

超微可溶钌纳米颗粒对H₂O₂诱导的肺上皮细胞氧化应激损伤的缓解作用与机制

刘露¹, 肖坤², 张春阳², 丁毅伟³, 张硕³, 谭周力³, 陈旭昕^{2*}, 韩志海^{1*}

¹华南理工大学医学院, 广东广州 510006; ²解放军总医院第八医学中心呼吸与危重症医学部, 北京 100091; ³解放军总医院第六医学中心呼吸与危重症医学科, 北京 100048

[中图分类号] R563 [文献标志码] A [DOI] 10.11855/j.issn.0577-7402.0054.2026.0427

[声明] 本文所有作者声明无利益冲突

[引用本文] 刘露,肖坤,张春阳等.超微可溶钌纳米颗粒对H₂O₂诱导的肺上皮细胞氧化应激损伤的缓解作用与机制[J].解放军医学杂志,DOI:10.11855/j.issn.0577-7402.0054.2026.0427.

[收稿日期] 2026-01-08 [录用日期] 2026-03-04 [上线日期] 2026-04-27

[摘要] 目的 制备水溶性、生物相容性良好的超微可溶钌纳米颗粒(sRuNP), 评估其对H₂O₂诱导的肺上皮细胞氧化应激损伤的缓解作用及可能机制。方法 采用热分解结合配体交换法合成sRuNP, 采用透射电子显微镜(TEM)、粒径分析及X线光电子能谱(XPS)观察其形貌、粒径、元素组成、价态和表面化学特征, 及其在生理盐水与RPMI-1640完全培养基中的体外分散稳定性。采用CCK-8法检测不同浓度sRuNP对肺上皮细胞A549活性的影响。将A549细胞分为对照组、H₂O₂组、H₂O₂+sRuNP(10 μg/ml)组, 采用Calcein-AM/PI双染检测细胞死亡, 试剂盒检测丙二醛(MDA)含量、超氧化物歧化酶(SOD)活性, Western blotting检测乙酰化SOD2(ac-SOD2)和SOD2表达水平。结果 制备的sRuNP粒径为(2.00±0.18) nm; XPS结果显示, sRuNP样品中存在明显的钌(Ru)、碳及氧元素的特征峰, Ru主要以Ru⁰和Ru⁺形式存在, 元素特定电子轨道的高分辨谱分析显示, 碳1s和氧1s谱提示颗粒表面存在有机配体修饰; 0、4、40、400 μg/ml sRuNP在25℃生理盐水中放置24 h, 0、1、10 μg/ml sRuNP在37℃ RPMI-1640完全培养基中放置24 h, 均未见明显沉淀。1 μg/ml和10 μg/ml sRuNP处理24 h, A549细胞活性与对照组差异无统计学意义(P>0.05)。与对照组比较, H₂O₂组细胞死亡增多, MDA含量升高, SOD活性降低, ac-SOD2/SOD2比值升高, 差异均有统计学意义(P<0.05); 与H₂O₂组比较, H₂O₂+sRuNP组细胞死亡减少, MDA含量下降, SOD活性升高, ac-SOD2/SOD2比值下降, 差异均有统计学意义(P<0.05)。结论 10 μg/ml sRuNP在体外的稳定性和生物安全性良好; 对肺上皮细胞的抗氧化作用明显, 抑制SOD2乙酰化是可能的分子机制。

[关键词] 超微钌纳米颗粒; 氧化应激; 急性肺损伤; 肺上皮细胞; 乙酰化超氧化物歧化酶2

Soluble ultrasmall ruthenium nanoparticles attenuate H₂O₂-induced oxidative stress injury in lung epithelial cells

Liu Lu¹, Xiao Kun², Zhang Chun-Yang², Ding Yi-Wei³, Zhang Shuo³, Tan Zhou-Li³, Chen Xu-Xin^{2*}, Han Zhi-Hai^{1*}

¹School of Medicine, South China University of Technology, Guangzhou, Guangdong 510006, China

²Senior Department of Pulmonary and Critical Care Medicine, the Eighth Medical Center, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100091, China

³Department of Pulmonary and Critical Care Medicine, the Sixth Medical Center, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100048, China

*Corresponding author, Han Zhi-Hai, E-mail: hanzhihai@301hospital.com.cn; Chen Xu-Xin, E-mail: huxiicu@outlook.com

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2023YFC2507101), and the Beijing Natural Science Foundation (7232169)

[Abstract] Objective To fabricate ultrasmall soluble ruthenium nanoparticles (sRuNP) with favorable water solubility and

[基金项目] 国家重点研发计划(2023YFC2507101); 北京市自然科学基金(7232169)

[作者简介] 刘露, 硕士研究生, 主要从事急性肺损伤与纳米酶治疗方面的研究

[通信作者] 韩志海, E-mail: hanzhihai@301hospital.com.cn; 陈旭昕, E-mail: huxiicu@outlook.com

