

特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2022-009

合成生物纳米酶

刘奇奇, 王春玉, 齐天翊, 朱明盛, 黄兴禄

(南开大学生命科学学院, 药物化学生物学国家重点实验室, 生物活性材料教育部重点实验室, 纳米酶联合实验室, 天津 300071)

摘要: 纳米酶是一类本身蕴含酶学特性的纳米材料, 能够在生理条件下催化天然酶的底物及其介导的生化反应, 表现出类似的反应动力学和催化机理。自2007年首次发现四氧化三铁纳米颗粒自身具有类过氧化物酶活性以来, 成百上千种不同的纳米酶材料相继被开发出来, 在生物医学、检测传感、环境工程等领域有着广泛的应用。近年来, 以基因编辑或重组为基础的纳米酶材料开始出现。相比较其他纳米酶, 这种纳米酶是基于合成生物学相关技术开发而来, 在这里将其命名为合成生物纳米酶, 其特点是以人为改造或从头设计的蛋白作为骨架, 原位生长一些金属纳米颗粒, 将蛋白骨架的功能和材料的催化融于一体。本文主要介绍了纳米酶的基本概况, 例证了其在生物医学应用上的优势; 概述了多种天然蛋白作为骨架制备纳米酶的原理, 列举了其中的部分应用; 简述了基因改造蛋白骨架方面的研究进展, 并重点强调这种蛋白骨架在合成无机纳米颗粒方面的优势; 在以上这些进展的基础上, 提出了合成生物纳米酶的概念, 并阐释了其中的内涵, 最后也以基因重组铁蛋白纳米酶为例介绍了目前的一些设计及应用。未来, 以合成生物纳米酶为代表的纳米酶, 有可能会将计算生物学、结构生物学、蛋白/基因工程及化学等手段融为一体, 在模拟酶的设计上更为理性, 在赋予功能上更为多样化, 并且有望进一步促进合成生物学与纳米生物学的深度融合。

关键词: 纳米酶; 纳米生物材料; 基因改造; 合成生物纳米酶; 铁蛋白纳米酶

中图分类号: Q816 **文献标志码:** A

Synthetic biological nanozyme

LIU Qiqi, WANG Chunyu, QI Tianyi, ZHU Mingsheng, HUANG Xinglu

(State Key Laboratory of Medicinal Chemical Biology and Key Laboratory of Bioactive Materials for the Ministry of Education, Joint Laboratory of Nanozymes, College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract: Nanozymes are nanomaterials with intrinsic enzyme-like activities, which can convert specific substrates to products and catalyze biochemical reactions as natural enzymes, with the similar reaction dynamics and catalytic mechanisms. Since the discovery of the intrinsic peroxidase activity of Fe_3O_4 nanoparticles, thousands of nanozymes

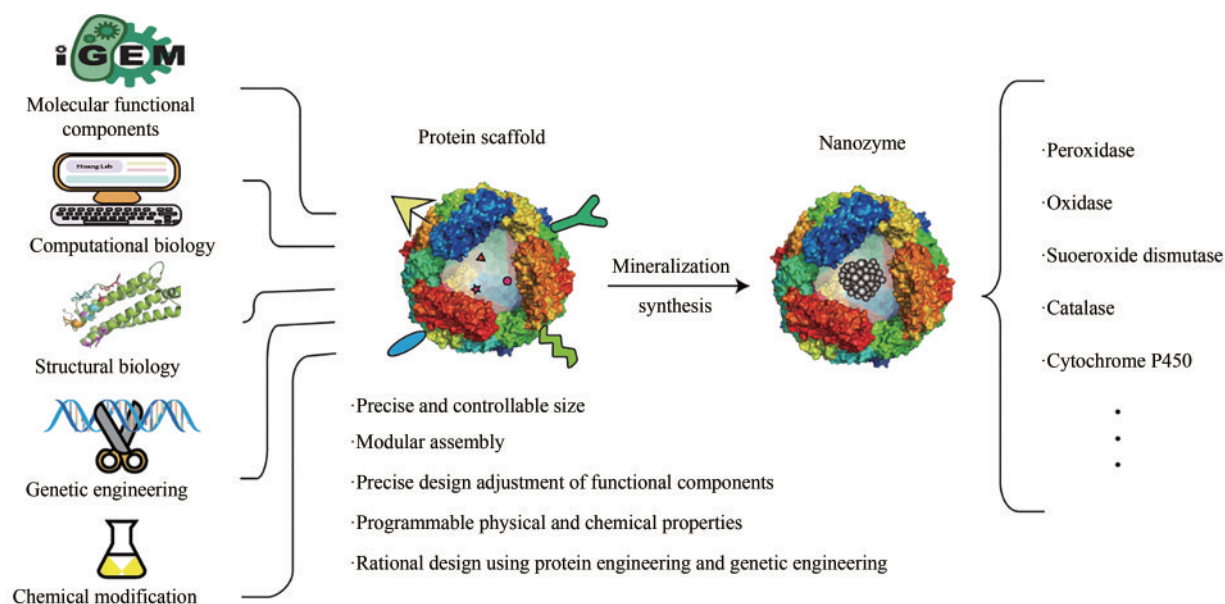
收稿日期: 2022-01-28 修回日期: 2022-03-31

基金项目: 国家自然科学基金 (31870999, 82072054, 91959129); 天津合成生物技术创新能力提升行动项目 (TSBICIP-KJGG-014-03)

引用本文: 刘奇奇, 王春玉, 齐天翊, 朱明盛, 黄兴禄. 合成生物纳米酶[J]. 合成生物学, 2022, 3(2): 320-334

Citation: LIU Qiqi, WANG Chunyu, QI Tianyi, ZHU Mingsheng, HUANG Xinglu. Synthetic biological nanozyme [J]. Synthetic Biology Journal, 2022, 3(2): 320-334

have been developed, and extensively applied in many fields, such as biomedicine, biosensor/biodetection and bioremediation. Recently, one type of nanozymes based on gene editing or genetic recombination technology was developed. Compared to other nanozymes, this kind of nanozymes was fabricated based on the key techniques of synthetic biology. Herein, we term them as synthetic biological nanozymes. The main characteristic of synthetic biological nanozymes is the utilization of artificially or *de novo* designed protein as scaffolds. Furthermore, the amino acids or domains of the scaffolds with metal ion binding ability can be used for synthesizing metal nanoparticles. This characteristic of synthetic biological nanozymes integrates the function of proteins and the catalytic activity of metal nanoparticles together. In this review, we comment the progress of nanozymes and their advantages in biomedicine applications, and highlight the synthesis principle of natural protein scaffold-based nanozymes and their applications in nanomedicine. We also introduce the gene editing or genetic recombination protein scaffolds for nanomaterials preparation and the superiorities of this kind of scaffolds for inorganic nanoparticles synthesis. Through such an overview, we elaborate the definition of synthetic biological nanozymes, and explain their essential connotation and finally take ferritin-based nanozymes as an example to demonstrate their design and applications. In the future, synthetic biological nanozymes may integrate technological innovations of many fields including computational biology, structural biology, protein engineering, genetic engineering, chemistry, etc., which would make the design of nanozymes more rational, their functions more diverse, and integration of synthetic biology and nanobiology more profound.



Keywords: nanozymes; bioactive materials; genetic engineering; synthetic biological nanozymes; ferritin nanozymes

近年来,随着合成生物学的兴起,如何对生物体进行理性设计、改造乃至从头合成,成为这一领域的研究热点。目前,科学家已经能够对核酸、蛋白质、脂质、酶等生物基大分子进行设计和合成。酶作为其中重要的一部分,是维持生物体正常生命活动所不可缺少的。近一个世纪以来,

酶学研究一直处于科学研究的重要位置,多次获得诺贝尔奖,如1946年的诺贝尔化学奖揭示了酶的化学本质是蛋白质;1989年核酶的发现,阐明了酶的复杂性和多样性;2018年诺贝尔化学奖授予酶的定向进化技术等。天然酶具有极强的催化能力,能在常温常压下将化学反应的速度提高 $10^7\sim$

10⁹倍,因此具有广泛的应用价值,预计到2024年全球酶市场将达到105亿美元^[1]。随着人们对其需求越来越大,天然酶在来源、提取、保存、使用等方面的诸多弊端也被暴露出来。

为应对以上问题,人工酶(artificial enzyme)的研究被提上日程,也是酶学研究中一个重要里程碑。通常,研究人员可以寻找并模拟大自然的智慧,通过计算^[2]和直接进化^[1]的方式进行人工酶的设计和构建;或者,研究人员也可以通过研究酶的物理化学内在相互作用,使用合成材料来构建人工酶^[3]。随着近年来纳米技术的发展,一些纳米材料自身也展现出一些类酶的活性,即纳米酶(nanozyme)。纳米酶的研究使得纳米材料具有了除光、热、磁等以外的新特性,也使得纳米材料的内涵和应用都得到了进一步的提升。作为一种新型人工酶,目前纳米酶的研究基本上还是属于材料领域的延伸,严格意义上与合成生物学的内容相差甚远。最近,我们以基因重组的重链铁蛋白作为蛋白骨架,通过仿生、创造等理念,在其内腔中合成了一系列的纳米酶新材料,从而融合蛋白骨架的靶向和纳米酶的催化等性能于一体。鉴于这种策略实现了合成生物学、纳米酶催化和纳米生物学等技术的深度融合,在此我们将其命名为“合成生物纳米酶”。本文将从纳米酶的基本概况、天然蛋白骨架纳米酶、基因改

