高等学校化学学报
CHEMICAL JOURNAL OF CHINESE UNIVERSITIES
研究论文

Ce-Cur纳米酶对巨噬细胞极化的调控

许海燕, 刘　琦, 孟　和, 刘风琦, 刘雨昕, 李嘉伟, 李常艳
(内蒙古大学化学化工学院, 呼和浩特 010021)

摘要　以氯化铈($CeCl_3$)和姜黄素(Cur)为原料, 以聚乙烯吡咯烷酮(PVP)为分散剂, 设计合成了无机-有机复合型Ce-Cur纳米酶. 采用X射线粉末衍射(XRD)、透射电子显微镜(TEM)、X射线光电子能谱(XPS)、傅里叶变换红外光谱(FTIR)、Zeta电位及粒度分析等手段对其微观结构和表面性质进行了表征. 通过ABTS和DPPH自由基清除实验评价了该纳米酶的体外抗氧化活性, 并利用DCFH-DA荧光探针法检测了其对巨噬细胞内活性氧物种(ROS)的清除能力. 结果表明, Ce-Cur纳米酶具有良好的抗氧化能力, 可显著降低细胞内ROS水平(荧光强度MFI下降53%). CCK8法与死活荧光染色实验显示, 该纳米酶具有良好的细胞相容性. 实时荧光定量PCR(RT-qPCR)、免疫荧光及ELISA分析数据显示, Ce-Cur纳米酶能够有效抑制由LPS+IFN-γ诱导的炎症反应, 下调M1型炎症因子TNF-α, IL-1β和IL-6的mRNA表达与蛋白分泌(M1抑制率分别为57%, 67%和82%), 同时促进M2型抗炎因子IL-10的表达(M2提升率达351%). 上述结果表明, 姜黄素与无定形氧化铈组分之间存在协同抗氧化与抗炎效应, 可显著调控巨噬细胞由M1向M2表型极化. 本研究为Ce-Cur纳米酶在免疫调节及相关炎症疾病治疗领域的应用提供了实验依据与潜在策略.

关键词　Ce-Cur纳米酶; 巨噬细胞; M1促炎因子; M2抗炎因子; 极化作用
中图分类号　O611.4; Q26　　**文献标志码**　A　　doi: 10.7503/cjcu20250188

Regulation of Macrophage Polarization by Ce-Cur Nanoenzymes

XU Haiyan, LIU Qi, MENG He, LIU Fengqi, LIU Yuxin, LI Jiawei, LI Changyan*
(*College of Chemistry and Chemical Engineering*, *Inner Mongolia University*, *Hohhot* 010021, *China*)

Abstract　This study designed and synthesized an inorganic-organic composite Ce-Cur nanoenzyme using cerium chloride($CeCl_3$) and curcumin(Cur) as raw materials, with polyvinylpyrrolidone(PVP) as the dispersant. Systematic characterization of its microstructure and surface properties was performed using X-ray powder diffraction(XRD), transmission electron microscopy(TEM), X-ray photoelectron spectroscopy(XPS), Fourier transform infrared spectroscopy(FTIR), zeta potential, and particle size analysis. In *vitro* antioxidant activity was evaluated *via* ABTS and DPPH radical scavenging assays, while DCFH-DA fluorescence probe-based assays assessed its ability to scavenge reactive oxygen species(ROS) within macrophages. Results indicate that the Ce-Cur nanozyme exhibits excellent antioxidant capacity, significantly reducing intracellular ROS levels(fluorescence intensity MFI decreased by 53%). CCK8 assays and live/dead fluorescent staining experiments demonstrated excellent cellular compatibility of the nanozyme. Real-time quantitative PCR(RT-qPCR), immunofluorescence, and ELISA analyses revealed that Ce-Cur nanozyme effectively suppressed LPS+IFN-γ-induced inflammatory responses. It downregulated mRNA expression and protein secretion of M1-type inflammatory cytokines TNF-α, IL-1β, and IL-6(M1 inhibition rates

收稿日期: 2025-07-07. 网络首发日期: 2025-10-15.
联系人简介: 李常艳, 女, 博士, 副教授, 主要从事纳米酶的设计与应用方面的研究. E-mail: celicy@imu.edu.cn
基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 22067015)、内蒙古2024年度留学人员创新创业启动项目(批准号: 12000-15072405)和内蒙古自治区研究生精品课程项目(批准号: JP20231008)资助.
Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 22067015), the Innovation and Entrepreneurship Start-up Project for Overseas Students in 2024 Inner Mongolia Autonomous Region, China (No.12000-15072405) and the Project of High-quality Graduate Courses in Inner Mongolia Autonomous Region, China (No.JP20231008).

were 57%, 67%, and 82%, respectively.), while simultaneously promoting the expression of the M2 anti-inflammatory factor IL-10(M2 growth rate reached 351%). These results indicate synergistic antioxidant and anti-inflammatory effects between curcumin and amorphous cerium oxide components, significantly regulating macrophage polarization from the M1 to the M2 phenotype. This study provides experimental evidence and potential strategies for the application of Ce-Cur nanoenzymes in immunomodulation and the treatment of related inflammatory diseases.

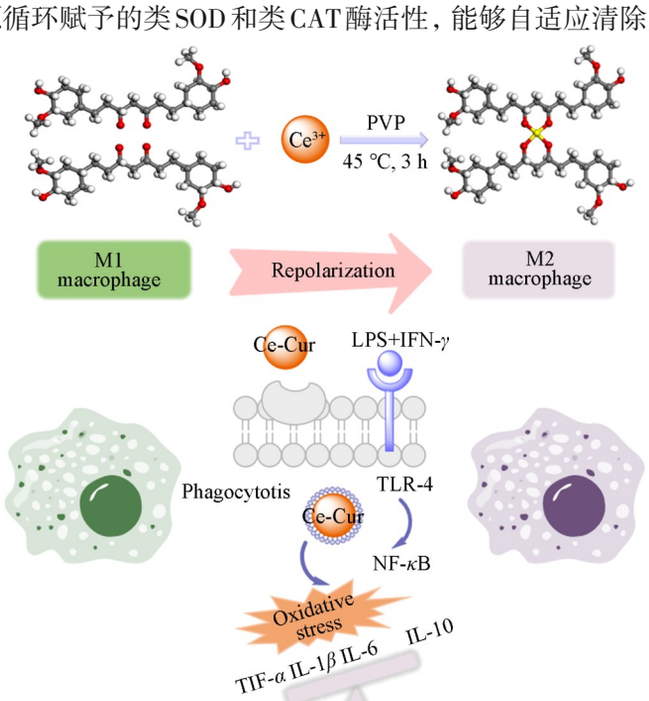
Keywords Ce-Cur nanoenzymes; Macrophage; M1-type inflammatory factor; M2-type anti-inflammatory factor; Polarization

巨噬细胞具有高度可塑性，可根据细胞微环境信号极化为不同功能的表型，其中M1型和M2型巨噬细胞是功能状态体的两个极端．M1型巨噬细胞主要参与促炎反应和清除病原体，而M2型则与抗炎反应和组织修复密切相关．这一极化过程受到多种信号分子及通路的精密调控，对免疫稳态和疾病进程具有关键影响[1,2].

在炎症反应中，巨噬细胞和中性粒细胞被募集至炎症部位并产生大量活性氧(ROS)．ROS不仅是细胞代谢的副产物，还在细胞信号传导和免疫调节等过程中扮演着重要角色．然而，过量ROS会激活MAPK和NF-κB等信号通路，促进TNF-α等促炎因子的分泌，进一步放大炎症反应，并可通过氧化DNA、脂质和蛋白质诱发氧化应激，导致细胞功能障碍甚至死亡[3~6]．研究表明，高水平ROS和RNS可驱动巨噬细胞向M1表型极化[7,8]．Li等[9]进一步揭示，ROS可通过促进chk2介导的pkm2磷酸化增强糖酵解，并通过p21积累引起细胞周期停滞，从而共同推动巨噬细胞向M1型极化，为靶向ROS调控免疫微环境提供了新思路[10,11].

