



单位代码 10635

学 号 012018319000224

西南大學

# 博士学位论文

一类具有多酶活性的纳米酶在肿瘤协同治疗中的  
功能研究

论文作者：傅仕艳

指导教师：康跃军 教授

学科专业：纳米生物医学

研究方向：纳米医药与肿瘤诊疗

提交论文日期：2021年03月10日

论文答辩日期：2021年05月18日

学位授予单位：西南大学

中国·重庆

2021年5月



西南大学博士学位论文

一类具有多酶活性的纳米酶  
在肿瘤协同治疗中的功能研究

专业：纳米生物医学

博士研究生：傅仕艳

指导教师：康跃军 教授

西南大学材料与能源学院

中国·重庆

二零二一年五月



Ph.D Dissertation  
*of*  
*Southwest University*

**Investigation of multi-functional  
nanoenzymes for synergistic cancer therapy**

**Major: Nanobiomedicine**

**Ph. D candidate: Shiyang Fu**

**Supervisor: Prof. Yuejun Kang**

School of Materials and Energy,  
Southwest University

Chongqing·China

May, 2021



## 独创性声明

学位论文题目：一类具有多酶活性的纳米酶在肿瘤协同治疗中的功能研究

本学位论文是作者在导师指导下独立完成的研究工作及取得的研究成果，恪守学术诚信，遵守学术准则。对本研究及学位论文撰写曾做出贡献的老师、朋友、同仁在文中作了明确说明并表示衷心感谢。

学位论文作者签名：傅化艳

导师签名：张华

签名日期：2021年5月28日

签名日期：2021年5月28日

## 学位论文版权使用授权书

本学位论文作者完全了解西南大学有关保留、使用学位论文的规定，有权保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅。本人授权西南大学研究生院可以将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。

本论文公开时间：获学位当年；推迟1年；推迟2年。

学位论文作者签名：傅化艳

导师签名：张华

签名日期：2021年5月28日

签名日期：2021年5月28日



# 基金资助声明

本研究论文是在国家自然科学基金面上项目——基于微针的生物检测与诊疗（编号：32071375），基于微结构的粘性仿生薄膜在软骨和皮肤组织再生医学中的基础研究（编号：31671037），国家自然科学基金青年项目——包埋纳米药物的聚合物微针用于黑色素瘤诊疗一体化的基础研究（编号：51703186），重庆市研究生科研创新项目——人工纳米酶介导的声动力疗法用于治疗乳腺癌（编号：CYB20095）资助下完成，在此表示衷心的感谢！



# 答辩委员会组成

答辩主席：

刘 雳 宇    教授    重庆大学

答辩委员：

刘 玉 菲    教授    重庆大学

刘 英 帅    教授    西南大学

胡 卫 华    教授    西南大学

徐 立 群    教授    西南大学



# 目 录

摘 要.....	I
ABSTRACT.....	V
缩写符号对照表.....	IX
第 1 章 绪论.....	1
1.1 研究意义.....	1
1.2.1 纳米酶概述.....	2
1.2.2 纳米酶的合成方法.....	3
1.2.3 纳米酶的分类及其催化原理.....	9
1.2.4 纳米酶在生物医学方面的应用.....	17
1.2.5 存在的主要问题.....	29
1.3 研究目标、研究内容及拟解决的关键问题.....	30
1.3.1 研究目标.....	30
1.3.2 研究内容.....	31
1.3.3 拟解决的关键问题.....	31
第 2 章 CoO@AuPt 自解聚纳米酶簇用于肿瘤微环境多级响应的化学动力治疗...33	
2.1 引言.....	33
2.2 实验部分.....	35
2.2.1 实验仪器.....	35
2.2.2 实验药品.....	36
2.2.3 CoO@AuPt 纳米酶的制备.....	36
2.2.4 CoO@AuPt 纳米酶的特征.....	37
2.2.5 CoO@AuPt 氧化酶和过氧化物酶活性测试.....	37
2.2.6 CoO@AuPt 过氧化氢酶活性测试.....	37
2.2.7 CoO@AuPt 消耗葡萄糖实验.....	37
2.2.8 CoO@AuPt 消耗谷胱甘肽实验.....	38
2.2.9 CoO@AuPt 产生活性氧能力测试.....	38
2.2.10 CoO@AuPt 纳米酶体外解聚模拟.....	38
2.2.11 CoO@AuPt 纳米酶在癌细胞内产生活性氧能力检测.....	39
2.2.12 CoO@AuPt 纳米酶在细胞内暗场成像和生物电镜.....	39
2.2.13 CoO@AuPt 纳米酶的生物相容性.....	39
2.2.14 CoO@AuPt 纳米酶对癌细胞的毒性检测.....	40
2.2.15 CoO@AuPt 纳米酶在小鼠体内毒性评价.....	40
2.2.16 建立 4T1 皮下移植瘤模型.....	40
2.2.17 生物分布和体内药物代谢动力学.....	40
2.2.18 CoO@AuPt 纳米酶的光声/CT 成像效果.....	40
2.2.19 CoO@AuPt 纳米酶的体内抗肿瘤效果.....	41

2.2.20 统计学分析.....	41
2.3 结果与讨论.....	41
2.3.1 CoO@AuPt 纳米酶结构表征.....	41
2.3.2 CoO@AuPt 的类酶活性评估.....	44
2.3.3 CoO@AuPt 纳米酶的细胞吞噬和生物分布.....	49
2.3.4 CoO@AuPt 纳米酶响应型解聚消除.....	51
2.3.5 CoO@AuPt 纳米酶的生物相容性.....	53
2.3.6 CoO@AuPt 纳米酶的体外治疗.....	56
2.3.7 CoO@AuPt 的药代动力学和体内成像.....	61
2.3.8 CoO@AuPt 的体内抗肿瘤效果.....	62
2.4 本章小结.....	68
第 3 章 CoFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> 自增强纳米酶用于肿瘤微环境响应的 CDT/SDT/免疫疗法协同治疗.....	69
3.1 引言.....	69
3.2 实验部分.....	70
3.2.1 仪器.....	70
3.2.2 试剂.....	70
3.2.3 CoFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> 纳米酶的制备.....	70
3.2.4 CoFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> 的类过氧化氢酶和类过氧化物酶活性评估.....	71
3.2.5 CoFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> 纳米酶产生活性氧评估.....	72
3.2.6 CoFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> 纳米酶的生物相容性.....	72
3.2.7 CoFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> 纳米酶相关细胞染色实验.....	72
3.2.8 CoFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> 纳米酶处理细胞相关 WB 实验.....	73
3.2.9 CoFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> 纳米酶介导的细胞免疫原性死亡.....	73
3.2.10 建立 4T1 荷瘤小鼠模型.....	74
3.2.11 CoFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> 纳米酶的药代动力学.....	74
3.2.12 CoFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> 纳米酶的 MRI 成像.....	74
3.2.13 CoFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> 纳米酶的体内抗肿瘤效率.....	74
3.2.14 CoFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> 纳米酶结合免疫治疗抗肿瘤和抗转移效率.....	74
3.3 结果与讨论.....	75
3.3.1 CoFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> 纳米酶的特征.....	75
3.3.2 CoFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> 的类酶活性的评价.....	77
3.3.3 CoFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> 纳米酶介导的活性氧产生.....	80
3.3.4 CoFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> 的生物相容性.....	82
3.3.5 CoFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> 纳米酶体外细胞毒性.....	84
3.3.6 CoFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> 纳米酶诱导的细胞免疫原性死亡.....	87
3.3.7 CoFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> 纳米酶体外抗转移评估.....	88
3.3.8 CoFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> 纳米酶的药代动力学.....	89

3.3.9 CoFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> 纳米酶体内抗肿瘤效果.....	90
3.3.10 CoFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> 纳米酶结合免疫治疗抗肿瘤效果.....	92
3.4 本章小结.....	97
第 4 章 全文总结与展望.....	99
4.1 全文总结.....	99
4.2 论文创新点.....	100
4.3 展 望.....	101
4.3.1 生物可消除纳米酶的开发.....	101
4.3.2 提高纳米酶的主动靶向性.....	101
4.3.3 纳米酶在免疫治疗中的应用.....	102
参考文献.....	103
博士期间科研成果.....	115
致 谢.....	117



# 一类具有多酶活性的纳米酶在肿瘤协同治疗中的功能研究

纳米生物医学专业 博士研究生:傅仕艳

指导教师:康跃军 教授

## 摘要

与天然酶相比,纳米酶由于具有较高的催化活性和物理化学稳定性,已广泛应用于催化、医学、生物等领域。随着纳米技术的快速发展和研究的不断深入,纳米酶固有的物理化学特性使其不仅成为酶替代品,也成为一类能响应多种外部刺激的多功能纳米平台。近期,广泛的研究工作集中在各种纳米酶的系统设计,通过定制的方式让纳米酶与一种或多种底物发生反应。例如,在肿瘤微环境中,纳米酶可以响应其 pH 值、过氧化氢和谷胱甘肽的浓度,以及氧气水平等条件。此外,纳米酶还可以与多种环境因素,包括磁场、光、超声和微波等外部刺激相结合,实现多种方式的协同治疗。总的来说,调节这些环境因素可以最大限度地提高纳米酶在生物医学环境中对多种疾病的诊断和治疗应用效果。因此,通过整合纳米酶系统的催化特性和固有的纳米材料特性,刺激响应型纳米酶有望为诊断、治疗和医学成像开辟新的视野。

一些纳米酶介导的化学动力疗法(CDT)通过芬顿或类芬顿反应可产生具有细胞毒性的活性氧,例如 $\cdot\text{OH}$ 来杀伤肿瘤,而无需依赖外部刺激或氧气水平,因而受到众多研究者的推崇。常见的化学动力疗法制剂,例如铁基纳米材料、过渡金属离子( $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ 和  $\text{Co}^{2+}$ )和有机金属框架(MOF)等,往往需要在强酸性条件下( $\text{pH} = 3-5$ )发挥作用,且生成的 $\cdot\text{OH}$ 易被肿瘤微环境中高水平的谷胱甘肽(GSH)清除。另外,该化学动力治疗的效率还会受到催化底物  $\text{H}_2\text{O}_2$  不足的限制。因此,设计高效稳定的新型纳米酶,并通过“驯化”肿瘤微环境,来提高纳米酶的疗效已成为本领域的研究热点和难点。

另一方面,独特的肿瘤微环境促进了癌症的增殖和转移,造成很难通过单一疗法达到治愈癌症的效果。而纳米酶不仅具有酶催化活性,其优异的理化性质使其还可以结合一些外部刺激实现协同治疗。众多研究工作已经证明,纳米材料介导的光、声和化学疗法等治疗方式可诱导肿瘤细胞免疫原性死亡,并释放肿瘤相关抗原递呈至树突状细胞,从而激活免疫系统实现协同治疗。受这些发现的启发,

目前基于“纳米疫苗”的研究也成为了本领域一项研究热点。基于当前纳米酶材料在癌症诊疗中的难点问题，我们设计并制备了对肿瘤微环境可产生特异性响应的一类多功能纳米酶体系，不仅提高了化学动力治疗效率，并且在超声刺激下实现了多种方式协同治疗肿瘤，在小动物肿瘤模型中取得较好的诊疗效果。

具体的研究工作包括如下两方面：

### 1. CoO@AuPt 自解聚纳米酶簇用于肿瘤微环境多级响应的化学动力治疗

以钴纳米球为模板和还原剂，创新性地合成了一种具有多酶活性的CoO@AuPt 纳米酶簇，该材料在正常生理条件下展现出了良好的生物相容性。在增强渗透滞留（EPR）效应的作用下，该纳米酶簇可在肿瘤区域快速高效富集，CoO 框架在弱酸性和高表达  $H_2O_2$  的肿瘤微环境中快速降解为  $Co^{2+}$ ，并使 AuPt 双金属纳米酶簇解聚，解聚为尺寸小于 10 nm 的具有更高催化活性的 AuPt 纳米酶，实现对肿瘤的特异性杀伤。该策略可有效降低传统超小 Au、Pt 纳米酶在体内长循环过程中被快速清除的风险，此外解聚后的纳米酶在实体瘤中具有更高的穿透深度，且更容易被机体代谢出体外。AuPt 纳米酶具有过氧化物酶活性和氧化酶活性，在催化  $H_2O_2$  生成 $\cdot OH$ 的同时，可有效地将还原性 GSH 氧化为 GSSG，极大地保护生成的活性氧被氧化应激消耗。另一方面，AuPt 纳米酶还可模拟过氧化氢酶催化  $H_2O_2$  分解产生氧气。此外，AuPt 纳米酶还可以氧化癌细胞内的葡萄糖，获得的大量  $H_2O_2$  作为催化底物，从而进一步促进了  $O_2$  和 $\cdot OH$ 的生成。这种循环型葡萄糖消耗和  $H_2O_2$  再生机制，不仅实现了肿瘤的饥饿疗法，更显著提高了 CDT 的治疗效果。综上所述，该空心纳米酶簇可有效响应肿瘤微环境，其具有的多酶催化活性可有效增强 CDT，该材料的设计方法对未来发展新型纳米酶并应用于生物医学领域具有重要指导意义。

### 2. 铁酸钴自增强纳米酶用于肿瘤微环境响应的 CDT/SDT/免疫疗法协同治疗

通过溶剂热法成功设计并合成了具有花状结构的人造多功能纳米酶 $CoFe_2O_4$ ，并在其表面修饰PEG增加其生物相容性得到 $CoFe_2O_4$ -PEG（CFP）。首先，该铁酸钴纳米酶不仅具有类过氧化物酶的活性，能响应催化肿瘤微环境内过表达的 $H_2O_2$ ，产生羟基自由基实现化学动力疗法，另一方面，该 $CoFe_2O_4$ 还具有较小的带隙能，使其成为无机声敏剂的优异候选材料，并且其具有类过氧化氢酶活性的特点可以催化肿瘤微环境的 $H_2O_2$ 产生氧气，增强了声动力效率，从而克服传统无机声敏剂的氧气水平依赖缺陷，实现在肿瘤微环境中自增强声动力疗法和化学动力疗法协同治疗。在利用此纳米酶联合超声刺激治疗高度自发转移性4T1乳腺癌的研究中，我们发现该纳米酶介导的多种治疗方式还可以调节转移相关蛋白抑制肿瘤转移，并引起细胞免疫原性死亡，并将其与PD-L1抗体联合使用，实现了与免疫治疗相结合的多种治疗方式协同作用，有效地抑制了小动物模型中的肿瘤生长和转移。

综上所述，本论文研究首先针对传统化学动力疗法低效率的关键问题设计了一类具备多酶活性的  $\text{CoO}@AuPt$  多功能纳米酶，可对肿瘤微环境的多种底物产生特异性的响应，显著地提高了化学动力疗法的治疗效率。在本研究后期工作中，为了深入挖掘纳米酶的物理化学特性优势，我们进一步设计了基于铁酸钴的纳米酶，将其能够灵敏响应肿瘤微环境和外部声学刺激的优势有机结合，并与免疫抑制剂联合使用抑制肿瘤转移，实现了纳米酶介导下的化学动力、声动力和免疫学协同治疗。本论文研究为系统性优化多功能纳米酶的设计构建、以及多模态肿瘤诊疗一体化的纳米药物研发提供了新的思路和实验证据。

**关键词：**纳米酶，活性氧，肿瘤微环境，化学动力疗法，声动力疗法



# Investigation of multi-functional nanoenzymes for synergistic cancer therapy

Major: Nanobiomedicine;

Ph. D candidate: Shiyan Fu

Supervisor: Yuejun Kang

## ABSTRACT

Compared with natural enzymes, artificial nanozymes have been widely used in catalysis, medicine, biology and other fields due to their higher catalytic activity and physical or chemical stability. With the rapid development of nanotechnology, the excellent physical and chemical properties of nanozymes make them not only substitutes of natural enzymes, but also multifunctional nanoplatforms responsive to many environmental stimuli. Recently, extensive efforts has been focused on designing nanozymes that can react with one or more tumor microenvironmental cues. For example, nanozymes can respond to variations in acidity, hydrogen peroxide and glutathione concentrations, and oxygen levels. In addition, nanozymes can be also excited with different external stimuli, such as magnetic field, light, ultrasound and microwaves for synergistic treatments. Taken together, tuning these factors properly may significantly increase the effectiveness of nanozymes for cancer diagnosis and therapy. Therefore, if the catalytic capability of nanoenzymes is introduced to a stimulus-responsive nanomaterial, it may open up new horizons for cancer diagnosis, therapy, and imaging.

Nanozyme-mediated chemodynamic therapy (CDT) may produce cytotoxic  $\cdot\text{OH}$  to kill tumors through Fenton or Fenton-like reactions, independent of external stimulation or oxygen levels. Many CDT agents, such as the iron-based nanomaterials, transition metal ions ( $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Co}^{2+}$ ) and organic metal frameworks (MOF), work only in strong acidic conditions ( $\text{pH} = 3-5$ ), and the generation of  $\cdot\text{OH}$  is vulnerable because of high levels of glutathione (GSH) in tumor microenvironment. In addition, the efficiency of the CDT therapy is limited due to the lack of catalytic substrate  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Therefore, efficient and stable nanozymes to domesticate the otherwise unfriendly tumor

microenvironment are highly desirable to improve the therapeutic efficacy.

Tumor microenvironment naturally promotes the proliferation and metastasis of tumor, making it difficult to cure cancer with monotherapeutic modality. Interestingly, recent studies have shown that nanomaterial-mediated light, sound and chemotherapy may induce immunogenic cell death and release tumor-associated antigens to dendritic cells. Many researchers are developing various "nano vaccines" hoping to realize artificial nanomaterial-mediated immunotherapy. Inspired by these findings, we designed and prepared a class of multifunctional nanozymes that can specifically respond to tumor microenvironment and improve the efficiency of cancer treatment by combining multiple therapeutic modalities.

This thesis work includes two major aspects as described in the following:

### **1. Application of a self-depolymerizing CoO@AuPt nanozyme clusters for enhanced CDT**

We designed and synthesized a novel hollow CoO@AuPt nanozyme using Co as sacrificial templates. The resultant CoO@AuPt exhibited high biocompatibility and stability in physiological conditions. After accumulation in the tumor site due to the enhanced permeability and retention (EPR) effect, CoO template can be gradually degraded into  $\text{Co}^{2+}$  in the TME with high acidity and over expressed  $\text{H}_2\text{O}_2$ , inducing the release of Au/Pt nanosatellites. Decent stability and TME-clues responsive property of CoO@AuPt not only protected the tiny Au/Pt nanosatellites from clearance during long-term circulation, but also increased their penetration depth in solid tumors after acidity-induced disintegration. while the released Au/Pt nanosatellites facilitated versatile enzymatic activities. Firstly, Au/Pt nanosatellites worked as a GSH peroxidase by converting GSH into GSH disulfide (GSSG), which tremendously mitigated the issue of GSH-mediated ROS consumption for CDT. Secondly, a higher amount of intracellular  $\text{H}_2\text{O}_2$  was decomposed into  $\text{O}_2$  and  $\cdot\text{OH}$  through the catalase-like and peroxidase-like activities, respectively. Thirdly, the strong GOx-mimic activity of Au/Pt nanosatellites caused a dramatic decrease of intratumoral glucose level in the presence of  $\text{O}_2$  and produced a large amount of  $\text{H}_2\text{O}_2$ , which in turn enhanced the generation of  $\text{O}_2$  and  $\cdot\text{OH}$ . Such cycle-like glucose-depletion and  $\text{H}_2\text{O}_2$ -repletion mechanism not only boosted tumor starvation but also dramatically enhanced the CDT outcome by enzymatic self-supply of  $\text{H}_2\text{O}_2$ . These findings suggested that the hollow CoO@AuPt had multiple enzyme-mimic functions to ameliorate TME for highly efficacious CDT, which may also inspire more strategic designs of inorganic nanozyme for biomedical

applications.

## **2. Applications of a self-enhancing CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> nanoenzyme for combination SDT/CDT/Immunotherapy**

In this work, flower-like CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-PEG (CFP) was obtained by modifying PEG on the surface of CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, which was successfully designed and synthesized by solvent thermal method. After intravenous injection, the CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> nanozyme reach to the tumor area through the EPR effect. Firstly, the cobalt ferrite nanozyme has peroxidase-like activity, which can response to the expressed hydrogen peroxide in tumor microenvironment to produce hydroxyl radicals for CDT, on the other hand, CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> nanozyme also has catalase-like activity, which can be used to decomposed H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> producing oxygen. More importantly, the CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> can also be an ideal candidate for inorganic sonosensitizers due to its small band gap energy. In addition, its catalase-like activity can catalyze hydrogen peroxide in the tumor microenvironment to produce oxygen to realize self-enhancement of its sonodynamic therapy (SDT) efficiency, thus overcoming the problem of oxygen level limited the efficiency of traditional inorganic sonosensitizers. The synergistic therapy of self-enhanced SDT and CDT is realized by CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> nanozyme with US irritation. We also found that this nanozyme-mediated therapy modulates metastase-associated proteins to inhibit tumor metastasis and induce cell immunogenic death. Therefore, the combination of PD-L1 antibody with CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> nanozyme with US irritation can effectively inhibit tumor growth and metastasis.

In summary, we firstly designed an multifunctional nanozyme CoO@AuPt to address the low efficiency of many traditional CDT therapeutic agents. The enzyme-like activity of CoO@AuPt can specifically respond to a variety of tumor microenvironmental cues, which can remarkably improve the efficiency of CDT treatment. We further designed an cobalt ferrite nanozyme, which is not only very sensitive to tumor microenvironment but also can take advantage of external acoustic stimulus and immune inhibitors to inhibit tumor growth and metastasis. Based on this novel nanozyme, we demonstrated an evident synergistic anti-tumor effect in a mouse model by combining CDT/SDT/immunotherapy. This thesis work presented an new strategy and solid experimental evidence for the design of a multifunctional nanozyme for tumor diagnosis and treatment.

**Keywords:** Nanoenzyme, Reactive oxygen species, Tumor microenvironment, Chemodynamic therapy, Sonodynamic therapy



## 缩写符号对照表

英文名称	中文名称	缩写符号
2, 2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)	2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸	ABTS
Chemodynamic therapy	化学动力疗法	CDT
Computed tomography	计算机断层扫描	CT
Electron paramagnetic resonance	电子自旋共振	EPR
Fourier transform infrared spectroscopy	傅里叶变换红外光谱	FTIR
Inductively coupled plasma emission spectrometer	电感耦合等离子发射光谱仪	ICP
3-(4,5-Dimethyl-2-Thiazolyl)-2,5-Diphenyl Tetrazolium Bromide	噻唑蓝	MTT
Magnetic resonance imaging	磁共振成像	MRI
Metal organic frameworks	有机金属框架	MOF
o-Phenylenediamine	邻苯二胺	OPD
Programmed cell death 1 ligand 1	细胞程序性死亡-配体 1	PD-L1
Reactive oxygen species	活性氧	ROS
Sonodynamic therapy	声动力疗法	SDT
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine	3,3',5,5'-四甲基联苯胺	TMB
Tumor microenvironment	肿瘤微环境	TME
X-ray photoelectron spectroscopy	X 射线光电子能谱	XPS
X-rays of diffraction	X 射线衍射	XRD
Ultrasound irradiation	超声刺激	US
CoFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> -PEG	修饰聚乙二醇的铁酸钴	CFP



## 第1章 绪论

### 1.1 研究意义

全世界每年约有 960 万人死于癌症。癌症是目前人类健康亟待攻克的难题。目前癌症的常用临床治疗方式主要有三种，第一种是通过手术将癌症病灶切除，其次是化疗和精准放疗，第三种是靶向治疗。这些治疗方式在一定程度上都能够达到治愈癌症的目的，但这些治疗方式都存在对正常组织伤害较大、病灶隐蔽、易复发等问题<sup>[1]</sup>。众多研究工作者致力于探索更多的治疗方式，近年来各种尺寸小于几百纳米的有机和无机纳米材料由于其被动靶向肿瘤部位的独特性质，成为可用于癌症治疗和诊断有前途的工具。由于这些纳米药物可以通过肿瘤血管泄漏而积聚在实体瘤部位，从而选择性地递送治疗药物，因此多种纳米药物平台例如聚合物胶束、脂质体、树状聚合物、半导体等广泛用于靶向递送抗癌药物<sup>[2-4]</sup>。这类纳米材料作为载体递送药物的方式有许多缺点，如载药量低、易中途泄漏损伤正常组织等。越来越多的学者开始关注纳米材料自身物理化学性质对癌症治疗的潜在应用。步文博研究小组在几年前提出了化学动力疗法<sup>[5]</sup>，这是一种新兴的治疗策略，其定义为使用 Fenton 反应或类 Fenton 反应产生的原位治疗。在肿瘤部位产生羟基自由基 ( $\cdot\text{OH}$ )。例如铁基纳米材料会在肿瘤微环境的弱酸性条件下溶解成亚铁离子，催化在肿瘤微环境中过表达的  $\text{H}_2\text{O}_2$  引发 Fenton 反应从而产生  $\cdot\text{OH}$  引发细胞凋亡并抑制肿瘤生长。常见的化学动力疗法制剂，例如铁基纳米材料、过渡金属离子 ( $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  和  $\text{Co}^{2+}$ ) 和金属有机框架等需要在强酸性条件下 ( $\text{pH} = 3-5$ ) 发挥作用，且生成的  $\cdot\text{OH}$  易被肿瘤微环境中高水平的谷胱甘肽清除。另外 CDT 的效率还会受到催化底物  $\text{H}_2\text{O}_2$  不足的限制。鉴于肿瘤微环境的弱酸性 ( $\text{pH} \approx 6.8$ )<sup>[6]</sup>、过表达的  $\text{H}_2\text{O}_2$ <sup>[7]</sup>、缺氧<sup>[8]</sup>、抗氧化应激<sup>[9]</sup>等特点。设计高效稳定的新型纳米材料，并通过“驯化”肿瘤微环境，来提高 CDT 疗效已成为本领域的研究热点和难点。近几十年来人们开发了大量的 TME 响应型纳米材料，与肿瘤微环境的特异性相结合，原位响应抑制肿瘤生长。纳米酶就是其中一员。

纳米酶通过有效地模拟天然酶的催化位点或在反应中隐藏多价元素，成功地替代了传统酶的催化作用。最近广泛的研究集中在设计各种纳米酶体系，通过定制的方式让纳米酶对一种或多种底物响应<sup>[10]</sup>。此外，纳米酶可以通过不同的外加刺激来提高催化效果，包括磁场、光、超声和热等。总的来说，这些因素可以相互结合，以最大限度地提高生物学环境下纳米酶对不同疾病的诊断和治疗效果。一些纳米酶还具有 CT、MRI 和光声成像等效果。并且，越来越多的研究证明纳米酶通过原位地催化肿瘤微环境底物  $\text{H}_2\text{O}_2$  产生的活性氧 (ROS) 等物质杀死癌细胞

后，会引发癌细胞的免疫原性死亡，由此与免疫检查点抑制剂相结合，实现多种治疗方式协同作用，对肿瘤的治疗以及抗转移显示出良好效果。因此，通过整合纳米酶的催化特性和其固有的物理化学特性，我们预计刺激响应型纳米酶将成为集诊断、治疗和成像为一体的智能纳米药物。

## 1.2 研究现状

### 1.2.1 纳米酶概述

纳米酶的发现是基于材料在纳米尺度（1~100nm）展现出与其宏观尺度不同的新特性。2004年，Scrimin 和他的同事<sup>[11]</sup>最先提出了“纳米酶”，应用官能团功能化的金纳米粒子作为催化剂，模拟核糖核酸酶剪切磷酸二酯键的催化活性。但其催化活性主要来自于其表面修饰的官能团，而不是其本身的特性。起初，纳米材料被认为是化学惰性的物质。2007年阎锡蕴和她的团队在研究如何用纳米材料进行抗原的检测时发现了一个“诡异”的现象：四氧化三铁纳米颗粒，在人体组织中可以吸附带电荷的抗原分子，并且可以使抗原变色。而使抗原变色原本需要加入辣根过氧化物酶才会发生，经过多次实验发现四氧化三铁纳米颗粒与辣根过氧化物酶具有类似的性质，如图 1-1。随即首次报道了四氧化三铁磁性纳米粒子的本征过氧化物酶活性<sup>[12]</sup>。在随后的十多年内，大量关于纳米酶的研究不断涌现。如贵金属纳米材料、半导体纳米材料、碳纳米材料和金属有机框架材料等。

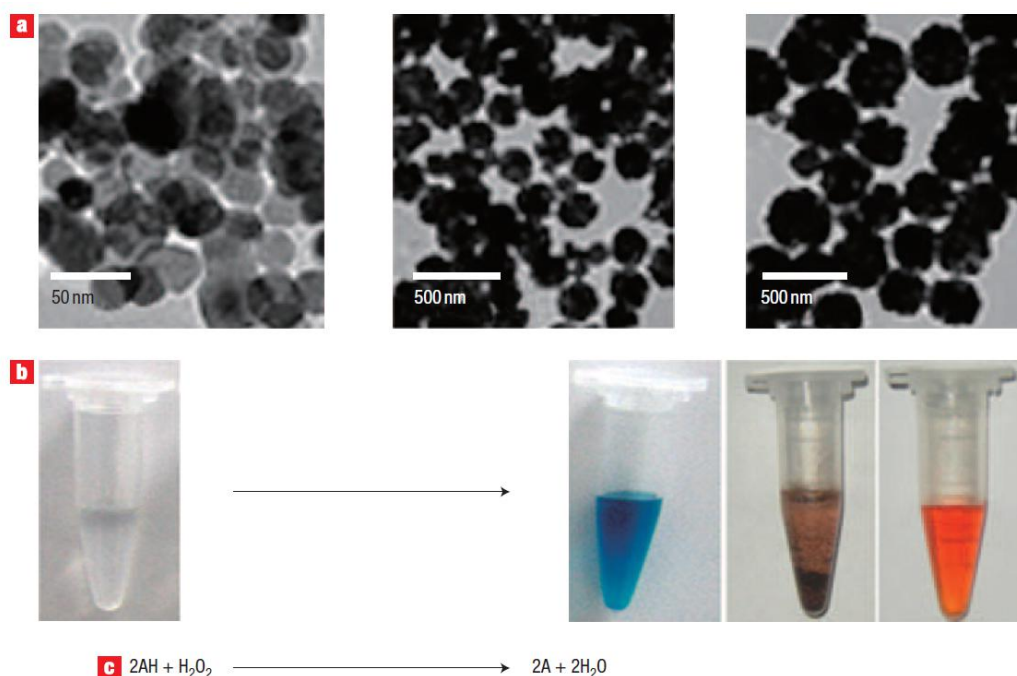


图 1-1 四氧化三铁纳米颗粒表现出过氧化物酶性质<sup>[12]</sup>。

Figure 1-1 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> MNPs show peroxidase-like activity<sup>[12]</sup>.

近年来，这些纳米酶独特理化特性也成为研究者关注的热点，例如可调节带隙宽度，独特的吸收光谱和局部表面等离子体共振等。研究者将纳米酶的理化性质与纳米酶类酶活性相结合，制备一系列表现出优越的纳米酶，并增强纳米酶的应用功能。例如，通过利用纳米材料的光热性质来提升纳米酶的催化活性，可以形成光增强的催化体系。此外，利用光或声等刺激激活纳米材料的催化特性也可以提高催化活性。因此，纳米酶本身的理化性能的结合将扩大纳米酶的“内涵”，为我们改善纳米酶催化特性及扩大生物应用提供新思路。

### 1.2.2 纳米酶的合成方法

纳米酶的制备方法有很多种，主要来自于一些金属、金属氧化物、非金属氧化物以及有机金属框架纳米材料的制备方法，及上述纳米材料复合体系的制备。在此对几种类型常见的纳米酶的制备方法作简要举例。其它众多不作赘述。

#### (1) 贵金属纳米酶的制备方法

贵金属纳米酶主要指过渡元素中的贵金属元素金、银、铂、钯和铱等金属纳米材料或他们的合金纳米材料，贵金属纳米酶中最常用的数金纳米颗粒，金纳米颗粒被报道具有类葡萄糖氧化酶性质后，在生物检测及疾病诊断方面应用广泛，其制备方法常用的有柠檬酸盐还原法和Brust-Schiffrin法。

#### 柠檬酸盐还原法：

金纳米颗粒的制备比较经典的方法是柠檬酸盐还原方法。即Turkevich-Frens法，该方法是应用最广的制备尺寸均一的金纳米颗粒的方法，后面发展出的很多方法也是在此基础上的延续。是在接近沸点（100 °C）的水溶液中用柠檬酸钠还原金前体。这种合成产生稳定的金纳米颗粒水溶液（金胶体或金溶胶），因为柠檬酸根离子既作为还原剂又作为保护剂。这种制备方法在金纳米颗粒应用于生物方面应用较广。因为该方法制备的金纳米颗粒更利于表面修饰官能团。后来Nikolina<sup>[13]</sup>也报道了用 $\gamma$ 射线辐射氯金酸/柠檬酸盐溶液前体，通过改变金与柠檬酸盐的摩尔比可以得到不同尺寸和不同特征吸收的金纳米颗粒，如图1-2。

Brust-Schiffrin法利于在室温下合成粒径较小（2-2.5 nm）<sup>[14]</sup>，同时具有高度稳定性的功能化金纳米粒子。该方法极大地影响了后续金纳米颗粒制备方法的发展。其它很多贵金属纳米材料也是参考该方法合成的。图1-3显示了合成过程的示意图。在烷硫醇和二烷基二硫化物的硫醇配体作用下，加入硼氢化钠还原三价的金粒子，再生长成金纳米粒子。

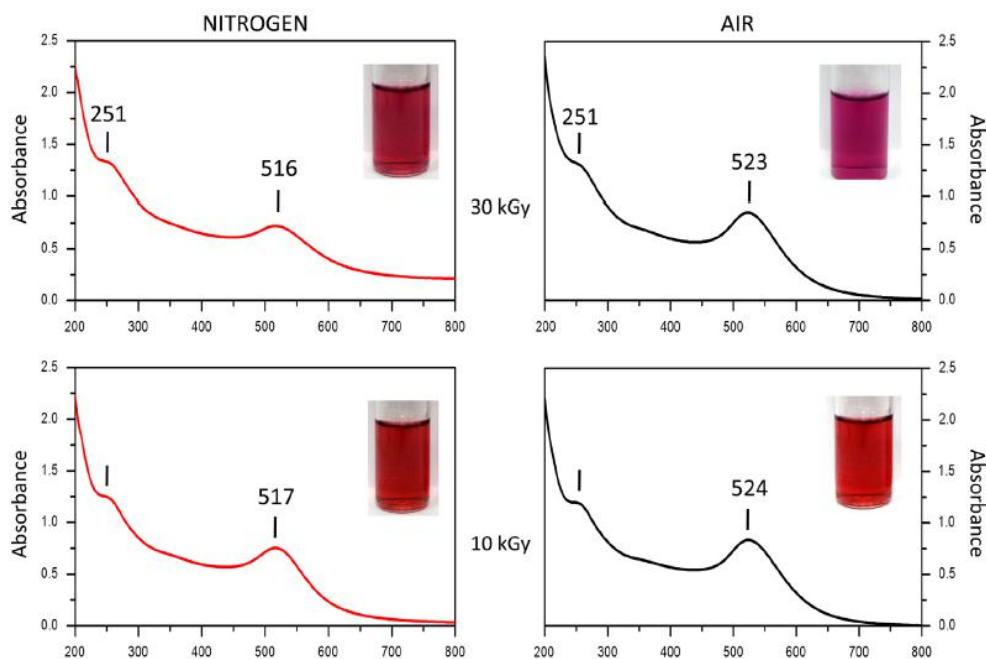


图 1-2 通过 $\gamma$ 射线辐照不同比例 Au(III)/柠檬酸盐溶液在空气或氩气氛围里制备不同的金纳米颗粒紫外吸收光谱<sup>[13]</sup>。

Figure 1-2 UV-vis spectra of gold nanoparticle (GNP) sample synthesised by  $\gamma$ -irradiation of Au(III)/citrate solutions in the presence of dissolved oxygen (air) or Nitrogen<sup>[13]</sup>.

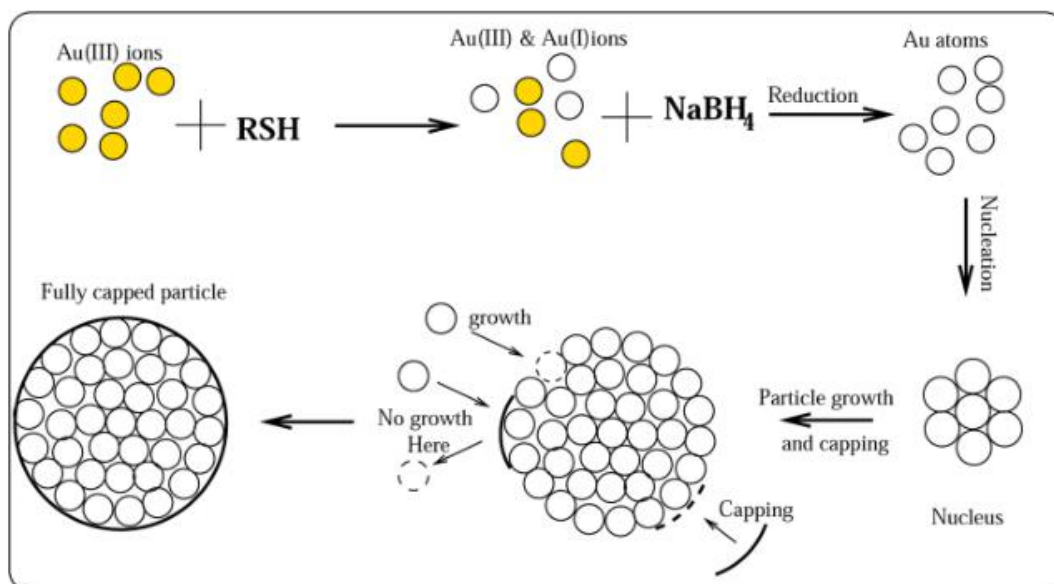


图 1-3 Brust-Schiffrin 法制备金纳米颗粒机理说明图<sup>[14]</sup>。

Figure 1-3 Schematic representation of Brust-Schiffrin method for prepared gold nanoparticles<sup>[14]</sup>.

一种金属纳米材料可能会有多种酶活性，例如铂纳米粒子具有四种类酶活性，包括超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、氧化酶和过氧化物酶。其中一些活性会相互干扰。例如，作为抗氧化酶模拟物，它们的超氧化物歧化酶和过氧化氢酶活性对

清除活性氧 (ROS) 非常有帮助。然而它们的氧化酶或过氧化物酶活性可能同时氧化一些天然抗氧化剂, 从而影响最终的抗氧化功效。因此, 微调不同的酶活性对于实现其功能的优化非常重要。一些研究工作者通过将其做成多种金属合金, 通过改变电子结构来微调某种类酶活性。简要举例一种多金属合金的制备方法<sup>[15]</sup>, 如图 1-4, 通过种子介导法制备金纳米棒。首先, 7.5 mL CTAB (0.1M) 溶液与 100  $\mu$ L 氯金酸溶液 24 (mM) 混合后稀释至 9.4 mL, 然后加入 0.6 mL 冰浴制备的硼氢化钠溶液 0.01 (M), 磁力搅拌 3 min 得到 CTAB 封端的金种, 然后配置生长液: 100 mL CTAB (0.1 M)、1.96 mL HAuCl<sub>4</sub> (25 mM)、1 mL AgNO<sub>3</sub> (0.01 mM)、2 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0.1 M) 和 0.8 mL 抗坏血酸 (0.1 M)。加入 240  $\mu$ L 上述金种, 反应 12 h 后得到金纳米棒。然后加入不同比例的 HAuCl<sub>4</sub> 和 AgNO<sub>3</sub> 溶液, 并加入抗坏血酸还原。30 °C 水浴匀速搅拌。得到 Au@PtAg 纳米棒。

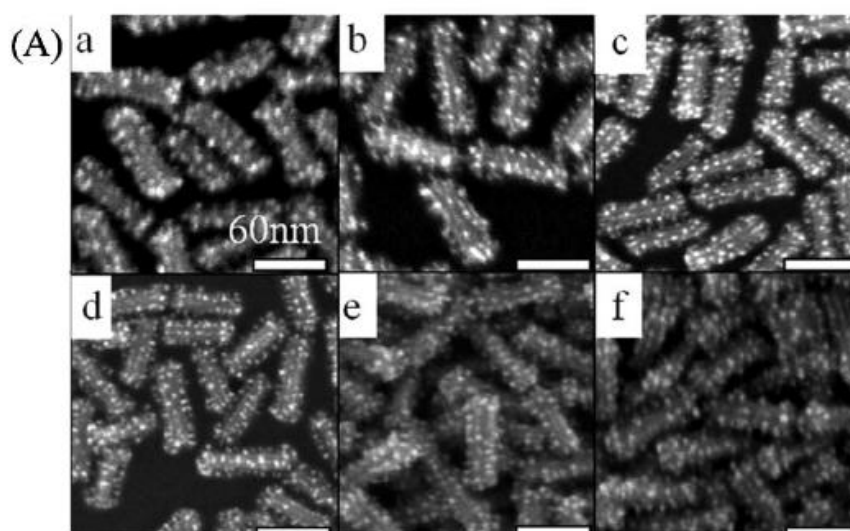
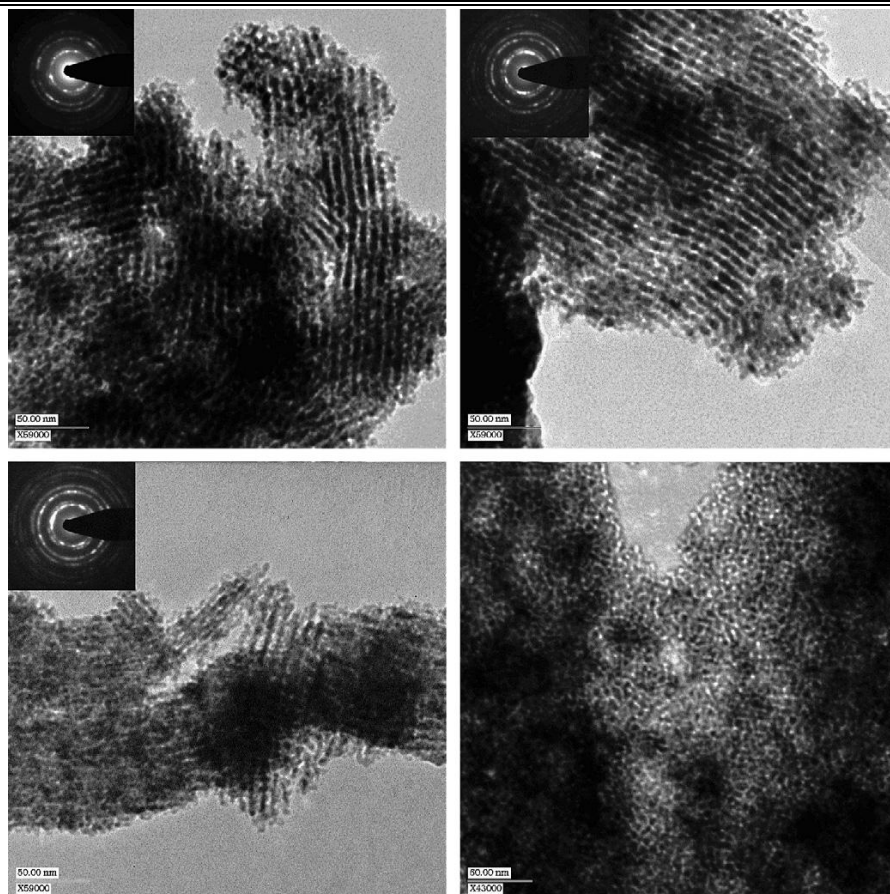


图 1-4 不同 Ag/Pt 比例的 Au@PtAg 合金的扫描电镜照片<sup>[15]</sup>。

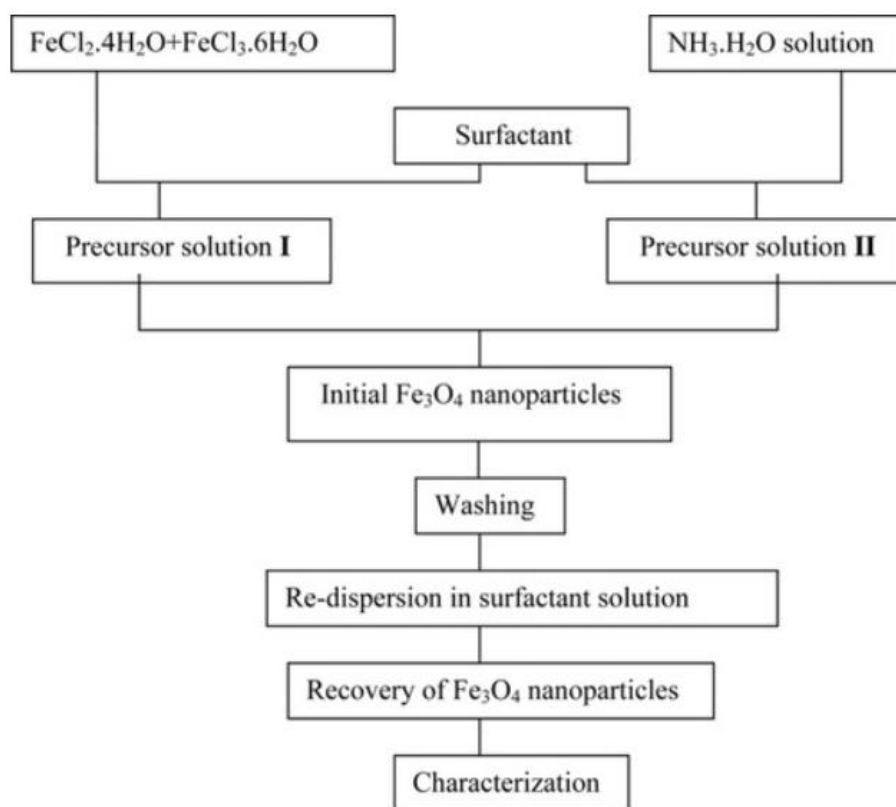
Figure 1-4 Typical SEM images of Au@PtAg NRs with Ag/Pt ratios in the alloy<sup>[15]</sup>.

## (2) 金属氧化物纳米酶制备方法举例

二氧化铈和四氧化三铁是常用的金属氧化物纳米酶。氧化铈纳米粒子以混合价态 ( $Ce^{3+}$ ,  $Ce^{4+}$ ) 存在, 具有许多独特的性质, 已被证明在生物医学和催化应用中具有很高的实用性。据报道氧化铈纳米粒子具有多酶活性, 如超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、氧化酶和磷酸酶活性。Jan<sup>[16]</sup>等用  $Ce(NO_3)_3$  浸渍介孔 CMK-3 碳, 制备介孔  $CeO_2$ 。具体方法如下: 将  $Ce(NO_3)_3$  的饱和水溶液 (2 mL) 加入 1 g CMK-3 中, 揉制 3 min。在室温干燥 24 h 后, 样品在空气中以 2.5 K/min 的升温速率加热至 473 K, 并在该温度下加热 2 h, 使硝酸铈转化为氧化铈。再以 2 K/min 的恒定速率加热样品至 673 K, 保持 2 h 去除碳, 在 973 K 热分解  $Ce(NO_3)_3$  制备无孔  $CeO_2$ 。制备的氧化铈电镜照片如图 1-5。

图1-5 介孔二氧化铈的电镜照片<sup>[16]</sup>。Figure 1-5 TEM pictures of mesoporous CeO<sub>2</sub> <sup>[16]</sup>.

大量的研究集中在铁氧化物纳米酶领域，归功于其巨大潜在应用前景，例如磁性药物靶向、磁共振成像以及在肿瘤微环境响应型治疗等等。四氧化三铁的制备方法众多，例如电弧放电、机械研磨、激光烧蚀、微乳化以及有机前体的高温分解等。但是用于生物领域需要其具有良好的分散性以及生物相容性。作为一种方便且廉价的方法，化学共沉淀法能满足直接制备分散性良好的Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>纳米颗粒的需求。适当的表面活性剂可以很好地控制纳米颗粒的制备，并且可以很好地控制纳米颗粒的尺寸。此外，如果严格地控制溶液pH、反应温度、搅拌速率、溶质浓度和表面活性剂浓度之类的条件，则可以制备所需形状和尺寸的Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>纳米颗粒。例如：使用氨水溶液进行改性的二价/三价铁盐共沉淀来合成Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>纳米粒子，该粒子可以很好地分散在水溶液中<sup>[17]</sup>。制备流程图如图1-6 在此过程中，使用干燥氮气保护二价铁盐避免被氧化。

图1-6 化学共沉淀法制备四氧化三铁纳米颗粒流程图<sup>[17]</sup>。Figure 1-6 Procedure for the preparation of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles by the controlled chemical coprecipitation method<sup>[17]</sup>.

多金属过渡金属氧化物，因其多价金属离子存在而具有良好的催化性能最近也得到了特别关注，其多种酶活性在肿瘤治疗领域也有重要的应用前景。例如林俊等<sup>[18]</sup>利用硫化铜钼（Cu<sub>2</sub>MoS<sub>4</sub>）构建了负载葡萄糖氧化酶（GO<sub>x</sub>）的中空介孔Cu<sub>2</sub>MoS<sub>4</sub>多功能纳米材料，用于结合化学动力疗法/饥饿疗法/光热疗法/免疫疗法协同治疗癌症。其制备方法如下：将CuCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O和PVP分别分散于100 mL去离子水中，剧烈磁搅拌10 min，然后在磁搅拌下依次加入NaOH和抗坏血酸。1 h后，10000 rpm离心5 min，分别用去离子水和乙醇洗涤3次。最后将样品在60 °C的真空烘箱中烘干过夜。得到的Cu<sub>2</sub>O作为模板制备Cu<sub>2</sub>MoS<sub>4</sub>，将上述得到的Cu<sub>2</sub>O粉末和葡萄糖粉末超声溶解分散于20 mL乙二醇中。然后，将Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O和C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>NS加入溶液中，进行超声分散30 min。混合溶液转移到45 mL反应釜内，在烘箱200 °C反应24 h。得到的Cu<sub>2</sub>MoS<sub>4</sub>如图1-7。

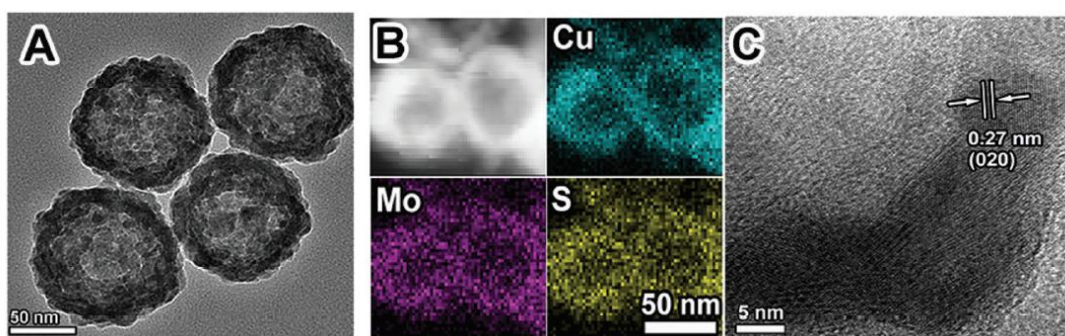
图1-7 模板法制备具有多酶活性的 $\text{Cu}_2\text{MoS}_4$ <sup>[18]</sup>。

Figure 1-7 The  $\text{Cu}_2\text{MoS}_4$  multifunctional nanozyme was prepared by templated method<sup>[18]</sup>.

### (3) 非金属纳米酶的制备方法

随着具有过氧化物酶活性纳米材料的涌现，人们发现一些非金属纳米材料同样具有类酶活性，特别是具有高稳定性和良好生物相容性的无金属纳米酶，为纳米酶在癌症治疗带来新的机遇。范克龙等<sup>[19]</sup>在密度泛函理论（DFT）分析的指导下，利用杂原子改变碳催化剂中的电子平衡和活性位点，制备了一系列无金属原子共掺杂碳材料，包括磷和氮双掺杂多孔空心碳球、硫和氮双掺杂多孔空心碳球、硼和氮双掺杂多孔空心碳球。制备方法如下，多巴胺分子（氮的前体）或三磷酸腺苷（磷的前体）或原硼酸（硼的前体）或左旋半胱氨酸（硫的前体）混合下通过硬模板过程自聚合。24 h 后，产物通过离心、洗涤和干燥后获得。干燥的粉末然后在氮气氛围内于 800 °C 碳化 2 h。然后用氢氧化钠蚀刻、洗涤和干燥后得到不同掺杂的无金属纳米酶。如图 1-8。

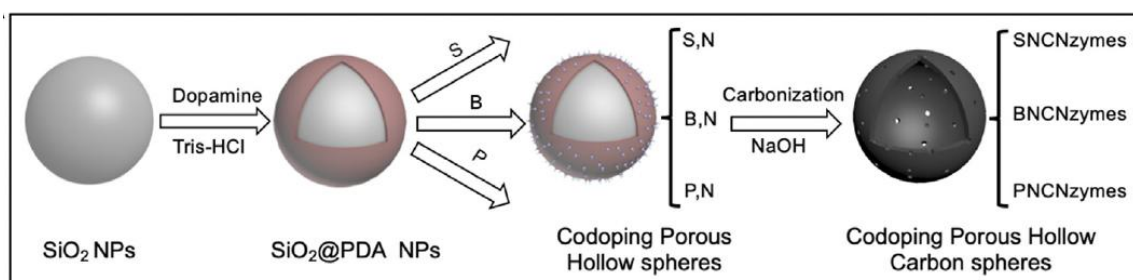
图1-8 制备不同掺杂元素的无金属纳米酶<sup>[19]</sup>。

Figure 1-8 Preparation of heteroatom dual-doped metal-free carbon nanozymes<sup>[19]</sup>.

