8.49 \times 10^{-6}$  mol/(L·s), respectively. *In vitro* cell experiments such as cell counting kit-8 (CCK-8) confirmed that MeNPs had cytoprotective effects on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress. Inflammatory factors IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and chemokine CXCL-1 were significantly reduced in the mouse model of liver fibrosis treated by MeNPs nanoenzymes. Liver damage indexes ALT, AST and H&E staining of liver tissue showed the good efficacy of MeNPs in liver fibrosis. The research has guiding significance for the construction of safe and efficient free radical scavenging nanoenzymes,

收稿日期: 2023-09-15. 网络首发日期: 2023-11-21.

联系人简介: 张瑞平, 男, 博士, 教授, 主要从事分子影像与纳米医学方面的研究. E-mail: zrp\_7142@sxmu.edu.cn

基金项目: 中国博士后科学基金(批准号: 2022M722001)、山西省自然科学研究面上项目(批准号: 202103021224241)和山西医科大学校博士启动基金(批准号: 03201529)资助.

Supported by the China Postdoctoral Science Foundation(No. 2022M722001), the Natural Science Foundation of Shanxi Province, China (No.202103021224241) and the Startup Foundation for Doctors of Shanxi Medical University, China(No.03201529).

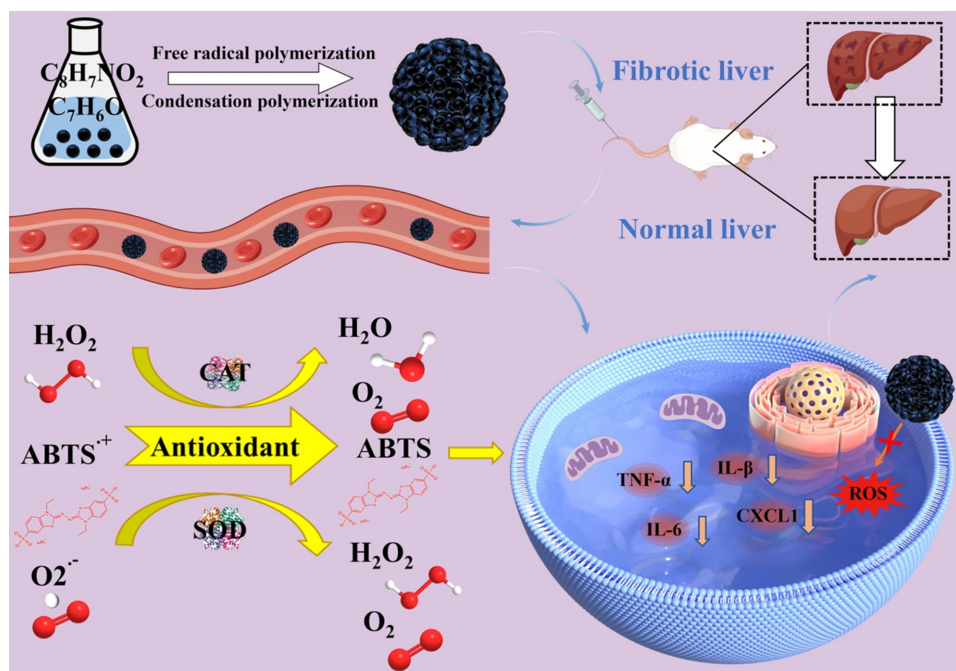
and also provides a theoretical basis and material basis for the treatment of liver fibrosis.

**Keywords** Melanin; Metal-free nanoenzyme; Superoxide-like dismutase; Catalase-like; Liver fibrosis

肝纤维化是慢性肝病进展过程中出现的细胞外基质过度沉积的现象,是多种慢性肝病的共同病理基础.如不加干预,肝纤维化可进展为肝硬化,甚至引起门静脉高压或肝癌<sup>[1]</sup>.目前尚无临床获批的肝纤维化治疗药物或生物制剂,主要通过肝细胞保护、抗炎及抗氧化应激缓解肝损伤来逆转肝纤维化<sup>[2]</sup>.因此,开发一种安全且高效的干预措施对于治愈肝纤维化以及降低重症肝病发病率具有重要意义.

酶是一类由活细胞产生的,对底物具有高度特异性和高度催化效能的蛋白质或RNA.尽管天然酶具有催化效率高和底物专一等特点,但因其本身存在制备纯化成本高、稳定性差、对反应环境敏感以及难以回收和再利用<sup>[3]</sup>等缺点,人工仿生材料尤其是纳米酶技术应运而生.纳米酶因其出色的酶催化性能和生物特性而成为生物医学领域的研究热点<sup>[4]</sup>.迄今,已有数百种纳米材料被报道具有类酶催化特征.其中,金属基纳米酶因其明确、稳定和可调控的物化结构,且经常表现多类酶活性的特点,已成为纳米酶家族的重要成员.在过去的10年里发现了大量具有过氧化物酶(POD)、氧化酶(OXD)、超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)活性的多功能纳米酶,包括金属氧化物、金属有机框架和单原子催化剂等<sup>[5]</sup>.然而,金属基纳米酶在高温和极端pH条件下极易失活<sup>[6]</sup>.更重要的是,在生物医学领域的应用中,这些金属基纳米酶因难以代谢而长期滞留在人体中,或在代谢过程中不可避免地会释放金属离子被人体吸收,已引起人们对金属基纳米酶安全性的担忧<sup>[7]</sup>.