鉴于ROS在巨噬细胞极化中的重要作用，调控ROS水平已成为干预炎症进程的重要策略．在此背景下，天然抗氧化剂姜黄素(Cur)因其多重的生物活性而受到关注．姜黄素是一种从姜科植物根茎中提取的多酚化合物[12]，不仅可有效抑制IL-6，IL-1β和TNF-α等促炎因子表达[13]，降低TLR-4水平，促进巨噬细胞向M2型极化[14,15]，还具备铁螯合能力，可通过调控铁代谢蛋白抑制Fenton反应[16]，并通过激活Nrf2/ARE通路上调GPX4和HO-1表达，从而减轻Fenton反应引发的疾病损伤[17,18]．然而，姜黄素的水溶性差、稳定性低和生物利用度不足严重限制了其在生物化学、生物医学及临床领域的应用．另一方面，纳米氧化铈凭借其Ce^{3+}/Ce^{4+}氧化还原循环赋予的类SOD和类CAT酶活性，能够自适应清除多种ROS[19]，但其抗炎机制较为单一．受姜黄素抗炎特性与纳米氧化铈多种类酶催化特性的启发，本文提出将二者整合以构建分散均匀和稳定性好的协同抗炎体系．

以氯化铈($CeCl_3$)和姜黄素(Cur)为原料，PVP作为纳米颗粒的分散剂，促使其形成粒度均匀且分散性更好的铈-姜黄素纳米酶(Ce-Cur)．通过ABTS和DPPH自由基清除实验评估了Ce-Cur纳米酶的体外抗氧化能力，并运用DCFH-DA荧光探针法检测了Ce-Cur纳米酶对巨噬细胞内活性氧(ROS)的清除效果，以评估其细胞水平上的抗氧化功能．利用RT-qPCR、免疫荧光和ELISA试剂盒分析了巨噬细胞中炎症因子的mRNA表达、分泌和极化作用，结合XRD，IR，XPS和TEM等结构分析数据，探讨了Ce-Cur纳米酶对RAW264.7巨噬细胞极化的调控作用(Scheme 1).



Scheme 1 Schematic diagram of the design, preparation and regulation of macrophage polarization by Ce-Cur

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

无水乙醇和六水合氯化铈均为分析纯，天津市风船化学试剂科技有限公司；聚乙烯吡咯烷酮(PVP，分析纯)和姜黄素(Cur，纯度98%)，Aladdin公司；DMEM培养基，Viva Cell Biosciences公司；胎牛血清(FBS)，Biological Industries公司；CCK8，东仁化学科技公司；LPS和DPPH自由基清除试剂盒，Solarbio公司；IFN-γ，Sigma-Aldrich公司；Calcein-AM/PI染色试剂和总抗氧化能力试剂盒(ABTS法)，碧云天生物技术有限公司(Beyotime)；小鼠肿瘤坏死因子α(TNF-α)、小鼠白细胞介素-1β(IL-1β)、小鼠白细胞介素-6(IL-6)和小鼠白细胞介素-10(IL-10)定量检测试剂盒，Elabscience Biotechnology公司；iNOS Recombinant Rabbit Monoclonal Antibody[PSH03-69]、Mannose Receptor(CD206) Recombinant Rabbit Monoclonal Antibody[PSH07-76]和iFluor™ 488 Conjugated Goat anti-rabbit IgG polyclonal Antibody，杭州华安生物技术有限公司. RAW264.7细胞为内蒙古大学生命科学学院赠送，属于美国ATCC细胞库目录.

ESCALABXI+型X射线光电子能谱(XPS)，赛默飞世尔科技公司；Tecnai F20型高分辨率场发射透射电子显微镜(TEM)，美国FEI公司；Empyrean型X射线粉末衍射仪(XRD)，荷兰PANalytical B. V. 公司；90PLUS型Zeta电位及粒度分析仪，美国布鲁克海文公司；NEXION 2000型ICP-MS电感耦合等离子质谱仪，美国PERKIN ELMER公司；VERTEX70型傅里叶变换中/远红外光谱仪(FTIR)，德国布鲁克光学仪器公司；CYTATION3型酶标仪，中国BIOTEK公司；IX83型荧光倒置显微镜，日本奥林巴斯株式会社；AXR型倒置激光共聚焦显微镜，日本Nikon公司；Lightcycler 480 II型荧光实时定量PCR仪，瑞士Roche公司；LSM 710型激光扫描共聚焦显微镜，德国蔡司ZEISS公司.

1.2 实验过程

1.2.1 *Ce-Cur纳米酶的制备* 将66 mg聚乙烯吡咯烷酮(PVP)溶解在5 mL甲醇中，持续搅拌下缓慢滴加溶解在1 mL甲醇中的20 mg $CeCl_3\cdot 6H_2O$溶液；反应5 min后，继续滴加溶解在1 mL甲醇中的10 mg姜黄素溶液，于45 ℃搅拌反应3 h后，将反应产物用水进行透析过夜，备用.

1.2.2 *样品的表征* 采用XRD进行纳米材料的物相结构分析，测试采用铜钯的$K\alpha$辐射源(λ=0.1541 nm). 利用TEM获得纳米材料的形貌，通过选区电子衍射(SAED)分析得出纳米材料的结晶性及结构等信息. 采用EDX-mapping对样品的结构和元素组成等微观结构进行研究. 利用FTIR光谱获得纳米材料的化学键和官能团等信息，按照样品/溴化钾质量比1:100的比例研磨压片，通过VERTEX70型红外光谱仪进行分析. 将纳米酶溶于超纯水中，超声约10 min后加入到比色皿中，检测样品的水合粒径和Zeta电位. 采用XPS进行样品的表面元素价态表征，选用Al靶，$K\alpha$照射源，测试电压为15 kV，功率为150 W. 利用激光扫描共聚焦显微镜观测巨噬细胞内iNOS和CD206的表达，采用405和488 nm的激发器.

1.3 纳米酶的细胞存活率测试

采用CCK-8检测技术评估了纳米酶的细胞毒性. 首先，将纳米酶溶解于DMEM培养基中，分别制成不同浓度的纳米酶悬浊液，超声直至溶液完全分散. 其次，将8×10^3个RAW264.7细胞接种于96孔板中，于37 ℃培养12 h，加入100 μL含有不同浓度纳米酶的培养液培养24 h，每组设置3个平行孔. 培养完成后，弃去含有纳米酶的培养液，为避免纳米酶的干扰使用PBS缓冲液清洗孔板. 最后，加入100 μL含10%(体积分数)CCK8的基础培养基，置于细胞培养箱中孵育1 h，测定450 nm处的OD值，细胞存活率(Cell viability，%)的计算公式如下：

$$\text{Cell viability} = \frac{OD_1 - OD_3}{OD_2 - OD_3} \times 100\% \quad (1)$$

式中：OD_1，OD_2和OD_3分别为实验组、对照组和空白组的吸光度值.

1.4 纳米酶的抗氧化分析

1.4.1 *总抗氧化能力* 使用试剂盒测试纳米酶对ABTS自由基的抗氧化能力. 将10 μL不同材料的悬

浮液与200 μL ABTS工作溶液混合，室温下孵育5 min，用酶标仪检测734 nm的吸光度，ABTS抗氧化能力采用标准曲线计算得出.