### (4) 有机金属框架纳米酶制备方法举例

一些有机金属框架也有类似某种天然酶活性的性质，例如董绍俊<sup>[20]</sup>提出 MOF-818 的活性位点三核铜中心具有类天然儿茶酚氧化酶活性，并且具有良好的特异性。儿茶酚氧化酶特异性催化邻二酚氧化成相应的邻醌，对黑色素和其他多酚类天然产物的生物合成很重要。MOF-818 作为一种新型儿茶酚氧化酶纳米酶，具有良好的特异性和高催化活性。其制备方法如下，将 85 mg  $\text{ZrOCl}_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ 、62 mg

$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 、65 mg  $\text{H}_2\text{PyC}$  溶于20 mL 二甲基甲酰胺中，超声分散5 min后加入240  $\mu\text{L}$ 三氟乙酸。混合溶液搅拌均匀后在100  $^\circ\text{C}$ 加热 10 h后,加入62 mg  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  继续 100  $^\circ\text{C}$ 反应 10 h。得到的产物离心洗涤收集。电镜照片如图 1-9。

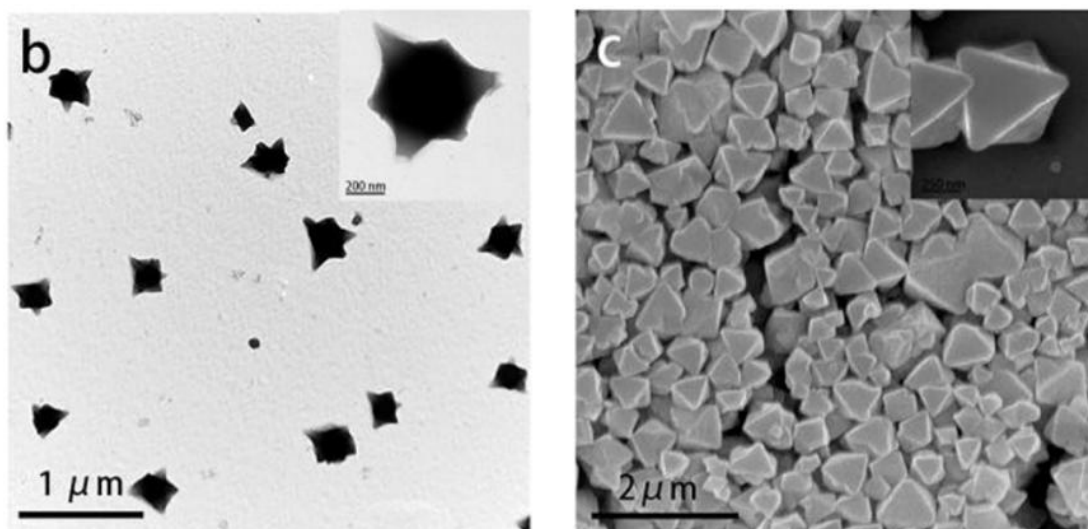


图1-9 MOF-818电镜照片<sup>[20]</sup>。

Figure 1-9 TEM images of MOF-818<sup>[20]</sup>.

### 1.2.3 纳米酶的分类及其催化原理

目前发现的纳米酶种类繁多，并且一种纳米材料可能有多种酶活性。对这些纳米酶的分类也有多种方式。深入了解纳米酶可能的催化机理将有助于新型高效纳米酶的开发、合理调控纳米酶的活性。另外纳米技术的快速发展拓宽了新型纳米酶的探索途径。结合模拟和理论计算，这些纳米酶可能的催化机理逐渐被阐明。这些研究可能有助于提高纳米酶的催化活性。下面是对纳米酶的分类及机理简要说明。

#### (1) 氧化酶

氧化酶是过氧化物酶体中的主要酶类，氧化酶约占过氧化物酶体酶总量的一半，包括：尿酸氧化酶、D-氨基酸氧化酶、L-氨基酸氧化酶和 L- $\alpha$ -羟羧酸氧化酶等。各种氧化酶作用于不同的底物，其共同特征是氧化底物的同时，将氧还原成过氧化氢。氧化酶中比较常见的具有葡萄糖氧化酶活性的金纳米材料，2004年 Rossi<sup>[21]</sup>和他的同事提出金纳米粒子可以在氧气存在下催化葡萄糖氧化生成葡萄糖酸和  $\text{H}_2\text{O}_2$ 。通过实验表明，其他金属纳米材料对葡萄糖氧化没有表现出明显的催化能力。随后，他们在2006年通过一系列实验探索，对这一现象给出了合理的解释<sup>[22]</sup>。如图 1-10。在碱性和产生  $\text{H}_2\text{O}_2$  促进下，水合葡萄糖阴离子与金表面原子

的相互作用可以形成富电子的金,通过亲核吸附活化分子氧。双氧中间体的  $\text{Au}^+-\text{O}_2^-$  或  $\text{Au}^{2+}-\text{O}_2^{2-}$  对可以作为将电子从葡萄糖转化到氧气分子的桥梁。最终形成了反应产物。

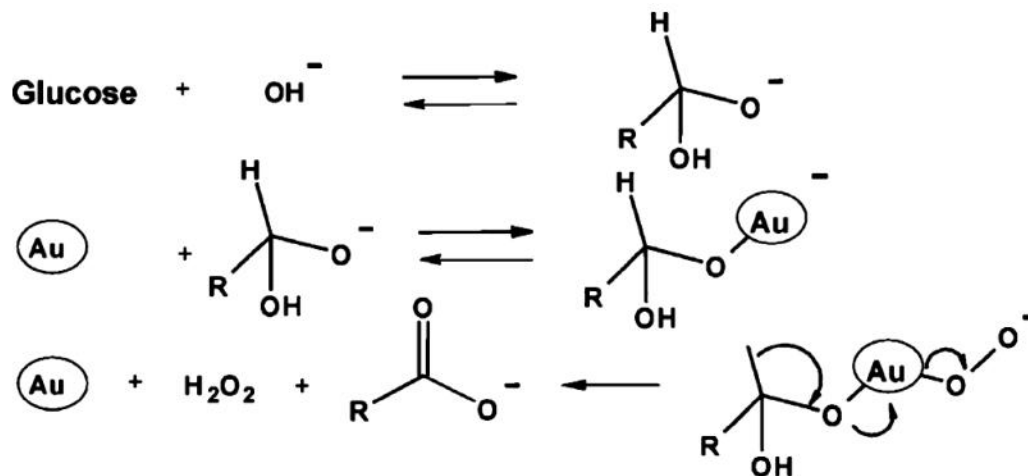
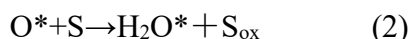


图 1-10 金纳米颗粒具有葡萄糖氧化酶活性的机制<sup>[22]</sup>。

Figure 1-10 Catalytic mechanism of Au nanoparticles as glucose oxidase mimics<sup>[22]</sup>.

2015年Gao等通过密度泛函理论系统地证明钯、铂、银和金及其合金等贵金属的氧化酶活性机理<sup>[23]</sup>。即金属表面上吸附的单原子氧原子具有Brønsted-base 特征。它们能够从周围的分子中提取酸性氢作为氧化剂。事实上,已经证明了预覆盖有氧原子的金具有很强的氧化能力,能够氧化一氧化碳和乙醛。

因此,贵金属的类氧化酶活性机制总结为下面的两个反应方程式<sup>[23]</sup>:



也就是说,金属催化吸附氧气分子离解产生O原子,然后O原子从底物如TMB和抗坏血酸中提取氢,完成 $\text{O}_2$ 对底物的氧化。在整个反应中,金属表现出氧化酶活性。由于自旋守恒<sup>[24]</sup>,当 $^3\text{O}_2$ 与有机底物的直接反应产生了具有非零磁矩和高能量的化合物,因此在自然界是不稳定的。当 $^3\text{O}_2$ 离解成金属上的氧原子时,由于 $^3\text{O}_2$ 的两个反键 $\pi^*$ 轨道已经被自旋向上的电子占据,它的键序通过接受金属的自旋向下的电子而降低到零。自旋向下的电子从金属中转移出来,导致金属上自旋向上的电子过多。因此,这个过程本质上将磁矩从 $^3\text{O}_2$ 转移到金属,产生化学吸附的零磁矩氧原子。根据自旋守恒定律,这个氧原子可以与有机底物反应生成稳定的非磁性化合物。这定性地解释了贵金属的类氧化酶活性的起源。

还有一些金属氧化物特异性氧化某种底物主要是依靠其高价态金属的氧化性,例如2014年,Tremel和他的同事<sup>[25]</sup>证明了在生理条件下,纳米氧化钼( $\text{MoO}_3$ )具有一种类亚硫酸盐氧化酶活性,亚硫酸盐氧化酶( $\text{SuO}_x$ )是一种位于线粒体上的含钼酶,可以催化有毒的亚硫酸盐氧化为硫酸盐,细胞色素c是电子受体。 $\text{SoO}_x$

在细胞内解毒过程中很重要，如果缺乏可能导致一些疾病，而氧化钼这种活性可能是亚硫酸盐氧化酶缺乏症的潜在治疗剂。其催化原理如图 1-11。 $\text{SO}_3^{2-}$ 首先与 $\text{MoO}_3$ 纳米颗粒结合，然后被氧化成 $\text{SO}_4^{2-}$ ，Mo从六价还原成四价。通过两个电子转移步骤，然后被电子受体氧化到初始价态，形成电子供应链。

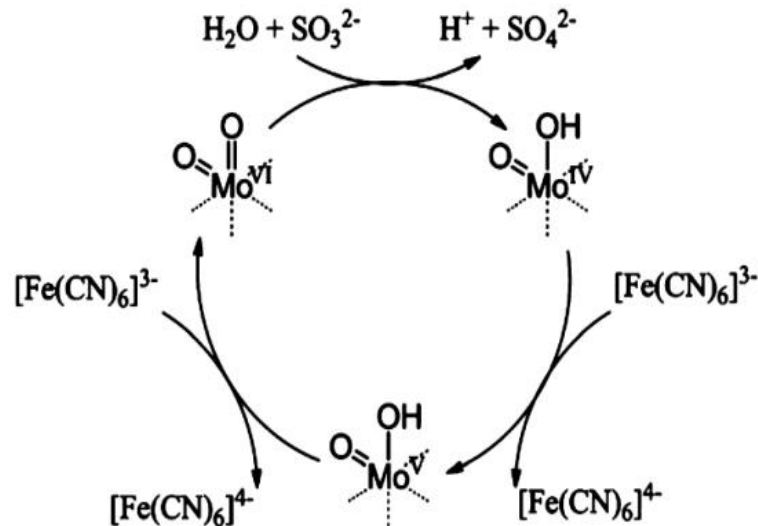


图1-10 纳米氧化钼的类亚硫酸盐氧化酶活性机制<sup>[25]</sup>。

Figure 1-10 Proposed mechanism of sulfite oxidase activity of  $\text{MoO}_3$  nanoparticles<sup>[25]</sup>.

另外还有二氧化铈<sup>[26]</sup>、二氧化锰<sup>[27]</sup>、铁酸锰<sup>[28]</sup>、铁酸钴<sup>[29]</sup>以及上述纳米材料复合物具有氧化酶活性的原理主要是类似上述化合物的氧化性质，氧化一些还原性物质。

## (2) 辣根过氧化物酶

辣根过氧化物酶比活性高，分子量小，纯酶容易制备。广泛分布于植物界，辣根中含量高，它是由无色的酶蛋白和棕色的铁卟啉结合而成的糖蛋白，是临床检验试剂中的常用酶。Li和Wang等<sup>[30]</sup>发现金纳米颗粒有类过氧化物酶活性，可能的机理是金纳米材料先吸附 $\text{H}_2\text{O}_2$ 分子，然后 $\text{H}_2\text{O}_2$ 的O-O键断裂形成两个羟基自由基。同时，形成的羟基自由基通过与金表面电子交换而具有稳定性，用于后续的催化作用<sup>[31]</sup>。银、铂、钯、铈、铷等贵金属合金的类过氧化物酶活性的催化机理类似。

许多碳基纳米材料同样表现出优异的类过氧化物酶性质。曲晓刚等人以石墨烯量子点(GQDs)为例探索了其催化机理<sup>[32]</sup>，结合实验数据和理论计算，发现 $-\text{C}=\text{O}$ 和 $-\text{O}=\text{C}-$ 基团分别可以作为催化活性位点和与底物结合位点。这些基团的修饰可以有效提高石墨烯量子点的催化活性。相反， $-\text{C}-\text{OH}$ 的存在会抑制它们的催化性能。Zhao及其同事进一步研究了具有类过氧化物酶活性的碳及其氧化物纳米材料的性质<sup>[33]</sup>。通过密度泛函理论以及分子水平的深入研究表明，大的芳香烃基团区

域对碳纳米材料的类过氧化物酶活性起主导作用，羧基可作为催化 $\text{H}_2\text{O}_2$ 产生羟基自由基的活性位点如图1-11。

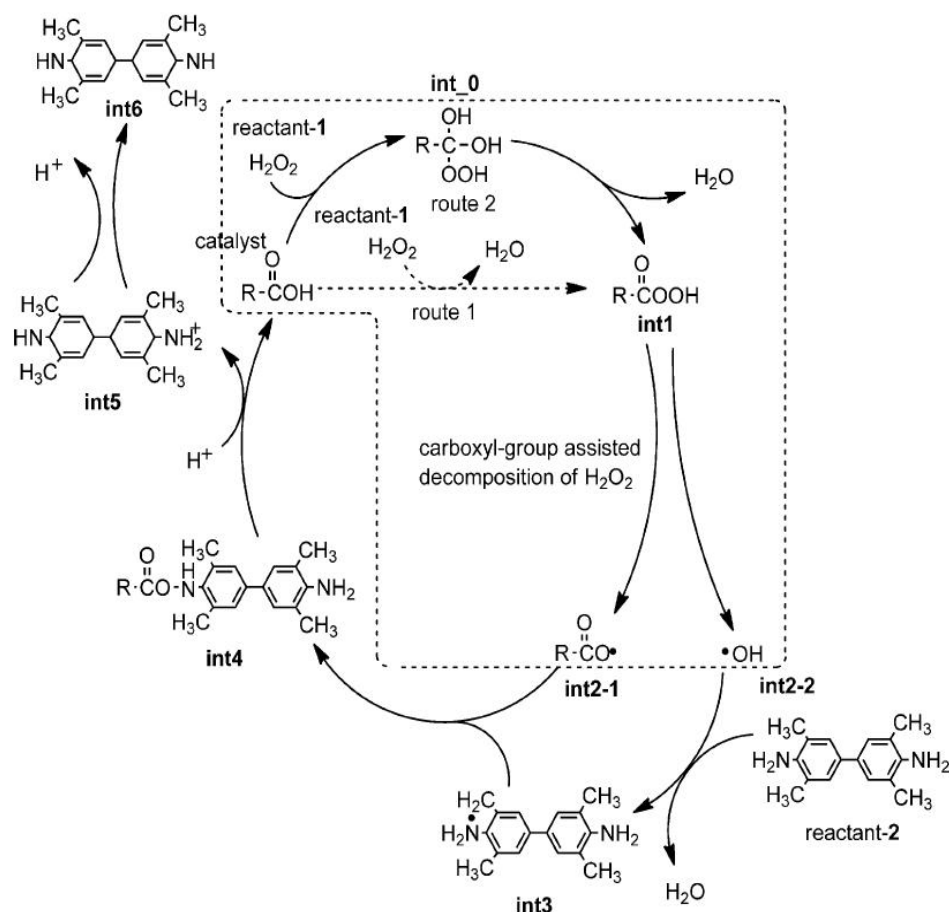


图1-11 羧基功能化的碳纳米材料氧化TMB底物可能的氧化循环<sup>[33]</sup>。

Figure 1-11 Proposed catalytic cycle of carboxyl-functionalized nanocarbon oxides catalyzing the oxidation of TMB<sup>[33]</sup>.

继 2007 年阎锡蕴等<sup>[33]</sup>发现四氧化三铁的类过氧化物酶活性后，大量铁基纳米材料的过氧化物酶活性被发现。Cleland 等<sup>[34]</sup>报道  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  纳米粒子的催化机制可能遵循乒乓反应机制， $\text{Fe}_3\text{O}_4$  可以首先与底物  $\text{H}_2\text{O}_2$  结合形成羟基自由基。然后生成的羟基自由基将从氢供体（例如 TMB）中捕获一个氢离子。随后唐等<sup>[35]</sup>在他们的工作中，用电子自旋共振（ESR）监测催化反应过程中间体。发现  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  纳米粒子能催化  $\text{H}_2\text{O}_2$  产生中间体羟基自由基，表明其具有过氧化物酶活性。另外，一些含铜或钒的氧化物也具有类过氧化物酶活性<sup>[36,37]</sup>。

### (3) 过氧化氢酶

过氧化氢酶存在于红细胞及某些组织内的过氧化体中，它的主要作用就是催化  $\text{H}_2\text{O}_2$  分解为  $\text{H}_2\text{O}$  与  $\text{O}_2$ ，使得  $\text{H}_2\text{O}_2$  不与  $\text{O}_2$  在铁螯合物作用下反应生成非常有害的羟基自由基。具有过氧化氢酶活性的贵金属纳米材料有铂、金、银、钯、铱以及上

述金属合金材料。Gao等<sup>[38]</sup>通过计算得出结论：金属（Au、Ag、Pd和Pt）在低 pH 条件下表现出过类氧化物酶活性归因于金属表面  $\text{H}_2\text{O}_2$  的碱样分解，而在高 pH条件下则表现为过类氧化氢酶活性，归因于其表面  $\text{H}_2\text{O}_2$  的酸状分解。如图1-12。

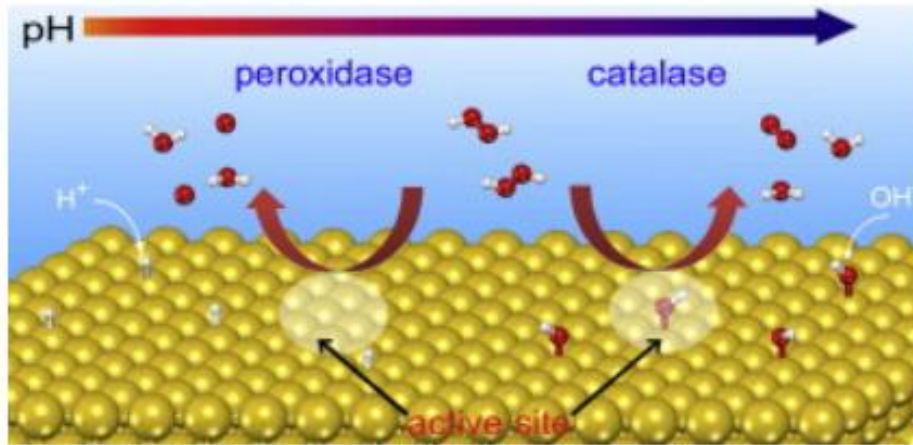


图1-12 贵金属在不同pH条件下表现出对 $\text{H}_2\text{O}_2$ 的不同催化活性<sup>[38]</sup>。

Figure 1-10 The predicted mechanisms for the pH-switchable peroxidase-like and catalase-like activities of the metals<sup>[38]</sup>.

除了贵金属催化剂具有过氧化氢酶活性，一些金属氧化物也具有类过氧化氢酶活性。Pirmohamed<sup>[39]</sup>的团队证明了纳米氧化铈依赖其氧化还原状态可以作为过氧化氢酶的替代物，高价态的  $\text{Ce}^{4+}$  是其催化活性的主要原因。Ghibelli 和同事<sup>[40]</sup>进一步说明了纳米氧化铈的类过氧化氢酶活性机制。 $\text{Ce}^{4+}$  首先被  $\text{H}_2\text{O}_2$  分子还原形成  $\text{Ce}^{3+}$ ，伴随着质子和  $\text{O}_2$  的产生。另一个  $\text{H}_2\text{O}_2$  分子将与氧空位结合，将  $\text{Ce}^{3+}$  氧化成  $\text{Ce}^{4+}$ ，如图 1.13。

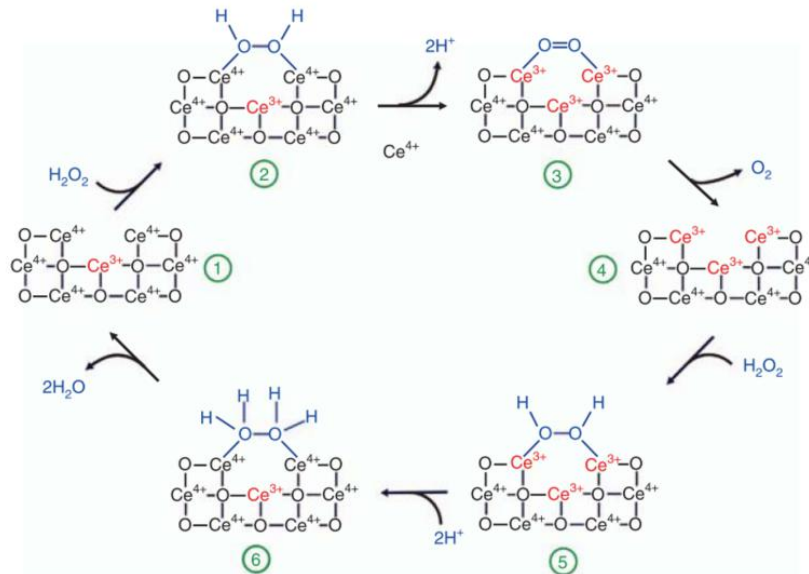
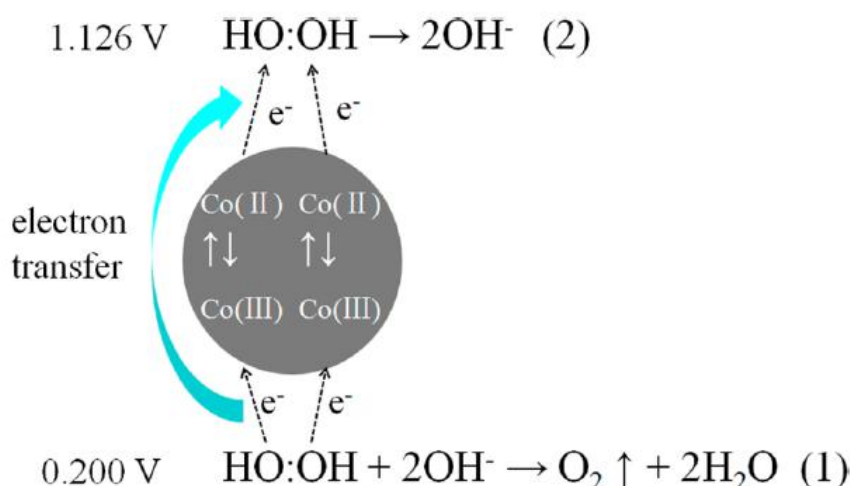


图1-13 氧化铈的类过氧化氢酶活性机制<sup>[40]</sup>。

Figure 1-13 Proposed mechanism of  $\text{CeO}_2$  nanoparticles as catalase mimics<sup>[40]</sup>.

图1-14 四氧化三钴作为过氧化氢酶可能的机制<sup>[40]</sup>。Figure 1-14 Possible Mechanism of  $\text{Co}_3\text{O}_4$  Nanomaterials as catalase mimics<sup>[40]</sup>.

Wang等<sup>[41]</sup>则通过能斯特方程计算反应的活化能得到四氧化三钴可能的过氧化氢酶活性机制， $\text{Co}_3\text{O}_4$  纳米材料作为一种半导体材料，可以作为电子传递介质，类似于天然过氧化氢酶。在上述反应体系中， $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}_2$  的氧化还原电位计算为0.200 V， $\text{H}_2\text{O}_2/\text{OH}^-$  的氧化还原电位计算为 1.126 V， $\text{Co}_3\text{O}_4$ 纳米棒的  $\text{Co}^{3+}/\text{Co}^{2+}$  氧化还原电势为 1.103 V（相对于Ag/AgCl电极）。根据比较氧化还原电势， $\text{Co}_3\text{O}_4$  纳米材料中的  $\text{Co(III)}$  很容易从  $\text{H}_2\text{O}_2$  中得到电子并转化为  $\text{Co(II)}$ ，使  $\text{H}_2\text{O}_2$  分解为氧气和水。其次， $\text{Co}_3\text{O}_4$  纳米材料中的  $\text{Co(II)}$  可以将电子传递给  $\text{H}_2\text{O}_2$ ，然后又转回 $\text{Co(III)}$ ，使  $\text{H}_2\text{O}_2$  还原为氢氧根。如图1-14。另外，过渡金属氧化物例如二氧化锰、三氧化二铁等具有类似过氧化氢酶活性，也是类似上述机理。

### (3) 谷胱甘肽过氧化物酶

谷胱甘肽过氧化物酶 ( $\text{GP}_x$ ) 是一种细胞内抗氧化酶，可将过氧化氢酶水解为水，以限制其有害作用。研究者目前发现具有类谷胱甘肽过氧化物酶活性的纳米材料有五氧化二钒<sup>[42]</sup>、硒以及硒复合物<sup>[43]</sup>和锰基纳米材料<sup>[44]</sup>。2017年曲晓刚等人发现石墨烯负载硒(GO-Se)纳米复合材料具有出色的类谷胱甘肽过氧化物酶活性，可保护细胞免受氧化应激。与单独硒纳米粒子相比，GO-Se纳米酶表现出更高的 $\text{GP}_x$ 模拟催化效率。如图1-15，催化反应可能遵循乒乓机制：首先  $\text{H}_2\text{O}_2$  与纳米硒反应，然后得到的氧化硒中间体将与硫醇（如GSH）反应生成 GSSG，硒成分将返回到初始纳米硒状态。在谷胱甘肽还原酶（GR）及其辅酶 NADPH 存在下，GSSG 可以再次还原为 GSH。然后纳米硒继续与其它  $\text{H}_2\text{O}_2$  分子反应<sup>[45]</sup>。Mugesh<sup>[46]</sup>和同事发现了  $\text{V}_2\text{O}_5$  纳米线同样具有显著类谷胱甘肽过氧化物酶活性，在生理条件下可以在谷胱甘肽的帮助下催化  $\text{H}_2\text{O}_2$  分解。

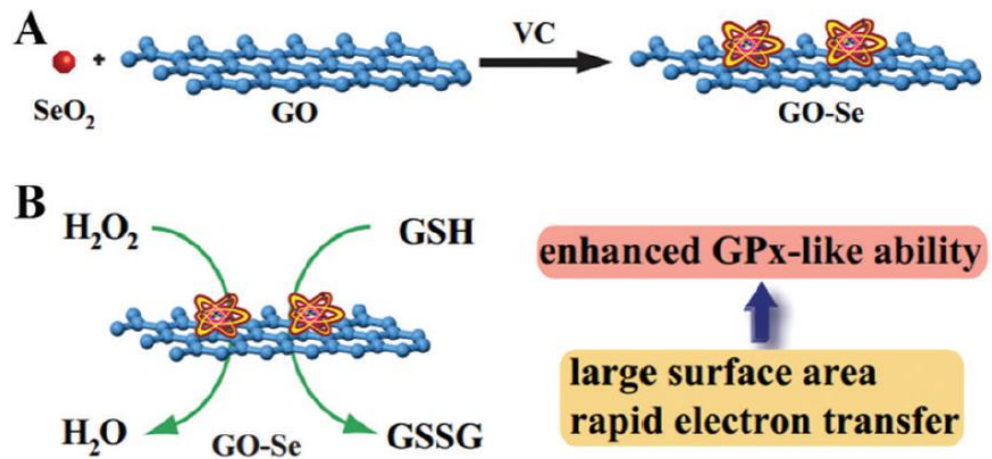


图1-15 GO-Se的过氧化物酶活性可能的机制<sup>[45]</sup>。

Figure 1-15 The  $\text{H}_2\text{O}_2$  removal mechanism of nanozyme with enhanced GPx-like properties<sup>[45]</sup>.

#### (4) 超氧化物歧化酶

超氧化物歧化酶（SOD）是生物体内存在的一种抗氧化金属酶，它能够催化超氧阴离子自由基歧化生成氧和过氧化氢，在机体氧化与抗氧化平衡中起到至关重要的作用，与很多疾病的发生、发展密不可分。具有超氧化物歧化酶活性的纳米材料主要有金、铂、钯及其合金等贵金属纳米材料<sup>[47,48]</sup>、氧化铈<sup>[49]</sup>和一些锰基纳米材料<sup>[50]</sup>。高等同样分析了贵金属纳米材料超氧化物歧化酶活性的机理<sup>[33]</sup>。超氧阴离子自由基 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 是一种碱性物质， $\text{pK}_b = 9.12$ ，它很容易从水中捕获一个质子，形成 $\text{HO}_2^{\cdot}$ 和 $\text{OH}^-$ ，如图1-16所示，贵金属的晶面具有较小的活化能，吸附的 $\text{HO}_2^{\cdot}$ 基团会在贵金属晶面上重排，产生 $\text{H}_2\text{O}_2$ 和 $\text{O}_2$ 。

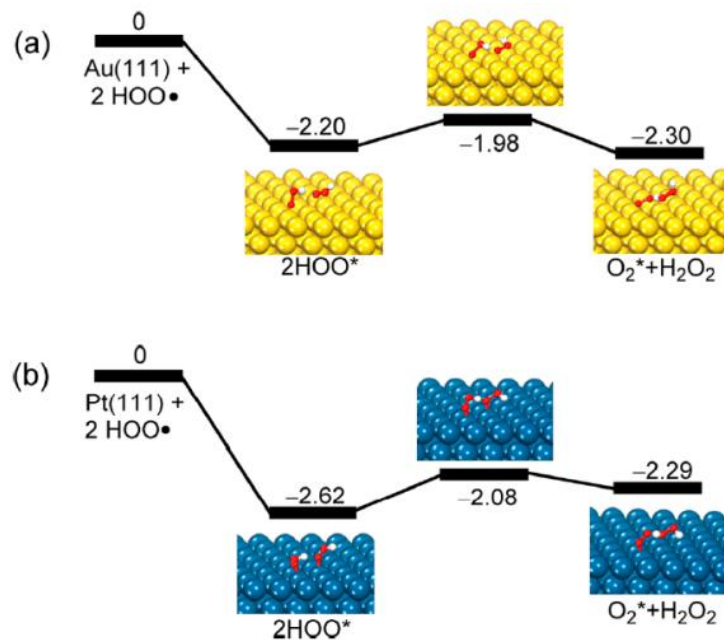


图1-16 金和铂（111）晶面上的 $\text{HO}_2^{\cdot}$ 重排<sup>[39]</sup>

Figure 1-16 Rearrangements of two  $\text{HO}_2^{\cdot}$  groups on (111) facets of (a) Au and (b) Pt<sup>[39]</sup>.

一些金属氧化物同样具有类超氧化物歧化酶活性，例如氧化铈，由于 $\text{Ce}^{3+}$ 和 $\text{Ce}^{4+}$ 以及氧空位的存在，纳米氧化铈具有优异的催化性能。Ghibelli和他的同事<sup>[51]</sup>提出氧化铈类超氧化物歧化酶活性的详尽催化机制。如图1-17，纳米氧化铈初始状态记为④，超氧化物优先与两个 $\text{Ce}^{3+}$ 周围的氧空位结合形成⑤。然后一个电子从一个 $\text{Ce}^{3+}$ 转移到一个氧原子上，形成一个电负性氧原子。因此，所获得的两个电负性氧原子可以与两个质子结合生成一个 $\text{H}_2\text{O}_2$ 分子以及中间体⑥。剩余的氧空位结合另一个超氧化物分子形成⑦。在这一步之后，随着 $\text{Ce}^{3+}$ 向 $\text{Ce}^{4+}$ ①的转化，生成了另一分子 $\text{H}_2\text{O}_2$ 。①表面的氧空位会导致 $\text{Ce}^{4+}$ 与 $\text{H}_2\text{O}_2$ 分子结合。这样就得到中间体②。②不稳定，可释放两个质子，将两个 $\text{Ce}^{4+}$ 转化为两个 $\text{Ce}^{3+}$ 生成中间体③。③转化为初始状态④。纳米材料表面 $\text{Ce}^{3+}/\text{Ce}^{4+}$ 的比例对催化性能有重要影响，较高的比例可以提高纳米材料的类超氧化物歧化酶活性。

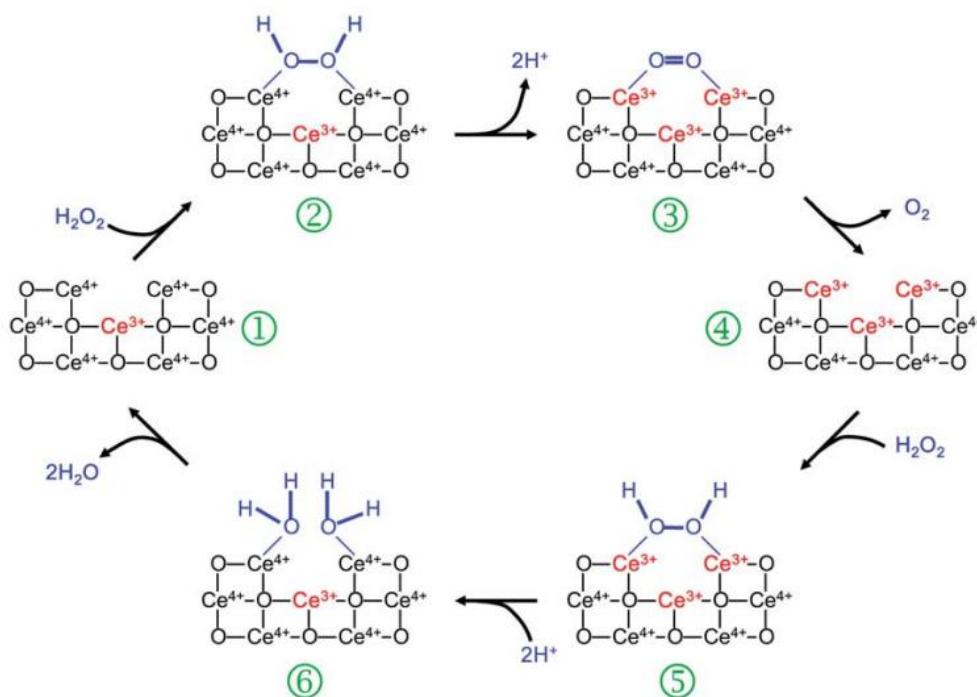


图1-17 二氧化铈纳米颗粒的类超氧化物歧化酶活性机制<sup>[51]</sup>。

Figure 1-17 Proposed mechanism of  $\text{CeO}_2$  nanoparticles as superoxide dismutase mimics<sup>[51]</sup>.

### (5) 其它纳米酶

纳米酶的种类还有很多，例如 Tremel 等<sup>[52]</sup>发现缺氧型  $\text{CeO}_{2-x}$  纳米棒可以作为一种有效的绿色尿酸酶模拟物，可在室温条件下催化尿素水解。其活性比天然的菜豆脲酶低一个数量级。通过镧取代调整  $\text{Ce}^{4+}/\text{Ce}^{3+}$  的比例，研究了氧化铈的表面性质。虽然镧的取代增加了表面缺陷的数量，但纳米铈表面  $\text{Ce}^{4+}$  位置的减少导致催化效率的降低。虽然天然的刀豆脲酶受到  $\text{Cu}^{2+}$  离子的强烈抑制，但氧化铈的尿酸酶活性不受  $\text{Cu}^{2+}$  的影响。

Tremel 的团队<sup>[53]</sup>还发现  $\text{V}_2\text{O}_5$  纳米线具有加卤过氧化物酶的活性，可以应用于

阻止海洋微环境中生物膜的形成。在  $\text{H}_2\text{O}_2$  存在下,  $\text{V}_2\text{O}_5$  纳米线可以催化卤离子, 如氯离子和溴离子, 产生次卤酸。生成的次卤酸会对海洋微生物造成氧化损伤, 保护船只免受海洋中细菌的粘附。

纳米酶的种类还有很多, 在此不再赘述, 相信研究者孜孜不倦的工作会开发出更多具有应用价值的纳米酶。

#### 1.2.4 纳米酶在生物医学方面的应用

由于纳米酶优异的物理化学性质和催化活性, 在生物医学领域的应用包括生物传感、疾病治疗、抗菌等方面。下面是对纳米酶在生物医学领域应用举例。

##### 生物传感

纳米酶因其独特类酶催化特性, 近年来受到广泛关注。如类过氧化物酶, 可以催化底物发生显色反应。在此基础上, 基于纳米酶的新型生物传感器已成功设计并用于检测离子、小分子、核酸、蛋白质等。

##### (1) 离子检测

纳米酶可以用于多种离子检测, 如金属  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Ag}^+$ 、 $\text{Fe}^{2+}$  等, 非金属离子如  $\text{CN}^-$ 、 $\text{F}^-$  等。具体如下:

曲晓刚课题组 2010 年<sup>[54]</sup>利用点击化学, 将叠氮化物功能化的磁性二氧化硅纳米粒子点击到乙炔功能化的多壁碳纳米管上制备了复合纳米系统, 制备的复合纳米材料比单独的二氧化硅磁性纳米粒子或多壁碳纳米管都具有更高的过氧化物酶样活性。作为点击化学催化剂, 一价铜来源于抗坏血酸钠或谷胱甘肽存在下对二价铜的还原, 该纳米复合物的催化活性可用于铜 ( $\text{Cu}^{2+}$  或  $\text{Cu}^+$ ) 的检测。工作原理如 1-18 所示。磁性二氧化硅纳米粒子点击在多壁碳纳米管上, 复合纳米材料固有的类过氧化物酶活性催化底物显色反应用于铜离子检测。检测限可低至  $1 \mu\text{M}$ 。

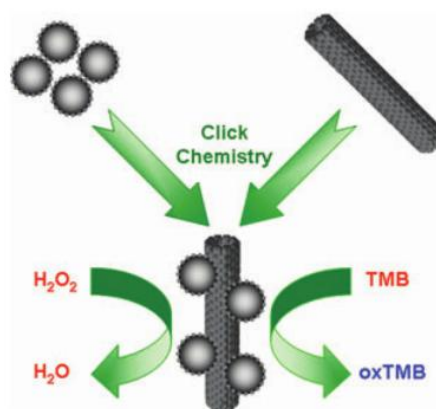


图1-18 结合点击化学和过氧化物酶的显色反应检测铜离子传感机理说明<sup>[54]</sup>。

Figure 1-18 Schematic representation of combination of click chemistry and peroxidase-like catalytic color reaction<sup>[54]</sup>.

在过去的几十年里，银离子是最危险的金属污染物之一。由于其在电气工业、摄影、成像以及制药中的广泛应用，工业废物和排放物不断向环境中释放银离子，其中小部分最终进入地表水。银离子的长期摄入会对公众健康造成严重影响，包括细胞毒性、器官衰竭和线粒体功能下降。大量学者致力于建立一种简单、快速、实时的银离子检测方法。例如，Tang 等<sup>[55]</sup>2016 年提出了一种简单可行的检测超低浓度银离子的比色法。牛血清白蛋白修饰的金纳米团簇具有类过氧化物酶活性，可以催化  $\text{H}_2\text{O}_2$  氧化 TMB。一旦引入银离子，银离子选择性地与金发生氧化还原反应，这就导致金纳米粒子的过氧化物酶活性被抑制。在此基础上，建立了银离子比色传感器。由于银和金相互作用的性质使其在有干扰离子存在下具有很好的特异性。 $\text{Ag}^+$  的最低检出浓度为  $0.204 \mu\text{M}$ ，该方法可用于湖水中银离子浓度的快速分析。

2020 年 Yin 等<sup>[56]</sup>证明了铂钌纳米粒子表现出多种酶活性（如过氧化物酶、氧化酶、铁氧化酶、过氧化氢酶和超氧化物歧化酶）和 1,1-二苯基-2-苦酰肼（DPPH）自由基清除活性。并发现铂钌纳米粒子的类酶活性高度依赖于铂/钌的摩尔比。其类铁氧化物酶活性可以应用于  $\text{Fe}^{2+}$  的检测。如图 1-19。在铂钌纳米粒子催化剂的帮助下， $\text{Fe}^{2+}$  可以在溶解氧的存在下被氧化成  $\text{Fe}^{3+}$ 。随后， $\text{Fe}^{3+}$  和水杨酸产生紫色络合物，在 525 nm 附近具有特征吸收，监测该络合物的量以评估  $\text{Fe}^{2+}$  的氧化速率。

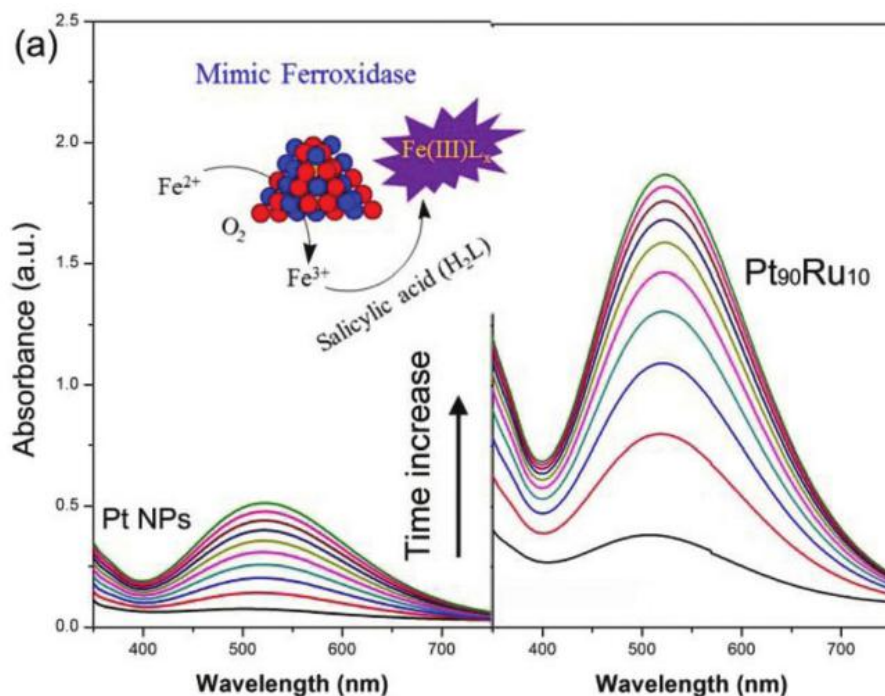


图1-19 铂和铂钌纳米粒子的铁氧化酶活性检测铁离子示意图<sup>[55]</sup>。

Figure 1-19 The ferroxidase-like activity of Pt and  $\text{Pt}_{90}\text{Ru}_{10}$  containing salicylic acid and  $\text{Fe}^{2+}$ <sup>[55]</sup>.

地表水中氰化物盐类不仅来源于工业废物，也来源于生物过程。氰化物离子（CN<sup>-</sup>）是对人类致命的毒物，对细胞色素 c 氧化酶具有很强的结合能力。它可以导致呼吸麻痹，甚至引发对中枢神经系统的严重损害。因此，高灵敏度地检测样品中的 CN<sup>-</sup>是非常重要的。Huang 等 2018 年<sup>[56]</sup>报道了一种简单的一步法合成具有类过氧化物酶活性、分散性良好的氧化石墨烯负载无定形氢氧化钴，及其在检测 CN<sup>-</sup>离子中的应用。氰化物离子可以显著抑制石墨烯负载无定形氢氧化钴纳米复合物的催化活性，这使得其可以用于检测水样和实验室废液中的氰化物。其工作原理是，CN<sup>-</sup>抑制 CoO<sub>x</sub>H-GO 催化 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化安普尔克斯红（AR）形成荧光间苯二酚。随着 CN<sup>-</sup>浓度的增加，膜的红色强度降低，这可以用肉眼观察到。这种高性价比的传感系统可以快速、简单地测定复杂废水样品中 CN<sup>-</sup>的浓度。

2016 年，Liu 等<sup>[57]</sup>通过将二氧化铈、底物 ABTS 与不同浓度的氟离子混合。氟离子浓度越高，ABTS 的颜色越深。反应 10 min 后通过紫外分光光度计测量 420 nm 处的吸光度。计算出检测限为 0.64 μM。该检测限比世界卫生组织推荐的饮用水标准低 100 多倍。该机制归因于表面电荷转移和基于ζ电位和 F<sup>-</sup>封端促进的电子转移。实现了对氟化物的超灵敏检测。如图 1.27。

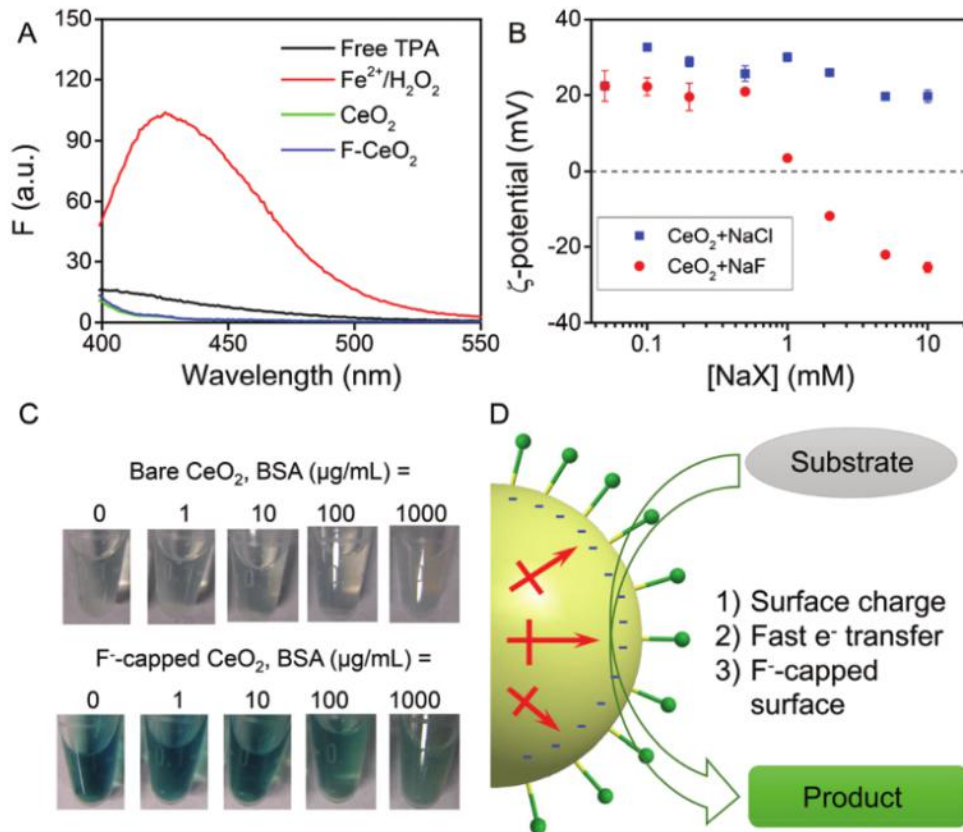


图1-20 氟离子封端的氧化铈增加氧化酶活性的机制说明<sup>[57]</sup>。

Figure 1-20 Mechanistic investigation of F<sup>-</sup>-capped nanoceria with enhanced oxidase activity<sup>[57]</sup>.

## (2) 小分子检测

葡萄糖是一种重要的生物分子，也是一种能量来源和代谢中间体。人体必须将葡萄糖水平调节在 3-8 mM 之间，因为更高的葡萄糖浓度，特别是在糖尿病中，会导致严重的并发症，包括心脏病、肾病、失明等。因此，使用快速、可靠和准确的传感器来监测体液中的葡萄糖至关重要。2018 年 Bansal 等<sup>[58]</sup>将纳米银包埋在棉织物基质中，用于快速检测复杂生物液体（如尿液）中的葡萄糖含量。棉织物作为模板的使用不仅提供大量的催化活性位点参与催化反应，棉纤维的吸收特性也有助于在传感过程中快速吸收生物分子、如葡萄糖。从而能够准确检测尿液中的葡萄糖含量。如图 1-21。

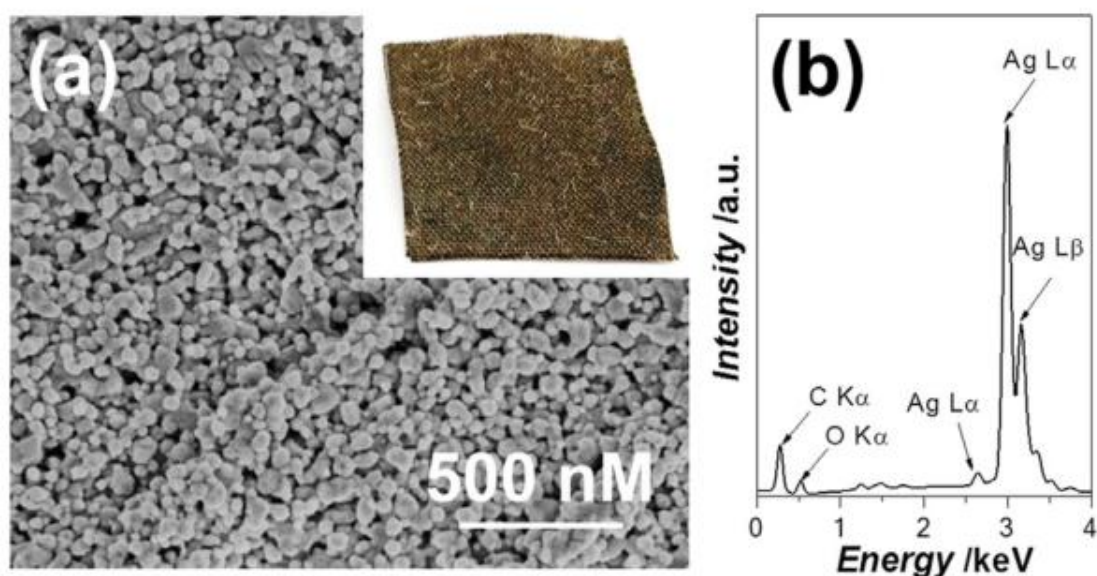


图1-21 应用于葡萄糖检测的银纳米粒子封装在棉纤维内的扫描电镜照片和能谱<sup>[58]</sup>。

Figure 1-21 SEM image of nanostructured Ag deposited on individual threads of a cotton fabric<sup>[58]</sup>.

尿素和脲酶在化学和生物化学的发展中起着重要作用。尿素广泛分布于生物体内，是尿液中的主要含氮成分和蛋白质代谢的终产物，因此尿素的测定在食品工业、环境监测和临床中非常重要。2016 年，Xia 等<sup>[59]</sup>基于金纳米粒子的类辣根过氧化物酶活性。构建了一个新的检测尿素、脲酶和脲酶抑制剂的传感平台。尿素和脲酶的检测限分别为  $5 \mu\text{M}$  和  $1.8 \text{ U}\cdot\text{L}^{-1}$ 。如图 1-22，金纳米粒子催化的 TMB- $\text{H}_2\text{O}_2$  反应体系具有良好的灵敏度和 pH 响应范围，构建了 pH 传感器用于监测与 pH 变化相关的生化过程。脲酶专门将尿素水解成二氧化碳和氨气。由于脲酶产生氨气这种碱性分子，它的活性会改变含水反应介质的酸碱度。因此，基于金纳米酶催化的 TMB- $\text{H}_2\text{O}_2$  系统与脲酶催化尿素水解结合时，可以实现尿素、脲酶和脲酶抑制剂的检测。

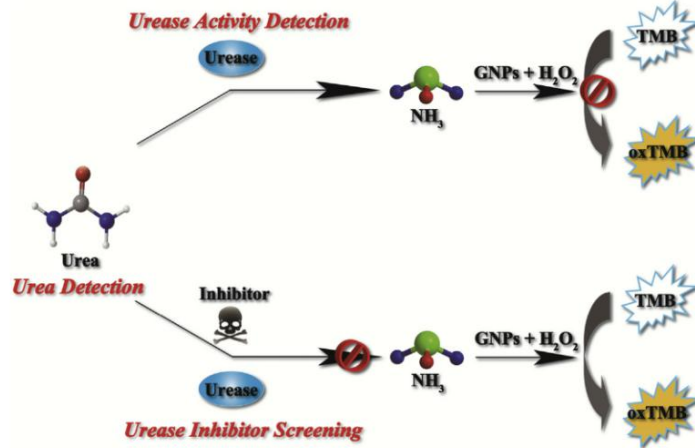


图1-22 尿素、脲酶和脲酶抑制剂的检测系统机理<sup>[59]</sup>。

Figure 1-22 Schematic illustrations of the sensing protocols for urea, urease, and urease inhibitor<sup>[59]</sup>.

对磷酸盐及其水解酶的检测也非常重要，因为它们在各种生物过程和许多疾病中起着重要作用。与用于单次检测一种给定磷酸盐的单个传感器相比，传感器阵列能够同时区分多种磷酸盐。2018年 Wei 等<sup>[60]</sup>制作了基于二维金属有机框架（2D-MOF）纳米酶的传感器阵列，通过用不同的磷酸盐，包括腺苷酸、腺苷二磷酸、三磷酸腺苷、焦磷酸和磷酸来调节它们的过氧化物酶活性。传感器阵列不仅成功地用于区分水溶液中的五种磷酸盐，还用于区分生物样品中的五种磷酸盐。如图 1-23，传感器阵列成功地应用于探测分别由腺苷三磷酸双磷酸酶和过氧化物酶催化的 ATP 水解过程。这项工作表明，基于纳米酶的传感器阵列是一个方便可靠的分析平台，用于探测磷酸盐及其相关的酶促过程，也可应用于其他分析物和酶促反应。

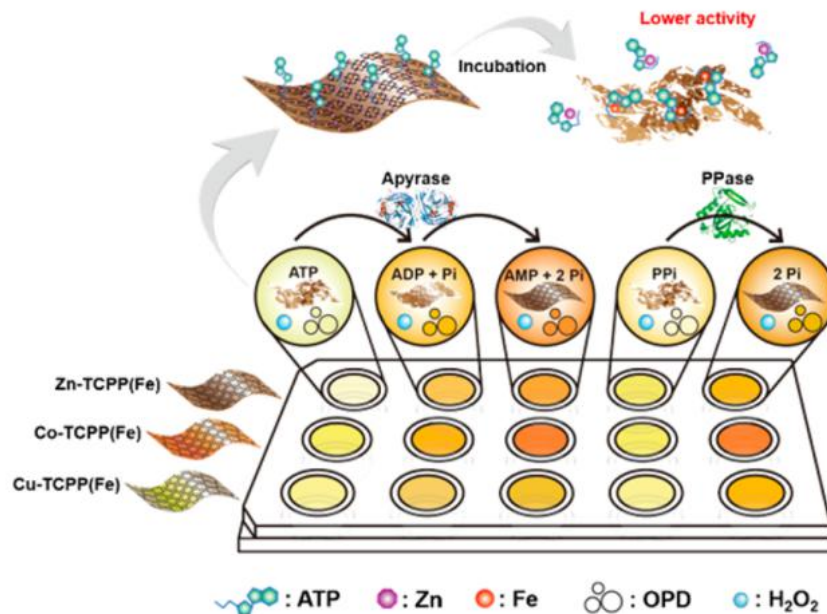


图1-23 基于二维金属有机框架（2D-MOF）纳米酶的传感器阵列<sup>[60]</sup>。

Figure 1-23 Schematic of 2D-MOF-Nanozyme sensor arrays probing phosphates and their related hydrolytic processes<sup>[60]</sup>.

