

## MoS<sub>2</sub>纳米酶通过调控线粒体动力及自噬减轻炎症性内皮细胞损伤

潘冬梅<sup>1</sup>, 柯孙葵<sup>3</sup>, 尹乾浩<sup>4</sup>, 杨沛彦<sup>2</sup>, 李超<sup>1\*</sup>, 叶社房<sup>4\*</sup>

(1. 厦门医学院附属海沧医院, 福建 厦门 361000; 2. 厦门大学附属第一医院, 福建 厦门 361004; 3. 厦门大学附属中山医院, 福建 厦门 361004; 4. 厦门大学材料学院, 生物材料系/生物医学工程研究中心/福建省高校重点实验室, 厦门市生物医学工程技术研究中心, 福建 厦门 361005)

**摘要:** 探讨新型 MoS<sub>2</sub> 纳米酶通过调控线粒体动力, 以减轻炎症性血管内皮细胞损伤的保护机制。利用水热法制备出了花状 MoS<sub>2</sub> 纳米片, 结合电子自旋共振 (electron spin resonance, ESR) 光谱检测技术, 表明花状 MoS<sub>2</sub> 纳米片对羟基自由基 ( $\cdot\text{OH}$ ) 和单线态氧 ( $^1\text{O}_2$ ) 都具有很强的清除能力, 呈剂量依赖效应。通过体外脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导的血管内皮细胞炎症氧化应激损伤模型, 用花状 MoS<sub>2</sub> 纳米片预处理, 本研究分别用 MTT 及 Annexin V-FITC/PI 双染法检测内皮细胞毒性及凋亡; 用 MitoTracker 荧光探针观察内皮细胞线粒体分裂及融合形态; 用活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 探针 DCFH-DA 及超氧阴离子 ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) 探针 DHE 检测细胞氧化应激水平; 用质粒 GFP-LC3 转染及荧光共定位技术观察并分析细胞自噬及线粒体自噬形成。结果表明, MoS<sub>2</sub> 纳米酶可以显著减少炎症性内皮细胞的细胞毒性及细胞凋亡, 减轻炎症性内皮细胞线粒体的分裂, 并维持融合状态下的线粒体动力; 还可以缓解 LPS 介导的内皮细胞线粒体自噬, 进而保护内皮细胞免受炎症氧化应激性损伤。以上结果确立了新型 MoS<sub>2</sub> 纳米酶可以通过调控内皮细胞线粒体动力及线粒体自噬, 实现对炎症性内皮细胞损伤的保护, 有望拓展 MoS<sub>2</sub> 纳米酶用于防治慢性炎症性血管内皮损伤相关疾病。

**关键词:** MoS<sub>2</sub> 纳米酶; 血管内皮; 氧化应激; 线粒体动力; 线粒体自噬

中图分类号: R943

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870(2024)10-2791-09

## MoS<sub>2</sub> nanozyme attenuated inflammation-related endothelial cell injury by regulating mitochondrial dynamics and mitophagy

PAN Dong-mei<sup>1</sup>, KE Sun-kui<sup>3</sup>, YIN Qian-hao<sup>4</sup>, YANG Pei-yan<sup>2</sup>, LI Chao<sup>1\*</sup>, YE She-fang<sup>4\*</sup>

(1. The HaiChuang Hospital of Xiamen Medical College, Xiamen 361000, China; 2. The First Affiliated Hospital of Xiamen University, Xiamen 361004, China; 3. Zhongshan Hospital of Xiamen University, Xiamen 361004, China; 4. The Higher Educational Key Laboratory for Biomedical Engineering of Fujian Province, Department of Biomaterials, Research Center of Biomedical Engineering of Xiamen, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

**Abstract:** To explore the protective mechanisms of a novel molybdenum disulfide (MoS<sub>2</sub>) nanozyme in alleviating inflammation-related endothelial cell injury by regulating mitochondrial dynamic, flower like-MoS<sub>2</sub> nanosheets were prepared by hydrothermal method, and its antioxidant enzyme-mimic activities were assessed via electron spin resonance (ESR) spectroscopy. It was shown that MoS<sub>2</sub> nanosheets had strong scavenging ability for hydroxyl radical ( $\cdot\text{OH}$ ) and singlet reactive oxygen species ( $^1\text{O}_2$ ) in a dose-dependent manner. Using an *in vitro* lipopolysaccharide (LPS)-induced vascular endothelial cell injury model, the protective roles of MoS<sub>2</sub> nanozyme on cytotoxicity and apoptosis of endothelial cells were examined by MTT and Annexin V-FITC/PI assay,

收稿日期: 2024-04-30; 修回日期: 2024-07-04.

基金项目: 国家自然科学基金面上资助项目 (32071396, 82073405); 厦门市自然科学基金项目 (3502Z20227425).

\*通讯作者 Tel: 86-592-6589189, E-mail: lc5912005@163.com;

Tel: 86-592-2185299, E-mail: yeshefang@xmu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-0416

respectively. Mitochondrial fission/fusion of endothelial cell were observed by Mito-Tracker green probe. Reactive oxygen species (ROS) probe DCFH-DA and superoxide anion probe DHE were used to detect the level of oxidative stress *in vitro*. Plasmid GFP-LC3 transfection using colocalization analysis was applied to assess the autophagy of endothelial cells. The results showed that MoS<sub>2</sub> nanozyme could significantly reduce the cytotoxicity and apoptosis of endothelial cells stimulated by LPS, and prevent the impairment mitochondrial dynamics of endothelial cells, thus maintaining mitochondrial dynamics. In addition, MoS<sub>2</sub> nanozyme was also shown to alleviate LPS-mediated endothelial mitochondrial autophagy, thus protecting endothelial cells from inflammatory stress. These results established that MoS<sub>2</sub> nanozyme protected endothelial cells injury from inflammatory stress by regulating mitochondrial dynamics and mitochondrial autophagy of endothelial cells, which is expected to expand the use of MoS<sub>2</sub> nanozyme in the prevention and treatment of inflammation-related vascular endothelial diseases.

