

核酸适体功能化纳米材料靶向识别与抗氧化评价

李西兰^{1,2}, 徐中胜^{3*}, 邹滔^{2*}, 王海波^{1*}

(1. 四川大学轻工科学与工程学院, 四川 成都 610065; 2. 陆军军医大学(第三军医大学)第一附属医院全军烧伤研究所, 重庆 400038; 3. 重庆医科大学第二附属医院放射科, 重庆 400038)

摘要: 该文建立了一种可区分材料固有活性氧清除能力与靶向增效贡献的三维系统评价策略, 联合无细胞化学法与细胞水平评价法, 从分子结合、细胞摄取、固有ROS清除及细胞保护四个维度系统评估核酸适体功能化纳米材料的抗氧化性能。采用溶胶-凝胶法与水热法制备锰掺杂中空介孔二氧化硅纳米颗粒(MSN), 经聚烯丙基胺盐酸盐(PAH)修饰后依次共价偶联4-羟基-2, 2, 6, 6-四甲基哌啶氮氧自由基(Tempol)与晚期糖基化终末产物受体(RAGE)靶向核酸适体(Apt), 成功制备了核酸适体功能化活性氧(ROS)清除复合纳米材料TMSN@Apt。利用透射电子显微镜(TEM)、能谱面分析(STEM-EDS mapping)及Zeta电位对所制备的材料进行表征。结果表明, MSN呈球形中空结构, 粒径为(87.94 ± 11.14) nm, 壳壁可见介孔孔道, Mn、O、Si元素均匀分布于壳壁, Zeta电位由PAH修饰后的(23.0 ± 0.3) mV经Tempol接枝升至(30.3 ± 1.1) mV, 再经Apt偶联降至(-2.1 ± 0.3) mV, 证实各组分成功修饰。流式检测显示TMSN@Apt与RAGE蛋白的结合荧光强度相对随机序列对照提升约12.4倍, 且与高表达RAGE的肺泡上皮细胞MLE-12呈浓度依赖性结合。激光共聚焦显微成像显示TMSN@Apt经RAGE介导进入细胞, 而随机序列对照组细胞内未见明显材料信号。TMSN@Apt在无细胞体系中达到ROS清除平台期的浓度为0.2 mg/mL, 而在细胞水平仅需0.05 mg/mL即可显著降低胞内ROS水平, 阳性率由(82.30 ± 1.91)%降至(13.93 ± 1.33)%, 并减轻细胞凋亡, 凋亡率由(20.94 ± 2.18)%降至(7.85 ± 0.61)%, 起效浓度显著低于无细胞体系平台浓度, 揭示了适体介导靶向富集带来的浓度-效应增益规律。该三维评价策略实现了对材料固有ROS清除能力与靶向增效贡献的区分评价, 为靶向纳米材料抗氧化性能的精准评估及生物应用剂量优化提供了方法学参考。

关键词: 核酸适体; 纳米材料; 靶向识别; 抗氧化活性; 活性氧清除

中图分类号: O766.1; O629.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(XXXX)XX-0001-09

Targeted Recognition and Antioxidant Evaluation of ROS-Scavenging Nanomaterials Functionalized with Aptamers

LI Xi-lan^{1,2}, XU Zhong-sheng^{3*}, ZOU Tao², WANG Hai-bo¹

(1. College of Biomass Science and Engineering, Sichuan University, Chengdu 610065, China; 2. Institute of Burn Research, the First Affiliated Hospital of Army Medical University (the Third Military Medical University), Chongqing 400038, China; 3. Department of Radiology, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: The in vivo antioxidant efficacy of nanomaterial-based reactive oxygen species (ROS) scavengers is governed by both their intrinsic ROS scavenging capacity and biological factors, including cellular interactions, internalization efficiency, and intracellular distribution. Currently, cell-free chemical assays and cellular-level evaluation methods for assessing the antioxidant properties of nanomaterials are conducted independently, precluding the differentiation of intrinsic ROS scavenging activity from targeting efficiency. Manganese-doped hollow mesoporous silica nanoparticles (MSN) was first prepared by a sol-gel method followed by hydrothermal treatment, subsequently surface-modified with polyallylamine hydrochloride (PAH), and then sequentially conjugated with Tempol and the aptamer via carbodiimide chemistry. Comprehensive characterization was

收稿日期: 2026-06-10; **修回日期:** 2026-07-02

基金项目: 国家自然科学基金(82202447); 重庆市自然科学基金(CSTB2022NSCQ-MSX0154, CSTB2024NSCQ-MSX0394)

***通讯作者:** 徐中胜, 硕士, 助理研究员, 研究方向: 纳米药物递送系统构建及应用研究, E-mail: zhongshengxu@cqmu.edu.cn;

邹滔, 博士, 助理研究员, 研究方向: 组织再生与免疫调控, E-mail: zoutao9210@163.com;