### (3) 核酸检测

单核苷酸的多态性与肿瘤形成和恶化密切相关。因此，对单核苷酸的检测分析可以为恶性肿瘤的早期诊断和风险评估提供重要工具。例如Fan和他的同事们<sup>[61]</sup>利用金纳米粒子的酶活性和DNA单链分子与DNA双链分子之间的亲和力，报道了一种用于检测DNA的探针。如图1-24，金纳米粒子具有类葡萄糖氧化酶性质。金纳米粒子通过金硫键对单链DNA有很高的亲和力。DNA修饰在金纳米粒子上会改变金纳米粒子的表面性质，从而限制其类葡萄糖氧化酶活性。与DNA单链分子相比，双链DNA分子与Au纳米粒子的结合能力相对较弱。在双链DNA的存在下，Au纳米粒子仍能保持较高的酶活性来催化葡萄糖的氧化。在辣根过氧化物酶的帮助下，葡萄糖被氧化的产物 $H_2O_2$ 可以被催化氧化相应的底物发生显色反应。

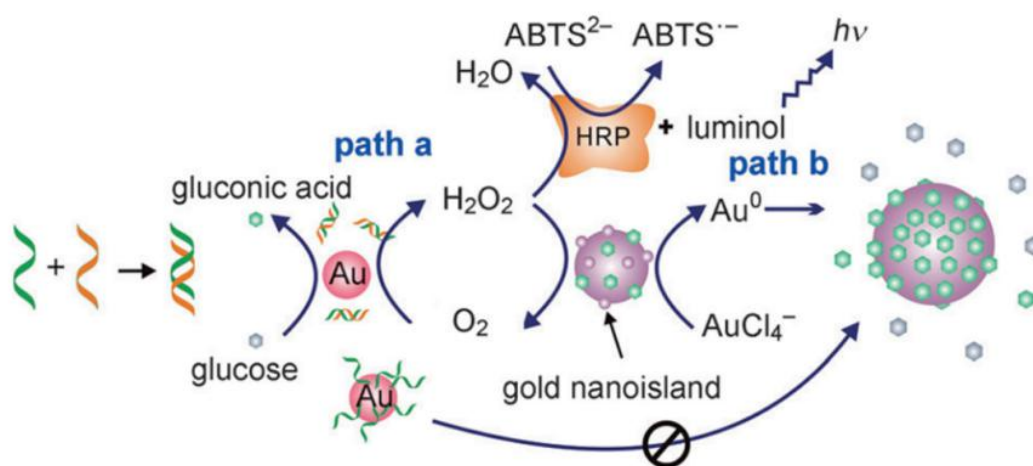
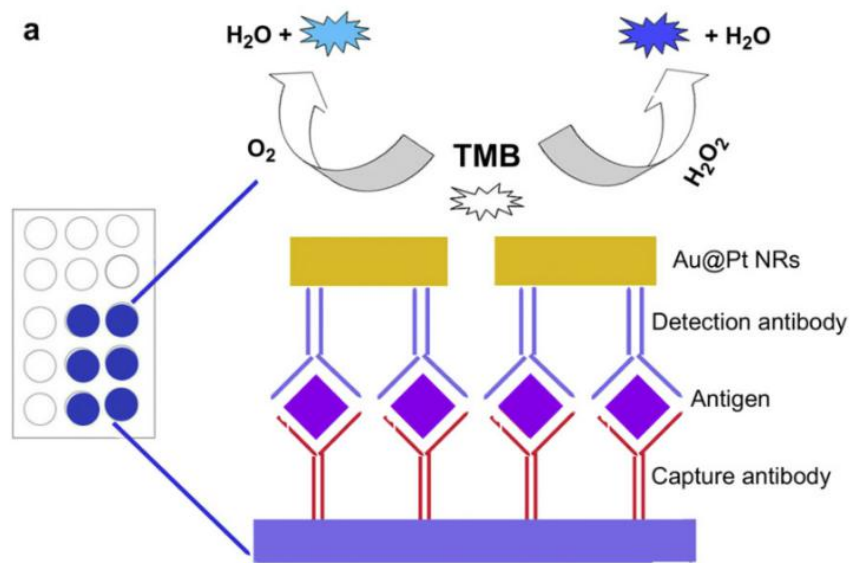


图 1-24 核酸检测比色策略示意图<sup>[61]</sup>。

Figure 1-24 Schematic illustration of colorimetric strategy for detection of nucleic acids <sup>[61]</sup>.

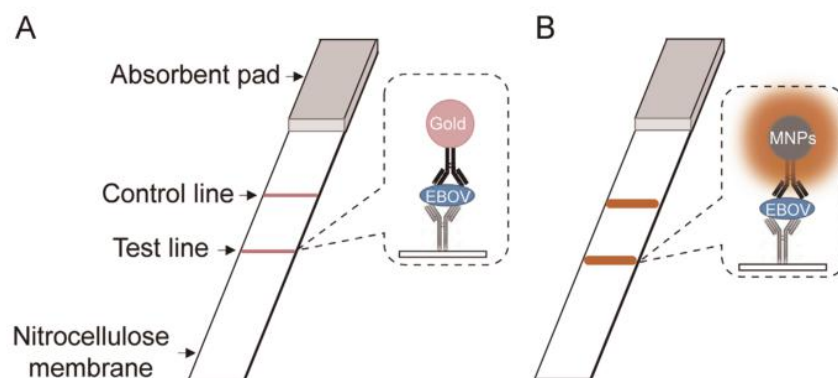
### (4) 蛋白质检测

众所周知，酶联免疫吸附试验是辣根过氧化物酶最重要的应用之一。一些具有类过氧化物酶活性的纳米酶特别是四氧化三铁用于抗原、抗体等的免疫检测。与传统的酶联免疫吸附法相比，这种基于纳米酶的免疫分析方法具有简便、快速、经济、灵敏等优点。例如 2010 年，Guo 等<sup>[62]</sup>证明了由金纳米棒负载铂纳米点组成的纳米材料具有类氧化酶、类过氧化物酶和类过氧化氢酶多种活性。基于上述发现，他们建立了一种基于金包覆铂纳米酶联免疫吸附试验（ELISA）来检测小鼠白细胞介素 2（IL-2）。与天然酶相比，Au@Pt 纳米结构具有成本低、制备简单、稳定性好、催化活性可调等优点，是一种有前途的类酶候选物。

图 1-25 基于金纳米棒负载铂纳米颗粒的酶联免疫检测示意图<sup>[62]</sup>。Figure 1-25 Au@Pt NRs-based ELISA<sup>[62]</sup>.

### 疾病诊疗

另外，纳米酶还应用于多种疾病的诊断。埃博拉病毒 2014 年在西非肆虐。迫切需要一种快速、高度灵敏、易于使用的埃博拉诊断检测方法。2015 年 Yan 等<sup>[63]</sup>用四氧化三铁磁性纳米粒子代替胶体金作为纳米酶探针（如图 1-26），建立了酶标法检测博拉病毒。该纳米酶探针与博拉病毒抗体结合，具有三种功能：识别、分离和条带上博拉病毒的可视化。由于其固有的过氧化物酶活性，纳米酶探针可以催化过氧化物酶底物发生显色反应，从而显著放大信号。此外，纳米酶探针的磁性为样品中成分的快速分离和富集提供了便捷。

图 1-26 标准胶体金试纸条和用四氧化三铁纳米粒子代替胶体金形成新型纳米酶探针<sup>[63]</sup>。Figure 1-26 Nanozyme-strip design. (A) Standard colloidal gold strip. (B) Nanozyme-strip employing MNPs in place of colloidal gold to form a novel nanozyme probe<sup>[63]</sup>.

随后 Yan 等<sup>[64]</sup>在 2019 年报道了一种单分散的基于铁蛋白的钴纳米酶，其特异性靶向并可视化临床肝癌细胞（HCC）。钴纳米酶是在肝癌细胞靶向性铁蛋白外壳仿生合成的，通过基因工程方法在铁蛋白表面修饰肝癌细胞特异性多肽 SP94。

该纳米酶固有的过氧化物酶活性催化底物发生显色反应，使肝癌肿瘤组织可视化。并且，Yan 等用 424 份临床肝癌细胞作为样本。验证了该钴纳米酶具有良好的特异性和敏感性。

纳米酶在疾病治疗领域也有诸多应用。例如，氧化应激与许多急性和慢性炎症疾病有关，但目前临床上可用的治疗方式有限。开发具有良好活性氧清除能力，生物相容性好的纳米酶是治疗活性氧相关炎症的一种有前途的方法。2020年Deng 等<sup>[65]</sup>报道了一种简单高效的一步法制备超小 $\text{Cu}_5.4\text{O}$ 纳米粒子，该纳米粒子具有多种类酶活性和活性氧清除能力，用于治疗活性氧相关疾病如图1-28。

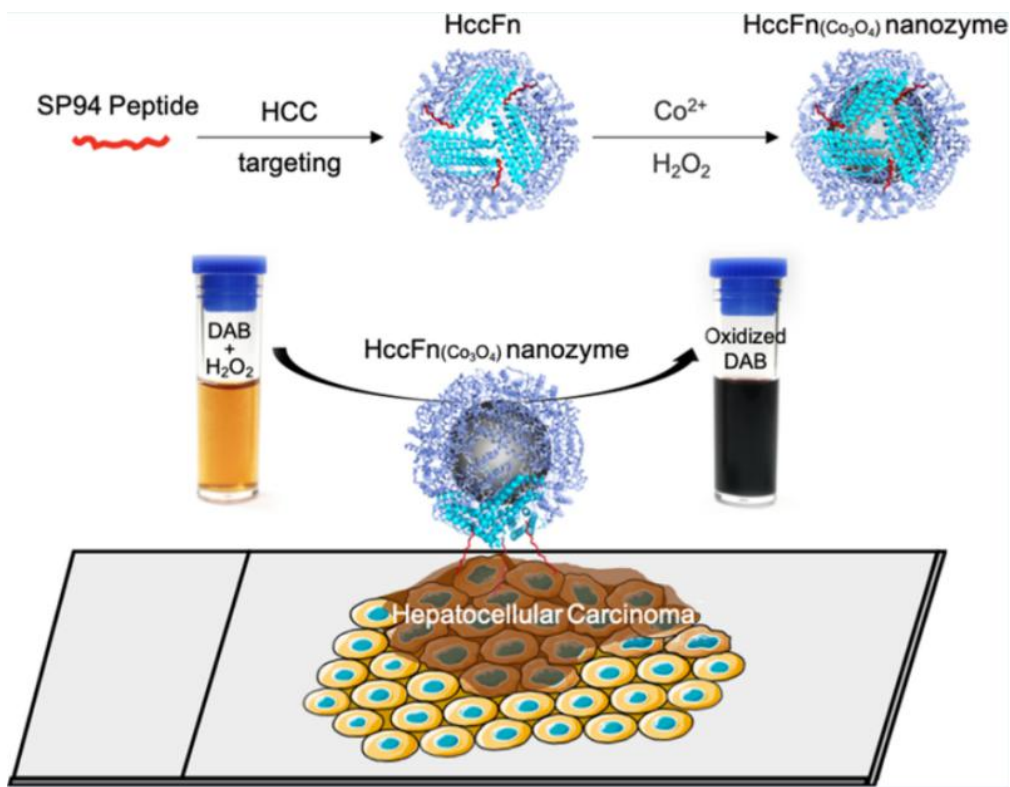


图 1-27 基于铁蛋白的钴纳米酶检测肝癌示意<sup>[64]</sup>。

Figure 1-27 Ferritin-based cobalt nanozyme for prognostic diagnosis of hepatocellular carcinoma <sup>[64]</sup>

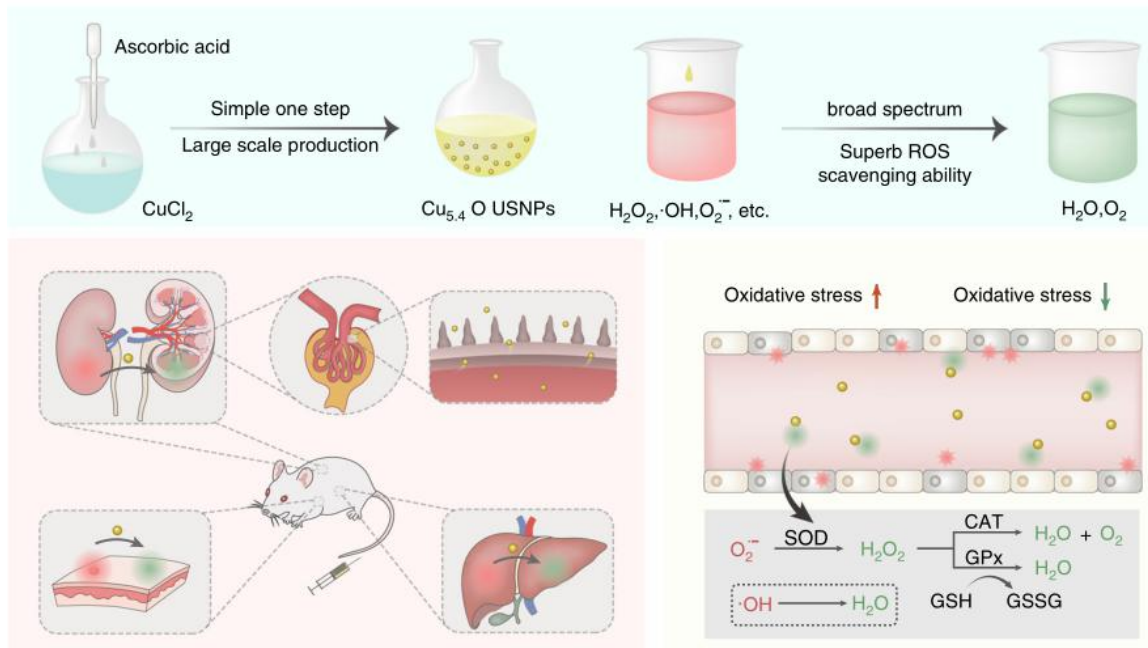


图1-28  $\text{Cu}_{5.4}\text{O}$ 超小纳米粒子治疗活性氧相关疾病的示意图<sup>[65]</sup>。

Figure 1-28 Schematic illustration of  $\text{Cu}_{5.4}\text{O}$  ultrasmall nanoparticles in the treatment of ROS-related diseases<sup>[65]</sup>.

$\text{Cu}_{5.4}\text{O}$ 纳米粒子同时具有过氧化氢酶、超氧化物歧化酶和谷胱甘肽过氧化物酶特性，在极低剂量下对活性氧介导的细胞损伤具有保护作用，并对改善急性肾损伤、急性肝损伤和促进伤口愈合有很好的治疗效果。同时，超小尺寸的 $\text{Cu}_{5.4}\text{O}$ 纳米粒子能够使纳米材料快速肾清除，保证生物安全性。

另一方面，外周 $\beta$ 淀粉样蛋白 ( $\text{A}\beta$ ) 的清除有助于克服血脑屏障 (BBB) 障碍，消除阿尔茨海默病 (AD) 相关的脑源性 $\text{A}\beta$ 。即便如此，当前开发的清除外周 $\text{A}\beta$ 的治疗方法仍面临着如何避免某些生物分子的干扰，以及如何防止触发免疫反应和凝血的挑战。最近Qu等<sup>[66]</sup>报道了一种具有增强蛋白质吸附抗性、最小化免疫原性和增强生物相容性的纳米酶 ( $\text{Cu}_x\text{O}@EM\text{-K}$ )。如图1-29，该 $\text{Cu}_x\text{O}@EM\text{-K}$ 由修饰有3xTg-AD小鼠红细胞膜包裹 $\text{Cu}_x\text{O}$ 纳米酶制成，该红细胞膜具有 $\text{A}\beta$ 靶向性五肽KLVFF。KLVFF作为 $\text{A}\beta$ 特异性配体，与红细胞膜一起选择性地捕获血液中的 $\text{A}\beta$ 。同时，红细胞膜涂层阻止蛋白质冠状物的形成，从而保持 $\text{Cu}_x\text{O}@EM\text{-K}$ 在生物液体中保存的 $\text{A}\beta$ 靶向能力。更重要的是，具有多种抗氧化酶样活性的 $\text{Cu}_x\text{O}$ 核心稳定了外层红细胞膜，同时减轻了 $\text{A}\beta$ 诱导的膜氧化损伤，从而延长必需的全身循环了吸附 $\text{A}\beta$ 。

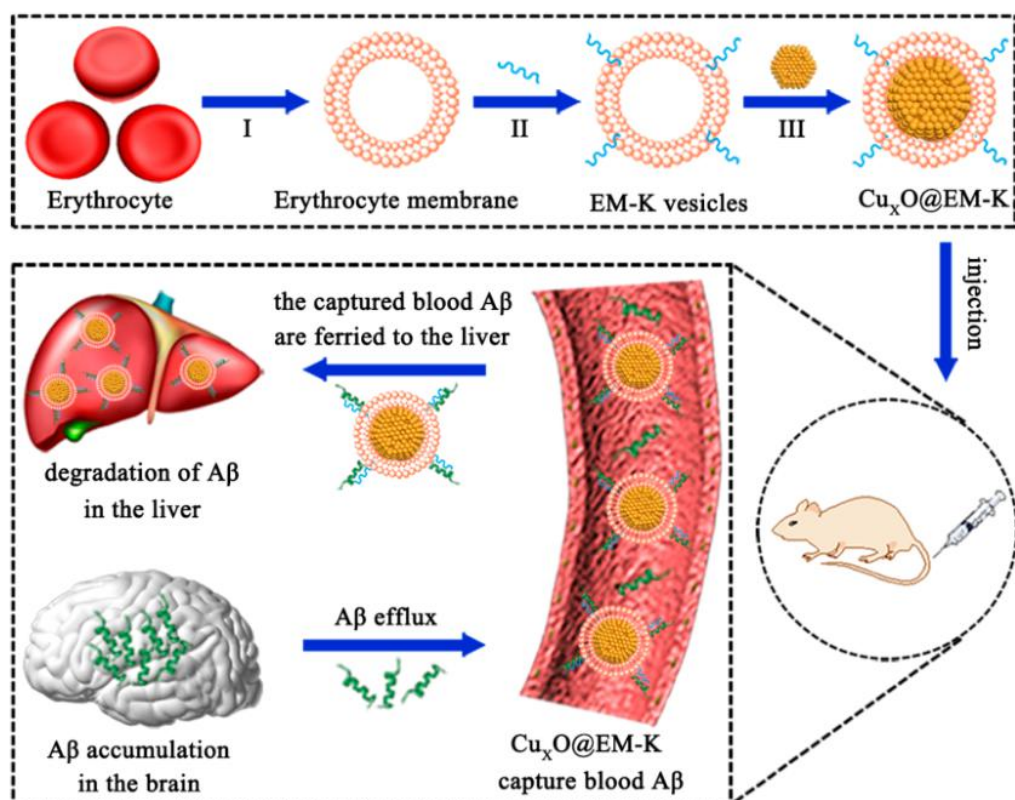


图 1-29 氧化铜纳米粒子包覆红细胞膜清除外周 $\beta$ 淀粉样蛋白示意图<sup>[66]</sup>。

Figure 1-29 Schematic diagrams of  $\text{Cu}_x\text{O}@EM-K$  synthesis and peripheral  $\text{A}\beta$  clearance by  $\text{Cu}_x\text{O}@EM-K$ <sup>[66]</sup>.

2019年Lin等<sup>[67]</sup>还构建了一种基于中空介孔 $\text{Cu}_2\text{MoS}_4$  负载葡萄糖氧化酶的多功能级联生物反应器,用于结合化学动态疗法/饥饿疗法/光热疗法/免疫疗法进行协同治疗癌症。如图1-30,  $\text{Cu}_2\text{MoS}_4$ 具有类芬顿、谷胱甘肽过氧化物酶和类过氧化氢酶活性。通过EPR效应到达肿瘤后,可通过类芬顿反应产生羟自由基,并消耗肿瘤微环境中过量表达的谷胱甘肽,以减弱肿瘤的抗氧化能力。此外,在缺氧TME条件下,  $\text{Cu}_2\text{MoS}_4$ 的过氧化氢酶活性可与肿瘤微环境内的 $\text{H}_2\text{O}_2$ 反应生成 $\text{O}_2$ ,激活葡萄糖被氧化进行饥饿治疗,并伴随 $\text{H}_2\text{O}_2$ 的再生。再生的 $\text{H}_2\text{O}_2$ 可用于类芬顿反应。同时,在1064 nm激光照射下,由于其优异的光热转换效率( $\eta = 63.3\%$ ),表现出显著的光热肿瘤杀伤能力。更重要的是,基于聚乙二醇化的 $\text{Cu}_2\text{MoS}_4$ 负载葡萄糖氧化酶的协同治疗结合检查点阻断治疗可以引发强大的免疫反应,从而有效地消融原发性肿瘤并抑制癌症转移。

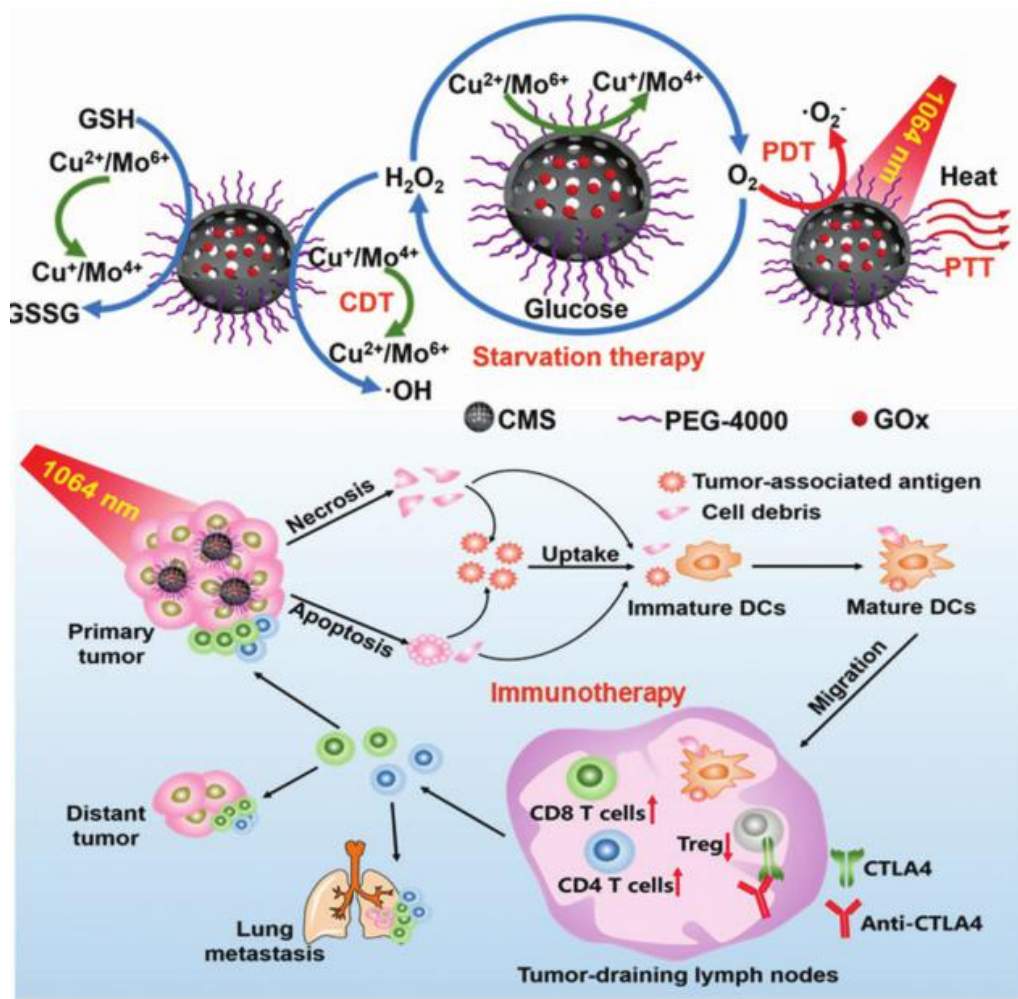


图1-30 聚乙二醇化 $\text{Cu}_2\text{MoS}_4@\text{GOx}$ 的制备和协同治疗机理示意图<sup>[67]</sup>。

Figure 1-30 Schematic illustration of fabrication and mechanism of PEGylated  $\text{CMS}@\text{GOx}$  for PTT/PDT/CDT/starvation therapy<sup>[67]</sup>.

2019年Wen等<sup>[141]</sup>也提出一种 $\text{Cu}_{2-x}\text{Te}$ 纳米酶用于肿瘤催化免疫疗法，如图1-31。首先该纳米酶具有谷胱甘肽过氧化物酶活性，可以氧化GSH改善肿瘤氧化应激。并且 $\text{Cu}_{2-x}\text{Te}$ 纳米酶还具有过氧化物酶活性催化 $\text{H}_2\text{O}_2$ 产生活性氧。该纳米酶的缺陷结构导致其在近红外区有较强光吸收，从而可以实现很好的光热效应。Wen等发现在1064 nm激光照射下， $\text{Cu}_{2-x}\text{Te}$ 纳米酶不仅可以有效抑制原位瘤生长，还可以改变免疫抑制微环境，激活免疫治疗并建立免疫记忆来防止肿瘤复发。

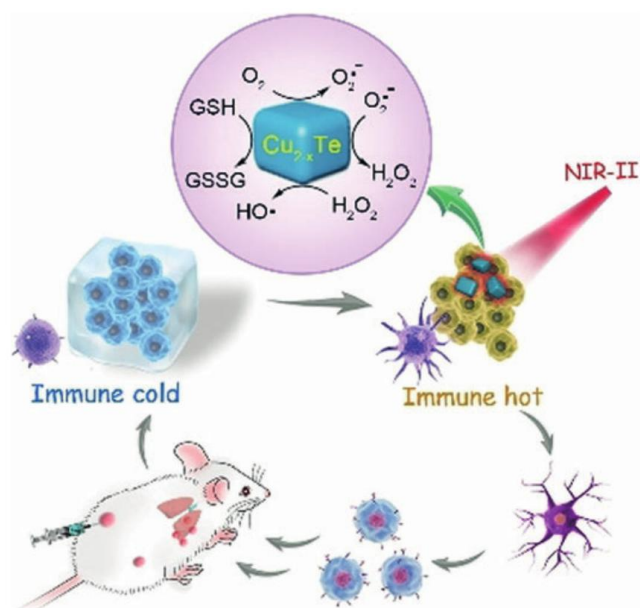


图1-31  $\text{Cu}_{2-x}\text{Te}$ 纳米酶在近红外二区激光照射下协同治疗方式激活免疫治疗<sup>[141]</sup>。

Figure 1-31 Schematic of  $\text{Cu}_{2-x}\text{Te}$  nanozyme catalyzed cascade reactions: antitumor immunotherapy reinforced by NIR-II light<sup>[141]</sup>.

2021年阎锡蕴团队<sup>[68]</sup>最新设计了一种新型纳米酶，即硫铁矿（ $\text{FeS}_2$ ）纳米酶。如图1-32。她们发现这种纳米酶结合 $\text{H}_2\text{O}_2$ 底物的亲和力极高，催化 $\text{H}_2\text{O}_2$ 的效率（ $k_{\text{cat}}/K_M$ ）比传统 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 纳米酶高4144倍，比天然辣根过氧化物酶高3086倍。并使用第一性原理探究了原因，发现与传统的 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 纳米酶相比， $\text{FeS}_2$ 纳米酶与 $\text{H}_2\text{O}_2$ 相互作用时配位结合的共价键更短，而且表面含有很多沟壑状结构，使其与底物的结合更稳定，因此能够催化肿瘤部位的 $\text{H}_2\text{O}_2$ ，产生羟基自由基引起肿瘤细胞凋亡。该纳米酶不仅对 $\text{H}_2\text{O}_2$ 有很高的亲和力，而且还同时具有谷胱甘肽氧化酶的活性，可以氧化细胞中的还原型谷胱甘肽。因此， $\text{FeS}_2$ 纳米酶蕴含两种类酶活性，谷胱甘肽氧化酶和过氧化物酶，构成级联反应，能够持续地产生羟基自由基引起更多肿瘤细胞的凋亡。此外，谷胱甘肽氧化酶活性还会引起GSH的消耗，而GSH是膜脂修复酶-谷胱甘肽过氧化物酶4的辅因子（GPX4），它的耗竭会导致后者的失活，使得细胞中的脂质过氧化物不能被有效清除，引起细胞铁死亡。

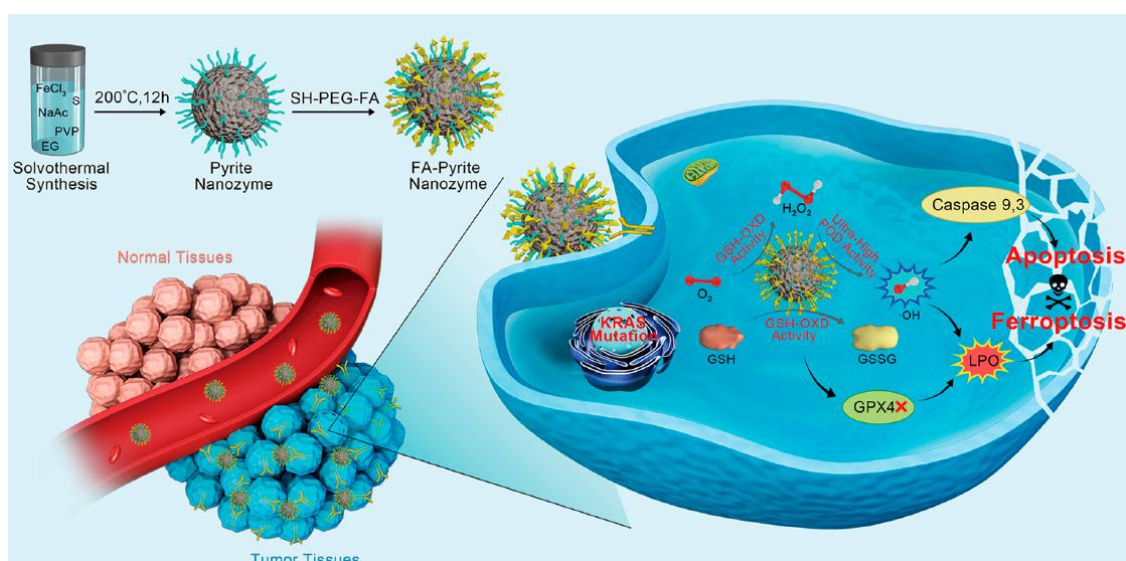


图 1-32 自级联硫铁矿纳米酶的过氧化物酶活性和谷胱甘肽氧化酶活性催化抗肿瘤机理图<sup>[68]</sup>。

Figure 1-32 Schematic illustration of the self-cascade pyrite nanozymes with ultrahigh POD-like catalytic activity and intrinsic GSH-OXD mimicking ability for apoptosis-ferroptosis synergistic tumor therapy<sup>[68]</sup>.

这一类具有多酶活性的纳米酶克服了传统芬顿类试剂对 pH 值要求苛刻的问题，能够催化肿瘤部位的  $H_2O_2$  产生大量羟基自由基。同时，一些多功能纳米酶的氧化酶活性不仅能为其过氧化物酶活性的发挥提供底物  $H_2O_2$ ，而且能催化氧化谷胱甘肽，引起细胞铁死亡，从而实现肿瘤的凋亡和铁死亡协同治疗。重要的是，单一材料即可实现高效、安全的肿瘤治疗效果，表明它具有很大的临床转化潜力。此外，纳米酶在抗菌、细胞保护、治疗帕金森症等众多疾病治疗中都有应用。虽然纳米酶在疾病治疗中显示出巨大的应用前景，但其生物安全性仍是一个问题。纳米酶用于临床治疗还有很长的路要走。

### 1.2.5 存在的主要问题

纳米酶在生物医学领域应用广泛，包括靶向癌症治疗、诊断医学、生物传感甚至环境毒理学。纳米酶在生物医学中的应用是一个比较新的研究领域，虽然发展迅速，但仍存在不少问题和挑战。基于纳米酶在肿瘤靶向治疗方面的应用主要存在材料自身治疗效率不高，和生物体或肿瘤微环境限制两方面问题。一方面，一些纳米酶活性单一治疗效率低，而通过载体负载多种纳米材料的解决方案有存在结构不稳定、制备过程复杂等问题。因此，开发设计简单、多功能的“机器人”纳米酶以可控调节来提高治疗效率是非常必要的。另一方面，肿瘤微环境的“土壤”也会在一定程度上限制其治疗效率。因此，“因地制宜”根据肿瘤微环境的具体情况

设计多功能纳米酶，用以调节肿瘤微环境同样重要。

另外，在一些纳米酶介导的化学动力疗法中，由于底物有限等制约因素限制了治疗效率的提高。而纳米酶本身不仅可以模仿天然酶，其优异的物理化学性质还可以结合光、声等外部刺激实现多种治疗方式的协同作用，多样的酶活性也可为并行引入其他的治疗方式提供了丰富的可能性，一些纳米酶甚至还可以像在自噬机制中一样直接操纵特定的生物通路。这些能力使纳米酶成为治疗和诊断应用的强有力工具。但是如何精确设计，完美发挥其特定功能，“扬长避短”是关键。

最后，无机纳米酶在医学领域还有很长的路要走，特别是临床应用的关键还在于将其生物安全性提高到一个新的台阶。在理想情况下，纳米颗粒在生物体内逐渐降解，最终排出体外，而不引起显著的生物毒性。但是目前开发的用于癌症靶向治疗的纳米酶几乎都是生物体无法自然降解的，因为无机纳米粒子比有机可降解的纳米粒子具有更强的化学和机械稳定性。对于纳米粒子的生物医学应用来说，这一特性是一把双刃剑，因为它虽然决定了纳米粒子的独特诊疗功能，但也引发了其生物安全性的关切。因此，开发和利用可生物降解的纳米酶迫在眉睫。而针对无机纳米酶，人们一方面在寻找无金属纳米酶，如含碳或氮等非金属元素的纳米材料来降低生物毒性；另一方面，只有尺寸小于 10 nm 的纳米粒子才能直接从肾脏和尿液中排出。虽然这些可快速清除的纳米粒子可能对生物成像有用，但不利于药物输送和治疗，所以一些研究者也致力于开发一些尺寸可变的纳米材料，设计目标在于使其首先靶向至肿瘤部位后，尺寸最终变小并被生物体排出体外。

## 1.3 研究目标、研究内容及拟解决的关键问题

### 1.3.1 研究目标

综上所述，纳米酶在纳米尺度上独特的物理化学性质和优异的酶活性使其在生物医学应用中具有优异的体内催化性能。用于体内肿瘤治疗的纳米酶引起了广泛关注。然而，对基于纳米酶的肿瘤治疗来说，更系统地根据生物系统复杂性设计纳米酶的活性和结构，来提高其工作效率并减小生物毒性是非常必要的。因此，本研究的工作目标一是根据肿瘤微环境的特异性，设计并制备一种多功能的纳米酶，通过特异性“驯化”肿瘤微环境，来提高治疗效率，并且通过设计肿瘤微环境响应的尺寸可变的纳米酶，来降低其生物毒性。二是将纳米酶的催化治疗性能与外部刺激有机结合，实现相互协同促进的治疗方式，并探索纳米酶介导的治疗方式与免疫治疗的结合的可能性。

### 1.3.2 研究内容

在第一阶段研究中，我们将以钴纳米球为牺牲模板，合成具有多酶活性的空心  $\text{CoO@AuPt}$  纳米酶簇，研究该  $\text{CoO}$  结构在体外模拟肿瘤微环境和实体瘤内的弱酸性和过表达  $\text{H}_2\text{O}_2$  存在下的结构瓦解情况。然后在体外验证该纳米酶的多酶活性： $\text{AuPt}$  纳米酶具有过氧化物酶活性，在催化  $\text{H}_2\text{O}_2$  生成 $\cdot\text{OH}$  的同时，可有效地将还原性  $\text{GSH}$  氧化为  $\text{GSSG}$ ，极大地保护生成的活性氧被氧化应激消耗。另一方面， $\text{AuPt}$  纳米酶还可模拟过氧化氢酶催化  $\text{H}_2\text{O}_2$  分解产氧气。此外， $\text{AuPt}$  的葡萄糖氧化酶活性还可催化细胞内葡萄糖的快速分解，获得的大量  $\text{H}_2\text{O}_2$  作为催化底物，进一步促进了  $\text{O}_2$  和 $\cdot\text{OH}$  的生成。这种循环型葡萄糖消耗和  $\text{H}_2\text{O}_2$  再生理念，有望实现肿瘤的饥饿疗法，还可能提高  $\text{CDT}$  的治疗效果。研究初期，我们将在细胞层面评估该纳米酶对癌细胞的杀伤效果。后期则通过小鼠肿瘤模型评估  $\text{AuPt}$  纳米酶的治疗效果和体内清除情况。

在第二阶段研究中，我们将通过溶剂热法合成具有花状结构的多功能纳米酶  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ ，并在其表面修饰  $\text{PEG}$  以增加其生物相容性得到  $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-PEG}$  (CFP)。首先，该铁酸钴纳米酶不仅具有类过氧化物酶的活性，能响应催化肿瘤微环境中过表达的  $\text{H}_2\text{O}_2$  产生羟基自由基实现化学动力疗法，还具有类过氧化氢酶活性，可分解  $\text{H}_2\text{O}_2$  产生氧气。更重要的是，该纳米酶由于具有较小的带隙能，可以作为一种无机声敏剂。并且，其类过氧化氢酶活性可以催化肿瘤微环境中的  $\text{H}_2\text{O}_2$  产生氧气，实现自增强的声动力效率，从而克服传统无机声敏剂的氧气水平依赖缺陷。同时，铁酸钴还可辅助增强  $\text{MRI}$  生物成像效果。后期研究将集中在肿瘤微环境中自增强声动力疗法和化学动力疗法的协同治疗效果，探索该纳米酶介导的多种治疗方式对转移相关蛋白的调节作用，并验证该治疗方式是否能够引起细胞免疫原性死亡。

### 1.3.3 拟解决的关键问题

(1) 化学动力治疗中类芬顿催化剂在偏酸性条件下 ( $\text{pH} = 3.0\text{-}5.0$ ) 才能发挥更好的作用，生成的活性氧易于被高水平的胞内谷胱甘肽快速消耗，而且化学动力的效率通常受限于  $\text{H}_2\text{O}_2$  作为催化底物不足的限制。因此，设计的多功能纳米酶需在弱酸性条件下发挥作用，并且同时能消耗谷胱甘肽增加活性氧杀伤力，更重要的是通过葡萄糖氧化酶的活性提高催化底物  $\text{H}_2\text{O}_2$  的量，以此“驯化”肿瘤微环境提高化学动力疗法效率。

(2) 对于生物体不能降解的纳米材料，只有尺寸小于  $10\text{ nm}$  的纳米颗粒才能直接从肾脏和尿液中排出。但是，纳米药物的原尺寸至少需要大于  $50\text{ nm}$  才可通过被动靶向富集至肿瘤部位。因此，我们拟通过模板法先制备纳米酶簇，用以通

过 EPR 效应被动靶向至肿瘤微环境，并设计使其尺寸在肿瘤微环境响应下变小，从而易于排出体外，以此提高其生物安全性。

(3) 肿瘤乏氧微环境对声动力疗法的治疗效果具有一定的抑制作用。通过设计开发同时具有多酶活性的无机声敏剂有利于声动力效率的自增强，利用多功能纳米酶实现化学动力和声动力的协同治疗。

(4) 通过纳米酶介导的化学动力和声动力治疗方式还有可能促进癌细胞免疫原性死亡，但如何将免疫抑制的肿瘤微环境转化为免疫支持状态，从而提高癌症免疫治疗的功效，仍需系统性的研究验证。

## 第2章 CoO@AuPt 自解聚纳米酶簇用于肿瘤微环境多级响应的化学动力治疗

### 2.1 引言

就缺氧肿瘤微环境而言,肿瘤细胞中活性氧水平显著上调,部分原因是由于代谢速率加快、线粒体功能障碍和过氧化物酶活性增强<sup>[69-72]</sup>。然而,极高水平的活性氧可能激活抗肿瘤信号,并在这种氧化应激下导致不可逆的细胞损伤,这种氧化应激最近被开发为一种有前途的肿瘤治疗方法<sup>[73-76]</sup>。羟基自由基( $\cdot\text{OH}$ )、过氧化物离子( $\text{O}_2^{2\cdot}$ )、单线态氧( $^1\text{O}_2$ )、超氧阴离子( $\cdot\text{O}_2^-$ )和其他代表性的活性氧已被广泛用于诱导肿瘤细胞的氧化损伤<sup>[77-78]</sup>。此外,许多与活性氧相关的治疗方法,如光动力疗法或声动力疗法,主要依赖于实施过程中的局部氧气水平<sup>[79-82]</sup>。然而,肿瘤细胞不受控制的增殖和血管的不均匀渗透性通常会由于氧气消耗的加剧和氧气输送的不足而形成缺氧微环境,这不利于实现高效的光动力疗法或声动力疗法<sup>[83-85]</sup>。相比之下,化学动力疗法可以利用  $\text{H}_2\text{O}_2$  通过芬顿或类芬顿反应产生羟基自由基损伤细胞,而不依赖于外部能量供给或局部氧气水平<sup>[86-88]</sup>。各种无机芬顿试剂,如铁基纳米材料、过渡金属离子( $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 和 $\text{Co}^{2+}$ )和金属有机框架,最近已广泛用于化学动力疗法<sup>[89-93]</sup>。然而,这些类芬顿催化剂在偏酸性条件下( $\text{pH} = 3.0-5.0$ )才能更好地发挥作用。并且在肿瘤微环境生成的活性氧易于被细胞内的谷胱甘肽快速消耗。而且化学动力疗法的效率通常受限于催化底物  $\text{H}_2\text{O}_2$  的不足。因此,调节化学动力疗法的反应微环境,包括降低  $\text{pH}$  值、增加  $\text{H}_2\text{O}_2$  水平和降低谷胱甘肽含量,都是提高化学动力治疗效率非常理想的方法<sup>[94]</sup>。然而,由于上述肿瘤微环境的限制,许多常规芬顿试剂的功能不足以获得令人满意的治疗结果<sup>[95]</sup>。因此,开发新型纳米材料以克服肿瘤微环境对化学动力疗法效率的限制变得越来越重要。

与此同时,纳米酶因其具有催化活性高、稳定性好、易于制备/纯化等独特优势而受到越来越多的关注<sup>[96-98]</sup>。许多纳米材料由于其尺寸、成分和结构不同表现出不同的类酶活性,广泛应用于生物分析、环境监测<sup>[99-101]</sup>。例如,铂纳米颗粒表现出多种类酶的活性,如超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、过氧化物酶和尿酸酶<sup>[102-105]</sup>。金纳米颗粒也具有独特的表面增强拉曼散射和多种类酶活性<sup>[106-111]</sup>,如柠檬酸包覆的金具有葡萄糖氧化酶活性。此外,与单独的  $\text{Au}$  或  $\text{Pt}$  相比,  $\text{AuPt}$  纳米酶有更高的催化活性<sup>[112,113]</sup>。并且尺寸偏小的纳米颗粒也容易被肾清除<sup>[114,115]</sup>。

本章研究工作以  $\text{Co}$  纳米球为模板和还原剂<sup>[116,117]</sup>,创新性地合成了一种具有多酶活性的  $\text{CoO@AuPt}$  纳米酶簇,该材料在正常生理条件下展现出了良好的生物

相容性（图 2-1）。在增强渗透滞留效应的作用下，该纳米酶簇可在肿瘤区域快速高效富集，CoO 框架在弱酸性和  $\text{H}_2\text{O}_2$  环境中快速降解为  $\text{Co}^{2+}$ ，并使 AuPt 双金属纳米酶簇快速解聚，释放具有更高催化活性的小尺寸纳米酶<sup>[118,119]</sup>，实现对肿瘤的特异性杀伤。该策略可有效避免传统超小 Au、Pt 纳米酶在体内循环过程中的快速清除。此外，解聚的纳米酶在实体瘤中具有更深的穿透深度，且更容易被机体代谢出体外。AuPt 纳米酶具有过氧化物酶活性，在催化  $\text{H}_2\text{O}_2$  生成  $\cdot\text{OH}$  的同时，可有效地将还原性 GSH 氧化为 GSSG，极大地保护生成的活性氧簇。另一方面，AuPt 纳米酶可模拟过氧化氢酶催化  $\text{H}_2\text{O}_2$  分解产生氧气。此外，AuPt 纳米酶还可催化氧化细胞内葡萄糖，反应获得的大量  $\text{H}_2\text{O}_2$  作为底物进一步促进了  $\text{O}_2$  和  $\cdot\text{OH}$  的生成。这种循环型葡萄糖消耗和  $\text{H}_2\text{O}_2$  再生机制，不仅实现了肿瘤的饥饿疗法，更显著提高了化学动力的治疗效果。综上所述，该空心纳米酶簇可有效响应肿瘤微环境，其具有的多酶催化活性可有效增强化学动力疗法，该材料的设计方法对未来发展新型纳米酶并应用于生物医学领域具有重要指导意义。

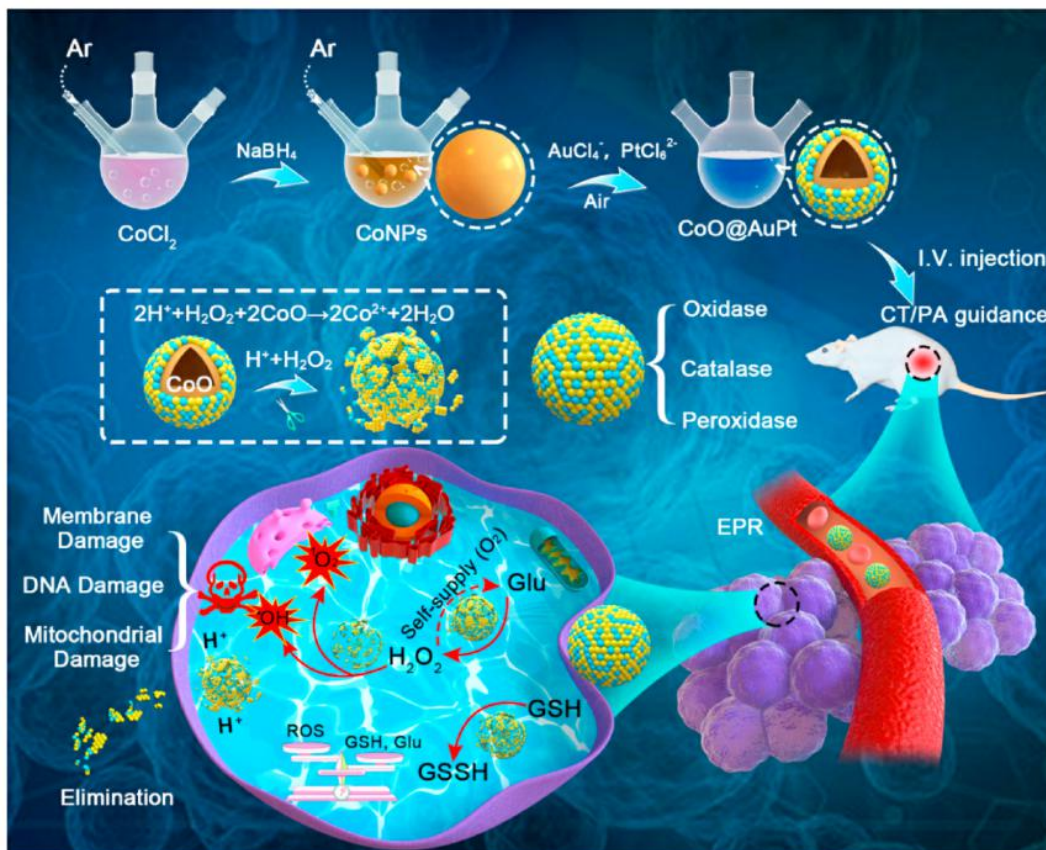


图2-1 空心CoO@AuPt纳米粒子的合成过程和增强癌症化学动力疗法的工作机制。

Figure 2-1 Schematic illustration to indicate the synthetic procedure of hollow CoO@AuPt and the working mechanism for augmented CDT of cancer.

