

doi:10.3969/j.issn.0253-9608.2019.06.001

纳米酶和铁蛋白新特性的发现和应用

马龙, 范克龙[†]

中国科学院生物物理研究所, 中国科学院纳米酶工程实验室, 北京, 100101

摘要 无机纳米材料通常被认为是生物惰性物质, 但最新研究表明无机纳米材料本身具有与天然酶相似的催化活性。我们将这类具有类酶活性的纳米材料称为“纳米酶”。纳米酶的发现打破了人们对酶的传统认知, 使纳米酶成为酶学领域研究的新热点。铁蛋白作为一种结构均一的天然球型纳米结构, 不仅能够通过改造形成新型纳米酶, 而且更重要的是天然铁蛋白本身能够特异性靶向肿瘤细胞, 是一种十分理想的纳米药物载体。文章简单介绍纳米酶和铁蛋白的相关概念, 并根据我们实验室的工作介绍两种纳米材料在环境治理、免疫检测以及肿瘤诊断治疗等多方面的研究, 最后对纳米酶在生物医学中的未来研究方向进行简单展望。

关键词 纳米酶; 铁蛋白; 类酶活性; 肿瘤靶向; 功能化修饰; 疾病检测和治疗

前言

纳米科学是指在1~100 nm的尺度下研究物质的组成、特性及其应用的学科。随着科学技术的发展, 纳米科学已然成为21世纪的前沿学科。“纳米”概念的提出来源于著名物理学家理查德·费曼, 其在1959年位于加州理工大学的一场名为“*There's plenty of room at the bottom*”的演讲中, 首次提出了纳米的概念^[1], 并预言了纳米医学的未来可行性。随后, 日本科学家Norio Taniguchi在描述半导体加工时, 首次使用了“纳米技术”的概念, 并定义纳米技术为“在单原子或单分子水平对材料进行加工和处理的技术”^[2]。纳米科学的发展离不开科学技术的进步, 1981年发明的扫描隧道显微镜, 能够通过探针检测物质表面的隧穿电流, 从而直接观测到单原子水平的变化, 极大地推动了纳米科学的发展。

纳米生物学是结合了纳米技术和生物学的新兴学科, 其主要包含两方面的内容: ①利用纳

米技术解决生物学问题; ②创造和利用生物启发性的纳米技术。纳米生物学旨在通过纳米技术更好地观察生物学现象、解决生物学问题以及通过生物模拟更好地理解生物发生发展的过程^[3]。同时, 相对于宏观尺度下的块状物质, 纳米尺度下的物质具有十分独特的性质。①表面效应: 当物质达到纳米级别时, 其表面积迅速增长, 使其具有很高的表面能。②小尺寸效应: 纳米尺度下的物质能够显著改变其原子配位、电子分布等, 从而直接改变其物理化学特性。③宏观量子隧道效应: 纳米尺寸能够改变物质的能级分布, 当外加热能、电能等比纳米材料平均能级间距要小时, 会使其呈现与宏观物质截然相反的表型, 比如纳米级别的导电金属不再具有电传导的性质。因此, 针对纳米生物学的研究能够从全新的角度探索物质和生命的特性。

作者实验室长期从事纳米生物学相关研究, 从无机纳米材料自身酶活性的发现到生物体内纳米尺度的铁蛋白的纯化与改良, 不仅首次提

[†]通信作者, 研究方向: 铁蛋白及纳米酶的新功能及生物医学应用研究。E-mail: fankelong@ibp.ac.cn

出了“纳米酶”的全新概念，还结合铁蛋白将它们用于疾病诊断、环境检测、免疫分析等多方面研究。本文将从纳米酶和铁蛋白的概念和应用综合介绍笔者在相关领域的工作，并做简单总结和展望。

1 新型功能性纳米材料——纳米酶

生物体的生长发育、新陈代谢是在种类十分多样的天然酶的催化以及其相互间的紧密协助下完成^[4]。自1877年，Wilhelm首次将细胞内具有催化活性的有机物命名为“酶”以来，目前已有4 000余种酶被发现。大多数酶的本质是蛋白质，少数酶例如RNA聚合酶本质是核酸。天然酶由于具有精细和可调控的三级结构，具有底物专一性强、催化活性高、反应条件温和等特点，是生物体内十分重要的催化剂。然而，天然酶对环境的稳定性较差，在极端pH和温度下容易变性，且通常难以制备和保存，很大程度上限制了其在体内外的研究和应用。为此，科学家一直在探索可以代替天然酶的模拟酶，例如肽酶、抗体酶、分子印迹酶等^[5-7]。这些模拟酶虽然克服了天然酶稳定性差的缺点，但仍然存在催化位点单一、催化活性较低等问题。

“纳米酶”的出现为模拟酶的发展提供了一个新的思路。2007年，Gao等人发现无机 Fe_3O_4 纳米材料具有类似于辣根过氧化物酶(HRP)的催化活性(图1)，首开纳米酶研究的先河^[8]。随后，纳米酶的相关研究接踵而至。截止目前，全球已有逾500种不同的纳米酶被合成和报道出来。目前已有的纳米酶主要具有氧化还原类的酶活性，例如过氧化物酶、过氧化氢酶、超氧歧化酶等，也有研究发现某些纳米酶具有碳酸酐酶^[9]、葡萄糖醛酸酶^[10]等非氧化还原类的酶活性。长久以来，无机纳米材料被认为是不具有生物活性的惰性物质。例如， Fe_3O_4 最初仅作为一种磁性材料使用，被应用于物质的分离纯化、抗体标记等。然而，纳米酶的发现，首次证实了纳米材料自身的“类生物”催化活性。之所以说纳米酶具有类酶特征，不仅是因为其与天然酶催化同一类化学反应，而且是因为其具有与天然酶相似的催化效

率和动力学特征。也就是说，纳米酶在催化过程中有着与天然酶相似的行为模式。纳米酶融合了天然酶和传统人工模拟酶的优点，既具有高效和可调节的催化活性，又具有稳定的结构。多数纳米酶在极端pH和高温下能够稳定存在，并且制备方法简单多样(水热法、化学沉淀法、超声沉淀法、溶胶-凝胶法、生物合成法等)，再生能力强。同时，作为无机纳米材料，纳米酶本身还具有一些特殊的理化性质，例如 Fe_3O_4 的超顺磁性，碳纳米点的光致发光^[11]等。这些优点使得纳米酶在生产和应用中优势明显，一跃成为当下最具研究价值和应用潜力的“新材料”之一。