王海波, 博士, 教授, 研究方向: 生物质基功能材料、生物医用高分子材料合成及应用研究, E-mail: whb6985@scu.edu.cn

performed using transmission electron microscopy (TEM), scanning transmission electron microscopy-energy dispersive X-ray spectroscopy (STEM-EDS) mapping, and dynamic light scattering-based zeta potential analysis. TEM images revealed spherical hollow architectures with diameter of 87.94 ± 11.14 nm and mesoporous channels in the shell walls. STEM-EDS elemental mapping confirmed the uniform distribution of Mn, Si, and O throughout the silica framework without phase segregation. Zeta potential measurements demonstrated a stepwise surface charge reversal: from negative (-20.0 ± 1.4 mV) to positive (23.0 ± 0.3 mV) after PAH coating, further increasing to 30.3 ± 1.1 mV upon Tempol grafting, and finally decreasing to -2.1 ± 0.3 mV after aptamer conjugation, thereby verifying the successful layer-by-layer functionalization. The targeted recognition and antioxidant efficacy of TMSN@Apt were evaluated from four aspects: molecular binding to purified RAGE protein, cellular uptake by H_2O_2 -stimulated MLE-12 alveolar epithelial cells, intrinsic ROS-scavenging capacity in cell-free systems, and cytoprotection against oxidative stress-induced apoptosis. Flow cytometric analysis demonstrated that TMSN@Apt exhibited approximately 12.4-fold higher binding affinity to immobilized RAGE protein compared to the random sequence control. Concentration-dependent cellular association was observed at 12.5, 25, and 50 $\mu\text{g/mL}$, with mean fluorescence intensity increasing proportionally. Laser confocal scanning microscopy further revealed obvious intracellular colocalization of TMSN@Apt with RAGE, confirming receptor-mediated internalization, whereas no significant intracellular fluorescence was detected in the random sequence control group. In cell-free assays, TMSN@Apt displayed broad-spectrum ROS-scavenging activity against superoxide anion ($\text{O}_2^{\cdot -}$), hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$), and hydrogen peroxide (H_2O_2) in a dose-dependent manner, reaching scavenging efficiencies of 75.6%, 76.7%, and 80.1%, respectively, at 0.2 mg/mL. Remarkably, at the cellular level, only 0.05 mg/mL was required to reduce intracellular ROS levels from $(82.30 \pm 1.91)\%$ to $(13.93 \pm 1.33)\%$ and to attenuate total apoptotic rates from $(20.94 \pm 2.18)\%$ to $(7.85 \pm 0.61)\%$ in H_2O_2 -challenged cells. This substantial concentration-efficacy discrepancy between cell-free and cell-based systems highlights the critical contribution of aptamer-mediated targeted enrichment and intracellular accumulation. The established methodology enables quantitative differentiation between intrinsic antioxidant capacity and targeting-enhanced biological efficacy, providing a robust framework for precise performance evaluation and rational dosage optimization of aptamer-functionalized nanomaterials in therapeutic applications.

Key words: aptamer; nanomaterial; targeted recognition; antioxidant activity; reactive oxygen species scavenging

过量 ROS 引起的氧化应激是心血管疾病、神经退行性疾病及炎症等多种病理发展的主要驱动因素,清除过量 ROS 也成为干预这些疾病的重要策略^[1-3]。近年来,基于纳米材料的 ROS 清除剂发展迅速,其结构易于改变、催化活性可调及稳定性高等优势使其在氧化应激相关疾病治疗中展现出广阔前景^[4-7]。然而,纳米材料进入生物体系后,其抗氧化效果不仅取决于材料的固有 ROS 清除能力,还会受到细胞相互作用、内化过程及其胞内分布等生物学因素的影响,因此精准评估纳米材料的抗氧化性能是推动临床应用的关键前提^[8-10]。

目前,纳米材料抗氧化性能的评价主要依赖无细胞化学法和细胞水平评价法两类策略。无细胞化学法采用基于分光光度法的试剂盒测定材料的类超氧化物歧化酶(SOD)和类过氧化氢酶(CAT)活性,可定量表征材料的固有 ROS 清除能力,但无法评估材料与细胞的结合及细胞内化过程^[11-14]。细胞水平评价法采用 2', 7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯(DCFH-DA)荧光探针和膜联蛋白 V-FITC/碘化丙啶(Annexin V-FITC/PI)双染法分别评估胞内 ROS 水平和细胞凋亡率,以评价材料的细胞保护效应,但难以区分固有清除能力与细胞摄取等生物学过程对总体抗氧化效能的贡献,且检测体系易受细胞培养条件干扰^[15-17]。两类方法相互独立,无法建立固有活性与细胞效应之间的定量关联。核酸适体功能化纳米材料的抗氧化效能解析面临更为复杂的挑战。此类材料虽可通过特异性识别实现主动靶向与精准富集,但其细胞水平效能是材料固有清除能力与适体介导靶向富集效应协同叠加的结果。然而,现有评价方法的根本局限在于,无细胞化学法仅能测定材料的固有 ROS 清除活性,无法反映靶向过程带来的增益;而细胞水平法则将两者混为一体,无法定量区分固有清除能力与靶向增效的独立贡献,导致

对材料性能的误判及给药浓度的盲目设计^[18]。因此，亟需建立整合无细胞与细胞水平、能够解构上述协同效应的系统评价策略。

针对这一研究空白，本文以核酸适体功能化的 ROS 清除复合纳米材料 TMSN@Apt 为分析对象，构建了一套四维系统评价体系。通过流式细胞术和激光共聚焦显微成像评估分子结合与细胞摄取（靶向性验证），通过比色法定量无细胞体系中的固有 ROS 清除能力（基线效能），通过 DCFH-DA 荧光探针和 Annexin V-FITC/PI 双染法评估细胞保护效应（综合效能）。该策略的核心创新在于通过交叉比较无细胞体系与细胞水平的浓度-效应关系，实现固有清除能力与靶向增效贡献的定量区分，并明确靶向纳米材料在生物体系中实际起效浓度与无细胞体系平台浓度的差异规律，为核酸适体功能化纳米材料的性能评价及生物应用剂量设计提供方法学参考。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

正硅酸乙酯 (TEOS)、氨水 ($\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 28%)、无水乙醇、氯化铵 (NH_4Cl)、氯化锰 ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)、聚烯丙基胺盐酸盐 (PAH)、4-羟基-2, 2, 6, 6-四甲基哌啶氮氧自由基 (Tempol)、N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS)、1-(3-(2-甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺 (EDC)、2-吗啉乙磺酸 (MES) 均购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司。核酸适体 Apt (序列 5'-COOH-CATTCTTAGATTTTTGTCTCACTTAGGTGTAGATGGTGAT-3') 及随机对照序列 RS 均委托生工生物工程(上海)股份有限公司固相合成。针对荧光检测实验需求，二者统一在序列第 19 位胸腺嘧啶碱基处引入 Int 6-FAM-dT 或 Int CY5.5 dT 嵌入型荧光单体，实现 6-FAM、Cy5.5 荧光基团共价标记。Ni-NTA 琼脂糖微珠 (Ni Sepharose High Performance) 购自 Cytiva 公司。DCFH-DA 购自 Sigma-Aldrich 公司。Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒购自联科生物技术有限公司(杭州)。胎牛血清、0.25% 胰酶-EDTA 购自 HyClone 公司(美国)。DMEM/F-12 培养基购自 Gibco 公司(美国)。小鼠肺泡上皮细胞系 MLE-12 购自中乔新舟生物科技有限公司(上海)。超氧阴离子自由基检测试剂盒、羟基自由基检测试剂盒和过氧化氢检测试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。