造蛋白骨架及合成生物纳米酶4个部分展开综述。

1 纳米酶的基本概况

纳米酶(nanozyme)是一类本身蕴含酶学特性的纳米材料,能够催化酶的底物,产生同天然酶类似的催化反应,并具有酶促反应动力学等特征,属于一类新型模拟酶^[4-5]。与天然酶类似,纳米酶可以在温和的生理条件下高效催化酶的底物,因其可调的催化活性、苛刻条件下的高稳定性、组成和结构设计的灵活性以及优异的生物相容性等优势,成为了天然酶的理想替代品^[6-7]。2007年,阎锡蕴院士团队^[8]首次报道并证明了磁性四氧化三铁纳米颗粒的类过氧化物酶活性。随着近年来纳米技术、合成生物技术、催化和理论计算的飞速发展,越来越多具有不同类酶活性的纳米酶被发现或设计,纳米酶的优势也逐渐被挖掘出来(表1)。

合成的纳米酶可以模拟天然酶的结构或功能,能够催化与酶相同的底物和化学反应,主要模拟的酶类型有氧化还原酶和水解酶等,有些纳米酶可同时表现出双酶或多酶活性,这些活性被广泛应用于生物传感、生物成像、抗菌、抗氧化、疾病诊断治疗等领域^[10]。尽管纳米酶具有同天然酶

表1 天然酶与纳米酶优缺点对比^[9]

Tab. 1 Advantages and disadvantages of natural enzymes and nanozymes^[9]

纳米酶		天然酶	
优点	缺点	优点	缺点
高催化活性、成本低	活性类型有限	高催化活性	成本高
稳定性高	底物选择性有限	高底物选择性	稳定性有限
可长期存储	具有潜在的纳米毒性	良好的生物相容性	长期存储难
易于批量生产、可回收利用	催化机制不清楚	生物催化类型广泛	批量生产难、分离纯化耗时
多酶模拟活性、可控催化活性和类型	缺乏统一标准和参考资料	应用广泛	催化活性单一
易于多功能化(生物共轭表面积大)、可通过外部刺激进行催化活性和催化类型控制(如光、超声、热、磁等)	催化性能依赖于大小、形状、结构和成分等	通过基因和蛋白质工程进行理性设计	在极端环境中使用难(如高温、极端pH、盐离子浓度、紫外线照射等)
适用于极端环境			
独特的物理化学性质(如荧光、电、顺磁性质等)			

类似的催化反应及酶促反应动力学等特征，但在其特异性、高效性和催化类型的丰富性等方面与天然酶相比还有所差异。因此，纳米酶近年来的研究重点也致力于增强纳米酶的催化活性，改善纳米酶的催化特异性及丰富纳米酶的催化类型等。与天然酶相比，纳米酶的优势之一是更容易进行理性设计^[11]，研究人员可以通过仿生设计、高通量计算等手段增加其各方面的性能^[12-15]。然而，目前纳米酶的催化机制还较为模糊，主要原因是其研究受限于纳米酶种类的多样性、结构的复杂性及催化位点的不确定性等，如：纳米材料的尺寸、形貌、组成成分及表面修饰等都会影响其类酶活性^[7]。最近，对于纳米酶催化机理的研究已取得一定进展，此方面的工作在多篇综述中进行了总结^[16-19]，在此主要关注于纳米酶的功能化设计及在生物医学领域的应用。

近年来，纳米酶代替天然酶在开发免疫传感器中显示出低成本、稳定性好、灵敏度高和选择性强的优点。过氧化物酶样纳米酶用于构建多功能生物传感器^[20-22]已被广泛研究。例如，Wei等^[23]通过将葡萄糖氧化酶与具有类过氧化物酶活性（peroxidase, POD）的 Fe_3O_4 纳米酶结合，开发了一种兼具敏感性和选择性的葡萄糖传感策略。纳米酶制备的纳米探针还可以快速灵敏地检测病毒，Duan等^[24]通过将 Fe_3O_4 纳米颗粒作为探针，开发了基于 Fe_3O_4 纳米酶的免疫试纸条（nanozyme-strip），可检测低至1 ng/mL的埃博拉病毒糖蛋白，将埃博拉病毒检测的精度提高了近百倍，检测的敏感性与ELISA方法相当，但是速度

要快得多，可在30 min内完成且更为简单，这为埃博拉病毒疫情的诊断提供了便捷有效的筛查工具（图1）。

此外，纳米酶对活性氧（reactive oxygen species, ROS）的调控能力使其具有抗肿瘤^[25]、抗氧化^[26]和抗菌^[27]等治疗潜力。以抗肿瘤治疗为例，纳米酶首先可以通过被动方式和主动方式靶向肿瘤细胞，然后利用类氧化物酶（oxidase, OXD）和POD活性直接生成或协同增强ROS来杀伤肿瘤细胞；或者通过其过氧化氢酶（catalase, CAT）活性，将肿瘤微环境的 H_2O_2 催化生成 O_2 ，可以有效缓解肿瘤组织缺氧，促进肿瘤细胞凋亡，也可以提高光动力、声动力和放射治疗等需氧治疗方法的效率。Fan等^[28]利用氮掺杂多孔碳纳米球开发了一种具有4种类酶活性（OXD、POD、CAT和SOD）的纳米酶。在酸性条件下，碳氮纳米酶可以通过OXD和POD活性催化氧和过氧化氢生成活性氧自由基杀伤肿瘤细胞，在中性环境中，它们会发挥CAT和超氧化物歧化酶（superoxide dismutase, SOD）活性，能够清除自由基保护正常细胞不受损害。

纳米酶可以有效减轻氧化应激引起的损伤，即抗氧化作用。例如，ROS可能是脑型疟疾发生过程中损害血脑屏障的重要介质，Zhao等^[29]针对脑内皮细胞中ROS上升的特点，设计合成了铁蛋白纳米酶，其中性条件下具有的CAT活性可以保护血脑屏障内皮细胞免受ROS损伤，显著提高了实验性恶性脑疟小鼠的存活率。同时铁蛋白纳米酶和抗疟疾药物蒿甲醚联合给药时可以显著减

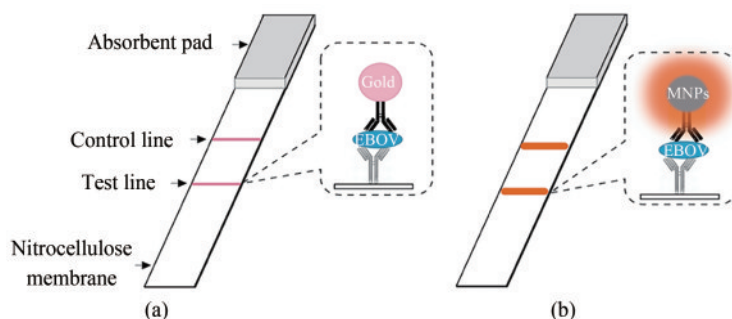


图1 纳米酶试纸条的设计^[24]

(a) 标准胶体金试纸条；(b) 纳米酶试纸条，利用纳米酶的活性，可以与底物发生显色反应，实现肉眼可见的增强信号

Fig. 1 Design for nanozyme-strips^[24]

(a) Colloidal gold strips; (b) Nanozyme-strips. Probe with nanozyme activity generates a color reaction with substrates, which significantly enhances the signal so that it can be visualized by naked-eyes

轻恶性脑症小鼠脑部炎症和记忆障碍。纳米技术在抗菌、抗病毒方面也展示了巨大的应用潜力^[27]。目前, 抗菌纳米酶主要包括金属基化合物、碳基纳米材料、过渡金属硫化物/过氧化物/氧化物、单原子纳米酶和金属有机框架(metal-organic frameworks, MOFs)基化合物等^[27, 30-33]。例如, 石墨烯量子点(GQDs)是一种具有类POD活性的碳纳米材料, GQDs催化过氧化氢分解生成具有较高抗菌活性的羟基自由基, 以达到杀灭细菌的作用, 对大肠杆菌等革兰氏阴性菌和金黄色葡萄球菌等革兰氏阳性菌均具有广泛的抑菌活性^[33]。

2 天然蛋白骨架纳米酶

基于天然蛋白为骨架设计的纳米酶, 通常以天然蛋白质为载体, 与纳米酶共同组成复合材料。该系统具有如下优势:

(1) 良好的生物相容性: 天然蛋白骨架大多为内源性物质, 具有低毒和低免疫原性, 并且代谢产物安全。

(2) 较强的稳定性: 天然蛋白通常在一定的温度和酸碱度下保持结构稳定, 对于一些如金属纳米团簇/颗粒材料等不稳定的纳米酶, 天然蛋白骨架可以通过与其结合或包载提高整体稳定性。