**Key words:** MoS<sub>2</sub> nanozyme; vascular endothelium; oxidative stress; mitochondrial dynamics; mitophagy

血管内皮作为选择性单层细胞生物屏障维持血管稳态,包括维持血管张力、血管生成以及为机体提供一个抗氧化、抗炎和抗血栓形成的界面等<sup>[1]</sup>。血管内皮受损所致的内皮功能异常是许多泛血管疾病的标志特征,其中过量的氧自由基是血管内皮功能受损的重要病理机制之一<sup>[2]</sup>。生理状态下,氧化应激可调节内皮细胞功能、受体信号和免疫反应等,但过度的氧化应激则会通过促进血管平滑肌和炎症细胞的生长及迁移、降解细胞外基质、促进内皮细胞凋亡、激活转录因子、促进炎症因子和黏附分子过表达等机制损伤内皮细胞<sup>[3,4]</sup>。线粒体是活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的主要生成场所,线粒体功能障碍会促使细胞内 ROS 的过度生成,造成细胞内氧化应激,促进细胞损伤甚至凋亡。线粒体动力 (mitochondrial dynamics) 紊乱是引起线粒体功能障碍的关键机制<sup>[5]</sup>,线粒体通过不断地融合与分裂、线粒体自噬等过程维持细胞正常生理功能<sup>[5,6]</sup>。当线粒体动力异常时,线粒体分裂相关蛋白,如动力相关蛋白 1 (dynamin-related protein 1, Drp1)、线粒体分裂因子 (mitochondrial fission factor, Mff)、线粒体分裂蛋白 1 (mitochondrial fission protein 1, Fis1) 等表达增高;而线粒体融合相关蛋白,如视神经萎缩因子 1 (optic atrophic protein1, OPA1)、线粒体融合蛋白 2 (mitofusin 2, Mfn2) 等表达降低,造成线粒体碎片化,诱发其严重功能障碍<sup>[7]</sup>。线粒体动力在能量产生、钙稳态和细胞免疫及凋亡等方面发挥着重要作用,其异常与血管慢性炎症、血管通透性增加、内皮细胞衰老、内皮细胞代谢异常和内皮细胞间质转化等密切相关<sup>[8]</sup>。因此,干预线粒体动力调控细胞内氧化应激水平可作为治疗泛血管疾病的潜在靶标,是血管药物研究的重要策略之一。

纳米酶 (nanozyme) 是指具有类似天然酶活性的纳米材料<sup>[9]</sup>。与天然酶相比,纳米酶具有稳定性高、催化活性可调、易规模制备及功能修饰等特点,因而在生

物医学领域备受关注<sup>[10,11]</sup>。纳米酶主要有过氧化物酶模拟酶、过氧化氢酶模拟酶、氧化物酶模拟酶,以及超氧化物歧化酶模拟酶等<sup>[12]</sup>。体外环境下,纳米酶在极端条件下性能稳定,有望替代天然酶在细胞捕获、生物分子检测、生物排污等领域发挥作用<sup>[13]</sup>。体内环境下,纳米酶则可通过多重氧化还原酶活性来调节细胞内活性氧 ROS 水平,以用于防治慢性氧化应激性疾病,如心血管疾病、糖尿病、神经退行性疾病及癌症等<sup>[14,15]</sup>,目前在纳米生物医药研究领域备受关注。MoS<sub>2</sub> 是一类具有类似石墨烯独特二维结构的过渡金属二硫化物纳米材料,因其出色的理化性能及良好的生物相容性等,其在药物载体、光动力治疗、生物传感等领域具有潜在应用前景<sup>[16,17]</sup>。MoS<sub>2</sub> 纳米片层因其表面富有 Mo、S 空穴而显示出类过氧化氢酶活性、类超氧化物歧化酶活性等多重类酶活性,引起了研究者的广泛关注<sup>[18,19]</sup>。研究表明,MoS<sub>2</sub> 纳米酶可以通过发挥类氧化酶活性,调控病灶微环境的氧化应激状态,在抗氧化应激损伤及内皮细胞衰老、促进保护性自噬及保护神经等方面发挥重要作用<sup>[20,21]</sup>。最近还发现,MoS<sub>2</sub> 纳米酶可逆转内皮细胞间质化、促进血管再生等<sup>[22]</sup>。本研究合成了花状 MoS<sub>2</sub> 纳米片层结构,通过体外炎性内皮细胞损伤模型,探讨 MoS<sub>2</sub> 纳米花的纳米酶活性及其对线粒体动力的调控机制,为发展新型纳米酶用于炎性血管内皮损伤的防治策略提供新思路。

## 材料与方法

**仪器与试剂** 人脐静脉血管内皮细胞系 (HUVECs) 购自中国科学院上海生命科学研究所。脂多糖 (lipopolysaccharides, LPS)、2,2,6,6-四甲基哌啶 (2,2,6,6-tetramethylpiperidine, TEMP)、5-叔丁氧羰基-5-甲基-1-吡咯啉-*N*-氧化物 (5,5-dimethyl-1-pyrroline *N*-oxide, DMPO) 购自美国 Sigma 公司。内皮细胞培养基 EGM-2 购自美国 Clonetics 公司。胎牛血清 (fetal

bovine serum, FBS)、青霉素-链霉素溶液、MTT细胞增殖及毒性检测试剂盒、Annexin V-FITC/PI凋亡检测试剂盒、Mito-Tracker 荧光探针、线粒体膜电位检测试剂盒 (JC-1) 荧光探针 2',7'-二氯荧光素二乙酸酯 (2',7'-dichlorofluoresceindiacetate, DCFH-DA)、二氢乙锭 (dihydroethidium, DHE)、增强型 ATP 检测试剂盒、GFP-LC3 质粒、ECL 化学发光试剂购自上海碧云天生物技术公司。一抗包括: 抗 Drp1 抗体、抗 Drp1 Ser616 抗体、抗 Mff 抗体、抗 Bcl-2 (B-cell lymphoma-2) 抗体、抗 caspase-3 (apoptosis-related cysteine peptidase caspase 3) 抗体、抗 TOMM20 (translocase of outer mitochondrial membrane 20 homolog) 抗体、抗  $\beta$ -actin 抗体购自美国 Cell Signaling 公司; 抗 LC-3II (microtubule-associated proteins light chain 3) 抗体、抗 p62 (sequestosome 1) 抗体、抗 PINK1 (PTEN induced putative kinase 1) 抗体、抗 Parkin (Parkin protein) 抗体系美国 Abcam 公司产品。Lipofectamine 3000 购自美国 Invitrogen 公司。