黑色素是广泛存在于动物、植物、细菌及真菌等自然生物中的一类黑色聚合色素<sup>[8-13]</sup>,属于内源性色素,不仅具有优良的生物相容性和生物代谢降解性,而且具有辐射防护、热调节、色素沉着及自由基清除等多种优异的理化和生物学功能<sup>[14-18]</sup>.黑色素有强大的类超氧化物歧化酶(SOD)样和类过氧化氢酶(CAT)样模拟活性,可以通过清除过多的活性氧(ROS)来维持人和动物体内的氧化平衡<sup>[19-21]</sup>,可进一步应用于各种氧化应激诱导疾病的炎症治疗中.在自然界中,黑色素的生物合成通常涉及黑色素细胞中酪氨酸或1,3,4-二羟基苯基丙氨酸(LDOPA)衍生的5,6-二羟基吲哚(DHI)单体的自由基氧化聚合<sup>[21]</sup>.本文通过自氧化自由基聚合过程中DHI的酚基与醛之间的缩合反应构建了无金属黑色素纳米酶(MeNPs)<sup>[22]</sup>,并探讨了其类超氧化物歧化酶(SOD)样和类过氧化氢酶(CAT)样活性在肝纤维化中的抗炎和抗氧化作用;进一步对该纳米酶的肝纤维化治疗效果和生物安全性进行了评估(Scheme 1).本文不仅为新型纳米酶的制备提供了有价值的指导,也为其在肝纤维化的治疗领域开拓了新视角.



Scheme 1 Schematic diagram of the synthesis and mechanism of action of metal-free melaninnanoenzymes

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

5,6-二羟基吲哚(DHI)和苯甲醛( $C_7H_6O$ ), 分析纯, 上海泰坦科技有限公司; 无水乙醇, 分析纯, 成都科隆化学试剂有限公司; IL-6 ELISA 试剂盒和TNF- $\alpha$ ELISA 试剂盒, 武汉博士德生物工程有限公司; DCFH-DA 活性氧荧光探针、细胞计数试剂盒(CCK-8)、PBS 缓冲液和DMEM 培养基, 北京索莱宝科技有限公司; WST-8 超氧化物歧化酶检测试剂盒和CAT 检测试剂盒, 上海科艾博生物公司; 实验用水均为去离子水, 利用ULUPURE 净水系统获得; 其余材料和试剂均来自不同的商业来源, 无需进一步纯化。

LIBRA 200 型透射电子显微镜(TEM), 德国蔡司仪器公司; UV-6100 型紫外-可见(UV-Vis)分光光度计, 上海美谱达仪器有限公司; ZS90 型纳米颗粒度电位仪(DLS), 英国马尔文公司; FTIR-650 型傅里叶变换红外光谱仪(FTIR), 天津港东公司; 石蜡包埋机、SAKURA 型自动组织脱水机和IX73 型荧光显微镜, 日本OLYMPUS 公司; JPSJ-605F 型溶解氧计, 上海INESA 科学仪器公司。

### 1.2 实验过程

**1.2.1 MeNPs 的合成** 将98 mg DHI 溶解于20 mL 去离子水和20 mL 乙醇中, 室温下搅拌10 min; 随后将97 mg 苯甲醛溶解于20 mL 乙醇并加入反应体系中, 剧烈搅拌下加入2.5  $\mu$ L 氨水溶液(氨的质量分数为28%~30%), 然后置于65  $^{\circ}$ C 水浴中加热。反应溶液逐渐变成淡紫色, 随后变为深棕色。反应8 h 后以16000 r/min 的转速离心5 min, 然后用去离子水洗涤3次, 得到MeNPs, 产率91.2%。

**1.2.2 MeNPs 的结构表征** 采用TEM 对MeNPs 的形貌尺寸进行了表征。通过动态光散射光谱仪测量了MeNPs 的水合粒径及电位。利用紫外-可见分光光度计测量了MeNPs 的吸光度值, 用红外光谱仪表征了MeNPs 的特征峰谱, 以验证MeNPs 的制备。将一定浓度MeNPs 分别置于水、PBS 和DMEM 3种不同的介质中, 并记录粒径随时间的变化直至120 h, 观察MeNPs 的生理稳定性。

**1.2.3 MeNPs 催化活性氧的清除** 选择 $H_2O_2$ ,  $O_2^-$ , ABTS $\cdot$  3种不同类型的反应物, 记录MeNPs 纳米酶(6.25~100  $\mu$ g/mL)与各反应物清除量之间的关系。将1.5 mg/mL 的MeNPs 加入到20 mL 玻璃瓶中, 于37  $^{\circ}$ C 搅拌, 然后加入2.5 mL 液体石蜡, 用橡胶塞密封, 用两根针管吹气。将 $N_2$  气(体积分数99.9%)吹入瓶中, 形成低氧环境。用 $N_2$  气鼓泡后, 向混合物中分别注入0.5~100 mmol/L 的 $H_2O_2$ 。使用溶解氧计测定生成氧浓度, 监测15 min 测定氧溶解度, 评价MeNPs 分解 $H_2O_2$  的活性。 $H_2O_2$  分解反应遵循典型的Michaelis-Menten 动力学:

$$V = V_{\max}S/(K_m + S)$$

式中:  $V$  [mol/(L $\cdot$ s)] 为酶促反应速度;  $V_{\max}$  [mol/(L $\cdot$ s)] 为最大酶促反应速度;  $S$  (mmol/L) 为底物浓度;  $K_m$  (mmol/L) 为米氏常数。

**1.2.4 MeNPs 抗氧化应激的体外细胞保护作用** 使用标准的细胞计数试剂盒CCK-8 检测了LO2 人正常肝细胞和AML12 小鼠正常肝细胞的细胞活力。观察LO2 和AML12 细胞的生物活性与MeNPs 浓度的关系; 将不同浓度的氧化应激诱导剂 $H_2O_2$  与LO2 和AML12 细胞共孵育4 h, 记录细胞活性变化; 记录MeNPs 浓度变化(0~200  $\mu$ g/mL)与LO2 和AML12 细胞活性恢复之间的关系。用DCFH-DA 对不同处理组的细胞进行标记后, 通过488 nm 激发下的荧光成像检测细胞内ROS 水平。