透射电子显微镜 (HT7700)，日立高新技术公司 (Hitachi High-Tech, 日本东京)；纳米粒度及 Zeta 电位分析仪 (Zetasizer Nano ZS)，马尔文帕纳科公司 (Malvern Panalytical, 英国马尔文)；声波聚焦流式细胞仪 (Attune NxT)，赛默飞世尔科技公司 (美国马萨诸塞州)；高分辨转盘共聚焦显微镜 (SpinSR)，奥林巴斯公司 (Olympus, 日本东京)。

1.2 TMSN@Apt 的制备

采用溶胶-凝胶法制备单分散二氧化硅纳米颗粒 (SN)^[19, 20]。在 25℃ 条件下，将无水乙醇、去离子水、氨水和正硅酸乙酯混合反应 20 h，离心 (12 000 r/min, 10 min) 收集 SN。随后采用水热法制备锰掺杂中空介孔二氧化硅纳米颗粒 (MSN)。将 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、 NH_4Cl 、氨水与 SN 混合，于 180℃ 水热处理 8 h，产物分别经乙醇和水洗涤、离心 (12 000 r/min, 10 min) 后干燥备用。

将 MSN 配制为 1 mg/mL 的分散液，取 5 mL (含 MSN 5 mg)，加入 10 mg PAH，室温搅拌 2 h。PAH 通过静电吸附修饰于 MSN 表面 (记为 MSN/PAH)，为后续偶联提供氨基活性位点。随后，采用共价偶联法依次连接 Tempol 和 Apt。将 5 mg Tempol 溶于 MES 缓冲液 (0.1 mol/L, pH 5.5) 中，加入 EDC 和 NHS，活化 30 min。将上述溶液与 5 mg MSN (PAH 修饰) 于 PBS 缓冲液 (pH 7.4) 中混合，室温反应过夜，得接枝 Tempol 的 MSN (TMSN)。将 5 OD (12.7 nmol) 的核酸适体 Apt 溶于 MES 缓冲液 (0.1 mol/L, pH 5.5) 中，加入 EDC 和 NHS，活化 30 min。将 1.8 mg TMSN 分散于 PBS 缓冲液 (pH 7.4) 中，加入活化后的 Apt 溶液，4℃ 反应过夜，离心洗涤后即得 TMSN@Apt。采用相同方法制备随机序列对照材料 TMSN@RS。

1.3 细胞培养与氧化应激模型建立

MLE-12 细胞培养于含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素-链霉素的 DMEM/F-12 培养基中，置于 37℃、5% CO_2 的培养箱中培养。待细胞生长至 80%~90% 融合度时，用 0.25% 胰酶消化传代。取对数生长期细胞用于后续实验。

为建立 RAGE 高表达细胞模型^[21], 将 MLE-12 细胞与 200 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 共孵育 6 h。通过免疫荧光染色验证 RAGE 表达上调后用于靶向识别实验。

1.4 靶向识别分析

采用流式细胞术检测 TMSN@Apt 与 RAGE 蛋白的结合。将重组 His-RAGE 蛋白通过 His 标签亲和固定于 Ni-NTA Sepharose High Performance 微珠上, 经 RAGE 抗体验证偶联成功后, 将 TMSN@Apt 与 RAGE-beads 共孵育 30 min, 洗涤后采用流式细胞仪检测 FAM 荧光强度。

为评估细胞水平的靶向结合能力, 将不同浓度 TMSN@Apt (12.5、25、50 $\mu\text{g/mL}$) 与经 H_2O_2 预处理的 MLE-12 细胞共孵育 1 h, 洗涤后采用流式细胞仪检测细胞荧光强度。采用共聚焦显微镜观察材料与 RAGE 的共定位。细胞与 TMSN@Apt (50 $\mu\text{g/mL}$) 孵育后, 固定并进行 RAGE 免疫荧光染色, DAPI 染核, 于共聚焦显微镜下观察。

1.5 活性氧清除能力测定

采用商品化试剂盒(南京建成生物工程研究所)测定 TMSN@Apt 的活性氧清除能力。超氧阴离子($\text{O}_2^{\cdot-}$)和羟基自由基($\cdot\text{OH}$)清除活性分别采用超氧阴离子自由基检测试剂盒和羟基自由基检测试剂盒测定。将不同浓度 TMSN@Apt (0~1.0 mg/mL) 加入黄嘌呤-黄嘌呤氧化酶反应体系中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, 测定 550 nm 处吸光度。过氧化氢(H_2O_2)清除活性采用过氧化氢检测试剂盒测定。将不同浓度 TMSN@Apt (0~0.8 mg/mL) 与 200 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 在 PBS 缓冲液 (pH 7.4) 中于 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 24 h, 测定 405 nm 处吸光度。

1.6 细胞水平抗氧化功能分析

取对数生长期的 MLE-12 细胞, 以每孔 3×10^4 密度接种至 24 孔板, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件培养至细胞融合度达到 30%~40%。加入不同浓度 TMSN@Apt (25, 50 $\mu\text{g/mL}$) 预处理 1 h, 随后加入 H_2O_2 (终浓度 200 μM), 继续培养 24 h。

细胞内活性氧检测: 去除培养基, PBS 洗涤细胞, 加入无血清培养基配制的 DCFH-DA (10 μM) 工作液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 20 min。离心 (300 $\times g$, 5 min) 收集细胞, 重悬至 PBS 后采用流式细胞仪检测 FITC 通道荧光强度, FlowJo 软件分析数据。

细胞凋亡检测: 收集细胞及上清培养基, 离心 (300 $\times g$, 5 min), PBS 重悬后加入 Annexin V-FITC 和 PI, 室温避光孵育 5 min, 采用流式细胞仪检测 FITC 和 PI 通道荧光强度, FlowJo 软件分析凋亡率 (早期凋亡与晚期凋亡之和)。

2 结果与讨论

2.1 TMSN@Apt 的制备与形貌表征

分别采用透射电子显微镜 (TEM)、能谱面分析 (STEM-EDS mapping) 及 Zeta 电位对 “1.2” 制备的 TMSN@Apt 进行表征。TEM 图像显示, MSN 呈球形中空结构, 壳壁可见介孔孔道 (图 1A, 左); 粒径统计分析显示, 颗粒粒径呈高斯分布, 平均粒径为 87.94 ± 11.14 nm ($n = 198$), $R^2 = 0.9733$, 表明样品具有良好的均一性 (图 1A, 右)。能谱面分析 (STEM-EDS mapping) 结果显示, Mn、O、Si 元素在壳壁范围内均匀分布, 未出现明显富集或分相, 表明 Mn 元素已成功掺杂进入二氧化硅骨架 (图 1B)。