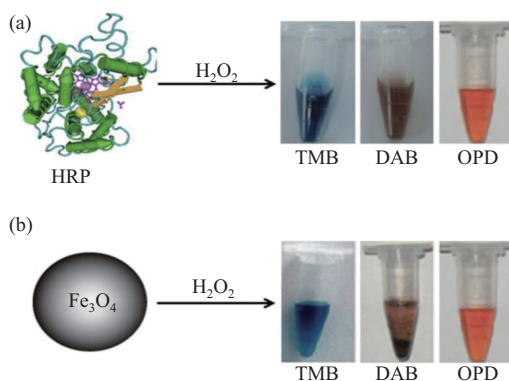


图1 (a)辣根过氧化物酶催化三种显色底物(TMB、DAB、OPD)氧化并发生颜色反应；(b)无机纳米材料 Fe_3O_4 催化三种底物发生相同的颜色反应^[8]

2 纳米酶的发展和應用

2.1 纳米酶用于污水处理及环境监测

Fe_3O_4 纳米酶具有过氧化物酶活性，能够在过氧化氢存在的条件下氧化分解多种环境中的污染物，如酚类污染物、芳香胺类污染物等，可用于这些有害物质的检测和清除。传统的酚类物质的降解方式是采用物理吸附或者化学氧化^[12-13]，即通过 $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ 所介导的Fenton反应来氧化清除，但该反应容易引起 Fe^{3+} 泄露，造成二次污染，且其反应速率较低。天然辣根过氧化物酶虽然具有高催化活性，但由于其蛋白不稳定的属性，在污水、土壤等非生理环境中容易失活，也阻碍了其在实际中的应用。而 Fe_3O_4 纳米酶不仅

具有与天然酶类似的催化效率，同时具有高稳定性和超顺磁性，不仅能够在 3 h 内清除 85% 的苯酚，而且在 20~85 °C 的温度范围内保持活性

(图2)。更重要是，我们能够利用Fe₃O₄的磁性回收污水中的纳米酶，从而避免了铁离子对介导的Fenton反应所产生的二次污染^[14]。

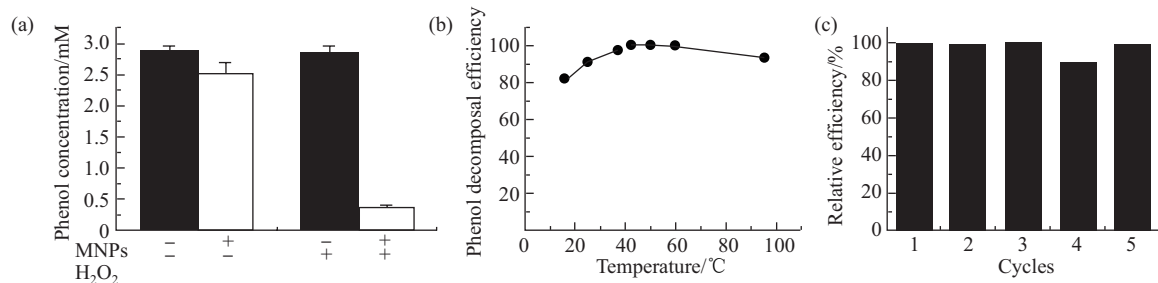


图2 利用Fe₃O₄纳米酶的过氧化物酶活性清除苯酚^[14]: (a)过氧化氢存在的条件下，Fe₃O₄纳米酶可显著清除苯酚；(b)Fe₃O₄纳米酶在20~85 °C均有催化活性；(c)多次回收的纳米酶仍保持高酶活性

同样利用Fe₃O₄纳米材料的过氧化物酶活性，我们实验室选用了显色底物四甲基联苯胺(TMB)作为反应物，通过检测反应产生的氧化TMB在特定波长下的吸收值变化来检测酸雨中的过氧化氢的含量。该体系能够在0~70 μM的浓度范围内检测酸雨中的过氧化氢^[15]。此外，Liang等通过结合乙酰胆碱酯酶/胆碱氧化酶和Fe₃O₄纳米酶，实现了快速灵敏检测环境中的有机磷神经毒素(图3)。有机磷神经毒素常被用作杀虫剂的主要成分，然而其过度使用会对环境和

人体健康造成威胁。有机磷神经毒素能造成神经突触传导中的乙酰胆碱酯酶失活，乙酰胆碱积累，最终引起机体功能失调甚至是死亡。我们通过上述Fe₃O₄纳米酶的颜色反应来指示乙酰胆碱级联反应产生的过氧化氢，而有机磷毒素能够使乙酰胆碱酯酶失活进而抑制该反应过氧化氢的产生。因此，通过过氧化氢产量的变化就能快速检测出有机磷毒素的含量。该反应体系可以分别检测到低至1 nM沙林，10 nM甲基对氧磷和5 μM乙酰甲胺磷^[16]。

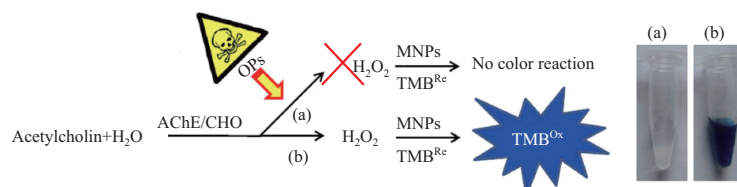


图3 通过纳米酶检测乙酰胆碱酯酶/胆碱氧化酶反应产生的过氧化氢的含量变化指示环境中的有机磷神经毒素^[16]

2.2 纳米酶用于免疫检测

免疫检测是通过抗原抗体反应检测样品中特定成分含量的技术。典型的免疫检测技术例如酶联免疫吸附测定(ELISA)，是在抗体识别固相载体上的抗原后，再通过酶标二抗结合抗原抗体复合物，最后添加显色底物指示抗原抗体复合物的含量。目前，主要采用的酶标二抗所用的酶主要是辣根过氧化物酶和碱性磷酸酶。我们实验室基于纳米酶的物理特性和催化活性，开发了多种免疫检测的方法。2010年，通过结合Fe₃O₄的磁

性和金纳米颗粒的催化活性，我们建立了高灵敏的蓖麻毒素检测体系，即分别在Fe₃O₄纳米颗粒和Au纳米颗粒上标记识别蓖麻毒素A链和B链的6A6和7G7抗体，在检测体系中形成Fe₃O₄-蓖麻毒素-Au的夹心结构，从而能够利用Fe₃O₄的磁性分离夹心复合物，并利用Au颗粒催化银离子还原形成放大的电信号，达到检测的目的^[17]。相对于传统的ELISA而言，该方法的检测限度提高了5倍而检测时间缩短了3倍，能够很好地用于食品和水中的蓖麻毒素的检测(图4)。