酶标仪 (美国 Bio-Rad 680); Tcs SP2 激光共聚焦显微镜 (德国 Leica 公司); Axiovert 200 荧光倒置显微镜 (德国 Carl Zeiss 公司); BD FACSCanto cytometers (美国 BD 公司); FEI Tecnai G2 高分辨透射电子显微镜 (TEM, 美国 FEI 公司); 电子顺磁共振波谱仪 (EPR, 德国 Bruker 公司); ZS90 纳米粒度电位仪 (英国 Malvern 公司)。

**MoS<sub>2</sub> 纳米酶的制备及模拟酶活性检测** 通过水热法<sup>[23]</sup>制备得到花状 MoS<sub>2</sub> 纳米片。为了验证花状 MoS<sub>2</sub> 纳米片的抗氧化酶活性, 本研究通过 ESR 测定其清除活性氧的能力。以 TEMP 作为自旋捕集剂检测 <sup>1</sup>O<sub>2</sub> 的生成, 它可以与 <sup>1</sup>O<sub>2</sub> 反应并形成稳定的自旋加合物 TEMP/<sup>1</sup>O<sub>2</sub>, ESR 三重态信号与 TEMP-<sup>1</sup>O<sub>2</sub> 浓度呈正相关。将不同浓度的 MoS<sub>2</sub> 纳米片溶解在水中, 并添加到 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 2  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  TEMP 的混合溶液中, 用紫外-可见光照射该混合溶液 2 min 并记录 ESR 信号。以 DMPO 作为  $\cdot\text{OH}$  检测的自旋捕集剂, 它可以与  $\cdot\text{OH}$  反应形成自旋加合物 DMPO/ $\cdot\text{OH}$ 。以 FeSO<sub>4</sub> 刺激 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 生成  $\cdot\text{OH}$ , 将 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  FeSO<sub>4</sub>、2  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  DMPO、100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和不同浓度 MoS<sub>2</sub> 纳米片混合后记录 ESR 信号。

**细胞培养** HUVECs 细胞培养于 10% 胎牛血清、100  $\text{u}\cdot\text{mL}^{-1}$  氨苄青霉素、100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  链霉素的 EGM-2 培养基中, 置于 37 °C 湿化的 5% CO<sub>2</sub> 孵箱中培养。对数生长期细胞消化后, 按适宜密度接种于细胞培养板。根据预实验观察到 0.1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  LPS 刺激 HUVECs 细胞时伴随明显的线粒体分裂, 因此本研究采用该浓度

刺激 HUVECs 细胞 6 或 24 h 建立体外内皮细胞炎性活化损伤模型, 然后用 MoS<sub>2</sub> 纳米片在 50  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  时作为适宜浓度预处理 HUVECs 细胞用于后续研究。

**细胞活性与凋亡检测** 根据实验设计处理细胞后, 按试剂说明每孔加入 10  $\mu\text{L}$  MTT 溶液, 放置 1.5 h 后使用酶标仪测 A<sub>490</sub> 值, 并计算细胞存活率。细胞存活率 = [(处理组 A<sub>490</sub> 值 - 空白组 A<sub>490</sub> 值) / (对照组 A<sub>490</sub> 值 - 空白组 A<sub>490</sub> 值)]  $\times$  100%。同时, 参照试剂说明进行细胞凋亡检测。收集处理后的细胞, 经缓冲液洗涤、离心后, 悬浮于 100  $\mu\text{L}$  结合缓冲液并加入 10  $\mu\text{L}$  Annexin V-FITC 和 5  $\mu\text{L}$  PI。室温避光孵育 15 min 后, 流式细胞仪上机检测。

**线粒体动力分析** HUVECs 细胞接种在共聚焦培养皿中并进行相应的处理。内皮细胞经消化、洗涤后, 加入无血清培养基稀释的线粒体特异荧光染料 Mito-Tracker Green, 37 °C 孵育 30 min 后, 经 PBS 润洗, 在激光共聚焦显微镜下观察细胞中线粒体长度 (反映线粒体融合与分裂形态)。使用 ImageJ 软件对共聚焦图片中 Mito-Tracker Green 标记的线粒体长度进行统计分析。

**细胞内活性氧及线粒体功能检测** HUVECs 细胞经接种、贴壁后进行处理。收集消化细胞并洗涤, 用细胞内活性氧探针 DCFH-DA 和超氧化物阴离子探针 DHE 结合流式细胞术测定细胞总体或线粒体 ROS 水平。根据试剂操作说明, 分别与 DCFH-DA、DHE 荧光探针在 37 °C 避光孵育 30 min, PBS 漂洗 3 次, 过筛后流式细胞上机检测。同时, 参照 JC-1 线粒体膜电位试剂盒说明, 结合流式细胞仪检测线粒体膜电位  $\Delta\psi_m$  变化, 观察分析 JC-1 聚合物 (红色)/JC-1 单体 (绿色) 荧光强度的变化。处理过的细胞裂解后, 按试剂盒检测说明用化学发光法检测细胞内 ATP 含量。

**细胞转染及自噬体观察** 根据 Lipofectamine 3000 转染试剂盒说明书, 将 GFP-LC3 质粒转染体系分别转入到 HUVECs 细胞中, 使用 G418 筛选出具有稳定转染的 GFP-LC3/HUVECs 细胞, 并按细胞密度  $3\times 10^5$  个/孔接种到 24 孔板中, 继续培养 20 h。细胞进行相应处理后, 在共聚焦显微镜下观察 GFP 聚集情况并进行图片采集分析。

**细胞免疫荧光检测** 用 4% 多聚甲醛对细胞爬片进行固定后, 以 5% BSA/0.15% Triton X-100 封闭液室温处理 30 min, 分别加入一抗: TOMM20 (1:200) 和 PINK1 (1:200), 4 °C 孵育过夜。然后加入 Alexa fluor 488 或 FITC 标记的二抗 (1:400), 37 °C 温育 1 h, 碘化丙啶复染、封片后, 置于荧光显微镜下观察分析。

**蛋白印迹检测** 收集处理细胞样品, 经蛋白酶和

磷酸酶抑制剂的RIPA液裂解后, 4 °C 13 000 r·min<sup>-1</sup>离心取上清。按胞浆/线粒体蛋白分离试剂盒说明书, 提取胞浆和线粒体蛋白。提取细胞总蛋白后对蛋白浓度进行定量后, 进行SDS-PAGE凝胶电泳1.5 h, 300 mA转膜2 h, 5%脱脂乳室温封闭2 h后, 加入一抗, 4 °C孵育过夜; 然后, TBST缓冲液洗涤30 min。加入稀释好的辣根过氧化物酶标记的二抗, 室温孵育2 h, TBST洗涤, 加入ECL显色液显影成像, 用ImageJ软件分析条带灰度值。