biocompatibility, and to evaluate their protective effects against H_2O_2 -induced oxidative stress injury in lung epithelial cells as well as the underlying mechanism. **Methods** Soluble ultrasmall Ru nanoparticles were synthesized *via* thermal decomposition combined with ligand exchange. Transmission electron microscopy (TEM), particle size analysis, and X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) were used to characterize their morphology, particle size, elemental composition, valence states, and surface chemical properties, as well as their dispersion stability in normal saline and complete RPMI-1640 medium *in vitro*. The CCK-8 assay was performed to determine the viability of A549 lung epithelial cells treated with different concentrations of sRuNP. A549 cells were divided into three groups: control group, H_2O_2 group, and H_2O_2 +sRuNP (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) group. Cell death was assessed by Calcein-AM/PI double staining. Commercial kits were used to measure malondialdehyde (MDA) content and superoxide dismutase (SOD) activity. The expression levels of acetylated SOD2 (ac-SOD2) and total SOD2 were detected by Western blotting. **Results** The prepared sRuNP had a uniform particle size of (2.00 ± 0.18) nm. XPS spectra showed characteristic peaks of Ru, C, and O. Ru existed mainly in metallic (Ru0) and oxidized (Ru4+) states, while the C 1s and O 1s spectra confirmed surface modification with organic ligands. No obvious precipitation was observed for sRuNP at 0, 4, 40, and 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in saline at 25 $^\circ\text{C}$ for 24 h, or at 0, 1, and 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in complete RPMI-1640 medium at 37 $^\circ\text{C}$ for 24 h. After 24 h of treatment, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ sRuNP showed no significant difference in A549 cell viability compared with the control group ($P>0.05$). Compared with control group, H_2O_2 group exhibited increased cell death, elevated MDA content, reduced SOD activity, and a higher ac-SOD2/SOD2 ratio ($P<0.05$). In contrast, compared with H_2O_2 group, H_2O_2 +sRuNP group showed decreased cell death, lower MDA levels, higher SOD activity, and a lower ac-SOD2/SOD2 ratio ($P<0.05$). **Conclusions** sRuNP at 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ exhibit good stability and biosafety *in vitro*. They exert significant antioxidant effects on lung epithelial cells, and inhibition of SOD2 acetylation as a potential molecular mechanism.

[Key words] ultrasmall ruthenium nanoparticles; oxidative stress; acute lung injury; lung epithelial cells; acetylated superoxide dismutase 2

急性呼吸窘迫综合征 (acute respiratory distress syndrome, ARDS) 是一种以弥漫性肺泡损伤、肺泡-毛细血管屏障破坏及强烈炎症反应为特征的危重症^[1-2]。尽管近年来支持性治疗和呼吸支持策略不断改进,但其病死率仍居高不下,目前尚缺少针对性治疗药物^[3]。

氧化应激在急性肺损伤 (acute lung injury, ALI) 及 ARDS 的发生发展过程中发挥关键作用^[4-6]。活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 如超氧阴离子 (superoxide anion, $O_2^{\cdot-}$)、过氧化氢 (hydrogen peroxide, H_2O_2) 和羟基自由基 (hydroxyl radical, $\cdot\text{OH}$) 过度生成, 可导致内源性抗氧化防御系统失衡^[7]。持续的氧化应激可诱发肺泡上皮细胞脂质过氧化、蛋白质氧化及 DNA 损伤, 最终引起细胞死亡和肺泡屏障功能障碍^[8-9]。清除过量 ROS、恢复氧化还原稳态是防治 ALI/ARDS 的重要策略之一^[10]。

天然抗氧化酶 [如超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶等] 在体内稳定性差、半衰期短及生物利用度有限, 在 ARDS 防治中的临床疗效不理想^[6,11-12]。近年来, 具有类酶催化活性的纳米酶因其良好的稳定性、可调控的催化性能及相对较低的制备成本, 逐渐成为抗氧化治疗领域的研究热点^[12-14]。其中, 钌 (ruthenium, Ru) 基纳米材料因其 $\text{Ru}^{3+}/\text{Ru}^{4+}$ 多价氧化还原特性及较高的催化效率而备受关注^[13]。纳米颗粒的催化活性与其尺寸密切相关, 超微纳米颗粒由于具有更高比例的低配位表面原子, 可增强其清除 ROS 的能力^[14]。超微钌纳米材料在氧化应激相关肾

损伤模型中展现了良好的抗氧化和组织保护作用^[15]。然而, 超微钌纳米颗粒在 ALI/ARDS 核心靶细胞——肺泡 II 型上皮细胞氧化应激损伤中的作用及分子机制仍有待阐明。锰超氧化物歧化酶 2 (manganese superoxide dismutase 2, MnSOD2) 是清除线粒体来源 ROS 的关键抗氧化酶, 其活性受翻译后修饰调控, 尤其 SOD2 的赖氨酸乙酰化是关键翻译后修饰调控机制之一^[6]。SOD2 过度乙酰化可削弱 SOD2 清除超氧阴离子的能力。本研究合成了一种具有良好水溶性和生物相容性的超微可溶钌纳米颗粒 (soluble ruthenium nanoparticles, sRuNP), 并评估其在人肺泡 II 型上皮细胞系 A549 中的抗氧化效能及其分子机制, 旨在为 sRuNP 用于 ALI/ARDS 的抗氧化损伤治疗提供更多实验依据。

1 材料与方法

1.1 试剂与设备 三氯化钌水合物 ($\text{RuCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 和油酰胺购自美国 Sigma 公司; 细胞计数试剂盒-8 (CCK-8, CK04) 购自日本同仁化学研究所; Calcein-AM/PI 染色试剂盒、丙二醛 (MDA) 检测试剂盒和 SOD 检测试剂盒 (CA1630、BC-0025、BC-516S) 均购自北京索莱宝科技有限公司; SOD2 重组兔单克隆抗体 (bsm-52741R) 购自北京博奥森生物技术有限公司; 重组抗乙酰化 SOD2 (ac-SOD2)/MnSOD (acetyl K68) 抗体 (ab137037) 购自英国 Abcam 公司。离心机、电泳仪 (武汉赛维尔生物科技有限公司); 酶标仪 (美国赛默飞世尔科技公司); 显微镜 (日本 Olympus 公司)。