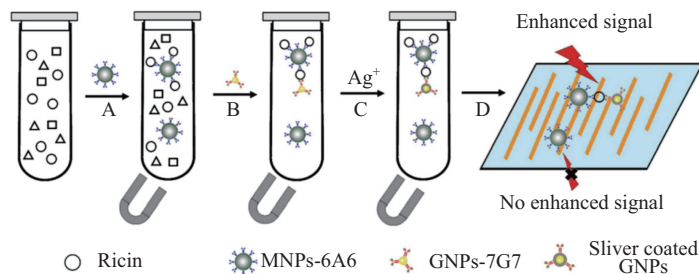


图4 利用Fe₃O₄纳米颗粒的磁性和Au纳米颗粒的催化活性检测溶液中的蓖麻毒素含量^[17]

此外，我们还设计了能够替代胶体金试纸条的纳米酶试纸条^[18]。2014年，埃博拉病毒在非洲大面积暴发，使得数以万计的人感染并死于该病毒，并且当时没有有效的治疗措施。为了尽早检测出埃博拉病毒携带者，控制病情扩散，我们通过在纳米酶上连接埃博拉病毒糖蛋白的特异性抗体，并利用纳米酶自身的过氧化物酶活性催化显色底物氧化，指示埃博拉病毒含量。这种纳米酶试纸条能够在30 min内通过肉眼识别的条带检测到浓度低至1 ng/mL的埃博拉病毒(图5)，识别效率达到了传统胶体金试纸条的100倍。

通过更换抗体，可将纳米酶试纸条用于不同的检测领域。我们已经成功开发了针对高致病性禽流感、新布尼亚病毒、艾滋病病毒等传染病病原体检测，以及肿瘤分子标志物检测等应用的纳米酶试纸条。目前纳米酶试纸条已经成功获得医疗器械证书，并进入产业化阶段，相关产品将在未来几年内进入市场。

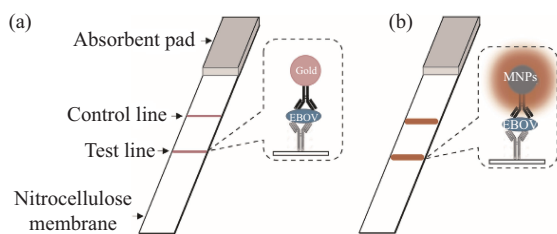


图5 利用纳米酶的过氧化物酶活性设计检测埃博拉病毒的试纸条^[18]: (a)胶体金试纸条; (b)纳米酶试纸条

2.3 纳米酶用于肿瘤的诊断和治疗

癌症是中国乃至世界上治愈率最低、致死率最高的疾病之一。据统计，仅2015年一年中国就出现4 292 000例新生肿瘤病例以及2 814 000例肿瘤致死病例^[19]。由于肿瘤转移的高发性和肿

瘤微环境的复杂性，晚期肿瘤在进行切除或者化疗后仍然难以控制或容易复发，这使得针对肿瘤早期诊断和晚期治疗的研究十分迫切。纳米酶作为一种新型材料，在肿瘤检测和治疗中也能够发挥重要的作用。在肿瘤的检测方面，2012年，笔者在人重链铁蛋白(HFn)内核中通过亚铁离子的负载和氧化，构建了内核为Fe₃O₄纳米酶的磁铁纳米颗粒M-HFn(图6)。该包载有纳米酶的铁蛋白不仅具有十分均一稳定的结构，而且相对于天然以水铁矿(5Fe₂O₃·9H₂O)为内核的铁蛋白和无核铁蛋白，具有显著的过氧化物酶活性。

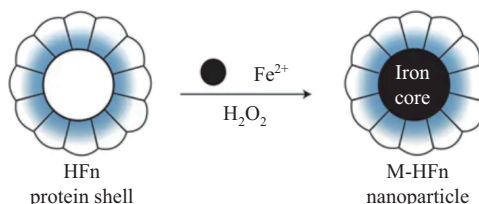


图6 人重链铁蛋白外壳内装载铁核^[20]

同时，由于肿瘤细胞高表达铁蛋白的特异性受体——转铁蛋白受体1(TfR1)，使得M-HFn能在不加任何修饰的情况下靶向肿瘤细胞，并通过其过氧化物酶活性显色检测肿瘤组织。我们通过M-HFn处理了247例临床肿瘤样本和227例正常组织样本，发现M-HFn能够以98%的灵敏度和95%的特异性识别肿瘤组织(图7)。更重要的是，该纳米颗粒不仅容易制备(利用大肠杆菌重组表达即可)，且检测步骤简单，检测时间短。相比于需要4 h才能得到结果且步骤繁琐的免疫组化显色方法，M-HFn能够通过一步显色法在1 h内快速检测肿瘤组织^[20]。

除了肿瘤检测外，纳米酶还可以用于肿瘤的靶向治疗。2018年，我们合成了具有四种酶活

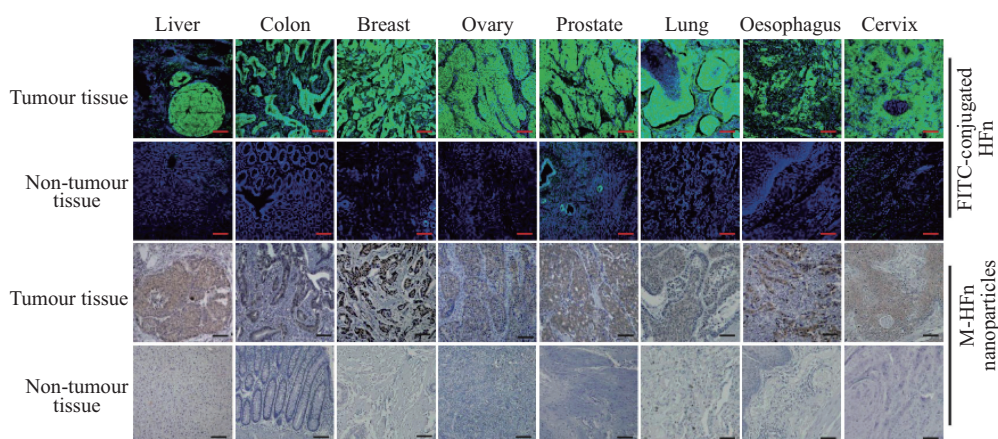


图7 荧光素FITC标记HFn和M-HFn都能够特异性靶向指示肿瘤组织^[20]

性的氮掺杂多孔碳纳米球(N-PCNSs)。这种纳米酶在酸性条件下具有产生活性氧自由基ROS(O_2^- 和 $OH\cdot$)的氧化酶和过氧化物酶活性,而在中性条件下则具有消除ROS的过氧化氢酶和超氧歧化酶作用。纳米酶产生的ROS对细胞具有显著的杀伤作用,我们的实验表明N-PCNSs能够被肝癌细胞吸收,并定位到溶酶体中,利用溶酶体内的酸