**1.2.5 MeNPs 的体内治疗效果及抗炎作用** 以40 只清洁级C57BL/6 野生型小鼠[3~4 周龄, 体重(18 $\pm$ 2) g, 雄性]为主要研究对象, 将小鼠随机分为4 组: 正常对照组、肝纤维化模型组(LF)、肝纤维化模型PBS 治疗组和肝纤维化模型MeNPs 治疗组, 每组10 只。通过腹腔注射浓度为10 mg/mL 的硫代乙酰胺(TAA) 溶液(0.1 mL/10 g), 每周3 次, 持续4 周, 建立了肝纤维化的小鼠模型。将PBS 溶液或MeNPs 纳米酶(MeNPs 的剂量为5 mg/kg) 分别经尾静脉注入到肝纤维化小鼠体内, 每周2 次, 治疗过程持续4 周。检测不同组小鼠血清中肝脏损伤指标ALT 和AST 的变化, 同时对不同处理组的小鼠肝组织进行H&E 染色, 分析MeNPs 治疗肝纤维化的疗效。此外, 通过IL-6 ELISA 试剂盒、TNF- $\alpha$ ELISA 试剂

盒、IL-1 $\beta$ ELISA 试剂盒和 CXCL1 ELISA 试剂盒检测不同处理组小鼠血清中炎症因子 IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ 和趋化因子 CXCL1 的含量变化.

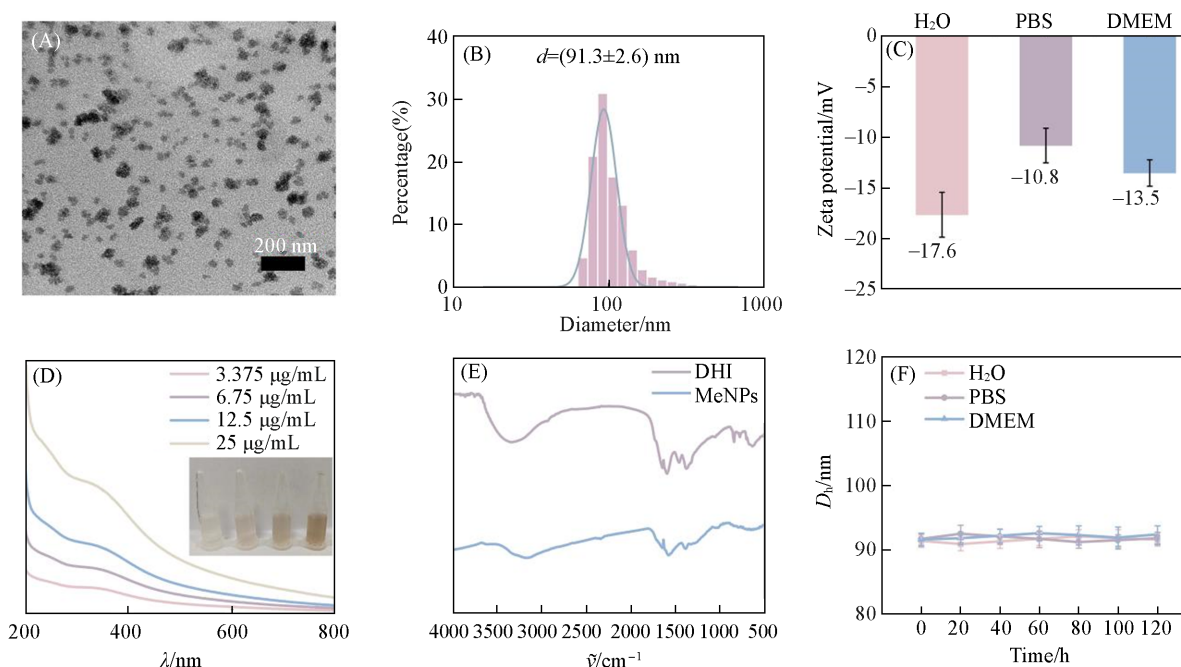
**1.2.6 MeNPs 的生物安全性** 将 MeNPs 与金属元素 Mn 进行偶联, 通过 ICP-MS 测定金属元素 Mn 的含量, 并测定 MeNPs 在小鼠主要器官 24 h 的分布以及 36~168 h 在粪便与尿液中的代谢情况; 经静脉注射 MeNPs 后, 观察纳米颗粒对正常小鼠的体重影响. 将小鼠分为未注射 MeNPs 的对照组和注射 MeNPs 的实验组, 分别测定小鼠血清中血红蛋白 (HGB)、平均红细胞体积 (MCV)、平均红细胞血红蛋白浓度 (MCHC)、平均红细胞血红蛋白量 (MCH)、红细胞比容 (HCT)、白细胞 (WBC)、红细胞 (RBC) 和血小板 (PLT) 的含量, 同时收集小鼠主要脏器 (心、肝、脾、肺和肾), 经脱水、浸蜡、包埋及切片进行 H&E 染色观察, 评估 MeNPs 的生物安全性.

**1.2.7 统计学分析** 所有结果均以均数 $\pm$ 标准差 (S. D.) 表示. 采用单因素方差分析 (ANOVA) 进行统计学意义分析, \*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$ , \*\*\*:  $P < 0.001$ .

## 2 结果与讨论

### 2.1 MeNPs 的结构表征

以 DHI 为反应物, 通过自由基聚合反应合成了无金属黑色素纳米酶 MeNPs. 由 TEM 照片 [图 1(A)] 可见, MeNPs 具有单分散球形结构, 分布均匀. 根据 DLS 测得 MeNPs 的水动力直径为  $(91.3 \pm 2.6)$  nm [图 1(B)], 与 TEM 表征结果一致; 而 MeNPs 在水、PBS 和 DMEM 中的 Zeta 电位分别为  $-17.6$ ,  $-10.8$  和  $-13.5$  mV, 带负电的纳米粒子可被动靶向肝脏<sup>[23]</sup>, 有利于 MeNPs 进入肝脏治疗肝纤维化 [图 1(C)]. 所制备的黑色素纳米酶 MeNPs 呈棕黑色, 紫外-可见光谱分析显示, MeNPs 可吸收 400~800 nm 范围的光 [图 1(D)]. 随着浓度的增加, MeNPs 的吸光度增强. 此外, 在 FTIR 谱图 [图 1(E)] 中, 与 DHI 单体相比, MeNPs 在约  $2900\text{ cm}^{-1}$  处出现一个新的特征峰, 这与缩合反应产生的  $-\text{CH}_2$  拉伸振动有关, 苯环振动和取代峰分别位于  $1550$  和  $795\text{ cm}^{-1}$ , 进一步证实了 MeNPs 的成功制备. 纳米颗粒的稳定性是其在体内应用的前提条件, 将 MeNPs 分散于水、PBS 和 DMEM 3 种不同介质中, 120 h 内纳米酶的粒径基本保



**Fig. 1** Characterization of MeNPs

- (A) TEM image; (B) dynamic light scattering (DLS) result of MeNPs in water; (C) Zeta potentials of MeNPs in different solvents; (D) UV-Vis spectra of samples at varied concentrations, the inset figure is a digital photograph of samples at varied concentrations; (E) FTIR spectra of DHI and MeNPs; (F) size of MeNPs in different solvents.