Zeta 电位测定结果显示 (图 1C), 修饰 PAH 后, MSN 表面 Zeta 电位由负 (-20.0 ± 1.4) 转正 (23.0 ± 0.3 mV), 表明 PAH 已成功修饰于材料表面。接枝 Tempol 后, 电位升至 30.3 ± 1.1 mV; 进一步偶联 Apt 后, 电位降至 -2.1 ± 0.3 mV。核酸适体偶联后电位由正转负, 证实适体已成功接枝于材料表面。由于 TMSN@Apt 在水相中 Zeta 电位接近零, 动态光散射 (DLS) 无法获得可靠的水合粒径分布, 故粒径数据以 TEM 统计结果为准。上述表征结果表明, TMSN@Apt 具备中空介孔结构、元素均匀掺杂^[22]和核酸适体成功偶联^[23, 24]的特性, 为其后续的识别与抗氧化活性分析提供了材料基础。

A. TEM image (Left, scale bar: 100 nm) and particle size distribution histogram with Gaussian fitting curve (right); B. HAADF-STEM image and corresponding elemental mapping of Mn, Si, and O (scale bar: 50 nm); C. Zeta potential changes during stepwise modification (MSN/PAH, TMSN,

TMSN@Apt)。Data are presented as mean $\pm$ SD ($n=3$) (A. TEM 图像 (左, 标尺 100 nm)、粒径分布直方图及高斯拟合曲线 (右); B. HAADF-STEM 图像及对应元素面分布 (Mn、Si、O), 标尺 50 nm; C. Zeta 电位随逐层修饰的变化 (MSN/PAH、TMSN、TMSN@Apt), 数据以平均值 $\pm$ 标准差表示 ($n=3$))

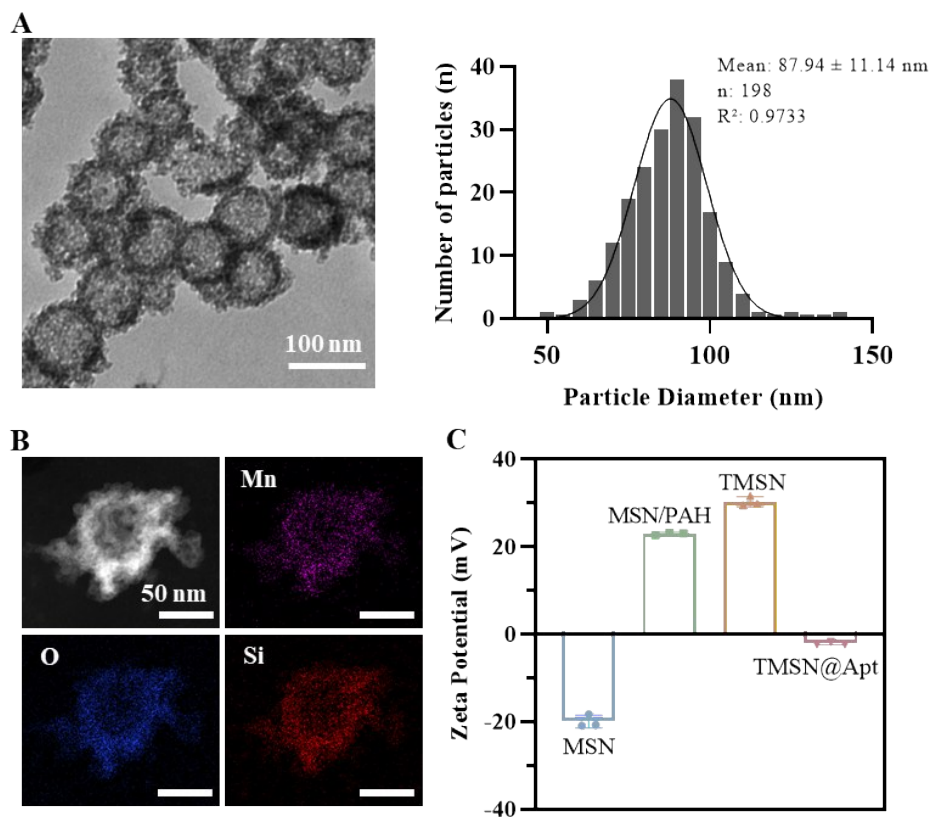


图 1 TMSN@Apt 的表征

Fig. 1 Characterization of TMSN@Apt

2.2 识别与细胞摄取分析

为验证核酸适体功能化后材料的靶向识别能力, 首先通过流式细胞术检测 TMSN@Apt 与 RAGE 蛋白的结合。采用 mfold 软件模拟 Apt 的二级结构 (图 2A), 其自由能 dG 为 -6.97 kcal/mol, 表明该序列具有稳定的二级结构。将重组 RAGE 蛋白固定于 Ni-NTA 琼脂糖微珠表面, 与 TMSN@Apt 孵育后进行流式检测。结果显示 (图 2B), 游离适体 (Apt) 的平均荧光强度 (MFI = 870) 较随机序列对照 (RS, MFI = 359) 提升约 2.4 倍, 表明适体对 RAGE 蛋白具有特异性识别能力^[25]。TMSN@Apt 的 MFI 达 4455, 较游离适体提升约 5.1 倍, 较 RS 提升约 12.4 倍, 表明纳米载体通过多价呈现策略显著增强了适体-RAGE 的结合效率。结果表明, 增强效应并非源于适体本身识别能力的改变, 而是通过局部浓度效应与多位点协同结合产生的亲和力 (avidity) 效应^[26], 使纳米载体表面高密度负载的适体与固定化 RAGE 蛋白形成更稳定的多点结合复合物。

进一步考察 TMSN@Apt 与高表达 RAGE 的肺泡上皮细胞的结合能力。以 200 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 刺激 MLE-12 细胞 6 h 建立 RAGE 高表达模型, 将不同浓度 (12.5, 25, 50 $\mu\text{g/mL}$) 的 TMSN@Apt 与细胞共孵育后进行流式检测。结果显示 (图 2C), 随 TMSN@Apt 浓度的升高, MFI 从 724 分别升至 1295、1673 和 2351, 呈现良好的浓度依赖性。