1.2 sRuNP的合成 采用改良热分解法合成sRuNP。步骤如下：将40 mg氯化钌(III)水合物($\text{RuCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)溶解于13 ml超纯水中，另将0.2 g油胺溶于2 ml环己烷形成有机相。将上述水溶液与有机溶液混合，经水浴超声处理5 min后持续搅拌1 h以确保充分预混合。随后，将所得混合乳液转移至封闭反应釜(Teflon-lined stainless steel autoclave)中，于160 °C下恒温水热反应(Hydrothermal reaction)12 h。

为增强纳米颗粒的生物相容性和水溶性，采用配体交换法将sRuNP表面疏水性油酰胺配体替换为聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)。经3或4次纯化以去除未反应配体及游离试剂后，最终获得稳定分散于水相中的sRuNP悬液，备用。

1.3 sRuNP的表征鉴定 采用透射电子显微镜(TEM)对sRuNP的形貌、分散性与粒径分布进行表征鉴定。取sRuNP水溶液(0.05~0.10 mg/ml)超声分散5~10 min后，吸取5~10 μl 滴加于200目铜网碳膜表面，室温静置1~2 min使颗粒吸附；随后用滤纸轻轻吸去多余液体，并用去离子水轻洗1次以去除盐分残留；最后在室温或真空干燥条件下干燥6 h后进行成像。

采用Fiji软件分析sRuNP的粒径。对TEM图像进行比例尺校准后，随机选取颗粒进行等效圆直径测量，每组样品统计颗粒数不少于200个。所得粒径数据导入GraphPad Prism 10.0软件，绘制粒径分布直方图，并采用高斯分布模型进行拟合分析，计算平均粒径及标准差。

采用X线光电子能谱(X-ray photoelectron spectroscopy, XPS)对sRuNP的元素组成、价态及表面化学特征进行分析。采集XPS全谱及元素特定电子轨道即Ru 3p、O 1s和C 1s的高分辨谱，对特征峰进行拟合分析，以评价材料中Ru元素的价态组成及表面有机配体修饰情况。

为评价sRuNP在体外实验条件下的分散稳定性，将不同浓度sRuNP分别置于25 °C生理盐水及37 °C RPMI-1640完全培养基中放置24 h，观察其是否出现肉眼可见的沉淀。

1.4 细胞培养与实验分组 人肺上皮细胞系A549采用含10%胎牛血清(FBS)和1%青霉素-链霉素的RPMI-1640培养基，于37 °C、5% CO_2 恒温培养箱中常规培养。

以0、1、10 $\mu\text{g/ml}$ 浓度的sRuNP分别处理A549细胞24、48、72 h，采用CCK-8法检测A549细胞的存活情况，用于评估sRuNP的细胞生物安全性。

将A549细胞分为对照组、 H_2O_2 模型组(H_2O_2 组)、 H_2O_2 +sRuNP(10 $\mu\text{g/ml}$)组，观察sRuNP能否缓解 H_2O_2 诱导的细胞氧化应激损伤。A549细胞生长至

80%~90%融合度后，每个T25培养瓶中加入1 ml胰酶，室温消化1 min，弃去胰酶加入2 ml培养基将细胞吹打脱落，收集细胞混悬液至15 ml离心管中，1000 \times g离心5 min，弃上清，获得细胞沉淀，加入适当培养基进行重悬，并检测浓度。将细胞重选液稀释至目标浓度后，分别接种于96孔板(100 μl /孔， 5×10^3 个细胞/孔)、12孔板(1 ml/孔， 1.5×10^5 个细胞/孔)和6孔板(2 ml/孔， 5×10^5 个细胞/孔)，培养过夜待细胞贴壁。随后更换为同体积的含100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 的培养基，诱导A549细胞建立体外氧化应激损伤模型^[16-18]， H_2O_2 +sRuNP组予以10 $\mu\text{g/ml}$ sRuNP处理，继续培养24 h。所有实验均独立重复3次。

1.5 CCK-8法检测不同浓度sRuNP下A549细胞活性 A549细胞按分组处理结束后(96孔板)，弃去培养液。每孔加入含CCK-8工作液的培养基(CCK-8:培养基=1:9)，总量100 μl /孔，置37 °C、5% CO_2 孵育30 min；空白孔仅含无细胞的等体积CCK-8工作液。使用酶标仪在450 nm处检测各孔吸光度(OD值)。细胞活性按公式计算：细胞活性(%)=(OD处理组-OD空白孔)/(OD对照组-OD空白孔) \times 100%。每组设6个复孔，实验独立重复3次。

1.6 Calcein-AM/PI双染法检测A549细胞存活 A549细胞按分组处理结束后(12孔板)，弃去培养液，PBS洗涤2次。按试剂盒说明配制Calcein-AM/PI双染工作液(避光操作)，每孔加入适量工作液(12孔板约500 μl /孔)，37 °C避光孵育30 min。孵育结束后PBS轻洗1次，加入少量PBS保持湿润，在荧光显微镜下分别采用Calcein-AM(FITC通道)标记活细胞，其激发波长设定为490 nm(发射绿色荧光)；PI(TRITC通道)用于标记死细胞，其激发波长设定为535 nm(发射红色荧光)，观察并采集图像，成像参数在各组间保持一致。每孔随机选取6个视野拍摄。采用Fiji软件进行荧光面积或细胞计数分析，计算细胞存活率。