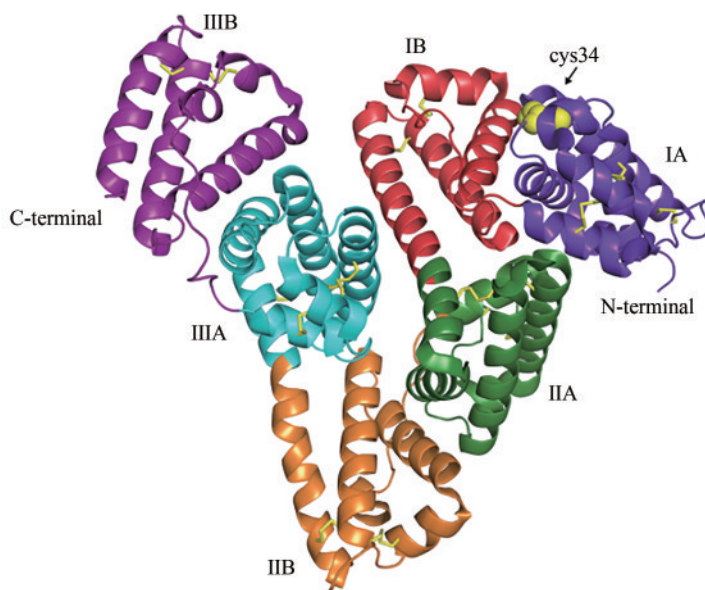
(3) 出色的靶向能力: 许多天然蛋白可以通过与某些细胞表面受体天然的亲和力实现靶向递送。

(4) 可延长体内半衰期: 一些天然蛋白可以通过躲避免疫系统的识别和清除(如血清白蛋白等), 延长自身在循环系统中存在的时间。

天然蛋白骨架原位合成或包载纳米酶通常利用了蛋白配体和金属之间存在的相互作用, 这种相互作用主要与金属携带的正电荷有关, 同时蛋白质的局部电荷和构象特征也会影响金属结合位点的活性高低^[34]。蛋白质与金属配位主要依靠的是侧链残基上能够提供电子的氨基酸。例如, 存在于螺旋或 β 链中的组氨酸通过咪唑环上氮提供的孤对电子与金属元素配位^[35]; 存在于螺旋、转角和环中的天冬氨酸和谷氨酸通过羧酸基团与金属元素结合^[36]。主链上的羰基氧也参与一些金属元素的结合, 尤其是Ca(II)^[37]。

白蛋白是血液中最丰富(35~50 g/L人血清)的血浆蛋白。作为一种内源性的蛋白, 白蛋白无免疫原性, 由肝脏合成, 主要用于维持血浆pH和渗透压^[38]。白蛋白具有半衰期长、水溶性好的特点, 在人血液中的半衰期约为19 d, 以此合成纳米酶可保持纳米酶相对较长时间不被清除, 使得纳米酶能够更持久地发挥活性。目前对于白蛋白金属结合位点的研究已经比较清晰, 大多数的哺乳动物白蛋白主要包含4个金属结合位点^[39], 分别是位于N末端的结合位点(N-terminal site, NTS)、Cys34及其附近的环境、位于界面处的多金属结合位点A(multi-metal binding site, MBS)和位置暂时未知的金属结合位点B, 这4个金属结合位点在蛋白结构和金属离子结合特异性上存在较大的差异。

人血清白蛋白(human serum albumin, HSA)和牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)是最为常见的两种白蛋白类纳米酶骨架。其中, HSA的整体三维结构呈心形, 由3个同源结构域I、II和III组成, 每个结构域包含两个亚结构域(A和B)^[40](图2)。目前研究表明, HSA中存在多个配体结合位点, 能通过共价或非共价的结合方式实现药物或金属等物质的搭载, 因此是与纳米酶结合的理想载体。HSA还具有天然的肿瘤组织靶向能力, 主要是基于其与细胞表面受体(包括gp18、gp30、gp60、FcRn)之间的相互作用^[41]。BSA在结构和理化性质上与HSA有相似性, 也可作为纳米酶的天然蛋白骨架。Huang等^[42]利用HSA修饰四氧化三锰(Mn_3O_4)纳米颗粒, 发展了一种新型复合抗氧化纳米材料来抑制缺血性中风再灌注引起的神经系统损伤。其中, HSA的修饰使得该纳米酶复合材料表现出很好的生物相容性和较低的器官毒性等特征, 能够治疗小鼠缺血性脑卒中再灌注引起的脑损伤。Han等^[43]以BSA为模板实现了二氧化锰纳米片的可控合成, 通过改变BSA的浓度能够影响纳米酶材料的类酶活性。此外, 该纳米材料还具有串联酶催化的特性, 从而利用此特性提出了一锅法、无酶葡萄糖比色传感新策略, 该方法灵敏度高、检测限低、检测时间短, 解决了传统血糖检测方法中生物酶、多催化剂、分步反应、非原位反应带来的问题。

图2 HSA的晶体结构^[40]Fig. 2 Crystal structure of HSA^[40]

丝蛋白 (silk fibroin, SF) 也是一种广泛应用于纳米递送系统的天然蛋白。丝素蛋白纤维核心由1个重链 (约350 kDa) 和1个轻链 (约25 kDa) 组成, 通过二硫键和糖蛋白连接在一起。重链丝蛋白的一级结构中具有 $(\text{Gly-Ser-Gly-Ala-Gly-Ala})_n$ 的氨基酸重复序列^[44]。丝蛋白具有优异的生物相容性、可控的生物降解性和低免疫原性, 还能通过与其他聚合物混合来调节其性能, 可显著改善纳米酶的生物利用度。Yang等^[45]在丝蛋白存在的条件下, 利用氯金酸和氯铂酸的生物结晶 (bioinspired crystallization) 构建了Au、Pt双金属纳米酶, 并在体外4T1肿瘤细胞和体内异种移植肿瘤模型上证明了所合成的AuPt@SF (APS) 纳米酶的抗肿瘤作用, 这些纳米催化剂对肿瘤微环境特别敏感, 可实现有效的肿瘤治疗和诊断。

天然酶自身也可以作为一种纳米酶合成蛋白骨架, 从而可以产生更为丰富的催化能力^[46]。Zeng等^[47]将金纳米颗粒 (Au) 与辣根过氧化物酶 (HRP) 相结合, 组装成纳米催化共轭物 (HRP-Au) 进行葡萄糖检测, HRP/Au的适当混合可以显著提高级联反应的催化活性。Losada-Garcia等^[48]使用几种酶分子为蛋白骨架合成了铜纳米颗粒杂化的铜纳米酶, 杂化后的纳米酶具有不同于酶支架的酶活性, 并且铜纳米颗粒和支架酶之间的协同作用还可以提高杂化铜纳米酶的氧化还原酶活

性。Li等^[49]将脂肪酶-聚合物共轭物与Pd纳米簇杂化构建了脂肪酶-Pd纳米簇杂化催化剂, 在催化S-1-苯乙胺外消旋中表现出了较商用Pd/C催化剂高50倍以上的活性, 并且还可以回收重复使用。

3 基因改造蛋白骨架

天然蛋白骨架在合成纳米酶上最大的问题是可塑性差, 以基因重组、改造为基础的可设计蛋白骨架, 其最大的特点是可“按需定制”, 能够赋予蛋白骨架更多的功能, 如靶向疾病等。在纳米研究领域, 可设计蛋白骨架最具代表性的是蛋白纳米笼。与传统纳米材料相比, 蛋白纳米笼因其高比表面积、内/外表面可设计性、多功能性和特殊的内在特性, 在包括药物输送在内的多个领域中具有良好的应用前景^[50-52]。以这种蛋白纳米笼为蛋白骨架, 仿生合成纳米颗粒为进一步开发纳米酶材料提供了基础。

自然界中存在很多种天然自组装的蛋白纳米笼结构, 如铁蛋白、小热休克蛋白 (sHSP)^[53]、封装蛋白^[54]和lumazine合酶^[55]等; 此外, 病毒样颗粒 (virus-like particles, VLP) 也是一种自组装纳米颗粒, 包括豇豆褪绿斑驳病毒 (CCMV)、噬菌体P22等^[52] (图3)。一些笼状蛋白本身就是一

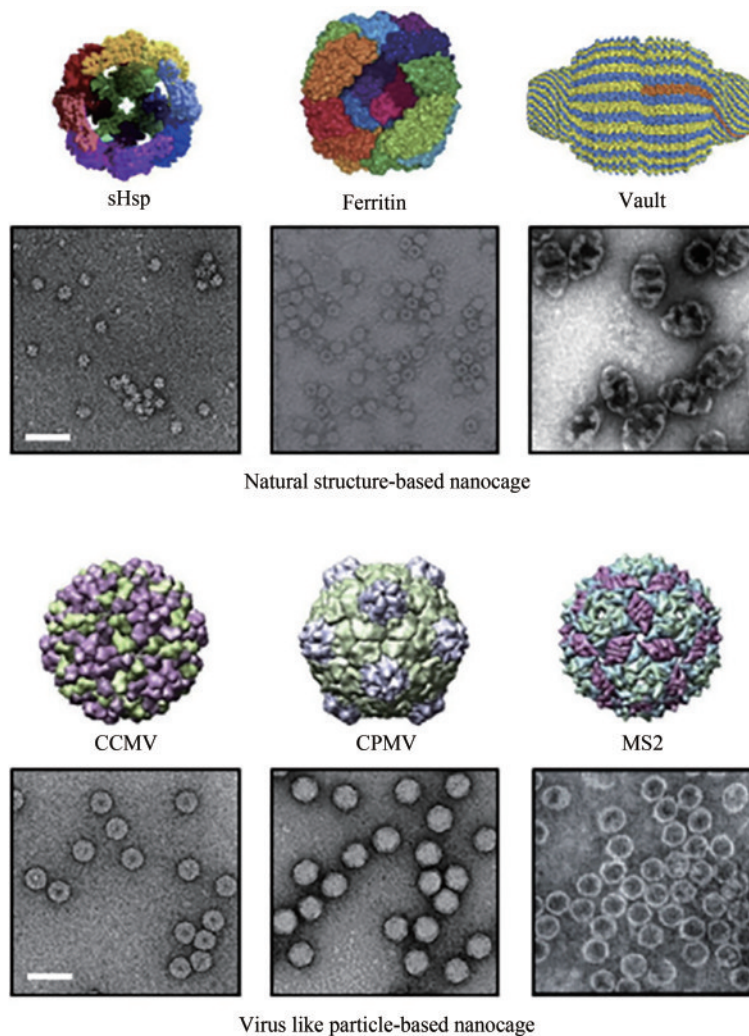


图3 各种基于笼状蛋白的结构示意图及其透射电镜图^[52]