持不变,证明了MeNPs在溶液中具有很高的生理稳定性[图1(F)].

## 2.2 MeNPs催化活性氧清除性能

MeNPs的酚羟基结构使其具备清除活性氧(ROS)的性能,这对于缓解氧化应激所形成的肝纤维化十分有利.通过类过氧化氢酶 $\text{H}_2\text{O}_2$ 分解反应及类超氧化物歧化酶 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 歧化反应等对MeNPs的活性氧清除性能进行了评价.当MeNPs浓度为 $100\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 时,该纳米颗粒可清除 $(78.8\pm 0.4)\%$ 的 $\text{H}_2\text{O}_2$ [图2(A)]和 $(61.6\pm 0.9)\%$ 的 $\text{O}_2^{\cdot-}$ [图2(B)].同时,利用2,2'-氨基-双(3-乙基苯并噻唑-6-磺酸)(ABTS)方法评估了MeNPs的抗氧化性能,以确定其生物催化活性.结果表明,当MeNPs浓度为 $50\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 时,ABTS·的清除率已接近90%[图2(C)]. $\text{H}_2\text{O}_2$ 是一种重要的活性氧,具有很强的氧化能力,也是 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 突变的下游产物.通过监测MeNPs在不同浓度 $\text{H}_2\text{O}_2$ 溶液中溶解的 $\text{O}_2$ 浓度,评价了MeNPs分解 $\text{H}_2\text{O}_2$ 的活性[图2(D)].结果证实MeNPs纳米酶具有CAT样活性,其不仅表现出优异的 $\text{H}_2\text{O}_2$ 清除能力,且具有浓度依赖性,随着 $\text{H}_2\text{O}_2$ 浓度的增加, $\text{O}_2$ 生成速率也随之增加.此外, $\text{H}_2\text{O}_2$ 分解反应遵循典型的Michaelis-Menten动力学<sup>[24]</sup>,Michaelis-Menten常数( $K_m$ )和最大反应速度( $V_{\max}$ )分别为 $1.01\ \text{mmol}/\text{L}$ 和 $8.49\times 10^{-6}\ \text{mol}/(\text{L}\cdot\text{s})$ [图2(E)和2(F)].以上结果均证实MeNPs具有广谱的活性氧清除能力.

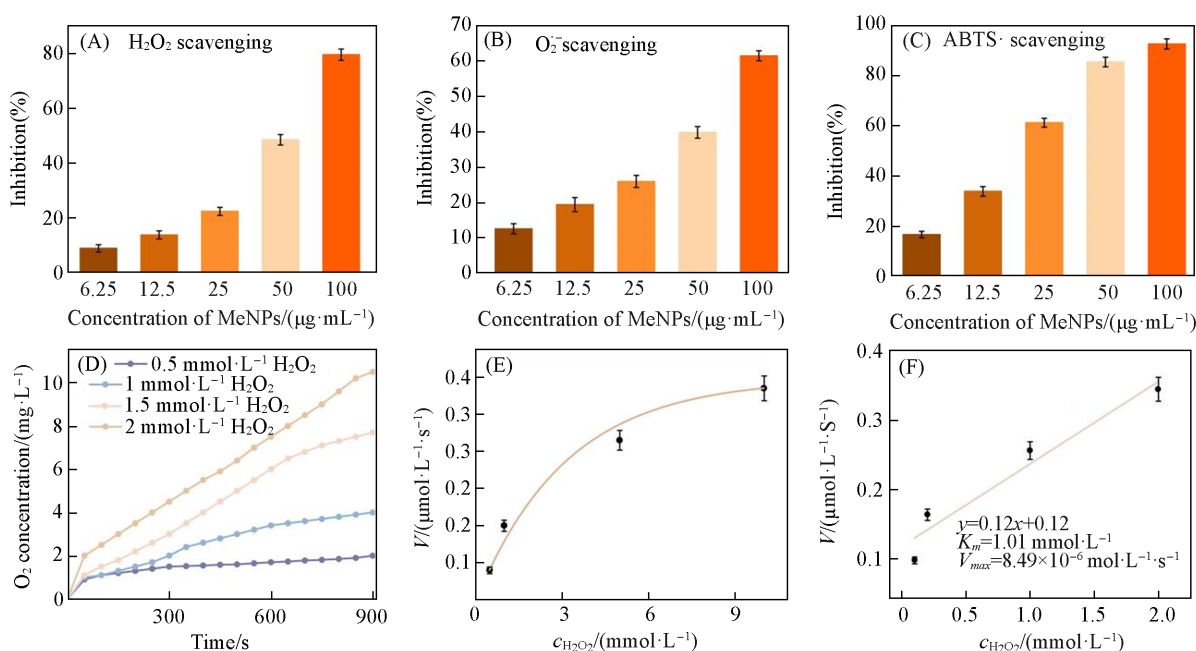


Fig. 2 MeNPs catalyze the elimination of reactive oxygen species

(A) Clearance efficiency of MeNPs on  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; (B) clearance efficiency of MeNPs on  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ; (C) clearance efficiency of MeNPs on ABTS·; (D) increased decomposition rates of  $\text{H}_2\text{O}_2$  into  $\text{H}_2\text{O}$  and  $\text{O}_2$  with various concentration of  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $n=3$  in each group); Michaelis-Menten kinetic analysis (E) and lineweaver-Burk plot (F) for MeNPs with  $\text{H}_2\text{O}_2$  as a substrate ( $n=3$  in each group), data are represented as mean $\pm$ SD.