1.7 测定A549细胞MDA含量及SOD活性 将A549细胞接种于6孔板，待细胞贴壁后按实验分组给予干预处理；培养24 h后，收集各组细胞培养液。采用MDA检测试剂盒测定细胞MDA含量，按说明书配置反应体系并于规定条件下反应后测定吸光度，根据标准曲线计算MDA含量。采用SOD检测试剂盒测定细胞SOD活性，按说明书反应并测定吸光度，计算SOD活性。各组均独立重复3次。

1.8 Western blotting检测A549细胞中ac-SOD2和SOD2表达水平 将A549细胞接种于6孔板，待细胞贴壁后按实验分组给予干预处理；培养24 h后，弃培养液，PBS洗涤2次。加入预冷RIPA裂解液(含10%蛋白酶抑制剂)，冰上裂解30 min，期间每10

min 轻轻振荡混匀。收集裂解液后于 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min, 取上清。采用 BCA 法测定蛋白浓度并统一定量。加入上样缓冲液, 95 °C 金属浴变性 10 min 后上样, 进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离, 随后转膜至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜。PVDF 膜用快速封闭液室温封闭 1 h。分别加入 SOD2 及 ac-SOD2 一抗(1:1000), 4 °C 孵育过夜。TBST 洗膜 3 次(每次 10 min)后加入相应 HRP 标记二抗(1:5000), 室温孵育 1 h。再次洗膜后采用增强型化学发光法(ECL)显色并成像。采用 Fiji 软件对蛋白条带灰度值进行分析, 以 GAPDH 作为内参, 计算目标蛋白相对表达量(目标蛋白灰度值/GAPDH 灰度值)。实验独立重复 3 次。

1.9 统计学处理 使用 Graphpad Prism 10.0 软件进行统计分析。计量资料均符合正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA), 进一步两两组间比较采用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 sRuNP 的制备表征及体外稳定性观察 通过热分解法成功合成了形态均匀的 sRuNP。TEM 观测结果显示, sRuNP 呈均匀分散的近球形结构, 颗粒边界清晰, 未观察到明显团聚现象(图 1A)。粒径统计分析结果显示, sRuNP 的粒径分布集中, 呈单峰高斯分布特征, 粒径为 (2.00 ± 0.18) nm, 多数颗粒尺寸集中分布于 2 nm 左右(图 1B); 提示本研究制备的 sRuNP 具有良好的尺寸均一性和可控性。

采用 XPS 分析 sRuNP 的元素组成及表面化学特征(图 1C)。XPS 全谱显示样品中存在明显的 Ru、C 及 O 元素特征峰, 提示纳米颗粒由钌核心及表面有机成分构成。高分辨 Ru 3p 谱显示, Ru 主要以 Ru⁰ 和 Ru⁴⁺ 两种价态形式存在; 提示 sRuNP 具有稳定的金属核及部分氧化态共存结构。O 1s 谱可分辨出 M-O、-OH 及 C-O 等组分, 表明材料表面存在金属-氧配位结构及含氧官能团。C 1s 谱中可分辨出 C-C、C-O 及 C=O 等特征峰, 提示 sRuNP 表面存在有机配体修饰(图 1D)。结合材料由疏水有机相成功转移至水相的实验现象, 上述结果从元素组成、价态结构及表面化学层面共同支持配体交换后有机配体成功修饰于 sRuNP 表面, 从而赋予其良好的水溶性与分散性。

在体外稳定性评价中, 0、4、40、400 μg/ml 的 sRuNP 在 25 °C 生理盐水中放置 24 h, 0、1、10 μg/ml 的 sRuNP 在 37 °C RPMI-1640 完全培养基中放置 24 h, 均未观察到明显沉淀; 而 100 μg/ml sRuNP 在 37 °C RPMI-1640 完全培养基中放置 24 h 后可见沉淀形成

(图 1E、F)。因此, 后续细胞实验选取 1 和 10 μg/ml 作为处理浓度。

2.2 不同浓度 sRuNP 对 A549 细胞活性的影响 CCK-8 检测结果显示, 处理 24 h 时, 与对照组比较, 1 μg/ml 和 10 μg/ml sRuNP 处理的 A549 细胞存活率差异均无统计学意义($P > 0.05$); 处理 48 h 时, 10 μg/ml sRuNP 处理的 A549 细胞活性明显下降($P < 0.05$); 处理 72 h 时, 1 μg/ml 和 10 μg/ml sRuNP 处理的 A549 细胞活性均明显降低($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$, 图 2)。

2.3 sRuNP 对 H₂O₂ 诱导的 A549 细胞死亡的影响 Calcein-AM/PI 双重染色结果显示, 与对照组比较, H₂O₂ 组死亡细胞(PI 阳性, 红色)数量明显增多($P < 0.05$); 与 H₂O₂ 组比较, H₂O₂+sRuNP 组 A549 细胞染色以 Calcein 阳性(绿色)活细胞为主, 死亡细胞明显减少($P < 0.05$, 图 3)。

2.4 sRuNP 对 A549 细胞 MDA 含量和 SOD 活性的影响 Elisa 法检测结果显示, 与对照组比较, H₂O₂ 组 A549 细胞的丙二醛(MDA)含量明显增高($P < 0.0001$), 而 SOD 活性明显降低($P < 0.0001$); 与 H₂O₂ 组比较, H₂O₂+sRuNP 组 A549 细胞 MDA 水平明显降低($P < 0.0001$), SOD 活性明显增高($P < 0.0001$, 图 4)。