(比例尺= 50 nm。上图显示了基于天然结构的纳米笼，下图展示了基于病毒样颗粒的纳米笼)

Fig. 3 Schematic diagrams and TEM images of structures of various protein-based nanocages^[52]

(Scale bar: 50 nm. Upper images show natural structure-based nanocages, and lower images show virus-like particles.)

种酶，肺炎链球菌的氨基肽酶是一种锌依赖的金属肽酶，由12个亚基自组装成四面体，在其中合成Pt金属纳米颗粒，能够将铂催化加氢和肽酶水解多步催化反应结合在一起^[56]。

天然笼状蛋白也可以通过基因重组、改造得到，使其“按需”获得一定的功能。此外，它们也可作为蛋白骨架，仿生合成各种金属纳米材料。天然铁蛋白(ferritin)由重链和轻链亚基组成，基因重组重链铁蛋白是由24个亚基自组装成的中空笼状结构(ferritin nanocage, FTn)，外径和内径分别为12 nm和8 nm。FTn能够结合肿瘤高表达的转铁蛋白受体1(TfR1)^[57-58]，具有肿瘤靶向的特

性及穿越血脑屏障的能力^[59]，已在肿瘤靶向治疗^[60-61]及成像^[62-63]等领域被广泛应用。FTn可以方便地通过遗传或者化学的手段在内腔、外表面及亚基界面修饰改性来获得新的功能，如在表面引入RGD基序^[64]及表皮生长因子(EGF)^[65]等来改善靶向或治疗能力。重要的是，FTn自身具有生物矿化特性，可以作为蛋白骨架在其内腔原位合成金属纳米颗粒，包括Fe、Pt、Pd、Cu、Co、Au、Ag等^[66-67]。进一步通过基因工程改造内腔，可提高合成金属纳米颗粒的合成效率，如在内腔引入半胱氨酸和组氨酸，可以通过巯基/咪唑和一些金属螯合，增加铁蛋白内部的金属装载量^[68]。

除了铁蛋白外,一些其他基因改造的笼状蛋白也被用于合成纳米颗粒。将青蛙M-铁蛋白模拟肽(QEHEDE)或带负电荷的富含谷氨酸肽(EEEEE)通过基因改造嵌入到内腔,可以使工程E2蛋白获得铁矿化的能力^[69]。豇豆褪绿斑驳病毒(CCMV)由于具有较大且带正电的内腔,可被用于合成金属纳米颗粒,通过基因改造可以实现病毒衣壳内部的电荷转换,将其N端带正电的氨基酸替换为带负电荷的谷氨酸仍能保持其笼状结构,可以介导Fe(II)在内腔的结合及24 nm的 γ -FeOOH纳米粒子在CCMV内腔中的合成^[70]。Giessen等^[71]改造了*T. maritima*衣壳蛋白,在天然EncTm操纵子中删除了Flp,并在N端遗传融合了DNA编码的银沉淀肽AG4(NPSSLFRYLPSD),构了工程衣壳蛋白EncTmAG4,使其具有了内部形成银纳米颗粒能力。

天然蛋白经过亿万年进化,已形成了稳定的结构,因此,一定程度上基因改造的天然蛋白质还是能够维持其结构稳定性。与之相比,人为创造非自然界存在的蛋白骨架更具挑战,即利用算法语言进行计算编程、建模和模拟,从而从头设计蛋白质纳米笼。华盛顿大学Baker实验室^[72]使用Rosetta套件高通量筛选的方式,将所有可能的界面趋近于自然进化的结构。之后通过软件对接最佳亚基和寻找互补性优化产物,在一项工作中设计出了5个笼状结构,每个结构由24个亚基组成^[73]。除此之外,他们还进一步设计了蛋白纳米笼的外表面,通过螺旋间隔结构域将抗体的恒定结构域与纳米笼的外表面结合,这种方法可将抗体精准地结合到具有几何形状的纳米笼中^[74]。Gao等^[75]从头设计构建了一种氧气通透性可控的人工蛋白纳米笼,策略是基于高分辨结构信息,利用亲和性的分子补丁封闭蛋白纳米笼外壳的通道,进而可逆地控制蛋白笼的氧通透性。这种从头设计策略对将来的纳米酶理性设计十分具有借鉴意义,或许可以成为纳米酶催化底物选择特异性及活性控制等策略之一。

一般来说,笼状蛋白可以在外腔、内腔和亚基界面基因工程化改造^[76],如改造外表面使其具有靶向作用或改善其生物相互作用^[77];改造内腔可以高效地装载或合成金属纳米颗粒^[68, 78];改造

亚基界面会使笼通道打开或诱导拆卸/重新组装^[79-80]。这种以基因改造为基础的可设计蛋白纳米笼,在合成酶学的研究中可作为一个人工酶展示平台,用于展示具有精确空间关系的酶或构建多酶级联纳米反应器系统^[81]。这些结构可以有效地模仿自然界中的酶络合物,通过酶的级联反应来提高催化的效率^[82]。可设计蛋白纳米笼在纳米酶的研究中也可作为合成模板或生物反应器,以构建多样化和功能化的纳米酶^[83]。因此,这样的特点可以将蛋白骨架的可设计优势与纳米酶催化特性巧妙地融合在一起,赋予纳米酶设计更多的可能性。

4 合成生物纳米酶

合成生物纳米酶是在上述基因改造蛋白骨架的基础上,利用和借鉴合成生物学技术手段和思路,开辟纳米酶研究领域的新分支。从设计上讲,区别于通常意义的纳米酶,合成生物纳米酶在结构上着重以基因重组、改造为基础的蛋白为骨架,再加以具有类酶催化活性金属纳米颗粒的合成,可以视其为生物材料和无机金属材料组成的杂化分子。合成生物纳米酶优于其他纳米酶的方面在于,研究人员可以将种种功能和结构部分作为一个模块/基块进行自下而上地组装和构建,这种构建方式以基因工程重组为前提,能够更为理性和标准化地控制。从催化机理上来讲,合成生物纳米酶的组成更类似于天然酶的组成特点,例如金属蛋白酶,因此也更容易模拟天然酶的设计,更容易探究其催化机理。从功能和应用上来讲,既可以利用蛋白骨架本身的功能,如靶向疾病等,也可以利用纳米颗粒的催化功能,两者合二为一。

基于以上特点,这种合成生物纳米酶目前研究最多的是铁蛋白纳米酶,我们和其他研究者在这方面做了许多的工作。基因重组重链铁蛋白(FTn)已被证明是一种优良的纳米递送平台^[84],它可以穿越多种生物屏障^[59],具有肿瘤靶向且可以趋向于低氧的肿瘤组织^[85-86]。通过在铁蛋白内部仿生合成金属纳米酶,可以进行多种酶活性的模拟^[83]。利用此种策略合成的人工纳米酶具有优良的单分散性、均匀的尺度及良好的生物相容性等

优点。我们利用这种铁蛋白作为蛋白骨架原位合成制备一系列功能各异的纳米酶，如合成模块化组装铁蛋白Pt纳米酶具有肿瘤靶向杀伤能力^[87]；靶向改造的铁蛋白Mn纳米酶具有SOD-CAT级联催化活性^[88]；铁蛋白Pd纳米酶模拟细胞色素P450可实现生物正交催化^[89]；铁蛋白Fe纳米酶的过氧化物酶活性模拟胞内氧化应激^[90]等。

氧化还原酶类的纳米酶可以进行ROS调控，进而进行细胞内重要功能的调控^[91-93]。在FTn内部合成的Mn纳米酶具有类过氧化氢酶样活性。这种仿生人工酶可以有效穿透肿瘤组织缺氧区域发挥过氧化氢酶活性以提供氧气，这可以显著缓解肿瘤的缺氧。这种氧气的产生可以缓和光动力疗法对氧气的需求大、肿瘤部位氧气不足的问题，增强光动力疗法的疗效^[94]。通过对铁蛋白外壳进行改造之后在其内部合成纳米酶，制备了靶向线粒体的铁蛋白纳米酶（mito-fenzoyme），这种人工级