## 2.2 实验部分

### 2.2.1 实验仪器

表 2-1 主要实验仪器

实验仪器	型号	生产厂家
紫外可见分光光度计	UV-1800	日本岛津公司
X 射线粉末衍射仪	XRD-7000	日本岛津公司
X 射线电子能谱仪	ESCALAB 250Xi	Thermo Fisher
荧光分光光度计	RF-5301PC	日本岛津公司
流式细胞仪	NovoCyte 2060R	艾森生物公司
激光共聚焦显微镜	Zeiss LSM 800	德国蔡司公司
荧光显微镜	IX73	日本奥林巴斯
酶标仪	SPARK-10M	瑞士帝肯公司
动态光散射粒度仪	Nano ZS90	英国马尔文公司
透射电子显微镜	JEM-2100	日本 JEOL
热场发射扫描电子显微镜	JSM-7800F	日本 JEOL
红外热成像仪	Fluke, TiS55	美国福禄克公司
电感耦合等离子体发射光谱仪	OPTIMA 8000DV	新加坡 ABI
电子自旋顺磁共振波谱	EMX Nano	布鲁克
动物血常规分析仪	BC-2600Vet	中国迈瑞

## 2.2.2 实验药品

表 2-2 本研究中所用到实验药品

试剂名称	化学式	规格	生产厂家
氯化钴	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	98%	Aladdin
柠檬酸钠	$\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$	99%	Aladdin
氯金酸	$\text{HAuCl}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	99%	Sigma-Aldrich
氯铂酸	$\text{H}_2\text{PtCl}_6 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	99%	Adamas Beta
硼氢化钠	$\text{NaBH}_4$	98%	Aladdin
葡萄糖	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	98%	悦翔化工
对苯二甲酸	$\text{C}_8\text{H}_6\text{O}_4$	98%	Sigma-Aldrich
噻唑蓝 (MTT)	$\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{BrN}_5$	98%	Aladdin
甲醛	$\text{HCHO}$	4%	武汉塞维尔
二甲亚砜 (DMSO)	$(\text{CH}_3)_2\text{OS}$	>99.9%	碧云天
二甲苯	$\text{C}_8\text{H}_{10}$	>99%	Aladdin
水合氯醛	$\text{C}_2\text{H}_3\text{Cl}_3\text{O}_2$	>99%	麦克林

## 2.2.3 CoO@AuPt 纳米酶的制备

所有的玻璃器皿都用王水浸泡后清洗干净，以确保在使用前清除所有污染物。通过煮沸的方式制备除氧的去离子水。然后，将 100 mL 去离子水和 400  $\mu\text{L}$  0.1 M 柠檬酸钠溶液加入到三颈烧瓶中。接下来，通入氩气以彻底去除残余氧气，然后注入 100  $\mu\text{L}$  0.4 M 氯化钴溶液。加入  $\text{NaBH}_4$  溶液 (400  $\mu\text{L}$ , 1 M) 后，反应体系颜色由淡粉色逐渐变为棕灰色，表明 Co (II) 被还原形成钴纳米球。反应进行 20 min 后，加入 600  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{PtCl}_6$  和  $\text{HAuCl}_4$  混合物 (摩尔比为 4:1, 25 mM)。然后，立即关闭氩气流，并将反应体系在空气中搅拌 30 min。得到中空的 CoO@AuPt 纳米粒子用去离子水离心洗涤。

### 2.2.4 CoO@AuPt 纳米酶的特征

用透射电子显微镜 (TEM, JEM-2100, 日本 JOEL) 和场发射扫描电子显微镜 (FESEM, JSM-7800F, 日本 JOEL) 观察了空心 CoO@AuPt 纳米粒子的表面形貌和晶体结构。通过动态光散射 (DLS) 测量产物的流体力学尺寸和表面电势。使用分光光度计 (UV-1800, 日本岛津) 测量空心 CoO@AuPt 纳米粒子的紫外可见近红外吸收光谱。纳米结构的晶形通过使用具有  $\text{CuK}\alpha$  辐射 ( $\lambda = 1.5406\text{\AA}$ ) 的 X 射线衍射仪 (XRD-7000, 岛津) 来表征。样品的表面化学元素价态由 X 射线光电子能谱仪表征得到 (XPS)。

### 2.2.5 CoO@AuPt 氧化酶和过氧化物酶活性测试

为了模拟无氧条件, 测试用的缓冲溶液试验前通入氩气以除去溶液中的溶解氧。利用紫外可见分光光度计, 通过测量 TMB 作为底物被氧化后在 652 nm 处的特征吸收, 来表征其氧化酶和过氧化物酶活性, 分析了 CoO@AuPt 纳米酶的催化性能。具体步骤如下, 将  $20\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  CoO@AuPt 纳米酶分散在磷酸盐缓冲液中 ( $0.1\ \text{M}$ ,  $\text{pH} = 5.7$ ), 然后加入 TMB, 终浓度为  $100\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。为了测定类过氧化物酶活性, 向磷酸盐缓冲液中引入  $10\ \text{mM}\ \text{H}_2\text{O}_2$ , 然后测 TMB 被氧化后的紫外吸收光谱。同样使用了 OPD 作为底物进行类过氧化物酶活性测试。OPD 的工作浓度为  $200\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 再添加 CoO@AuPt 纳米酶使其终浓度为  $20\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 和  $10\ \text{mM}\ \text{H}_2\text{O}_2$  反应 5 min 后测量反应物体系在 490 nm 处的吸光度。

### 2.2.6 CoO@AuPt 过氧化氢酶活性测试

在不同 pH 值的磷酸盐缓冲溶液中加入 CoO@AuPt 纳米酶使其终浓度为  $20\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。加入  $10\ \text{mM}$  的  $\text{H}_2\text{O}_2$  后立即用便携式溶解氧测定仪检测溶液中溶解氧浓度。并用紫外可见分光光度计测量  $\text{H}_2\text{O}_2$  在 240 nm 处的特征吸收来监测剩余  $\text{H}_2\text{O}_2$  的量。

### 2.2.7 CoO@AuPt 消耗葡萄糖实验

使用 DNS (3,5-二硝基水杨酸) 试剂法测量葡萄糖的消耗。DNS 配置方法如下: 将  $36.4\ \text{g}\ \text{KNaC}_4\text{O}_6\cdot 4\text{H}_2\text{O}$  溶解在  $100\ \text{mL}$  去离子水中, 然后加入  $1.26\ \text{g}\ \text{C}_7\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_7$ 、 $4.25\ \text{g}\ \text{NaOH}$  和  $1\ \text{g}$  苯酚。连续搅拌混合物使其充分溶解。在黑暗中向上述溶液中加入  $200\ \text{mL}$  去离子水制备 DNS 工作试剂。将不同浓度的 CoO@AuPt 与葡萄糖溶液 ( $1\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 混合后在  $37^\circ\text{C}$  的摇床反应 8 小时。然后将收集的上清液 ( $1\ \text{mL}$ ) 与去离子水和 DNS 工作液 1:1:1 混合, 随后在  $100^\circ\text{C}$  下水浴中使反应进行 5 分钟。使用酶标仪测量反应物在 532 nm 处的吸收强度。

### 2.2.8 CoO@AuPt 消耗谷胱甘肽实验

GSH 的消耗是用 DTNB（二硝基甲苯）试剂检测的，将 DTNB 溶解在 pH 值为 8 的磷酸盐缓冲溶液中使浓度为  $4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，并加入 EDTA 使其终浓度为  $1 \text{ mM}$ 。将不同浓度的 CoO@AuPt 分散在  $1 \text{ mL } 0.2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  谷胱甘肽中，并将反应体系在  $37^\circ\text{C}$  摇床反应 4 h。然后将  $400 \mu\text{L}$  DTNB 加入到上述溶液中，并进一步孵育 30 min。最后使用酶标仪读取上清液在  $412 \text{ nm}$  处的吸光度。为了测量细胞内谷胱甘肽的消耗，将 4T1 小鼠乳腺肿瘤细胞与不同浓度的 CoO@AuPt 在 96 孔板中孵育 8 h。然后，用  $50 \mu\text{L } 6.5\%$  TCA 溶液在  $4^\circ\text{C}$  裂解细胞 30 min。最后在每个孔中加入  $250 \mu\text{L}$  DTNB 试剂，用酶标仪测量  $412 \text{ nm}$  处的吸光度。

### 2.2.9 CoO@AuPt 产生活性氧能力测试

CoO@AuPt 纳米酶催化  $\text{H}_2\text{O}_2$  产生羟基自由基 ( $\cdot\text{OH}$ ) 的能力通过对苯二甲酸来检测 (TPA) [120]。对苯二甲酸被羟基自由氧化后会形成有荧光的 2-羟基对苯二甲酸。 $5 \text{ mM}$  的 TPA 溶解在  $2 \text{ mM NaOH}$  溶液中，加入  $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  CoO@AuPt 纳米酶和  $10 \text{ mM H}_2\text{O}_2$  避光反应 1 h 后，用荧光分光光度计测量荧光光谱，激发波长为  $435 \text{ nm}$ 。二氢乙锭 (DHE) 同样作为活性氧检测指示剂，在活性氧存在下，DHE 被活性氧脱氢生成溴化乙锭。溴化乙锭可以与 DNA 或 RNA 结合产生红色荧光 ( $\lambda_{\text{ex}}$ :  $520 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}}$ :  $610 \text{ nm}$ )。细胞外实验额外添加  $5 \mu\text{M}$  的 RNA。此外，产生的  $^1\text{O}_2$  的由 SOSG 检测，它能与  $^1\text{O}_2$  特异性结合并产生具有绿色荧光产物 ( $\lambda_{\text{ex}}$ :  $488 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}}$ :  $525 \text{ nm}$ )。通过混合  $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  CoO@AuPt 纳米酶、 $10 \text{ mM H}_2\text{O}_2$  和  $1 \mu\text{M SOSG}$  为反应体系反应 5 min。最后，使用荧光光谱仪测量产物光谱。我们还使用电子自旋共振 (ESR) 证明了羟基自由基和单线态氧的产生。

### 2.2.10 CoO@AuPt 纳米酶体外解聚模拟

为了很好地模拟 CoO@AuPt 纳米酶在肿瘤微环境内的解聚，选择含  $10 \text{ mM H}_2\text{O}_2$  的 PBS 缓冲液在模拟不同酸碱度条件下进行体外解聚行为研究。步骤如下，将 CoO@AuPt 纳米酶分散到不同的缓冲溶液中，在  $37^\circ\text{C}$  孵育 24 h 后，用透射电镜直接观察纳米酶的形态，并用电感耦合等离子体质谱 (ICP-MS) 测定上清液中  $\text{Co}^{2+}$  的含量。

### 2.2.11 CoO@AuPt 纳米酶在癌细胞内产生活性氧能力检测

为了验证 CoO@AuPt 纳米酶在癌细胞内产生活性氧情况, 将 4T1 细胞接种在 12 孔板中过夜培养贴壁后 (每孔  $5 \times 10^4$  个), 与  $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  CoO@AuPt 纳米酶孵育 6 小时后, 用 PBS 洗涤干净未被内吞的材料, 然后用  $10 \mu\text{M}$  DCFH-DA 处理细胞 20 分钟, 随后用  $2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  Hoechst 33342 再染核 20 分钟。然后使用激光扫描共聚焦显微镜观察细胞内荧光。细胞内 DHE 染色是通过将  $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  CoO@AuPt 纳米酶处理后的细胞与  $10 \mu\text{M}$  DHE 孵育 20 分钟, 然后进行荧光观察并拍照。为了观察线粒体膜电位的变化, 根据碧云天 JC-1 试剂盒说明, 将经 CoO@AuPt 处理后的 4T1 细胞与 JC-1 试剂孵育 25 分钟, 并使用共聚焦进行观察拍照。为了观察该纳米酶产生 ROS 对癌细胞 DNA 的损伤, 进行了彗星电泳试验, 将 CoO@AuPt 纳米酶处理后的 4T1 细胞消化下来后均匀地分散在低熔点琼脂糖中, 该琼脂糖进一步铺在磨砂玻璃载玻片上。载有样品的载玻片在裂解缓冲液 (90%二甲基亚砷) 中于  $4^\circ\text{C}$  孵育 2 小时, 然后置于含有 DNA 解旋缓冲液的水平电泳槽中。浸泡 30 分钟后, 在电压 25 伏下电泳 30 分钟。随后, 载玻片用 Tris-HCl 缓冲液 ( $\text{pH} = 7.5$ ) 中和, 然后用  $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  PI 染色, 最后用共聚焦观察细胞核拖尾情况。

### 2.2.12 CoO@AuPt 纳米酶在细胞内暗场成像和生物电镜

为了观察 4T1 细胞对该纳米酶的内吞情况, 利用贵金属的暗场成像特性。将 4T1 细胞接种在盖玻片上过夜培养, 并与  $25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  CoO@AuPt 纳米酶孵育 6 小时。通过 PBS 冲洗除去游离的未被内吞的纳米酶, 再用 10%福尔马林缓冲液固定细胞 2 小时。此后, 使用 BX51 光学显微镜和数字暗场聚光器拍摄暗场图像。对于透射电镜, 将用 CoO@AuPt 纳米酶处理后细胞经胰蛋白酶消化后、离心 ( $1500 \times g$ , 4 min) 并用 2.5%戊二醛固定。然后用透射电镜观察超薄细胞切片。

### 2.2.13 CoO@AuPt 纳米酶的生物相容性

用人脐静脉内皮细胞 (HUVECs) 和鼠成纤维细胞 (L929) 评价了 CoO@AuPt 纳米酶的生物相容性。实验步骤如下, 4T1 细胞在接种在 96 孔板 ( $1 \times 10^4$ /孔) 中培养, 并用不同浓度的 CoO@AuPt 纳米酶处理 24 h。然后用 MTT 法来评估细胞活性。溶血率实验是先取 BALB/c 小鼠全血, 全血以  $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 5 分钟, 红细胞沉淀用  $1 \times \text{PBS}$  洗涤 3 次。然后, 将  $500 \mu\text{L}$  红细胞 (4%, v/v) 与不同浓度的 CoO@AuPt 纳米酶在 PBS 中混合。并在等体积去离子水中加入红细胞设为阳性对照。在  $37^\circ\text{C}$  孵育 6 小时后, 通过  $10000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 分钟收集上清液, 并使用酶标仪读取上清液在  $570 \text{ nm}$  处的吸收强度 (OD)。然后根据以下公式计算溶血率:

$$\text{溶血率}\% = [(\text{OD 样品} - \text{OD 阴性}) / (\text{OD 阳性} - \text{OD 阴性})] * 100\%$$

#### 2.2.14 CoO@AuPt 纳米酶对癌细胞的毒性检测

小鼠乳腺肿瘤细胞(4T1)、人宫颈癌细胞(HeLa)和人肝细胞肝癌细胞(HepG2)都用于体外细胞毒性评价。分别将细胞在 96 孔培养板 ( $1 \times 10^4$ /孔) 中过夜培养贴壁后,用不同浓度的 CoO@AuPt 纳米酶孵育 24 小时。然后用标准 MTT 法计算细胞活力。并进一步进行死活细胞荧光染色。步骤如下,将细胞接种在 24 孔板中过夜培养,然后用  $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  CoO@AuPt 纳米酶孵育 24 小时。然后用钙黄绿素 AM 和 PI 染色细胞,并用荧光显微镜观察细胞死亡情况。

#### 2.2.15 CoO@AuPt 纳米酶在小鼠体内毒性评价

健康雌性 BALB/c 小鼠 ( $n = 5$ ) 被用于评估 CoO@AuPt 纳米酶的体内系统毒性。具体步骤如下,小鼠通过尾静脉注射 0、25、50 或  $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  CoO@AuPt 纳米酶。给药后每天记录所有小鼠的体重。在第 15 天,使用动物血常规分析仪检测小鼠全血。并对小鼠进行解剖,切除的主要器官用 10%福尔马林固定,包埋在石蜡中,切成 10 mm 薄片,用苏木精和伊红染色,然后进行显微镜观察。

#### 2.2.16 建立 4T1 皮下移植瘤模型

所有的动物处理程序都遵循西南大学动物护理和使用机构委员会 (IACUC) 的批准,并按照《中国实验动物护理和使用国家规定》执行。将 4T1 乳腺肿瘤细胞植入 BALB/c 小鼠的后腿背部皮下区域,随后生长一个星期左右,直到肿瘤体积达到约  $200 \text{ mm}^3$ 。根据修正的椭球公式计算肿瘤体积  $V$ 。a 为宽度, b 为长度。

$$V = 0.5 \times b \times a^2$$

#### 2.2.17 生物分布和体内药物代谢动力学

15 只移植有 4T1 肿瘤的 BALB/c 小鼠通过尾静脉注射  $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  CoO@AuPt 纳米酶。分别在注射后的第 1、2、4、10 和 15 天,随机挑选 3 只小鼠处死并收集主要器官和肿瘤。然后,烘干后用王水溶解所有组织,用电感耦合等离子体质谱法 (ICP) 测定金、铂和钴的含量。为了研究 CoO@AuPt 纳米粒子的药代动力学,在静脉注射  $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  CoO@AuPt 纳米酶后,在不同时间点对小鼠 ( $n = 3$ ) 进行眼眶取血后,用王水消解后,ICP 定量检测血液中的金、铂和钴的浓度。

#### 2.2.18 CoO@AuPt 纳米酶的光声/CT 成像效果

首先在体外检测了不同浓度的 CoO@AuPt 纳米酶的光声成像效果。为了评估体内成像效果,给荷瘤小鼠静脉注射  $100 \mu\text{L}$  含  $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  CoO@AuPt 纳米酶的生理盐水溶液,并在注射 24 小时前后拍摄肿瘤区域的光声信号。Vevo LAZR-X 多模态成像系统用来采集声信号和处理成像数据。同样在体外检测了不同浓度的 CoO@AuPt 纳米酶的计算机断层扫描 (CT) 信号。体内成像效果同样通过给荷瘤

小鼠静脉注射 100  $\mu\text{L}$  含 10  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  纳米酶的生理盐水溶液，并在注射后的不同时间点采集肿瘤区域的 CT 图像。使用西门子 SOMATOM CT 扫描仪采集 CT 信号并处理成像数据。

### 2.2.19 CoO@AuPt 纳米酶的体内抗肿瘤效果

将 15 只荷瘤小鼠随机分为三组（每组 5 只），分别在第 1 天和第 7 天两次给药：生理盐水、阿霉素（DOX）（10  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ）和 CoO@AuPt 纳米酶（10  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ）。将药剂通过静脉注射或瘤内注射到每只小鼠体内。连续两周记录小鼠的体重和肿瘤体积。在第 15 天，处死所有小鼠并解剖得到实体瘤和主要器官（心脏、肝脏、脾、肺和肾），用福尔马林固定后进一步处理用于组织病理学分析。

### 2.2.20 统计学分析

除非另有说明，数据以平均标准偏差（SD）表示。统计学显著性（\* $p < 0.05$ ，\*\* $p < 0.01$ ，\*\*\* $p < 0.001$ ， $n = 4$ ）。

## 2.3 结果与讨论

### 2.3.1 CoO@AuPt 纳米酶结构表征

CoO@AuPt 纳米酶的绿色合成是以钴纳米核作为牺牲模板，通过离子置换反应合成的<sup>[98, 99]</sup>。SEM 和 TEM 图像清楚地显示了合成的 CoO@AuPt 纳米酶具有空心结构，由较小的颗粒组成具有均匀尺寸的壳形，（图 2-2a 和 2-2b）。CoO@AuPt 纳米酶的平均直径约为 36 nm，纳米壳厚度约为 4 nm。根据 HRTEM 图像，晶格间距测量为 0.21、0.23 和 0.24 nm，分别与金（200）、铂（111）和金（111）的晶面间距一致（图 2-2c）<sup>[122, 123]</sup>。还观察到明显异质结，这种纳米酶中异质结的存在会提高其催化活性，从而提高其酶活性。此外，能谱图进一步揭示了金、铂和钴的共存（图 2-2d 和图 2-3a）。此外，使用电感耦合等离子体质谱定量分析元素含量，金、铂和钴的摩尔比为 4:1:0.01（图 2-2e）。CoO@AuPt 的 XPS 图谱进一步证明了这种中空纳米结构的成功合成，并且没有任何杂质（图 2-2f、2-4a 和 2-4b）。

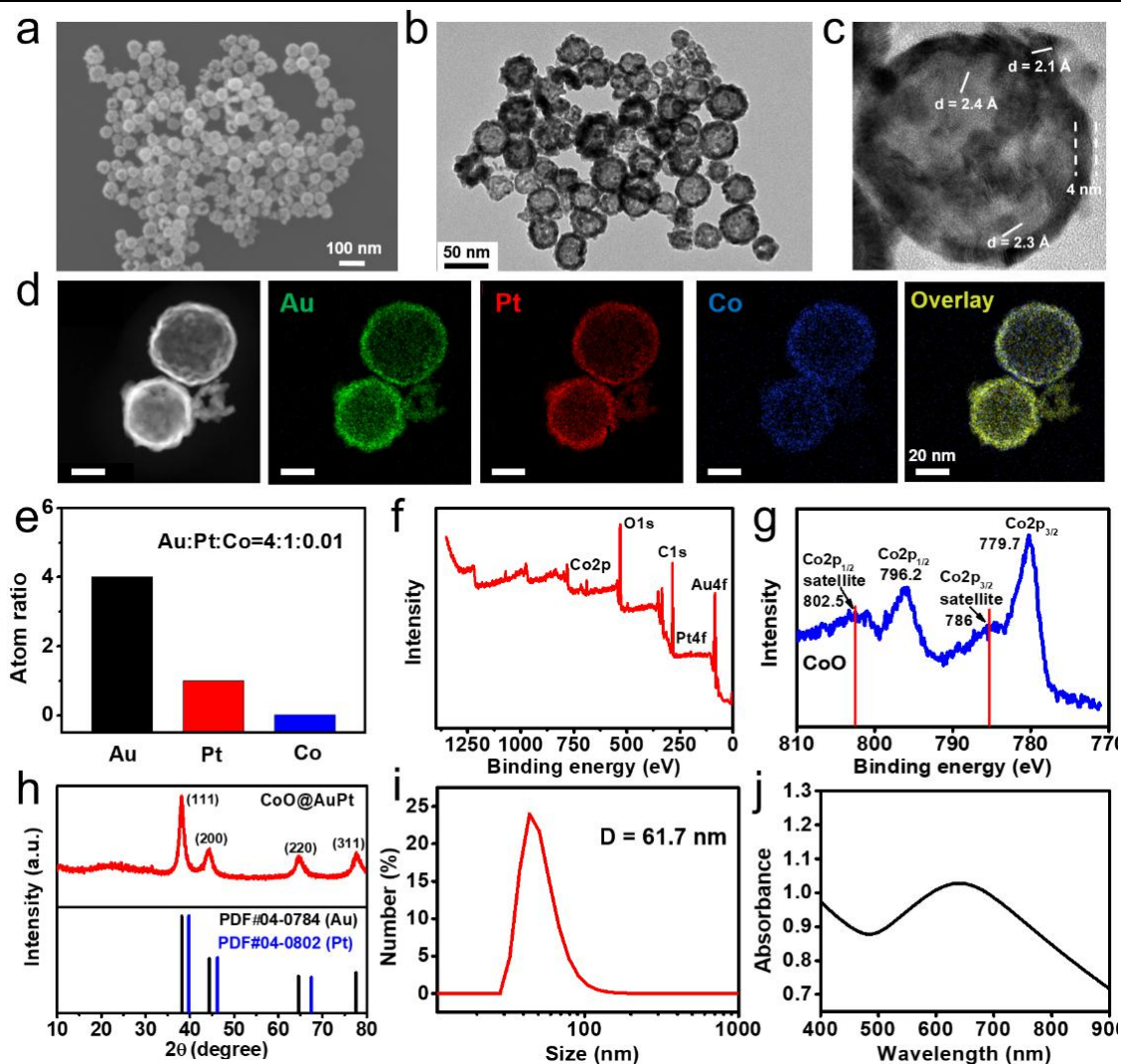


图 2-2 空心 CoO@AuPt 纳米酶的特征：(a) CoO@AuPt 的扫描电镜图像；(b) CoO@AuPt 的低倍透射电子显微镜图像；(c) CoO@AuPt 的高分辨率透射电子显微镜图像；(d) 元素能谱图，以证实金、铂和钴的共存；(e) 利用电感耦合等离子体质谱法对氧化钴@铂纳米粒子的元素组成进行定量分析；(f) CoO@AuPt 的 XPS 谱图；(g) CoO@AuPt 中的钴元素 XPS 谱图；(h) CoO@AuPt 的 XRD 图谱；(i) 去离子水中 CoO@AuPt 的粒径分布；(j) CoO@AuPt 的紫外可见近红外吸收光谱。

Figure 2-2 Characterizations of hollow CoO@AuPt. (a) SEM image of CoO@AuPt; (b) low magnification TEM image of CoO@AuPt; (c) high resolution (HR) TEM image of CoO@AuPt; (d) EDS elemental mapping to confirm the coexistence of Au, Pt and Co in CoO@AuPt; (e) Quantitative analysis of the elemental composition of CoO@AuPt using ICP-MS; (f) XPS pattern of full spectrum of CoO@AuPt; (g) core level XPS spectrum of Co2p in CoO@AuPt; (h) XRD pattern of CoO@AuPt; (i) size distribution of CoO@AuPt in DI water; (j) UV-vis-NIR absorption spectrum of CoO@AuPt.

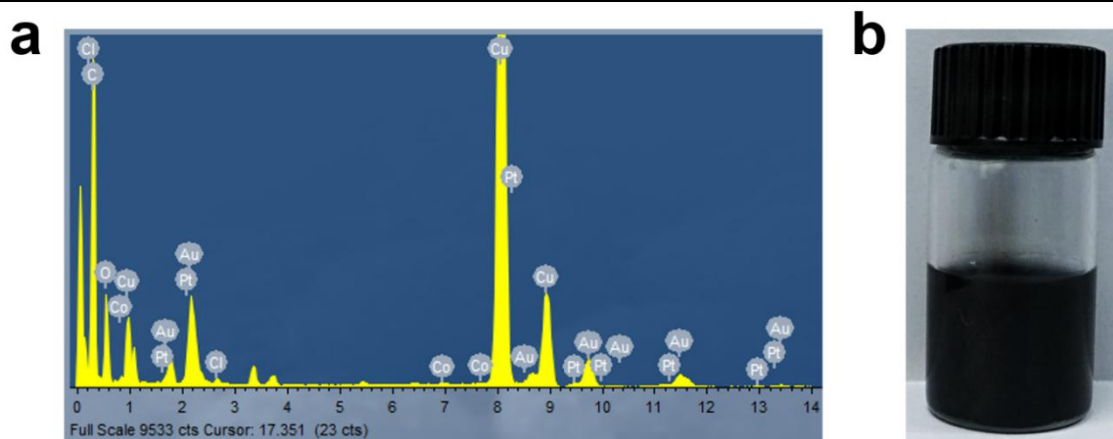


图2-3 (a) CoO@AuPt 纳米酶的能谱； (b) CoO@AuPt 纳米酶的电子照片。

Figure 2-3 (a) EDS spectroscopy of CoO@AuPt; (b) digital image of the aqueous dispersion of CoO@AuPt.

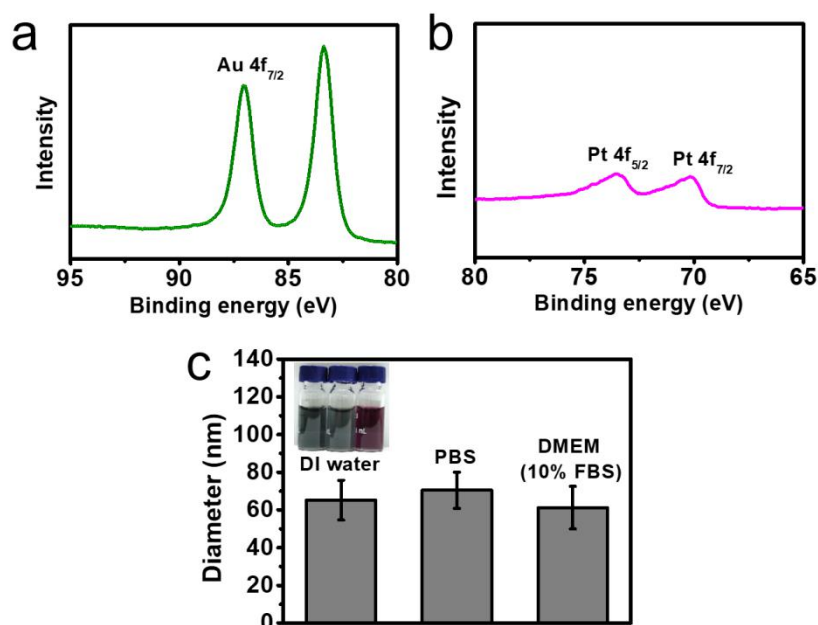


图2-4 (a) 金元素的XPS图谱； (b) 铂元素的XPS图谱； (c) CoO@AuPt在水、PBS和DMEM中的粒径值。

Figure 2-4 Core level XPS spectrum of (a) Au 4f and (b) Pt 4f in CoO@AuPt; (c) the average size of CoO@AuPt in DI water, PBS and DMEM (with 10% FBS).

用 XRD 表征 CoO@AuPt, 其结构与金相 PDF 卡片 (JCPDS 04-0784) 很好地对应于 (1 1 1)、(2 0 0)、(2 2 0) 和 (3 1 1) 的衍射峰 (图 2-2h)。相比之下, 由于金和铂 (4:1:0.01) 在 CoO@AuPt 中的比例很高<sup>[124]</sup>。而极少量的氧化钴导致在 XRD 图谱中未检测到 CoO 的特征峰。CoO@AuPt 的流体力学尺寸测量为约 61.7 nm, PDI 分散指数为 0.229 (图 2-2i), 并且该参数在 PBS 或 DMEM (含有 10% 的 FBS) 中没有显著改变 (图 2-4c)。此外, CoO@AuPt 纳米粒子的表面电位为

16.8 mV。CoO@AuPt 的产物显示为深蓝色（图 2-3b），紫外可见近红外吸收光谱显示其在近红外区有较强吸收（图 2-4j），这一性质也可以很好地应用于光热治疗。

### 2.3.2 CoO@AuPt 的类酶活性评估

合成的 CoO@AuPt 酶具有多种酶活性，这有利于解决目前活性氧介导的肿瘤治疗效率低的问题（图 2-5a）。首先通过测量 TMB 被氧化后在 652 nm 处的吸收变化来评估其氧化酶活性（图 2-5b）。在常氧条件下观察到 CoO@AuPt 与 TMB 混合后，氧化态 TMB 吸光度显著增加，证实了 CoO@AuPt 的氧化酶能力。相反，在缺氧条件下（通过充入氩气除氧）的氧化酶活性显著减弱。我们进一步评估了该纳米酶氧化细胞内还原性物质的能力，包括葡萄糖和谷胱甘肽。如图 2-5c 所示，中性条件下，随着 CoO@AuPt 的浓度升高，葡萄糖的含量降低，这可归因于金基纳米材料的葡萄糖氧化酶活性<sup>[102]</sup>。此外，在模拟肿瘤微环境（pH = 6.5 和 10 mM 过氧化氢）条件下进一步评估了 CoO@AuPt 介导的葡萄糖消耗。可以看到在偏酸性和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 存在的情况下，可以加速葡萄糖的消耗（图 2-6），这可能是由于 CoO@AuPt 催化 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 产生更多氧气促进的。同样，CoO@AuPt 的类氧化酶活性也可以引起谷胱甘肽的消耗，我们用 DTNB 试剂进行了评估（图 2-7）。此外，我们还比较了 CoO@AuPt 与天然葡萄糖氧化酶的活性（图 2-5d）。在天然葡萄糖氧化酶介导的葡萄糖消耗过程中观察到瞬时溶解氧消耗。相比之下，CoO@AuPt 缓慢引起溶解氧水平降低，而 25 分钟后氧气水平在一定程度上恢复。这一结果证实了 CoO@AuPt 良好的葡萄糖氧化酶活性，而氧气水平的反弹是由于其类过氧化氢酶活性。CoO@AuPt 的类氧化酶活性可能是因为贵金属纳米酶表面的大面积暴露可能会提供更具反应性的高指数面来吸附游离的氧气分子<sup>[125]</sup>。接下来，我们通过测量不同 pH 条件下 CoO@AuPt 催化 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 分解产生氧气导致溶解氧浓度的变化，探讨了 CoO@AuPt 的类过氧化氢酶活性（图 2-5e）。在不到 3 分钟的时间内，观察到溶解氧水平显著升高，O<sub>2</sub> 生成速率与酸度的相关性不大。同时，通过测量 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 在 240 nm 处的特征吸收可以证明其随着时间被消耗（图 2-5f）。通过催化 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 分解的三个循环可以确定 CoO@AuPt 的类过氧化氢酶活性的稳定性（图 2-5g）。

此外，CoO@AuPt 的类过氧化物酶活性对于提高 CDT 抗肿瘤的效率至关重要。因此，TMB 同样作为一种辣根过氧化物酶底物，被用来表征其过氧化物酶活性，在过氧化氢存在下 CoO@AuPt 可以催化氧化 TMB 显色（图 2-7b）。在 CoO@AuPt 和过氧化氢的存在下，652 nm 处的特征吸收显著增加，表明 TMB 的氧化是由活性氧产生引起的。此外，OPD 同样作为过氧化物酶底物证明了 CoO@AuPt 的类酶活性，并且在 435 nm 处的特征吸收变化与使用 TMB 作为底物结果一致（图 2-7c）。此外，对苯二甲酸被羟基自由基氧化后会生成有荧光的羟基产物，从而用来检测

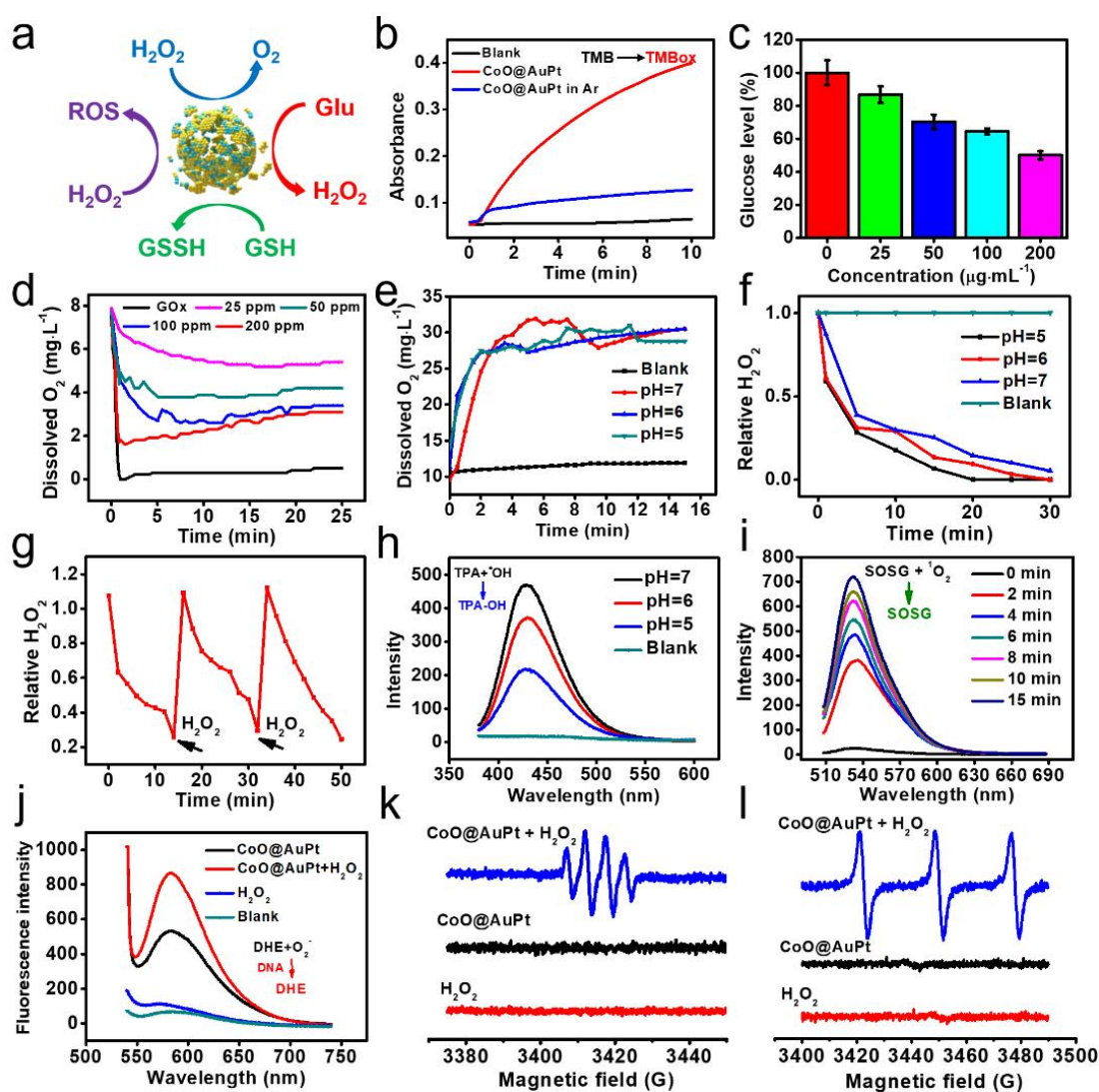


图 2-5 CoO@AuPt 的类酶活性评估：(a) CoO@AuPt 多酶活性示意图；(b) TMB 作为探针评估 CoO@AuPt 的氧化酶样活性；(c) 不同浓度 (pH = 7) CoO@AuPt 引起的葡萄糖消耗；(d) 天然葡萄糖氧化酶 ( $2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 或不同浓度 CoO@AuPt 介导的葡萄糖氧化导致的溶解氧消耗；(e) 通过测量不同 pH 条件下溶解氧水平评估 CoO@AuPt 的过氧化氢酶活性；(f) 在不同 pH 条件下，过氧化氢随时间而减少；(g) CoO@AuPt 在三个循环 ( $\lambda = 240 \text{ nm}$ , pH = 7) 消耗 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 过程中的稳定性；(h) 在 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 存在下，不同 pH 条件以对苯二甲酸为示踪剂，检验产生的羟基自由基；(i) SOSG 检测单线态氧的产生 ( $\lambda_{\text{ex}}: 488 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}}: 525 \text{ nm}$ )；(j) 使用 DHE 作为示踪剂，检测由 CoO@AuPt 介导的<sup>·</sup>O<sub>2</sub>生成；(k) DMPO 检测羟基自由基的电子自旋共振光谱；(l) TEMP 检测单线态氧的电子自旋共振光谱。

Figure 2-5 Enzymatic performance of hollow CoO@AuPt. (a) Scheme of the catalytic mechanism of CoO@AuPt as a multi-enzyme system; (b) oxidase-like activity of CoO@AuPt measured by a TMB probe; (c) glucose depletion by CoO@AuPt at different concentrations (pH = 7); (d) O<sub>2</sub> consumption caused by glucose oxidation mediated by natural GOx ( $2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) or CoO@AuPt at various

concentrations; (e) catalase-like activity of CoO@AuPt by measuring dissolved O<sub>2</sub> levels under different pH conditions; (f) time-dependent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> decrease at different pH levels; (g) enzymatic stability of CoO@AuPt during the consumption of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for three cycles ( $\lambda = 240$  nm, pH = 7); (h) peroxidase-like activity of CoO@AuPt for generating  $\cdot\text{OH}$  using TPA as a tracing agent under different acidic conditions in the presence of 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; (i) fluorescence spectra of SOSG after being incubated with CoO@AuPt and 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for different periods of time ( $\lambda_{\text{ex}}$ : 488 nm,  $\lambda_{\text{em}}$ : 525 nm); (j)  $\cdot\text{O}_2^-$  generation mediated by CoO@AuPt using DHE as the tracing agent (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = 10 mM where applicable); (k) ESR spectra of DMPO/ $\cdot\text{OH}$  adducts in different solutions; (l) ESR spectra of TEMP/<sup>1</sup>O<sub>2</sub> adducts in different solutions.

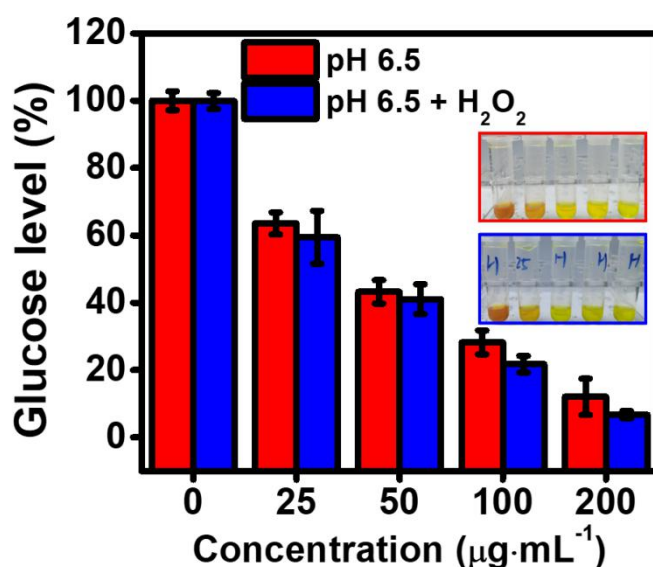


图2-6 不同浓度的CoO@AuPt在不同条件下介导的葡萄糖消耗。

Figure 2-6 Glucose depletion by CoO@AuPt at different concentrations under pH = 6.5 with or without H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 mM).

羟基自由基的产生,如图 2-5h,在不同 pH 值条件下都能观察到对苯二甲酸被氧化,说明该纳米酶的过氧化物酶活性催化 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 产生羟基自由基不受该 pH 值条件范围的限制,这归因于金和铂晶面(111)的过氧化物酶样活性<sup>[126]</sup>。这种类型过氧化物酶的性质比 Fe<sup>2+</sup>催化的芬顿反应更有利,因为后者仅在强酸性条件下(pH = 3.0-5.0)起作用。而肿瘤微环境只是弱酸性。我们还使用 SOSG 探针验证了 <sup>1</sup>O<sub>2</sub> 的产生,该探针可以选择性地捕获 <sup>1</sup>O<sub>2</sub> 并产生绿色荧光。荧光强度随着孵育时间的增加而增强,表明 CoO@AuPt 可以催化 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 发生一系列反应产生 <sup>1</sup>O<sub>2</sub> (图 2-5i 和 2-7d)。该原理可能是由于 O<sub>2</sub> 分子可以通过在铂的(111)晶面上激活表面等离子体共振(SPR)从高自旋状态(<sup>3</sup>O<sub>2</sub>)转换到低自旋状态(<sup>1</sup>O<sub>2</sub>)<sup>[126]</sup>。此外,通过使用 DHE 探针,我们发现 CoO@AuPt 纳米酶可以催化 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 反应后,检测到显著的 $\cdot\text{O}_2^-$ 产生

(图 2-5j)。我们假设 CoO@AuPt 介导产生 $\cdot\text{O}_2$ 的潜在机制如下:环境中氧分子首先吸附在 CoO@AuPt 的表面,基于高效的电荷分离和转移过程,初始电子转移被激活以将  $\text{O}_2$  还原为 $\cdot\text{O}_2$  [127,128]。在  $\text{H}_2\text{O}_2$  存在的情况下,可通过 CoO@AuPt 催化  $\text{H}_2\text{O}_2$  分解来增加溶解氧水平,这进一步提高了 $\cdot\text{O}_2$ 的产率。此外,在不同酸性环境 (pH = 7.4、6.8 和 5.7) 条件下评估了 $\cdot\text{O}_2$ 的产生,发现在 pH = 7.4 时产率最高,这可以解释为在中性条件下 $\cdot\text{O}_2$ -质子化成为 $\cdot\text{HO}_2$ 的趋势被抑制(图 2-8)。除了比色法之外,还利用了 2,2,6,6-四甲基哌啶 (TEMP) 和 5,5-二甲基-1-吡咯啉-N-氧化物 (DMPO) 作捕获剂,通过电子自旋共振来捕获羟基自由基和  $^1\text{O}_2$  的产生(图 2-5k 和 2-5l)。在  $\text{H}_2\text{O}_2$  存在的反应条件下,明显观察到 CoO@AuPt 催化产生特征信号强度  $^1\text{O}_2$  (1:1:1) 和  $\cdot\text{OH}$  (1:2:2:1),与前面使用分光光度法结果一致。

为了更好地理解 CoO@AuPt 在肿瘤微环境中每种酶活性竞争性,在含 10 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ , pH = 6.8 的 PBS 溶液中加入 CoO@AuPt 后检测各类产物指标。通过计算发现:反应 2 分钟后,溶解氧浓度达到最大值 0.013 mM,相当于参与反应的  $\text{H}_2\text{O}_2$  的 32.7%。然而,在同一时期基于分光光度法发现, $\text{H}_2\text{O}_2$  的总消耗率为 73.7%,因此约 41%的  $\text{H}_2\text{O}_2$  用于产生活性氧。为了确定哪种类型的活性氧在该系统中起主导作用,使用 DCFH-DA 探针检测检测活性氧,并在加入二甲基亚砷(羟基自由基清除剂)或  $\text{NaN}_3$  ( $^1\text{O}_2$  清除剂)后进行检测 [127]。如图 2-9 所示,在与 CoO@AuPt 和  $\text{H}_2\text{O}_2$  反应后, DMSO 和  $\text{NaN}_3$  都导致 DCFH-DA 荧光强度衰减,这意味着对应种类 ROS 清除结果。计算得到二甲基亚砷和  $\text{NaN}_3$  分别导致荧光降低 30.5% 和 15.1%,证实羟基自由基是该纳米酶催化  $\text{H}_2\text{O}_2$  产生的主要活性氧种类。

根据以上对 CoO@AuPt 催化活性的研究,我们假设 CoO@AuPt 也可以耗尽细胞内葡萄糖,这可能会导致饥饿治疗引起的肿瘤生长抑制。催化过程也可能提高细胞内  $\text{H}_2\text{O}_2$  的水平。有趣的是,CoO@AuPt 对  $\text{H}_2\text{O}_2$  既表现出类过氧化氢酶活性,又表现出类过氧化物酶活性,产生  $\text{O}_2$  和多种活性氧。产生的  $\text{O}_2$  对缓解肿瘤缺氧至关重要,同时促进葡萄糖循环消耗产生  $\text{H}_2\text{O}_2$ 。此外,CoO@AuPt 也可以作为谷胱甘肽氧化酶,谷胱甘肽被转化为非还原性 GSSH,以保护 CDT 过程中产生的 ROS。

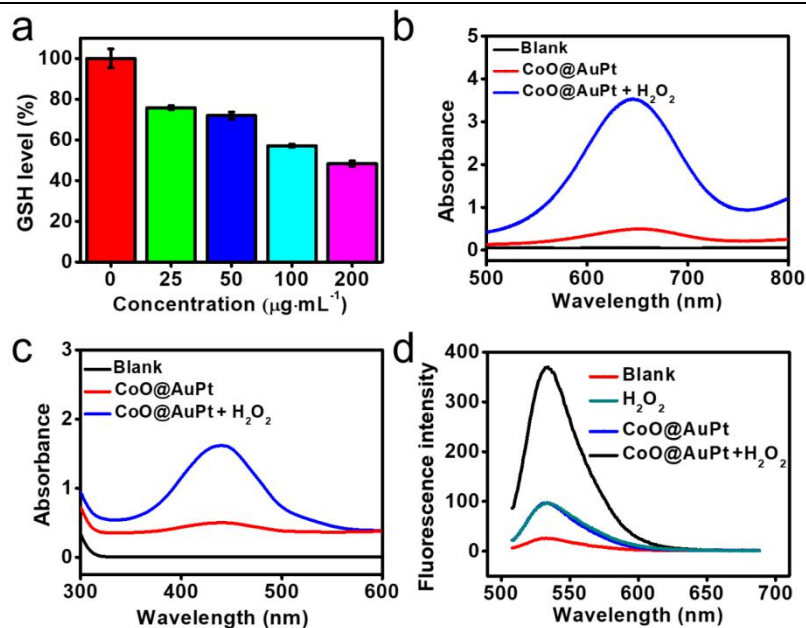


图2-7 (a) 不同浓度的CoO@AuPt 介导的谷胱甘肽消耗；(b) CoO@AuPt催化H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>氧化TMB；  
(c) CoO@AuPt催化H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>氧化OPD；(d) CoO@AuPt催化H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>氧化SOSG的荧光光谱。

Figure 2-7 (a) GSH consumption by CoO@AuPt at different concentrations; (b) vis-NIR absorption of TMB after incubation with CoO@AuPt in the presence or absence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 mM); (c) vis-NIR absorption of OPD after incubation with CoO@AuPt in the presence or absence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 mM); (d) fluorescence emission spectra of SOSG after incubation with CoO@AuPt in the presence or absence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 mM).

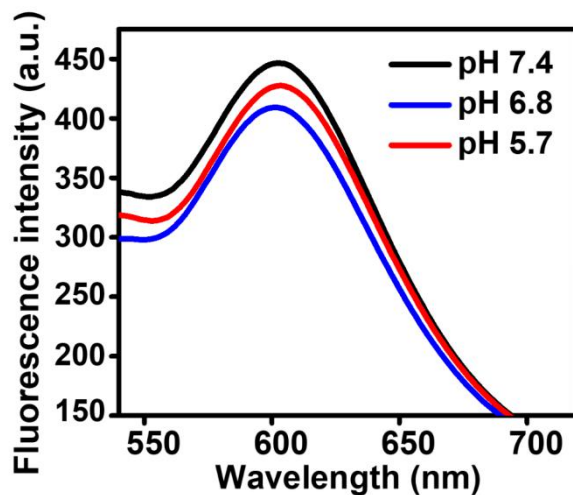


图2-8 二氢乙锭检测不同pH值条件下 CoO@AuPt 介导的超氧阴离子的产生。

Figure 2-8  $\cdot\text{O}_2^-$  generation mediated by CoO@AuPt using DHE as the tracing agent under different pH conditions (pH = 5.7, 6.8 and 7.4).

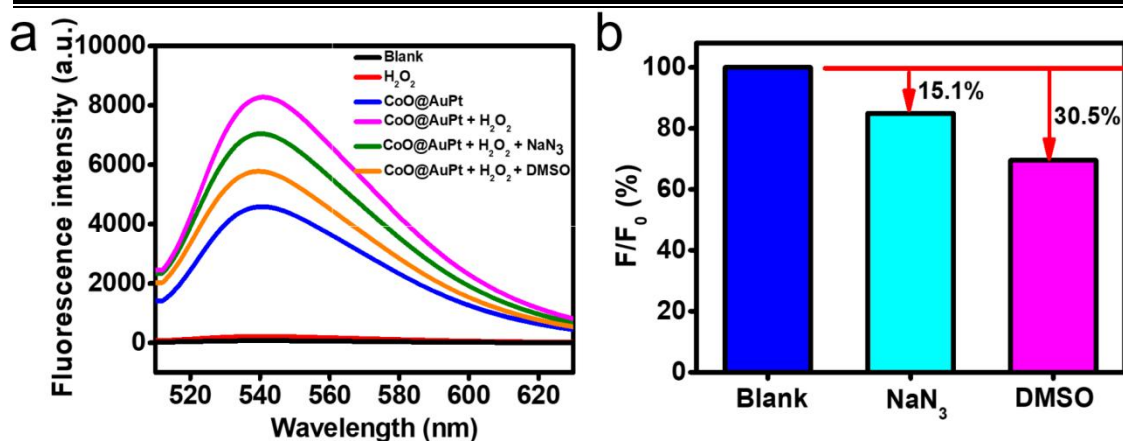


图2-9 通过DCFH-DA 鉴别生成ROS的主要类型。(a) CoO@AuPt ( $75 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 和 $\text{H}_2\text{O}_2$  (10 mM) 在 $\text{NaN}_3$  (10 mM) 或DMSO溶液 (10%) 存在下的DCFH-DA荧光光谱; (b) 在各种活性氧清除剂存在下, DCFH-DA荧光强度下降百分比。 $F_0$ 为CoO@AuPt和 $\text{H}_2\text{O}_2$ 反应氧化 DCFH-DA时的荧光强度。

Figure 2-9 Identifying main type of generated ROS by CoO@AuPt. (a) Fluorescence spectra of DCFH-DA incubated with CoO@AuPt ( $75 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) in the presence of  $\text{NaN}_3$  (10 mM), DMSO (10%) or  $\text{H}_2\text{O}_2$  (10 mM) for 10 min; (b) fluorescence intensity decrease percent of DCFH-DA treated with CoO@AuPt in the presence of various ROS scavengers.  $F_0$  is the fluorescence intensity of DCFH-DA incubated with CoO@AuPt and  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

### 2.3.3 CoO@AuPt 纳米酶的细胞吞噬和生物分布

细胞高效摄取该纳米酶是实现其治疗功能的前提。我们通过暗场成像和荧光成像, 使用 4T1 细胞分析 CoO@AuPt 纳米酶的细胞内吞情况。基于金属纳米粒子独特的局部表面等离子体共振 (LSPR) 原理, 暗场显微技术和光谱学已被应用于生物传感和单分子成像。在图 2-10a 中, CoO@AuPt 纳米酶在暗场显微镜下具有明显的亮点, 将 4T1 细胞与 CoO@AuPt 孵育 6 小时后, 暗场下的亮点表示 CoO@AuPt 纳米酶能成功被细胞内吞, 并分布在细胞核周围 (图 2-10b)。我们进一步使用荧光成像确定纳米酶在细胞内定位, 二氢卟吩 e6 (Ce6) 是一种荧光染料, 通过疏水作用被装载到中空 CoO@AuPt 纳米酶中 (图 2-11a)。通过荧光光谱观察到对应于 Ce6 的红色荧光证明其成功负载。将 4T1 细胞与负载有 Ce6 的 CoO@AuPt 纳米酶孵育一段时间后, 观察到 4T1 细胞中的红色荧光随着时间的推移而增强, 进一步表明该纳米酶能很好地被细胞内吞 (图 2-11b)。

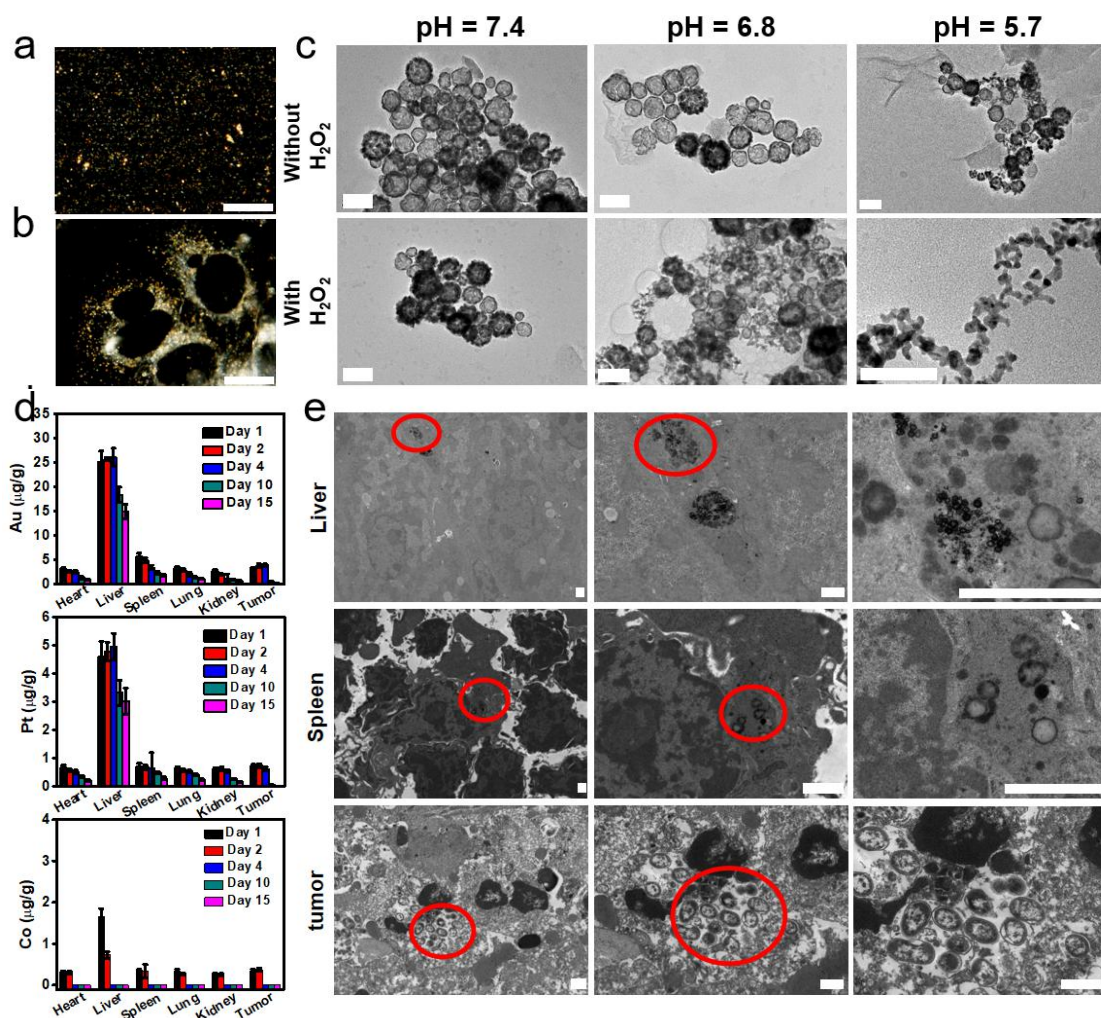


图2-10 CoO@AuPt 的内吞和解聚情况：(a) CoO@AuPt的暗场显微图像；(b) 4T1细胞与 $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  CoO@AuPt 孵育6小时后的暗场显微图像（比例尺： $20 \mu\text{m}$ ）；(c) 在有或没有 $10 \text{mM}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ 和不同pH值条件下，CoO@AuPt 的透射电镜图像（比例尺： $50 \mu\text{m}$ ）；(d) 荷瘤BALB/c小鼠静脉注射CoO@AuPt后，使用ICP对主要器官和肿瘤中的金、铂和钴进行定量分析；(e) 肝脏、脾脏和肿瘤超薄切片透射电镜图像（比例尺： $1 \mu\text{m}$ ）。从左到右逐步放大图像。

Figure 2-10 Internalization and depletion of hollow CoO@AuPt. (a) Dark-field microscopic image of CoO@AuPt (scale bar:  $20 \mu\text{m}$ ); (b) dark-field microscopic image of 4T1 after incubation with CoO@AuPt ( $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) for 6 h (scale bar:  $20 \mu\text{m}$ ); (c) TEM images of CoO@AuPt dispersed in phosphate buffer under different pH conditions with or without  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $1 \text{mM}$ ) (scale bar:  $50 \mu\text{m}$ ); (d) quantitative analysis of the amount of Au, Pt and Co in vital organs and tumors using ICP-MS after intravenous administration of CoO@AuPt in tumor-bearing BALB/c mice; (e) TEM images of the ultrathin slices of liver, spleen and tumor on day 14 post-injection of CoO@AuPt (scale bar:  $1 \mu\text{m}$ ).

Stepwise magnification images from left to right.

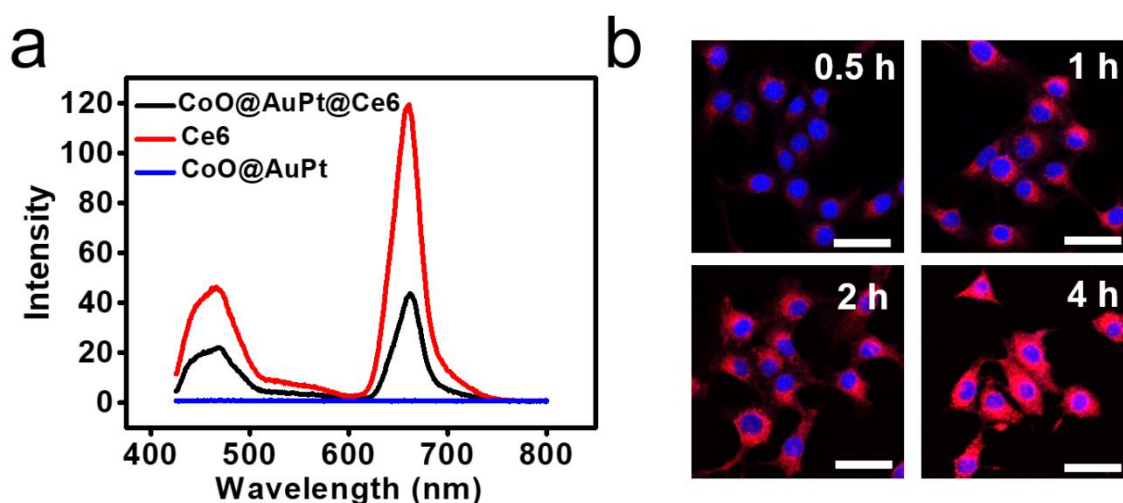
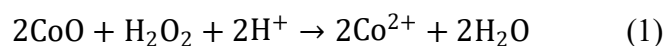


图 2-11 (a)CoO@AuPt 负载 Ce6 前后的荧光光谱;(b)4T1 细胞内吞负载有 Ce6 的 CoO@AuPt 在不同时间点荧光成像 (标尺: 50  $\mu\text{m}$ )。

Figure 2-11 (a) Fluorescence spectra of CoO@AuPt before and after conjugation with Ce6 ( $\lambda_{\text{ex}}$ : 488 nm); (b) fluorescence images of 4T1 cells after incubation with CoO@AuPt for different periods of time (scale bars: 50  $\mu\text{m}$ ).