性环境,该纳米酶能够发挥过氧化物酶和氧化酶活性,产生ROS,造成肝癌细胞凋亡(图8)。同时,为了使N-PCNSs能够在体内靶向肿瘤细胞,我们在N-PCNSs上连接能够靶向肿瘤的重链铁蛋白,重组后的分子靶向肿瘤细胞溶酶体的能力提高了23倍,且在杀伤肿瘤细胞的同时基本不影响正常细胞的活力^[21]。

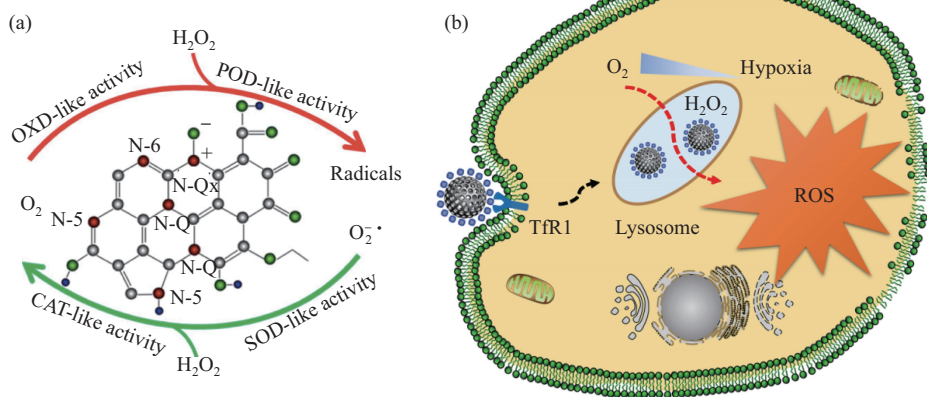


图8 纳米酶催化治疗肿瘤^[21]。(a)具有多酶活性的氮掺杂的多孔碳纳米酶;(b)多孔纳米酶靶向肿瘤细胞,最终定位于溶酶体并产生ROS杀伤肿瘤细胞

2.4 纳米酶活性调节

纳米酶的催化活性可受多种因素的调节。首先是尺寸效应。大多数的纳米酶,随着尺寸的降低,催化活性提高,这可能是因为尺寸降低显著提高了纳米颗粒的比表面积。但不同的纳米酶对尺寸的依赖效果不尽相同。例如, Komkova等合成的普鲁士蓝纳米酶的过氧化物酶活性则随着

尺寸增加而增加^[22]。其次,不同的元素掺杂对纳米酶的活性也十分重要。例如前文提到的氮掺杂的多孔碳纳米球,其四种酶活性在没有氮掺杂时基本不呈现。同时,多种金属元素掺杂也能够影响纳米酶的催化活性,常见掺杂金属包括铁、铜、锰、钴等。除了元素组成外,纳米酶的形状也能够影响纳米酶的活性。Fu等合成了不

同形状的 Fe_3O_4 纳米颗粒，发现在过氧化物酶活性方面：纳米簇>纳米花>纳米钻^[23]。此外，不同的表面修饰也能够调节纳米酶的活性。为了提高 Fe_3O_4 纳米酶的催化活性，我们实验室于2016年合成了单个组氨酸修饰的磁铁颗粒纳米酶，其能够模拟天然过氧化物酶血红素辅酶中远端组氨酸的作用，通过氢键提高酶活中心对过氧化氢的亲和力^[24](图9)。修饰后的 Fe_3O_4 对过氧化氢的亲和力提高了10倍，催化效率也因此提高了20倍，这种模拟天然酶活性中心的方法也为纳米酶活性调节提供了全新的思路。除了组成和结构，合成条件的改变也能够影响纳米酶活性中心的形成。2018年，我们实验室首次报道了单锌原子分散的锌咪唑酯框架结构(即单原子纳米酶)具有很高的过氧化物酶活性。通过800 °C热解锌咪唑酯可以引起其石墨烯化，形成多个单原子活性位点。该合成过程受到严格的温度控制，我们分别采用了600 °C、700 °C、800 °C、900 °C、1 000 °C的热解温度合成该单原子纳米酶，发现在600 °C、700 °C下合成的材料基本没有酶活性，而900 °C、1 000 °C也表现出较低的酶活性^[25]，说明了合成条件对纳米酶活性的重要性。

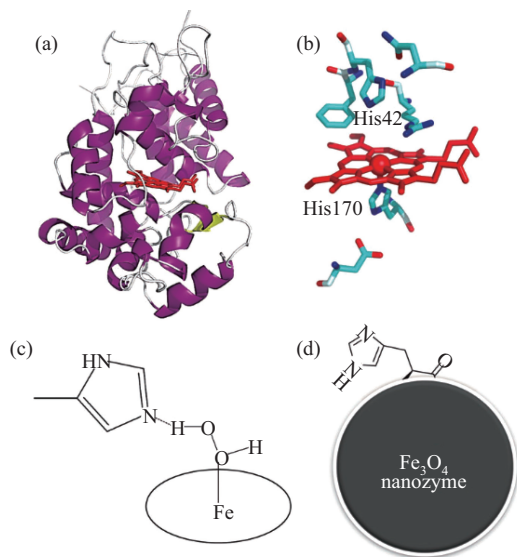


图9 单个组氨酸修饰的 Fe_3O_4 纳米酶模拟天然过氧化物酶活性中心^[24]：(a)天然过氧化物酶结构；(b)过氧化物酶亚铁血红素活性中心；(c)远端组氨酸通过氢键结合过氧化氢；(d)单组氨酸修饰纳米酶

纳米酶作为一种人工合成的新材料，不仅克服了天然酶稳定性差的缺点，而且为纳米材料的生物学应用提供了全新的方向。目前，全世界已有30个国家300多个实验室从事纳米酶的相关研究，涉及纳米酶种类多样，应用范围十分广泛。纳米酶已然成为纳米生物学的重要组成部分。纳米生物学除了利用人工纳米材料解决生物学问题，也包含创造和利用生物源性的天然纳米材料。天然纳米材料不仅生物安全性良好，同时具有生物功能多样、结构特异等特点。铁蛋白作为典型的天然纳米结构，是一种具有内腔结构的球型蛋白，且具有稳定性高、结构均一等优点，是十分理想的天然纳米载体。