1.4.2 DPPH自由基清除 采用试剂盒测定测试不同纳米酶对DPPH自由基的清除能力. 将10 μL不同纳米酶的悬浮液与190 μL DPPH工作溶液混合，室温下避光孵育30 min，检测515 nm处的OD值. DPPH自由基清除率(D, %)计算如下：

$$D = \frac{\left[A_{\text{blank}} - \left(A - A_{\text{control}}\right)\right]}{A_{\text{blank}}} \times 100\% \tag{2}$$

式中：A，A_{control}和A_{blank}分别为实验组、对照组和空白组在450 nm处的吸光度值.

1.5 细胞内ROS检测

首先，以1∶3的比例对RAW264.7细胞进行传代操作，并将其接种至6孔板中，待细胞完全贴壁后，用PBS缓冲液清洗3次，加入含有200 ng/mL LPS和10 ng/mL IFN-γ的培养液诱导RAW264.7细胞极化，将细胞培养过夜. 随后，添加含有纳米酶的培养液，继续刺激细胞6 h后，用PBS缓冲液清洗3次. 之后，加入DCFH-DA工作液，于37 ℃孵育30 min后，用PBS缓冲液清洗3次. 最后，用荧光显微镜拍照，检测Ce-Cur纳米酶对ROS的清除能力.

1.6 细胞因子检测

1.6.1 酶联免疫吸附实验(ELISA) 将1×10^{4}个RAW264.7细胞接种于24孔板中，待细胞贴壁后，用PBS缓冲液清洗3次，加入200 ng/mL LPS和10 ng/mL IFN-γ诱导巨噬细胞向M1型巨噬细胞极化，培养过夜. 然后，加入不同纳米酶的培养液刺激6 h，吸去旧培养基，用预冷的PBS缓冲液清洗，以1000g的转速离心5 min收集细胞，通过超声破碎细胞. 按照ELISA试剂盒操作步骤进行测定，每组进行3个重复孔，每个实验独立重复3次.

1.6.2 实时荧光定量PCR 将1×10^{4}个RAW264.7细胞接种于24孔板中，待细胞贴壁后，用PBS缓冲液清洗3次，加入200 ng/mL LPS和10 ng/mL IFN-γ诱导巨噬细胞向M1型巨噬细胞极化，培养过夜. 然后，加入不同纳米酶的培养液刺激6 h，用PBS缓冲液清洗3次，收集细胞. 通过RT-qPCR对IL-6，IL-1β，TNF-α和IL-10等基因的表达进行检测，各组实验独立重复3次，采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算结果.

$$\text{M1 factor inhibition rate} = \left(1 - \frac{A}{B}\right) \times 100\% \tag{3}$$

$$\text{M2 factor percentage increase} = \frac{A - B}{B} \times 100\% \tag{4}$$

式中：A为纳米酶组相对表达量；B为LPS+IFN-γ相对表达量.

1.7 Ce-Cur纳米酶的实验分组

用于抗氧化性分析的Cur组和Ce-Cur组的浓度分别为0，15，31，62，125，250，300和1000 μg/mL. 用于细胞毒性分析的Cur组和Ce-Cur组的浓度分别为0，5，10，25，50，100，150和200 μg/mL. 细胞活性分析实验分为空白对照组、Cur组和Ce-Cur组. 体外ROS能力检测实验分为对照组、Cur组和Ce-Cur组. ELISA检测实验分为对照组、Cur组、LPS+IFN-γ组和Ce-Cur组. RT-qPCR实验分为对照组、Cur组、LPS+IFN-γ组和Ce-Cur组. iNOS和CD206免疫荧光实验分为对照组、Cur组、LPS+IFN-γ组和Ce-Cur组.

1.8 数据处理

利用GraphPad Prism 9软件进行One-way ANOVA统计学分析，数据代表3次独立重复实验的平均值($^*P$<0.05，$^{**}P$<0.01，$^{***}P$<0.001，$^{****}P$<0.0001).

2 结果与讨论

2.1 Ce-Cur纳米酶的表征

由图1(A)可见，Ce-Cur纳米酶的XRD谱图呈现出典型的宽泛无定型峰[20]，表明其整体为无定形结构. 这与纯姜黄素的结晶衍射峰或结晶性CeO_2的尖锐衍射峰截然不同，该结果显示Ce-Cur纳米酶是

一种新型的无定形纳米复合材料，而非Cur与结晶性CeO_2的简单物理混合．图1(B)比较了Cur与Ce-Cur纳米酶的红外光谱，其中Cur的FTIR谱图在3501 cm^{-1}处展现出一条吸收带，该吸收带是由酚羟基的O—H伸缩振动所致；1601和1504 cm^{-1}处的吸收峰归属于苯环中C═C的伸缩振动；1626 cm^{-1}处的吸收峰归属于C═O的伸缩振动；1432 cm^{-1}处为烯烃C—H弯曲振动峰；1278 cm^{-1}处为芳香族C—O的伸缩振动峰；1027和851 cm^{-1}处的吸收带则对应于C—O—C的伸缩振动[21]．Ce-Cur纳米酶的FTIR谱图中，3408 cm^{-1}处的吸收峰归属为O—H的伸缩振动；2591 cm^{-1}处为C—H的伸缩振动峰；1653 cm^{-1}处为C═O的伸缩振动峰；1426 cm^{-1}处为烷烃C—H的弯曲振动峰；1291 cm^{-1}处是C—N的伸缩振动峰．伸缩振动峰的位置发生移动表明姜黄素的O—H，C═O基团和聚乙烯吡咯烷酮的C—N，C═O基团之间产生了氢键，Ce^{3+}与姜黄素的苯酚基团配位，形成了Ce-Cur纳米酶[22]．图1(C)为Ce-Cur纳米酶的EDX能谱图，图中显示其中含有C，O和Ce 3种元素，进一步验证了Ce与Cur的复合．图1(D)所示透射电子显微镜(TEM)图像显示，Ce-Cur纳米酶粒度分布均匀，粒径大小为(91±0.5) nm．由图1(E)可见，Cur的水合粒径约为336.36 nm，Ce-Cur纳米酶的水合粒径为91.34 nm，与TEM表征的统计粒度大小相符[23]．Cur的zeta电位为−12.06 mV，Ce-Cur纳米酶zeta电位为−38.15 mV[图1(F)]，表面负电与Cur中富含C═O和—OH相关[24]．Ce-Cur纳米酶的zeta电位及水合粒径发生变化，导致团聚减少、水溶性和分散性提高．