### 2.3.4 CoO@AuPt 纳米酶响应型解聚消除

为了研究 CoO@AuPt 纳米酶响应型解聚功能, 首先将样品分散在不同 pH 值的 PBS 溶液中, 并选择性地加入 10 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  模拟肿瘤微环境。pH = 5.7 模拟细胞内溶酶体酸性条件。pH = 6.8 模拟肿瘤微环境, 而 pH = 7.4 模拟正常体液微环境。摇床 37°C 孵育 24 小时后, 用透射电镜观察经处理后的 CoO@AuPt (图 2-10c)。与未经处理的纳米粒子相比, 在 pH = 7.4 时, 无论有没有  $\text{H}_2\text{O}_2$  的条件下, CoO@AuPt 没有明显形态变化。相比之下, 在 pH = 5.7 和 pH = 6.8 时可明显观察到其结构坍塌, 并且在外加  $\text{H}_2\text{O}_2$  后, 这种结构瓦解情况更加地明显。特别是在  $\text{H}_2\text{O}_2$  存在和 pH = 5.7 时明显观察到尺寸范围为 6-9 nm 的纳米粒子, 这表明金铂纳米酶尺寸明显随着结构解聚而变小。解聚的纳米团簇的晶格间距测量为 0.21 nm, 这与金和铂纳米晶体的特征一致 (图 2-12a)。此外, 在不同的处理后, 测量了 CoO@AuPt 的尺寸变化 (图 2-12b)。在 pH = 7.4、6.8 和 5.7 并且含  $\text{H}_2\text{O}_2$  条件下, 测定的平均粒径分别为 67.4 nm、31.6 nm 和 12.4 nm, 改变化趋势与使用透射电镜观察的结果非常一致 (图 2-10c)。为了理解 CoO@AuPt 解聚的潜在机制, 测量了不同处理条件上清液的钴元素含量 (图 2-12c)。结果发现  $\text{H}_2\text{O}_2$  存在和偏酸的环境有利于钴的溶解, 钴的释放量在 pH = 5.7 时达到最大。所以我们推断 CoO@AuPt 纳的结构解聚可归因于反应(1):



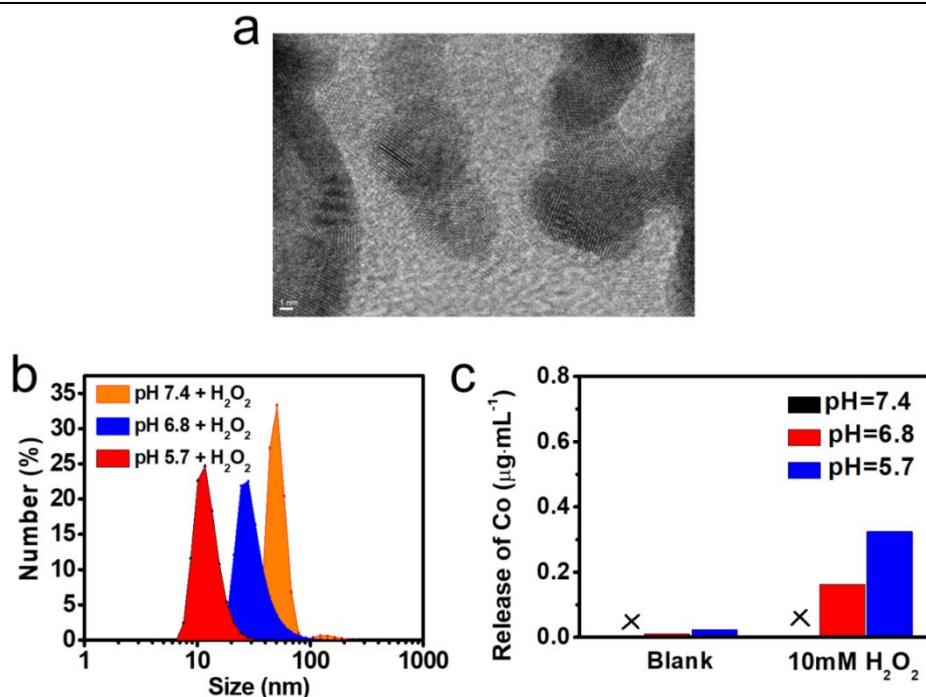


图 2-12 (a)pH = 5.7 外加 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作用下解聚的 CoO@AuPt 高分辨率 TEM 图像(比例尺:10 nm); (b) 在不同条件下孵育 24 h 后 CoO@AuPt 的粒径分布; (c) 不同条件下 CoO@AuPt 上清液中 Co 的浓度。

Figure 2-12 (a) High resolution TEM image of the nanoclusters from disintegrated hollow CoO@AuPt (pH = 5.7 with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Scale bar: 10 nm; (b) size distribution of CoO@AuPt after incubation with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 mM) under different pH conditions for 24 h; (c) Co concentration in the supernatant of CoO@AuPt dispersion under various conditions.

由于 CoO 在 CoO@AuPt 纳米粒子的形成过程中充当了金和铂生长的模板, 氧化钴在 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和氢离子的共同作用下可能导致模板溶解, 进而导致纳米颗粒解聚为尺寸更小的金铂纳米酶。由于肿瘤微环境的弱酸性和瘤内过表达 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 因此可以合理地假设中空 CoO@AuPt 纳米酶在肿瘤区域响应解聚后可能实现潜在的抗肿瘤功能。第一, 空心 CoO@AuPt 在长期循环过程中可以保持其结构完整性, 避免了使用较小尺寸 Au 和 Pt 纳米酶稳定性差、循环时间短等问题。第二, CoO@AuPt 纳米酶的响应型解聚可以帮助较小尺寸的金铂纳米酶渗透到肿瘤组织更深处。第三, 变小的金铂纳米酶比原来的组装体具有更高的催化活性, 可以增强肿瘤靶向治疗效果。因此, 我们受到这些假设的启发, 研究了 CoO@AuPt 在体内分布和解聚情况。

给接种 4T1 肿瘤的 BALB/c 小鼠中静脉注射 CoO@AuPt 后, 使用 ICP 定量分析了心脏、肝脏、脾、肺、肾和肿瘤中的金、铂和钴的浓度(图 2-10d)。注射后第 1 天, 金 (25.08)、铂 (4.61) 和钴 (1.65) (单位为 μg·g<sup>-1</sup>) 在肝脏中富集, 水平远高于其他主要器官或肿瘤。这一现象可归因于内皮网状系统中丰富的巨噬

细胞捕获外来物质。肝脏中金和铂的浓度随着时间的推移而增加，并在第3天达到最大值，这意味着典型的初始积累。同时，在第1天，在肿瘤区域也发现了相当高浓度的金（2.98）、铂（0.72）和钴（0.35） $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ，这表明通过EPR效应在肿瘤内有效地富集了CoO@AuPt纳米酶。在第4天，在肿瘤组织中检测不到钴，这可能归因于通过微环境响应的解聚和排除。然而，金和铂元素还是能在肿瘤部位检测到，第4天金和铂的浓度升高也证明了我们的假设。

我们进一步通过组织超薄切片透射电镜观察了CoO@AuPt在组织中的定位和形态。在注射后的第15天，在肝脏的细胞内溶酶体小泡中发现了聚集形式的纳米酶（图2-10e）。放大的图像显示了CoO@AuPt结构的解聚和解聚后的金铂纳米颗粒。此外，在这些微小的纳米酶附近观察到吞噬泡，这可能意味着吞噬作用可以促进中性粒细胞的清除。然而，在脾脏和肿瘤切片中没有观察到明显的CoO@AuPt解聚结构。这可能是由于脾脏和肿瘤中CoO@AuPt的富集较低，或者这些结构解聚后被清除。这一结果与ICP定量分析的结果都验证了我们前面的假设，这一发现可以减少纳米酶在体内长期滞留而造成的系统毒性。为纳米酶的临床应用提供了方向。

### 2.3.5 CoO@AuPt 纳米酶的生物相容性

我们从多个角度研究了空心CoO@AuPt纳米酶的生物安全性。首先，用人脐静脉内皮细胞（HUVEC）和小鼠成纤维细胞（L929）通过MTT法在细胞水平上评价CoO@AuPt纳米酶的生物相容性（图2-13a）。观察到即使在 $200\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的高浓度下，与CoO@AuPt孵育24小时后，细胞存活率仍保持在80%以上，表明该纳米酶具有良好的生物相容性。还使用死活细胞染色试剂盒进一步评估细胞活力，荧光图像几乎没有红色细胞死亡信号（图2-14a）。与肿瘤细胞相比，对正常细胞毒性低可归因于正常细胞中 $\text{H}_2\text{O}_2$ 的含量是极低的。此外，用不同浓度的CoO@AuPt与红细胞共孵育，研究了CoO@AuPt纳米酶的溶血率（图2-14b）。比浊法测定的结果表明溶血率在CoO@AuPt浓度为 $1.6\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时也非常低（ $<5\%$ ），这表明CoO@AuPt具有良好的血液相容性。此外，在静脉注射25、50和 $100\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的CoO@AuPt纳米酶后，对昆明鼠进行了体内慢性毒性研究。注射15天后，没有发现任何小鼠死亡或明显异常，并且在研究期间体重没有显著差异（图2-14c）。此外，关键血液指标，包括白细胞（WBCs）、红细胞（RBCs）、血小板（PLTs）、血红蛋白（HGB）、血细胞比容（HCT）和平均红细胞体积（MCV），都在正常范围内，如图2-15a所示。同时，H&E染色结果表明心脏、肝脏、脾、肺和肾等主要器官中都没有检测到明显病理异常或组织损伤（图2-15b）。这些结果都证明CoO@AuPt纳米酶在细胞毒性、血液相容性方面具有很好的生物相容性。

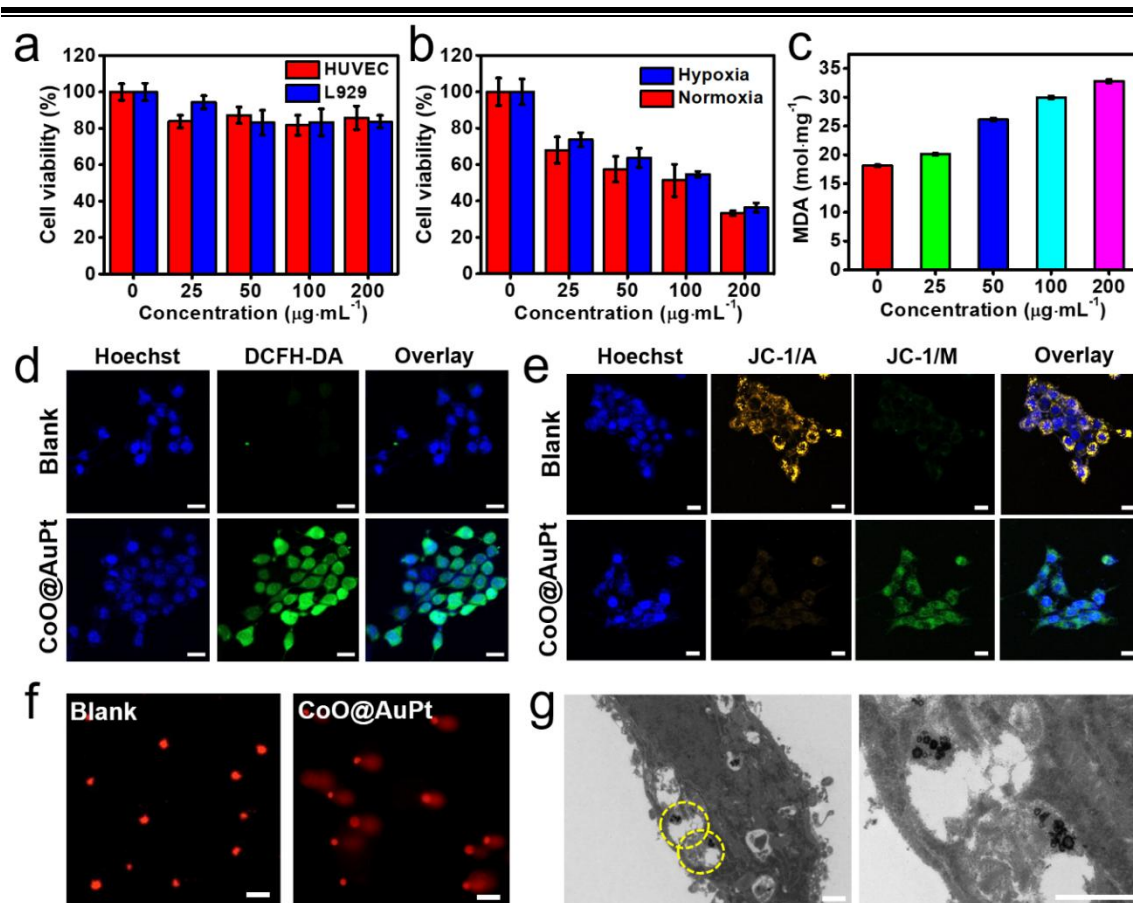


图 2-13 细胞毒性评估：（a）与不同浓度 CoO@AuPt 孵育 24 小时后，HUVECs 和 L929 成纤维细胞的活力；（b）在低氧或常氧条件下，CoO@AuPt 孵育 24 小时后 4T1 细胞的活力；（c）不同浓度 CoO@AuPt 作用 8 h 后，4T1 细胞中脂质过氧化物丙二醛（MDA）水平；（d）使用 DCFH-DA 试剂盒评估细胞内 ROS 生成（标尺：20  $\mu\text{m}$ ）；（e）使用 JC-1 试剂盒评估线粒体损伤（标尺：20  $\mu\text{m}$ ）；（f）彗星试验评估 4T1 细胞的 DNA 损伤（标尺：5  $\mu\text{m}$ ）；（g）4T1 细胞经 CoO@AuPt（100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ）处理 24 h 后的 TEM 图像（标尺：1  $\mu\text{m}$ ）。黄色圈内区域代表内核体/溶酶体区域。

Figure 2-13 Cytotoxicity in vitro. (a) Viability of HUVECs and L929 fibroblasts after incubation with CoO@AuPt at various concentrations for 24 h; (b) viability of 4T1 cells after incubation with CoO@AuPt for 24 h in hypoxia or normoxia; (c) lipid peroxidation as malondialdehyde (MDA) levels in 4T1 cells subject to various concentrations of CoO@AuPt for 8 h; (d) in vitro assessment of intracellular ROS generation using 4T1 cells stained with DCFH-DA (scale bars: 20  $\mu\text{m}$ ); (e) mitochondrial damage of 4T1 cells (under 8 h treatment of CoO@AuPt) measured by JC-1 assay kit (scale bars: 20  $\mu\text{m}$ ); (f) DNA damage evaluation of 4T1 cells (under 8 h treatment with CoO@AuPt) using Comet assay (scale bars: 5  $\mu\text{m}$ ); (g) TEM images of 4T1 cells after incubating with CoO@AuPt (100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) for 24 h (scale bars: 1  $\mu\text{m}$ ). Yellow circle enclosed area represents the endosome/lysosome region.

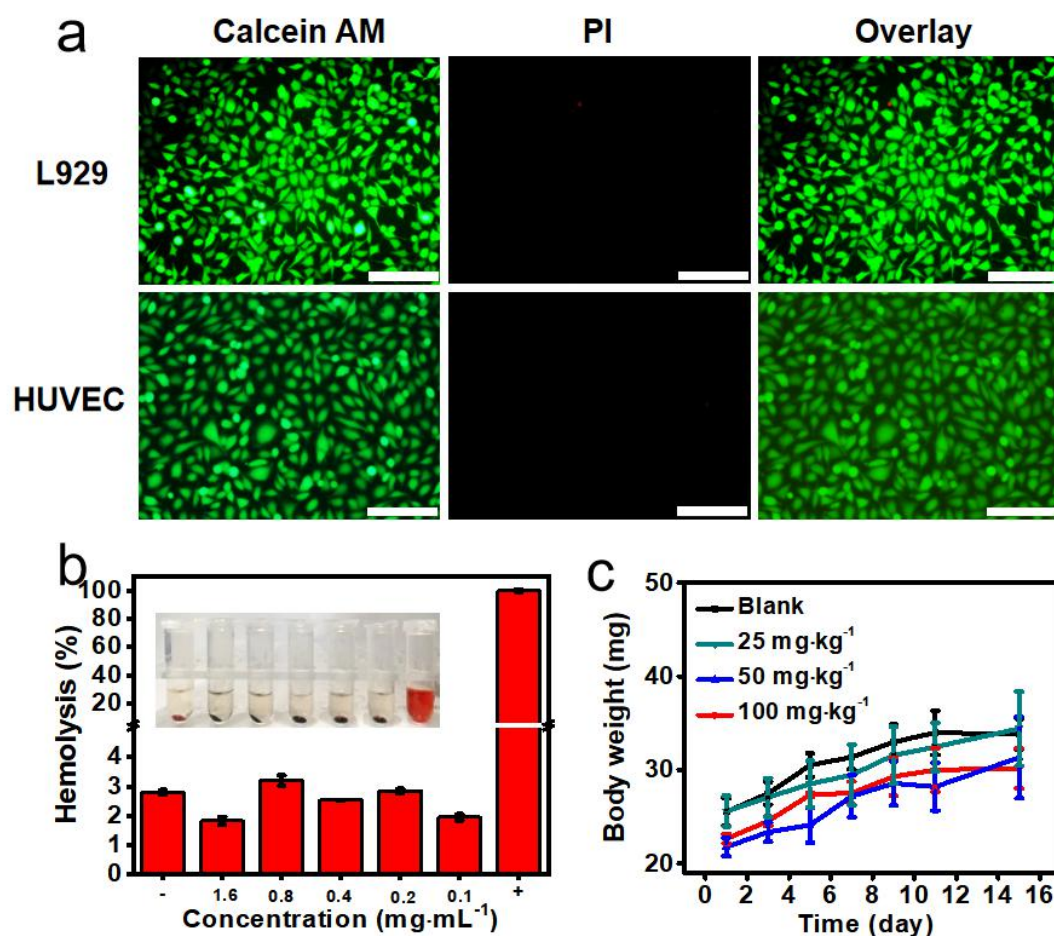


图 2-14 (a) HUVECs 和 L929 细胞经 CoO@AuPt ( $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 处理 24 h 后活死细胞染色(标尺:  $50 \mu\text{m}$ ); (b) 不同浓度 CoO@AuPt 孵育 6 h 后红细胞的溶血率; (c) 不同剂量 CoO@AuPt 静脉注射后昆明鼠的体重变化。

Figure 2-14 (a) Fluorescence microscopy of HUVECs and L929 cells treated with CoO@AuPt ( $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) for 24 h and stained with Live/Dead cell staining kit (scale bars:  $50 \mu\text{m}$ ); (b) hemolytic rate of erythrocytes after incubation with CoO@AuPt at various concentrations for 6 h; (c) variation of KM mouse body weight after intravenous injection with CoO@AuPt with different doses.

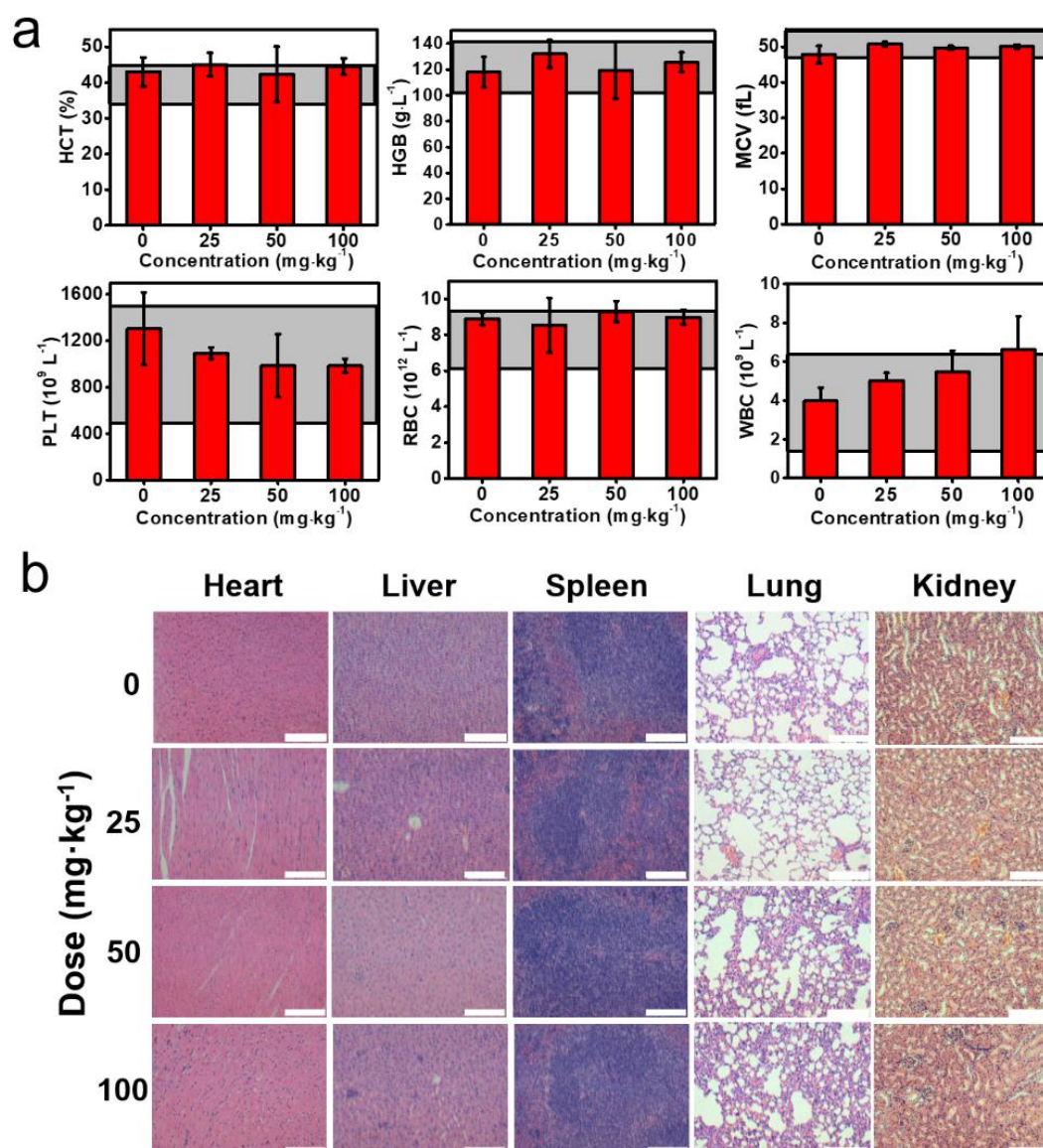


图 2-15 体内生物相容性评估。(a) 静脉注射不同剂量 CoO@AuPt 后第 15 天小鼠血常规分析, 灰色面积代表了正常参考范围; (b) 主要脏器(心、肝、脾、肺、肾)的 H&E 染色(标尺: 100  $\mu\text{m}$ )。

Figure 2-15 In vivo biocompatibility assessment. (a) blood routine analysis and (b) H&E staining of major organs (heart, liver, spleen, lung and kidney) of KM mice on day 15 after intravenous injection of CoO@AuPt with different dosages. Grey color hatched area in (a) represents the reference normal range from guideline (scale bars: 100  $\mu\text{m}$ ).

### 2.3.6 CoO@AuPt 纳米酶的体外治疗

在 CoO@AuPt 纳米酶的多种催化活性激励下, 我们首先在细胞层面评价了它的抗肿瘤作用。在低氧和常氧条件下与不同浓度 CoO@AuPt 孵育 24 小时后, 通过标准 MTT 法测定 4T1 细胞生存力(图 2-13b)。低氧和常氧条件下的细胞存活率

没有统计学差异,说明 CoO@AuPt 介导的抗肿瘤过程可以不需要依赖于氧气水平。此外,当与 CoO@AuPt 纳米粒子的孵育时间延长至 48 h,观察到更严重的细胞毒性效应(图 2-16)。此外,所产生的细胞毒性与纳米酶的浓度呈正相关,在  $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的浓度下,超过 60% 的 4T1 细胞被杀死。在 HeLa 和 HepG2 细胞中也观察到了 CoO@AuPt 纳米酶的毒性效应(图 2-17a)。CoO@AuPt 特异性肿瘤细胞毒性可能是由于以下原因。首先,由 CoO@AuPt 催化葡萄糖消耗可能导致肿瘤细胞内代谢平衡被扰乱。第二,与正常细胞相比,肿瘤细胞含有更多的  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,它不仅可以作为产生活性氧的底物,也为解聚 CoO@AuPt 纳米酶创造条件。细胞活死染色也证实了用  $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  CoO@AuPt 处理 4T1 细胞 24 h 后的生存能力(图 2-17b),结果表明对照组全部是活细胞的绿色荧光,而处理后的细胞则几乎全部呈现红色荧光表明细胞几乎全部死亡。表明在治疗组中观察到显著的细胞杀伤效应。

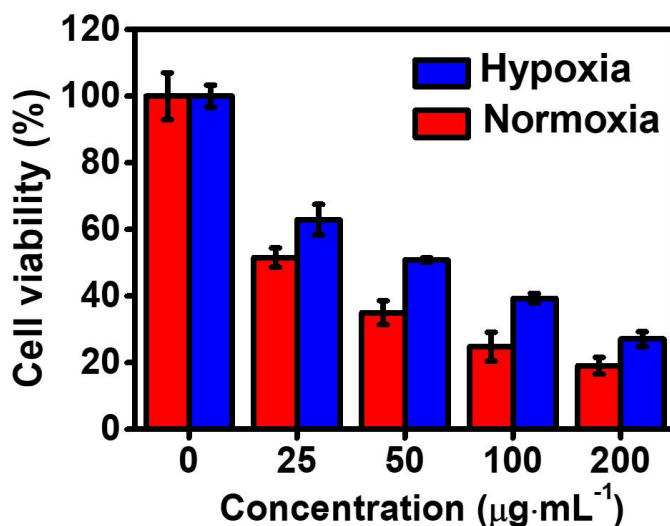


图 2-16 CoO@AuPt 与 4T1 细胞在常氧和缺氧条件下孵育 48h 的细胞毒性。

Figure 2-16 Viability of 4T1 cells after incubation with CoO@AuPt for 48 h in hypoxia or normoxia.

我们使用埃尔曼试剂检测了不同浓度 CoO @ AuPt 处理 4T1 细胞后细胞内谷胱甘肽水平(图 2-17c)。由于 CoO @ AuPt 的氧化物酶活性, CoO @ AuPt 浓度增加会导致细胞内谷胱甘肽减少。谷胱甘肽消耗对肿瘤治疗非常重要,因为 GSH 可以消耗 CoO@AuPt 介导的治疗过程中产生的活性氧。众所周知,活性氧介导的治疗会引起肿瘤细胞内的脂质氧化损伤<sup>[128]</sup>。因此,我们检测了脂质氧化损伤主要标志物丙二醛的水平。在未处理的细胞中观察到丙二醛的吸收,这是由于细胞膜的醛类和多糖的干扰。结果表明,细胞内的丙二醛水平随着纳米酶浓度增加而升高。

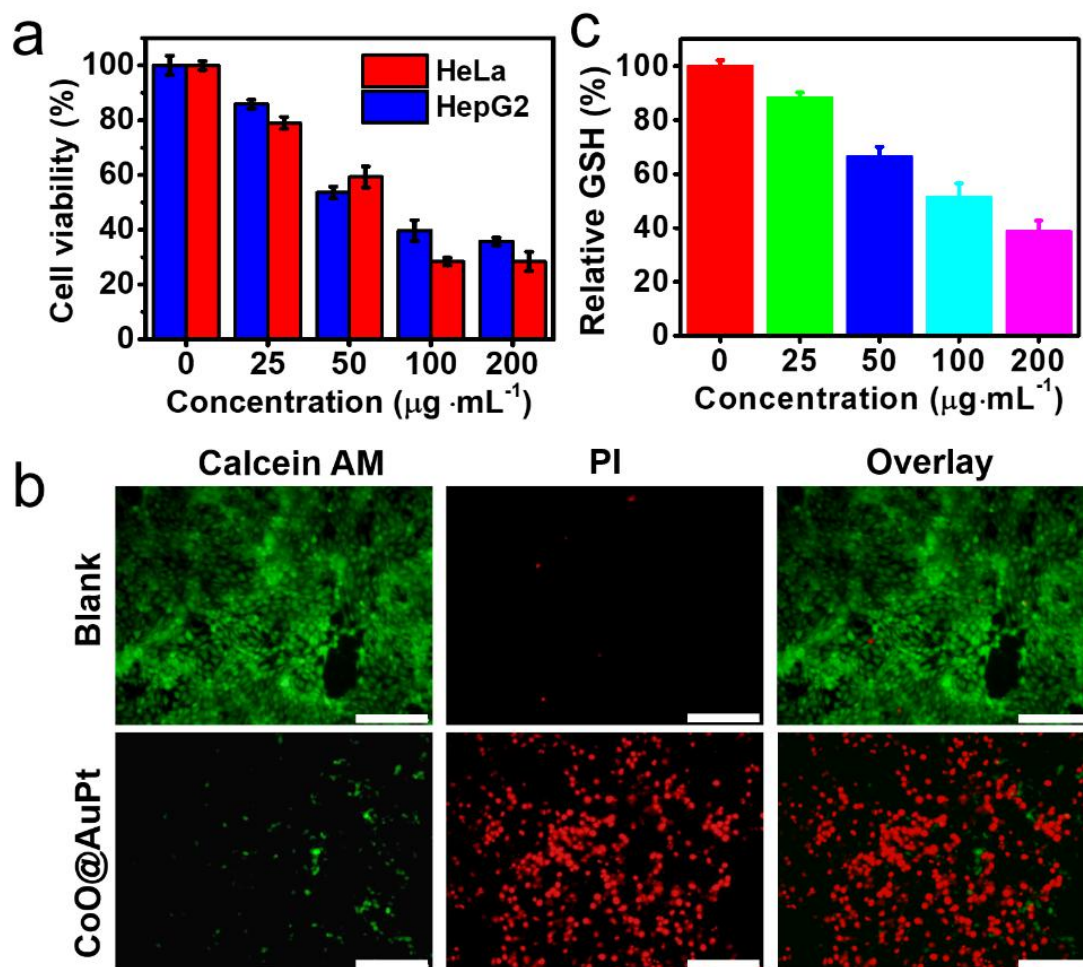


图2-17 (a)HeLa和HepG2细胞与不同浓度CoO@AuPt孵育24 h后的细胞活力;(b)CoO@AuPt处理4T1细胞24 h后的死活染荧光图像(标尺:500  $\mu\text{m}$ );(c)用标准Ellman试剂检测CoO@AuPt处理4T1细胞8 h后GSH水平。

Figure 2-17 (a) Viability of HeLa and HepG2 cells after incubation with CoO@AuPt at various concentrations in normoxia for 24 h; (b) fluorescence images of 4T1 cells after treatment with CoO@AuPt for 24 h and staining with Live/Dead cell viability assay kit (scale bars: 500  $\mu\text{m}$ ); (c) intracellular GSH level of 4T1 cells after treatment with CoO@AuPt for 8 h, measured by standard Ellman reagent.

此外,用DCFH-DA探针检测了4T1细胞内的活性氧水平,该探针在氧化应激下可转化为2,7-二氯荧光素。如图2-13所示,在常氧条件下与CoO@AuPt孵育8小时后,4T1细胞内观察到明显的绿色荧光,表明ROS的产生。事实上,即使在低氧条件下以DCFH-DA(图2-18)或DHE作为活性氧探针(图2-19),同样也能检测到ROS信号,这可能是由于该纳米酶介导的过氧化氢酶活性催化 $\text{H}_2\text{O}_2$ 分解产生 $\text{O}_2$ 来提供分子氧。相反,在L929细胞中没有检测到ROS产生,这表明该纳米酶介导的活性氧产生是对肿瘤细胞特异性的(图2-20)。

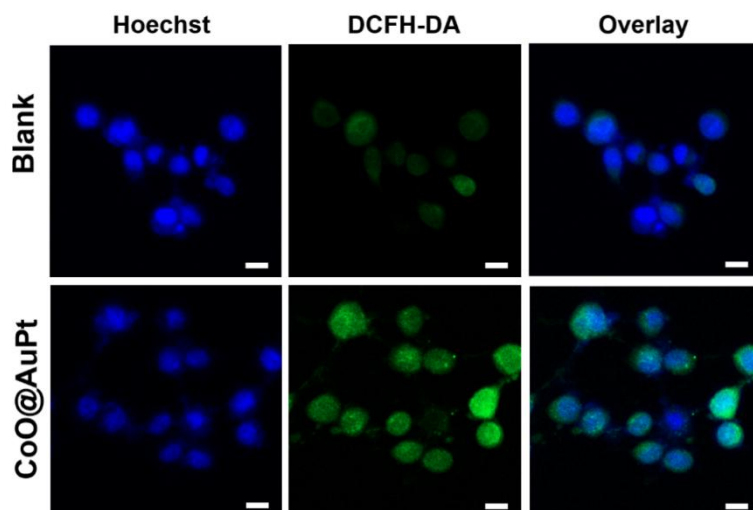


图 2-18 CoO@AuPt 与 4T1 细胞在缺氧条件下的活性氧产生情况，DCFH-DA 作为指示剂（标尺：20  $\mu\text{m}$ ）。

Figure 2-18 In vitro assessment of ROS generation in hypoxia using 4T1 cells stained with DCFH-DA (scale bars: 20  $\mu\text{m}$ ).

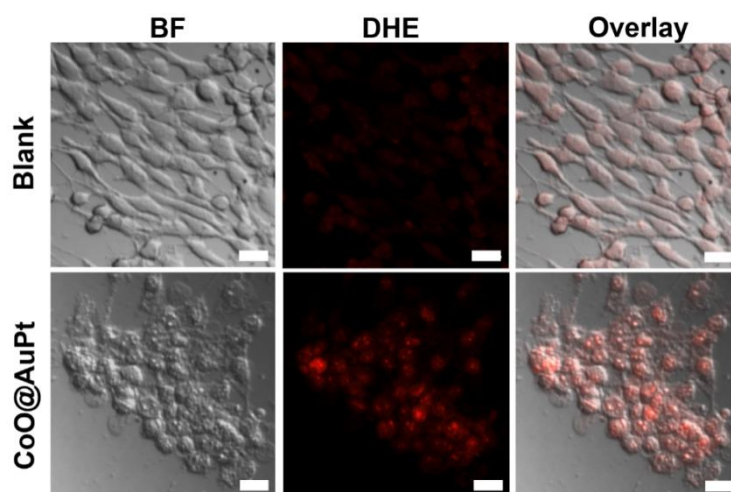


图 2-19 CoO@AuPt 纳米酶与 4T1 细胞在缺氧条件下的活性氧产生情况 DHE 作为指示剂（标尺：20  $\mu\text{m}$ ）。

Figure 2-19 In vitro assessment of intracellular ROS generation in hypoxia using 4T1 cells stained with DHE probe (scale bars: 20  $\mu\text{m}$ ).

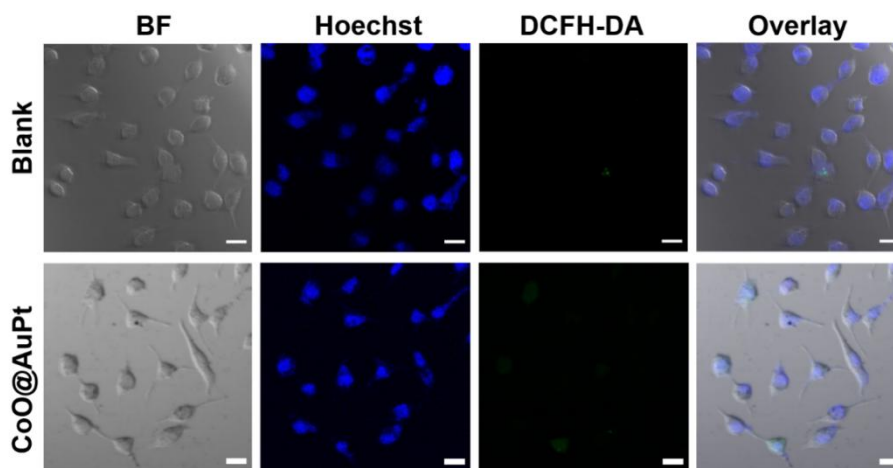


图 2-20 CoO@AuPt 处理 L929 细胞活性氧产生情况，DCFH-DA 作为指示剂（标尺：20  $\mu\text{m}$ ）。

Figure 2-20 In vitro assessment of intracellular ROS generation using L929 fibroblasts stained with DCFH-DA (scale bars: 20  $\mu\text{m}$ ).

随后，我们研究了该纳米酶处理的肿瘤细胞线粒体和 DNA 损伤情况。JC-1 染料是一种膜渗透探针，用于监测线粒体膜电位。正常情况下，JC-1 分子以聚集体的形式积累在线粒体中，产生橙色荧光。由于细胞器损伤导致金属基质蛋白酶去极化，JC-1 从线粒体部分释放，并以发射绿色荧光的单体形式存在。如图 2-13e 所示，CoO@AuPt 处理后 4T1 细胞中 JC-1 单体表达增加，是线粒体损伤导致的细胞凋亡现象。此外，活性氧通常通过氧化鸟嘌呤核苷酸库产生变异的核苷酸 8-氧代-GTP，这可能激活碱基切除修复，最终导致 DNA 双链断裂<sup>[129]</sup>。因此，我们使用标准的彗星试验研究了活性氧诱导的 DNA 损伤。如图 2-13f 所示，经 CoO@AuPt ( $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 处理 8 h 后，4T1 细胞核出现明显的拖尾现象，表明 DNA 双链受到严重损伤。根据对彗星拖尾长度的统计，DNA 损伤水平可分为轻度、中度或重度。用 CoO@AuPt 处理后导致  $36.0\pm 1.8\%$  的 DNA 损伤，典型的中度 DNA 损伤（二级，20%-40% 的 DNA 损伤）。

上述治疗效果都依赖于细胞通过胞吞作用对 CoO@AuPt 的有效摄取，我们还使用透射电镜观察了纳米酶的胞内分布（图 2-21）。孵育 2 小时后，在 4T1 细胞的细胞质中发现 CoO@AuPt 以聚集体形式存在。相反，在处理 6 小时后观察到具有双层脂质膜自噬体（红色圆圈区域）。当处理时间进一步增加到 48 小时，在细胞质中发现内体/溶酶体小泡，这意味着肿瘤细胞处于凋亡的晚期阶段（图 2-13g）。

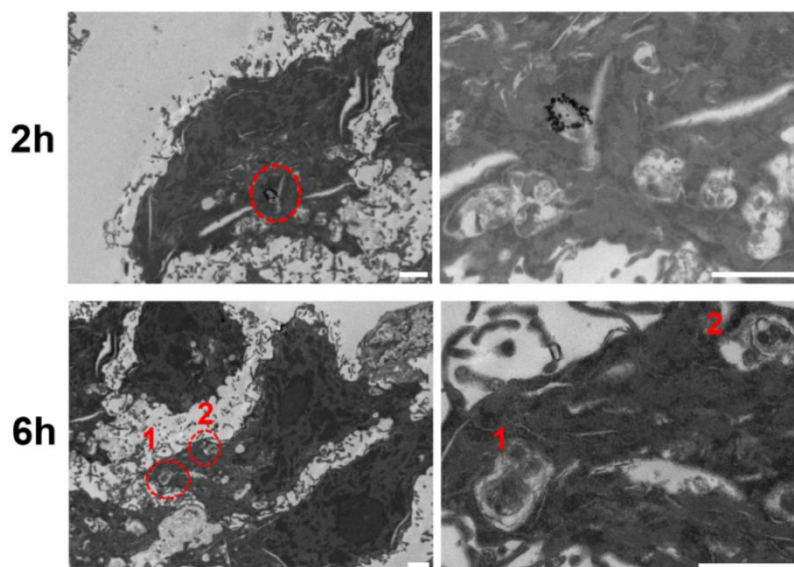


图 2-21 CoO@AuPt 处理 4T1 细胞不同时间后的电镜照片 (1  $\mu\text{m}$ )。

Figure 2-21 TEM images of 4T1 cells after incubation with CoO@AuPt for 2 h and 6 h (1  $\mu\text{m}$ ).

### 2.3.7 CoO@AuPt 的药代动力学和体内成像

静脉注射该纳米酶后，通过使用电感耦合等离子体质谱测量小鼠不同时间点血液中金、铂和钴的浓度来表征 CoO@AuPt 纳米酶的药代动力学。使用单指数药代动力学模型来拟合元素含量的变化 (图 2-22)。金、铂和钴的循环半衰期分别为 1.4455、0.995 和 0.322 h。钴的半衰期较短可归因于其结构的易瓦解。此外，由于金和铂的半衰期比钴元素长，如生物分布实验所示 (图 2-10)，这两种元素的清除要慢得多。从循环系统中快速清除金、铂和钴可以最大限度地降低 CoO@AuPt 应用到临床的潜在毒性或不利影响。

接下来，我们评估了该纳米酶的光热性能，808 nm 近红外激光照射 15 min 后 ( $1.5 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$ )， $75 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  CoO@AuPt 溶液的最终温度可达约  $80^\circ\text{C}$  (图 2-23)。此外，CoO@AuPt 的光热转换效率高达 41.93%，有光热治疗肿瘤的潜在应用。利用它在近红外区的优异吸收和优异光热响应，在体内外评估了 CoO@AuPt 用于癌症诊断的光声成像 (PA) 造影剂的潜力。如图 2-24a 和 2-24b 所示，PA 信号强度随着纳米酶浓度增加而增加。然后，通过分析荷瘤小鼠模型在静脉注射 CoO@AuPt 前后实体瘤的 PA 图像来评估 CoO@AuPt 的体内 PA 成像效果。如图 2-24c，在注射后 24 小时，在肿瘤区域检测到较高对比度 PA 信号。

此外，我们检测了不同浓度的 CoO@AuPt 体外的 CT 成像特性 (图 2-24d 和 2-24e)。随着 CoO@AuPt 浓度的增加，信号强度逐渐增强，这表明了该纳米酶有用作 CT 成像造影剂的可能性。对于体内评估，同样通过静脉注射纳米酶给荷瘤小鼠后，观察肿瘤区域的 CT 成像效果 (图 2-24f)。24 小时的 CT 数值为 123，是

0.5 h 的近 1.73 倍。这种时间依赖性信号增强可能是由于肿瘤组织中 CoO@AuPt 通过 EPR 效应的富集。CoO@AuPt 的多种高性能成像特性对体内肿瘤的快速定位非常有益。

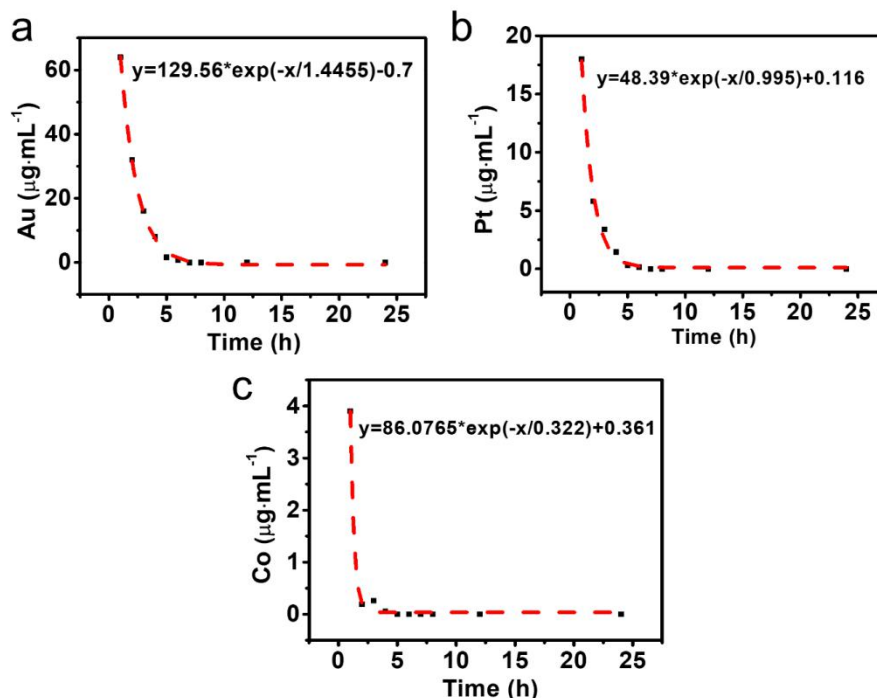


图 2-22 荷瘤 BALB/c 小鼠静脉注射 CoO@AuPt 24 h 后血液中 (a) Au、(b) Pt 和 (c) Co 的药代动力学曲线。

Figure 2-22 Pharmacokinetics of (a) Au, (b) Pt and (c) Co contents in blood over 24 h after intravenous injection of CoO@AuPt into 4T1 tumor-bearing BALB/c mice.

### 2.3.8 CoO@AuPt 的体内抗肿瘤效果

鉴于该纳米酶体外显著的肿瘤特异性细胞杀伤效果，我们进一步进行了荷瘤小鼠体内治疗实验。4T1 荷瘤小鼠被随机分为三组分别注射：(1) 生理盐水、(2) DOX 和 (3) CoO@AuPt (每组 5 只)。DOX 于 20 世纪 60 年代末被发现，并从链霉菌的培养物中分离出来，目前在临床上被用作许多恶性肿瘤的临床化疗药物<sup>[130]</sup>。然而其固有的缺点包括有限的溶解度和非选择性生物分布，通常会导致正常或健康组织的严重损伤<sup>[131]</sup>。在这方面，重要的是开发更有利的抗肿瘤剂，以弥补 DOX 的弱点。为了证明 CoO@AuPt 的优越性，在动物研究中选择 DOX 作为模型化疗药物进行比较。系统地比较了同等给药剂量下 ( $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) DOX 和 CoO@AuPt 的治疗效果。在治疗期间，每天监测小鼠的肿瘤体积和体重。注射盐水组肿瘤生长迅速，而注射 DOX 组肿瘤生长缓慢，有中度肿瘤抑制作用 (图 2-24g)。相比之下，CoO@AuPt 治疗组中有显著的肿瘤抑制效果。此外，在第 15 天，用 CoO@AuPt 处理组的肿瘤生长抑制指数 (TGI) 计算为 58.6%，远高于 DOX 处理组的 29.5%。

第15天切除的实体瘤重量也显示出相同的趋势（图2-24h）。然而，所有组之间的体重没有显著差异，表明对小鼠身体生长的不利影响可以忽略不计（图2-24i）。这些结果表明，CoO@AuPt 纳米粒子可能通过多种催化功能作为一种有效的癌症治疗剂，得到比DOX 更好的治疗效果。

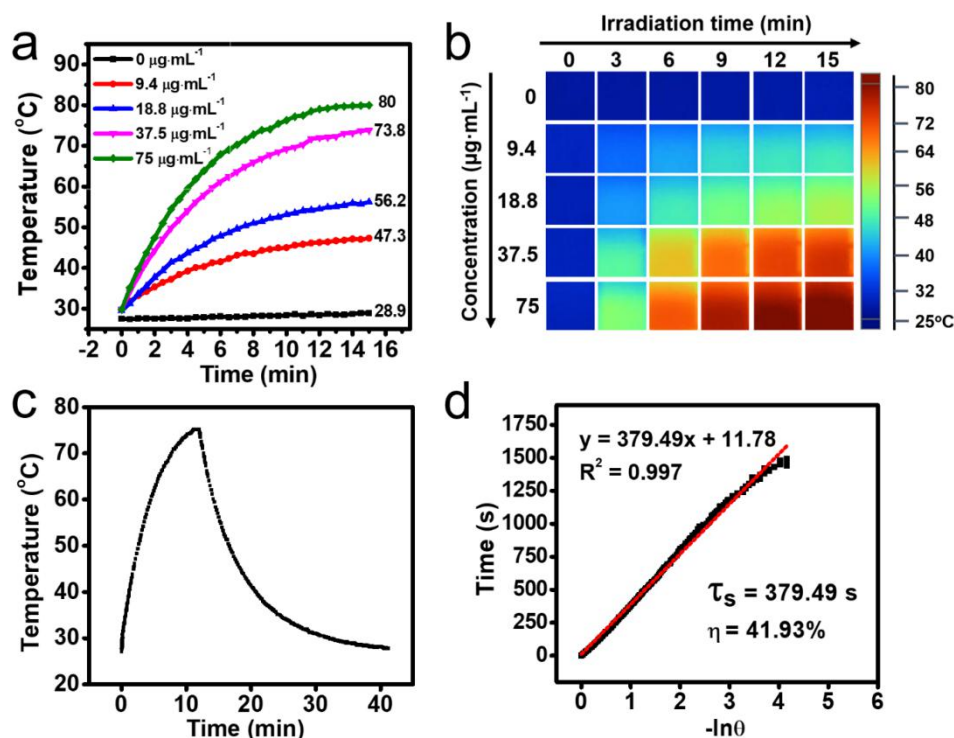


图 2-23 CoO@AuPt 的光热性质：（a）近红外激光照射（808 nm,  $1.5 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$ ）15 min 后，不同浓度 CoO@AuPt 的升温曲线；（b）CoO@AuPt 对应(a)的红外热成像图；（c）CoO@AuPt（1 mL,  $37.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ）的升温 and 降温曲线；（d）拟合（c）中冷却阶段  $-\ln(\theta)$  函数的时间曲线。

Figure 2-23 Photothermal property of CoO@AuPt. (a) Temperature elevation of CoO@AuPt aqueous dispersion at various concentrations under NIR laser irradiation ( $808 \text{ nm}$ ,  $1.5 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) for 15 min; (b) infrared thermographic images of CoO@AuPt corresponding to (a); (c) heating and cooling curve of CoO@AuPt aqueous dispersion (1 mL,  $37.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ); (d) fitting curve of time as a function of  $-\ln(\theta)$  derived from the cooling stage in (c).

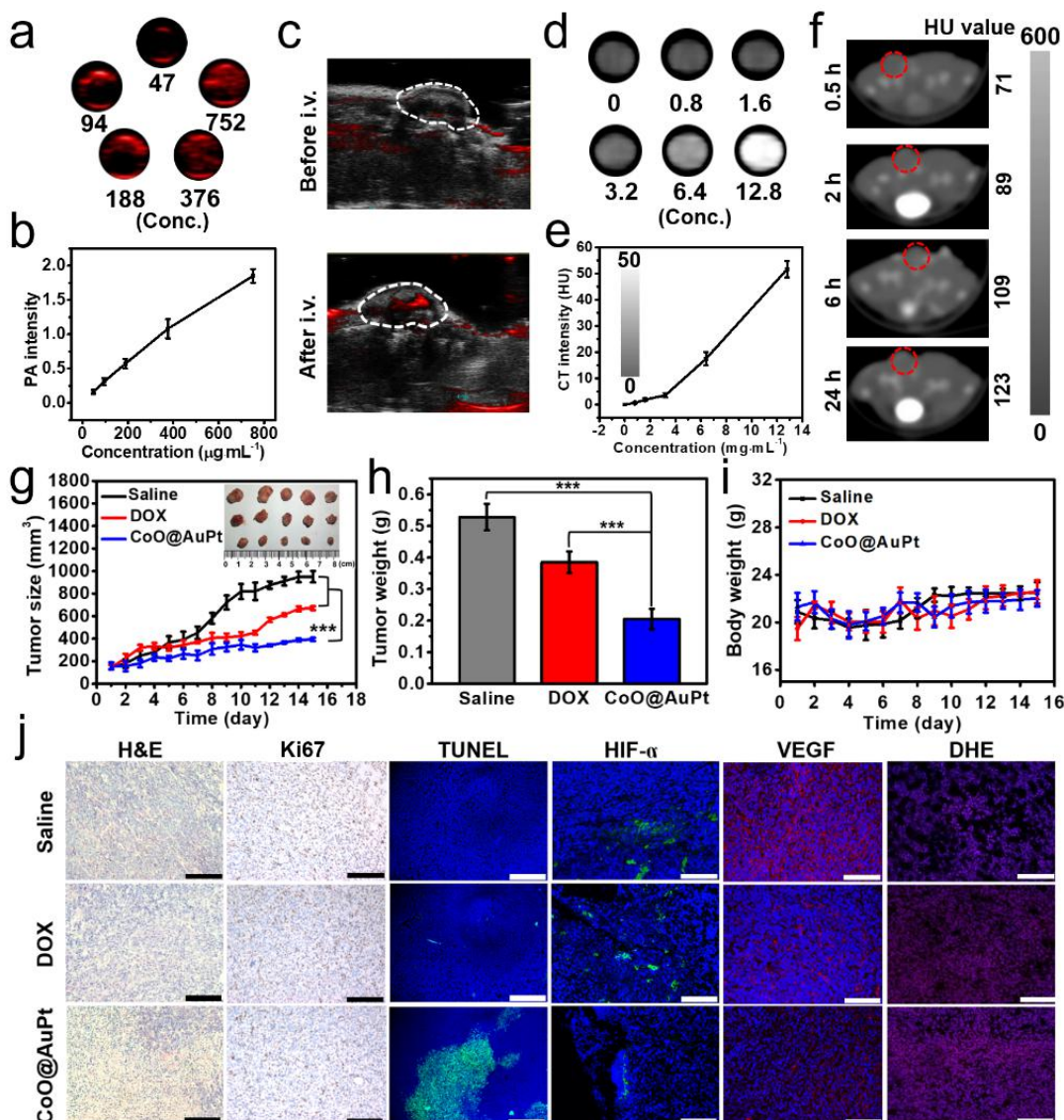


图 2-24 PA/CT 生物模型成像：(a) 体外 PA 图像和 (b) 不同浓度 CoO@AuPt PA 信号平均强度；(c) 静脉注射 CoO@AuPt 24 小时后肿瘤区域的 PA 图像；(d) 体外 CT 图像和 (e) 不同浓度 CoO@AuPt 的平均 CT 强度值；(f) 静脉注射 CoO@AuPt 0.5、2、6 和 24 小时后肿瘤区域的 CT 图像。静脉注射 CoO@AuPt 的体内抗肿瘤作用：(g) 荷瘤 BALB/c 小鼠分别注射生理盐水、DOX 或 CoO@AuPt 的肿瘤生长曲线（附图：治疗后第 15 天切除肿瘤的照片）；(h) 治疗结束时实体瘤的重量；(i) 小鼠治疗期间体重变化；(j) 切除肿瘤的组织学分析：Ki67、TUNEL、HIF- $\alpha$ 、VEGF 和 HE 染色(标尺：100  $\mu\text{m}$ ) (\*\* \*  $p < 0.001$ )。

Figure 2-24 PA/CT biomodal imaging: (a) In vitro PA images and (b) average PA signal intensity of CoO@AuPt with different concentrations; (c) in vivo PA images of tumor region before intravenous (i.v.) injection and at 24 h post-injection; (d) in vitro CT images and (e) average CT intensity values of CoO@AuPt at different concentrations; (f) in vivo CT images of tumor region at 0.5, 2, 6 and 24 h post-injection. In vivo anti-tumor effect of CoO@AuPt through intravenous injection: (g) tumor growth

curve of 4T1 tumor-bearing BALB/c mice after receiving saline, DOX or CoO@AuPt (inset: photos of excised tumors on day 15 post-treatment); (h) weight of solid tumors at the end of each treatment regimen; (i) variation of mouse body weight in a treatment period of 15 days; (j) histological analysis of the excised tumor sections by H&E, Ki67, TUNEL, HIF- $\alpha$ , VEGF and DHE staining (scale bars: 100  $\mu$ m) (\*\* $p < 0.001$ ).