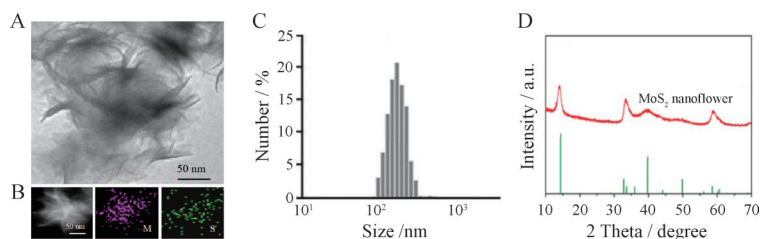
**统计学分析** 采用SPSS 10.0统计软件对各组数据进行ANOVA单因素方差分析, 多组数据之间的比较采用student's Newman-Keuls方法, 数据表达为相对值均值±标准差, 其中相对值为实验值与对照值(设为1或100%)的比值。 $P < 0.05$ 为有统计学差异。

## 结果与讨论

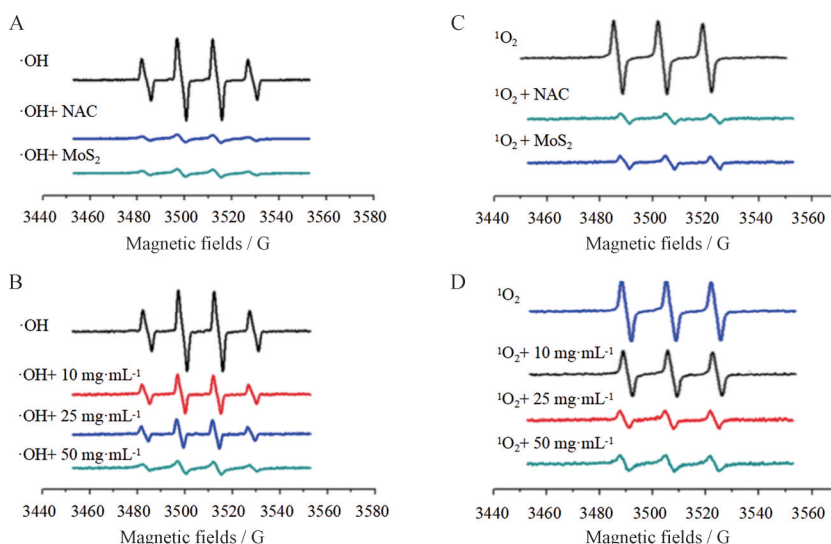
### 1 MoS<sub>2</sub>纳米花的理化性能表征

从图1A TEM照片中可以看出, 制备的MoS<sub>2</sub>纳米

结构呈类石墨烯的絮状薄片状结构, 边缘卷曲, 形成三维花状结构, 粒径大小约为210 nm。EDS元素分布图揭示MoS<sub>2</sub>纳米片异质结构中, Mo和S元素较为均匀地分布(图1B)。Zeta电位测得MoS<sub>2</sub>纳米片的电位为-23.6 mV, 提示其在水中具有良好的分散性。如图1C所示, DLS分析其平均粒径为242 nm, 与TEM测得的结果较为吻合。MoS<sub>2</sub>纳米片呈花状结构, 有较大的比表面积为62.5 m<sup>2</sup>·g<sup>-1</sup>。MoS<sub>2</sub>的衍射峰与表征标准卡片对应较好且衍射峰尖锐, 说明其具有较高的结晶度(图1D)<sup>[23]</sup>。接下来, 本研究用ESR法研究了花状MoS<sub>2</sub>纳米片在不同条件下的模拟酶抗氧化活性。如图2A、B所示, 利用DMPO作为·OH检测的自旋捕集剂, 与对照组相比, 在使用MoS<sub>2</sub>纳米片后, ESR信号显著降低, 显示良好的·OH清除能力, 效应呈浓度依赖性。类似地, 以TEMP作为自旋捕集剂检测到<sup>1</sup>O<sub>2</sub>的生成, 在对照组中呈现明显ESR信号; 经MoS<sub>2</sub>纳米片处理后, ESR信号峰值强度显著降低, 表明花状MoS<sub>2</sub>纳米片能有效地消耗<sup>1</sup>O<sub>2</sub>, 效应亦呈浓度依赖性(图2C、D)。花



**Figure 1** Characterization of flower-like MoS<sub>2</sub> nanosheets. A: Transmission electron microscope (TEM) image of MoS<sub>2</sub> flower-like nanosheets; B: Energy dispersive spectrometer (EDS) mapping of MoS<sub>2</sub> nanosheets; C: Dynamic light scattering (DLS) analysis of MoS<sub>2</sub> nanosheets in water; D: X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) spectra of MoS<sub>2</sub> flower-like nanosheets



**Figure 2** Reactive oxygen species (ROS) scavenging abilities of flower like-MoS<sub>2</sub> nanosheets. A: ESR spectra of samples containing ·OH, MoS<sub>2</sub> nanosheets (50 mg·mL<sup>-1</sup>); B: ESR spectra of samples containing ·OH and MoS<sub>2</sub> nanosheets with different concentrations; C: ESR spectra of samples containing <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, MoS<sub>2</sub> nanosheets (50 mg·mL<sup>-1</sup>); D: ESR spectra of samples containing <sup>1</sup>O<sub>2</sub> and MoS<sub>2</sub> nanosheets with different concentrations

状MoS<sub>2</sub>纳米片的模拟酶抗氧化活性可能与MoS<sub>2</sub>纳米片平面存在较多的缺陷位点、有利于增加其活性部位有关<sup>[18,19]</sup>。