共聚焦显微成像结果 (图 2D) 进一步显示, 与 TMSN@Apt 孵育的细胞中, 玫红色荧光 (Cy5.5 标记材料) 在细胞内清晰可见, 且与 RAGE 绿色荧光共定位明显, 表明材料经 RAGE 介导进入细胞。相比之下, 随机序列修饰的 TMSN@RS 对照组未见明显细胞信号。上述结果共同证实, 核酸适体功能化材料可通过 RAGE 识别途径特异性结合靶细胞并被摄取进入胞内。

A. Secondary structure simulation of Apt using mfold; B. Flow cytometric detection of aptamer-RAGE

binding (fluorescence intensity of random sequence RS, free aptamer Apt, and TMSN@Apt with RAGE-beads); C. Concentration-dependent binding of TMSN@Apt to MLE-12 cells (12.5, 25, 50 $\mu\text{g/mL}$) detected by flow cytometry; D. Confocal microscopy imaging of TMSN@Apt colocalization with RAGE and cellular uptake (TMSN@Apt vs TMSN@RS; green: RAGE, magenta: TMSN@Apt, blue: nucleus), scale bar: 20 μm (A. Apt 的二级结构模拟; B. 流式细胞术检测适体与 RAGE 蛋白的结合 (随机序列 RS、游离适体 Apt、TMSN@Apt 与 RAGE-beads 的结合荧光强度); C. 流式细胞术检测 TMSN@Apt 与 MLE-12 细胞的浓度依赖性结合 (12.5, 25, 50 $\mu\text{g/mL}$); D. 共聚焦显微成像检测 TMSN@Apt 在细胞内的分布及其与 RAGE 的共定位 (TMSN@Apt vs TMSN@RS, 绿色: RAGE, 玫红色: 纳米材料, 蓝色: 细胞核)。标尺: 20 μm)

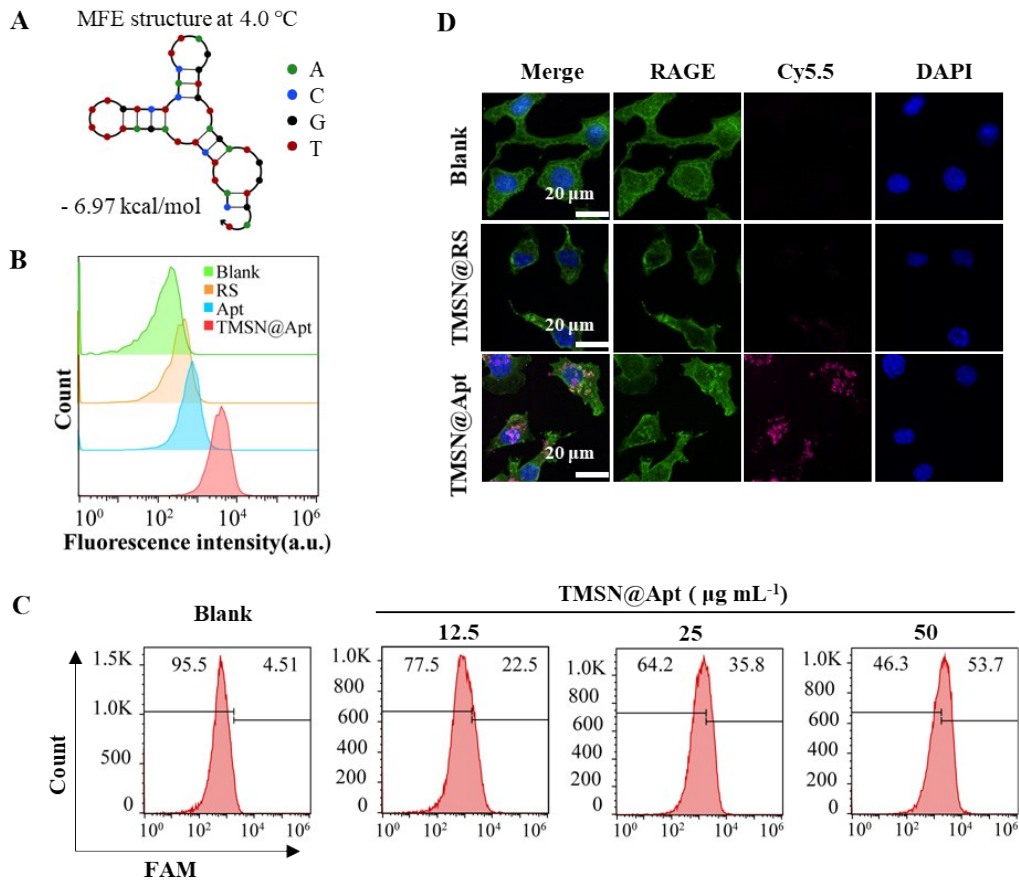


图2 TMSN@Apt 的靶向识别与细胞摄取分析

Fig. 2 Targeted recognition and cellular uptake analysis of TMSN@Apt

2.3 活性氧清除能力分析

采用试剂盒测定 TMSN@Apt 对超氧阴离子 ($\text{O}_2^{\cdot-}$) (图 3A)、羟基自由基 ($\cdot\text{OH}$) (图 3B) 和过氧化氢 (H_2O_2) (图 3C) 的清除能力。结果显示, TMSN@Apt 对 3 种 ROS 的清除率均呈浓度依赖性, 随材料的浓度升高而增加。当 TMSN@Apt 浓度为 0.025 mg/mL 时, 对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 、 $\cdot\text{OH}$ 和 H_2O_2 的清除率分别为 13.2%、15.5% 和 8.8%; 当浓度增至 0.1 mg/mL 时, 清除率分别升至 64.1%、61.7% 和 64.7%; 继续增至 0.2 mg/mL 时, 清除率分别达到 75.6%、76.7% 和 80.1%; 0.4 mg/mL 时, 清除率分别为 80.1%、79.9% 和 83.7%; 0.8 mg/mL 时, 清除率分别为 86.3%、83.8% 和 84.6%, 表明 0.2 mg/mL 后清除率增幅趋缓, 基本进入平台期。上述结果表明, TMSN@Apt 具备同时清除 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 、 $\cdot\text{OH}$ 和 H_2O_2 的能力, 可能源于材料中 Tempol 与锰掺杂组分的协同贡献, Tempol 作为氮氧自由基可清除 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 和 $\cdot\text{OH}$ [27], 锰掺杂可通过价态变化清除 H_2O_2 和 $\cdot\text{OH}$ [28], 二者共同作用使材料对多种 ROS 均表现出浓度依赖性的清除效果。