## 2.3 MeNPs抗氧化应激的体外细胞保护作用

为了验证MeNPs对LO2人正常肝细胞和AML12小鼠正常肝细胞的细胞毒性,采用CCK-8测定了LO2和AML12细胞的细胞活力.结果表明,随着MeNPs浓度的增加( $0\sim 200\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ),LO2和AML12细胞的生物活性仍维持在 $90\%\sim 100\%$ 之间[图3(A, A')],可见MeNPs在细胞水平上的生物安全性良好.由图3(B, B')可见,当不同浓度的氧化应激诱导剂 $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $0\sim 800\ \mu\text{mol}/\text{L}$ )与细胞共孵育4 h时,LO2和AML12细胞的细胞活力均呈明显下降,其下降程度与 $\text{H}_2\text{O}_2$ 的浓度呈正相关.由图3(C, C')可见,随着无金属黑色素纳米酶MeNPs浓度的增加,LO2和AML12细胞的细胞活性逐渐恢复,且当MeNPs浓度为 $200\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 时,LO2和AML12细胞的活性均接近正常对照组.随后,利用荧光探针2,7-二氯二氢荧光素二醋酸酯(DCFH-DA)检测了细胞内ROS水平.由图3(D)可见,MeNPs本身不会增加细胞内ROS水平,并且可以显著抑制 $\text{H}_2\text{O}_2$ 产生的ROS.综上所述,MeNPs对 $\text{H}_2\text{O}_2$ 诱导的氧化应激具有细胞保护作用.

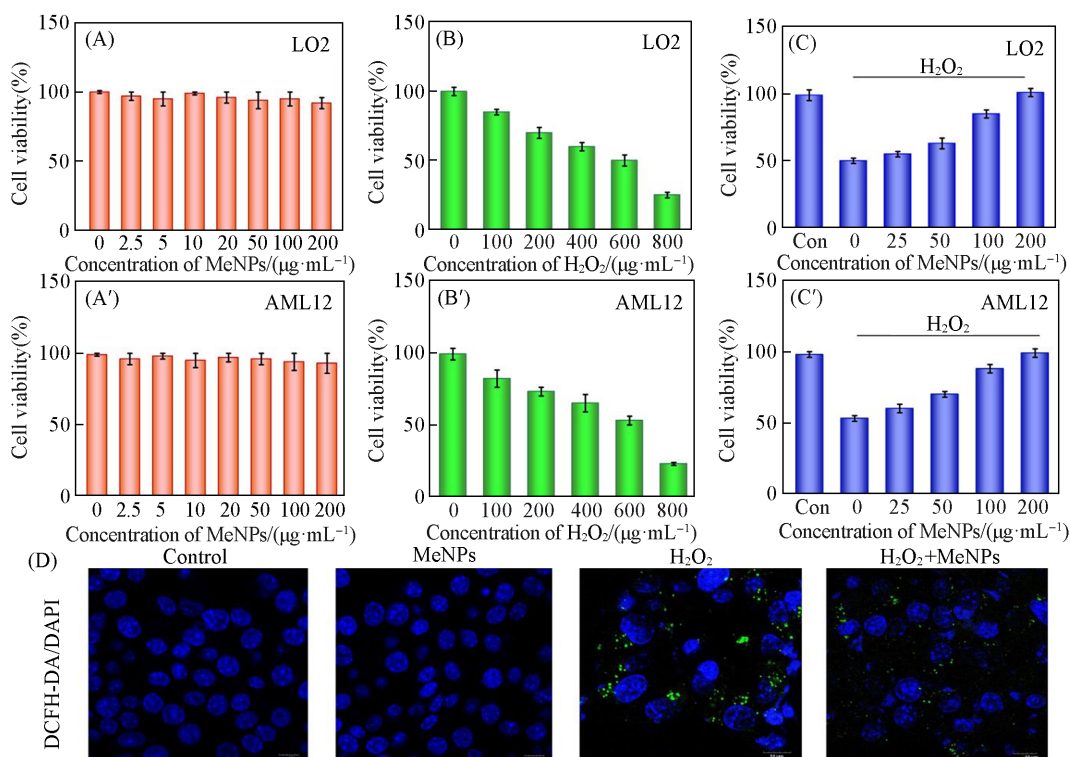


Fig. 3 Cytoprotective effect of MeNPs against oxidative stress *in vitro*

(A, A') Cell viability of LO2 and AML12 cells after treatment with MeNPs at different concentrations ( $n=3$  in each group); (B, B') cell viability of LO2 and AML12 cells after treatment with  $H_2O_2$  at different concentrations ( $n=3$  in each group); (C, C') cell viability of  $H_2O_2$  (600  $\mu\text{mol/L}$ ) co-incubated LO2 and AML12 cells after different concentrations of MeNPs treatment ( $n=3$  in each group); (D) CLSM images of LO2 or AML12 cells stained with DCFH-DA and DAPI after different treatments.

#### 2.4 MeNPs的体内治疗效果

鉴于无金属黑色素纳米酶MeNPs具有优良的清除ROS性能,进一步采用C57BL/6野生型小鼠肝纤维化模型验证了MeNPs减慢肝纤维化进程的效果.首先,通过腹腔注射浓度为10 mg/mL的硫代乙酰胺(TAA)溶液(0.1 mL/10 g),每周3次,持续4周,建立了肝纤维化的小鼠模型.将PBS溶液或MeNPs纳米酶(MeNPs的剂量为5 mg/kg)分别经尾静脉注入到肝纤维化小鼠体内,每周2次,治疗过程持续4周.ALT和AST是检测肝损伤的代表性指标.与正常小鼠相比,肝纤维化小鼠的ALT和AST水平要高得多.经PBS治疗后无明显缓解,而鼠尾静脉注射MeNPs纳米酶后,肝纤维化小鼠的ALT和AST水平显著降低,说明肝功能得到恢复(图4),验证了MeNPs对肝纤维化的显著治疗效果.同时,对不同处理组的肝组织进行H&E染色,为MeNPs的治疗效果提供了更直接的证据.在经PBS处理的肝纤维化小鼠的肝组织中,可以观察到炎症细胞浸润和肝实质细胞坏死区域无明显变化.相反,MeNPs可有效减轻肝纤维化,炎症细胞浸润和肝实质细胞坏死区域减少(图5).以上结果表明,MeNPs纳米酶治疗肝纤维化的疗效显著.