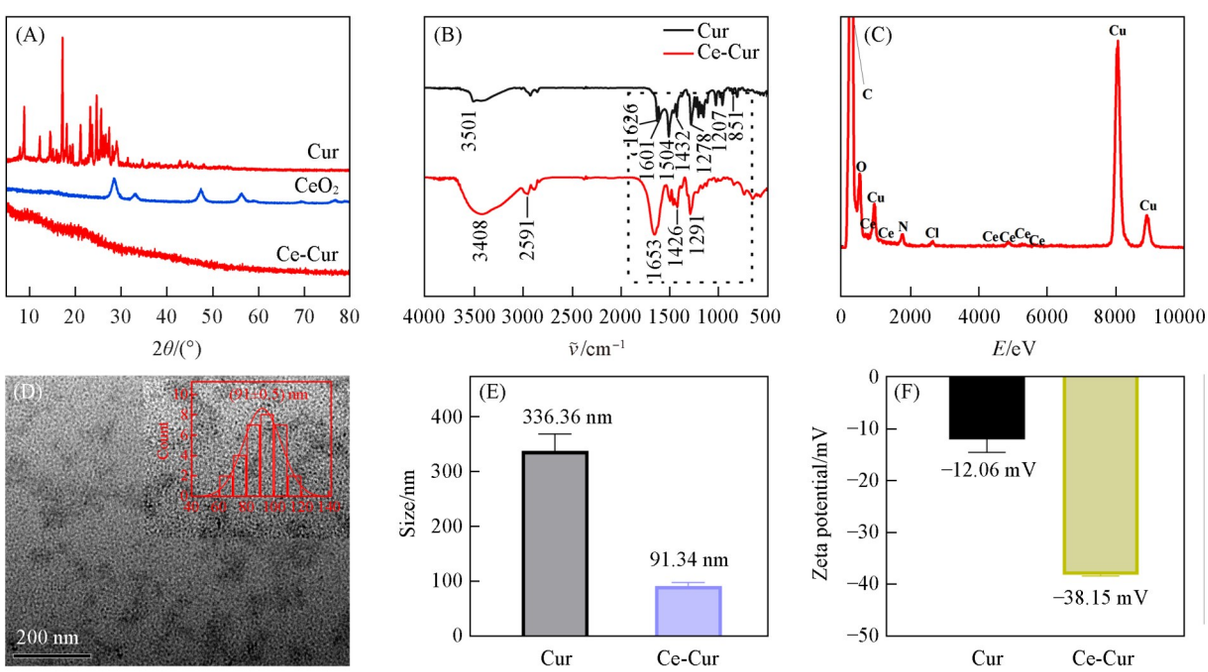


Fig. 1　XRD patterns(A), FTIR spectra(B), EDX spectra(C), TEM image(D), hydrated particle size(E) and zeta potentials(F) of Ce-Cur nanozymes

(D) Inset: TEM particle size distribution.

采用XPS测试了Ce-Cur纳米酶表面元素的组成和结合能．图2(A)为Cur和Ce-Cur纳米酶的XPS全谱图，Cur的谱图中具有明显的O_{1s}和C_{1s}特征峰，表明Cur纳米酶中存在O和C元素；Ce-Cur纳米酶的谱图中具有明显的Ce_{3d}，O_{1s}和C_{1s}特征峰，表明Ce-Cur纳米酶中存在Ce，O和C元素，这与EDX表征结果[图1(C)]一致．为了分析元素的价态，对O_{1s}，C_{1s}和Ce_{3d}的结合能进行了拟合分析．由图2(B)可见，Cur中O_{1s}在531.5和532.8 eV处呈现2个特征峰．其中，531.5 eV处的峰可归属为氧空位，532.8 eV处的峰归属为表面吸附的羟基(—OH)或分子水等结合氧物种．如图2(E)所示，Ce-Cur纳米酶中O_{1s}谱图在531.5和533.4 eV处也存在2个特征峰，其归属与Cur中O_{1s}相同，表明Ce的引入未引起O_{1s}结合能的显著位移．但O_{1s}峰面积的显著变化表明Ce元素的引入对表面氧物种的相对丰度具有一定程度的影响：531.5 eV处峰面积的增加表明Ce-Cur纳米酶表面氧空位的浓度增加，533.4 eV处峰面积的减少则

表明表面吸附羟基(—OH)或分子水等结合氧物种的浓度显著降低. 这种变化反映Ce元素诱导了表面氧化学态的再分布[25,26].

图2(D)为Ce-Cur纳米酶中Ce_{3d}结合能谱图. 由于电子的自旋和耦合作用, Ce_{3d}轨道劈裂成2个峰: $Ce_{3d3/2}$和$Ce_{3d5/2}$, 其中880.2和900.3 eV以及883.7和903.7 eV的峰归属于Ce^{3+}. 881.7和901.6 eV, 886.8和906.6 eV以及904.9和925.1 eV的峰归属于Ce^{4+}, 表明Ce-Cur纳米酶中Ce^{3+}和Ce^{4+}共存. 利用半定量公式对表面Ce^{3+}/Ce^{4+}的比率进行分析发现, Ce-Cur纳米酶中Ce^{3+}占比为33.48%, Ce^{4+}占比为66.52%[27]. 如图2(C)所示, Cur的C_{1s}谱图在284.8和286.6 eV处也存在2个特征峰, 归属为姜黄素中C—C和C—O的结合能谱图. 而Ce-Cur纳米酶的C_{1s}谱图在284.4, 286.0和288.2 eV处存在3个峰[图2(F)], 其中, 284.4和286.0 eV处的峰归属为姜黄素中的C—C和C—O, 这与图2(C)中Cur C_{1s}谱分析结果一致; 288.2 eV处出现C═O的峰, 表明姜黄素与Ce发生了相互作用. Ce^{3+}与姜黄素分子中的氧原子(如酚羟基和羰基氧)发生配位[28], Ce^{3+}作为电子受体, 降低了氧原子的电子密度, 这一效应通过化学键传递至碳原子, 导致其内层电子更受原子核束缚, 从而引起了C_{1s}结合能的升高. C—C, C—O和C═O 3种C_{1s}的存在形式与FTIR表征结果一致, 这从电子结构层面证明Ce-Cur并非简单混合物, 而是形成了分子间相互作用的复合纳米材料.

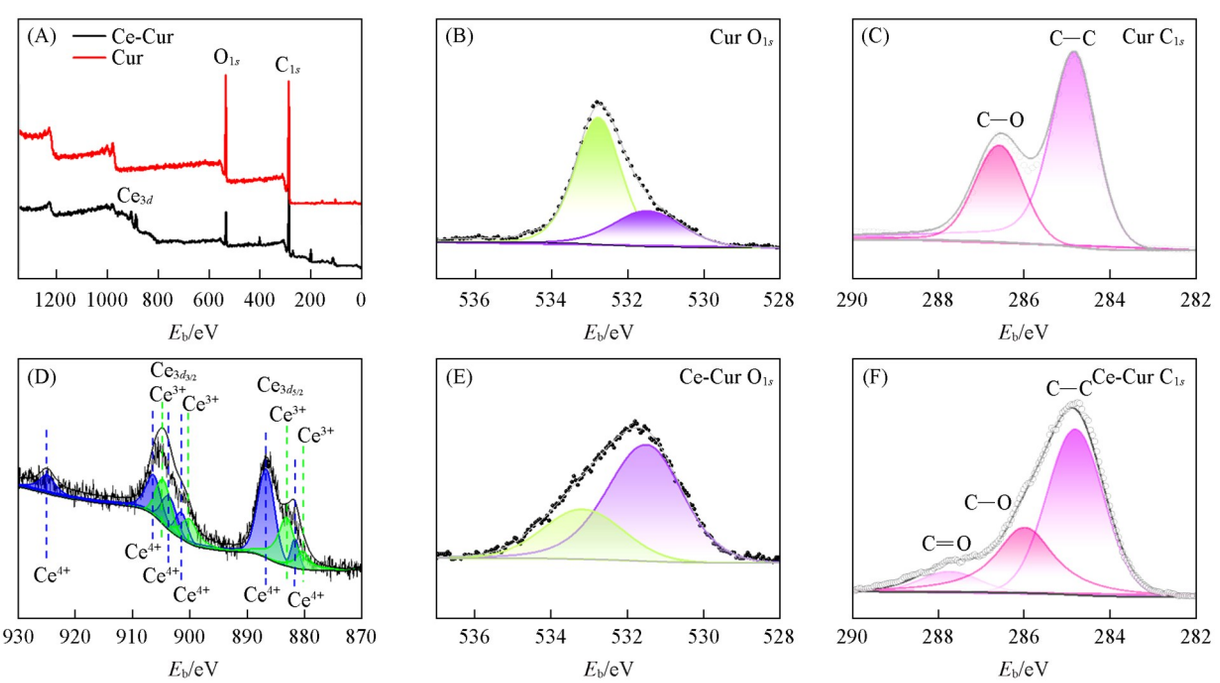


Fig. 2 XPS survey spectra(A) of Ce-Cur nanozymes and Cur nanozymes, fine-scan XPS spectra of O_{1s}(B), C_{1s}(C) of Cur, and fine-scan XPS spectra of Ce_{3d}(D), O_{1s}(E), C_{1s}(F) of Ce-Cur