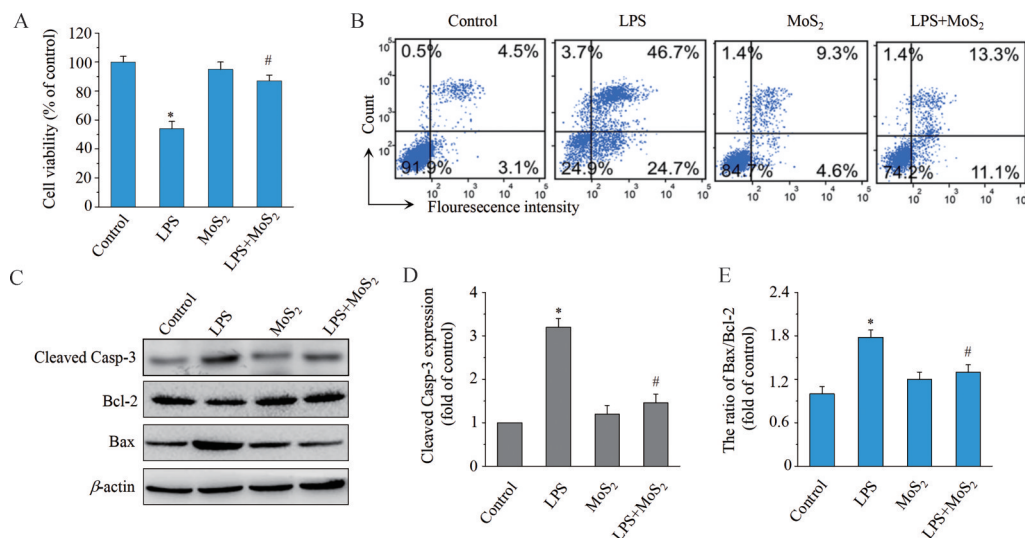
## 2 MoS<sub>2</sub>纳米酶通过清除氧自由基抑制LPS诱导的氧化应激性内皮细胞凋亡

ROS (如<sup>1</sup>O<sub>2</sub>、·OH等)的累积引起氧化应激诱导细胞损伤,是许多泛血管疾病的共同病理机制之一。基于前期研究结果<sup>[23]</sup>,花状MoS<sub>2</sub>纳米片在低于50 μg·mL<sup>-1</sup>浓度作用24 h时,对HUVECs细胞没有明显毒性作用;在此浓度范围内,50 μg·mL<sup>-1</sup>显示出最大的抗氧化模拟酶活性,因此该实验选择50 μg·mL<sup>-1</sup>作为适宜剂量用于MoS<sub>2</sub>纳米酶抗氧化应激损伤的后续研究。基于LPS刺激血管内皮细胞建立体外炎性氧化应激模型,本研究发现LPS刺激后HUVECs细胞活力约为正常对照组的50%,而MoS<sub>2</sub>纳米酶预处理后显著抑制了LPS诱导的HUVECs细胞毒性,细胞活性恢复至对照组的83%左右,表明MoS<sub>2</sub>可以抑制LPS介导的内皮细胞损伤(图3A)。图3B显示,在Annexin V-FITC/PI双染法检测细胞凋亡中,PI被排除在活细胞(Annexin V<sup>-</sup>/PI<sup>-</sup>)和早期凋亡细胞(Annexin V<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>)外,而晚期凋亡细胞和坏死细胞同时被双染料结合呈双阳性(Annexin V<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>)。如图3B所示,与对照组相比,LPS刺激细胞后24 h后,HUVECs细胞凋亡率增加到46.7%,经MoS<sub>2</sub>预处理后HUVECs细胞凋亡率降至13.3%。蛋白印迹结果表明,与LPS模型组相比,MoS<sub>2</sub>纳米酶预处理内皮细胞后,抗凋亡蛋白Bcl-2表达量增

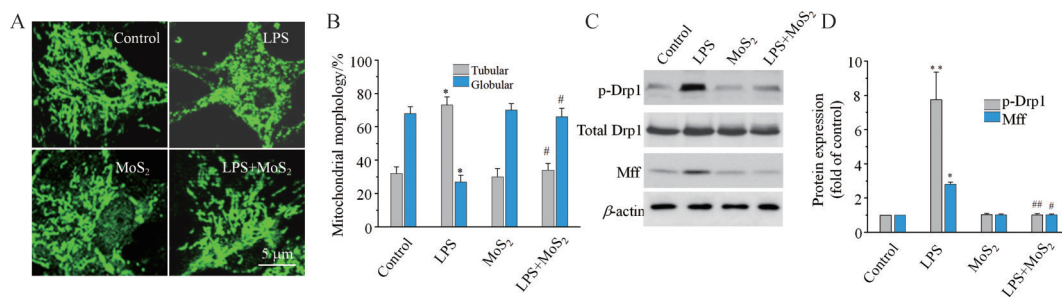
加,促凋亡蛋白Bax及凋亡效应蛋白cleaved caspase-3表达量下调(图3C~E)。在炎性细胞损伤中,线粒体外膜通透性增高可诱发细胞凋亡,该途径主要由Bcl-2家族蛋白调控<sup>[24]</sup>,据此推测MoS<sub>2</sub>纳米酶可能通过调控Bcl-2家族蛋白稳定线粒体膜,进而抑制caspase-3依赖性细胞凋亡。

## 3 MoS<sub>2</sub>纳米酶抑制LPS诱导的内皮细胞线粒体断片化

线粒体作为一种动态的细胞器,可以不停地融合与分裂运动,这种融合与分裂运动称为线粒体动力学,与细胞的代谢、增殖、凋亡等功能密切相关,其调控功能的损伤可以导致许多慢性疾病的发生<sup>[6]</sup>。利用Mito-Tracker Green作为线粒体特异标记,本研究发现对照组HUVECs细胞线粒体密集,呈长丝或管状网络结构;而LPS模型组线粒体呈密集点状排列,提示线粒体分裂导致断片化;MoS<sub>2</sub>纳米酶预处理后可使HUVECs细胞线粒体恢复至对照组的形态(图4A)。进一步对线粒体形态进行量化分析表明,LPS刺激模型组与MoS<sub>2</sub>纳米酶孵育后,内皮细胞管状线粒体数量显著增加,与图4A观察到的结果一致(图4B)。线粒体动力学由进化上高度保守的线粒体融合蛋白以及分裂蛋白调控与协同作用完成。蛋白印迹结果显示,LPS刺激后HUVECs细胞总Drp1蛋白水平无明显变化,但Drp1 Ser616磷酸化水平明显增高。一致地,线粒体分裂因子Mff表达在LPS刺激下也上调(图4C、D)。Drp1磷酸化后发生线粒体迁移,与线粒体外膜上