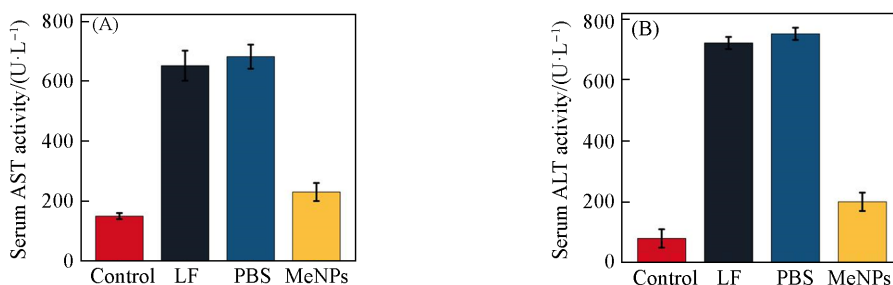


Fig. 4 Serum levels of AST(A) and ALT(B) under different conditions

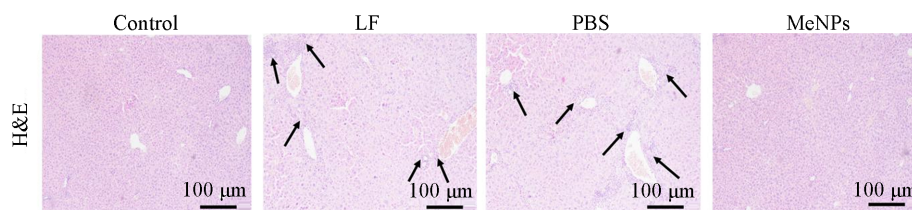


Fig. 5 H&E staining of liver tissues

## 2.5 MeNPs的体内抗炎作用

当肝脏受到各种致病因子刺激时,相关炎症细胞可分泌促炎细胞因子如IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ 和趋化因子CXCL1等,这些因子在肝纤维化的发生发展中起着重要作用.因此,为了研究MeNPs的体内抗炎作用,检测了肝纤维化小鼠血清中炎症因子的水平.ELISA分析表明,与正常小鼠相比,肝纤维化小鼠血清中IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ 和CXCL1的水平显著升高[图6(A)~(D)],经静脉注射PBS溶液后,炎症因子水平无明显变化.相比之下,炎症因子被MeNPs显著抑制.以上结果表明,MeNPs可有效减轻炎症反应.

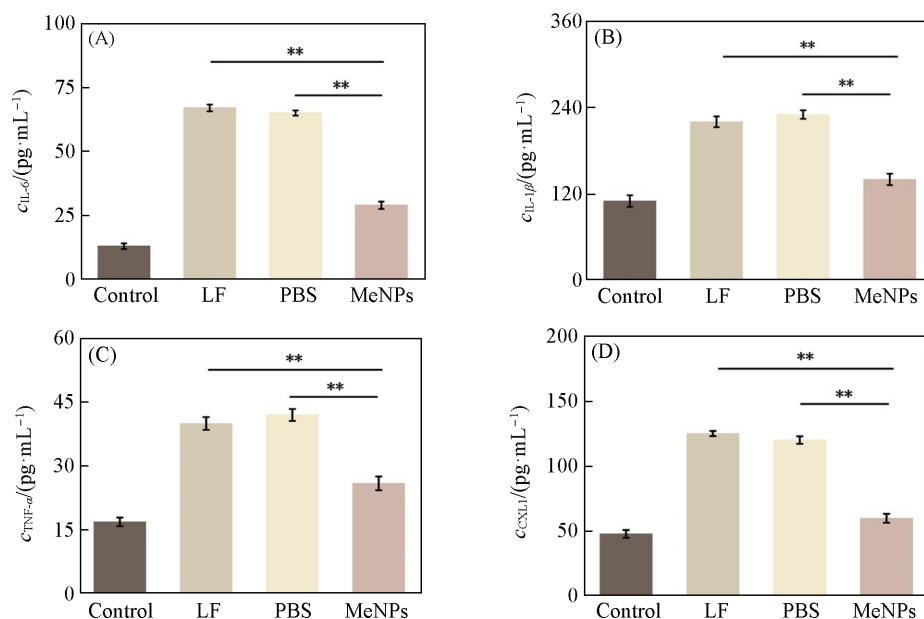


Fig. 6 Anti-inflammatory effect of MeNPs *in vitro*

Levels of IL-6 (A), TNF- $\alpha$  (B), IL-1 $\beta$  (C) and CXCL1 (D) secreted by mice with liver fibrosis after treatment with PBS and MeNPs; data are represented as mean $\pm$ SD; \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01, \*\*\* $P$ <0.001.