我们还进行组织病理学分析以观察组织水平的肿瘤生长抑制（图 2-24j）。在苏木精和伊红染色后，CoO@AuPt 治疗组的肿瘤切片中观察到典型的核浓缩和膜断裂，这种形态学畸变表明肿瘤组织的损伤。同时，Ki67 的表达与细胞增殖密切相关，并广泛用于常规病理分析。与其他组相比，CoO@AuPt 治疗组的 Ki67 阳性细胞数量显著减少，表明有效抑制了肿瘤细胞增殖。同样，TUNEL 染色后的绿色荧光证明凋亡细胞数量显著增加。此外，免疫荧光结果表明 CoO@AuPt 治疗组还导致 HIF-1 $\alpha$  表达的显著抑制，这意味着有效缓解了局部缺氧。此外，这种缺氧改善可以下调血管内皮生长因子的表达并抑制血管生成。CoO@AuPt 处理后的肿瘤组织冷冻切片，通过 DHE 染色表明其在肿瘤部位确实有活性氧产生。值得注意的是，在整个治疗过程中，主要器官没有明显的病理损伤或其他异常，表明 CoO@AuPt 没有引起明显的全身毒性（图 2-25）。

我们同样将 CoO@AuPt 通过瘤内注射用于肿瘤抑制实验（图 2-26）。瘤内注射 CoO@AuPt 治疗 15 天也可抑制肿瘤。最终 TGI 为 64.5%，高于静脉注射所得的 58.6%。与其他组相比，该治疗方案对主要器官也没有明显的副作用（图 2-27）。可以假设，与静脉给药相比，通过瘤内注射，纳米药物的局部药物浓度和肿瘤与器官的比率都可以显著改善<sup>[132]</sup>。然而，单次瘤内注射可能会导致实体瘤内药物分布不均匀，没有通过全身给药的增强渗透和保留效应来富集药物<sup>[133]</sup>。因此，无论采用何种给药途径，复杂的因素抑制药物的治疗效果，并且只有基于治疗结果的实验证据才能推荐为最佳策略。

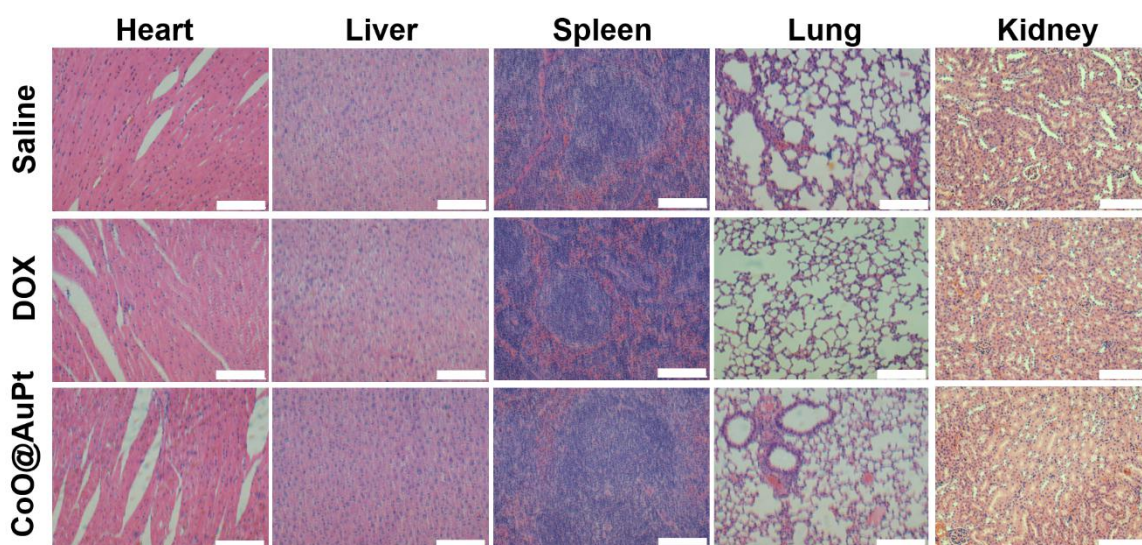


图 2-25 荷瘤小鼠静脉注射治疗 15 天后主要器官切片 HE 染色 (标尺: 100  $\mu\text{m}$ )。

Figure 2-25 H&E staining of major organ slices from 4T1 tumor-bearing mice on day 15 after intravenous injection with various agents (scale bars: 100  $\mu\text{m}$ ).

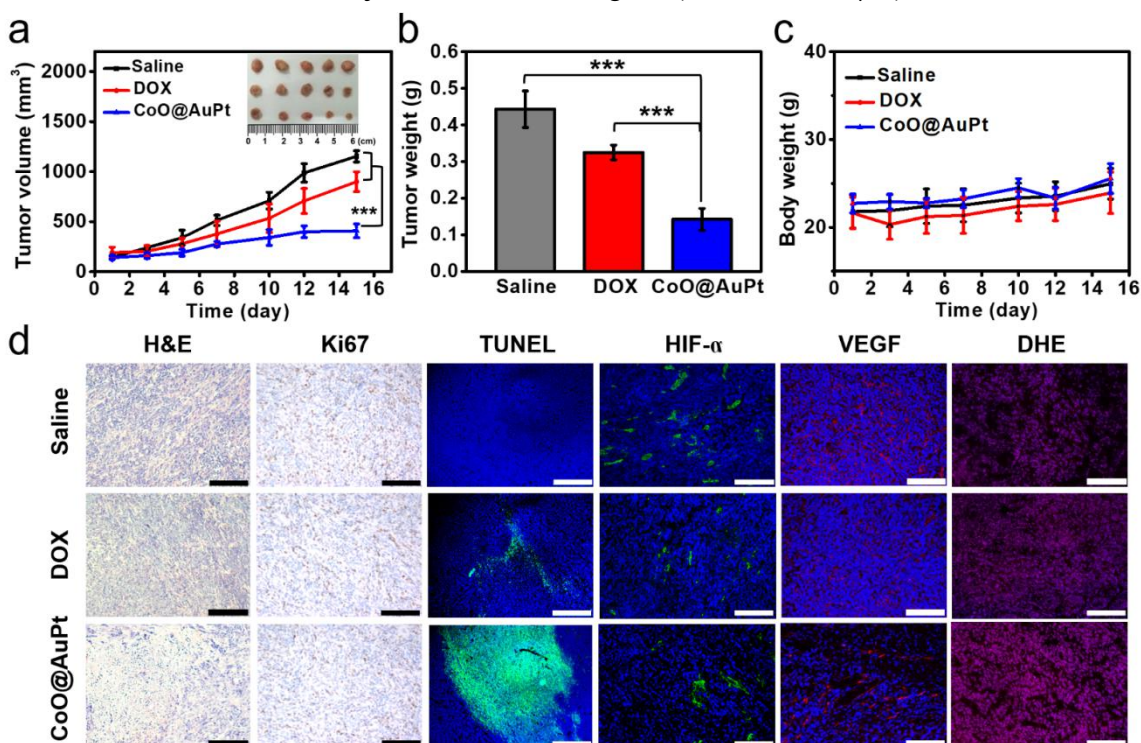


图 2-26 CoO@AuPt 通过瘤内注射的体内抗肿瘤实验。(a) 荷瘤 BALB/c 小鼠分别接受生理盐水、DOX 或 CoO@AuPt 治疗后的肿瘤生长曲线 (附图: 治疗后第 15 天切除的肿瘤照片); (b) 每个治疗方案结束时的实体瘤重量; (c) 15 天治疗期间小鼠体重变化; (d) 切除肿瘤的组织学分析): Ki67、TUNEL、HIF- $\alpha$ 、VEGF 和 DHE (标尺: 100  $\mu\text{m}$ )。

Figure 2-26 In vivo anti-tumor effect of CoO@AuPt through intratumoral injection. (a) tumor growth curve of 4T1 tumor-bearing BALB/c mice after receiving saline, DOX or CoO@AuPt (inset: photos of

excised tumor on day 15 post-treatment); (b) solid tumor weight at the end of each treatment regimen; (c) variation of mouse body weight in a treatment period of 15 days; (d) histological analysis of the excised tumor sections by H&E, Ki67, TUNEL, HIF- $\alpha$ , VEGF and DHE staining (scale bars: 100  $\mu$ m).

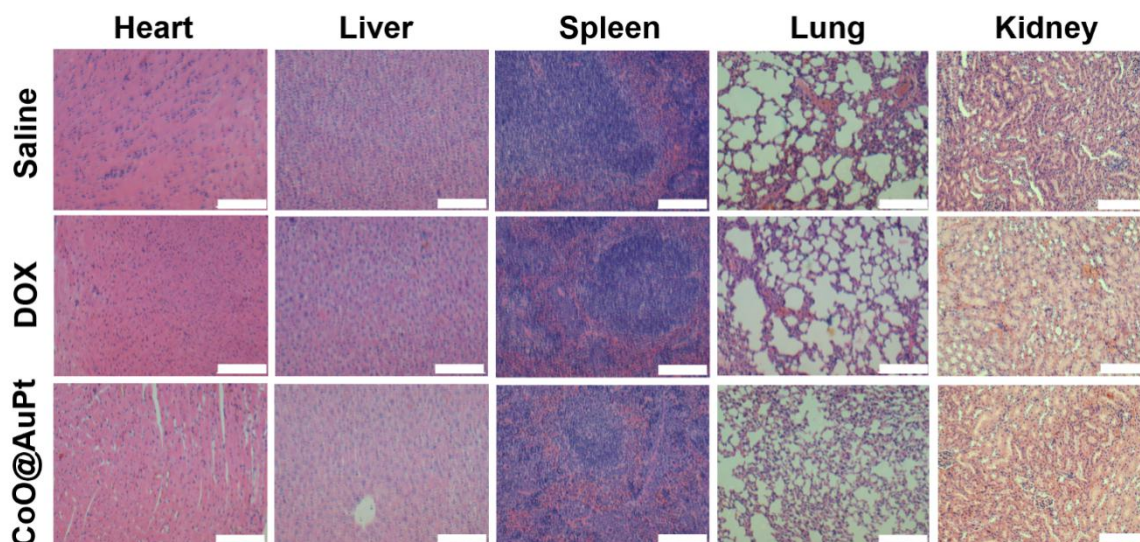


图 2-27 荷瘤小鼠瘤内注射治疗 15 天后主要器官切片 HE 染色 (标尺: 100  $\mu$ m)。

Figure 2-27 H&E staining of major organ slices from 4T1 tumor-bearing mice on day 15 after intratumoral injection with various agents (scale bars: 100  $\mu$ m).

## 2.4 本章小结

综上所述,我们设计并合成了一种具有多种酶活性的新型 CoO@AuPt 纳米酶,可以响应肿瘤微环境引发一系列酶催化反应。与传统的活性氧生成系统相比,该平台具有多种优势:(1) CoO @ AuPt 介导的催化过程具有肿瘤特异性损伤作用,对正常细胞的损伤作用不明显;(2) 通过静脉注射或瘤内注射 CoO@AuPt,可以实现高效的肿瘤生长抑制,避免了其他治疗方式的典型缺陷,如光的穿透深度受限、超声诱发的发热或复杂的外部刺激设备;(3) 细胞内活性氧水平可以通过协同催化作用显著提高,包括通过催化氧化葡萄糖分解持续供应 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,并通过过氧化物酶活性诱导的局部谷胱甘肽消耗来缓解氧化应激。(4) 其肿瘤微环境特异性解聚性能可以增加肿瘤部位渗透深度和加速纳米材料在体内的肾清除,减少长期滞留引起的毒性。在细胞水平和动物研究中都证明了高效的肿瘤抑制功能。这项研究不仅为多功能 CDT 药物的设计提供了一个范例,而且为利用独特的肿瘤微环境响应型治疗方向展示了有临床应用价值的治疗机制。

## 第3章 CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>自增强纳米酶用于肿瘤微环境响应的 CDT/SDT/免疫疗法协同治疗

### 3.1 引言

癌症是人类健康的劲敌。声动力疗法(SDT)作为一种新型的治疗手段,由于具有较高组织穿透能力、无创性和时间可控等特点而得到广泛应用。超声成像已广泛应用于临床有效地诊断和治疗各种疾病<sup>[134,135]</sup>。有机卟啉作为声敏剂在声动力治疗中应用最为广泛。然而,与有机声敏剂相比,无机声敏剂具有较高的生理条件稳定性和化学稳定性,因而受到越来越多的关注<sup>[136]</sup>。特别是一些无机纳米粒子的体积优势小到可以穿过血管进入肿瘤深部组织。各种无机纳米体系已被开发用于声动力治疗,包括硅基纳米粒子、碳纳米材料、金纳米粒子、二氧化钛<sup>[137-139]</sup>等无机纳米复合体系。此外,声动力介导的活性氧产生过程,高度依赖于氧气水平<sup>[86-88]</sup>。因此,肿瘤缺氧微环境在很大程度上限制了SDT的治疗效果。一些研究者试图通过递送充氧载体或具有类过氧化氢酶活性的纳米颗粒至肿瘤部位提高SDT的效率<sup>[140-141]</sup>,但这些负载药物易泄漏、稳定性差和制备复杂等缺点阻碍了其进一步的临床应用。因此,开发一种简单高效的纳米系统,以有效抑制肿瘤生长,同时催化肿瘤微环境中过表达的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>产生氧气来缓解缺氧条件,是增强SDT疗效的一个关键的策略。

近年来,人造纳米酶在癌症治疗中得到了广泛的应用。一些具有多功能纳米酶活性的无机纳米材料,由于其优异的理化性质和结构优势,与光、微波、磁和超声等多种技术相结合,广泛应用于癌症治疗和抗转移。虽然这些治疗方式对激活免疫治疗抗肿瘤的详细机制尚不明确,但它们能引起细胞免疫原性死亡从而激活免疫系统的能力已被证实<sup>[142-145]</sup>。例如,Cu<sub>2-x</sub>Te人工酶通过催化级联反应诱导免疫原性细胞死亡,并成功诱导免疫记忆效应抑制肿瘤转移<sup>[142]</sup>。

本章工作通过溶剂热法成功合成了具有花状结构的多功能纳米酶CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>,并在其表面修饰PEG增加其生物相容性得到CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-PEG(CFP)。该纳米酶通过静脉注射小鼠体内后,通过EPR效应富集到肿瘤区域。首先,该铁酸钴纳米酶不仅具有类过氧化物酶的活性,能响应催化肿瘤微环境内过表达的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>产生羟基自由基实现化学动力疗法,而且具有类过氧化氢酶的特性,可以分解H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>产生氧气。另一方面,由于具有较小的带隙能,使得其在超声刺激下可以促进电子空穴分离,将周围的氧气分子转化为单线态氧。因此成为无机声敏剂理想候选材料。鉴于前面提到的其类过氧化氢酶活性可以催化H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>产生氧气,来自增强其声动力效率。从而实现在肿瘤微环境自增强声动力疗法和化学动力疗法协同治疗。得到一种简

单易得的人造酶联合超声刺激治疗4T1乳腺癌的纳米药物。更重要的是，我们发现该纳米酶可以通过调节转移相关蛋白抑制肿瘤转移，另一方面，光热疗法、声动力疗法和化学动力疗法等方式已经被证明可以引起细胞免疫原性死亡，我们验证了该纳米酶介导的化学动力疗法和声动力疗法产生的活性氧同样可以引起细胞免疫原性死亡。因此将其并与PD-L1抗体联合使用，实现了与免疫治疗相结合的多种治疗方式协同应用，有效地抑制肿瘤生长和转移。如图3-1所示。

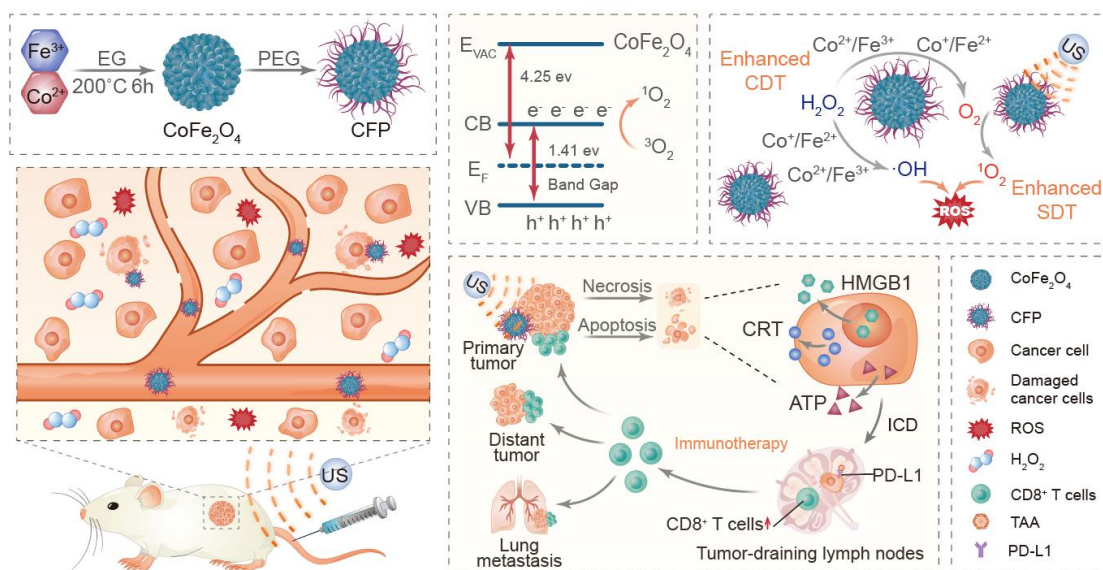


图3-1 花状铁酸钴纳米酶的合成过程和增强癌症化学动力、声动力和免疫疗法的工作机制。

Figure 3-1 Schematic illustration to indicate the synthetic procedure of  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  and the working mechanism for CDT, SDT and immunotherapy of cancer.

## 3.2 实验部分

### 3.2.1 仪器

见表 2-1。

### 3.2.2 试剂

见表 2-2。

### 3.2.3 $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ 纳米酶的制备

通过改进我以前的实验方法合成了 $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ 纳米酶。 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (0.36 g) 和  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (0.19 g) 溶于20 mL乙二醇中。然后将0.9 g NaAc溶解在溶液中，加入NaOH调整其pH值为12。溶解完全的混合物转移到一个四氟乙烯容器中，并密封在不锈钢高压反应釜中。在烘箱内 $180^\circ\text{C}$ 反应 6 h。产品用无水乙醇洗2次，用水磁洗分离洗3次。PEG修饰的方法是将 $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ 与 $\text{NH}_2\text{-PEG3400-COOH}$ 以1:1 (wt%)

的比例混合，在室温下超声30 min，然后将PEG修饰后的CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>纳米酶进行磁选分离，再用水反复洗涤2次待用。

### 3.2.4 CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>的类过氧化氢酶和类过氧化物酶活性评估

不同浓度的CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-PEG (CFP) (100、50、25、0 μg·mL<sup>-1</sup>)与含10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>在100 mL PBS溶液中反应。使用便携式溶解氧仪 (JPB-607A, 上海INESA科学仪器, 中国)测量溶解氧浓度随时间变化趋势。将20 μg·mL<sup>-1</sup> CFP分散于2 mL pH = 6.8的0.1 M磷酸缓冲液中, 加入20 μL 10 mg·mL<sup>-1</sup> TMB和10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 用紫外可见分光光度计测定被氧化后TMB在652 nm处的吸收强度, 以验证其类过氧化物酶活性。同样使用200 μg·mL<sup>-1</sup>的邻苯二胺 (OPD) 作为底物进行过氧化物酶活性验证。并测量其氧化产物在490 nm处的特征强度。同样使用2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐 (ABTS) 作为过氧化物酶底物, 在pH = 4.5的醋酸缓冲液中评估了CFP的类过氧化物酶活性。

我们还通过米式方程评估了其类酶活性效率, 具体实验步骤如下: 将8 mL CFP溶液 (10 μg·mL<sup>-1</sup>) 与不同浓度的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0、5、10、15、20、25、30 mM) 混合于0.1 M pH = 6.8 (模拟肿瘤微环境) 的磷酸盐缓冲溶液中, 研究其类过氧化氢酶活性。并使用便携式溶氧仪测量溶解氧浓度随时间的变化, 通过浓度变化计算参与反应的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>浓度。反应速率用Origin2018的Michaelis-Menten方程模拟, 以计算动力学常数:

$$v = V_{\max} \times [S]/(K_m + [S]) \quad (1)$$

其中  $v$  为初速度,  $V_{\max}$  为最大反应速度,  $[S]$  为底物 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度,  $K_m$  为 Michaelis 常数。也使用了相应的 Lineweaver-Burk 线性拟合方程。

另外, 也拟合了过氧化物酶活性, 用不同浓度 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0、0.05、0.1、0.2、0.4、0.8 和 1.6 M) 在 2 mL 0.1 M 磷酸缓冲液 (pH = 6.8) 中加入 10 μg·mL<sup>-1</sup> CFP 溶液, 50 μL TMB (10 mM)。然后实时监测 TMB 底物被氧化后在 652 nm 处的吸光度。根据 TMB 氧化的初始斜率计算不同浓度 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的反应速率 ( $v$ )。将数据拟合到 Michaelis Menten 饱和曲线上, 计算  $K_M$  和  $V_{\max}$ 。TMB 氧化物在 652 nm 处的摩尔吸收系数为 39000 M·cm<sup>-1</sup>[146]。用下列公式计算催化常数  $k_{\text{cat}}$

$$k_{\text{cat}} = v_{\max} / [E] \quad (2)$$

其中  $k_{\text{cat}}$  是速率常数, 定义了每单位时间内转化成产物的底物分子的最大数目。[E]是纳米酶浓度 (M)。类过氧化物酶的催化效率按公式(3)计算:

$$\text{Efficiency} = K_{\text{cat}} / K_M \quad (3)$$

### 3.2.5 CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> 纳米酶产生活性氧评估

用 0.1% 亚甲基蓝 (MB) 作为检测羟基自由基的指示剂, 分别检测五个处理组产生活性氧的能力: 1. 对照组为 MB 溶液, 2. US+ 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 3. US+ CFP, 4. CFP + 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 5. US+ CFP + 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>。(US 刺激参数: 1.0 MHz, 0.5 W·cm<sup>-2</sup>, 20%, 3 min)。CFP 的浓度为 50 μg·mL<sup>-1</sup>, 处理完后立即用紫外可见分光光度计测量 MB 吸收变化。还用 1 mg·mL<sup>-1</sup> 3-二苯基异苯并呋喃 (DPBF) 检测了 CFP 在超声刺激下产生单线态氧的能力。分别给与 4 个不同处理组: 1. US, 2. US+ 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 3. US+ CFP, 4. US+ CFP + 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (US 刺激参数: 1.0 MHz, 0.5 W·cm<sup>-2</sup>, 20%, 5 min)。CFP 的浓度为 50 μg·mL<sup>-1</sup>。然后用紫外可见分光光度计测量 DPBF 随处理时间的吸收变化。并用电子自旋共振光谱仪 (ESR) (Bruker Biospin GmbH, Germany) 进一步验证了其羟基自由基和单线态氧的产生, DMPO 作为 <sup>1</sup>O<sub>2</sub> 的捕获试剂。而 TEMP 作为 ·OH 的捕获剂。

### 3.2.6 CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> 纳米酶的生物相容性

溶血率实验: 取 BALB/c 小鼠全血测定 CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-PEG 对红细胞的溶血作用。通过眼眶取血后, 3000 rpm 离心 5 min, 用 PBS 洗 3 次。将 400 μL 红细胞 (4%, v/v) 与不同浓度的 CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-PEG 混合, 室温孵育 6 h 后, 10000 rpm 离心 5 min 后收集上清液, 用酶标仪测定上清液在 570 nm 处的吸收强度。用人脐静脉内皮细胞 (HUVECs) 和小鼠成纤维细胞 (L929) 评价了 CFP 在体外的生物相容性。具体步骤如下, 细胞在 96 孔板中培养贴壁后 (密度: 1×10<sup>4</sup> /孔), 用不同浓度的 CFP 处理 24 h, 然后用标准 MTT 法测定细胞活力。体内生物相容性评估实验: 选取健康雌性 BALB/c (n = 5)。将不同剂量 (0、12.5、25、50 mg·kg<sup>-1</sup>) 的 CFP 通过尾静脉给药注射到小鼠体内。在给药后 15 天内记录所有小鼠的体重变化。第 15 天取小鼠全血并用动物血常规分析仪进行血液学分析。组织学分析采用福尔马林 (10%) 固定解剖得到的主要脏器, 石蜡包埋后切片并进行 H&E 染色, 再用显微镜观察。

### 3.2.7 CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> 纳米酶相关细胞染色实验

所有涉及到观察细胞内荧光的实验都是采用激光扫描共聚焦显微镜。首先为了验证细胞内 ROS 的产生, 4T1 细胞在 12 孔板中培养贴壁后 (密度: 5×10<sup>4</sup> /孔), 与 CFP 共孵育 4 h 后 (75 μg·mL<sup>-1</sup>)。用 PBS 洗涤未被内吞的材料, 给予 US 刺激或 100 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理 (US: 1.0 MHz, 0.5 W·cm<sup>-2</sup>, 20%, 3 min), 具体分为 6 组: 1. 不做任何处理, 2. US+10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 3. CFP, 4. CFP + 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 5. CFP + US, 6. US+ CFP + 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>。继续培养 2 h 后, 细胞用 DCFH-DA (10 μM) 染色 20

分钟, 随后用 Hoechst 33342 ( $2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 染核 20 min。洗涤后采用激光扫描共聚焦显微镜观察细胞内荧光情况。同样处理后的细胞还用 DiD 细胞膜染料和死活染试剂盒观察了细胞膜的损伤情况和细胞死亡情况。

所有的细胞免疫荧光染色实验步骤如下, 4T1 细胞经过上述不同处理组处理后继续培养 2 小时。然后用 PBS 洗涤 3 次, 4%多聚甲醛溶液固定 10 min, 0.2% Triton X-100 渗透 5 min。然后用 1% BSA 在室温下封闭 1 h, 一抗孵育 4°C 过夜, 然后用 FITC 或 Cy3 标记的二抗在室温下孵育 4 h。用 PBS 洗 3 次之后, 用含有 DAPI 的封片液封片, 最后用共聚焦显微镜观察细胞内荧光情况。

### 3.2.8 CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> 纳米酶处理细胞相关 WB 实验

首先, 4T1 细胞用  $75 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  CFP 共孵育 4 h, PBS 洗涤后, 用超声刺激 (US: 1.0 MHz,  $0.5 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$ , 20%, 3 min) 或  $10 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$  处理细胞, 具体分为 6 组: 1. 不做任何处理, 2. US+10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 3. CFP, 4. CFP +10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 5. CFP +US, 6. US+CFP + 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>。继续培养 2 h 后使用胰酶消化收集细胞。然后, 使用 RIPA 裂解缓冲液在冰上裂解细胞, 裂解后使用冷冻离心机 12000 rpm 离心 15 min, 收集上清液。并使用 BCA 试剂盒对蛋白浓度进行定量。然后与上样缓冲液混合后开水煮开 5 min, 加入制备好的胶样进行电泳。最后将蛋白转移到 PVDF 膜上, 与兔抗 MMP9、兔抗 VEGF、兔抗 GADPH、兔抗 Tubulin、兔抗 Caspase 3、兔抗 GPX4、兔抗 RARP 和兔抗 E-cadherin 抗体 4°C 孵育过夜。然后用二抗孵育。使用 ECL 显影液检测信号。

### 3.2.9 CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> 纳米酶介导的细胞免疫原性死亡

将  $75 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的 CFP 与 4T1 共孵育 4h 细胞, 用 PBS 洗涤未被内吞的材料, 用超声刺激 (US: 1.0 MHz,  $0.5 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$ , 20%, 3 min) 或  $10 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$  处理细胞, 具体分为 6 组: 1. 不做任何处理, 2. US+10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 3. CFP, 4. CFP +10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 5. CFP +US, 6. US+ CFP + 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>。继续培养 2 h 后收集上清液, 贴壁细胞用胰酶消化, 收集细胞, 在冰上裂解细胞, 冷冻离心机 1500 rpm 离心 5 min, 收集上清。用碧云天 ATP 试剂盒测定 ATP 含量。对于钙网蛋白 (CRT) 和 HMGB1 免疫染色, 处理后的 4T1 细胞用 4%多聚甲醛溶液固定 10 min, 0.2% Triton X-100 渗透 5 min。然后用 1% BSA 在室温下封闭 1 h, 与一抗孵育 4°C 过夜, 然后用 FITC 或 Cy3 标记的二抗室温下孵育 2 小时。用 PBS 洗 3 次之后, 用含有 DAPI 的封片液封片, 最后用共聚焦显微镜观察细胞内荧光情况。

### 3.2.10 建立 4T1 荷瘤小鼠模型

所有的动物处理程序都遵循西南大学动物护理和使用机构委员会的批准，并按照《中国实验动物护理和使用国家规定》执行。将 4T1 ( $2 \times 10^5$  个) 乳腺肿瘤细胞植入 BALB/c 小鼠的后腿背部皮下区域，随后生长一个星期左右，直到肿瘤体积达到约  $200 \text{ mm}^3$ 。根据修正的椭球公式(1)计算肿瘤体积 V。a 为宽度，b 为长度。

$$V = 0.5 \times b \times a^2$$

双肿瘤模型是先左后腿接种肿瘤 ( $2 \times 10^5$  个)，一个星期后在右后腿接种远端肿瘤 4T1 细胞 ( $4 \times 10^4$ )。

### 3.2.11 CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> 纳米酶的药代动力学

雌性 BALB/c 荷瘤小鼠通过尾静脉注射 CFP ( $25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )。用毛细管在不同时间点取小鼠眼窝血，王水溶解后，用 ICP-MS 仪器测定血液中 Co 元素的浓度。

### 3.2.12 CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> 纳米酶的 MRI 成像

用德国西门子 Prisma 3.0 T MR 扫描仪 (梯度强度可达  $80 \text{ mT/m}$ (T<sub>2</sub>, CPMG)) 测量了不同浓度 CFP 的磁共振成像(MRI)信号。同样用该仪器对静脉注射 CFP ( $25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 的荷瘤小鼠进行 MRI 信号检测 (TR = 3500 ms, TE = 35 ms. Matrix = 128\*128)。

### 3.2.13 CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> 纳米酶的体内抗肿瘤效率

20 只雌性 BALB/c 荷瘤小鼠随机分为四组，分别处理为：1. 生理盐水, 2. US 刺激, 3. CFP ( $25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), 4. CFP+US。CFP 经尾静脉注射 ( $150 \mu\text{L}$ )。分别在注射后第 1 天和第 3 天给予或不给予 US 刺激 (US:  $1.0 \text{ MHz}$ ,  $1 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$ , 20%, 5 min)。然后记录小鼠体重和肿瘤体积。第 14 天后将所有小鼠处死并解剖后取实体瘤及主要脏器 (心、肝、脾、肺、肾)，进一步进行组织病理学分析和免疫荧光染色。根据修正的椭球形公式计算肿瘤体积：

$$V = 0.5 \times \text{长} \times \text{宽}^2$$

### 3.2.14 CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> 纳米酶结合免疫治疗抗肿瘤和抗转移效率

我们还使用双边瘤模型评价了 CFP ( $25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 介导的化学疗法和声动力疗法联合 PD-L1 抗体介导的免疫治疗协同治疗效果。荷瘤小鼠在接种完第二个肿瘤后给不同处理组小鼠给药：1. 生理盐水, 2. US+ $\alpha$ PD-L1, 3. CFP+ $\alpha$ PD-L1 ( $25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), 4. CFP+US+ $\alpha$ PD-L1。分别在第 1 天和第 3 天给与超声刺激 (US:  $1.0 \text{ MHz}$ ,  $1 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$ , 20%, 5 min)，在第 1、4、7 天注射  $\alpha$ PD-L1 抗体 ( $75 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )。每天记录小鼠体重和近端瘤、远端肿瘤尺寸。治疗 14 天后，所有小鼠均处死并解剖后取实体瘤及主要脏器 (心、肝、脾、肺、肾)，进一步进行组织病理学分析和免

疫荧光染色。

抗转移实验分为两组，接种双边瘤模型后，对照组注射生理盐水作为对照，治疗组注射 CFP (25 mg·kg<sup>-1</sup>) 并在第 1 天和第 3 天给与超声刺激 (US: 1.0 MHz, 1 W·cm<sup>-2</sup>, 20%, 5 min)，第 1、4、7、注射 PD-L1 抗体治疗 (75 μg·kg<sup>-1</sup>)。在第 8 天每只小鼠静脉注射 4T1 (1 × 10<sup>5</sup>) 细胞，继续饲养 21 天后取肺观察肺转移结节情况，并作肺切片 HE 染色。

### 3.3 结果与讨论

#### 3.3.1 CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> 纳米酶的特征

CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> 纳米酶的合成是参考我们之前的溶剂热法合成 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 纳米粒子的方法。通过添加氯化钴作钴源和调整溶剂 pH 值得到，从 TEM 图像 (图 3-2a、3-2b) 中可以观察到，CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> 是由小颗粒聚集成类似花状结构并且尺寸均一的纳米颗粒。用 ImageJ 统计电镜照片得到 CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> 纳米酶的平均粒径为 164.8 ± 20.7 nm (图 3-2b)。通过静电吸附作用修饰 PEG 后，得到 CFP 的水合粒径为 280 nm (图 3-3a)，这一尺寸比电镜照片统计的偏大可能是因为 PEG 的修饰或 CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> 的磁性影响的。修饰 PEG 后 zeta 电位从 18.1 mV 变化到 21 mV (图 3-3c)，这可能是由于氨基暴露在外端。从透射电镜的衍射图样 (图 3-2c) 中可以看出 CFP 具有体心立方晶体结构。同样用 XRD 对 CFP 的晶体结构进行了表征 (图 3-2d)，结果表明 (1 1 1)、(2 2 0)、(3 1 1)、(4 4 0) 和 (5 1 1) 的衍射峰与 CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (JCPDS #22 -1086) 很好地相对应。衍射模式为晶体立方尖晶石结构，具有 Fd3m(227) 空间群<sup>[147]</sup>。合成的 CFP 在 581 cm<sup>-1</sup> 处出现 Fe-O 和 Co-O 伸缩振动峰的特征峰。在 CFP 表面修饰 NH<sub>2</sub>-PEG-COOH 配体基团后，在 1047 cm<sup>-1</sup>、1347 cm<sup>-1</sup> 和 1585 cm<sup>-1</sup> 处的新峰分别为 C=O、C-H、N-H 基团的伸缩振动峰 (图 3-2e)，表明 PEG 通过静电吸附成功修饰在铁酸钴表面。图 3-2f 揭示了 300K 温度下 CFP 的 M-(H) 磁滞回线。可以得到 CFP 的饱和磁化强度 (Ms) 为 46.8 emu·g<sup>-1</sup>，而 PEG 修饰前为 100 emu·g<sup>-1</sup> (图 3-2c)。这可能是由于生物大分子的修饰影响了其磁性的变弱。由于磁感应热效率高度依赖于磁性，这一特性说明 CFP 在磁热治疗肿瘤方面也有很好潜在应用前途。我们还在室温下表征了 CFP 的电子顺磁共振 (EPR) 波谱，如图 3-2g，在 g 值为 2.101 处显示出特征共振信号，据已有的文献报道铁离子的共振信号特征 g 征值为 2.0<sup>[148]</sup>。而该 CFP 共振信号观察到 g 值为 2.101 可以归因于 Fe<sup>3+</sup> 和 Co<sup>2+</sup> 之间的电子交换。EPR 谱和 M-(H) 磁滞回线都表明制备的 CFP 具有顺磁性。XPS 图谱进一步证明了 CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> 的成功合成，图 3-4 中明显观察到铁元素、钴元素和氧元素的特征峰。Fe2p 图中三价铁元素的特征峰处的结合能 (732.9 eV 和 717.2 eV) 表明 CFP 中存在 Fe<sup>3+</sup> (图 3-2h)。Co2p<sub>3/2</sub> 处结合能 786.19 eV 和 Co2p<sub>1/2</sub> 处的结合能 801.8

eV 也表明了  $\text{Co}^{2+}$  的特征峰 (图 3-2i)。O1s 在 529.78 eV 处的特征吸收也证明其处在金属氧化物中的氧元素。这些结果都证明了 CFP 的成功合成。

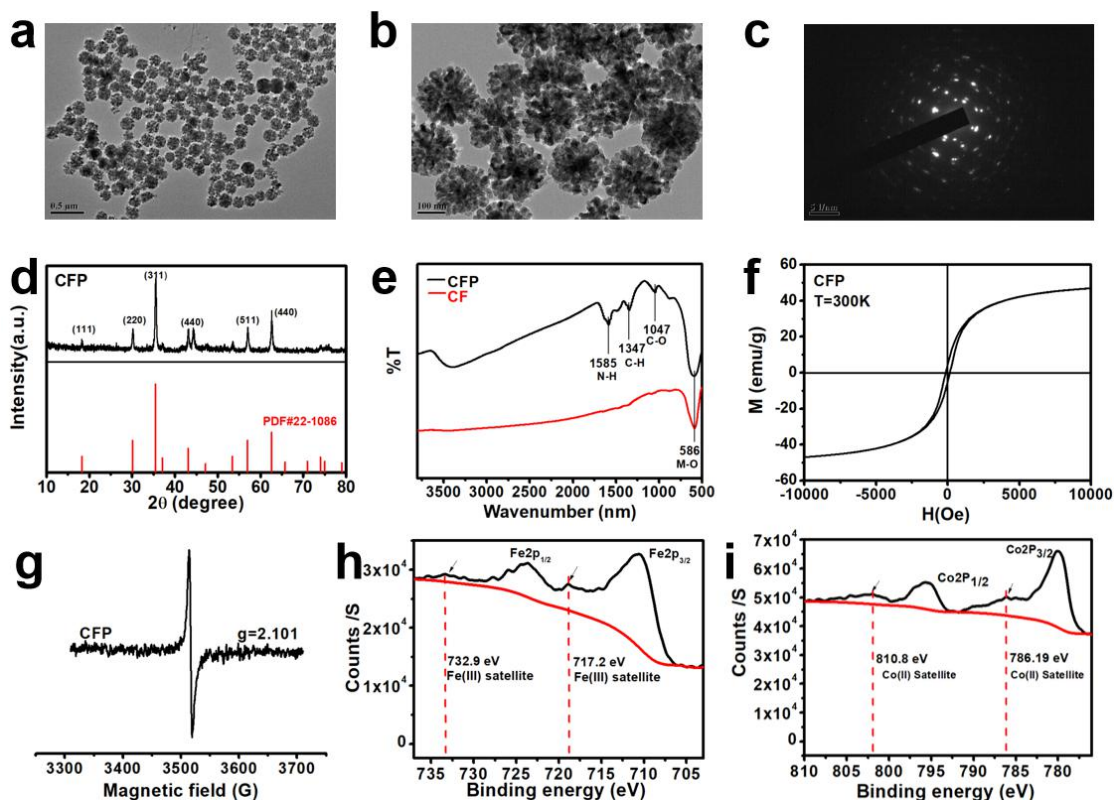


图 3-2 铁酸钴纳米酶的表征: (a) 铁酸钴的低倍 TEM 图像; (b) 铁酸钴的高分辨率 HRTEM 图像; (c) 铁酸钴的晶格衍射图; (d) 铁酸钴的 XRD 图谱; (e) 铁酸钴修饰 PEG 前后的 FTIR 光谱; (f) 铁酸钴在 300K 温度下的磁滞回线; (g) 室温下铁酸钴的 EPR 图谱; (h) 铁酸钴中铁元素的 XPS 谱图; (i) 铁酸钴中钴元素的 XPS 谱图。

Figure 3-2 Characterizations of CFP: (a) low magnification TEM image of CFP ; (b) high resolution (HR) TEM image of CFP ; (c) SAED image of CFP ; (d) XRD pattern of CFP ; (e) FTIR spectrum of CFP showing the coating of PEG; (f) Magnetic hysteresis loops of CFP at 300 K temperature; (g) EPR spectrum of CFP recorded at a room temperature; (h) XPS spectrum of Fe2p in CFP ; (i) XPS spectrum of Co2p in CFP .

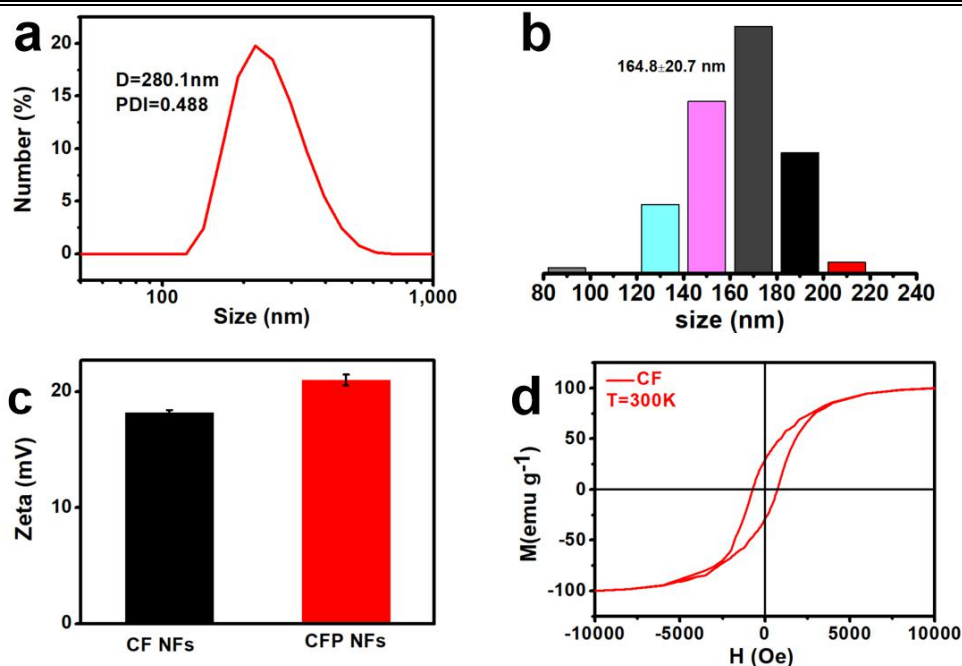


图 3-3 (a) CFP 在去离子水中的粒径分布；(b) CFP 在 TEM 图中的尺寸分布（用 ImageJ 统计）；(c) CFP 修饰 PEG 前后的 zeta 电位；(d) 300 K 温度下未修饰 PEG 的磁滞回线。

Figure 3-3 (a) size distribution of CFP in DI water; (b) size distribution of CFP in TEM picture; (c) zeta potential of CFP; (d) Magnetic Hysteresis loops of CF at 300K temperature.

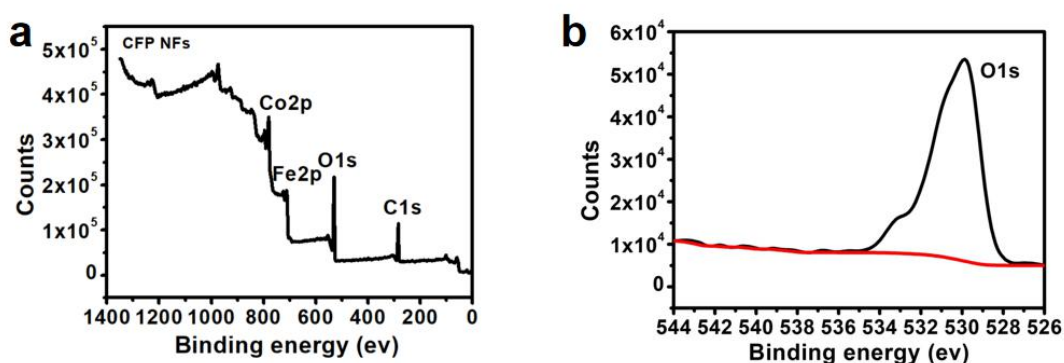


图 3-4 (a) 铁酸钴的 XPS 全谱图；(b) 铁酸钴内的氧元素的 XPS 图谱。

Figure 3-4 (a) XPS spectrum of CFP; (b) core level XPS spectrum of O1s in CFP.

### 3.3.2 $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ 的类酶活性的评价

$\text{CoFe}_2\text{O}_4$  的类过氧化物活性已经被很多研究工作者报道过，它可以通过催化  $\text{H}_2\text{O}_2$  产生羟基自由基氧化底物 TMB 生成蓝色的  $\text{O}_x\text{TMB}$ （图 3-5b），这一性质也通过催化过氧化物酶底物如 OPD<sup>[156]</sup>和 ABTS 发生特征显色反应进一步证明（图 3-6a 和 3-6b）。利用这一特性，可以在肿瘤微环境中响应催化过表达的  $\text{H}_2\text{O}_2$  生成羟基自由基，对肿瘤细胞造成内源性损伤。更有趣的是，我们发现合成的铁酸钴

还具有类过氧化氢酶活性，这一性质鲜有文献报道过。这一发现使得我们的材料在癌症治疗中可以更好地发挥作用。我们测量了不同浓度 CFP 与 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 反应后，溶液中溶解氧水平变化，实验结果如图 3-5c 表明，溶解氧水平随着 CFP 浓度的增加而增加。这一特性可广泛应用于 SDT、PDT 等高度依赖氧气水平的治疗方式。

为了评估其在肿瘤环境中的多酶活性。我们在 pH = 6.8 的磷酸盐缓冲溶液中进行米氏方程实验评估。分别测定了其类过氧化物酶和类过氧化氢酶活性的酶促反应动力学参数（图 3-7 和表 3-3）。如图 3-7a，TMB 作为反应底物，TMB 反应的初速度和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度用 origin2018 拟合了 Michaelis-Menten 曲线，可以看出其反应还停留在混合级反应，所以选择双倒数图法作图 3-7b，计算最大初始速度 ( $V_{\max}$ ) 为 3.65  $\mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$ 。米氏常数  $K_m$  是酶促反应达最大速  $V_{\max}$  一半时的底物浓度，计算得到为 180 mM，该 CFP 的类过氧化物酶活性催化速率常数  $K_{\text{cat}}$  为 85.64  $\text{S}^{-1}$ ，催化效率为 0.475  $\text{mM}\cdot\text{s}^{-1}$ 。并利用溶氧仪监测得到用于产生氧气的过氧化氢浓度，来计算反应初速度。以过氧化氢为底物浓度，测定了 CFP 的类过氧化氢酶活性的米氏方程（图 3-7c）。可以肯定反应达到零级反应，通过计算得到  $V_{\max}$  为 2.33  $\mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$ ， $K_m$  为 34.58 mM。其类过氧化氢酶活性的催化效率为 1.58  $\text{mM}\cdot\text{s}^{-1}$ 。

综上所述，这些结果表明 CFP 具有类过氧化氢酶和类过氧化物酶活性，从模拟结果来看，其在肿瘤微环境中过氧化氢酶活性效率是过氧化物酶活性的 3 倍左右，由此我们可以推断其在肿瘤微环境可以催化 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 消耗分别产生氧气和活性氧。并且产生氧气的效率可能要高于产生羟基自由基，这有利于后续的超声刺激进一步产生单线态氧对肿瘤细胞造成损伤。鉴于文献报道的双金属氧化物的多酶活性<sup>[67]</sup>，我们推测其多酶活性的原理如方程式 3.1 和 3.2：

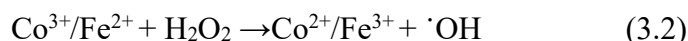
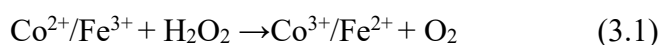


表 3-3 铁酸钴多酶活性米氏参数

	$V_{\max}[\mu\text{M}\cdot\text{S}^{-1}]$	$K_m[\text{mM}]$	$K_{\text{cat}}[\text{S}^{-1}]$	Efficiency $[\text{mM}^{-1}\cdot\text{S}^{-1}]$
过氧化物酶	3.65	180	85.64	0.475
过氧化氢酶	2.33	34.58	54.67	1.58

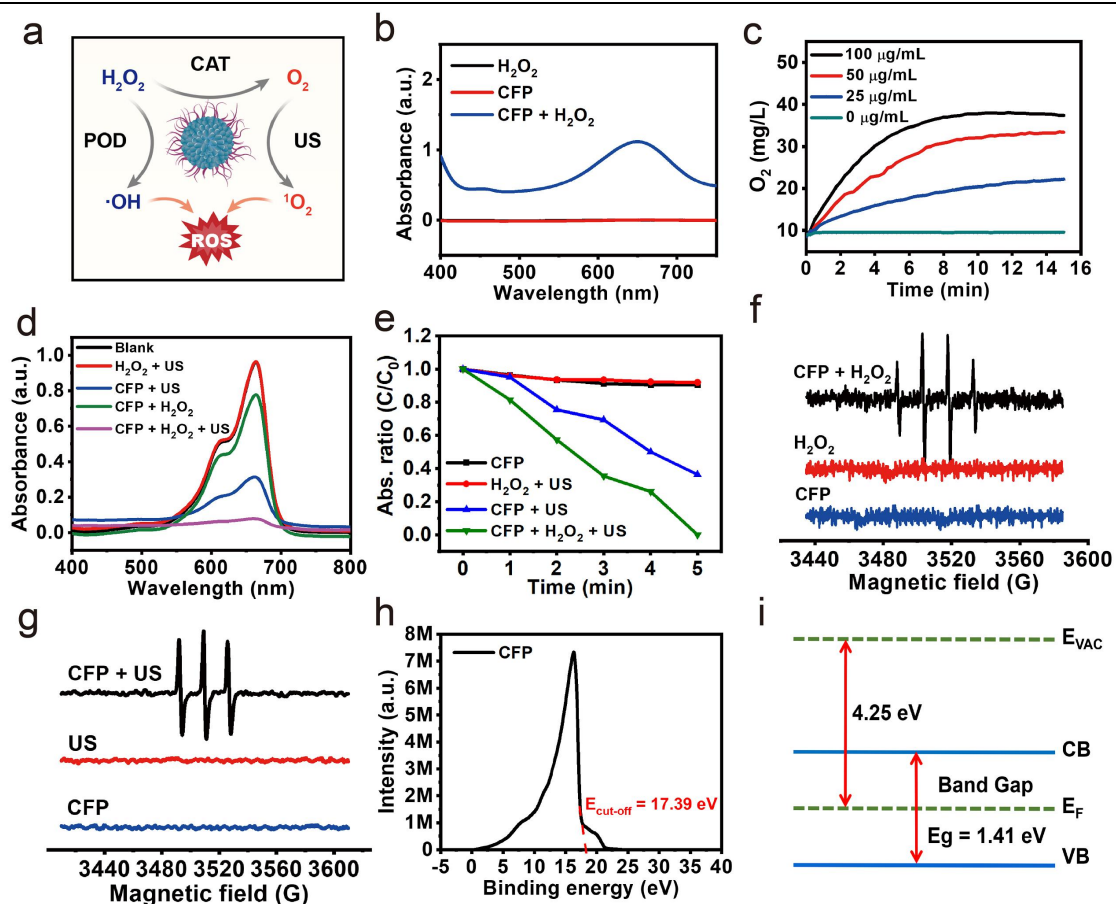


图 3-5 CFP 的类酶活性评估。(a) CFP 的多酶活性示意图；(b) TMB 作为探针测定 CFP 的类过氧化物酶活性；(c) 通过测定溶解氧水平测定 CFP 类过氧化氢酶活性；(d) 用 MB 作为探针评估在不同条件下，用超声波（1.0 MHz, 0.5 W·cm<sup>-2</sup>, 20%, 3 min）或用 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导 CFP 产生 ROS 能力；(e) CFP 在超声刺激或 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 下产生 ROS 消耗 DPBF；(f) DMPO/·OH 捕获物 ESR 图谱；(g) TEMP/<sup>1</sup>O<sub>2</sub> 捕获物的 ESR 图谱。(h) CFP 的紫外光电子能谱；(i) 铁酸钴的带隙能级示意图。

Figure 3-5 Enzymatic performance of hollow CFP. (a) Scheme of the catalytic mechanism of CFP ; (b) peroxidase-like activity of CFP measured by TMB probe; (c) catalase-like activity of CFP by measuring dissolved O<sub>2</sub> level; (d) generating ROS of CFP with ultrasound stimulation(1.0 MHz, 0.5 W·cm<sup>-2</sup>, 20%, 3 min) or 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> using MB as a tracing agent under different conditions; (e) Time consuming DPBF by ROS generated by CFP with ultrasound stimulation or 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ; (f) ESR spectra of DMPO/·OH adducts in different solutions; (g) ESR spectra of TEMP/<sup>1</sup>O<sub>2</sub> adducts in different solutions. (h) Ultraviolet Photoelectron Spectroscopy of CFP; (i) energy level of CFP .

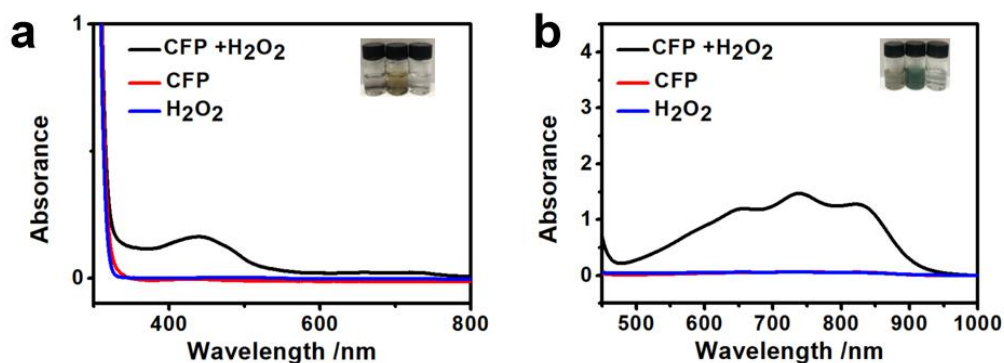


图 3.6 (a) OPD 作过氧化物酶底物的显色反应；(b) ABTS 作过氧化物酶底物的显色反应。

Figure 3-6 (a) peroxidase-like activity of CFP measured by OPD probe; (b) peroxidase-like activity of CFP measured by ABTS probe.