**Figure 3** Protective effects of MoS<sub>2</sub> nanozyme against cytotoxicity induced by lipopolysaccharides (LPS). A: Effects of MoS<sub>2</sub> nanozyme on the cytotoxicity of HUVECs with/without LPS stimulation for 24 h by MTT assay; B: Flow cytometric analysis of the percentage of apoptotic HUVECs in LPS-treated endothelial cell injury model with/without MoS<sub>2</sub> nanozyme by Annexin V/PI staining; C: The levels of cleaved caspase-3 (Casp-3), Bcl-2, and Bax expression were analyzed by Western blot; D, E: The intensity of blots was analyzed by densitometric analysis using ImageJ software.  $n = 3, \bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$  vs control; # $P < 0.05$  vs LPS



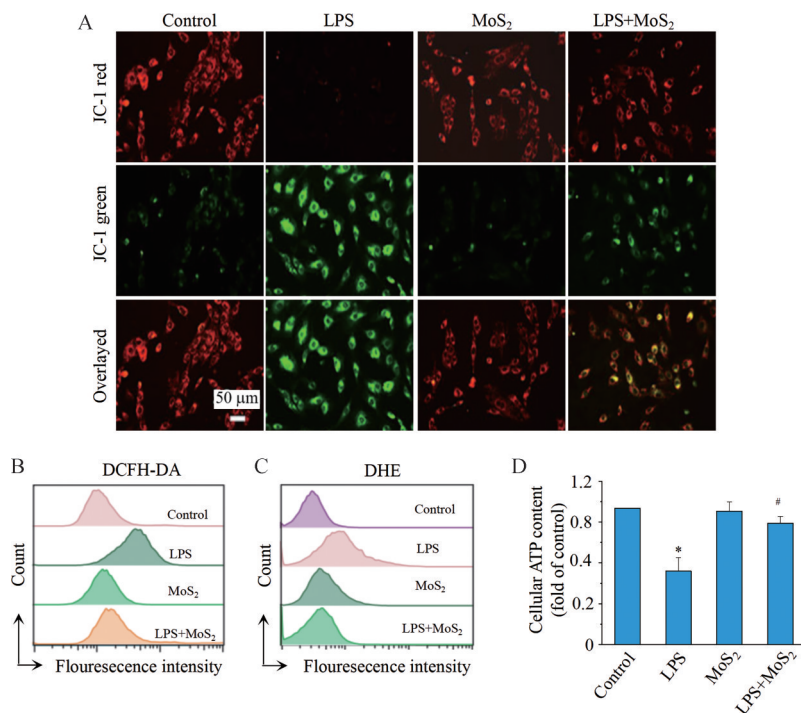
**Figure 4** MoS<sub>2</sub> nanozyme reduced mitochondrial fission in LPS-treated endothelial cell injury model. A: The mitochondrial morphology in HUVECs was measured by Mito-Tracker assay; B: Globular/tubular mitochondria were characterized and analyzed using ImageJ software; C: Mitochondrial fission-associated regulatory factors p-Drp1 and Mff were detected by Western blot; D: The intensity of blots was analyzed by densitometric analysis. *n* = 3,  $\bar{x} \pm s$ . \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01 vs control; #*P* < 0.05, ##*P* < 0.01 vs LPS

相应的受体蛋白如Mff、Fis1等结合并寡聚化，最终导致线粒体片段化<sup>[25]</sup>。与LPS模型组比较，MoS<sub>2</sub>纳米酶预处理后HUVECs细胞p-Drp1及Mff表达均下调(图4C、D)，表明MoS<sub>2</sub>纳米酶逆转LPS诱导的线粒体动力学紊乱与调控线粒体动力蛋白活性密切相关。

#### 4 MoS<sub>2</sub>纳米酶抑制LPS诱导的内皮细胞线粒体功能紊乱

线粒体动力动态平衡是维持细胞线粒体稳态和功能的前提，一旦该平衡破坏则会导致线粒体断片化使其功能受损，造成细胞氧化应激状态<sup>[15]</sup>。本研究用JC-1

法检测了HUVECs细胞线粒体膜电位( $\Delta\Psi_m$ )，探讨MoS<sub>2</sub>纳米酶对炎性内皮细胞线粒体功能的保护作用。在线粒体 $\Delta\Psi_m$ 较高时，JC-1以聚合物形式聚集在线粒体基质中而呈红色荧光；在线粒体 $\Delta\Psi_m$ 较低时，JC-1以单体形式存在而呈绿色荧光。用JC-1红/绿荧光的比值来衡量线粒体去极化功能状态。如图5A所示，与对照组相比，LPS刺激组的JC-1红色荧光强度变弱而绿色荧光则增强，表明LPS诱发了线粒体膜电位去极化。而加入MoS<sub>2</sub>纳米酶后，HUVECs细胞的JC-1红色荧光强度变强而绿色荧光则减弱，表明MoS<sub>2</sub>纳米酶使受损



**Figure 5** MoS<sub>2</sub> nanozyme restored the mitochondrial membrane potential, cellular ROS accumulation, and ATP production in LPS-treated endothelial cell injury model. A: Flow cytometric patterns of HUVECs stained with JC-1; B, C: Cellular ROS accumulation, and mitochondrial ROS level were assayed by DCFH-DA (B) and DHE (C) staining, respectively; D: Total cellular ATP levels assays were carried out using an ATP bioluminescence assay kit. *n* = 3,  $\bar{x} \pm s$ . \**P* < 0.05 vs control; #*P* < 0.05 vs LPS

的线粒体膜电位得到恢复,对线粒体功能发挥保护作用。线粒体是ATP的主要供应场所,参与许多细胞功能如活性氧簇、Ca<sup>2+</sup>稳态、凋亡等的信号转导过程。如图5B~D所示,与对照组相比,LPS刺激明显诱导HUVECs细胞总体ROS、线粒体活性氧上升及细胞内ATP水平的下降。与LPS模型组相比,MoS<sub>2</sub>纳米酶干预明显逆转了LPS诱导的HUVECs细胞氧化应激,并增加细胞ATP含量,其机制可能与恢复线粒体动力平衡有关。