联纳米酶具有类超氧化物歧化酶和过氧化氢酶样活性，可以克服多种生物屏障靶向线粒体。在心脏缺血再灌注损伤过程中，线粒体呼吸链中超氧阴离子的产生是造成再灌注损伤的重要因素^[95]，mito-fenzoyme在线粒体部位发挥超氧化物歧化酶的活性，清除过量产生的超氧化物自由基，保护因缺血造成的组织损伤^[88]（图4）。

铁蛋白纳米酶因其出色的酶活性及可编程的特异性，在体外检测中也有出色的表现。最为经典的例子是铁蛋白四氧化三铁纳米酶，其具有过氧化物酶活性和TfR1结合能力，能够靶向肿瘤高表达的TfR1发挥活性，作者检查了来自9种癌症患者的474个临床样本，验证了此纳米酶可以区分癌细胞和正常细胞，灵敏度为98%，特异性为95%^[96]。Jiang等^[97]报道了通过将肝靶向肽SP94遗传融合到铁蛋白表面的方式，制备了遗传改造的肝细胞癌特异性靶向铁蛋白（HccFn），并在其

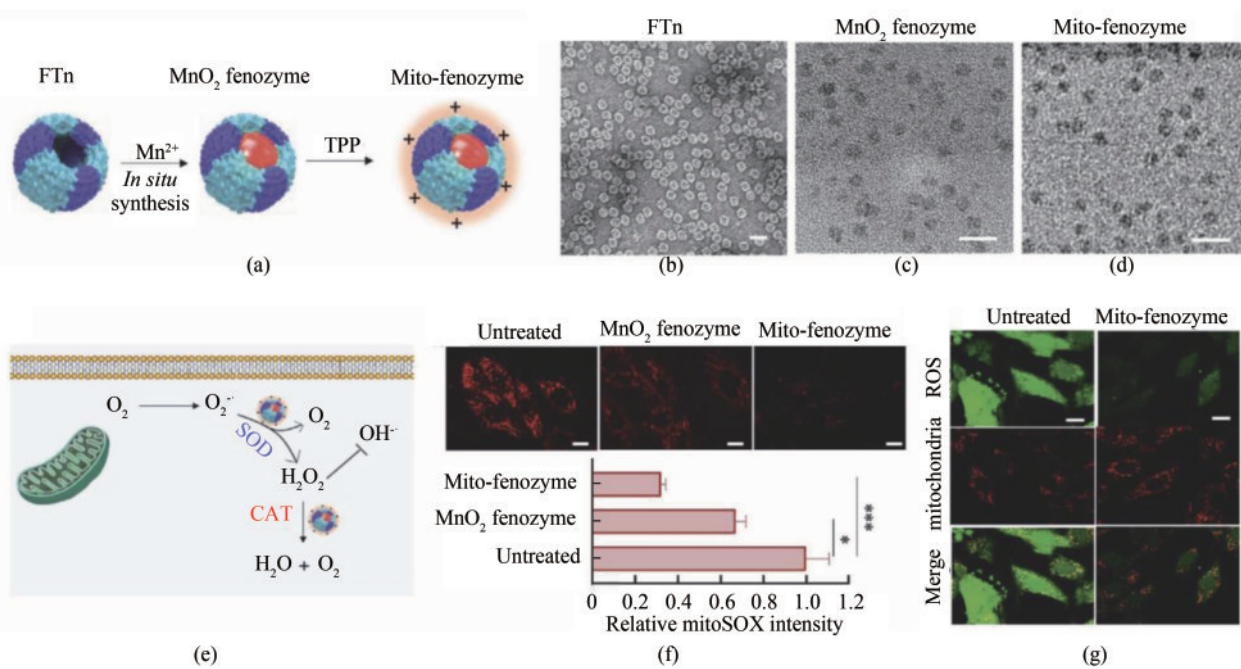


图4 杂化铁蛋白纳米酶（mito-fenzoyme）保护线粒体功能^[88]

(a) mito-fenzoyme制备示意图；(b) FTn的负染色TEM图；(c) MnO₂ fenozyme TEM图；(d) mito-fenzoyme TEM图（比例尺=20 nm）；(e) 在mito-fenzoyme作用下细胞内自由基向非细胞毒性分子转化的示意图；(f) mito-fenzoyme影响线粒体氧化损伤的共聚焦图像（上）和量化分析（下）；(g) mito-fenzoyme处理的细胞内氧化损伤自由基水平下降（比例尺=10 μm）

Fig. 4 Hybrid ferritin nanozyme (Mito-Fenzoyme) protects mitochondrial functions^[88]

(a) Schematic diagram for the preparation of Mito-Fenzoyme. TEM images of the FTn protein shell (negative staining with 1% uranyl acetate) (b), MnO₂ nanoparticles inside the FTn shell (c), and Mito-Fenzoyme (d). Scale bar: 20 nm. (e) Schematic diagram for the intracellular conversion of free radicals to non-cytotoxic molecules under the catalysis of Mito-Fenzoyme. (f) Confocal images (top) and quantitative analysis (bottom) for the effect of Mito-Fenzoyme on mitochondrial oxidative damage. (g) Mito-Fenzoyme reduced intracellular free radical levels in oxidatively damaged cells.

Scale bar: 10 μm

内部仿生合成了钴纳米酶——HccFn (Co_3O_4)。这种遗传改造的人工纳米酶具有过氧化物酶样活性催化底物二偶氮氨基苯 (DAB) 的氧化, 在 H_2O_2 的存在下发生颜色反应。作者检查了 424 份临床肝癌细胞癌标本, 证实 HccFn (Co_3O_4) 纳米酶区分肝癌组织与正常肝组织的敏感性为 63.5%, 特异性为 79.1%, 与临床使用的 HCC 特异性标志物 α 胎蛋白相当。

合成生物学模块化思路也可以应用于纳米酶的设计和构筑。通过对铁蛋白外壳组装后再组装的策略, 制备了具有精确超分子结构的寡聚纳米酶^[87] (图 5)。这种“自下而上”方式构建的寡聚纳米酶具有精确的结合价, 有助于增加靶向、延长血液循环时间及肿瘤组织的穿透能力。寡聚铁蛋白铂纳米酶具有强的过氧化物酶活性, 在溶酶体中产生高毒性的羟基自由基, 最终导致肿瘤细胞死亡。细胞色素 P450 是一种末端加氧酶, 参与了体内重要的生物学过程^[98]。肝脏中的细胞色素

P450 是药物代谢的关键酶, 可以将一些疏水药物转化为亲水以便于排除体外。最近研究发现, 铁蛋白铂纳米酶 (FTn-Pd) 具有模拟 P450_{BM3} 活性^[89], 可以特异性地切割丙基醚基团, 并且可以在溶酶体中催化生物正交反应。在溶酶体内的酸性环境下, FTn-Pd 纳米酶还会发挥其过氧化物酶活性, 进一步介导溶酶体膜的渗漏。FTn-Pd 纳米酶的多酶协同特性允许我们在溶酶体生物正交释药并克服溶酶体屏障增强药效。

使用合成生物学自下而上的策略, 仅使用其最小功能单元重构细胞生物学过程对于在分子和机械水平上研究细胞内生化机制非常有帮助。通过在简化的实验系统中组合可控数量的组件, 可以详细了解对一些生命至关重要的生物过程和分子机器。合成生物纳米酶具有模块化可设计且生物相容性好等优势, 这允许我们设计、控制、模拟和标准化生物过程。ROS 导致的 DNA 损伤及脂质过氧化是重要的生物学过程^[99]。Hu 等^[90] 设计

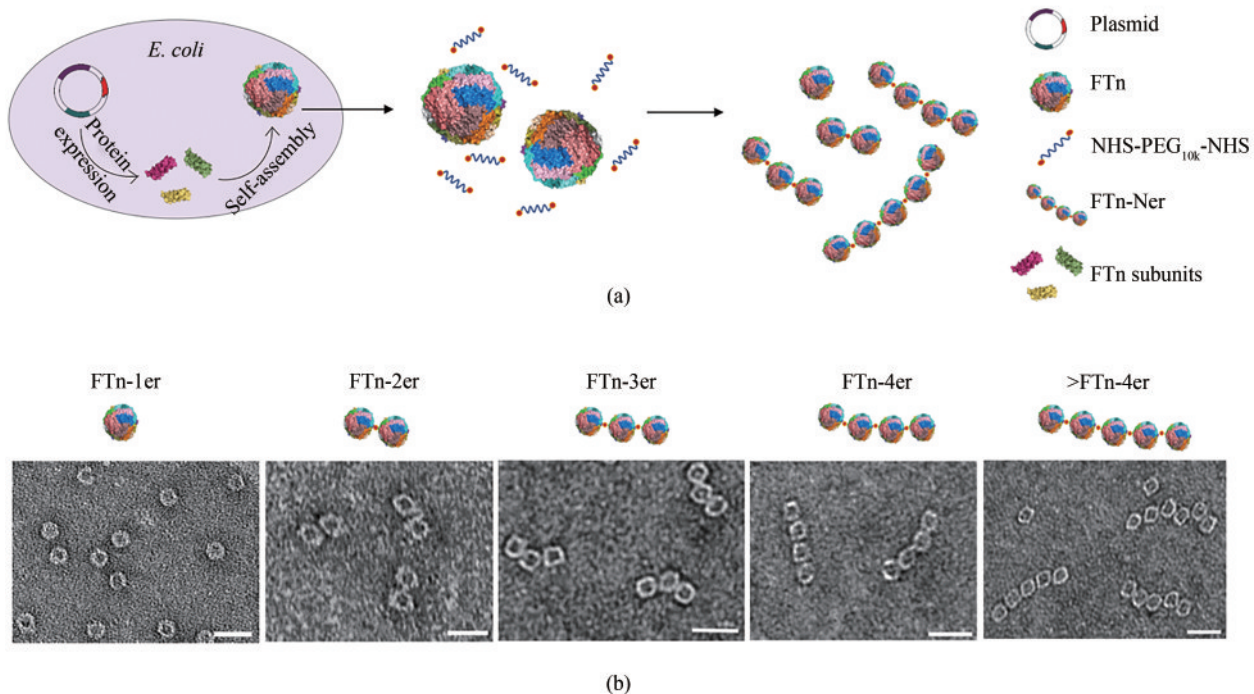


图 5 模块化组装思路构筑寡聚纳米酶^[87]