2.2 Ce-Cur纳米酶的体外细胞安全性

为探究不同浓度的Cur和Ce-Cur纳米酶对RAW264.7细胞的相容性, 利用不同浓度(5~200 μg/mL)的样品刺激RAW264.7细胞, 并于24 h后进行检测. 图3(A)和(B)显示, 当浓度为10 μg/mL时, Cur和Ce-Cur纳米酶的RAW264.7细胞存活率接近100%; 浓度为200 μg/mL时, Cur和Ce-Cur纳米酶与RAW264.7细胞孵育后其细胞存活率分别为70%和80%, 表现出良好的细胞相容性[29]. 与对照组相比, 差异有显著性意义(P<0.05), CCK8实验结果显示RAW264.7细胞存活率与Cur和Ce-Cur纳米酶的浓度存在明显的依赖性. 基于CCK8检测结果, 后续实验选择10 μg/mL Ce-Cur纳米酶作为药物刺激浓度. 选取10 μg/mL Ce-Cur纳米酶, 采用死活荧光染色法对细胞活性进行了评定, 结果示于图3(C). 与对照组相比, 经Cur和Ce-Cur纳米酶处理后RAW264.7巨噬细胞的死细胞于活细胞数量几乎无变化. 此结果表明, 该Ce-Cur纳米酶对RAW264.7细胞无明显毒性, 与CCK8检测结果一致.

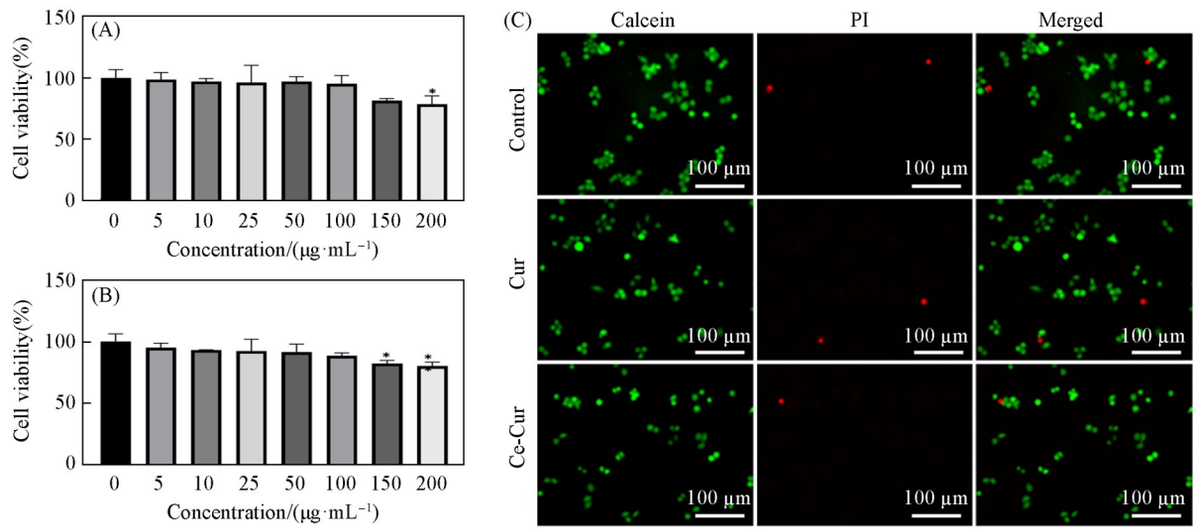


Fig. 3 Cell viability of RAW264. 7 cells determined by CCK-8 assays for Cur(A), Ce-Cur(B), and Calcein/PI dead-acting staining to detect the effects of different nanozymes on RAW264. 7 cells(C)

Data are mean ± SD(n=3); *P<0. 05, **P<0. 01 *vs.* 0 μg/mL.

2.3 Ce-Cur纳米酶的抗氧化能力

采用经典的1,1-二苯基-2-苦基肼基(DPPH)自由基和2′-连氮基-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)(ABTS)自由基清除实验，评估了Ce-Cur纳米酶的抗氧化能力. 图4(A)示出了Ce-Cur纳米酶对DPPH自由基的清除率变化. 可见，随着Ce-Cur纳米酶浓度的增大，DPPH自由基的清除率呈现显著的上升趋势. 当Ce-Cur纳米酶浓度达到62 μg/mL时，对DPPH自由基的清除率高达25%. 图4(B)示出了Ce-Cur纳米酶对ABTS自由基的清除率变化. 与DPPH自由基的清除情况类似，ABTS自由基的清除活性也随着Ce-Cur纳米酶浓度的增加而提升. 当Ce-Cur纳米酶的浓度为62 μg/mL时，其抗氧化能力为0. 8 mmol/g. 上述实验结果表明，Ce-Cur纳米酶具备高效的自由基清除能力，且其抗氧化能力与浓度紧密相关，呈现出明显的浓度依赖性[20]. 图4(C)~4(F)为Ce-Cur纳米酶对巨噬细胞内活性氧(ROS)清除能力的测试结果. 在LPS+IFN-γ组中，巨噬细胞受LPS刺激后发生氧化应激反应，产生大量活性氧物

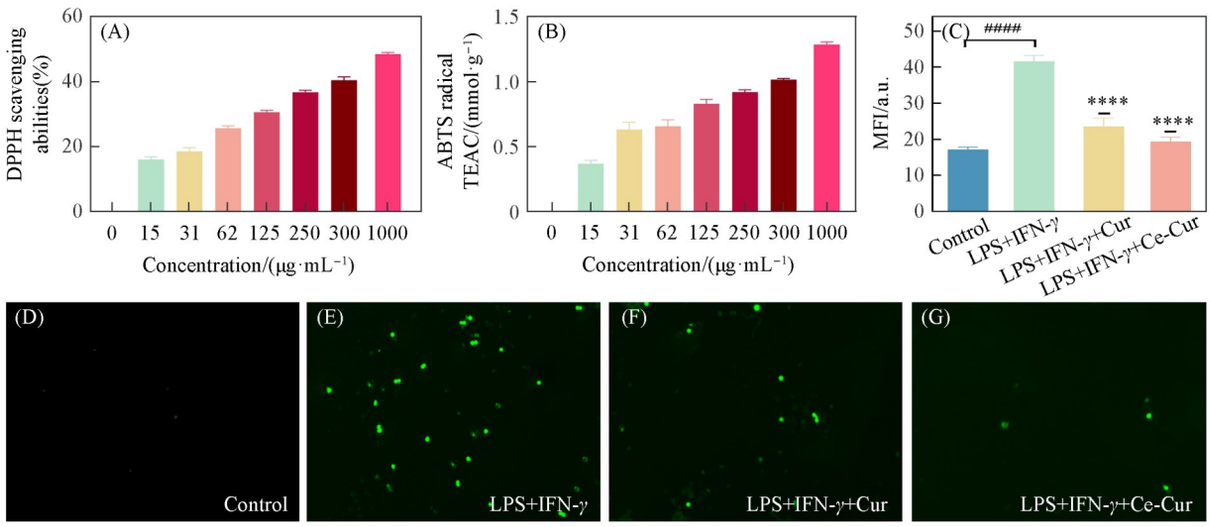


Fig. 4 Free radical scavenging activity of Ce-Cur on DPPH (A) and ABTS (B), ROS fluorescence quantitative analysis (C) and detection of ROS scavenging ability in macrophages by Ce-Cur nanozymes (D—G)

Data are mean ± SD(n=3); scale bar: 100 μm; ####P<0. 0001, ###P<0. 001 *vs.* Control group, *P<0. 05, **P<0. 01, ***P<0. 001, ****P<0. 0001 *vs.* LPS+IFN-γ group; ns indicates no statistical significance.