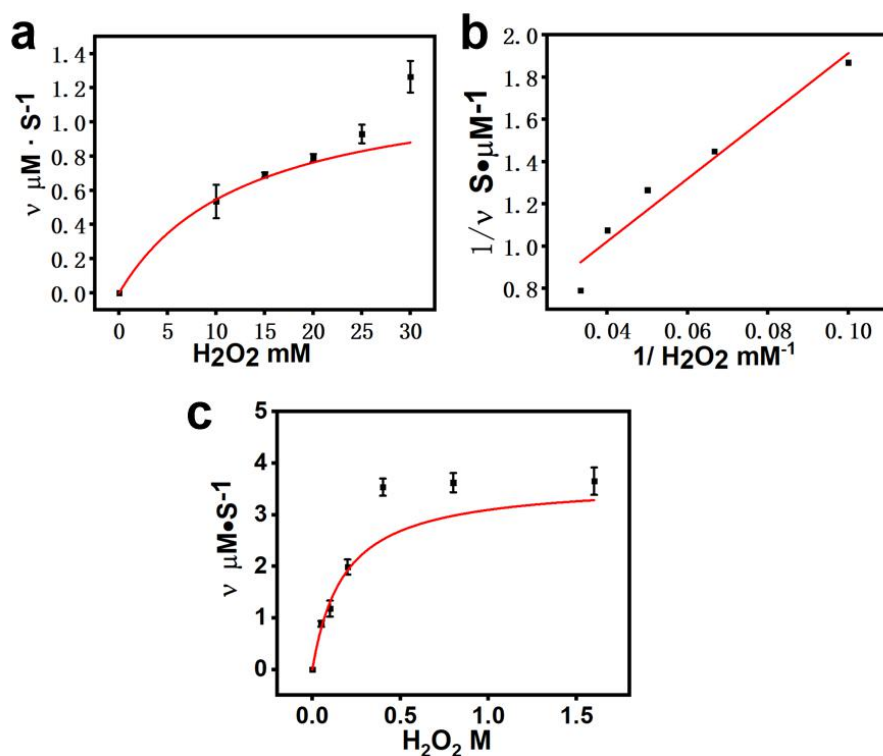


图 3-7 (a) 和 (b) CFP 的过氧化物酶活性米氏方程；(c) 过氧化氢酶活性米氏方程。

Figure 3-7 (a) and (b) peroxidase-like activity Kinetics of CFP; (c) catalase-like activity Kinetics of CFP.

### 3.3.3 CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> 纳米酶介导的活性氧产生

亚甲基蓝 (MB) 可以被活性氧降解, 因此广泛用于活性氧的检测<sup>[149]</sup>。因此我们用 MB 来评估了活性氧的产生。图 3-5d 的实验结果显示了 MB 在不同实验条件下处理 5 min 后的降解情况。可以看到, 当只有过氧化氢和超声刺激处理时 MB 没有明显下降, 当 CFP 和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 共同作用时, MB 降解了大约 20%。这是基于铁酸

钴的类过氧化物酶活性。当 CFP 和 US 刺激共同作用时，降解率增加到 67.5%，这说明 CFP 可以一种无机声敏剂。而当我们在上述条件下加入 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 时，MB 降解率达到 91.8%。表明加入过氧化氢也显著提高了降解量，这一方面可能是由于 CFP 过氧化物酶活性产生活性氧，另一方面 CFP 的过氧化氢酶活性催化 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 分解生成氧气提高了声动力效率。为了证明该超声过程中有单线态氧产生，我们使用了 <sup>1</sup>O<sub>2</sub> 特异性探针 DPBF 来检验（图 3-5e），可以看到单独超声刺激和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 都不能使 DPBF 下降，而 CFP 在超声刺激下促使 DPBF 的降解率达到了 70%，在此基础上引入过氧化氢后，DPBF 的降解几乎达到 100%，进一步证明了 CFP 的类酶活性可以提高声动力效率。为了进一步证实活性氧的产生，采用 ESR 法作为辅助分析。当 CFP 和过氧化氢反应时，DMPO 成功捕获到·OH 的存在（图 3-5f）。当 CFP 和超声刺激共同作用时，TEMP 成功捕获到 <sup>1</sup>O<sub>2</sub>（图 3-5g）。这些实验结果成功验证我们的设想，该 CFP 的类酶活性可以在肿瘤微环境多重响应并结合超声刺激协同产生活性氧，对肿瘤细胞产生损伤。

为了更好地了解 CFP 的声动力机制，我们对铁酸钴进行了紫外光电子能谱（UPS），使用单色 He I 光源（21.2 eV）和 VG Scienta R4000 分析仪测量了 CFP 的紫外光电子能谱（图 3-5h）。如图可以看到 12 eV 之后谱线开始剧烈上升，表明有较强的二次非弹性散射电子射出。进一步观察可以看到二次电子截断在 17.39 eV 处，这个光电信号截断表示 21.2 eV 的光子能量最多只能激发结合能为 17.39 eV 的电子，使其不经过任何散射而到达样品表面，因此通过公式  $\Phi = h\nu - (E_{\text{Cutoff}} - E_{\text{F}})$  可以计算出材料的逸出功。局部放大的紫外光电子能谱显示费米能级  $E_{\text{F}}$  为 0.44 eV（图 3-8）。得到其逸出功为 4.25 eV。较小的逸出功有利于其催化活性。同时根据铁酸钴的固体紫外漫反射图谱（图 3-9）。根据截线法  $E_{\text{g}} = 1024/\lambda_{\text{g}}$ ，计算铁酸钴的带隙为 1.41 eV。得到的禁带宽度比许多半导体催化材料都要低<sup>[150-153]</sup>。虽然目前无机声敏剂的原理尚未清晰地报道，但是大多数学者都将其归因于类似的光催化原理，较低的带隙能在超声刺激下可以很好地实现电子空穴分离（图 3-5i）。

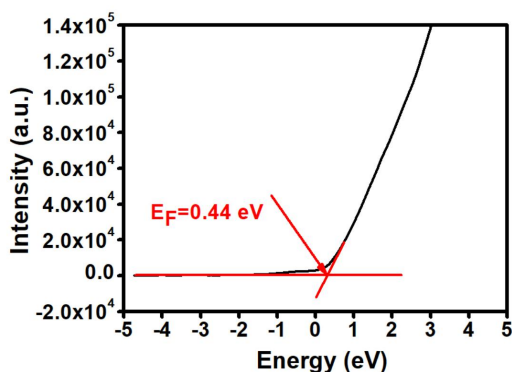


图 3-8 CFP 的紫外光电子图局部放大图。

Figure 3-8 Local magnification of ultraviolet photoelectron spectroscopy of CFP.

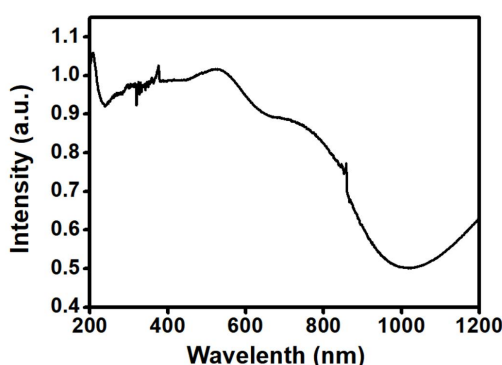


图 3-9 CFP 的紫外漫反射光谱。

Figure 3-9 UV-Vis diffuse reflectance spectra of the as-prepared CFP.

### 3.3.4 CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> 的生物相容性

首先在体外研究了 CFP 的生物安全性，不同浓度的 CFP 与 HUVECs 和 L929 共孵育 24 h 后，通过 MTT 法评估了细胞活性（图 3-10a）。可以看到 CFP 孵育 24 h 后，即使在  $300 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的高浓度下细胞存活率保持在 80% 以上，表明铁酸钴对正常细胞没有明显的毒性。虽然它具有多种的类酶活性，但正常细胞中的过氧化氢水平远低于癌细胞。我们还对铁酸钴进行了常规的溶血率实验，用不同浓度的铁酸钴与取好的红细胞溶液共孵育 6 h。如图 3-11 所示，即使浓度达到  $300 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，溶血率也不超过 5%，表明其对于血液有良好地生物相容性。我们进一步评价了该纳米酶在小鼠体内的生物安全性，通过静脉注射 0、12.5、25 和  $50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  CFP 到小鼠体内，15 天后对 BALB/c 小鼠进行血常规分析（图 3-12）。这些小鼠在注射后 15 天内没有出现死亡或其它异常现象，也没有明显的体重变化。红细胞（RBC）、白细胞（WBC）、血红蛋白（HGB）、血小板（PLT）、红细胞压积（HCT）、平均红细胞体积（MCV）等关键血液指标均未超过正常界限。同时，注射 15 天后主要内脏的 H&E 染色图像未见组织损伤或病理异常（图 3-13）。这些结果初步表明，CFP 在高剂量  $50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  时表现出良好的生物相容性。

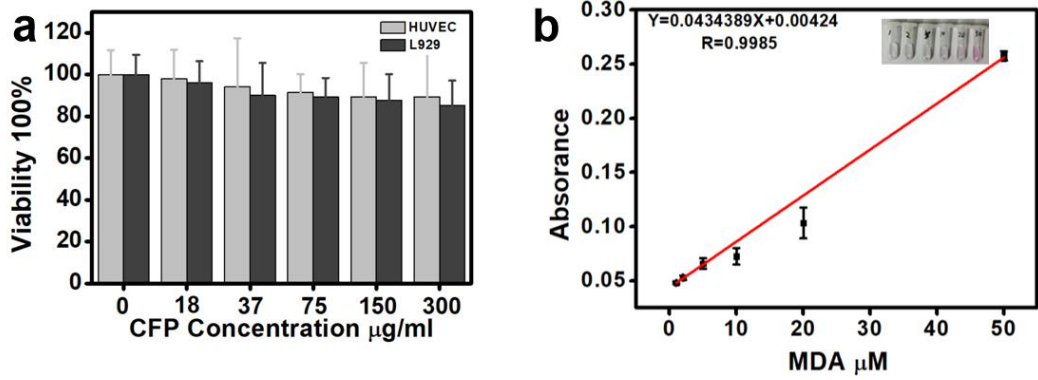


图3-10 (a) 不同浓度的CFP对HUVECs和L929的细胞毒性评估；(b) MDA试剂盒标曲。

Figure 3-10 (a) Viability of HUVECs and L929 after incubation with CFP at various concentrations for 24 h; (b) MDA standard curve.

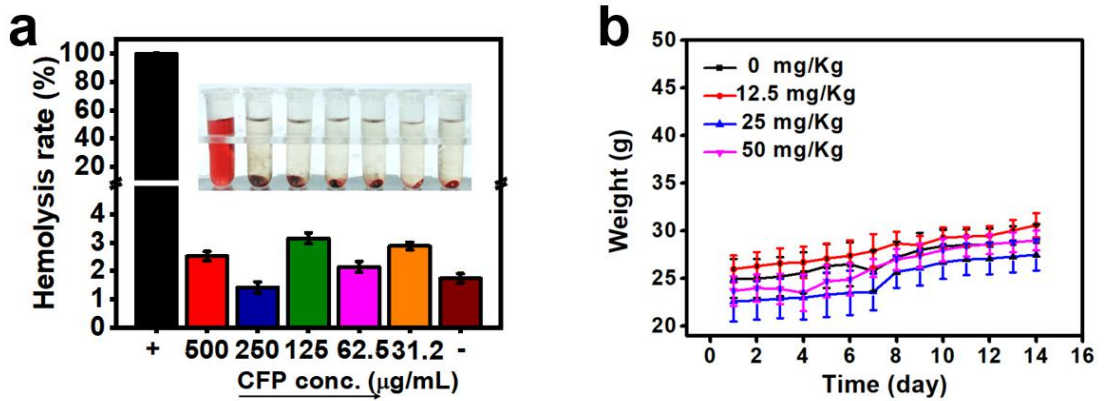


图3-11 (a) 不同浓度CFP的溶血率；(b) 静脉注射不同剂量CFP后小鼠体重变化。

Figure 3-11 (a) hemolytic rate of erythrocytes after incubation with CFP at various concentrations for 6 h; (b) variation of Blab/c mouse body weight after intravenous injection with CFP with different doses.

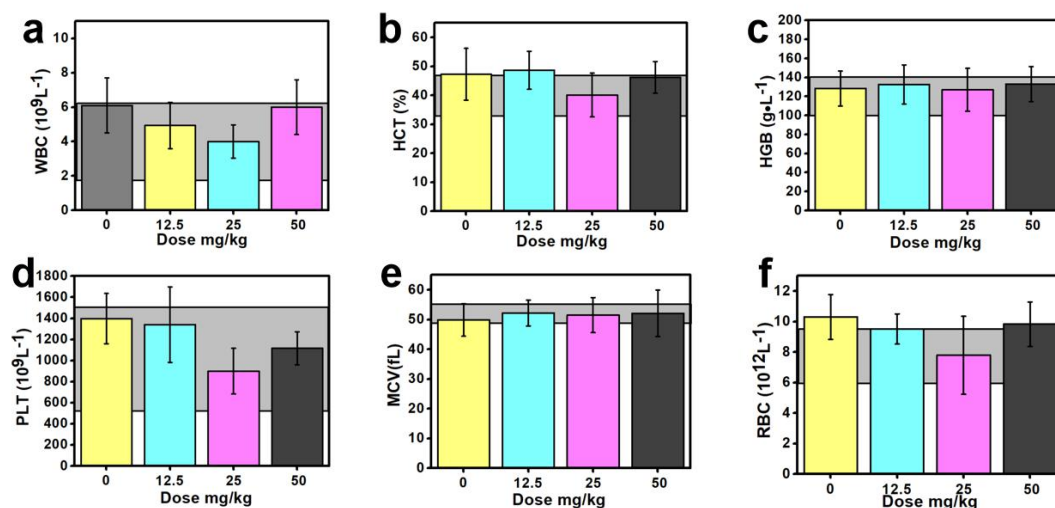


图3-12 体内生物安全性评估：注射不同剂量CFP的小鼠血常规分析。

Figure 3-12 In vivo biocompatibility assessment: blood routine analysis of Blab/c mouse on day 15 after intravenous injection of CFP with different dosages.

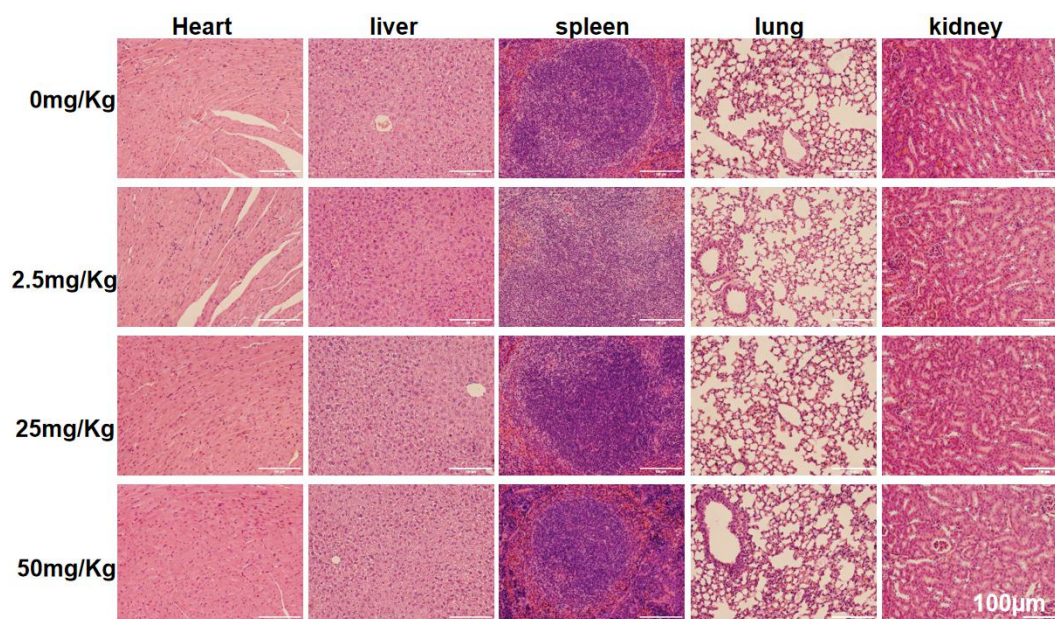


图3-13 静脉注射不同剂量CFP15天后Blab/c小鼠主要脏器（心、肝、脾、肺、肾）的H&E染色（比例尺：100  $\mu m$ ）。

Figure 3-13 H&E staining of major organs (heart, liver, spleen, lung and kidney) of Blab/c mice on day 15 after intravenous injection of CFP with different dosages (scale bars: 100  $\mu m$ ).

### 3.3.5 CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> 纳米酶体外细胞毒性

我们首先评估了不同浓度的 CFP 对 4T1 细胞的毒性。如图 3-14b 所示，不同浓度的 CFP 与 4T1 细胞共孵育 24 h 后，通过标准 MTT 法测定其活力。当浓度为 75  $\mu g \cdot mL^{-1}$  时细胞存活率为 81%，当浓度 300  $\mu g \cdot mL^{-1}$  时细胞存活率为 50%，

而外加超声的刺激后 (1.0 MHz、0.5 W·cm<sup>-2</sup>、3 min、20%)，细胞存活率分别下降为 40%和 20%。考虑到无机纳米材料在后续体内治疗时，浓度不宜过高，因此我们将 75 μg·mL<sup>-1</sup>CFP 作为后续一系列评估实验的工作浓度。如图 3-14c 所示，单独 CFP 对 4T1 细胞表现出轻微的毒性。而外加超声刺激后，4T1 细胞存活率急剧下降约为 27%，特别是当额外引入 100 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 参与时，细胞活力低于 10%。这些结果表明，CFP 不仅具有化学动力治疗作用，而且具有较好的声动力治疗效果。此外，但在分别引入 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 US 刺激后，细胞致死率分别提高 11%和 54%，同时引入 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 US 刺激作用时细胞致死率提高 72%。因此，我们推断，该纳米酶的多酶活性和 US 刺激共同作用产生 ROS 加剧了细胞死亡率。

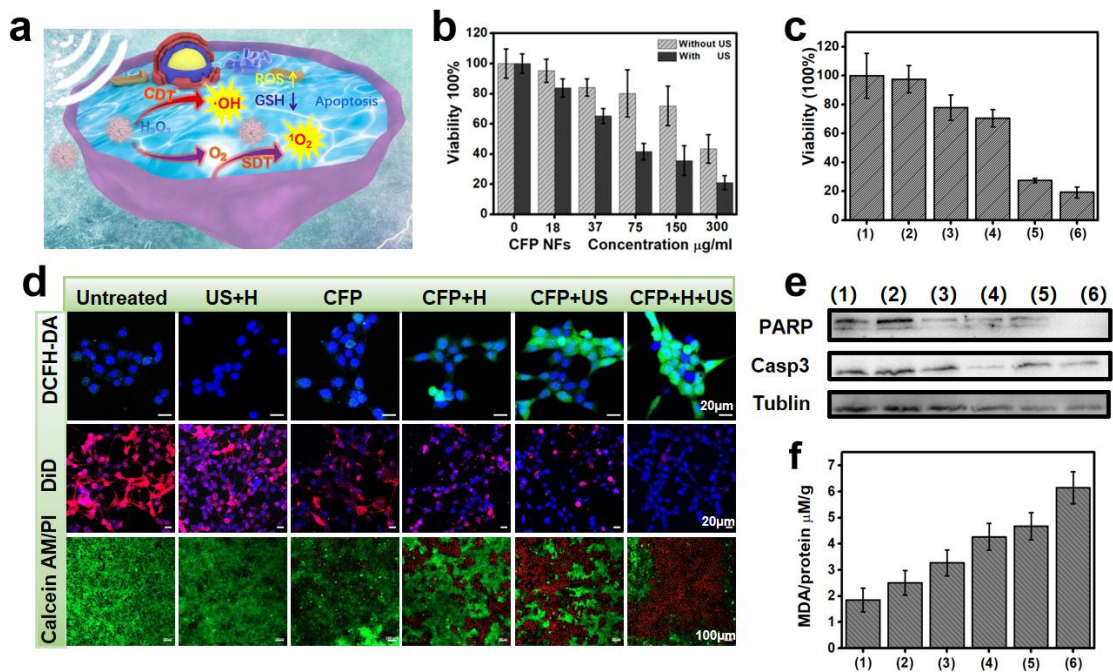


图 3-14 体外细胞毒性：(a) CFP 导致细胞死亡机制示意图；(b) 在加或不加超声刺激情况下，4T1 细胞与不同浓度 CFP 孵育 24 小时后的存活率；(c) 不同处理组的 4T1 细胞活力：(1)未经处理，(2) US+100 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>，(3) CFP，(4) CFP + 100 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>；(5) US+ CFP，(6) CFP+US+ 100 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>；(d) 使用 DCFH-DA 染色评估 4T1 细胞内 ROS 的产生（比例尺：20 μm），DiI 染色 4T1 细胞膜的荧光图像，不同处理组 4T1 细胞用活死染试剂盒染色荧光图像（比例尺:100 μm）；(e) 不同处理组 4T1 细胞 PARP 和 Casp3 两种凋亡相关蛋白表达量变化的 WB 结果。(f) 不同处理组 4T1 细胞中的丙二醛（MDA）水平。

Figure 3-14 Cytotoxicity in vitro. (a) Schematic diagram of CFP leading death mechanism; (b) viability of 4T1 cells after incubation with CFP for 24 h with or without ultrasonic stimulation; (c) viability of 4T1 cells after different processing stimuli; group: (1) untreated; (2) US+ 100 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; (3) CFP ; (4) CFP + 100 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; (5) US+ CFP ; (6) CFP+US+ 100 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; (d) in vitro

assessment of intracellular ROS generation using 4T1 cells stained with DCFH-DA (scale bars: 20  $\mu\text{m}$ ); fluorescence images of 4T1 cells stained with DID; fluorescence images of 4T1 cells after different treatment and staining with Live/Dead cell viability assay kit (scale bars: 100  $\mu\text{m}$ ); (e) Western blotting of PARP and Casp3 expression after cells being administered with various treatment. (f) lipid peroxidation as malondialdehyde (MDA) levels in 4T1 cells subject to various

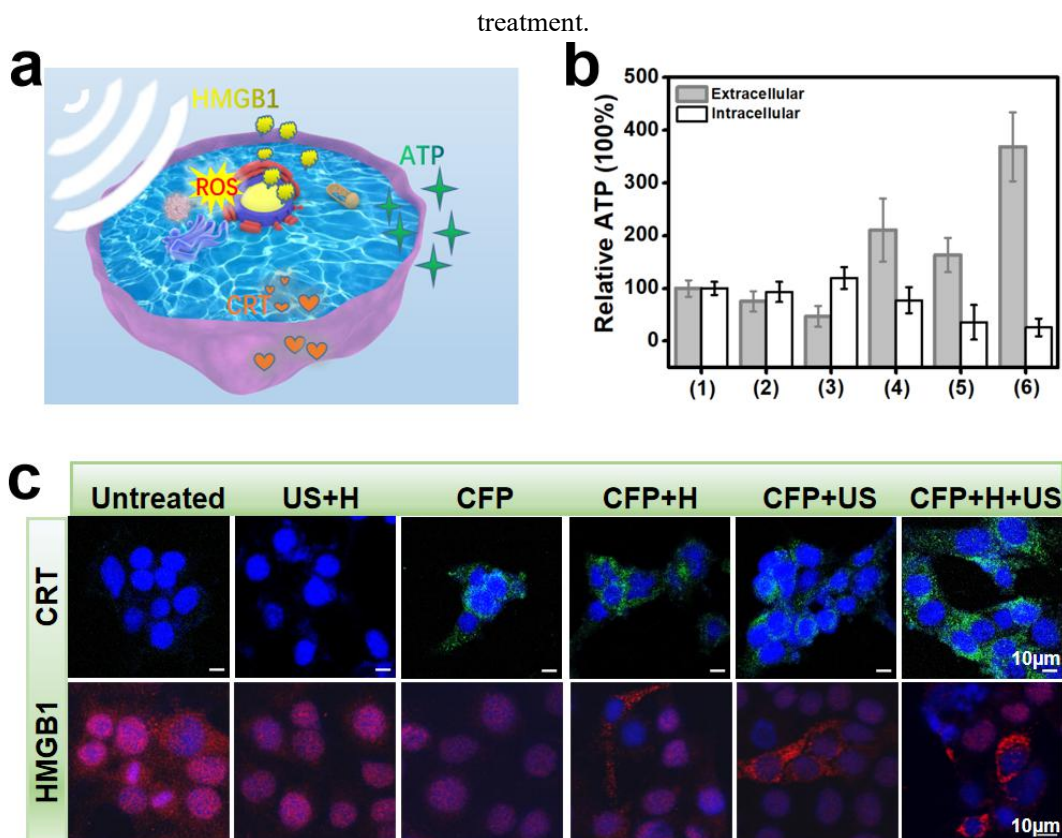


图 3-15 (a) 超声刺激结合 CFP 治疗后肿瘤细胞免疫原性细胞死亡示意图；(b) 不同治疗后 4T1 细胞 ATP 水平；(c) 免疫染色观察 HMGB-1 和 CRT 的释放情况。

Figure 3-15 (a) Illustration of immunogenic cell death of tumor cells after the treatment with CFP under US irradiation; (b) ATP level of 4T1 cells after different treatment; (c) The release of HMGB-1 and CRT was imaged through immunostaining.

我们使用 DCFH-DA 探针检测了不同处理组引起的细胞内 ROS 水平变化。如图 3-14d 所示, 单独超声和  $\text{H}_2\text{O}_2$  处理组和对照组一样细胞内几乎看不到绿色荧光, 而 CFP 加  $\text{H}_2\text{O}_2$  处理的细胞内可以看到少量绿色荧光, 这可能是由于 CFP 可以催化细胞内过表达的  $\text{H}_2\text{O}_2$  产生羟基自由基。而在外加过氧化氢的条件下, 一方面 CFP 可以催化部分  $\text{H}_2\text{O}_2$  产生羟基自由基, 另一方面 CFP 还可以催化  $\text{H}_2\text{O}_2$  产生氧气缓解肿瘤缺氧, 也可以抑制肿瘤细胞生长。另外, CFP 结合超声刺激处理组观察到较强绿色荧光, 荧光强度在额外引入  $\text{H}_2\text{O}_2$  后进一步增强, 该结果进一步验证了我

们前面的设想：CFP 不仅可以用于化学动力疗法还可以用于自增强声动力疗法，两者结合可以很好地产生 ROS 用于癌症治疗。鉴于活性氧引起的细胞损伤会导致膜的不完整，我们进一步用高氯酸盐(DiIC18(5))-DID 观察了不同处理组细胞膜状态。可以看到对照组的整个细胞膜有较强的红色荧光表明其具有完整的细胞膜，而 CFP 处理后的细胞红色荧光强度显著下降组, CFP 加过氧化氢处理组红色荧光进一步下降。而最后一组三者共同作用时几乎观察不到红色荧光。这一结果进一步证明了该纳米酶介导的化学动力疗法和声动力疗法产生的活性氧会损伤膜的完整性。细胞死活染色结果同样可以证明。如图 3-14d 所示，单独 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 加超声刺激，4T1 细胞和对照组一样几乎完全呈绿色荧光，表明 4T1 细胞仍保持较好活性。而 CFP 与其它方式结合治疗都能观察到大量红色荧光，说明大量细胞死亡。众所周知，活性氧介导的细胞死亡会导致细胞内脂质过氧化物水平升高，所以我们使用碧云天的 MDA 试剂盒评估了不同处理组细胞内的脂质过氧化物水平，如图 3-14f 所示，第六组 CFP 加 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 加超声刺激后，其 MDA 水平比对照组增加约 2.3 倍，表明 CFP 介导的两种治疗方式可以对 4T1 癌细胞有很好的损伤效果。Caspase 家族在介导细胞凋亡的过程中起着非常重要的作用，其中 caspase-3 (Casp3) 为关键的执行分子，它在凋亡信号传导的许多途径中发挥功能。聚(腺苷二磷酸-核糖)多聚酶 (PARP) 为一种依赖 Zn<sup>2+</sup> 的真核 DNA 结合蛋白，可特异性地识别 DNA 断裂末端并结合，是一种重要的 DNA 修复酶。在细胞凋亡发生的早期，PARP 是 caspase 家族 (如 caspase3) 的作用底物，后者可使 PARP 的 DNA 修复功能丧失。因此，为了验证该纳米酶介导的治疗方式能引 4T1 癌细胞凋亡，我们用 WB 实验评估了两种蛋白的表达情况。如图 3-14e，不仅是 CFP 处理组，CFP 结合超声刺激等治疗方式都能使 PARP 和 Casp3 两种蛋白表达下调，说明该纳米酶介导的 CDT 和 SDT 都能引起细胞凋亡。

### 3.3.6 CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> 纳米酶诱导的细胞免疫原性死亡

近年来，一些研究表明声动力或化学动力治疗肿瘤可诱导细胞免疫原性死亡 (ICD)，同时伴随着一些标志物的表达。这一现象跟化学药物治疗肿瘤类似，肿瘤细胞可发生免疫原性细胞死亡，即肿瘤细胞在发生凋亡的同时，由非免疫原性的细胞转变为具有免疫原性的细胞，并在机体内激发抗肿瘤免疫效应。如图 3-15a 在抗肿瘤治疗中，通过免疫原性死亡使肿瘤相关抗原暴露于抗原递呈细胞可激发肿瘤的免疫原性。通过测定三磷酸腺苷 (ATP)、钙网蛋白 (CRT) 和高迁移率组蛋白 (HMGB-1) 三种标志物的释放来检测 CFP 诱导的免疫原性细胞死亡。ATP 被认为是抗原呈递细胞如树突状细胞的趋化剂。此外，CRT 和 HMGB-1 暴露可诱导抗原呈递细胞吞噬垂死的肿瘤细胞，并随后将抗原呈递给 T 细胞。如

图 3-15c 所示, 对于未经治疗的肿瘤细胞, CRT 和 HMGB-1 分别分布在细胞质和细胞核内。而 CFP 介导的化学动力和声动力处理后, CRT 在细胞膜上明显聚集, HMGB-1 从细胞核扩散到细胞质中。表明 CFP 介导的治疗方式诱导的免疫原性细胞死亡增强。例如, CFP 诱导的 ATP 释放增加了近一倍 (图 3-15b)。而在超声刺激加  $H_2O_2$  和 CFP 共同作用时诱导的 ATP 释放增加了近四倍。综上所述, 该纳米酶介导的化学动力和声动力结合可以引起细胞免疫原性死亡, 有望与免疫治疗相结合。

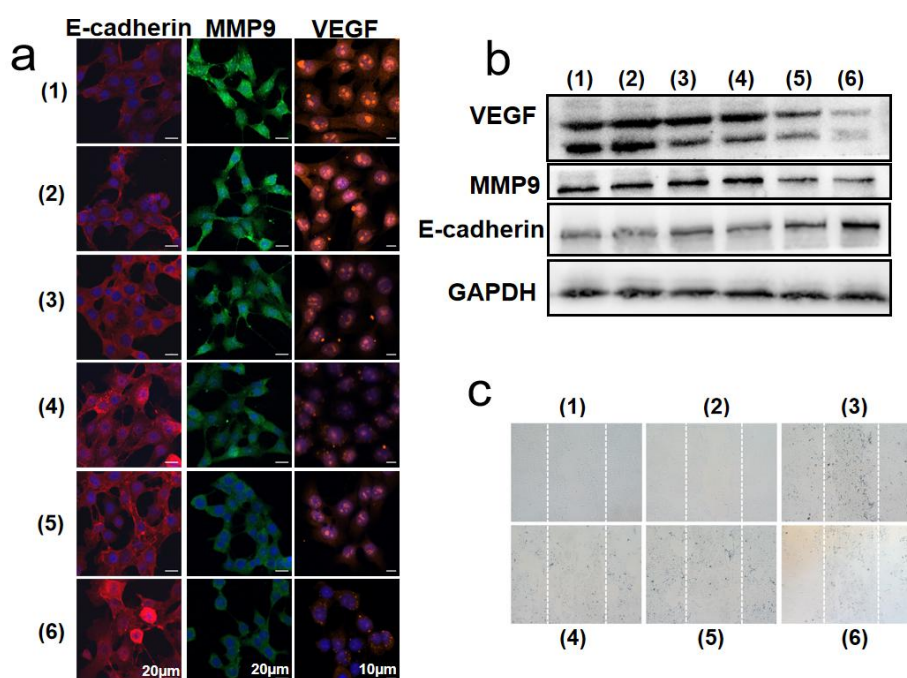


图 3-16 体外抗转移实验: (a) 不同处理组治疗 4 h 后, 转移相关蛋白 MMP9、VEGF 和 E-cadherin 免疫荧光检测; (b) 不同处理组治疗后 4T1 肿瘤细胞转移相关蛋白 MMP9、VEGF、E-cadherin 的 Western blot 实验; (c) 不同处理组处理 24 h 后 4T1 细胞划痕实验; (1) 未经处理的, (2) US+ 100  $\mu M H_2O_2$ , (3) CFP, (4) CFP + 100  $\mu M H_2O_2$ , (5) US+ CFP, (6) CFP + US+ 100  $\mu M H_2O_2$ 。

Figure 3-16 Anti-metastatic in vitro. (a) Immunofluorescence of metastasis-associated proteins MMP9, VEGF, and E-cadherin levels in 4T1 after different treatment for 4h; (b) Western blot protein expression levels of MMP9, VEGF, and E-cadherin from 4T1 tumor cells after different treatment; (c) Wound healing ability of 4T1 cells after different treatment for 24 h; group: (1) untreated; (2) US+ 100  $\mu M H_2O_2$ ; (3) CFP; (4) CFP + 100  $\mu M H_2O_2$ ; (5) US+ CFP; (6) CFP + US+ 100  $\mu M H_2O_2$ ;

### 3.3.7 $CoFe_2O_4$ 纳米酶体外抗转移评估

一些研究工作者发现许多纳米酶介导的协同治疗可以有效实现肿瘤抗转移,

归因于产生 ROS 造成的癌细胞损伤<sup>[143]</sup>。E-钙黏蛋白 (E-cadherin) 参与形成细胞间黏附链接, 其上调会造成细胞间的黏附性增加, 极性增强, 肿瘤细胞的转移能力减弱<sup>[154,155]</sup>。血管内皮生长因子 (VEGF) 是一种高度特异性促血管内皮细胞迁移的细胞因子。金属基质蛋白酶 MMP9 的表达下调也会抑制肿瘤转移。我们评估了 CFP 介导的多种治疗方式抗转移潜力。不同处理组的 4T1 细胞使用免疫荧光检测转移相关蛋白 MMP9、VEGF 和 E-cadherin 水平 (图 3-16a)。可以看到 CFP 纳米酶介导化学动力疗法对 MMP9 和 VEGF 蛋白表达的有下调的作用, 而对 E-cadherin 蛋白的表达则是上调作用。并且在外加超声刺激和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 条件后, 这一效果更加明显。此外, Western blot 数据进一步证实, CFP 介导的化学动力治疗和声动力治疗方式能降低 MMP9、VEGF 表达并上调 E-cadherin 表达 (图 3-16b)。这一结果说明该纳米酶介导的治疗方式可以很好地抑制肿瘤转移。我们还通过细胞划痕实验, 评估不同处理组 4T1 细胞的体外迁移能力 (图 3-16c)。在对照组和超声加 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组, 24 h 后创面闭合率为 43%, 而用 CFP 加 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理后创面完全没有愈合, 当加入超声刺激时, 细胞几乎大部分死亡。这些结果支持了我们的假设, 即 CFP 纳米酶介导的肿瘤治疗可以调节多种转移相关蛋白的表达, 该化学动力疗法和声动力疗法联合治疗策略可以有效地抑制肿瘤的生长和转移。

### 3.3.8 CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> 纳米酶的药代动力学

小鼠静脉注射 CFP 后, 采用 ICP-MS 测定小鼠血中 Co 元素浓度, 表征 CFP 纳米酶的药代动力学。用单指数药代动力学模型拟合了药代动力学曲线 (图 3-17a)。得到循环半衰期约为 0.627 小时。注射 24 小时后取小鼠主要器官烘干后用王水消解测量了 CFP 纳米酶注射 24 小时后在体内的分布情况, 如图 3-17b, 内皮网状系统肝脏和脾脏中的钴元素含量分别是 24.3 和 20.1  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。而在肿瘤组织中检测到 10.7  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  的钴元素, 表明 CFP 可以通过 EPR 效应到达肿瘤部位。

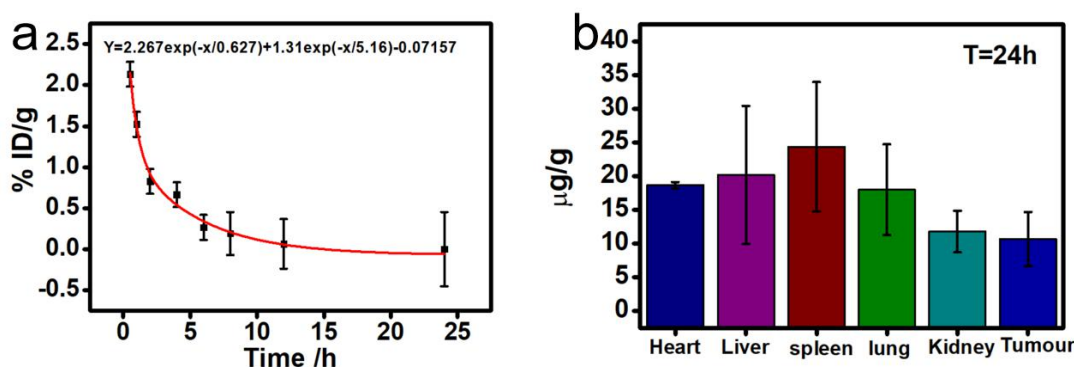


图 3-17 (a) 荷瘤 BALB/c 小鼠静脉注射 CFP 后血液中 Co 元素的药代动力学; (b) 荷瘤 BALB/c 小鼠静脉注射 CFP 24 h 后钴元素在主要脏器中的分布。

Figure 3-17 (a) Pharmacokinetics of Co contents in blood over after intravenous injection of

CFP into 4T1 tumor-bearing BALB/c mice; (b) Co contents distribution in 4T1 tumor-bearing BALB/c mice major organs after 24h intravenous injection.

### 3.3.9 CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> 纳米酶体内抗肿瘤效果

值得注意的是, 该纳米酶除了作为化学动力和声动力治疗平台外, 还具有良好的 T<sub>2</sub> 加权型 MRI 成像功能。我们首先在体外评估了该纳米酶的 MRI 信号 (图 3-17a), 可以观察到成像效果与浓度呈正相关。横向弛豫速率  $r_2$  为  $519.67 \text{ s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$ 。这一结果表明该纳米酶具有良好的成像应用潜力, 如图 3-17b 所示, 肿瘤部位图像与周围组织具有没有明显的成像对比。然后在注射 CFP 后 24 小时后, 肿瘤区域的对比度明显增加。这表明我们设计的 CFP 纳米酶不仅可以作为成像对比剂还可以通过被动靶向有效聚集到肿瘤部位。

另一方面, 在 CFP 纳米酶体外高效抑制肿瘤细胞生长的激励下, 我们进一步研究 CFP ( $25 \text{ mg} \cdot \text{Kg}^{-1}$ ) 联合 US 刺激治疗的体内抗肿瘤效果 ( $1.0 \text{ MHz}$ ,  $1 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$ ,  $50\%$ ,  $5 \text{ min}$ ) 如图 3-17c。雌性 BALB/c 肿瘤小鼠分为 4 组, 分别处理: (1) 生理盐水、(2) US、(3) CFP、(4) CFP + US。治疗 14 天期间, 各组间小鼠体重无明显差异 (图 3-17g), 表明该纳米酶无明显副作用。如图 3-17d 肿瘤照片可以看出 CFP 介导的化学动力和声动力治疗可以很好地抑制肿瘤生长, 与注射生理盐水组相比, 单独 CFP 治疗组的肿瘤生长抑制指数 TGI 指数为  $40.9\%$ , 而 CFP 与超声刺激相结合, 其 TGI 指数达到了  $51.7\%$  (图 3-17e-f)。治疗结束后, 主要器官 (心、肝、脾、肺和肾) 的 HE 染色结果也没有观察到明显病变或不正常 (图 3-18)。

治疗结束后, 我们还对肿瘤组织切片进行了组织免疫学分析。Ki67 的表达与细胞增殖密切相关, 广泛用于常规病理分析。如图 3-17h, 与其他对照组, 超声刺激结合 CFP 治疗组 ki67 阳性细胞明显减少, 表明该治疗方式组能有效抑制肿瘤细胞增殖。并且, 细胞发生凋亡时会激活一些 DNA 内切酶, 切断核小体间的 DNA, 因此使用碧云天的 TUNEL 试剂盒染色观察其细胞凋亡情况, CFP 处理组和 CFP 结合超声刺激组, 明显观察到了依次增强的绿色特征荧光, 表明凋亡细胞的数量显著增加。并且通过肿瘤组织的免疫组化数据证实, CFP 可以诱导 HMGB-1 的分布从核到细胞质的转移, 还有免疫荧光数据证实该 CFP 纳米酶还可以诱导 CRT 出现在细胞膜上。这些都是 CFP 纳米酶诱导免疫原性细胞死亡的证据。并且通过免疫荧光染色发现, 肿瘤组织切片中的 MMP9、VEGF 有明显下调趋势, 而 E-cadherin 则有上调趋势。这些结果证明, CFP 纳米酶介导化学动力疗法和声动力疗法结合可抑制肿瘤生长, 诱导细胞免疫原性死亡, 并抑制肿瘤转移。

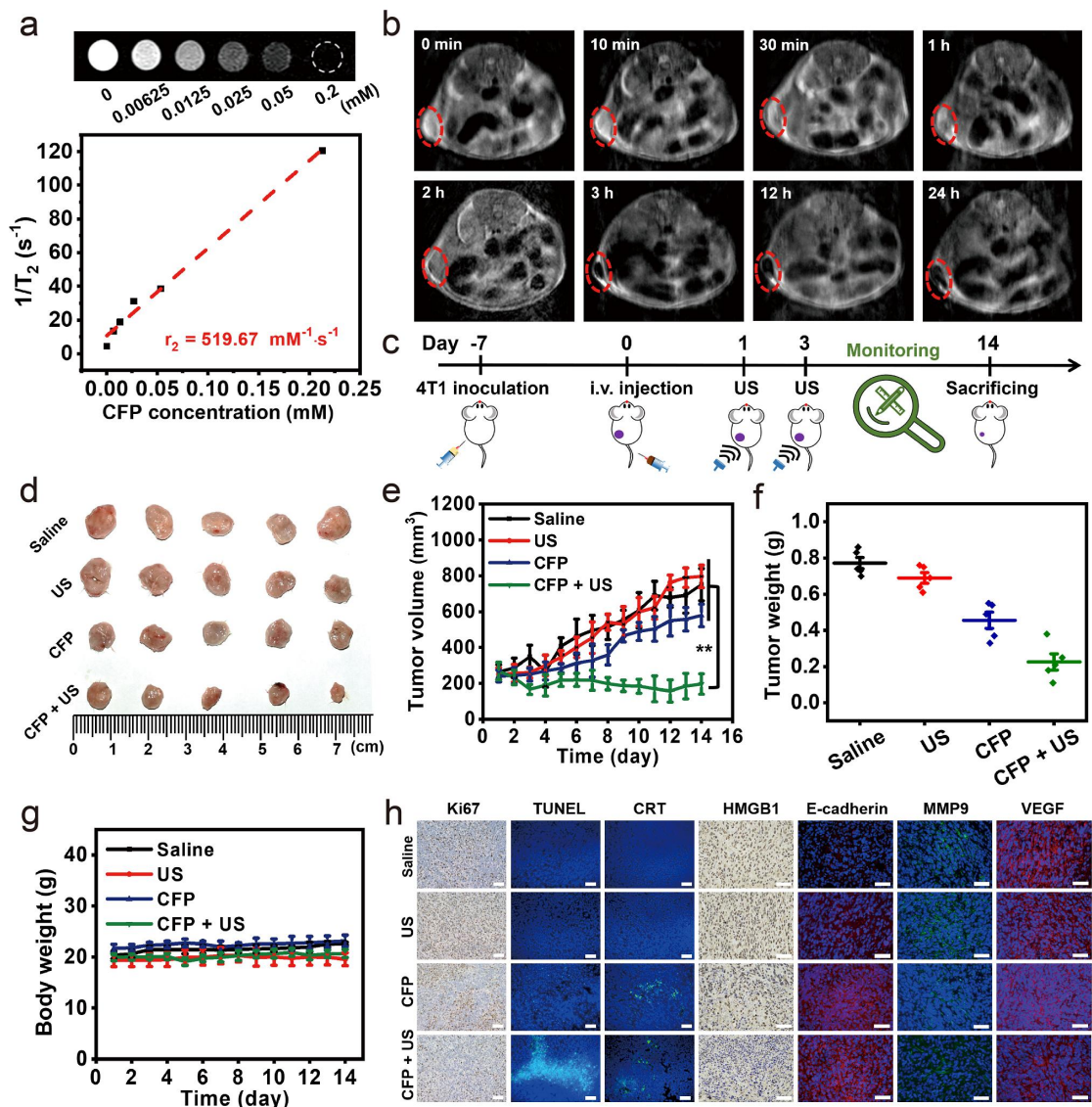


图 3-17 CFP 的 T<sub>2</sub> 加权 MR 成像及体内抗肿瘤作用：(a) 不同浓度 CFP 的体外 MRI 图像强度；(b) 静脉注射 CFP 后不同时间点肿瘤区域 MRI 图像；(c) 抗肿瘤治疗示意图；(d) 不同处理组治疗 14 天后的肿瘤图像；(e) 治疗期间肿瘤生长曲线；(f) 治疗结束时实体瘤的重量；(g) 治疗期间小鼠体重曲线；(h) 对切除肿瘤切片的组织学分析 Ki67、HMGB1、TUNEL、CRT、E-cadherin、MMP9 和 VEGF。

Figure 3-17 *In vivo* T<sub>2</sub>-weighted MR imaging and the suppression of primary tumor through CFP-mediated SDT/CDT. (a) T<sub>2</sub> relaxation rate vs. the concentration of CFP dispersed in PBS (transverse relaxation rate constant  $r_2$  at  $519.67 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ); (b) T<sub>2</sub>-weighted greyscale MR images of tumor region at different time points after intravenous injection; (c) scheme to show the treatment procedure for antitumor applications; (d) digital photographs of solid tumor collected on day 14; (e) tumor growth curve during the therapeutic course of 14 days; (f) weight of solid tumor harvested on day 14; (g) mouse body weight variation in the treatment period of 14 days; (h) histological analysis

of tumor section through Ki67 and HMGB1 immunohistochemical staining, as well as TUNEL, CRT, E-cadherin, MMP9 and VEGF immunofluorescence staining on day 14 (scale bar: 50  $\mu\text{m}$ ).

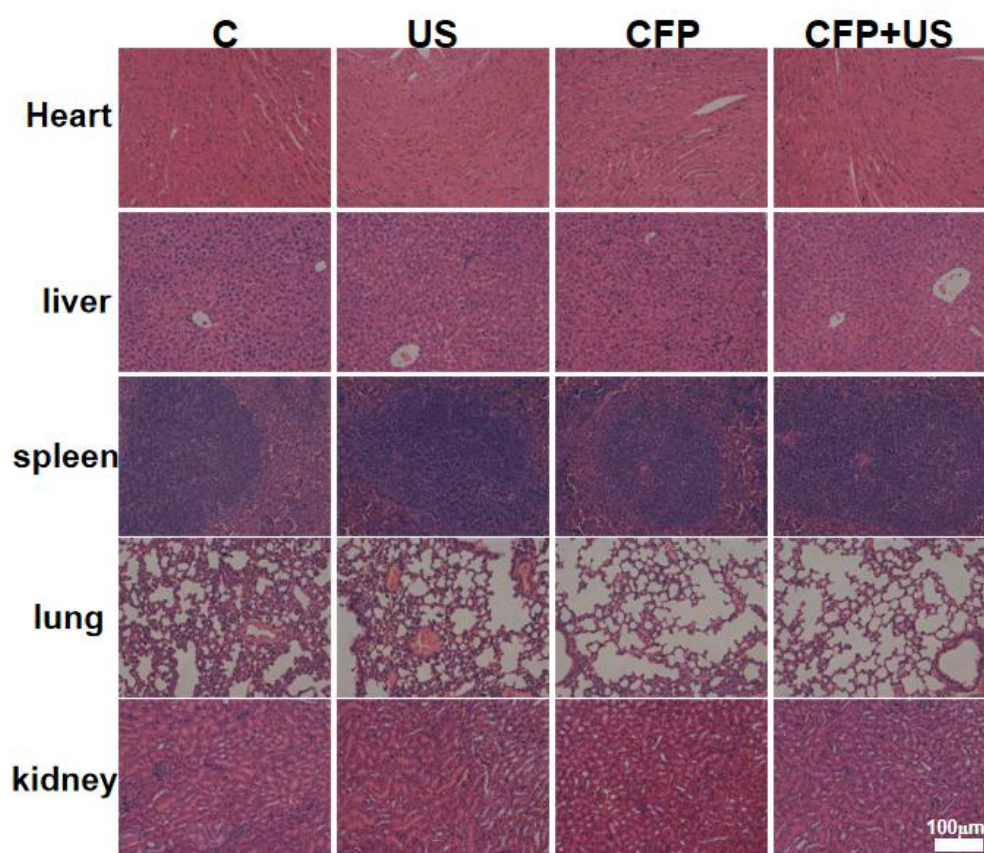


图 3-18 荷瘤小鼠静不同治疗后第 15 天主要器官的 H&E 染色（比例尺：100  $\mu\text{m}$ ）。

Figure3-18 H&E staining of major organ slices from 4T1 tumor-bearing mice on day 15 after intravenous injection with various treatment(scale bars: 100  $\mu\text{m}$ ).

### 3.3.10 CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> 纳米酶结合免疫治疗抗肿瘤效果

在CFP纳米酶优异的化学动力和声动力结合治疗诱导细胞免疫原性死亡的鼓舞下，我们进一步评估了该纳米酶介导的治疗与免疫抑制剂相结合对远端瘤的抑制效果，PD-L1抗体（aPD-L1）作为美国食品和药物管理局FDA批准的检查点抑制剂，该抗体与肿瘤细胞上的PD-L1结合后可以抑制该肿瘤细胞的免疫逃逸<sup>[156]</sup>。

以双侧荷瘤小鼠为模型，在接种远端瘤的第二天分别注射不同处理组的药物：（1）生理盐水、（2）生理盐水、（3）CFP、（4）CFP（25  $\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ ）。然后分别在第1天和第3天给第二组和第四组超声处理，1、4、7天第二、三和四组给与aPD-L1注射（75  $\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$ ），每天监测肿瘤生长情况和体重记录（图2-19a）。如图2-19b所示，在治疗过程中，各组小鼠体重保持正常，无明显差异。如图2-19c所示，单独的超声刺激外加aPD-L1对原位肿瘤生长几乎没有抑制效果，这可能是因

为单独的超声刺激无法引起细胞免疫原性死亡，免疫系统未被激活，反观CFP纳米酶和aPD-L1相结合可以很好地抑制原位瘤的生长，其肿瘤生长抑制指数TGI为46.7%，而在此基础上外加超声刺激后，TGI可达到66.3%。更有意义的是，该治疗方式对远端瘤也有良好的抑制生长效果，如图3-19(d-f)结合3-20肿瘤质量图，得到CFP纳米酶和aPD-L1外加超声刺激处理组对远端瘤的抑制指数可达60.5%。该结果应该是由于前面已经证实CFP纳米酶介导的协同治疗可以诱导细胞免疫原性死亡，从而激活免疫系统。和免疫检查点抑制剂相结合，对远端肿瘤具有抑制生长作用。如图3-21所示，从远端瘤切片的CD8免疫组化结果可以观察到，CFP纳米酶处理组和CFP结合超声处理组都能观察到CD8<sup>+</sup>阳性信号，说明有活化后的细胞毒性T细胞（CTL）在远端瘤特异性地杀伤肿瘤细胞。

我们进一步使用了ELISA法检测不同治疗方式3天后小鼠血清中促炎细胞因子INF- $\gamma$ 、IL-6和TNF- $\alpha$ （图3-19h-j）。我们观察到CFP + US + aPD-L1组的细胞因子水平最高，进一步说明基于CFP纳米酶的协同治疗结合aPD-L1辅助免疫治疗引发了强大的免疫应答。原位瘤和远端瘤的Ki67和TUNEL染色分析均显示了基于该纳米酶的协同治疗和aPD-L1治疗的效果（图3-22）。同样原位瘤的肿瘤组织切片免疫组化分析得到，CFP + US + aPD-L1比其他治疗更能降低MMP9、VEGF的表达和上调E-cadherin表达（图3-19g）。我们还使用肺转移模型，评估了该联合治疗方式的抗转移效果。如图3-23a所示，通过CFP + US + aPD-L1 处理小鼠和未治疗的小鼠静脉注射4T1癌细胞。继续饲养21天后，收集肺组织（图3-23b）。可以观察到对照组有很多的肺转移结节，而CFP + US + aPD-L1 治疗后的小鼠只有极少数的结节，肺组织切片的H&E染色进一步证实了这一点（图3-23c）。说明CFP纳米酶介导的化学动力、声动力和免疫治疗结合可以很好地抑制肿瘤生长和转移。

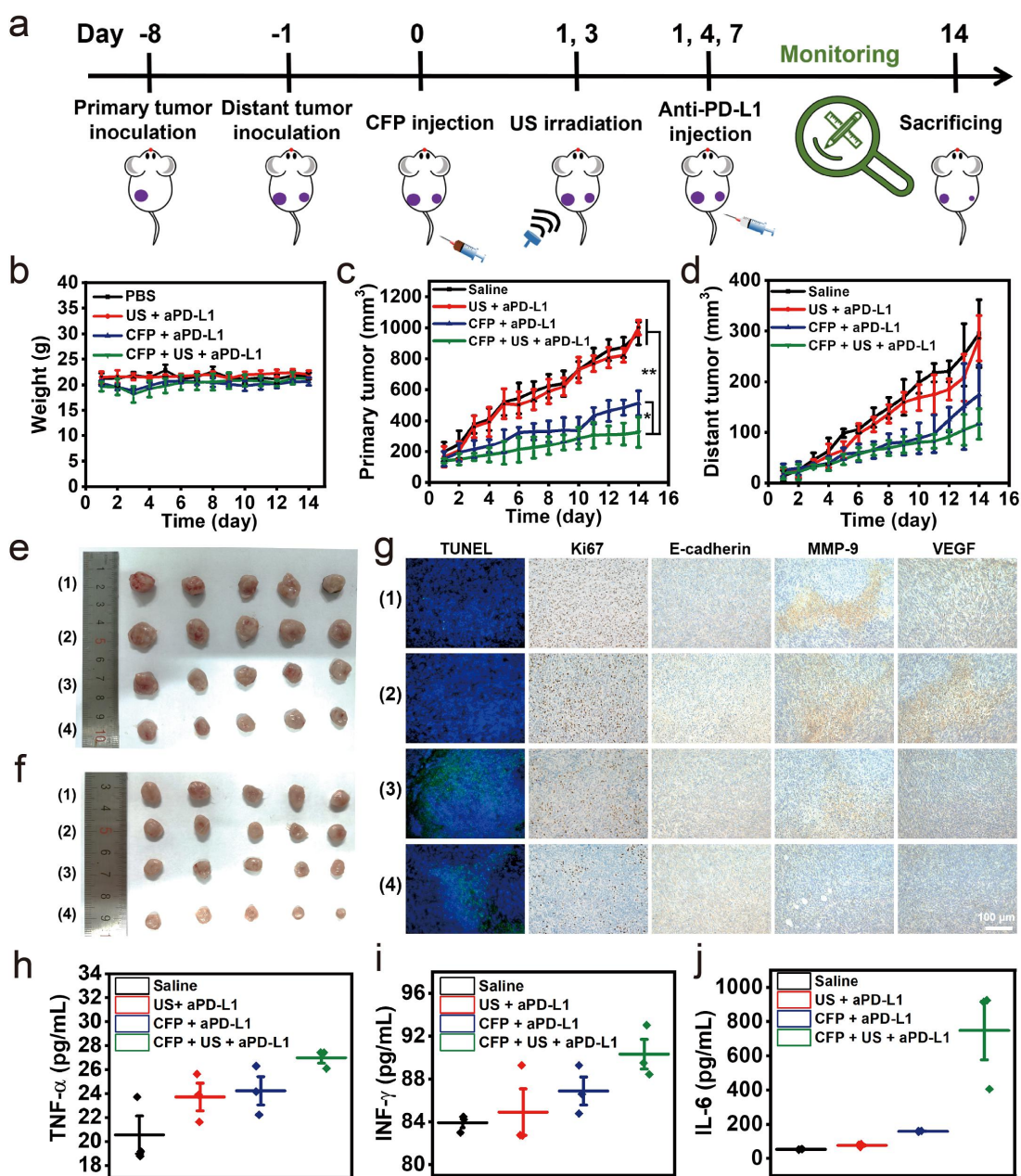


图 3-19 (a) CFP 结合超声刺激和 aPD-L1 免疫检查点阻断剂治疗 Balb/c 小鼠双边瘤模型的方案说明；(b) 治疗期间的小鼠体重变化；(c) 和 (d) 不同处理组原位瘤和远端瘤在治疗期间肿瘤生长曲线；(e) 和 (f) 不同处理原位瘤和远端瘤治疗后第 15 天切除的肿瘤照片；(g) 对切除的原位肿瘤的组织学分析 Ki67、TUNEL、E-cadherin、MMP9 和 VEGF；(h-j) 治疗 3 天后小鼠血清中细胞因子  $INF-\gamma$ 、 $IL-6$  和  $TNF-\alpha$  含量。

Figure 3-19 *In vivo* suppression of both primary and distant tumor through CFP-mediated therapy.