### 5 MoS<sub>2</sub>纳米酶抑制LPS诱导的内皮细胞自噬与线粒体自噬

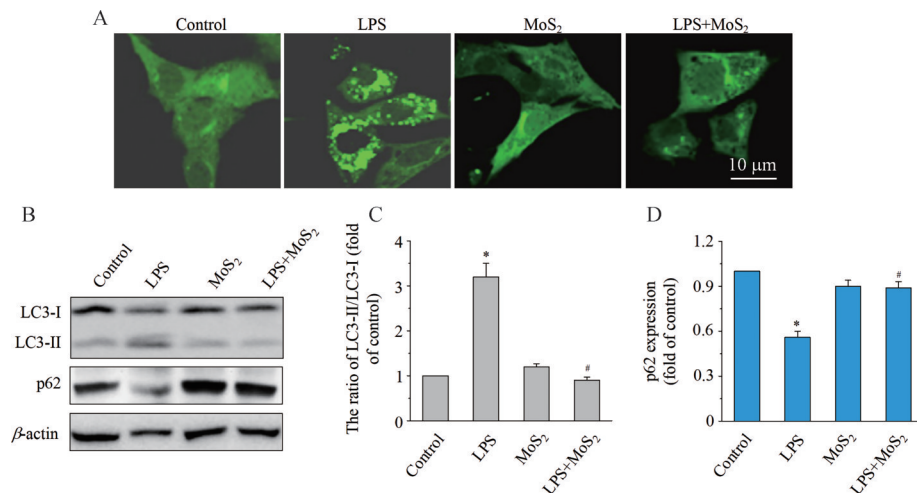
线粒体作为细胞内稳态必不可少的能量发生器,参与调控细胞死亡及自噬等过程,其核心功能使得线粒体的质量和数量受到严格控制。接下来,本研究继续探讨了MoS<sub>2</sub>纳米酶对LPS介导的细胞自噬的影响。GFP-LC3/HUVECs是稳定转染并持续表达绿色荧光标签的血管内皮细胞系,当自噬被激活后,GFP-LC3-I就会被加工成GFP-LC3-II而聚集在自噬小体膜中,在荧光显微镜下呈点状绿色荧光的自噬体。如图6A所示,与对照组相比,LPS诱导内皮细胞的绿色荧光呈点状聚集,阳性细胞的比例增多;而经MoS<sub>2</sub>纳米酶处理后,呈绿色荧光点状聚集的内皮细胞比例得到了显著的抑制。同样地,蛋白印迹分析表明,LPS刺激HUVECs细胞后,自噬标志物LC3-II的表达显著上升并伴随自噬底物p62的降解,与GFP-LC3标记的自噬体观察结果一致。而MoS<sub>2</sub>纳米酶可以抑制LC3-II的形成,促进自噬底物p62的堆积,与LPS组比较有显著差异(图6B~D),从而表明MoS<sub>2</sub>纳米酶能够抑制LPS诱导的细胞自噬。

在此基础上,本研究进一步探讨在线粒体分裂及去极化后,线粒体自噬是否参与了LPS诱导的内皮细胞自噬。当线粒体受损时,PINK1通过外膜转位酶在线粒体外膜积累,激活并招募Parkin蛋白,随后线粒体外膜上的蛋白电压依赖性阴离子通道蛋白1和Mfn1/2被Parkin泛素化,诱导线粒体自噬<sup>[26,27]</sup>。利用荧光共定位技术表明,LPS刺激处理内皮细胞后,PINK1蛋白与线粒体共定位明显,提示PINK1蛋白迁移到了线粒体膜促进了线粒体自噬,而MoS<sub>2</sub>纳米酶抑制了该效应的发生(图7A)。同样地,蛋白印迹分析表明,LPS刺激处理HUVECs细胞后,细胞PINK1与Parkin蛋白均表达上升,尤以PINK1蛋白表达更为明显,提示其可能作为级联启动蛋白通过PINK1/Parkin通路介导了细胞线粒体自噬效应。而MoS<sub>2</sub>纳米酶预处理则抑制了LPS诱导的PINK1与Parkin蛋白过表达,表明MoS<sub>2</sub>纳米酶调控炎性活化的内皮细胞线粒体自噬,进而有助于改善细胞线粒体功能(图7B、C)。

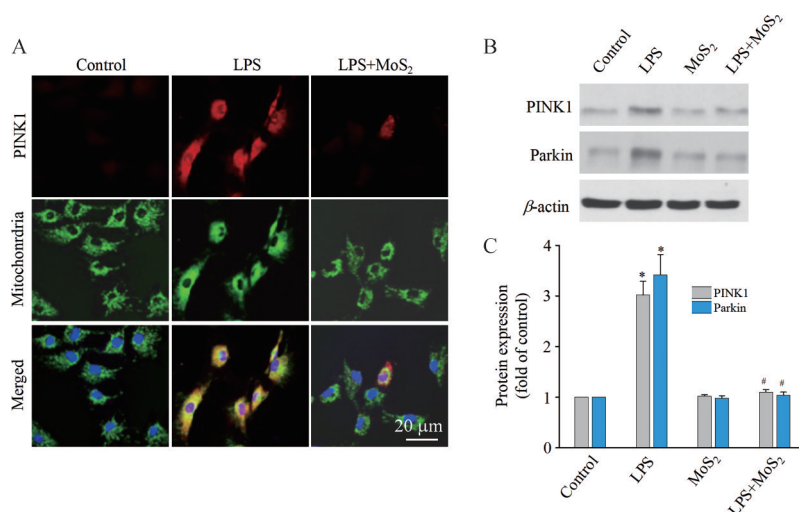
### 结论

本研究合成了具有类抗氧化酶活性的MoS<sub>2</sub>纳米酶,通过体外炎性氧化应激模型实验结果表明,MoS<sub>2</sub>纳米酶抑制LPS造成的内皮细胞氧化损伤和细胞凋亡,其机制可能与调控线粒体动力及线粒体自噬有关。本研究结果为发展新型纳米酶用于炎性血管内皮损伤的防治策略提供了新思路。

作者贡献:潘冬梅和柯孙葵负责细胞实验、数据分析及文章撰写;尹乾浩负责材料的制备与理化表征;杨沛彦负责分子与细胞相关实验;李超参与课题设计和指导及论文审



**Figure 6** MoS<sub>2</sub> nanozyme protected HUVECs by suppressing excessive autophagy. A: HUVECs with stable expression of GFP-LC3 were stimulated with LPS in the presence or absence of MoS<sub>2</sub> nanozyme, and GFP-LC3 puncta in treated cells was measured and quantified by confocal microscopy; B-D: The expression levels of LC3-II/LC3-I ratio and p62 were analyzed by Western blot. LC3-II/LC3-I ratios reflect the autophagy activity.  $n = 3, \bar{x} \pm s. *P < 0.05$  vs control; # $P < 0.05$  vs LPS