(a) 铁蛋白胞内重组胞外再重组构筑寡聚组装体示意图; (b) 构筑的几种组装体的示意图 (上) 和 TEM 照片 (下)。比例尺=20 nm

Fig. 5 Assembly of chain-like nanostructures^[87]

(a) Schematic illustration for the preparation of FTn-Ner via a two-step self-assembly/post-assembly approach. The uniform FTn as motifs were obtained by the self-assembly of 24 FTn subunits expressed in *E. coli*. Subsequently, purified FTn motifs were further assembled to form different FTn-Ner by using two-armed PEG. (b) Representative TEM images of various assembled nanostructures. Scale bar: 20 nm

了人工细胞系统，用铁蛋白纳米酶（fenozym）及人工合成脂质膜系统模拟细胞内的氧化应激反应。通过纳米酶诱导确定的催化反应，在巨型单层囊泡（GUV）体系中重建了细胞中重要的氧化应激化学事件，包括DNA损伤和脂质过氧化。此外，GUV系统还可以响应肿瘤微环境中高表达的 H_2O_2 ，主动诱导肿瘤细胞DNA双链断裂和脂质损伤。这个概念性的研究，为定义生物系统中的催化提供了一个有前途的选择，并为以全合成的方式从头创建人工细胞提供了新的见解。

5 展望

综上所述，纳米酶是一个学科交叉研究的产物，作为一个“载体”或“平台”，能够将各种不同的领域融合在一起，展现出强大的生命力。作为一种新型的人工酶，纳米酶能够把传统的酶类从“单分子”延伸至“颗粒”，极大扩充了合成生物学的工具包。纳米酶领域经过10多年的发展，目前已开发出成百上千种不同的纳米酶材料，能够模拟多种不同的酶活性，尤其是氧化还原酶类和水解酶类。基于这些酶的模拟，近年来，纳米酶在体外检测、体内疾病调控等方面正在发挥越来越大的作用，甚至在人造细胞的全合成方面也展现出一定的优势。然而，目前纳米酶领域仍然有很多问题亟待解决，如催化机制理论体系的建立、对底物选择性、类酶活性、标准化方法的建

立等。为应对以上问题，借鉴天然酶的基本结构，即蛋白骨架和活性中心，理性设计所需纳米酶，使其结构更为简单、组分更为明确，将对解决目前纳米酶存在的基本问题提供很好的思路。

由于一些天然来源的蛋白容易获取，像HSA和BSA等，已被用来合成一些纳米酶材料，但这类材料仅仅利用了蛋白作为模板来合成材料，在材料的可控性、功能性和赋能性上大大受限。事实上，利用合成生物学理念和技术，通过基因工程改造或从头设计，一些非天然蛋白骨架已被越来越多地开发出来，这些蛋白骨架利用计算生物学、结构生物学、遗传工程、化学手段等将分子功能元件融为一体，使得获得的蛋白骨架具有多种优势，如尺寸精准可控、模块化组装、功能分子精准设计、性能按需设计等，这为进一步构建合成生物纳米酶提供了基础。某些氨基酸/蛋白结构域能够亲和/捕捉金属离子，从而为纳米酶材料的原位生长或矿化提供了结合位点，事实上，通过前期的基因改造或蛋白结构设计，也能够对结合位点或亲和金属类型进行按需定制，因此，相较于其他纳米酶，合成生物纳米酶允许我们集合人工筛选的或自然界中已有的功能模块进行重新整合，还可以将现有的计算生物学、结构生物学、蛋白/基因工程手段及化学手段等融为一体（图6），进行更为精巧设计和活性定制，这是优于传统纳米酶的一大特点。另外，以金属蛋白酶为例，经过亿万年的进化，酶的结构和表现的催化

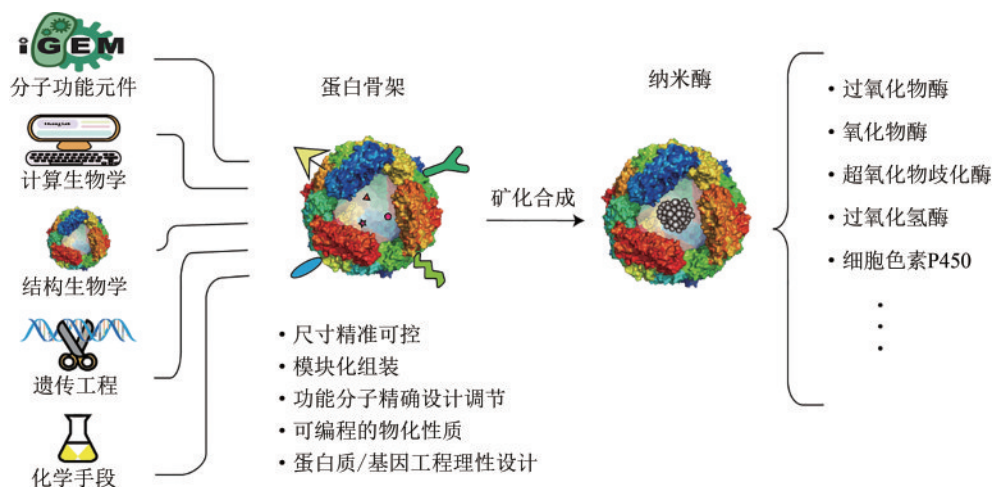


图6 合成生物纳米酶可能的方向

Fig. 6 Prospects for synthetic biological nanozymes

特性在某种意义上是一种极致的存在形式，蛋白的柔性和金属催化活性中心的完美协同作用，使其成为控制生命体代谢过程中不可分割的一部分。合成生物纳米酶以蛋白骨架原位合成纳米酶材料，其存在的必要性和优势也需要进一步挖掘和拓展，这也为传统酶学研究领域、合成生物学领域及其他新兴交叉领域展示了无限的可能性和新的思考。