2.5 sRuNP 对 H₂O₂ 诱导的 A549 细胞中 ac-SOD2/SOD2 比值的影响 Western blotting 检测结果显示, 与对照组比较, H₂O₂ 组 A549 细胞中 ac-SOD2/SOD2 比值明显升高($P < 0.05$); 与 H₂O₂ 组比较, H₂O₂+sRuNP 组 ac-SOD2/SOD2 比值明显降低($P < 0.001$, 图 5)。

3 讨 论

本研究合成的 sRuNP 水溶性和稳定性良好; 在 10 μg/ml、24 h 条件下, sRuNP 对 A549 细胞未见明显细胞毒性, 且可显著改善 H₂O₂ 诱导的细胞活力下降及脂质过氧化水平升高; 调控线粒体抗氧化关键酶 SOD2 的乙酰化状态是 sRuNP 发挥抗氧化活性的可能机制。

从材料特征看, 本研究构建的 sRuNP 属于超微尺寸, 元素组成和表面修饰特征稳定。TEM 及粒径统计结果显示, sRuNP 平均粒径约为 2 nm, 且粒径分布窄; 提示本研究采用的合成方法能够稳定获取尺寸均一的超小纳米结构。已有研究显示, 超小尺寸纳米材料的比表面积更高, 暴露活性位点更多, 有利于增强其表面催化反应效率。本研究中, XPS 全谱检测到明确的 Ru、C 及 O 元素信号, 高分辨 Ru 3p 谱提示 Ru⁰ 和 Ru⁴⁺ 共存, 提示颗粒表面存在金属态与部分氧化态结构; 同时, C 1s 和 O 1s 谱显示颗粒表面存在 C-O、C=O 及 -OH 等官能团, 结合材料由有机相成功转移至水相的实验现象, 支持 PEG 等亲

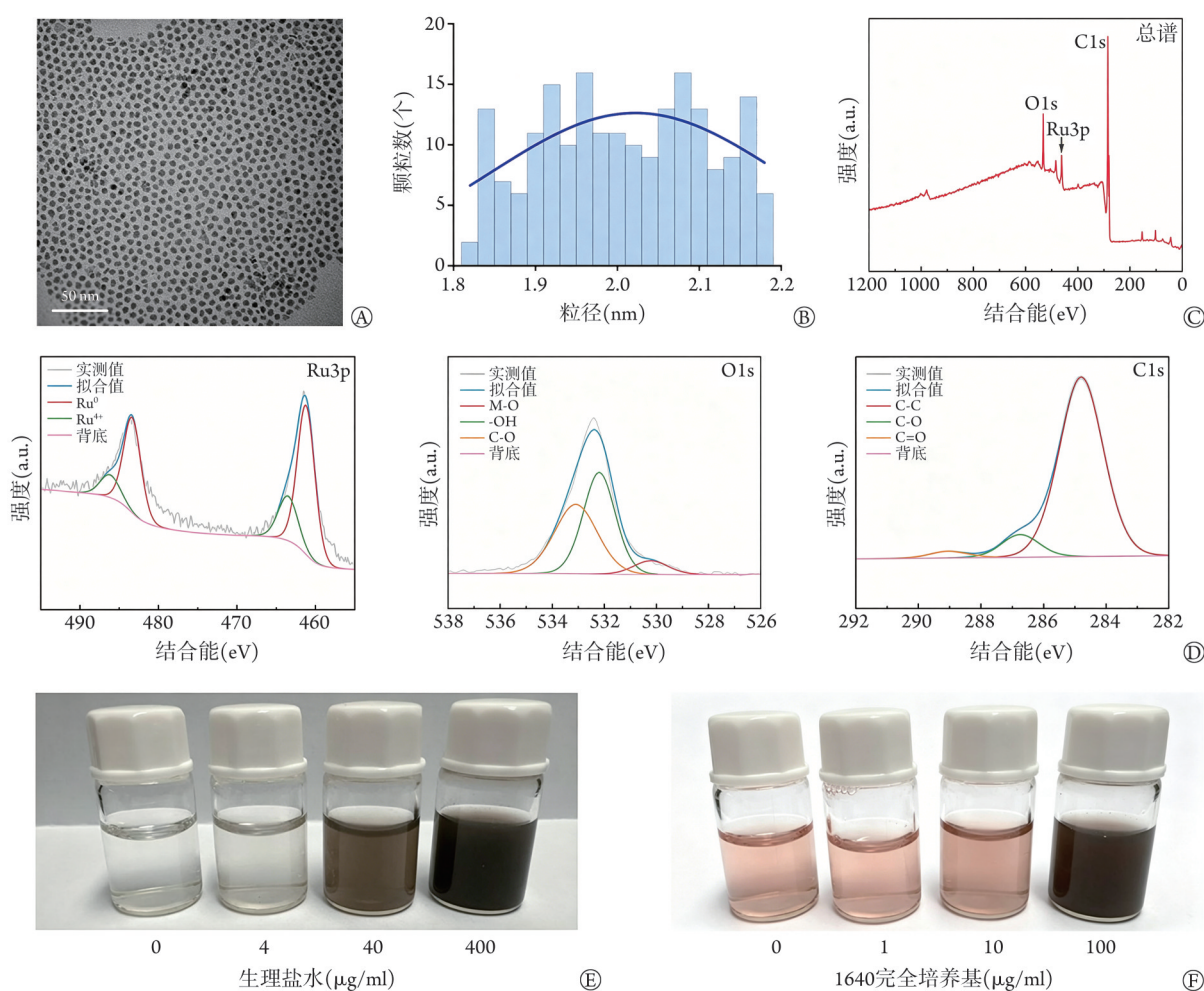


图1 超微可溶性钌纳米颗粒(sRuNP)的形貌、表面化学特征及体外稳定性表征

Fig. 1 Appearance, surface chemical properties, and *in vitro* stability of water-soluble and biocompatible ultrasmall ruthenium nanoparticles (sRuNP)