2 天然的纳米材料——铁蛋白

相对于体外合成的纳米材料而言，生物源性的纳米材料是在生命活动的过程中，由生物体在体内合成具有独特理化特性的无机-有机纳米复合物。铁蛋白作为生物体内负责铁代谢的蛋白，是一类典型的生物源性纳米材料。自1937年马脾脏中铁蛋白被首次报道以来^[26]，在多种生物体内，包括人类、其他哺乳动物、植物、微生物中均发现了铁蛋白的存在。这些不同来源的铁蛋白具有十分相似的结构。人铁蛋白是由24个蛋白亚基构成的中空球状结构，其外径12nm，内径8nm，并内含8个亲水和6个疏水性的离子通道(图10)，蛋白亚基由重链(H链)和轻链(L链)组成，并且H链和L链在不同组织的铁蛋白中含量也不同。除了均一的蛋白外壳外，天然铁蛋白的内核中主要为水铁矿($5\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$)。该水铁矿是由 Fe^{2+} 通过亲水离子通道进入到铁蛋白内腔，并被具有氧化酶活性位点的H链氧化形成，一个铁蛋白最多能装载4 500个 Fe^{3+} 。胞内铁蛋白主要存在于细胞质、线粒体和细胞核中，而胞外的铁蛋白则主要分布于血清、脑脊液和关节滑液中。铁蛋白的组成、结构使得其成为十分理想的纳米材料。因为具有尺寸均一、生物毒性小，容易改造修饰和易于生产等特点，铁蛋白被广泛应用于疾病检测、核磁共振、肿瘤检测和治疗等多种领域中。

我们实验室发现人重链铁蛋白具有天然的

肿瘤靶向性，开创了铁蛋白在生物医学领域应用的新方向。后文将从肿瘤检测与治疗、疾病检测、蛋白展示等方面介绍实验室的相关工作。

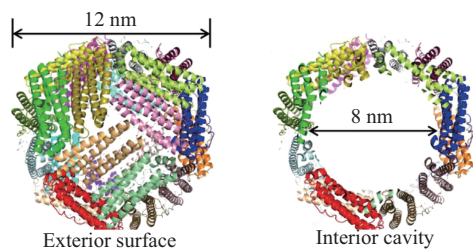


图10 人铁蛋白结构示意图^[27]

3 铁蛋白的改良与应用

3.1 铁蛋白与疾病的诊断和治疗

前文提到的铁蛋白纳米粒，就是笔者基于铁蛋白靶向肿瘤细胞的能力，设计合成的重组铁蛋白纳米酶。人的重组重链铁蛋白能够在不加任何修饰的情况下，靶向高表达“转铁蛋白受体1(TfR1)”的肿瘤细胞。TfR1特异性识别铁蛋白后会促进其内化进入到溶酶体中，因此H铁蛋白能够作为很好的肿瘤标记分子或靶向治疗载体。在利用磁铁纳米颗粒灵敏精准地检测肿瘤组织后，我们实验室于2014年将铁蛋白作为纳米载体装载高剂量的癌症治疗药物阿霉素用于肿瘤的靶向治疗。通过尿素处理H铁蛋白使其变性装载阿霉素后再复性的方法，我们成功将阿霉素包载进入了铁蛋白内部。每个H铁蛋白内腔可以负载33个阿霉素分子。同样，这些负载阿霉素的H铁蛋白能够特异性地进入到肿瘤细胞溶酶体中。并利用其内的微酸性环境(pH5.0)释放其内部包载的阿霉素，从而达到肿瘤靶向杀伤的效果^[28]。小鼠模型也证明了该纳米载体能够显著延长荷瘤小鼠生存期，并且未在肿瘤区域富集的铁蛋白最后能够通过肾脏和肝脏排出，进一步保证了该载体的安全性。

不仅如此，我们还发现铁蛋白纳米药物载体能够通过TfR1受体穿越血脑屏障，靶向颅内的神经胶质瘤。传统的纳米载体难以穿越血脑屏障，并且即使透过血脑屏障也难以靶向识别脑部的肿瘤细胞。此外，体外合成的纳米材料还

存在潜在的安全性问题。生物来源的铁蛋白，不仅能够通过转胞吞作用跨过血脑屏障，而且可以特异性地在胶质瘤细胞中聚集，是十分理想的胶质瘤纳米载体。这种独特功能的实现主要依赖于铁蛋白结合受体时的阈值效应。尽管脑内皮细胞和胶质瘤细胞同时表达TfR1，但由于表达水平不同使得H铁蛋白在两种细胞内的定位存在差异。由于脑内皮细胞上的TfR1表达水平不是太高，所以H铁蛋白在进入内皮细胞后不会进入溶酶体，而是会存在于中性环境的胞浆中，并在随后被内皮细胞吐出，因此H铁蛋白能够穿越由内皮细胞组成的血脑屏障。在胶质瘤细胞中，TfR1表达水平远远大于正常阈值，H铁蛋白则会定位到溶酶体中释放阿霉素诱导胶质瘤细胞凋亡^[29](图11)。也是基于H铁蛋白此阈值效应，即H铁蛋白定位于脑内皮细胞胞浆的特点，我们发现包载铁核的人铁蛋白在该环境下具有显著的过氧化氢酶活性，可以分解由疟原虫感染所产生的活性氧自由基，保护血脑屏障内皮细胞免受损伤，能够显著提高脑疟感染的生存率^[30]。

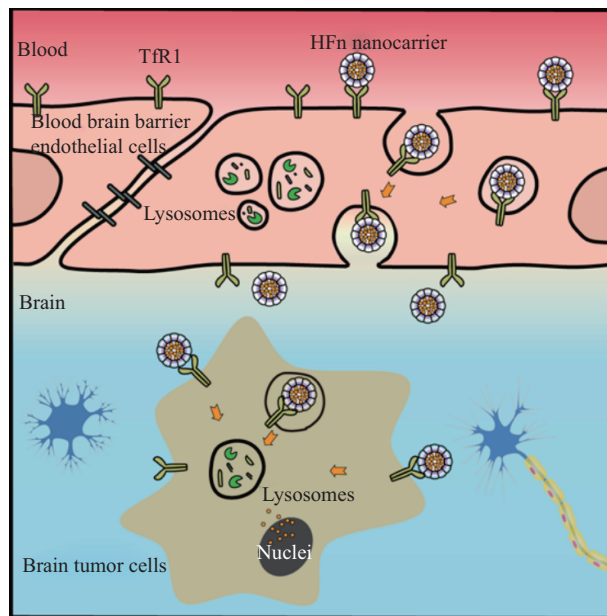


图11 铁蛋白纳米载体透过血脑屏障并特异性靶向脑胶质瘤^[29]