参 考 文 献

- [1] DE PINA MARIZ B, CARVALHO S, BATALHA I L, et al. Artificial enzymes bringing together computational design and directed evolution[J]. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2021, 19(9): 1915-1925.
- [2] MAK W S, SIEGEL J B. Computational enzyme design: transitioning from catalytic proteins to enzymes[J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2014, 27: 87-94.
- [3] MURAKAMI Y, KIKUCHI J I, HISAEDA Y, et al. Artificial enzymes[J]. *Chemical Reviews*, 1996, 96(2): 721-758.
- [4] 高利增, 梁敏敏, 温涛, 等. 纳米酶标准术语[J]. *中国科技术语*, 2020, 22(6): 21-24.
GAO L Z, LIANG M M, WEN T, et al. Standard vocabulary for nanozyme[J]. *China Terminology*, 2020, 22(6): 21-24.
- [5] WEI H, GAO L Z, FAN K L, et al. Nanozymes: a clear definition with fuzzy edges[J]. *Nano Today*, 2021, 40: 101269.
- [6] WEI H, WANG E K. Nanomaterials with enzyme-like characteristics (nanozymes): next-generation artificial enzymes[J]. *Chemical Society Reviews*, 2013, 42(14): 6060-6093.
- [7] WU J J X, WANG X Y, WANG Q, et al. Nanomaterials with enzyme-like characteristics (nanozymes): next-generation artificial enzymes (II) [J]. *Chemical Society Reviews*, 2019, 48(4): 1004-1076.
- [8] GAO L Z, ZHUANG J, NIE L, et al. Intrinsic peroxidase-like activity of ferromagnetic nanoparticles[J]. *Nature Nanotechnology*, 2007, 2(9): 577-583.
- [9] LIANG M M, YAN X Y. Nanozymes: from new concepts, mechanisms, and standards to applications[J]. *Accounts of Chemical Research*, 2019, 52(8): 2190-2200.
- [10] WANG X Y, GAO X J, QIN L, et al. e_g occupancy as an effective descriptor for the catalytic activity of perovskite oxide-based peroxidase mimics[J]. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 704.
- [11] 武江洁星, 魏辉. 浅谈纳米酶的高效设计策略[J]. *化学进展*, 2021, 33(1): 42-51.
WU J J X, WEI H. Efficient design strategies for nanozymes[J]. *Progress in Chemistry*, 2021, 33(1): 42-51.
- [12] LIN S C, WEI H. Design of high performance nanozymes: a single-atom strategy[J]. *Science China Life Sciences*, 2019, 62(5): 710-712.
- [13] MENG X Q, ZARE I, YAN X Y, et al. Protein-protected metal nanoclusters: an emerging ultra-small nanozyme[J]. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 2020, 12(3): e1602.
- [14] ZHANG R F, FAN K L, YAN X Y. Nanozymes: created by learning from nature[J]. *Science China Life Sciences*, 2020, 63(8): 1183-1200.
- [15] LI S R, ZHOU Z J, TIE Z X, et al. Data-informed discovery of hydrolytic nanozymes[J]. *Nature Communications*, 2022, 13: 827.
- [16] LIU Q W, ZHANG A M, WANG R H, et al. A review on metal- and metal oxide-based nanozymes: properties, mechanisms, and applications[J]. *Nano-Micro Letters*, 2021, 13(1): 154.
- [17] HUANG Y Y, REN J S, QU X G. Nanozymes: classification, catalytic mechanisms, activity regulation, and applications[J]. *Chemical Reviews*, 2019, 119(6): 4357-4412.
- [18] SUN H J, ZHOU Y, REN J S, et al. Carbon nanozymes: enzymatic properties, catalytic mechanism, and applications[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2018, 57(30): 9224-9237.
- [19] LOPEZ-CANTU D O, GONZÁLEZ-GONZÁLEZ R B, MELCHOR-MARTÍNEZ E M, et al. Enzyme-mimicking capacities of carbon-dots nanozymes: properties, catalytic mechanism, and applications-a review[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2022, 194: 676-687.
- [20] WANG X Y, HU Y H, WEI H. Nanozymes in bionanotechnology: from sensing to therapeutics and beyond[J]. *Inorganic Chemistry Frontiers*, 2016, 3(1): 41-60.
- [21] HU Y H, CHENG H J, ZHAO X Z, et al. Surface-enhanced Raman scattering active gold nanoparticles with enzyme-mimicking activities for measuring glucose and lactate in living tissues[J]. *ACS Nano*, 2017, 11(6): 5558-5566.
- [22] PRATSINIS A, KELESIDIS G A, ZUERCHER S, et al. Enzyme-mimetic antioxidant luminescent nanoparticles for highly sensitive hydrogen peroxide biosensing[J]. *ACS Nano*, 2017, 11(12): 12210-12218.
- [23] WEI H, WANG E K. Fe_3O_4 magnetic nanoparticles as peroxidase mimetics and their applications in H_2O_2 and glucose detection[J]. *Analytical Chemistry*, 2008, 80(6): 2250-2254.
- [24] DUAN D M, FAN K L, ZHANG D X, et al. Nanozyme-strip for rapid local diagnosis of Ebola[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2015, 74: 134-141.
- [25] CHANG M Y, HOU Z Y, WANG M, et al. Single-atom Pd nanozyme for ferroptosis-boosted mild-temperature photothermal therapy[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2021, 60(23): 12971-12979.
- [26] CHEN Y, ZOU H, YAN B, et al. Atomically dispersed Cu nanozyme with intensive ascorbate peroxidase mimic activity capable

- of alleviating ROS-mediated oxidation damage[J]. *Advanced Science*, 2022, 9(5): 2103977.
- [27] MEI L Q, ZHU S, LIU Y P, et al. An overview of the use of nanozymes in antibacterial applications[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2021, 418: 129431.
- [28] FAN K L, XI J Q, FAN L, et al. *In vivo* guiding nitrogen-doped carbon nanozyme for tumor catalytic therapy[J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 1440.
- [29] ZHAO S, DUAN H X, YANG Y L, et al. Fenozyme protects the integrity of the blood-brain barrier against experimental cerebral malaria[J]. *Nano Letters*, 2019, 19(12): 8887-8895.
- [30] REN E, ZHANG C, LI D F, et al. Leveraging metal oxide nanoparticles for bacteria tracing and eradicating[J]. *View*, 2020, 1(3): 20200052.
- [31] ATTAR F, SHAHPAR M G, RASTI B, et al. Nanozymes with intrinsic peroxidase-like activities[J]. *Journal of Molecular Liquids*, 2019, 278: 130-144.
- [32] JIANG D W, NI D L, ROSENKRANS Z T, et al. Nanozyme: new horizons for responsive biomedical applications[J]. *Chemical Society Reviews*, 2019, 48(14): 3683-3704.
- [33] SUN H J, GAO N, DONG K, et al. Graphene quantum dots-band-aids used for wound disinfection[J]. *ACS Nano*, 2014, 8(6): 6202-6210.
- [34] TAINER J A, ROBERTS V A, GETZOFF E D. Protein metal-binding sites[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 1992, 3(4): 378-387.
- [35] CHAKRABARTI P. Geometry of interaction of metal ions with histidine residues in protein structures[J]. *Protein Engineering, Design and Selection*, 1990, 4(1): 57-63.
- [36] BALA T, PRASAD B L V, SASTRY M, et al. Interaction of different metal ions with carboxylic acid group: a quantitative study[J]. *The Journal of Physical Chemistry A*, 2007, 111(28): 6183-6190.
- [37] CHAKRABARTI P. Systematics in the interaction of metal ions with the main-chain carbonyl group in protein structures[J]. *Biochemistry*, 1990, 29(3): 651-658.
- [38] AN F F, ZHANG X H. Strategies for preparing albumin-based nanoparticles for multifunctional bioimaging and drug delivery[J]. *Theranostics*, 2017, 7(15): 3667-3689.
- [39] BAL W, SOKOŁOWSKA M, KUROWSKA E, et al. Binding of transition metal ions to albumin: sites, affinities and rates[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2013, 1830(12): 5444-5455.
- [40] LARSEN M T, KUHLMANN M, HVAM M L, et al. Albumin-based drug delivery: harnessing nature to cure disease[J]. *Molecular and Cellular Therapies*, 2016, 4: 3.
- [41] TAN Y L, HO H K. Navigating albumin-based nanoparticles through various drug delivery routes[J]. *Drug Discovery Today*, 2018, 23(5): 1108-1114.
- [42] HUANG G N, ZANG J K, HE L Z, et al. Bioactive nanoenzyme reverses oxidative damage and endoplasmic reticulum stress in neurons under ischemic stroke[J]. *ACS Nano*, 2022, 16(1): 431-452.
- [43] HAN L, ZHANG H J, CHEN D Y, et al. Protein-directed metal oxide nanoflakes with tandem enzyme-like characteristics: colorimetric glucose sensing based on one-pot enzyme-free cascade catalysis[J]. *Advanced Functional Materials*, 2018, 28(17): 1800018.
- [44] CRIVELLI B, PERTEGHELLA S, BARI E L, et al. Silk nanoparticles: from inert supports to bioactive natural carriers for drug delivery[J]. *Soft Matter*, 2018, 14(4): 546-557.
- [45] YANG R H, FU S Y, LI R D, et al. Facile engineering of silk fibroin capped AuPt bimetallic nanozyme responsive to tumor microenvironmental factors for enhanced nanocatalytic therapy[J]. *Theranostics*, 2021, 11(1): 107-116.
- [46] WILLNER I, BARON R, WILLNER B. Growing metal nanoparticles by enzymes[J]. *Advanced Materials*, 2006, 18(9): 1109-1120.
- [47] ZENG D D, LUO W J, LI J, et al. Gold nanoparticles-based nanoconjugates for enhanced enzyme cascade and glucose sensing[J]. *The Analyst*, 2012, 137(19): 4435-4439.
- [48] LOSADA-GARCIA N, JIMENEZ-ALESANCO A, VELAZQUEZ-CAMPOY A, et al. Enzyme/nanocopper hybrid nanozymes: Modulating enzyme-like activity by the protein structure for biosensing and tumor catalytic therapy[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2021, 13(4): 5111-5124.
- [49] LI X Y, CAO Y F, LUO K, et al. Highly active enzyme-metal nanohybrids synthesized in protein-polymer conjugates[J]. *Nature Catalysis*, 2019, 2(8): 718-725.
- [50] HERRERA ESTRADA L P, CHAMPION J A. Protein nanoparticles for therapeutic protein delivery[J]. *Biomaterials Science*, 2015, 3(6): 787-799.
- [51] SCHOONEN L, VAN HEST J C M. Functionalization of protein-based nanocages for drug delivery applications[J]. *Nanoscale*, 2014, 6(13): 7124-7141.
- [52] LEE E J, LEE N K, KIM I S. Bioengineered protein-based nanocage for drug delivery[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2016, 106: 157-171.
- [53] CHOI S H, KWON I C, HWANG K Y, et al. Small heat shock protein as a multifunctional scaffold: integrated tumor targeting and caspase imaging within a single cage[J]. *Biomacromolecules*, 2011, 12(8): 3099-3106.
- [54] MOON H, LEE J S, MIN J, et al. Developing genetically engineered encapsulin protein cage nanoparticles as a targeted delivery nanoplatfrom[J]. *Biomacromolecules*, 2014, 15(10): 3794-3801.
- [55] MIN J, KIM S, LEE J S, et al. Lumazine synthase protein cage nanoparticles as modular delivery platforms for targeted drug delivery[J]. *RSC Advances*, 2014, 4(89): 48596-48600.