A. sRuNP in transmission electron microscope image; B. Particle size distribution histogram, particle size of $(2.00 \pm 0.18) \text{ nm}$ ($n=200$); C. X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) total spectrum; D. Ruthenium (Ru) 3p, oxygen (O) 1s, carbon (C) 1s high-resolution spectra; E. Stability in physiological saline; F. Stability in RPMI-1640 complete medium

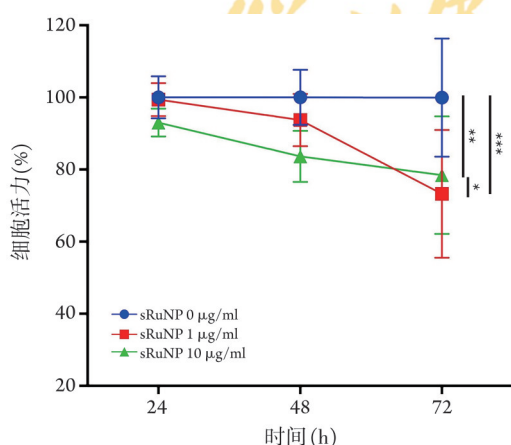


图2 不同浓度超微可溶性钌纳米颗粒(sRuNP)对A549细胞活性的影响(CCK-8检测, $n=6$)

Fig. 2 Effects of water-soluble and biocompatible ultrasmall ruthenium nanoparticles (sRuNP) on activity of A549 cells (CCK-8 assay, $n=6$)

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

水配体成功修饰于sRuNP表面。上述结果提供了材料结构的证据, 也为其水溶性、分散性及后续生物学效应提供了合理的材料学基础。

本研究采用CCK-8法评估sRuNP对A549细胞活性的影响; 结果显示, sRuNP的细胞毒性呈现明显的浓度与时间依赖性, 在关键的24 h, 1 µg/ml组和10 µg/ml组与对照组(0 µg/ml)细胞活性均无明显差异; 提示该浓度区间短期内sRuNP对细胞无明显毒性。但随着作用时间延长, 1 µg/ml组和10 µg/ml组的细胞活性随作用时间延长而缓慢下降, 至72 h, 1 µg/ml组和10 µg/ml组对A549细胞均存在显著毒性; 提示sRuNP长时程暴露对细胞有一定的生长抑制作用。因此, 10 µg/ml的sRuNP在24 h内无明显细胞毒性。参照既往纳米材料相关研究中常采用的“有效剂量用于机制探索”的实验设计原则^[19], 本研究在后续减少H₂O₂诱导细胞死亡及相关机制研究中也

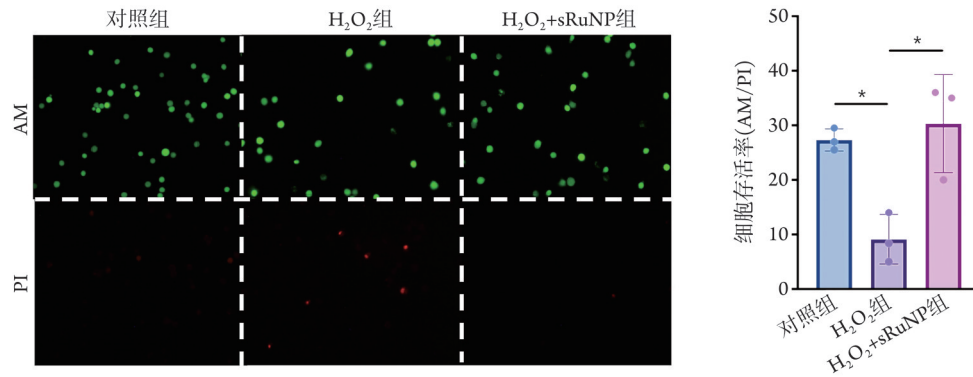


图3 超微可溶性钌纳米颗粒(sRuNP)对H₂O₂诱导的A549细胞死亡的影响(Calcein-AM/PI双重染色, n=3)

Fig. 3 Effects of water-soluble and biocompatible ultrasmall ruthenium nanoparticles (sRuNP) on A549 cell death induced by H₂O₂ (Calcein-AM/PI double staining, n=3)注: *P<0.05

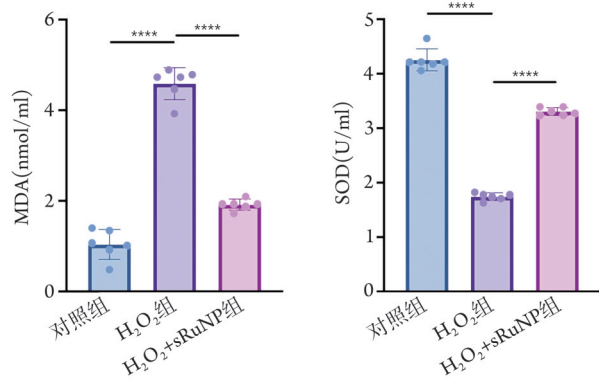


图4 超微可溶性钌纳米颗粒(sRuNP)预处理对A549细胞中MDA含量和SOD活性的影响(n=6)