种，荧光强度最强．具有抗氧化作用的Cur能与细胞中的活性氧相互作用，从而降低荧光强度．在Ce-Cur纳米酶中，XPS分析结果显示无定型Ce氧化物中Ce^{3+}和Ce^{4+}共存，亦可消除ROS[30]，无定型Ce氧化物和姜黄素发挥协同效应，显著提升了清除活性氧物种的能力．与LPS+IFN-γ组相比，图4(C)中ROS荧光强度统计结果显示Ce-Cur纳米酶组的荧光强度大幅降低(P<0.0001)，ROS下降53%.

2.4 Ce-Cur纳米酶对巨噬细胞极化作用的影响

肿瘤坏死因子-α(TNF-α)和白细胞介素-6(IL-6)的水平与炎症状态呈正相关，这一特性对免疫治疗策略的制定具有关键指导意义．为探究Ce-Cur纳米酶对巨噬细胞极化作用的影响，使用LPS+IFN-γ刺激RAW264.7细胞构建了炎症模型．基于CCK8检测结果，选择极化实验中Ce-Cur纳米酶的浓度为10 μg/mL．图5(A)和5(C)为对照组RAW264.7细胞的形态图像，图5(B)和5(D)为LPS+IFN-γ刺激后RAW264.7细胞的形态图，可见其形态由圆形变成了椭圆形，这是促炎型M1巨噬细胞的典型形态，部分细胞铺展明显并形成伪足，这是抗炎型M2巨噬细胞的典型形态[31].

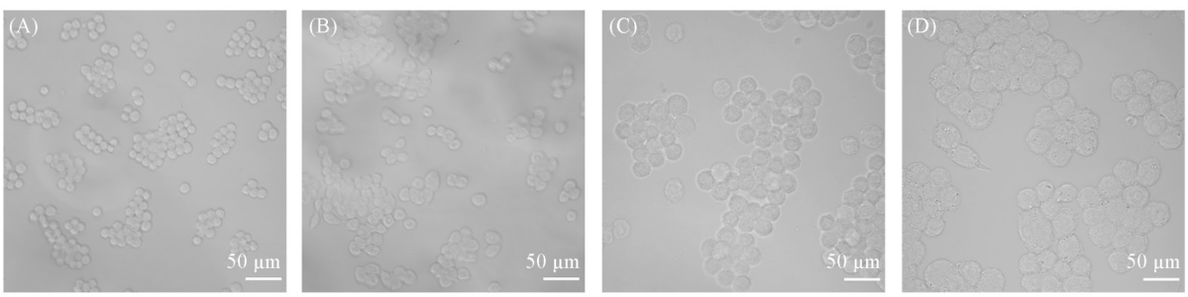


Fig. 5 Fluorescence confocal bright field images of morphology of RAW264.7 cells

(A, B) 20 Times magnification control and LPS+IFN-γ stimulation of RAW264.7 cells; (C, D) 40 times magnification control and LPS+IFN-γ stimulation of RAW264.7 cells.

Ce-Cur纳米酶抗氧化能力检测结果显示，其具有卓越的细胞内、外ROS清除能力．ROS是激活NF-κB等炎症信号通路的关键信使分子[32]，为探究清除ROS是否影响下游炎症因子的基因表达，采用RT-qPCR检测了M1和M2型巨噬细胞标志物的mRNA水平．如图6所示，当RAW264.7细胞经LPS+IFN-γ处理后，肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、白细胞介素-6(IL-6)、促炎细胞因子白细胞介素-1β(IL-1β)以

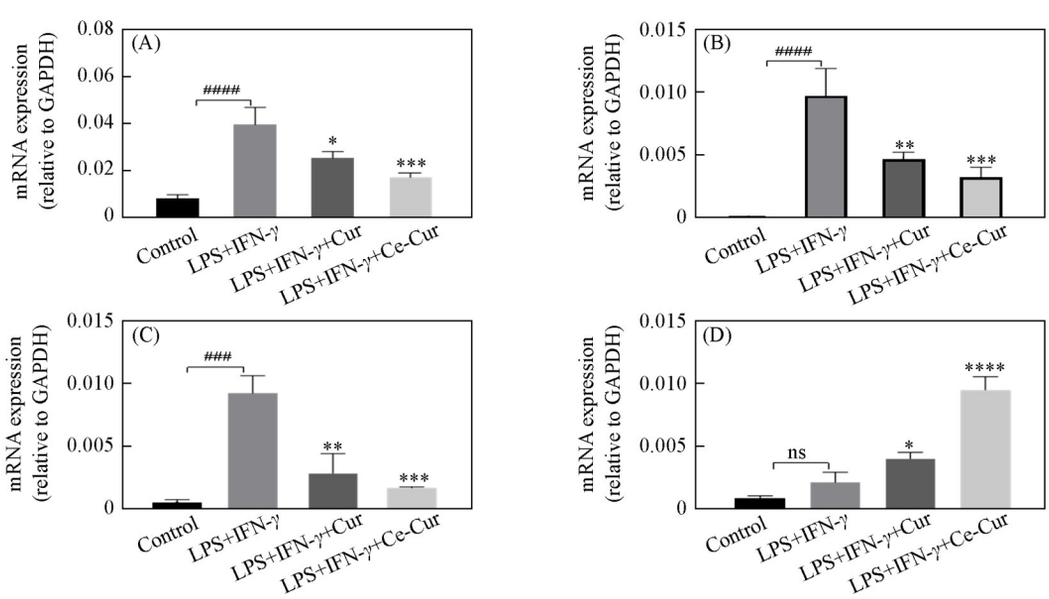


Fig. 6 mRNA expression of TNF-α(A), IL-1β(B), IL-16(C) and M2(D) IL-10 macrophage markers in RAW264.7 cells after different treatments, as evaluated by RT-qPCR analysis

Data are mean ± SD(n=3); ####P<0.0001, ###P<0.001 *vs.* Control group, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ****P<0.0001 *vs.* LPS+IFN-γ group; ns indicates no statistical significance.

及抗炎细胞因子白细胞介素-10(IL-10)的表达水平均出现显著上调，表明该处理可有效诱导细胞产生炎症反应，从而构建了细胞炎症模型．与之相反，经10 μg/mL Ce-Cur纳米酶处理后，RAW264.7细胞中促炎细胞因子的mRNA表达呈现明显抑制趋势：其中TNF-α，IL-6与IL-1β的mRNA表达量降低($P<0.05$)，计算得出其抑制率分别达到57%，82%和67%；同时，具有M2型巨噬细胞标志物特性的抗炎细胞因子IL-10表达量显著上调($P<0.0001$)，其相对提高率为351%．上述结果充分证实，Ce-Cur纳米酶能够通过抑制促炎细胞因子的释放及促进抗炎细胞因子的mRNA表达，从而有效调控细胞炎症状态，展现出优良的抗炎活性．

2.5 Ce-Cur纳米酶对巨噬细胞极化特征蛋白表达的影响

RT-qPCR实验结果表明，Ce-Cur纳米酶在转录水平上调控了M1、M2型巨噬细胞标志物的表达，但其无法提供蛋白质表达的信息．为此，实验对M1表型的关键标志物诱导型一氧化氮合酶(iNOS)和M2表型的关键标志物CD206进行了免疫荧光分析．如图7所示，在iNOS表达方面，与LPS+IFN-γ处理组相比，Cur处理组与Ce-Cur纳米酶(10 μg/mL)处理组的荧光信号强度均出现一定程度下降，且Ce-Cur纳米酶处理组的荧光强度低于Cur处理组．此结果提示，Ce-Cur纳米酶中Cur和无定型Ce氧化物协同作用，能够下调M1型巨噬细胞特征标志物iNOS的表达水平，进而发挥抗炎效应．在CD206表达检测中，与LPS+IFN-γ处理组相比，Cur处理组和Ce-Cur处理组的荧光强度均呈上升趋势，其中Ce-Cur处理组的荧光强度显著高于Cur处理组．这表明Ce-Cur纳米酶中Cur与无定型Ce氧化物协同作用，可有效促进M2型巨噬细胞特征标志物CD206的表达．综上可知，Ce-Cur纳米酶不仅能够抑制促炎相关标志物(iNOS)的表达，还可上调抗炎相关标志物(CD206)的表达水平，此结论与RT-qPCR实验结