除了使用人源重组的H铁蛋白，我们还选用了激烈火球菌的铁蛋白作为载体，通过基因工

程的方法在其蛋白多肽的N末端连接肝癌细胞特异性结合多肽SP94, 该重组蛋白不仅能够保持均一的球状构象, 而且能够特异性地识别肝癌组织。之后, 我们在其内核氧化 Co^{2+} 形成 Co_3O_4 内核。该纳米粒表现出强氧化物酶活性。这种铁蛋白纳米粒能够特异性地检测肝癌细胞和组织, 且催化活性较以往以 Fe_3O_4 为内核纳米粒高了20倍^[31]。在进一步实验中, 我们发现该肝癌特异性识别多肽SP94, 主要是结合肝癌细胞中的葡萄糖调节受体GRP78。为了实现肝癌治疗的目的, 我们在SP94改造的激烈火球菌的铁蛋白中负载阿霉素。令人惊奇的是, 与人重链铁蛋白相比, 激烈火球菌铁蛋白能够装载多达404个阿霉素分子^[32]。包载量的增加使得铁蛋白能够递送更多的药物到达肿瘤部位, 因此其可以显著杀伤肝癌细胞, 甚至抑制肺转移肝癌细胞的生长, 具有稳定的肝癌治疗效果。由此可见, 无论是非修饰的人重链蛋白还是修饰的激烈火球菌铁蛋白, 都可以作为很好的肿瘤药物载体。相对于传统的抗体-药物偶连载体, 铁蛋白药物载体不仅十分稳定, 且其特殊的内核结构和易于修饰的特点, 使其能够应用于多种方式的药物传导和肿瘤靶向治疗^[33] (图12)。

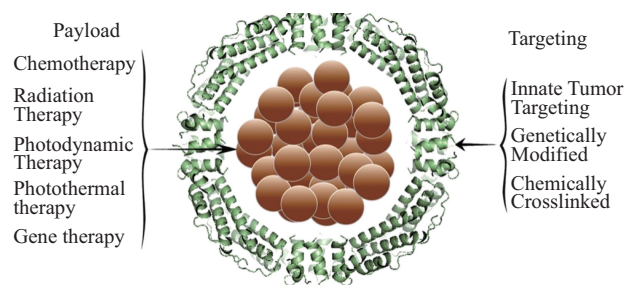


图12 不同来源的铁蛋白药物载体可通过多种方式靶向肿瘤细胞, 并可携带不同类型的治疗药物^[33]

3.2 铁蛋白与体内成像

由于铁蛋白能够特异性靶向大部分肿瘤细胞, 并且易于人工改造和修饰, 因此也可用于医学成像。医学成像是针对机体的某些部分, 采取非侵入的方式获得内部组织影像的技术, 常见的医学影像技术包括核磁共振(NMRI)、电脑断

层扫描、正电子发射断层扫描(PET)等。我们实验室于2016年对铁蛋白进行改造, 在其内部诱导铁核形成的同时在外连接放射性核素 ^{125}I , 该纳米探针可以借助肿瘤细胞上TfR1的内循环不断进入到肿瘤细胞中, 在细胞内聚集高浓度放射性纳米探针的同时也避免了非放射性探针的干扰。铁蛋白纳米探针仅需一次注射就获得高时空分辨率的影像, 实现了单一剂量纳米探针同时用于磁共振(MRI)和正电子发射断层扫描(PET)的愿望^[34], 克服了以往MRI和PET成像由于两者对探针的灵敏度相差巨大而需要多次注射的问题(图13)。

采用同样的方法, 2018年, 我们实验室在铁蛋白外壳上连接放射性核素锝($^{99\text{m}}\text{Tc}$), 修饰后的纳米探针 $^{99\text{m}}\text{Tc-HFn}$ 能够用于动脉粥样硬化症中的易损斑块的成像。研究表明H铁蛋白受体TfR1不仅在肿瘤细胞高表达, 在动脉粥样硬化症斑块内渗透的巨噬细胞中也显著高表达。因此, 通过高脂处理脂蛋白突变的小鼠诱导动脉粥样硬化发生后, 我们发现通过尾静脉打入小鼠体内的 $^{99\text{m}}\text{Tc-HFn}$ 可被主动脉内的动脉粥样硬化斑块吸收并显示很高的放射信号(图14)。H铁蛋白放射信号的强度和斑块中的巨噬细胞浸润密切相关^[35], 可以被用于定量分析动脉粥样硬化症和炎症反应的实时发展进程, 为治疗提供参考。

除了X射线、放射性核素以及磁共振成像外, 光学成像也是临床诊断的重要手段。我们实验室还在铁蛋白外壳上直接连接荧光或近红外染料将其开发为荧光探针以用于早期胃癌诊断。因为铁蛋白荧光探针可以被胃癌细胞特异性吸收, 所以通过内窥镜就可以直接观察胃部癌症细胞的分布, 并根据分布情况对胃癌进行分级^[36]。

3.3 铁蛋白展示纳米抗体

前文提及的都是将铁蛋白用做纳米载体或探针, 更多的是强调其靶向性, 而其实铁蛋白作为一种高稳定性的自我组装的24聚体球状蛋白, 也是一种十分理想的蛋白展示平台。H铁蛋白可通过简单的基因工程的方法连接不同的肽段, 且维持其均一构象和稳定性, 例如

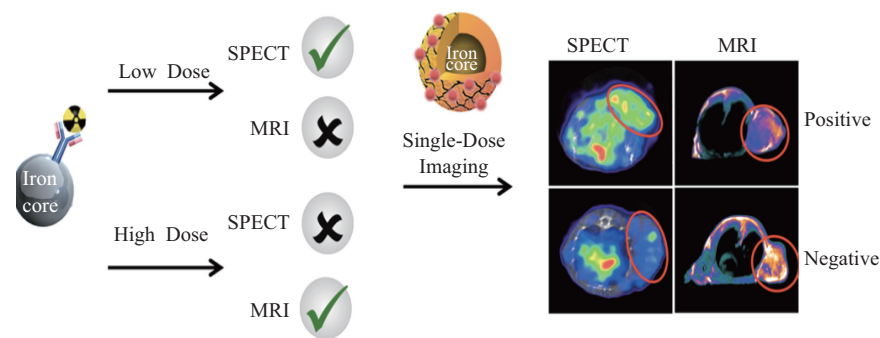


图13 铁蛋白纳米探针用于单剂量PET和MRI成像^[34]

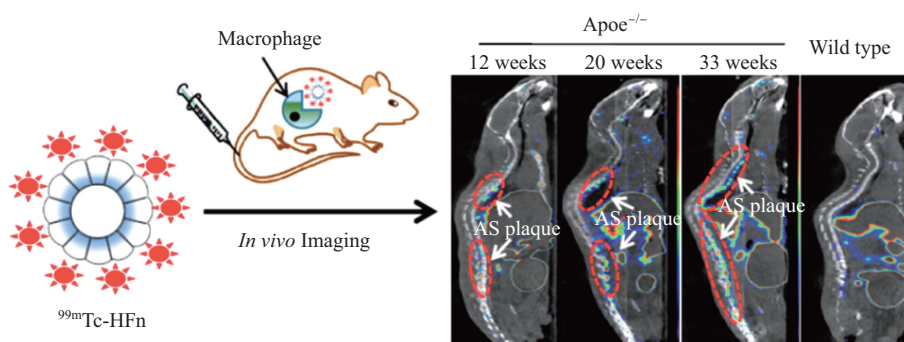


图14 ^{99m}Tc连接H铁蛋白用于动脉粥样硬化斑块成像^[35]