## 2.6 MeNPs的生物安全性

MeNPs纳米酶的安全性对其在生物体内的应用评估非常重要. MeNPs注射后2, 4和24 h在小鼠主要器官内的生物分布分析如图7(A)所示. MeNPs主要分布在肝脏, 这为MeNPs进入肝脏充分发挥抗炎抗氧化效果, 抑制肝纤维的进展提供了前提条件. 进一步收集小鼠的粪便和尿液, 对其中MeNPs的含量进行了量化分析. 研究表明, 小鼠注射MeNPs后的30~168 h内, 小鼠粪便中MeNPs的排泄量由11.5%逐渐增加到41.5%, 小鼠尿液中MeNPs的排泄量由3.8%逐渐增加到14.5%[图7(B)], 说明MeNPs在7 d内主要通过肝脏与肾脏进行代谢. 同时, 对小鼠进行了20 d的行为和体重监测, 结果表明, 注射MeNPs纳米颗粒的小鼠, 饮食及精神状态良好, 未观察到明显的行为异常, 体重稳定增长[图7(C)]. 血液生化检查结果表明, 与对照组相比, 体内给药MeNPs对小鼠血红蛋白(HGB)、平均红细胞体积(MCV)、平均红细胞血红蛋白浓度(MCHC)、平均红细胞血红蛋白量(MCH)、红细胞比容(HCT)、白细胞(WBC)、红细胞(RBC)和血小板(PLT)均无显著影响[图7(D)]. 对主要脏器进行H&E染色所得结果显示, MeNPs未对小鼠的心、肝、脾、肺和肾造成明显的组织病理改变, 且主要组织中未

见炎症细胞[图7(E)].

以上结果表明, MeNPs具有低毒性、良好的安全性和生物相容性, 为其后续临床应用转化奠定了理论基础.

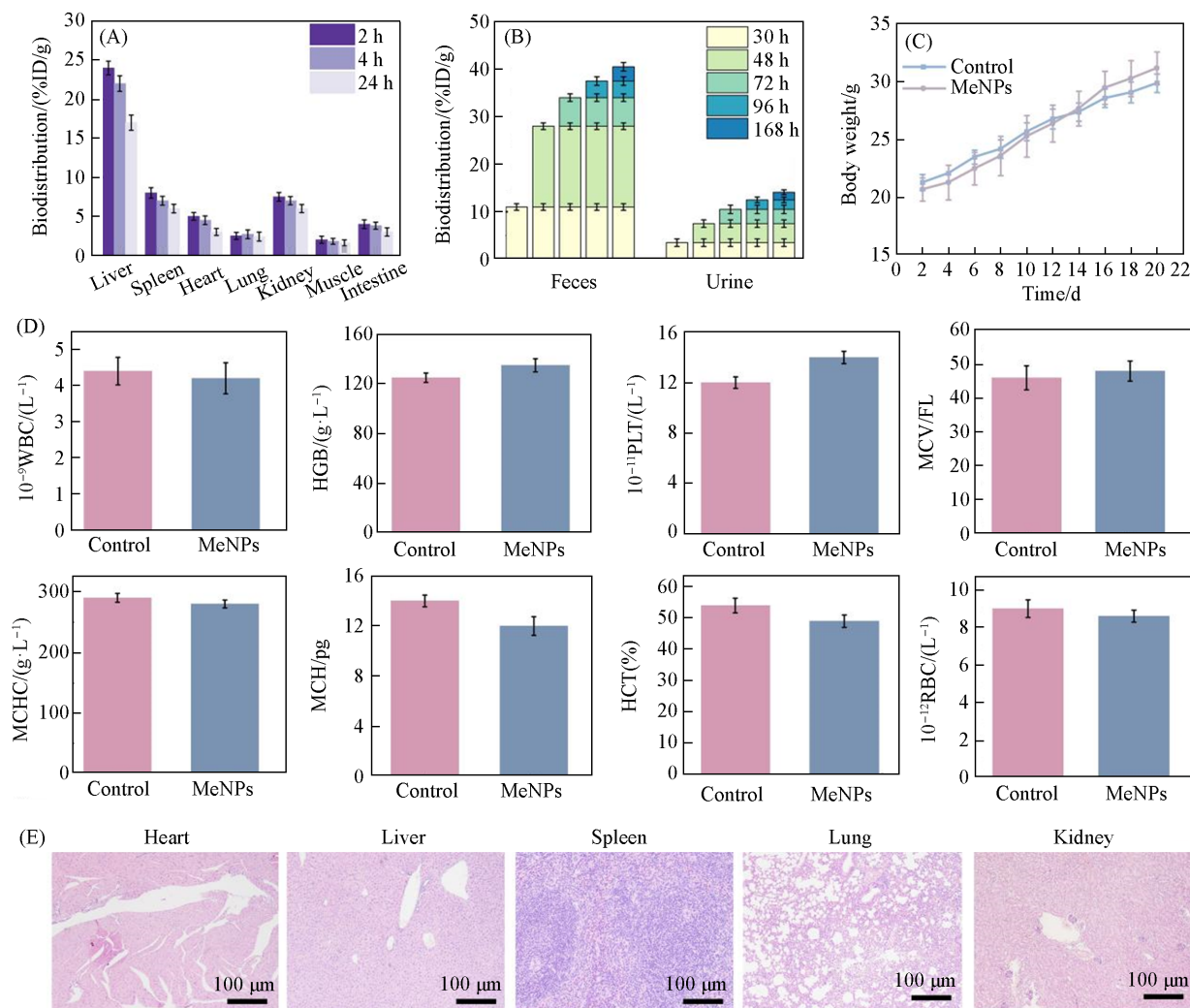


Fig. 7 Biosafety of MeNPs

(A) Biodistribution of MeNPs in mice ( $n=3$ ) at 2, 4, and 24 h after injection; (B) the accumulative MeNPs levels in feces and urine ( $n=3$ ); the feces and urine were collected from 30 to 168 h post MeNPs injection; (C) body weight changes of mice ( $n=3$ ) 20 d after tail vein injection of MeNPs; (D) blood routine examination results of mice treated with saline (control) and MeNPs; compared with the control group, all the parameters in the MeNPs treated groups did not show any significant differences, indicating that the MeNPs do not cause obvious infection and inflammation in the treated mice; (E) H&E stained images of major organs of mice.