Fig. 4 Effects of water-soluble and biocompatible ultrasmall ruthenium nanoparticles (sRuNP) on MDA and activity of SOD in A549 cells (n=6)

****P<0.0001。MDA. 丙二醛; SOD. 超氧化物歧化酶

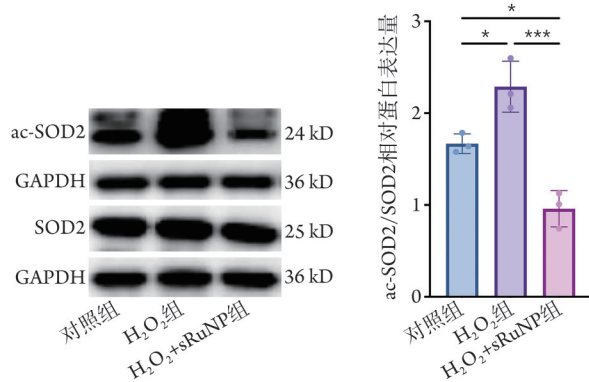


图5 超微可溶性钌纳米颗粒(sRuNP)对H₂O₂诱导的A549细胞SOD2乙酰化水平的影响(Western blotting, n=3)

Fig. 5 Effects of water-soluble and biocompatible ultrasmall ruthenium nanoparticles (sRuNP) on acetylation of SOD2 in A549 cells induced by H₂O₂ (Western blotting, n=3)

*P<0.05, ***P<0.001。SOD2. 超氧化物歧化酶2; ac-SOD2. 乙酰化SOD2

选取10 μg/ml sRuNP作用24 h作为代表性实验条件, 以期阐明sRuNP的抗氧化效应及其潜在分子机制。10~100 μg/ml浓度的sRuNP是否具有同样的生物安全性或更高效的抗氧化效能, 尚待后续研究进一步探讨。

在活/死细胞双染实验中, 通过FITC与TRITC双通道观察发现, sRuNP预处理可明显逆转H₂O₂引起的细胞死亡增加, 有利于维持细胞存活。定性与定量结果均提示, sRuNP在安全剂量下可拮抗氧化应激诱导的细胞死亡, 展现显著的细胞保护效应, 为其在抗氧化治疗领域的应用提供了实验依据。

本研究结果还显示, sRuNP处理可明显提高H₂O₂诱导氧化应激条件下A549细胞的存活率, 降低细胞内MDA含量; 提示其可减轻氧化应激所致的细胞损伤。既往研究认为, 超微尺度金属纳米材料由于表面具有较高比例的低配位原子和活性位点, 能够参与多种活性氧清除反应, 表现出类似“纳米酶”的抗氧化特性^[20-21]。本研究中sRuNP的超微尺寸及良好分散状态, 可能有助于其与活性氧充分接触, 从而增强活性氧的清除效率。

本研究还发现, sRuNP可在一定程度上恢复因氧化应激受损的内源性抗氧化防御系统。H₂O₂处理显著降低细胞内SOD活性, 而sRuNP处理可部分逆转该变化。已知多种信号通路参与维持细胞氧化还原平衡, 其中核因子E2相关因子2(NRF2)介导的抗氧化应答机制研究较为深入。NRF2的激活可促进一系列抗氧化酶的转录, 从而增强细胞对氧化应激损伤的抵抗力^[22-23]。近期研究显示, 线粒体抗氧化酶的翻译后修饰在调控氧化还原稳态中亦十分重要。关键线粒体抗氧化酶SOD2可通过赖氨酸乙酰化调节, 显著影响该酶的活性。SOD2去乙酰化可增强其抗氧化能力, 进而减少细胞内ROS积累, 保护细胞免受氧化应激损伤^[24]。本研究Western blotting分析

结果显示, sRuNP可显著抑制H₂O₂诱导的MnSOD2乙酰化水平升高, 而总SOD2蛋白表达未发生明显改变; 提示sRuNP可能通过调控SOD2的乙酰化状态, 恢复其抗氧化活性, 从而在细胞内形成更为持久和有效的抗氧化防御; 这一机制可能是其发挥保护作用的重要基础。本研究未直接检测经典氧化应激相关信号通路(如NRF2通路), 但可推测, 这些经典抗氧化通路与SOD2乙酰化依赖性调控之间存在交叉作用^[25-26]。因此, 推测sRuNP介导的抗氧化效应可能涉及线粒体抗氧化酶与氧化还原敏感信号通路的协同调控。

本研究结果显示, sRuNP具有良好的早期生物相容性, 可通过调控SOD2乙酰化水平发挥抗氧化保护作用。但本研究仅在体外A549细胞模型中验证了sRuNP的抗氧化作用, 其在体内ALI/ARDS动物模型中的治疗效果及应用的安全性尚待验证; 进一步评估sRuNP在不同氧化应激强度和长期暴露条件下的作用效果, 也有待进一步探究。

本研究成功制备了水溶性和体外生物相容性良好的超微sRuNP; 在H₂O₂诱导的人肺上皮细胞氧化应激模型中, sRuNP能够降低细胞内ROS水平和脂质过氧化程度, 增强内源性抗氧化酶活性, 进而减轻氧化应激所致的细胞损伤。机制研究提示, sRuNP可能通过抑制SOD2的乙酰化修饰、恢复其抗氧化功能而发挥细胞保护作用。上述结果可为钕基纳米材料在氧化应激相关肺损伤中的潜在应用提供实验依据。