前文提到的在激烈火球菌H铁蛋白的N端连接SP94。笔者于2018年发表于*Analytic Chemistry*的文章将H铁蛋白作为纳米抗体的展示平台，传统的抗体由成对的重链和轻链组成，重链和轻链又分别由可变区和恒定区组成，可变区决定了抗体识别的特异性。纳米抗体则是抗体重链上的单一结构域，该分子容易克隆表达，且具有一定的抗原特异性。但由于其结构简单且分子较小，使得其在亲和力和体内半衰期上存在缺陷。笔者通过将禽流感H5N1的纳米

抗体克隆到铁蛋白24个亚基中的第5个α螺旋处，构建了外表面表达纳米抗体的融合蛋白(图15)。该纳米平台不仅实现了纳米抗体的多聚化，且使其对禽流感病毒的亲和力提高了约360倍。此外，由于多聚化展示使得整体分子量提高，铁蛋白展示的纳米抗体在小鼠体内的半衰期延长了10倍^[37]，极大程度扩展了纳米抗体的应用范围，相信铁蛋白纳米平台未来会用于更多蛋白的展示和优化。

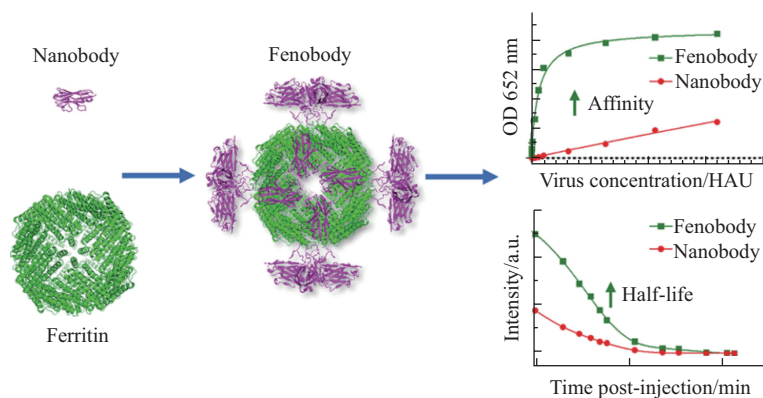


图15 铁蛋白用于展示纳米抗体^[37]

4 总结与展望

纳米技术的发展为生物学、基础医学的研究和发展提供了全新的方法和思路。本文简单介绍了体外合成的纳米酶和生物源性的铁蛋白的基本概念,以及笔者实验室将其作为纳米载体、纳米探针、蛋白展示平台等用于体内外应用的相关研究。纳米酶的高催化活性、稳定性、易于合成等特点,使其不仅可以通过显色底物进行体内外检测,也能够应用于体内多种疾病治疗等。而铁蛋白,尤其人重链铁蛋白,因为其结构均一性,特殊的内核结构以及肿瘤细胞和动脉粥样硬化斑块靶向能力,可以作为理想的纳米载体装载不同的药物用于疾病治疗,同时可以作为纳米抗体或者多肽展示平台等用于疾病的诊疗。

本文介绍的几种类型的纳米酶仅仅是纳米酶领域的一小部分,纳米酶目前包括数量庞大的人工合成和天然的纳米材料,且随着研究深入,其种类和数量日益增加。将纳米酶应用于生物医学仍具有很大的发展空间。

(1) 纳米生物传感器的探索和应用。纳米生物传感器是指能够进入到组织或者细胞中,并高效原位指示细胞内基因和蛋白表达水平的变化,为精准治疗提供参考;而在纳米生物传感器发展中,天然酶的稳定性和高昂的成本一直转化研究的瓶颈。随着酶催化活性的提高,纳米酶替代天然酶用于纳米生物传感将会带来新的思路和方向。

(2) 基于纳米酶的多功能仿生细胞器和人工细胞的构建。人工细胞器和细胞的构建不仅可以推动纳米材料的体内外应用,对人们理解生命起源的过程也具有十分重要的意义;而纳米酶作为仿生细胞器和人工细胞的基础反应单元,将会在这个领域中起到重要作用。

(3) 纳米机器人的开发和利用。纳米机器人是指能够在生物体内循环的纳米材料,并能够根据机体的变化精细调控,自主靶向杀伤肿瘤或其他疾病分子,是纳米生物医学发展的重要方向;而纳米酶可以作为纳米机器人的“发动机”和“导航仪”。利用酶催化反应,为纳米机器人提供动力和控制方向。

致谢 感谢中国科学院生物物理研究所阎锡蕴院士的修改建议及对本文的审定。

(2019年10月8日收稿) ■



参考文献

- [1] FEYNMAN R P. There's plenty of room at the bottom [J]. *Engineering and Science magazine*, 1960, 23(5): 22-36.
- [2] TANIGUCHI N. On the basic concept of 'nano-technology' [C]//5th International Conference on Production Engineering, Japan Society of Precision Engineering, Tokyo, Japan, 1974: 18-23.
- [3] NUSSINOV R, ALEMÁN C. Nanobiology: from physics and engineering to biology [J]. *Physical Biology*, 2006, 3(1). doi:10.1088/1478-3975/3/1/E01.
- [4] ALVES R, CHALEIL R A G, STERNBERG M J E. Evolution of enzymes in metabolism: a network perspective [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2002, 320(4): 751-770.
- [5] ATASSI M Z, MANSHOORI T. Design of peptide enzymes (pepzymes)-surface-simulation synthetic peptides that mimic the chymotrypsin and trypsin active-sites exhibit the activity and specificity of the respective enzyme [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1993, 90(17): 8282-8286.
- [6] POLLACK S J, JACOBS J W, SCHULTZ P G. Selective chemical catalysis by an antibody [J]. *Science*, 1986, 234(4783): 1570-1573.
- [7] WULFF G. Enzyme-like catalysis by molecularly imprinted polymers [J]. *Chemical Reviews*, 2002, 102(1): 1-27.
- [8] GAO L, ZHUANG J, NIE L, et al. Intrinsic peroxidase-like activity of ferromagnetic nanoparticles [J]. *Nat Nanotechnol*, 2007, 2(9): 577-583.
- [9] NATH I, CHAKRABORTY J, VERPOORT F. Metal organic frameworks mimicking natural enzymes: a structural and functional analogy [J]. *Chem Soc Rev*, 2016, 45(15): 4127-4170.
- [10] WALTHER R, WINTHER A, FRUERGAAARD A S, et al. Identification and directed development of non-organic catalysts with apparent pan-enzymatic mimicry into nanozymes for efficient prodrug conversion [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2019, 58(1): 278-282.
- [11] QU S, WANG X, LU Q, et al. A biocompatible fluorescent ink based on water-soluble luminescent carbon nanodots [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2012, 51(49): 12215-12218.
- [12] NEVSKAIA D M, CASTILLEJOS-LOPEZ E, MUÑOZ V, et al. Adsorption of aromatic compounds from water by treated carbon materials [J]. *Environmental Science & Technology*, 2004, 38(21): 5786-5796.
- [13] GARCIA-MOLINA V, LÓPEZ-ARIAS M, FLORCZYK M, et al. Wet peroxide oxidation of chlorophenols [J]. *Water Research*, 2005, 39(5): 795-802.
- [14] ZHANG J, ZHUANG J, GAO L, et al. Decomposing phenol by the hidden talent of ferromagnetic nanoparticles [J]. *Chemosphere*, 2008, 73(9): 1524-1528.
- [15] ZHUANG J, ZHANG J, GAO L, et al. A novel application of iron oxide nanoparticles for detection of hydrogen peroxide in acid rain [J]. *Materials Letters*, 2008, 62(24): 3972-3974.
- [16] LIANG M, FAN K, PAN Y, et al. Fe₃O₄ magnetic nanoparticle peroxidase mimetic-based colorimetric assay for the rapid detection of organophosphorus pesticide and nerve agent [J]. *Anal Chem*, 2013, 85(1): 308-312.
- [17] ZHUANG J, CHENG T, GAO L, et al. Silica coating magnetic nanoparticle-based silver enhancement immunoassay for rapid electrical detection of ricin toxin [J]. *Toxicon*, 2010, 55(1): 145-152.
- [18] DUAN D, FAN K, ZHANG D, et al. Nanozyme-strip for rapid local diagnosis of Ebola [J]. *Biosens Bioelectron*, 2015, 74: 134-141.
- [19] CHEN W, ZHENG R, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China,