### 3 结 论

以DHI为单体构建了无金属黑色素纳米酶MeNPs, 验证其具有类超氧化物歧化酶(SOD)和类过氧化氢酶(CAT)活性, 并表现出极强的抗氧化能力和极高的催化活性. 体外细胞实验证实MeNPs具有良好的生物相容性及清除活性氧的能力. MeNPs在肝纤维化小鼠模型中也表现出显著的抗炎和抗氧化作用, 通过肝脏损伤指标表明MeNPs可逆转肝纤维化的病理进展. 此外, 血液生化检查及主要脏器H&E染色均证实了MeNPs优良的生物安全性. 综上所述, MeNPs具有出色的抗氧化能力, 可在细胞抗氧化防护以及肝纤维化的体内治疗方面发挥重要作用. 该新型纳米酶材料的构建不仅为设计多功能黑色素纳米材料开拓了新视野, 同时也为临床干预肝纤维化提供了一种安全、有效的治疗策略.

参 考 文 献

- [ 1 ] Li F. F., Zhao Y., Cheng Z. X., Wang Y. Z., Yue Y. L., Cheng X. Y., Sun J. Y., Atabakhshi-Kashi M., Yao J. D., Dou J. P., Yu J., Zhang X. P., Qi Y. Q., Li X. T., Qi X. L., Nie G. J., *Adv. Mater.*, **2023**, 35(17), 2212206
- [ 2 ] Lv J., Xu Y., Xu L., Nie L. M., *Radiology*, **2021**, 300(1), 89—97
- [ 3 ] Ai Y. J., Hu Z. N., Liang X. P., Sun H. B., Xin H. B., Liang Q. L., *Adv. Funct. Mater.*, **2022**, 32(14), 2110432
- [ 4 ] Meng F. C., Zhu P. B., Yang L. N., Xia L. X., Liu H. Y., *Chem. Eng. J.*, **2023**, 452, 139411
- [ 5 ] Chen M., Zhang H. J., Tian L., Lv H. W., Chen C., Liu X. K., Wang W. Y., Wang Y. W., Zhao Y. F., Wang J., Zhou H., Mao Y., Xiong C., Wu Y. E., *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2023**, 15(1), 407—415
- [ 6 ] Chang L., Huang H., Feng W., Fu H., Qi F. G., Liu J. J., Chen Y., *Nanoscale*, **2022**, 14(16), 6171—6183
- [ 7 ] Lamas B., Breyner N. M., Houdeau E., *Part. Fibre Toxicol.*, **2020**, 17(1), 19
- [ 8 ] Lampel A., McPhee S. A., Kassem S., Sementa D., Massarano T., Aramini J. M., He Y., Ulijn R. V., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2021**, 60(14), 7564—7569
- [ 9 ] Al-Massadi O., Dieguez C., Schneeberger M., López M., Schwaninger M., Prevot V., Nogueiras R., *Nat. Rev. Endocrinol.*, **2021**, 17(12), 745—755
- [ 10 ] Zhou J., Liu W., Zhao X. Y., Xian Y. F., Wu W., Zhang X., Zhao N. N., Xu F. J., Wang C. Y., *Adv. Sci.*, **2021**, 8(20), 2100505
- [ 11 ] Zhao C. Y., Li Z., Chen J. X., Su L. C., Wang J. Q., Chen D. S., Ye J. M., Liao N. S., Yang H. H., Song J. B., Shi J. J., *Adv. Mater.*, **2021**, 33(34), 2102391
- [ 12 ] Zhao C. Y., Chen J. X., Ye J. M., Li Z., Su L. C., Wang J. Q., Zhang Y., Chen J. H., Yang H. H., Shi J. J., Song J. B., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2021**, 60(26), 14458—14466
- [ 13 ] Cao W., Zhou X. H., McCallum N. C., Hu Z. Y., Ni Q. Z., Kapoor U., Heil C. M., Cay K. S., Zand T., Mantanona A. J., Jayaraman A., Dhinojwala A., Deheyn D. D., Shawkey M. D., Burkart M. D., Rinehart J. D., Gianneschi N. C., *J. Am. Chem. Soc.*, **2021**, 143(7), 2622—2637
- [ 14 ] Fu Y., Yang L., Zhang J. H., Hu J. F., Duan G. G., Liu X. H., Li Y. W., Gu Z. P., *Mater. Horizons*, **2021**, 8(6), 1618—1633
- [ 15 ] Qiu J. C., Shi Y. F., Xia Y. N., *Adv. Mater.*, **2021**, 33(45), 2104729
- [ 16 ] Zou Y., Chen X. F., Yang P., Liang G. J., Yang Y., Gu Z. P., Li Y. W., *Sci. Adv.*, **2020**, 6(36), eabb4696
- [ 17 ] Yang P., Zhu F., Zhang Z. B., Cheng Y. Y., Wang Z., Li Y. W., *Chem. Soc. Rev.*, **2021**, 50(14), 8319—8343
- [ 18 ] Yang P., Zhang S., Zhang N., Wang Y., Zhong J., Sun X. X., Qi Y., Chen X. F., Li Z., Li Y. W., *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2019**, 11(45), 42671—42679
- [ 19 ] Lin Z. J., Liu L. Z., Wang W., Jia L., Shen Y. Q., Zhang X. M., Ge D. T., Shi W., Sun Y. A., *Biomater. Sci.*, **2021**, 9(17), 5951—5964
- [ 20 ] Wang C. P., Wang D., Dai T. J., Xu P., Wu P. L., Zou Y., Yang P., Hu J. J., Li Y. W., Cheng Y. Y., *Adv. Funct. Mater.*, **2018**, 28(33), 1802127
- [ 21 ] Hu J. F., Yang L., Yang P., Jiang S. H., Liu X. H., Li Y. W., *Biomater. Sci.*, **2020**, 8(18), 4940—4950
- [ 22 ] Yang P., Wang T. Y., Zhang J. H., Zhang H. J., Bai W. J., Duan G. G., Zhang W., Wu J. R., Gu Z. P., Li Y. W., *Sci. China Chem.*, **2023**, 66(5), 1520—1528
- [ 23 ] Fang L., *Pharmacy*, People's Medical Publishing House, Beijing, **2023**(方亮. 药剂学, 北京: 人民卫生出版社, 2023)
- [ 24 ] Zhou C. Y., Zhang L., Xu Z. S., Sun T., Gong M. F., Liu Y., Zhang D., *Small*, **2023**, 19(19), 2206408

(Ed.: L, W, K)