A. Scavenging rate of superoxide anion ($\text{O}_2^{\cdot-}$); B. scavenging rate of hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$); C. scavenging rate of hydrogen peroxide (H_2O_2). Assay conditions: 37 °C, pH 7.4; Y-axis: scavenging

rate (%) (A. O_2^- 清除率; B. $\cdot OH$ 清除率; C. H_2O_2 清除率。测定条件: $37^\circ C$, pH 7.4)

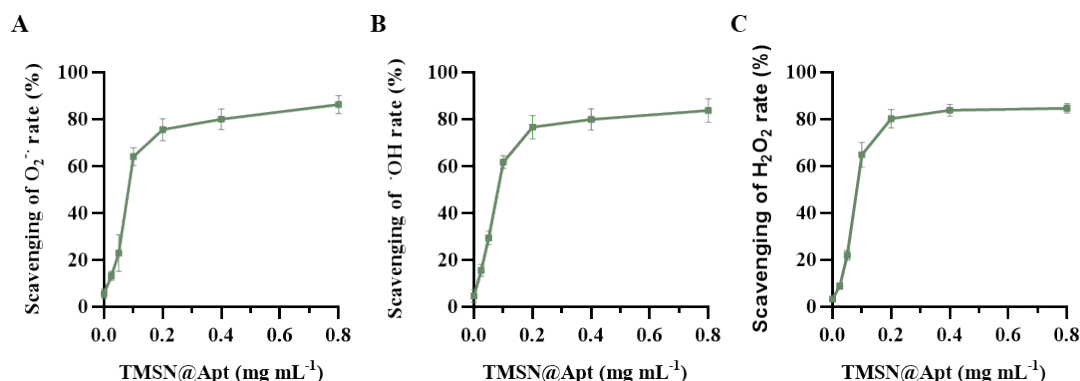


图3 TMSN@Apt的活性氧清除能力

Fig. 3 ROS-scavenging capability of TMSN@Apt

2.4 细胞保护作用分析

在明确活性氧清除能力的基础上, 进一步在细胞水平评价TMSN@Apt的细胞保护作用。采用DCFH-DA荧光探针检测胞内活性氧水平。结果(图4A、B)显示, $200\ \mu\text{mol/L}$ H_2O_2 刺激24 h后, MLE-12细胞ROS阳性率由阴性对照的(10.43 ± 1.37)%升至(82.30 ± 1.91)%; 经 $25\ \mu\text{g/mL}$ TMSN@Apt预处理后, 阳性率降至(49.17 ± 2.00)%; 当浓度提高至 $50\ \mu\text{g/mL}$ 时, 阳性率进一步降至(13.93 ± 1.33)%。为明确靶向适体对细胞保护作用的具体贡献, 本研究进一步考察了随机序列修饰的TMSN@RS在细胞水平的抗氧化效果。结果显示(图4A、B), 经 $25\ \mu\text{g/mL}$ 和 $50\ \mu\text{g/mL}$ TMSN@RS预处理后, ROS阳性率分别降至(70.13 ± 1.99)%和(51.73 ± 2.39)%, 显著高于同浓度TMSN@Apt处理组。采用Annexin V-FITC/PI双染法检测细胞凋亡水平。流式散点图(图4C、D)显示, 阴性对照组总凋亡率为(5.45 ± 1.26)%; $200\ \mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理6 h后, 总凋亡率升至(20.94 ± 2.18)%; 经 $25\ \mu\text{g/mL}$ TMSN@Apt预处理后, 总凋亡率降至(13.17 ± 0.32)%; 当浓度提高至 $50\ \mu\text{g/mL}$ 时, 总凋亡率进一步降至(7.85 ± 0.61)%。TMSN@RS处理后, $25\ \mu\text{g/mL}$ 和 $50\ \mu\text{g/mL}$ 浓度下的总凋亡率分别为(16.29 ± 1.36)%和(11.28 ± 1.19)%(图4C、D), 同样显著高于同浓度TMSN@Apt处理组。由于TMSN@RS与TMSN@Apt具有完全相同的无机内核与Tempol负载, 两者在无细胞体系中的固有ROS清除能力基本一致, 因此细胞水平的显著差异直接归因于适体介导的靶向识别与胞内富集。

A. DCFH-DA flow cytometry analysis of intracellular ROS scavenging by TMSN@Apt or TMSN@RS in H_2O_2 -stimulated MLE-12 cells (Blank, Negative control, H_2O_2 positive control, 25 and $50\ \mu\text{g/mL}$ TMSN@Apt or TMSN@RS pretreatment groups). The numbers indicate the percentage of ROS-positive cells; B. Statistical bar graph of ROS-positive rates for each group. Data are presented as mean $\pm$ SD ($n=3$); C. Annexin V-FITC/PI double staining flow cytometry analysis of apoptosis inhibition by TMSN@Apt or TMSN@RS in H_2O_2 -stimulated MLE-12 cells (Negative control, H_2O_2 positive control, 25 and $50\ \mu\text{g/mL}$ TMSN@Apt or TMSN@RS pretreatment groups). The numbers indicate the total apoptosis rate (early apoptosis + late apoptosis); D. Statistical bar graph of total apoptosis rates for each group. Data are presented as mean $\pm$ SD ($n=3$) (A. DCFH-DA 流式细胞术检测TMSN@Apt或TMSN@RS对 H_2O_2 诱导的胞内活性氧的清除效果(空白、阴性对照、 H_2O_2 阳性对照、25和 $50\ \mu\text{g/mL}$ TMSN@Apt或TMSN@RS预处理组), 图中数值为ROS阳性细胞百分比; B. 各组ROS阳性率统计柱状图, 数据以平均值 $\pm$ 标准差表示($n=3$); C. Annexin V-FITC/PI双染流式细胞术检测TMSN@Apt或TMSN@RS对 H_2O_2 诱导的细胞凋亡的抑制作用(阴性对照、 H_2O_2 阳性对照、25和 $50\ \mu\text{g/mL}$ TMSN@Apt或TMSN@RS预处理组), 图中数值为总凋亡率(早期凋亡+晚期凋亡); D. 各组总凋亡率统计柱状图, 数据以平均值 $\pm$ 标准差表示($n=3$))。