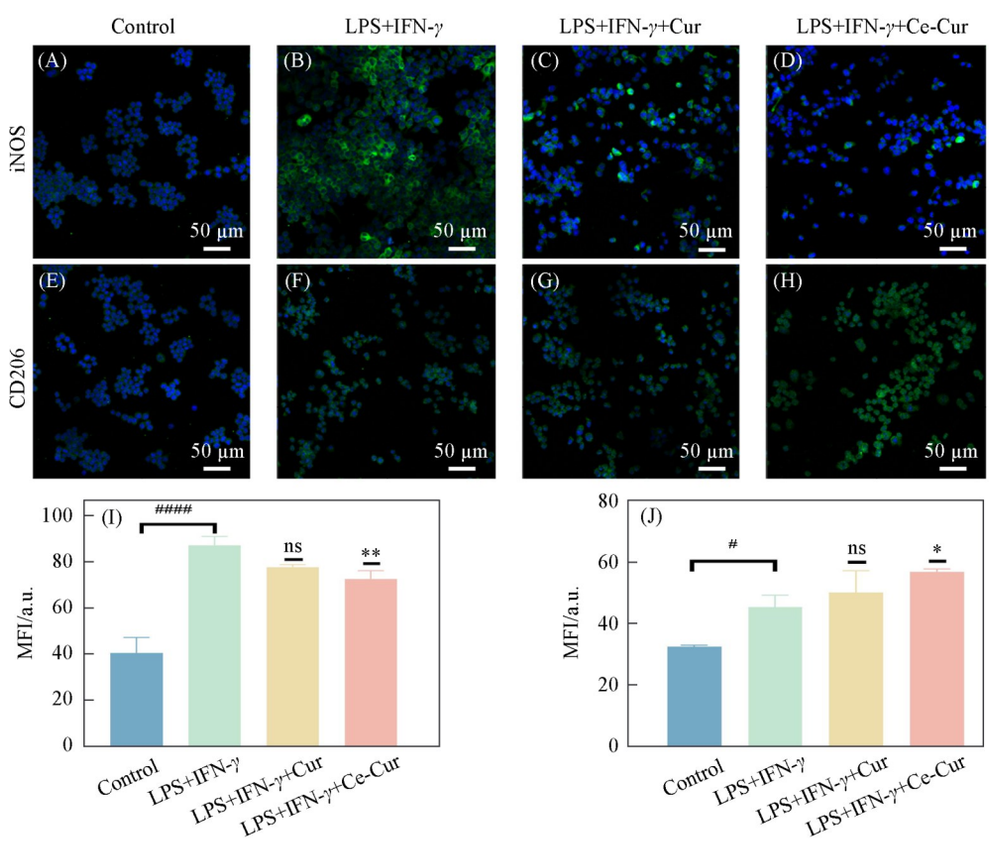


Fig. 7 Immunofluorescence images showing expression of proinflammatory factor iNOS(A—D) and anti-inflammatory factor CD206(E—H), along with quantitative analysis of iNOS-positive(I) and CD206-positive cells(J)

####$P<0.0001$, ###$P<0.001$ *vs.* Control group, *$P<0.05$, **$P<0.01$, ***$P<0.001$, ****$P<0.0001$ *vs.* LPS+IFN-γ group; ns indicates no statistical significance.

果一致. mRNA与蛋白表达水平的变化呈现出一致性，不仅证明了Ce-Cur纳米酶对极化相关基因的转录调控是有效的，更重要的是这种调控可转化为蛋白的表达.

2.6 Ce-Cur纳米酶对巨噬细胞炎症因子的调控

免疫荧光分析结果显示，与LPS+IFN-γ模型组相比，Ce-Cur纳米酶处理组的细胞内iNOS荧光信号显著减弱($P<0.01$)，而CD206荧光信号则增强($P<0.05$)，表明Ce-Cur纳米酶可有效调控巨噬细胞极化相关蛋白的内在表达. 为进一步探究这些蛋白的表达变化是否转化为对外的分泌功能，采用ELISA法定量检测了细胞培养上清液中炎症因子的水平. 如图8(A)~(D)所示，用LPS+IFN-γ刺激RAW264.7巨噬细胞后，Ce-Cur纳米酶组显著降低了细胞分泌至胞外的促炎因子(TNF-α，IL-6和IL-1β)的蛋白浓度，同时提升了抗炎因子IL-10的分泌水平，表明在Ce-Cur纳米酶作用下，巨噬细胞能够发挥其免疫调节功能.

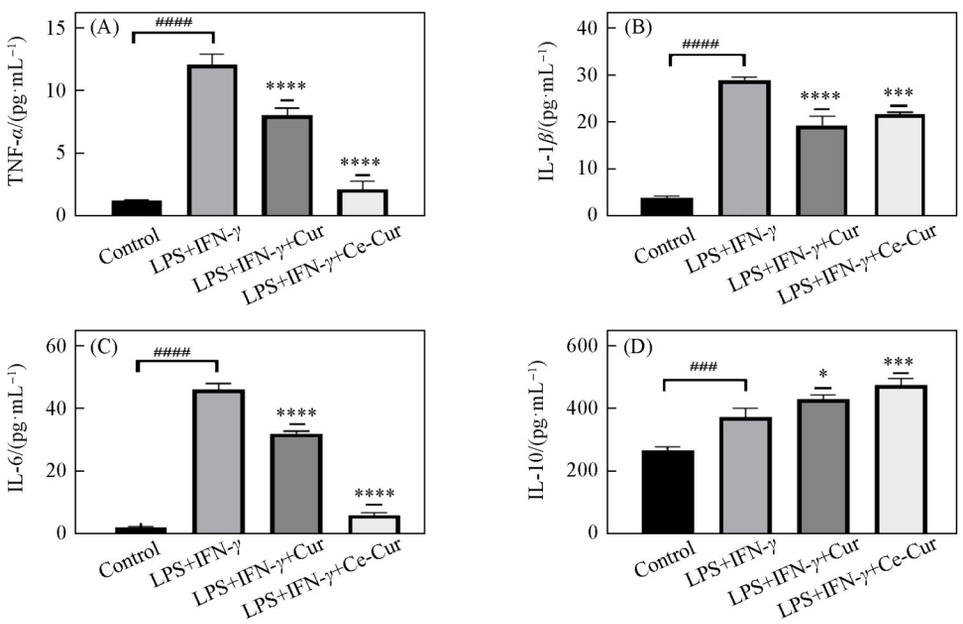


Fig. 8 TNF-α (A), IL-1β (B), IL-16 (C) and M2 (D) IL-10 macrophage markers in RAW264.7 cells after different treatments, as evaluated by ELISA analysis

Data are mean ± SD (n=3); ####P<0.0001, ###P<0.001 *vs.* Control group, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ****P<0.0001 *vs.* LPS+IFN-γ group; ns indicates no statistical significance.