**Figure 7** MoS<sub>2</sub> nanozyme attenuated the mitophagy of HUVECs in LPS-treated endothelial cell injury model. A: The colocalization of mitochondria and PTEN induced putative kinase 1 (PINK1) was examined by dual immunofluorescence staining. The colocalization was increased in the LPS-treated HUVECs compared to the control group, while MoS<sub>2</sub> nanozyme treatment reduced this effect; B, C: The expression of PINK1 and Parkin was detected by Western blot. The intensity of blots was analyzed by densitometric analysis.  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$  vs control; # $P < 0.05$  vs LPS

阅;叶社房负责课题设计、指导和论文审阅。

**利益冲突:** 本文所有作者声明不存在利益冲突关系。

## References

- [1] Balta S. Endothelial dysfunction and inflammatory markers of vascular disease [J]. *Curr Vasc Pharmacol*, 2021, 19: 243-249.
- [2] Incalza MA, D'Oria R, Natalicchio A, et al. Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases [J]. *Vascul Pharmacol*, 2018, 100: 1-19.
- [3] He P, Talukder MAH, Gao F. Oxidative stress and microvessel barrier dysfunction [J]. *Front Physiol*, 2020, 11: 472.
- [4] Bai B, Yang Y, Wang Q, et al. NLRP3 inflammasome in endothelial dysfunction [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11: 776.
- [5] Kraus F, Roy K, Pucadyil TJ, et al. Function and regulation of the divisome for mitochondrial fission [J]. *Nature*, 2021, 590: 57-66.
- [6] Ma K, Chen G, Li W, et al. Mitophagy, mitochondrial homeostasis, and cell fate [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 467.
- [7] Horbay R, Bilyy R. Mitochondrial dynamics during cell cycling [J]. *Apoptosis*, 2016, 21: 1327-1335.
- [8] Jin JY, Wei XX, Zhi XL, et al. Drp1-dependent mitochondrial fission in cardiovascular disease [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2021, 42: 655-664.
- [9] Jiang D, Ni D, Rosenkrans ZT, et al. Nanozyme: new horizons for responsive biomedical applications [J]. *Chem Soc Rev*, 2019, 48: 3683-3704.
- [10] Wang H, Wan K, Shi X. Recent advances in nanozyme research [J]. *Adv Mater*, 2019, 31: e1805368.
- [11] Zhang R, Fan K, Yan X. Nanozymes: created by learning from nature [J]. *Sci China Life Sci*, 2020, 63: 1183-1200.
- [12] Meng X, Fan K, Yan X. Nanozymes: an emerging field bridging nanotechnology and enzymology [J]. *Sci China Life Sci*, 2019, 62: 1543-1546.
- [13] Wu J, Wang X, Wang Q, et al. Nanomaterials with enzyme-like characteristics (nanozymes): next-generation artificial enzymes (II)[J]. *Chem Soc Rev*, 2019, 48: 1004-1076.
- [14] Cheng C, Zhao S, Cheng Y, et al. Design of nanozymes for inflammatory bowel disease therapy [J]. *Sci China Life Sci*, 2021, 64: 1368-1371.
- [15] Liu Y, Cheng Y, Zhang H, et al. Integrated cascade nanozyme catalyzes *in vivo* ROS scavenging for anti-inflammatory therapy [J]. *Sci Adv*, 2020, 6: eabb2695.
- [16] Liu T, Liu Z. 2D MoS<sub>2</sub> nanostructures for biomedical applications [J]. *Adv Healthc Mater*, 2018, 7: e1701158.
- [17] Li X, Shan J, Zhang W, et al. Recent advances in synthesis and biomedical applications of two-dimensional transition metal dichalcogenide nanosheets [J]. *Small*, 2017, 13: 1602660.
- [18] Chen T, Zou H, Wu X, et al. Nanozymatic antioxidant system based on MoS<sub>2</sub> nanosheets [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2018, 10: 12453-12462.
- [19] Zhang X, Zhang S, Yang Z, et al. Self-cascade MoS<sub>2</sub> nanozymes for efficient intracellular antioxidation and hepatic fibrosis therapy [J]. *Nanoscale*, 2021, 13: 12613-12622.
- [20] Ke S, Lai Y, Zhou T, et al. Molybdenum disulfide nanoparticles resist oxidative stress-mediated impairment of autophagic flux and mitigate endothelial cell senescence and angiogenic dysfunctions [J]. *ACS Biomater Sci Eng*, 2018, 4: 663-674.
- [21] Han Q, Cai S, Yang L, et al. Molybdenum disulfide

- nanoparticles as multifunctional inhibitors against Alzheimer's disease [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2017, 9: 21116-21123.
- [22] Ke S, Lai Y, Li L, et al. Molybdenum disulfide quantum dots attenuates endothelial-to-mesenchymal transition by activating TFEB-mediated lysosomal biogenesis [J]. *ACS Biomater Sci Eng*, 2019, 5: 1057-1070.
- [23] Ke S, Yang P, Wang Y, et al. Flower-like molybdenum disulfide nanostructures for promoting mitochondrial homeostasis and attenuating inflammatory endothelial dysfunction [J]. *ACS Applied Nano Materials*, 2021, 4: 11709-11722.
- [24] Hou X, Yang S, Yin J. Blocking the REDD1/TXNIP axis ameliorates LPS-induced vascular endothelial cell injury through repressing oxidative stress and apoptosis [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2019, 316: C104-C110.
- [25] Losón OC, Song Z, Chen H, et al. Fis1, Mff, MiD49, and MiD51 mediate Drp1 recruitment in mitochondrial fission [J]. *Mol Biol Cell*, 2013, 24: 659-667.
- [26] Eiyama A, Okamoto K. PINK1/Parkin-mediated mitophagy in mammalian cells [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2015, 33: 95-101.
- [27] Wu W, Xu H, Wang Z, et al. PINK1-Parkin-mediated mitophagy protects mitochondrial integrity and prevents metabolic stress-induced endothelial injury [J]. *PLoS One*, 2015, 10: e0132499.