上述结果表明, TMSN@Apt可浓度依赖性地清除胞内过量ROS并减轻氧化应激诱导的细胞凋亡, $50\ \mu\text{g/mL}$ 时ROS阳性率和凋亡率均恢复至接近正常水平。TMSN@Apt在无细胞体系中达到清除平台所需浓度($0.2\ \text{mg/mL}$)显著高于其在细胞水平发挥显著作用的浓度($0.05\ \text{mg/mL}$), 这一浓度-效应差异

可归因于核酸适体介导的 RAGE 识别与胞内富集 (图 2D), 使材料在较低给药浓度下即可实现高效 ROS 清除, 而 TMSN@RS 因缺乏靶向能力, 即使在相同浓度下其降低胞内 ROS 水平及细胞凋亡率效果有限。然而, 细胞水平的最终抗氧化效能还可能受到其他生物学过程的影响。首先, 材料经 RAGE 介导内吞进入细胞后, 需经胞内运输到达作用靶点方可发挥清除功效, 该摄取与运输过程的动力学效率可能影响实际起效浓度与时间窗口。其次, 部分内化材料可能被限制于溶酶体酸性隔室中, 影响 Tempol 及锰组分的活性释放与持续作用能力, 从而在一定程度上弱化其胞内抗氧化效果。此外, RAGE 介导的内吞途径本身可能影响材料的胞内分布命运及降解动力学。因此, 本研究所观察到的浓度-效应差异是适体介导的靶向富集与上述胞内命运过程综合作用的结果, 其中靶向识别与内化是效能增益的前提, 而胞内释放效率与降解逃逸不足则可能对最终效果产生削弱效应。

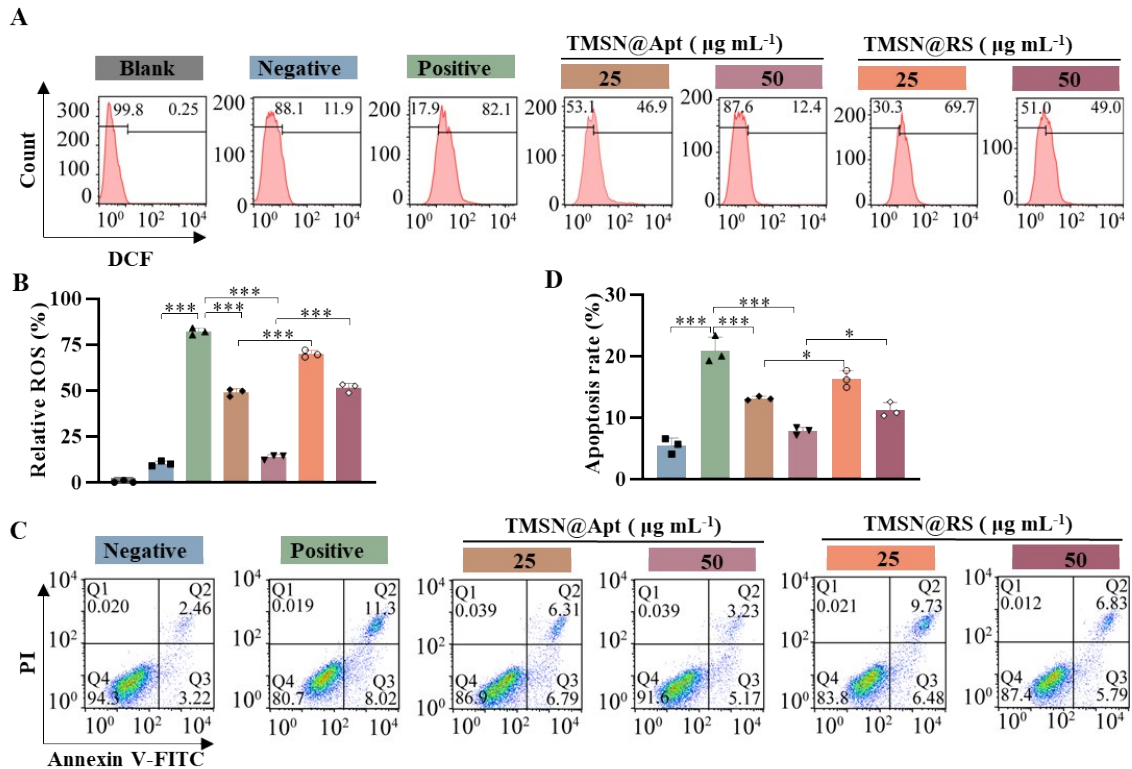


图4 TMSN@RS与TMSN@Apt的细胞保护作用比较

Fig. 4 Comparison of cytoprotective effects between TMSN@RS and TMSN@Apt

本研究所建立的“分子结合、细胞摄取、无细胞ROS清除、细胞保护”四维评价策略适用于受体介导主动靶向的纳米材料体系, 能够有效区分固有清除能力与靶向富集贡献。但对于依赖被动富集机制或非内吞途径入胞的纳米材料, 其细胞水平起效浓度与无细胞体系平台浓度的关联规律可能与本体系不同, 需结合具体材料的内化特性另行分析。尽管如此, 该结果直接证实了靶向纳米材料的细胞水平效能是其固有清除能力与适体介导的靶向富集效应叠加的结果, 而非固有清除能力的简单反映, 验证了联合评价策略的必要性, 并为靶向纳米材料的生物应用剂量设计提供了实验依据。

3 结 论

本研究建立了一种联合应用无细胞体系活性氧清除能力测定与细胞水平功能验证的评价策略, 以核酸适体功能化的ROS清除纳米材料(TMSN@Apt)为分析模型进行了系统验证。结果表明, 该策略可有效区分材料固有ROS清除能力与核酸适体靶向增效的独立贡献, 弥补了传统无细胞活性氧清除能力测定在评估靶向性纳米材料时的不足。同时发现, 由于适体介导的胞内富集, 靶向纳米材料在细胞水平的实际起效浓度显著低于无细胞体系的平台期浓度, 提示分层评价对生物应用剂量设计具有指导意义。该方法为核酸适体功能化纳米材料的性能评价及生物应用剂量优化提供了方法学参考。