3 结　论

设计合成了有机-无机杂化的Ce-Cur纳米酶. CCK8与ROS评价结果表明，该纳米酶具备良好的生物相容性和显著的抗氧化能力，能够有效清除DPPH、ABTS自由基以及细胞内的活性氧(ROS). 结合XRD，XPS，RT-qPCR，免疫荧光和ELISA等多维度数据分析，发现Ce-Cur纳米酶中Ce^{3+}/Ce^{4}的氧化还原循环与姜黄素协同作用，通过清除ROS抑制M1型炎性细胞因子的产生，不仅可显著降低M1型炎症因子TNF-α和IL-6在mRNA层面的表达及蛋白分泌水平，同时能促进M2型抗炎因子IL-10的表达与分泌，从而有效调控巨噬细胞极化状态，表现出优异的抗炎活性. 本研究为Ce-Cur纳米酶在免疫调节与抗炎治疗领域的应用提供了实验依据与理论支持，为靶向抑制NF-κB介导的M1促炎通路及激活STAT6相关的M2抗炎通路提供了新思路，也为炎症相关疾病的免疫治疗策略开发提供了潜在途径.

参　考　文　献

[1] Mills C. D., Ley K., *J. Innate Immun.*, **2014**, *6*(6), 716—726
[2] Deng L. S., Jian Z. J., Xu T., Li F. Q., Deng H. D., Zhou Y. C., Lai S. Y., Xu Z. W., Zhu L., *Molecules*, **2023**, *28*(5), 2379
[3] Pliouta L., Lampsas S., Kountouri A., Korakas E., Thymis J., Kassi E., Oikonomou E., Ikonomidis I., Lambadiari V., *J. Clin. Med.*,

2025, *14*(11), 3706
[4] Mohapatra A., Rajendrakumar S. K., Chandrasekaran G., Revuri V., Sathiyamoorthy P., Lee Y. K., Lee J. H., Choi S. Y., Park I. K., *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2023**, *15*(3), 3812—3825
[5] Chen Y., Chen N., Wang J., Li S. Q., *Acta Biochim. Pol.*, **2023**, *70*(1), 77—82
[6] Wang Y. T., Fu X., Li H. J., *Front. Endocrinol.*, **2025**, *16*, 1520835
[7] Sarmiento-Salinas F. L., Perez-Gonzalez A., Acosta-Casique A., Ix-Ballote A., Diaz A., Trevino S., Rosas-Murrieta N. H., Millan-Perez-Pena L., Maycotte P., *Life Sci.*, **2021**, *284*, 119942
[8] Zhao T. J., Wu W., Sui L. H., Huang Q., Nan Y. Y., Liu J. H., Ai K. L., *Bioact. Mater.*, **2022**, *7*, 47—72
[9] Li C. L., Deng C. S., Wang S. W., Dong X., Dai B., Guo W. D., Guo Q. Q., Feng Y. L., Xu H. D., Song X. Y., Cao L., *Redox Biol.*, **2024**, *70*, 103059
[10] Vadevoo S. M. P., Kang Y. L., Gunassekaran G. R., Lee S. M., Park M. S., Jo D. G., Kim S. K., Lee H., Kim W. J., Lee B. Y. H., *Theranostics*, **2024**, *14*(6), 2605—2621
[11] Chen R. J., Zheng S. M., Zhao X. Y., Huang H. R., Xu Y. T. H., Qiu C. Y., Li S. J., Liang X. D., Mao P. F., Yan Y. Q., Lin Y. H., Song S. N., Cai W. J., Guan H. X., Yao Y. S., Zhu W. L., Shi X. B., Ganapathy V., Kou L. F., *J. Control. Release*, **2025**, *380*, 469—489
[12] Nelson K. M., Dahlin J. L., Bisson J., Graham J., Pauli G. F., Walters M. A., *J. Med. Chem.*, **2017**, *60*(5), 1620—1637
[13] Gorabi A. M., Razi B., Aslani S., Abbasifard M., Imani D., Sathyapalan T., Sahebkar A., *Cytokine*, **2021**, *143*, 155541
[14] Benameur T., Gaban S. V. F., Giacomucci G., Filannino F. M., Trotta T., Polito R., Messina G., Porro C., Panaro M. A., *Molecules*, **2023**, *28*(2), 742
[15] Li Z., Hao K., He C. L., Tian H. Y., *Chem. J. Chinese Universities*, **2023**, *44*(10), 20230154(李真, 郝凯, 贺超良, 田华雨. 高等学校化学学报, **2023**, *44*(10), 20230154)
[16] Rainey N. E., Moustapha A., Saric A., Nicolas G., Sureau F., Petit P. X., *Cell Death Discov.*, **2019**, *5*, 150
[17] Li D. Y., Zhang C. J., Gao Z. S., Xia N., Wu C., Liu C., Tian H., Mei X. F., *Mol. Pharmaceut.*, **2023**, *20*(9), 4453—4467
[18] Liao D. H., Shangguan D. G., Wu Y., Chen Y., Liu N., Tang J. Y., Yao D. W., Shi Y. R., *Psychopharmacology*, **2023**, *240*(5), 1179—1190
[19] Wang Y., Li C. Y., Wan Y., Qi M. L., Chen Q. H., Sun Y., Sun X. L., Fang J., Fu L., Xu L., Dong B., Wang L., *Small*, **2021**, *17*(41), 2101505
[20] Yuan R. Y. K., Li Y. Q., Han S., Chen X. X., Chen J. Q., He J., Gao H. W., Yang Y., Yang S. L., Yang Y., *ACS Cent. Sci.*, **2022**, *8*(1), 10—21
[21] Jin Y. N., Yang S. Q., Li F. F., Zhang Y. Y., Zhao T. Y., Cheng S. Q., Mei X. H., *J. Food Eng.*, **2024**, *371*, 111994
[22] Li S. Y., Wei N., Wei J., Fang C. L., Feng T., Liu F. F., Liu X., Wu B., *Int. J. Biol. Macromol.*, **2024**, *266*, 131248
[23] Liu X. L., Chen B. H., Chen J. Q., Wang X., Dai X. F., Li Y. Q., Zhou H. Y., Wu L. M., Liu Z., Yang Y., *Adv. Mater.*, **2024**, *36*(2), 2308477
[24] Jiang C. X., Shi Q. Z., Yang J., Ren H., Zhang L., Chen S., Si J. Y., Liu Y. H., Sha D. J., Xu B., Ni J., *J. Adv. Res.*, **2024**, *63*, 159—170
[25] Mehmood R., Ariotti N., Yang J. L., Koshy P., Sorrell C. C., *ACS Biomater. Sci. Eng.*, **2018**, *4*(3), 1064—1072
[26] Deshpande S., Patil S., Kuchibhatla S. V. N. T., Seal S., *Appl. Phys. Lett.*, **2005**, *87*(13), 133113
[27] Wang F., Li J. Q., Chen C. Y., Lan Y. P., Sohn H. Y., Murali A., Zhang W., Zhang J. S., Wang Q., Liu L., *Mol. Catal.*, **2023**, *549*, 113507
[28] Mary C. P. V., Vijayakumar S., Shankar R., *J. Mol. Graph. Model.*, **2018**, *79*, 1—14
[29] Gao Y. Y., Liu K. L., Zhang Y. C., Sun Z. Y., Song B., Wang Y., Zhang B., Chen X., Hu D. T., Wen J. P., Wang H., Wang K., Wang L., *Carbohydr. Polym.*, **2023**, *310*, 120668
[30] Peng W. C., Tai W. B., Li B. W., Wang H., Wang T., Guo S. Y., Zhang X., Dong P. Y., Tian C. Y., Feng S. Y., Yang L., Cheng G., Zheng B., *Nat. Mater.*, **2025**, *24*(4), 637—648
[31] Liang L. X., Song A. Q., Zhou Y., Sun P., Wang D. Q., Wei J., *Chem. J. Chinese Universities*, **2024**, *45*(7), 20240169(梁露娴, 宋安琪, 周扬, 孙平, 王德强, 魏杰. 高等学校化学学报, **2024**, *45*(7), 20240169)
[32] Yang Y., Wu M. Y., Zhang X. L., Zhao Y. L., Zhou S. T., Ji W. B., Liu H. G., *Agriculture*, **2024**, *14*(7), 992

(Ed.: L, V, K)