【参考文献】

- [1] Matthay MA, Zemans RL, Zimmerman GA, *et al.* Acute respiratory distress syndrome[J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2019, 5(1): 18.
- [2] Bellani G, Laffey JG, Pham T, *et al.* Epidemiology, patterns of care, and mortality for patients with acute respiratory distress syndrome in intensive care units in 50 countries[J]. *JAMA*, 2016, 315(8): 788-800.
- [3] Thompson BT, Chambers RC, Liu KD. Acute respiratory distress syndrome[J]. *N Engl J Med*, 2017, 377(6): 562-572.
- [4] Zwissler B, Kemming G, Habler O, *et al.* Inhaled prostacyclin (PGI₂) versus inhaled nitric oxide in adult respiratory distress syndrome[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 1996, 154(6 Pt 1): 1671-1677.
- [5] Zou B, Saleem D, Jiang W, *et al.* A highly conserved host lipase deacylates oxidized phospholipids and ameliorates acute lung injury in mice[J]. *Elife*, 2021, 10: e70938.
- [6] Zou X, Santa-Maria CA, O'Brien J, *et al.* Manganese superoxide dismutase acetylation and dysregulation, due to loss of SIRT3 activity, promote a luminal B-like breast carcinogenic-permissive phenotype[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2016, 25(6): 326-336.
- [7] Sies H, Jones DP. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21(7): 363-383.
- [8] Kellner M, Noonepalle S, Lu Q, *et al.* ROS signaling in the pathogenesis of acute lung injury (ALI) and acute respiratory distress syndrome (ARDS) [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2017, 967: 105-137.
- [9] Yang L, Tang H, Wang J, *et al.* O-GlcNAcylation attenuates ischemia-reperfusion-induced pulmonary epithelial cell ferroptosis via the Nrf2/G6PDH pathway[J]. *BMC Biol*, 2025, 23(1): 32.
- [10] Xu Y, Lv L, Wang Q, *et al.* Emerging application of nanomedicine-based therapy in acute respiratory distress syndrome[J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2024, 237: 113869.
- [11] Ziros PG, Habeos IG, Chartoumpakis DV, *et al.* NFE2-related transcription factor 2 coordinates antioxidant defense with thyroglobulin production and iodination in the thyroid gland[J]. *Thyroid*, 2018, 28(6): 780-798.
- [12] Forman HJ, Zhang H. Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2021, 20(9): 689-709.
- [13] He L, Li Y, Wu Q, *et al.* Ru(III)-based metal-organic gels: intrinsic horseradish and NADH peroxidase-mimicking nanozyme[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2019, 11(32): 29158-29166.
- [14] Suchomel P, Kvittek L, Pucek R, *et al.* Simple size-controlled synthesis of Au nanoparticles and their size-dependent catalytic activity[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 4589.
- [15] 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[J]. *Small*, 2022, 18(29): e2201558.
- [16] Zulato E, Ciccarese F, Nardo G, *et al.* Involvement of NADPH oxidase 1 in liver kinase B1-mediated effects on tumor angiogenesis and growth[J]. *Front Oncol*, 2018, 8: 195.
- [17] Zubiete-Franco I, Tonks NK. Famotidine increases cellular phospho-tyrosine levels[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2024, 734: 150763.
- [18] Zhu N, Xu J, Ma Q, *et al.* A new lysosome-targeted fluorescent probe for hydrogen peroxide based on a benzothiazole derivative [J]. *Methods*, 2023, 215: 38-45.
- [19] Yan J, Tang Z, Li Y, *et al.* Molybdenum nanodots for acute lung injury therapy[J]. *ACS Nano*, 2023, 17(23): 23872-23888.
- [20] Huang X, He D, Pan Z, *et al.* Reactive-oxygen-species-scavenging nanomaterials for resolving inflammation[J]. *Mater Today Bio*, 2021, 11: 100124.
- [21] Tarricone G, Castagnola V, Mastronardi V, *et al.* Catalytic bioswitch of platinum nanozymes: mechanistic insights of reactive oxygen species scavenging in the neurovascular unit[J]. *Nano Lett*, 2023, 23(10): 4660-4668.
- [22] Zuo J, Zhang Z, Li M, *et al.* The crosstalk between reactive oxygen species and noncoding RNAs: from cancer code to drug role[J]. *Mol Cancer*, 2022, 21(1): 30.
- [23] Zuo L, Ye M, Chen L, *et al.* Anthocyanin-rich berries and their bioactive compounds in ocular health: mechanisms and therapeutic potential[J]. *J Agric Food Chem*, 2025, 73(38): 23724-23741.
- [24] Zhang M, Lin X, He J, *et al.* SENP1-Sirt3 axis regulates type II alveolar epithelial cell activity to confer resistance against oxidative damage in lung tissue[J]. *Redox Biol*, 2025, 85: 103752.
- [25] Yue MY, Zhao WR, Wang SS, *et al.* *Salviae miltiorrhizae radix et rhizoma* protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity: a

systematic review[J]. *Phytomedicine*, 2025, 148: 157244.
[26] Hu B, Tian T, Li XT, *et al.* Dexmedetomidine postconditioning attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury by activating the

Nrf2/Sirt3/SOD2 signaling pathway in the rats[J]. *Redox Rep*, 2023, 28(1): 2158526.

(责任编辑: 蒋铭敏)



解放军医学杂志®