- 2015 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115-132.
- [20] FAN K, CAO C, PAN Y, et al. Magnetoferritin nanoparticles for targeting and visualizing tumour tissues [J]. *Nat Nanotechnol*, 2012, 7(7): 459-464.
- [21] FAN K, XI J, FAN L, et al. In vivo guiding nitrogen-doped carbon nanozyme for tumor catalytic therapy [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 1440.
- [22] KOMKOVA M A, KARYAKINA E E, KARYAKIN A A. Catalytically synthesized prussian blue nanoparticles defeating natural enzyme peroxidase [J]. *J Am Chem Soc*, 2018, 140(36): 11302-11307.
- [23] FU S, WANG S, ZHANG X, et al. Structural effect of Fe_3O_4 nanoparticles on peroxidase-like activity for cancer therapy [J]. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 2017, 154: 239-245.
- [24] FAN K, WANG H, XI J, et al. Optimization of Fe_3O_4 nanozyme activity via single amino acid modification mimicking an enzyme active site [J]. *Chemical Communications*, 2017, 53(2): 424-427.
- [25] XU B, WANG H, WANG W W, et al. A single-atom nanozyme for wound disinfection applications [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2019, 58(15): 4911-4916.
- [26] LAUFBERGER V. Sur la cristallisation de la ferritine [J]. *Bull Soc Chim Biol*, 1937, 19: 1575-1582.
- [27] FAN K, YAN X. Bioengineered ferritin nanoprobe for cancer theranostics [M]// CONDE J. *Handbook of Nanomaterials for Cancer Theranostics*, 2018, 143-175.
- [28] LIANG M, FAN K, ZHOU M, et al. H-ferritin-nanocaged doxorubicin nanoparticles specifically target and kill tumors with a single-dose injection [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(41): 14900-14905.
- [29] FAN K, JIA X, ZHOU M, et al. Ferritin nanocarrier traverses the blood brain barrier and kills glioma [J]. *ACS Nano*, 2018, 12(5): 4105-4115.
- [30] ZHAO S, DUAN H, YANG Y, et al. Fenozyme protects the integrity of the blood-brain barrier against experimental cerebral malaria [J]. *Nano Lett*, 2019, 12: 8887-8895.
- [31] JIANG B, YAN L, ZHANG J, et al. Biomineralization synthesis of the cobalt nanozyme in sp94-ferritin nanocages for prognostic diagnosis of hepatocellular carcinoma [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2019, 11(10): 9747-9755.
- [32] JIANG B, ZHANG R, ZHANG J, et al. GRP78-targeted ferritin nanocaged ultra-high dose of doxorubicin for hepatocellular carcinoma therapy [J]. *Theranostics*, 2019, 9(8): 2167-2182.
- [33] HE J, FAN K, YAN X. Ferritin drug carrier (FDC) for tumor targeting therapy [J]. *J Control Release*, 2019, 311/312: 288-300.
- [34] ZHAO Y, LIANG M, LI X, et al. Bioengineered magnetoferritin nanoprobe for single-dose nuclear-magnetic resonance tumor imaging [J]. *ACS Nano*, 2016, 10(4): 4184-4191.
- [35] LIANG M, TAN H, ZHOU J, et al. Bioengineered h-ferritin nanocages for quantitative imaging of vulnerable plaques in atherosclerosis [J]. *ACS Nano*, 2018, 12(9): 9300-9308.
- [36] DU Y, FAN K, ZHANG H, et al. Endoscopic molecular imaging of early gastric cancer using fluorescently labeled human H-ferritin nanoparticle [J]. *Nanomedicine*, 2018, 14(7): 2259-2270.
- [37] FAN K, JIANG B, GUAN Z, et al. Fenobody: A ferritin-displayed nanobody with high apparent affinity and half-life extension [J]. *Anal Chem*, 2018, 90(9): 5671-5677.

The finding and application of the novel properties of nanozyme and ferritin

MA Long, FAN Kelong

CAS Engineering Laboratory for Nanozyme, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101

Abstract Inorganic nanomaterials are typically considered to be biologically inert. However, recent studies have shown that some types of inorganic nanomaterials exhibit catalytic activities similar to that of natural enzymes. We named this type of nanomaterials with enzyme-like activity as nanozyme. The finding of nanozyme breaks the traditional cognition of enzyme, and nanozyme is emerging as a new field of enzymology. Moreover, as a natural spherical nanostructure with uniform size, ferritin can be easily engineered to novel types of nanozymes. Importantly, natural ferritin can specifically target to many types of tumor cells without any modifications, which makes it as a promising nanocarrier for tumor therapy. In this review, we will briefly introduce the concepts of nanozymes and ferritin, and summarize our recent studies on nanozyme and ferritin in the fields of environmental management, immunoassay and tumor diagnosis and therapy. In addition, we will give prospects of nanozyme in biomedicine in the near future.

Key words nanozyme, ferritin, enzyme-like activity, tumor targeting, functional modification, disease diagnosis and treatment

(编辑: 段艳芳)