参考文献:

- [1] Wang J Y, Wang Z K, Li Y Q, Hou Y J, Yin C Y, Yang E D, Liao Z Y, Fan C D, Martin L L, Sun D D. *Biomaterials*, **2023**, 302: 122359.
- [2] Kishi S, Nagasu H, Kidokoro K, Kashiara N. *Nat. Rev. Nephrol.*, **2024**, 20 (2): 101–119.
- [3] Liu J T, Han X Y, Zhang T Y, Tian K Y, Li Z P, Luo F. *J. Hematol. Oncol.*, **2023**, 16 (1): 116.
- [4] Zhou S W, Cai H J, He X J, Tang Z Y, Lu S Y. *Coord. Chem. Rev.*, **2024**, 500: 215536.
- [5] Patil P, Russo K A, McCune J T, Pollins A C, Cottam M A, Dollinger B R, DeJulius C R, Gupta M K, D'Arcy R, Colazo J M, Yu F, Bezold M G, Martin J R, Cardwell N L, Davidson J M, Thompson C M, Barbul A, Hasty A H, Guelcher S A, Duvall C L. *Sci. Transl. Med.*, **2022**, 14 (641): eabm6586.
- [6] Lu X Y, Kuai L, Huang F, Jiang J S, Song J K, Liu Y Q, Chen S, Mao L J, Peng W, Luo Y, Li Y Y, Dong H Q, Li B, Shi J L. *Nat. Commun.*, **2023**, 14 (1): 6767.
- [7] Zhang D D, Chen Q, Ren Q X, Zhong W B, Zhang H J, Wang G N, Zhang Y. *Coord. Chem. Rev.*, **2024**, 508: 215771.
- [8] Wang Q W, Qian W C, Han Y L, Mao Y, Gao Z Y, Chen Y X, Zeng X, Lu H, Jiang L L, Li J X, Gu N, Qian P X. *Nat. Nanotechnol.*, **2025**, 20 (7): 959–969.
- [9] Aldrich J, Dong G F, Panicker A, Russell J, Kumar S, Ovalle R, Jr., Allen K D, Ryan T E, Sharma B. *ACS Appl. Mater. Interfaces.*, **2026**, 18 (1): 649–663.
- [10] Chen C X, Ma J J, Duan S J, Xue M H, Yang Z, Ma Z W, Ji J N, Ma Y F, Qing G C, Guo K Y, Wu W, Chen T F, Wang Z Z, Luo Y. *Biomaterials*, **2025**, 318: 123119.
- [11] Zandieh M, Liu J W. *Adv. Mater.*, **2024**, 36 (10): 2211041.
- [12] Zheng J J, Zhu F Y, Song N N, Deng F, Chen Q, Chen C, He J Y, Gao X F, Liang M M. *Nat. Protoc.*, **2024**, 19 (12): 3470–3488.
- [13] Panferov V G, Zhang X H, Wong K Y, Lee J H, Liu J W. *Angew. Chem.*, **2025**, 137 (46): e202512409.
- [14] Vardakas P, Kartsonakis I A, Kyriazis I D, Kainourgios P, Trompeta A F A, Charitidis C A, Kouretas D. *Environ. Res.*, **2023**, 220: 115156.
- [15] Ruijter N, van der Zee M, Katsumiti A, Boyles M, Cassee F R, Braakhuis H. *NanoImpact*, **2024**, 35: 100521.
- [16] Peter A, Jose J, Bhat S G, K A. *Results Eng.*, **2024**, 24: 102925.
- [17] Zheng J, Zhang L J, Qi J C, Zhang S X, Zhang D H, Zhang D S, Zhang Y, Hu J. *J. Colloid Interface Sci.*, **2025**, 683: 250–255.
- [18] Ding J L, Du Y H, Hu X Y, Zhao M Y, Li Y Y, Li L, Su Y, Lin Z K. *Nanotechnology*, **2023**, 34 (36): 365101.
- [19] Yu L D, Chen Y, Wu M Y, Cai X J, Yao H L, Zhang L L, Chen H R, Shi J L. *J. Am. Chem. Soc.*, **2016**, 138 (31): 9881–9894.
- [20] Li X L, Liu Y, Qi X W, Xiao S L, Xu Z S, Yuan Z X, Liu Q, Li H S, Ma S Y, Liu T F, Huang Y, Zhang X R, Zhang X, Mao Z W, Luo G X, Deng J. *Adv. Mater.*, **2022**, 34 (19): 2109004.
- [21] Downs C A, Dang V D, Johnson N M, Denslow N D, Alli A A. *J. Cell. Biochem.*, **2018**, 119 (1): 599–606.
- [22] Yang B W, Guo Y D, Wang Y M, Yang J J, Yao H L, Shi J L. *CCS Chem.*, **2021**: 1648–1658.
- [23] Millozzi F, Milán-Rois P, Sett A, Delli Carpini G, De Bardi M, Gisbert-Garzarán M, Sandonà M, Rodríguez-Díaz C, Martínez-Mingo M, Pardo I, Esposito F, Viscomi M T, Bouché M, Parolini O, Saccone V, Toulmé J J, Somoza Á, Palacios D. *Nat. Commun.*, **2025**, 16 (1): 577.
- [24] Sarkar S, Moitra P, Duan W, Bhattacharya S. *Adv. Healthc. Mater.*, **2024**, 13 (31): 2402259.
- [25] Higashimoto Y C, Matsui T N, Nishino Y R, Taira J I, Inoue H Y, Takeuchi M Y, Yamagishi S I. *Microvasc. Res.*, **2013**, 90: 64–70.
- [26] Moradi Z, Abnous K, Taghdisi S M, Zamanian J, Moshiri M, Etemad D, Etemad L, Kesharwani P, Sahebkar A. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, **2025**, 105: 106614.
- [27] Gwozdziński K, Pieniazek A, Gwozdziński L. *Molecules*, **2025**, 30 (10): 2159.
- [28] Pelluau T, Sene S, Garcia-Cirera B, Albela B, Bonneviot L, Larionova J, Guari Y. *Nanomaterials*, **2022**, 12 (7): 1136.

(责任编辑:)