- [56] SAN B H, KIM S, MOH S H, et al. Platinum nanoparticles encapsulated by aminopeptidase: a multifunctional bioinorganic nanohybrid catalyst[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2011, 50(50): 11924-11929.
- [57] DANIELS T R, DELGADO T, RODRIGUEZ J A, et al. The transferrin receptor part I: Biology and targeting with cytotoxic antibodies for the treatment of cancer[J]. *Clinical Immunology*, 2006, 121(2): 144-158.
- [58] MONTEMIGLIO L C, TESTI C, CECI P, et al. Cryo-EM structure of the human ferritin-transferrin receptor 1 complex[J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 1121.
- [59] FAN K L, JIA X H, ZHOU M, et al. Ferritin nanocarrier traverses the blood brain barrier and kills glioma[J]. *ACS Nano*, 2018, 12(5): 4105-4115.
- [60] XING R M, WANG X Y, ZHANG C L, et al. Characterization and cellular uptake of platinum anticancer drugs encapsulated in apoferritin[J]. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2009, 103(7): 1039-1044.
- [61] LIU W, LIN Q, FU Y, et al. Target delivering paclitaxel by ferritin heavy chain nanocages for glioma treatment[J]. *Journal of Controlled Release*, 2020, 323: 191-202.
- [62] ZHAO Y Z, LIANG M M, LI X, et al. Bioengineered magnetoferritin nanopores for single-dose nuclear-magnetic resonance tumor imaging[J]. *ACS Nano*, 2016, 10(4): 4184-4191.
- [63] ZHEN Z P, TANG W, GUO C L, et al. Ferritin nanocages to encapsulate and deliver photosensitizers for efficient photodynamic therapy against cancer[J]. *ACS Nano*, 2013, 7(8): 6988-6996.
- [64] ZHEN Z P, TANG W, CHEN H M, et al. RGD-modified apoferritin nanoparticles for efficient drug delivery to tumors[J]. *ACS Nano*, 2013, 7(6): 4830-4837.
- [65] LI X, QIU L H, ZHU P, et al. Epidermal growth factor-ferritin H-chain protein nanoparticles for tumor active targeting[J]. *Small*, 2012, 8(16): 2505-2514.
- [66] KRAMER R M, LI C, CARTER D C, et al. Engineered protein cages for nanomaterial synthesis[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2004, 126(41): 13282-13286.
- [67] HOSEIN H A, STRONGIN D R, ALLEN M, et al. Iron and cobalt oxide and metallic nanoparticles prepared from ferritin[J]. *Langmuir*, 2004, 20(23): 10283-10287.
- [68] BUTTS C A, SWIFT J, KANG S G, et al. Directing noble metal ion chemistry within a designed ferritin protein[J]. *Biochemistry*, 2008, 47(48): 12729-12739.
- [69] PENG T, PARAMELLE D, SANA B, et al. Designing non-native iron-binding site on a protein cage for biological synthesis of nanoparticles[J]. *Small*, 2014, 10(15): 3131-3138.
- [70] DOUGLAS T, STRABLE E, WILLITS D, et al. Protein engineering of a viral cage for constrained nanomaterials synthesis[J]. *Advanced Materials*, 2002, 14(6): 415-418.
- [71] GIESSEN T W, SILVER P A. Converting a natural protein compartment into a nanofactory for the size-constrained synthesis of antimicrobial silver nanoparticles[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2016, 5(12): 1497-1504.
- [72] ROHL C A, STRAUSS C E M, MISURA K M S, et al. Protein structure prediction using Rosetta[J]. *Methods in Enzymology*, 2004, 383: 66-93.
- [73] KING N P, SHEFFLER W, SAWAYA M R, et al. Computational design of self-assembling protein nanomaterials with atomic level accuracy[J]. *Science*, 2012, 336(6085): 1171-1174.
- [74] DIVINE R, DANG H V, UEDA G, et al. Designed proteins assemble antibodies into modular nanocages[J]. *Science*, 2021, 372(6537): eabd9994.
- [75] GAO R M, TAN H, LI S S, et al. A prototype protein nanocage minimized from carboxysomes with gated oxygen permeability[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2022, 119(5): e2104964119.
- [76] UCHIDA M, KANG S, REICHHARDT C, et al. The ferritin superfamily: supramolecular templates for materials synthesis[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2010, 1800(8): 834-845.
- [77] SUN X R, HONG Y L, GONG Y B, et al. Bioengineered ferritin nanocarriers for cancer therapy[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(13): 7023.
- [78] MOSCA L, FALVO E, CECI P, et al. Use of ferritin-based metal-encapsulated nanocarriers as anticancer agents[J]. *Applied Sciences*, 2017, 7(1): 101.
- [79] ZANG J C, ZHENG B W, ZHANG X Q, et al. Design and site-directed compartmentalization of gold nanoclusters within the intrasubunit interfaces of ferritin nanocage[J]. *Journal of Nanobiotechnology*, 2019, 17(1): 79.
- [80] HUARD D J E, KANE K M, TEZCAN F A. re-engineering protein interfaces yields copper-inducible ferritin cage assembly[J]. *Nature Chemical Biology*, 2013, 9(3): 169-176.
- [81] JENKINS M C, LUTZ S. Encapsulin nanocontainers as versatile scaffolds for the development of artificial metabolons[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2021, 10(4): 857-869.
- [82] MCCONNELL S A, CANNON K A, MORGAN C, et al. Designed protein cages as scaffolds for building multienzyme materials[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2020, 9(2): 381-391.
- [83] JIANG B, FANG L, WU K M, et al. Ferritins as natural and artificial nanozymes for theranostics[J]. *Theranostics*, 2020, 10(2): 687-706.
- [84] HE J Y, FAN K L, YAN X Y. Ferritin drug carrier (FDC) for tumor targeting therapy[J]. *Journal of Controlled Release*, 2019, 311/312: 288-300.
- [85] HUANG X L, CHISHOLM J, ZHUANG J, et al. Protein nanocages that penetrate airway mucus and tumor tissue[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(32): E6595-E6602.

- [86] HUANG X L, ZHUANG J, CHUNG S W, et al. Hypoxia-tropic protein nanocages for modulation of tumor- and chemotherapy-associated hypoxia[J]. *ACS Nano*, 2019, 13(1): 236-247.
- [87] LIU Q Q, TIAN J W, LIU J J, et al. Modular assembly of tumor-penetrating and oligomeric nanozyme based on intrinsically self-assembling protein nanocages[J]. *Advanced Materials*, 2021, 33(39): 2103128.
- [88] ZHANG Y, KHALIQUA A, DU X C, et al. Biomimetic design of mitochondria-targeted hybrid nanozymes as superoxide scavengers[J]. *Advanced Materials*, 2021, 33(9): 2006570.
- [89] SUN Z Y, LIU Q Q, WANG X Y, et al. Bioorthogonal catalytic nanozyme-mediated lysosomal membrane leakage for targeted drug delivery[J]. *Theranostics*, 2022, 12(3): 1132-1147.
- [90] HU X Y, WANG X Y, LIU Q Q, et al. Nanozyme-powered giant unilamellar vesicles for mimicry and modulation of intracellular oxidative stress[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2021, 13(18): 21087-21096.
- [91] CHEN J, PATIL S, SEAL S, et al. Rare earth nanoparticles prevent retinal degeneration induced by intracellular peroxides[J]. *Nature Nanotechnology*, 2006, 1(2): 142-150.
- [92] SHCHERBAKOV A B, ZHOLOBAK N M, SPIVAK N Y, et al. Advances and prospects of using nanocrystalline ceria in prolongation of lifespan and healthy aging[J]. *Russian Journal of Inorganic Chemistry*, 2015, 60(13): 1595-1625.
- [93] ZHAO H Q, ZHANG R F, YAN X Y, et al. Superoxide dismutase nanozymes: an emerging star for anti-oxidation[J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2021, 9(35): 6939-6957.
- [94] GAO F L, WU J, GAO H Q, et al. Hypoxia-tropic nanozymes as oxygen generators for tumor-favoring theranostics[J]. *Biomaterials*, 2020, 230: 119635.
- [95] CHOUGHANI E T, PELL V R, JAMES A M, et al. A unifying mechanism for mitochondrial superoxide production during ischemia-reperfusion injury[J]. *Cell Metabolism*, 2016, 23(2): 254-263.
- [96] FAN K L, CAO C Q, PAN Y X, et al. Magnetoferritin nanoparticles for targeting and visualizing tumour tissues[J]. *Nature Nanotechnology*, 2012, 7(7): 459-464.
- [97] JIANG B, YAN L, ZHANG J L, et al. Biomimetic synthesis of the cobalt nanozyme in SP94-ferritin nanocages for prognostic diagnosis of hepatocellular carcinoma[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2019, 11(10): 9747-9755.
- [98] ORTIZ DE MONTELLANO P R. *Cytochrome P450: structure, mechanism, and biochemistry* [M]. 3rd ed. Springer, 2005.
- [99] SIES H, JONES D P. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2020, 21(7): 363-83.



通讯作者: 黄兴禄(1981—),男,教授,博士生导师。研究方向为合成生物学纳米材料、血管纳米生物学等。
E-mail: huangxinglu@nankai.edu.cn



第一作者: 刘奇奇(1994—),女,博士研究生。研究方向为纳米生物材料的生物学效应及疾病治疗应用。
E-mail: 450137842@qq.com