(a) Scheme to show the treatment procedure on BALB/c mouse models with bilateral tumor inoculation; (b) record of mouse body weight during the treatment period of 14 days; (c) primary and (d) distant tumor growth curve after mice receiving various treatments; digital photographs of (e) primary and (f) distant tumors harvested on day 14; (g) histological analysis of tissue

sections from primary tumor excised on day 14, through immunostaining with TUNEL, Ki67, E-cadherin, MMP-9 and VEGF (scale bar: 100 μm); cytokine level of (h) TNF-α, (i) INF-γ and (e) IL-6 in blood serum on day 3 after various treatments. Groups are assigned to be (1) saline, (2) US + aPD-L1, (3) CFP + aPD-L1, (4) CFP + US + aPD-L1.

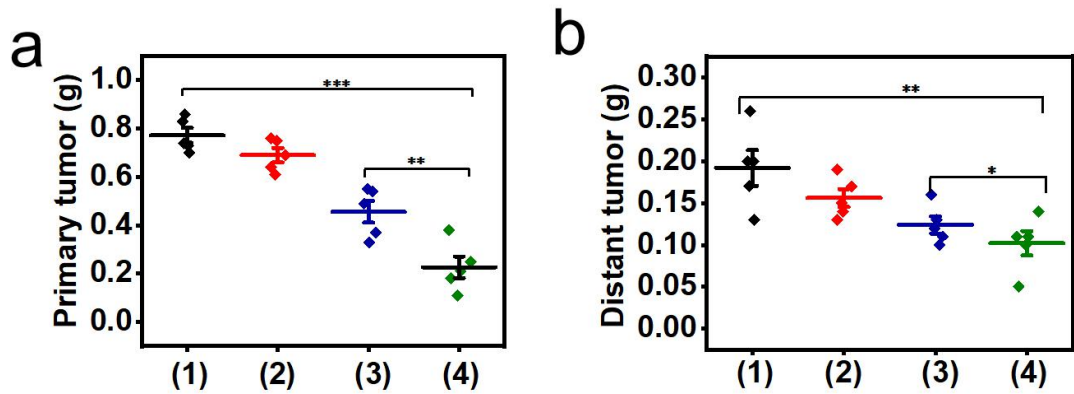


图 3-20 原位瘤和远端瘤的肿瘤质量:(1) 生理盐水, (2) US + aPD-L1, (3) CFP + aPD-L1 and (4) CFP + US + aPD-L1。

Figure 3-20 Weight of (a) primary tumor and (b) distant tumor harvested on day 14 in terms of different treatments. Groups are allocated to be (1) saline, (2) US + aPD-L1, (3) CFP + aPD-L1 and (4) CFP + US + aPD-L1.

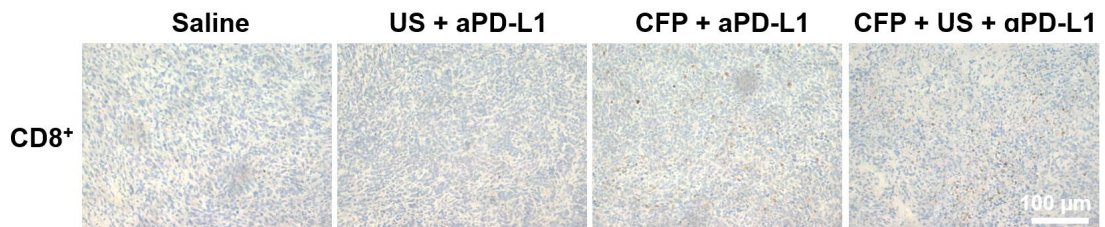


图 3-21 不同处理组远端瘤细胞切片 CD8 免疫组化分析, 棕色为阳性信号。

Figure 3-21 CD8 immunohistochemical analysis of sections of distant tumor of different treatment groups.

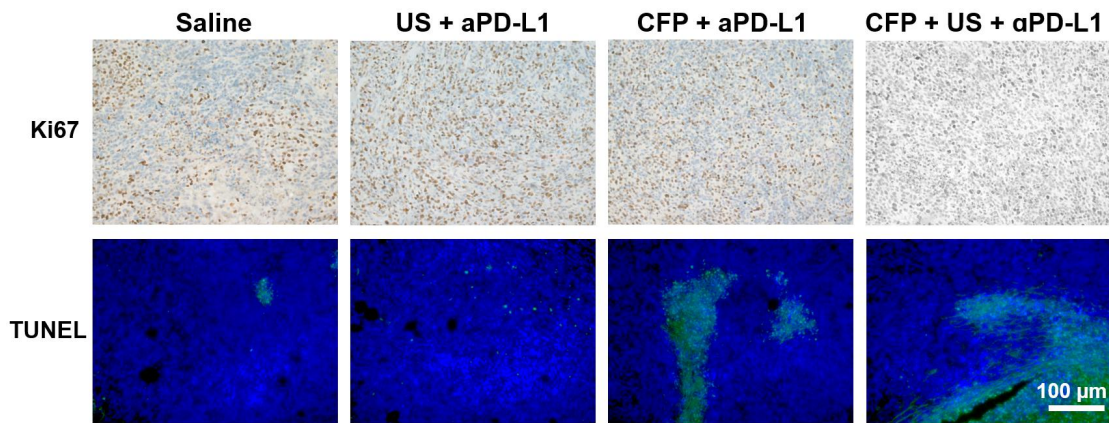


图 3-22 不同处理组远端肿瘤的 Ki67 和 TUNEL 染色。

Figure 3-22 Ki67 and TUNEL staining of distant tumor of different group.

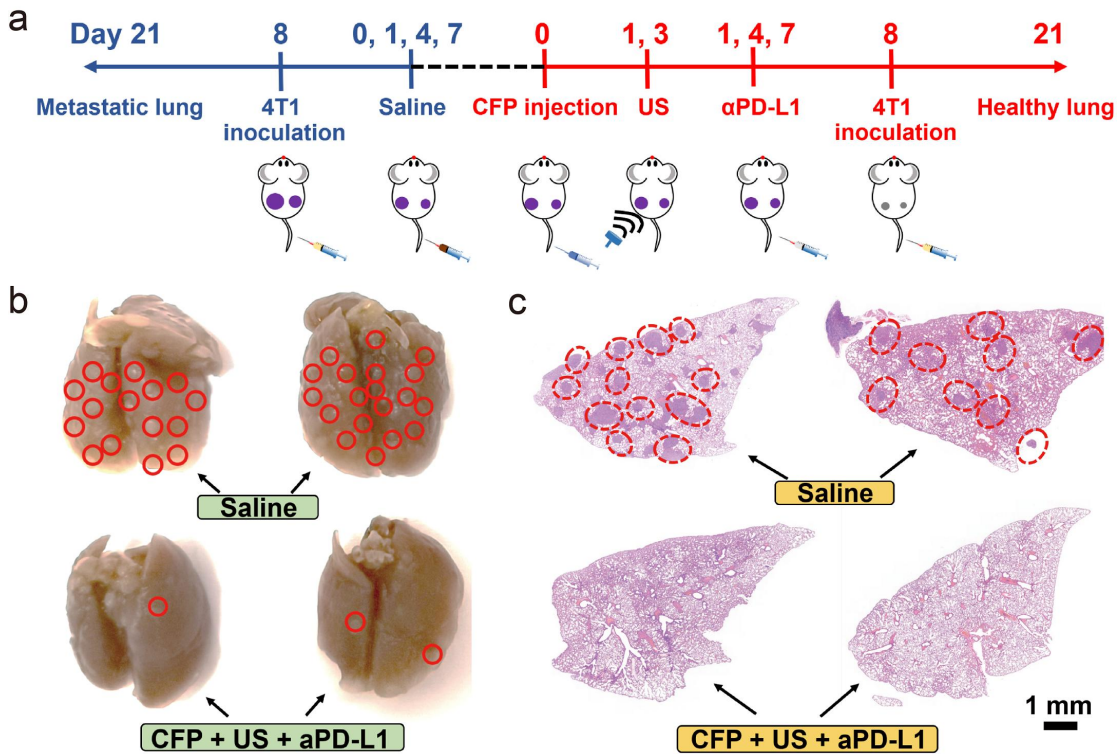


图 3-23 (a) US+ CFP +aPD-L1 抑制 Balb/c 小鼠肺转移治疗方案。(b) 不同治疗组肺组织的图像；(c) 不同治疗组肺组织的 H&E 染色。

Figure 3-23 (a) Scheme of US+ CFP +PD-L1 antibody synergistic comprehensive treatment for lung metastasis inhibition in Balb/c mice; (b) Representative images of lung tissues from different treatment groups; (c) H&E staining of lung tissues with different treatments.

### 3.4 本章小结

我们构建了一种具有多酶活性的铁酸钴纳米酶，一方面具有类过氧化物酶活性，可以在肿瘤微环境中催化过表达的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>产生羟基自由基实现化学动力疗法，同时具有类过氧化氢酶活性催化H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>产生氧气。另一方面该纳米酶由于较小带隙能优势可以作为理想的无机声敏剂，在结合外部超声刺激时，能很好地实现电子空穴分离，将周围的氧气分子转化为单线态氧，而其类过氧化氢酶活性可以通过提高氧气浓度实现其自增强声动力效率。而且该纳米酶介导的化学动力疗法和声动力疗法可以诱导细胞免疫原性死亡，激活免疫系统。我们将其与免疫抑制剂相结合，实现化学动力治疗/声动力治疗/免疫治疗协同治疗。总之，本研究为纳米酶介导癌症协同治疗提供了一个新的策略，对未来的临床转化具有一定的价值。



## 第4章 全文总结与展望

### 4.1 全文总结

纳米酶是具有内在酶样特性的纳米材料，在过去十年中蓬勃发展，因为它们能够解决天然酶的众多局限性，如稳定性低、成本高和储存困难等问题。随着纳米科学技术的快速发展和理解的不断深入，纳米酶有望通过模拟和进一步工程化天然酶的活性中心来直接替代传统酶。通过结合独特的物理化学性质和类似酶的催化活性，纳米酶可以辅助实现多重生物化学功能，已被广泛应用于体外诊断检测、在体监测和治疗等。纳米酶在肿瘤治疗方面的能力也已逐步显现，特别是可以原位催化肿瘤微环境的底物以达到抑制肿瘤生长作用。此外，纳米酶对肿瘤相关疾病还具有免疫调节作用，可激活免疫细胞实现免疫治疗。当然，纳米酶也存在一定的局限性，例如只基于酶活性的治疗效率低、生物安全性差等问题。本论文研究致力于通过设计对肿瘤微环境可产生特异性响应的多功能纳米酶用于提高化学动力疗法效率，利用纳米酶独特的物理化学性质和响应外部刺激的性能来实现多种治疗方式的协同作用，并进一步将其与免疫检查点抑制剂结合，实现纳米酶介导的多模态协同治疗及成像引导。具体的研究成果如下：

(1) 以 Co 纳米球为模板和还原剂，创新性地合成了一种具有多酶活性的 CoO@AuPt 纳米酶簇，该材料在正常生理条件下展现出了良好的生物相容性和稳定性。在增强渗透滞留 (EPR) 效应的作用下，该纳米酶簇可在肿瘤区域快速高效富集。其核心的 CoO 框架在肿瘤局部弱酸性和高水平  $H_2O_2$  环境中快速降解为  $Co^{2+}$ ，并使 Au/Pt 双金属纳米酶簇快速解聚，释放具有更高催化活性的纳米酶，实现对肿瘤的特异性杀伤。该策略可有效解决传统超小 Au、Pt 纳米酶在体内长循环过程中易被快速清除的问题。此外，解聚后的纳米酶在实体瘤中具有更高的穿透深度，且更容易被机体降解和代谢。一方面，Au/Pt 纳米卫星具有过氧化物酶活性，在催化  $H_2O_2$  生成  $\cdot OH$  的同时，可有效地将肿瘤细胞中高表达的还原性 GSH 氧化为 GSSG，极大地保护所生成的活性氧簇。另一方面，Au/Pt 纳米酶可模拟过氧化氢酶催化  $H_2O_2$  分解产氧，并提高局部氧分压。此外，Au/Pt 纳米酶还可催化胞内葡萄糖的快速分解，反应获得的大量  $H_2O_2$  作为催化底物进一步促进了  $O_2$  和  $\cdot OH$  的生成。这种循环型葡萄糖消耗和  $H_2O_2$  再生机制，不仅促进了肿瘤的饥饿疗法，更显著提高了化学动力治疗效果。综上所述，该空心纳米酶簇可有效响应肿瘤微环境，其具有的多酶催化活性可有效增强化学动力疗效，该材料的设计方法对未来发展新类型纳米酶并应用于生物医学领域具有重要指导意义。

(2) 通过一步法加入铁源和钴源，制备得到了多功能纳米酶铁酸钴。此纳米体系一方面具有类过氧化物酶活性，可在肿瘤微环境中催化过表达的  $H_2O_2$ ，产生羟

基自由基实现化学动力治疗，也具有类过氧化氢酶活性，可催化  $\text{H}_2\text{O}_2$  产生氧气；另一方面，该纳米酶由于特殊的理化性质可作为优异的无机声敏剂，而其类过氧化氢酶活性可以进一步实现其声动力效率的自增强。化学动力疗法和声动力疗法都可以诱导细胞免疫原性死亡，并调控肿瘤细胞转移相关蛋白抑制肿瘤转移，这样再把激活免疫系统与免疫抑制剂相结合后，可实现化学动力治疗/声动力治疗/免疫治疗三路协同的抗肿瘤效果。

简单来讲，本研究第一阶段重在利用  $\text{CoO}@\text{AuPt}$  的多酶活性实现对肿瘤微环境的多种底物产生特异性响应，从而提高 CDT 治疗效率，主要针对的是传统化学动力疗法效率低的问题。在第二阶段研究中，为了进一步挖掘纳米酶的理化性质优势，利用铁酸钴纳米酶既能响应肿瘤微环境也能响应外部声学刺激的特点，实现了化学动力和声动力协同治疗，并且将纳米材料介导的免疫系统激活放大效应与免疫抑制剂结合，共同有效抑制肿瘤生长和转移，进一步丰富了纳米酶介导的联合治疗模式。总体来讲，本研究为优化多功能纳米酶的设计和肿瘤诊疗一体化纳米药物的开发应用提供了新的思路和实验证据。

## 4.2 论文创新点

本论文的主要创新点可以总结为以下几点：

(1) 创新性地合成了多功能纳米酶  $\text{CoO}@\text{AuPt}$  用于化学动力疗法，抑制肿瘤生长，该治疗方法相对传统的光热、光动力等单一治疗方式具有更大的临床应用潜力，因为光热、光动力等治疗方式不仅需要外部刺激，并且受到外部刺激因素在生物组织中的穿透深度局限。

(2) 肿瘤微环境响应型、可解聚的  $\text{CoO}@\text{AuPt}$  纳米酶为增加纳米材料的生物安全性提供了新的方法，通过特殊设计使其在靶向至肿瘤区域后能够解聚成小于 10 纳米的颗粒并易于通过肾脏清除。该方法对于清除生物体不可降解的纳米材料是非常有利的，不仅可以增加纳米药物在肿瘤部位的渗透深度，也可促进残余纳米药物从体内顺利清除，减少因纳米材料长期滞留体内引起的系统毒性。

(3) 金铂双金属多功能纳米酶的设计不仅可有效解决传统化学动力疗法制剂的 pH 值依赖性，例如铁基纳米材料、过渡金属离子和金属有机框架等需要在强酸性条件下 ( $\text{pH} = 3-5$ ) 发挥作用，且化学动力产生的活性氧易被肿瘤微环境中高表达的谷胱甘肽清除。另外，肿瘤微环境中偏低的  $\text{H}_2\text{O}_2$  水平也会降低治疗效率。而金铂纳米酶同时具有氧化酶和过氧化氢酶等活性，通过对肿瘤微环境底物产生一系列级联反应，可以很好地解决上述问题从而提高治疗效率。

(4) 设计并合成了多功能的铁酸钴纳米酶，虽然其过氧化物酶活性已有很多研究报告，但其过氧化氢酶活性却鲜有报道。

(5) 目前用于声动力治疗的无机声敏剂为数不多, 本身具有过氧化氢酶活性且可自增强声动力效率的更是鲜有。因为声动力疗法依赖局部氧气水平, 而肿瘤微环境的天然缺氧环境会抑制声动力治疗的效果。本研究设计的铁酸钴具有过氧化氢酶活性, 可以很好地催化肿瘤微环境中过表达的  $H_2O_2$ , 从而对声动力疗法起到自增强作用, 再结合其过氧化物酶活性则可实现化学动力和声动力协同治疗作用。

(6) 铁酸钴纳米酶介导的化学动力/声动力有效协同治疗还可额外地激活肿瘤免疫微环境, 引发肿瘤细胞免疫原性死亡, 再与免疫抑制剂结合作用, 因而在前述化学动力/声动力协同基础上进一步起到了免疫治疗的效果。

### 4.3 展望

在本研究中, 借助多功能纳米酶的设计策略, 合成了两种肿瘤微环境响应型纳米酶,  $CoO@AuPt$  不仅提高了化学动力疗法的效率, 还因其结构在肿瘤微环境瓦解, 减小了生物毒性。铁酸钴纳米酶不仅可以实现声动力疗法, 还可实现自增强的化学动力疗法并结合免疫治疗实现肿瘤的治疗和抗转移。基于前期的工作基础以及文献调研, 我们认为纳米酶在肿瘤治疗方面还有如下众多研究工作可以深入开展。

#### 4.3.1 生物可消除纳米酶的开发

纳米酶具有优异的催化活性和物理化学性质, 在纳米医学领域具有巨大的应用潜力, 特别是在癌症成像、治疗和诊断方面。但是, 纳米粒子的生物安全性引起了越来越受到研究者的关注。被免疫系统视为外来物质的纳米粒子可能会引发许多健康风险, 如炎症、氧化损伤和纤维化。因此, 在生物体内可控消除已成为临床转换可能的先决条件之一。如果纳米粒子材料在体内有被机体降解的能力, 可以逐渐降解, 最终排出体外就可减小生物毒性。否则, 长期滞留在体内可能带来严重且不可预测的毒性风险。因此, 开发和生物可消除的无机纳米粒子和纳米复合材料迫在眉睫。已经发现一些无机纳米粒子本质上是可生物降解的。例如被美国 FDA 批准作为贫血药物和  $T_2$  加权磁共振造影剂的  $Fe_3O_4$  纳米粒子, 能够被生物体降解为铁离子, 而铁离子作为调节铁稳态的必需微量元素天然存在于人体内, 因此具有良好的生物安全性。还包括一些磷酸钙、磷酸锰等也是生物可降解的。但是总体来说, 生物可消除的纳米酶还是很少的, 有待广大研究学者的努力开发出更多生物可消除的纳米酶, 推动纳米酶往临床应用的目标发展。

#### 4.3.2 提高纳米酶的主动靶向性

与进入循环系统后容易变性和降解的天然酶相比, 纳米酶在多功能性、高稳定性和低成本方面的优势将使它们有望被广泛应用于体内。然而, 临床实用的纳

米酶还应该具有靶向性和可控性两个特征。因为通过 EPR 效应被动靶向至病灶部位的效率是很低的，应该提高纳米酶的主动靶向性，并使它们能够在复杂的肿瘤微环境有效地执行所设计的功能。例如，曲晓刚教授研究团队通过在红细胞膜上修饰靶向肽，然后将红细胞膜包覆在氧化铁纳米酶表面，设计并合成了具有主动 A $\beta$  靶向能力的 Cu<sub>x</sub>O@EM-K，增强了蛋白质吸附抗性并最小化了免疫原性，用于选择性和有效地清除外周 A $\beta$  用以治疗阿兹海默症的目的。这种利用红细胞膜包覆纳米酶并修饰抗体实现靶向性的方法可以很好地解决纳米酶的被动靶向效率低的问题，并且纳米酶的刚性与红细胞膜的柔性有机结合，给增强纳米酶的靶向性及多功能设计提供了很好的方向。

#### 4.3.3 纳米酶在免疫治疗中的应用

肿瘤的发展和转移与肿瘤微环境（TME）的结构和功能密切相关。最近，关于 TME 调节策略在癌症免疫治疗中引起了很大关注。尽管近年免疫治疗取得了初步成功，但其治疗效果受到 TME 的各种限制。与传统的小分子药物相比，纳米酶自身或可作为载体通过靶向肿瘤微环境来改变肿瘤区域局部的免疫抑制环境，将之转化为免疫支持状态，从而提高癌症免疫治疗的功效。据报道，一些功能化的纳米材料可以与树突状细胞表面的 CD40、CD11c 和甘露糖等受体特异性结合，达到增强免疫治疗的效果。而纳米酶具有独特的催化性质和理化性质，可以保护药物的降解或聚集，并响应肿瘤微环境特定的刺激（如 pH 值、缺氧或 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>），以达到可控释放药物。纳米酶还可以通过影响 TME 的异常结构和功能，从而减少耐药性并放大化疗、放疗和光动力疗法的治疗效果。因此，将纳米酶本身的催化活性与肿瘤微环境特异性有机结合，将提供更多简便高效的多功能治疗平台。

综上所述，我们相信纳米酶在未来从体外诊断检测、体内监测和催化治疗方面将具有巨大的潜力。本领域迫切需要新的方法来针对纳米酶的生物效应进行系统评估，包括细胞毒性、体内摄取、生物分布和利用率、免疫原性以及纳米酶的药代动力学等方面，以推进纳米酶的临床转化应用。这些将是未来纳米酶前沿研究将要解决的主要问题，并将加速纳米酶在基础和临床研究中的发展。

## 参考文献

- [1] Bae K. H., Chung H. J., Park T.G., Nanomaterials for cancer therapy and imaging[J]. *Mol. Cells* **2011**, 31(4):295-302.
- [2] Gong F., Yang N., Wang X., et al. Tumor microenvironment-responsive intelligent nanoplatforms for cancer theranostics[J]. *Nano Today* **2020**, 32:100851.
- [3] Mukta A., Swarnlata S., Shailendra S., et al. Recent strategies and advances in the fabrication of nano lipid carriers and their application towards brain targeting[J]. *J. Controlled Release* **2020**, 321:372-415.
- [4] Zhou J., Tian G., Zeng L., et al. Nanoscaled Metal-Organic Frameworks for Biosensing, Imaging, and Cancer Therapy[J]. *Adv. Healthcare Mater.* **2018**, 7(10): 1800022.
- [5] Tang Z., Liu Y., He M., et al. Chemodynamic therapy: tumour microenvironment mediated fenton and fenton-like reaction[J]. *Angew. Chem.* **2018**, 58(4):946-956.
- [6] Yang M., Li J., Gu P., et al. The application of nanoparticles in cancer immunotherapy: Targeting tumor microenvironment[J]. *Bioact. Mater.* **2021**, 6(7):1973-1987.
- [7] Reczek C.R., Chandel N.S., ROS promotes cancer cell survival through calcium signaling, *Canc. Cell* **2018**, 33(6):949-951.
- [8] Lohse I., Targeting hypoxic microenvironment of pancreatic xenografts with the hypoxia-activated prodrug TH-302[J]. *Oncotarget* **2016**, 7(23):33571-33580.
- [9] Poillet-Perez L., Despouy G., Delage-Mourroux R., et al. Interplay between ROS and autophagy in cancer cells, from tumor initiation to cancer therapy[J]. *Redox Biol.* **2015**, 4:184-192.
- [10] Xu K., Wu X., Cheng Y., et al. A biomimetic nanoenzyme for starvation therapy enhanced photothermal and chemodynamic tumor therapy[J]. *Nanoscale* **2020**, 45(12): 23159-23165.
- [11] Manea F., Houillon F. B., Pasquato L., et al. Nanozymes: gold nanoparticle based transphosphorylation Catalysts[J]. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, 43(45):6165-6169.
- [12] Gao L., Zhuang J., Nie L., et al. Intrinsic peroxidase-like activity of ferromagnetic nanoparticles[J]. *Nat. Nanotechnol.* **2007**, 2(9):577-583.
- [13] Hani N., Jurkin T., Maksimovi A., et al. The synthesis of gold nanoparticles by a citrate-radiolytical method[J]. *Radiat. Phys. Chem.* **2015**, 106:77-82.
- [14] Xiong L., James G., et al. Kinetic study of gold nanoparticle growth in solution by Brust-Schiffrin reaction[J]. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2006**, 6(4):1054-1059.
- [15] Hu, X., Saran, A., Hou, S., et al. Au@PtAg core/shell nanorods: tailoring enzyme-like activities via alloying[J]. *RSC Adv.* **2013**, 3 (17):6095-6105.

- [16] Roggenbuck J., Sch H., Tsoncheva T., et al. Mesoporous CeO<sub>2</sub>: synthesis by nanocasting, characterisation and catalytic properties[J]. *Microporous Mesoporous Mater.* **2007**, 101(3):335-341.
- [17] Hua C. C., Zakaria S., Farahiyan R., et al. Size-controlled synthesis and characterization of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles by chemical coprecipitation method[J]. *Sains Malays.* **2008**, 37(4):389-394.
- [18] Chang M., Wang M., Wang M., et al. A multifunctional cascade bio-reactor based on hollow-structured Cu<sub>2</sub>MoS<sub>4</sub> for synergetic cancer chemodynamic therapy/starvation therapy/phototherapy/immunotherapy with remarkably enhanced efficacy[J]. *Adv. Mater.* **2019**, 31(51):1905271
- [19] Liang Q., Xi J., Gao X. J., et al. A metal-free nanozyme-activated prodrug strategy for targeted tumor catalytic therapy[J]. *Nano Today* **2020**, 35:100935.
- [20] Chen Q., Li X., Min X., et al. Determination of catechol and hydroquinone with high sensitivity using MOF-graphene composites modified electrode[J]. *J. Electroanal. Chem.* **2017**, 789:114-122.
- [21] Comotti M., Della P. C., Matarrese R., et al. The catalytic activity of “naked” gold particles[J]. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, 43:5812-5815.
- [22] Comotti M., Della P. C., Falletta, E., et al. Aerobic oxidation of glucose with gold catalyst: hydrogen peroxide as intermediate and reagent[J]. *Adv. Synth. Catal.* **2006**, 348(3), 313-316.
- [23] Shen X., Liu W., Gao X., et al. Mechanisms of oxidase and superoxide dismutation-like activities of gold, silver, platinum, and palladium, and their alloys: a general way to the activation of molecular oxygen[J]. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, 137(50):15882-15891.
- [24] Behler J., Delley B., Lorenz S., et al. Dissociation of O<sub>2</sub> at Al(111): the role of spin selection rules[J]. *Phys. Rev. Lett.* **2005**, 94(3):537-559.
- [25] Ragg R., Natalio F., Tahir M. N., et al. Molybdenum trioxide nanoparticles with intrinsic sulfite oxidase activity[J]. *ACS Nano* **2014**, 8(5):5182-5189.
- [26] Asati A., Santra S., Kaittanis C., et al. Oxidase-like activity of polymer-coated cerium oxide nanoparticles[J]. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, 48(13):2308-2312.
- [27] Liu J., Meng L. J., Fei, Z. F., Dyson, P. J., Jing, X. N., Liu X., MnO<sub>2</sub> nanosheets as an artificial enzyme to mimic oxidase for rapid and sensitive detection of glutathione[J]. *Biosens. Bioelectron.* **2017**, 90:69-74.
- [28] Zhang X. D., He S. H., Chen Z. H., Huang Y. M., CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles as oxidase mimic-mediated chemiluminescence of aqueous luminol for sulfite in white wines[J]. *Agric. Food Chem.* **2013**, 61(4):840-847.

- [29] Vernekar A. A., Das T., Ghosh S., Muges G., A remarkably efficient MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-based oxidase nanozyme[J]. *Chem. Asian J.* **2016**, 11(1):72-76.
- [30] Li J., Liu W., Wu X., et al. Mechanism of pH-switchable peroxidase and catalase-like activities of gold, silver, platinum and palladium[J]. *Biomaterials* **2015**, 48:37-44.
- [31] Sun H. J., Zhao A. D., Gao N., et al. Deciphering a nanocarbon-based artificial peroxidase: chemical identification of the catalytically active and substrate-binding sites on graphene quantum dots[J]. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2015**, 54(24):7176-7180.
- [32] Zhao R. S., Zhao X., Gao X. F., Molecular-level insights into intrinsic peroxidase-like activity of nanocarbon oxides[J]. *Chem. Eur. J.* **2015**, 21(3):960-964.
- [33] Gao L., Zhuang J., Nie L., et al. Intrinsic peroxidase-like activity of ferromagnetic nanoparticles[J]. *Nat. Nanotechnol.* **2007**, 2(9):577-583.
- [34] Cleland W. W., Derivation of rate equations for multisite ping-pong mechanisms with ping-pong reactions at one or more sites[J]. *J. Biol. Chem.* **1973**, 248(24):8353-8355.
- [35] Wang N., Zhu L. H., Wang D. L., et al. Sono-assisted preparation of highly-efficient peroxidase-like Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanoparticles for catalytic removal of organic pollutants with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>[J]. *Ultrason. Sonochem.* **2010**, 17(3):526-533.
- [36] Feng Y. B., Hong L., Liu A. L., et al. High-efficiency catalytic degradation of phenol based on the peroxidase-like activity of cupric oxide nanoparticles[J]. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* **2015**, 12(2):653-660.
- [37] André R., Natálio F., Humanes M., et al. V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> Nanowires with an intrinsic peroxidase-like activity[J]. *Adv. Funct. Mater.* **2011**, 21(3):501-509.
- [38] Li J., Liu W., Wu X., et al. Mechanism of pH-switchable peroxidase and catalase-like activities of gold, silver, platinum and palladium[J]. *Biomaterials* **2015**, 48:37-44.
- [39] Pirmohamed T., Dowding J. M., Singh S., et al. Nanoceria exhibit redox state-dependent catalase mimetic activity[J]. *Chem. Commun.* **2010**, 46(16):2736-2738.
- [40] Celardo I., Pedersen J. Z., Traversa E., et al. Pharmacological potential of cerium oxide nanoparticles[J]. *Nanoscale* **2011**, 3(4):1411-1420.
- [41] Mu J., Zhang L., Zhao M., et al. Catalase mimic property of Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanomaterials with different morphology and its application as a calcium sensor[J]. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2014**, 6(10):7090-7098.
- [42] Ghosh S., Roy P., Karmodak N., et al. Nanoisozymes: crystal facet dependent enzyme mimetic activity of V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> nanomaterials[J]. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2018**, 57(17):4510-4515.

- [43] Li Y., Li X., Wong Y. S., et al. The reversal of cisplatin-induced nephrotoxicity by selenium nanoparticles functionalized with 11-mercapto-1-undecanol by inhibition of ROS-mediated apoptosis[J]. *Biomaterials* **2011**, 32(34):9068-9076.
- [44] Singh N., Savanur M. A., Srivastava S., et al. A redox modulatory  $Mn_3O_4$  nanozyme with multi-enzyme activity provides efficient cytoprotection to human cells in a Parkinson's disease model[J]. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2017**, 56(45):14267-14271.
- [45] Huang Y. Y., Liu C. Q., Pu F., et al. A GO-Se nanocomposite as an antioxidant nanozyme for cytoprotection[J]. *Chem. Commun.* **2017**, 53:3082-3085.
- [46] Vernekar A. A., Sinha D., Srivastava S., et al. An antioxidant nanozyme that uncovers the cytoprotective potential of vanadia nanowires[J]. *Nat. Commun.* **2014**, 5:5301.
- [47] Shen X. M., Liu W. Q., Gao X. J., et al. Mechanisms of oxidase and superoxide dismutation-like activities of gold, silver, platinum, and palladium, and their alloys: a general way to the activation of molecular oxygen[J]. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, 137(50):15882-15891.
- [48] Ge C. C., Fang G., Shen X. M., et al. Facet energy versus enzyme-like activities: the unexpected protection of palladium nanocrystals against oxidative damage[J]. *ACS Nano* **2016**, 10(11):10436-10445.
- [49] Zheng X. X., Liu Q., Jing C., et al. Catalytic gold nanoparticles for nanoplasmonic detection of DNA hybridization[J]. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2011**, 50(50):11994-11998.
- [50] Huang Y. Y., Liu Z., Liu C. Q., et al. Self-assembly of multi-nanozymes to mimic an intracellular antioxidant defense system[J]. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2016**, 55(23):6646-6650.
- [51] Celardo I., Pedersen J. Z., Traversa E., et al. Pharmacological potential of cerium oxide nanoparticles[J]. *Nanoscale* **2011**, 3(4):1411-1420.
- [52] Korschelt K., Schwidetzky R., Pfitzner F., et al.  $CeO_{2-x}$  nanorods with intrinsic urease-like activity[J]. *Nanoscale* **2018**, 10(27):13074-13082.
- [53] Natalio F., André R., Hartog A. F., et al. Vanadium pentoxide nanoparticles mimic vanadium haloperoxidases and thwart biofilm formation[J]. *Nat. Nanotechnol.* **2012**, 7(8):530-535.
- [54] Song Y., Qu K., Xu C., et al. Visual and quantitative detection of copper ions using magnetic silica nanoparticles clicked on multiwalled carbon nanotubes[J]. *Chem. Commun.* **2010**, 46(35):6572-6574.
- [55] Chang Y., Zhang Z., Hao J., et al. BSA-stabilized Au clusters as peroxidase mimetic for colorimetric detection of  $Ag^+$ [J]. *Sens. Actuators, B* **2016**, 232:692-697.
- [56] Lien C. W., Unnikrishnan B., Harroun S.G., et al. Visual detection of cyanide ions by membrane-based nanozyme assay[J]. *Biosens. Bioelectron.* **2018**, 102:510-517.

- [57] Liu B., Huang Z., Liu J., Boosting the oxidase mimicking activity of nanoceria by fluoride capping: rivaling protein enzymes and ultrasensitive F-detection[J]. *Nanoscale* **2016**, 8(28):13562-13567.
- [58] Karim M .N., Samuel R., Sanjay S., et al. Nanostructured silver fabric as a free-standing nanozyme for colorimetric detection of glucose in urine[J]. *Biosens. Bioelectron.* **2018**, 110:8-15.
- [59] Deng H. H., Hong G.L., Lin F.L., et al. Colorimetric detection of urea, urease, and urease inhibitor based on the peroxidase-like activity of gold nanoparticles[J]. *Anal. Chim. Acta* **2016**, 915:74-80.
- [60] Liu H., Zhu J. Y., Fu S.Y., Effects of lignin–metal complexation on enzymatic hydrolysis of cellulose[J]. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, 12(58): 7233-7238.
- [61] Chen W., Zhang X., Li J., et al. Colorimetric detection of nucleic acids through triplex-hybridization chain reaction and DNA controlled growth of Platinum nanoparticles on graphene oxide[J]. *Anal. Chem.* **2020**, 92(3):2714-2721.
- [62] He W., Liu Y., Yuan J., et al. Au@Pt nanostructures as oxidase and peroxidase mimetics for use in immunoassays[J]. *Biomaterials* **2011**, 32(4):1139-1147.
- [63] Demin, D., Fang K., et al. Nanozyme-strip for rapid local diagnosis of Ebola[J]. *Biosens. Bioelectron.* **2015**, 74:134-141.
- [64] Bing J., Liang L., et al. Biom mineralization synthesis of the cobalt nanozyme in SP94-Ferritin nanocages for prognostic diagnosis of hepatocellular carcinoma[J]. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2019**, 10 (11):9747-9755.
- [65] Liu T., Xiao B., Xiang F., et al. Ultrasmall copper-based nanoparticles for reactive oxygen species scavenging and alleviation of inflammation related diseases[J]. *Nat. Commun.* **2020**, 11(1):2788.
- [66] Ma M., Liu Z., Gao N., et al. Self-protecting biomimetic nanozyme for selective and synergistic clearance of peripheral amyloid- $\beta$  in an alzheimer's disease model[J]. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, 142(52):21702-21711.
- [67] A Multifunctional cascade bio-reactor based on hollow-structured  $\text{Cu}_2\text{MoS}_4$  for synergetic cancer chemodynamic therapy/ starvation therapy/ phototherapy/ immunotherapy with remarkably enhanced efficacy[J]. *Adv. Mater.* **2019**, 31(51): 1905271.
- [68] Meng X., Li D., Chen L., et al. High-performance self-cascade pyrite nanozymes for apoptosis-ferroptosis synergistic tumor therapy[J]. *ACS Nano* **2021**, 15(3):5735-5751.
- [69] Raza M. H., Siraj S., Arshad A., et al. ROS-modulated therapeutic approaches in cancer treatment[J]. *Cancer Res. Clin. Oncol.* **2017**, 143(9):1789-1809.

- [70] Yang H., Villani R. M., Wang H., et al. The role of cellular reactive oxygen species in cancer chemotherapy[J]. *Exp. Clin. Cancer Res.* **2018**, 37:266.
- [71] Reczek C. R., Chandel N. S., The two faces of reactive oxygen species in cancer[J]. *Annu. Rev. Cancer Biol.* **2017**, 1:79-98.
- [72] Reczek C. R., Chandel N. S., ROS promotes cancer cell survival through calcium signaling[J]. *Cancer Cell.* **2018**, 33(6):949-951.
- [73] Brenneisen P., Reichert A. S., Nanotherapy and reactive oxygen species (ROS) in cancer: A novel perspective[J]. *Antioxidants.* **2018**, 7(2):31-46.
- [74] Junior P. L., Camara D. A. D., Porcacchia A. S., et al. The roles of ROS in cancer heterogeneity and therapy[J]. *Oxid. Med. Cell. Longevity.* **2017**, 2017:2467940.
- [75] Zhou Z., Song J., Nie L., et al. Reactive oxygen species generating systems meeting challenges of photodynamic cancer therapy[J]. *Chem. Soc. Rev.* **2016**, 45(23):6597-6626.
- [76] Kumari S., Badana A. K., Malla R., Reactive oxygen species: a key constituent in cancer survival[J]. *Biomarker Insights* **2018**, 13:175-181.
- [77] Yang B., Chen Y., Shi J., Reactive oxygen species (ROS)-based nanomedicine[J]. *Chem. Rev.* **2019**, 119(8):4881-4985.
- [78] Poillet-Perez L., Despouy G., Delage-Mourroux R., et al. Interplay between ROS and autophagy in cancer cells, from tumor initiation to cancer therapy[J]. *Redox Biol.* **2015**, 4:184-192.
- [79] Calixto G. M., Bernegossi J., Freitas L. M., et al. Nanotechnology-based drug delivery systems for photodynamic therapy of cancer: A review[J]. *Molecules* **2016**, 21(3):342.
- [80] Lucky S. S., Soo K. C., Zhang Y., Nanoparticles in photodynamic therapy[J]. *Chem Rev.* **2015**, 115(4):1990-2042.
- [81] Costley D., Ewan C. M., Fowley C., et al. Treating cancer with sonodynamic therapy: A review[J]. *Int. J. Hyperthermia.* **2015**, 31(2):107-117.
- [82] McHale A. P., Callan J. F., Nomikou N., et al. Sonodynamic therapy: concept, mechanism and application to cancer treatment[J]. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2016**, 880:429-450.
- [83] Du J., Lane L. A., Nie S., Stimuli-responsive nanoparticles for targeting the tumor microenvironment[J]. *J. Controlled Release* **2015**, 219:205-214.
- [84] Chen Q., Liu G., Liu S., et al. Remodeling the Tumor Microenvironment with Emerging Nanotherapeutics[J]. *Trends Pharmacol. Sci.* **2018**, 39(1):59-74.
- [85] Liu Y., Zhen W., Jin L., et al. All-in-one theranostic nanoagent with enhanced reactive oxygen species generation and modulating tumor microenvironment ability for effective tumor eradication[J]. *ACS Nano* **2018**, 12(5):4886-4893.

- [86] Tang Z., Liu Y., He M., et al. Chemodynamic therapy: tumour microenvironment-mediated fenton and fenton-like reactions[J]. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2019**, 58(4):946-956.
- [87] Lin L. S., Song J., Song L., et al. Simultaneous Fenton-like ion delivery and glutathione depletion by MnO<sub>2</sub>-based nanoagent to enhance chemodynamic therapy[J]. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2018**, 57(18):4902-4906.
- [88] Zhang C., Bu W., Ni D., et al. Synthesis of iron nanometallic glasses and their application in cancer therapy by a localized fenton reaction[J]. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2016**, 55(6):2101-2106.
- [89] Hu P., Wu T., Fan W., et al. Near infrared-assisted Fenton reaction for tumor-specific and mitochondrial DNA-targeted photochemotherapy[J]. *Biomaterials* **2017**, 141:86-95.
- [90] Zhang L., Wan S. S., Li C. X., et al. Triphosphate-responsive autocatalytic Fenton nanoparticle for tumor ablation with self-supplied H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and acceleration of Fe(iii)/Fe(ii) conversion[J]. *Nano Lett.* **2018**, 18(12):7609-7618.
- [91] Ranji-Burachaloo H., Gurr P. A., Dunstan D. E., et al. Cancer treatment through nanoparticle-facilitated fenton reaction[J]. *ACS Nano* **2018**, 12(12):11819-11837.
- [92] Yin S. Y., Song G., Yang Y., et al. Persistent regulation of tumor microenvironment via circulating catalysis of MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>@metal-organic frameworks for enhanced photodynamic therapy[J]. *Adv. Funct. Mater.* **2019**, 29(25):1901417.
- [93] Gao S., Jin Y., Ge K., et al. Self-supply of O<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by a nanocatalytic medicine to enhance combined chemo/chemodynamic therapy[J]. *Adv. Sci.* **2019**, 6(24):1902137.
- [94] Wang L., Huo M., Chen Y., et al. Iron-engineered mesoporous silica nanocatalyst with biodegradable and catalytic framework for tumor-specific therapy[J]. *Biomaterials* **2018**, 163:1-13.
- [95] Fan J. X., Peng M. Y., Wang H., et al. Engineered bacterial bioreactor for tumor therapy via Fenton-like reaction with localized H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation[J]. *Adv. Mater.* **2019**, 31(16):1808278.
- [96] Wang Q., Zhang X., Huang L., et al. GOx@ZIF-8(NiPd) nanoflower: an artificial enzyme system for tandem catalysis[J]. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2017**, 56(50):16082-16085.
- [97] Yi H., Yan M., Huang D., et al. Synergistic effect of artificial enzyme and 2D nano-structured Bi<sub>2</sub>WO<sub>6</sub> for eco-friendly and efficient biomimetic photocatalysis[J]. *Appl. Catal., B* **2019**, 250:52-62.
- [98] Hu R., Fang Y., Huo M., et al. Ultrasmall Cu<sub>2-x</sub>S nanodots as photothermal-enhanced Fenton nanocatalysts for synergistic tumor therapy at NIR-II biowindow[J]. *Biomaterials* **2019**, 206:101-114.
- [99] Li J., Xie C., Huang J., et al. Semiconducting polymer nanoenzymes with photothermic activity for enhanced cancer therapy[J]. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2018**, 57(15):3995-3998.

- [100] P. Zhu, Y. Chen, J. Shi, nanoenzyme-augmented cancer sonodynamic therapy by catalytic tumor oxygenation[J]. *ACS Nano* **2018**, 12(4):3780-3795.
- [101] Wang H., Wan K., Shi X., Recent advances in nanozyme research[J]. *Adv. Mater.* **2019**, 31(45): 1805368.
- [102] Formo E., Lee E., Campbell D., et al. Functionalization of electrospun TiO<sub>2</sub> nanofibers with Pt nanoparticles and nanowires for catalytic applications[J]. *Nano Lett.* **2008**, 8(2):668-672.
- [103] Puja P., Kumar P., A perspective on biogenic synthesis of platinum nanoparticles and their biomedical applications[J]. *Spectrochim. Acta, Part A* **2019**, 211:94-99.
- [104] Dong Y., Chi Y., Lin X., et al. Nano-sized platinum as a mimic of uricase catalyzing the oxidative degradation of uric acid[J]. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, 13(13):6319-6324.
- [105] Huang Y., Ren J., Qu X., Nanozymes classification, catalytic mechanisms, activity regulation, and applications[J]. *Chem. Rev.* **2019**, 119(6):4357-4412.
- [106] Hu Y., Cheng H., Zhao X., 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.
- [107] Kang J. W., So P. T., Dasari R. R., et al. High resolution live cell Raman imaging using subcellular organelle-targeting sers-sensitive gold nanoparticles with highly narrow intra-nanogap[J]. *Nano Lett.* **2015**, 15(3):1766-1772.
- [108] Lin Y., Ren J., Qu X., Nano-gold as artificial enzymes: hidden talents[J]. *Adv. Mater.* **2014**, 26(25):4200-4217.
- [109] Comotti M., Pina C. D., Matarrese R., et al. The catalytic activity of "Naked" gold particles[J]. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, 43(43):5812-5815.
- [110] Wang X. X., Wu Q., Shan Z., et al. BSA-stabilized Au clusters as peroxidase mimetics for use in xanthine detection[J]. *Biosens. Bioelectron.* **2011**, 26(8):3614-3619.
- [111] He W., Zhou Y. T., Wamer W. G., et al. Intrinsic catalytic activity of Au nanoparticles with respect to hydrogen peroxide decomposition and superoxide scavenging[J]. *Biomaterials* **2013**, 34(3):765-773.
- [112] Bian H., Nguyen T., Yoo J., et al. Forming a Highly Active, Homogeneously alloyed AuPt co-catalyst decoration on TiO<sub>2</sub> nanotubes directly during anodic growth[J]. *ACS Appl. Mater. Interfaces.* **2018**, 10(21):18220-18226.
- [113] He W., Liu Y., Yuan J., et al. Au@Pt nanostructures as oxidase and peroxidase mimetics for use in immunoassays[J]. *Biomaterials* **2011**, 32(4):1139-1147.

- [114] Li H. J., Du J. Z., Du X. J., et al. Stimuli-responsive clustered nanoparticles for improved tumor penetration and therapeutic efficacy[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2016**, 113(15):4164-4169.
- [115] Yang G., Phua S. Z. F., Bindra A. K., et al. Degradability and clearance of inorganic nanoparticles for biomedical applications[J]. *Adv. Mater.* **2019**, 31(10): 1805730.
- [116] Liang H. P., Guo Y. G., Zhang H. M., et al. Controllable AuPt bimetallic hollow nanostructures[J]. *Chem. Commun.* **2004**, 2004(13):1496-1497.
- [117] Liang H. P., Zhang H. M., Hu J. S., et al. Pt hollow nanospheres: facile synthesis and enhanced electrocatalysts[J]. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, 16(12):1566-1569.
- [118] Zhang Z., Chen Z., Pan D., et al. Fenton-like reaction-mediated etching of gold nanorods for visual detection of  $\text{Co}^{2+}$ [J]. *Langmuir* **2015**, 31(1): 643-650.
- [119] Shen X., Liu W., Gao X., et al. Mechanisms of oxidase and superoxide dismutation-like activities of gold, silver, platinum, and palladium, and their alloys: a general way to the activation of molecular oxygen[J]. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, 137(50): 15882-15891.
- [120] Hu C., Cun X., Ruan S., et al. Enzyme-triggered size shrink and laser-enhanced NO release nanoparticles for deep tumor penetration and combination therapy[J]. *Biomaterials* **2018**, 168:64-75.
- [121] Ayala A., Munoz M. F., Arguelles S., Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal[J]. *Oxid. Med. Cell. Longevity.* **2014**, 2014: 360438.
- [122] Gruber C. C., Walker G. C., Incomplete base excision repair contributes to cell death from antibiotics and other stresses[J]. *DNA Repair* **2018**, 71:108-117.
- [123] He W., Han X., Jia H., et al. AuPt alloy nanostructures with tunable composition and enzyme-like activities for colorimetric detection of bisulfide[J]. *Sci. Rep.* **2017**, 7: 40103.
- [124] Obregon S., Ruiz-Gomez M. A., Hernandez-Uresti D. B., Direct evidence of the photocatalytic generation of reactive oxygen species (ROS) in a  $\text{Bi}_2\text{W}_2\text{O}_9$  layered structure[J]. *J. Colloid Interface Sci.* **2017**, 506 :111-119.
- [125] Burnaugh L., Sabeur K., Ball B. A., Generation of superoxide anion by equine spermatozoa as detected by dihydroethidium[J]. *Theriogenology* **2007**, 67(3):580-589.
- [126] Cai S., Qi C., Li Y., et al. PtCo bimetallic nanoparticles with high oxidase-like catalytic activity and their applications for magnetic-enhanced colorimetric biosensing[J]. *J. Mater. Chem. B* **2016**, 4(10):1869-1877.
- [127] Wang Z., Zhang Y., Ju E., et al. Biomimetic nanoflowers by self-assembly of nanozymes to induce intracellular oxidative damage against hypoxic tumors[J]. *Nat. Commun.* **2018**, 9:3334.

- [128] Fang J., Zhang Y., Zhou Y., et al. In-situ formation of supported Au nanoparticles in hierarchical yolk-shell CeO<sub>2</sub>/mSiO<sub>2</sub> structures as highly reactive and sinter-resistant catalysts[J]. *J. Colloid Interface Sci* **2017**, 488:196-206.
- [129] Chen C., Wu Q., Chen F., et al. Aluminium-rich Beta zeolite-supported platinum nanoparticles for the low-temperature catalytic removal of toluene[J]. *J. Mater. Chem. A* **2015**, 3(10):5556-5562.
- [130] Gorini S., Angelis A., Berrino L., et al. Chemotherapeutic drugs and mitochondrial dysfunction: focus on doxorubicin, trastuzumab, and sunitinib[J]. *Oxid. Med. Cell. Longevity* **2018**, 2018:7582730.
- [131] Meng L., Zhang X., Lu Q., et al. Single walled carbon nanotubes as drug delivery vehicles: Targeting doxorubicin to tumors[J]. *Biomaterials* **2012**, 33(6):1689-1698.
- [132] Lammers T., Peschke P., Kuhnlein R., et al. Effect of intratumoral injection on the biodistribution and the therapeutic potential of HPMA copolymer-based drug delivery systems[J]. *Neoplasia* **2006**, 8(10):788-795.
- [133] Goins B., Phillips W.T., Bao A., Strategies for improving the intratumoral distribution of liposomal drugs in cancer therapy[J]. *Expert Opin. Drug Delivery* **2016**, 13(6):873-889.
- [134] Zhan K., Wang L., Chen Z., et al. Intravascular photoacoustic and autofluorescence imaging for detecting intraplaque hemorrhage: a feasibility study[J]. *IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron.* **2020**, 11(99):1-9.
- [135] Zhao Y., Yu S., Zhu L., et al. A light-adjustable hand-held probe for photoacoustic tomography in vivo[J]. *IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron.* **2021**, 27(4):1-11.
- [136] Wang X., Zhong X., Bai L., et al. Ultrafine titanium monoxide (TiO<sub>1+x</sub>) nanorods for enhanced sonodynamic therapy[J]. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, 142(14):6527-6537.
- [137] Zheng Y., Liu Y., Wei F., et al. Functionalized g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> nanosheets for potential use in magnetic resonance imaging-guided sonodynamic and nitric oxide combination therapy[J]. *Acta Biomater.* **2020**, 121:592-604.
- [138] Dong H., Pang L., Cong H., et al. Application and design of esterase-responsive nanoparticles for cancer therapy[J]. *Drug Delivery* **2019**, 26(1):416-432.
- [139] Wang D., Chen D. B., Ji L., et al. Precise magnetic resonance imaging-guided sonodynamic therapy for drug-resistant bacterial deep infection[J]. *Biomaterials* **2020**, 264:120386.
- [140] Xu J., Shi R., Chen G., et al. All-In-One Theranostic nanomedicine with ultrabright second near-Infrared emission for tumor-modulated bioimaging and chemodynamic/ photodynamic therapy[J]. *ACS Nano* **2020**, 14(8):9613-9625.

- [141] Wen M., Ouyang J., Wei C., et al. Artificial enzyme catalyzed cascade reactions: antitumor immunotherapy reinforced by NIR-II light[J]. *Angew. Chem.* **2019**, 48(58):17425-17432.
- [142] Chang M.Y., Wang M., Wang M. F., et al. A multifunctional cascade bioreactor based on hollow-structured  $\text{Cu}_2\text{MoS}_4$  for synergetic cancer chemo-dynamic therapy/ starvation therapy/ phototherapy/ immunotherapy with remarkably enhanced efficacy[J]. *Adv. Mater.* **2019**, 31(51):1905271
- [143] Liang R., Chen Y., Huo M., et al. Sequential catalytic nanomedicine augments synergistic chemodrug and chemodynamic cancer therapy[J]. *Nanoscale Horiz.* **2019**, 4(4):890-901.
- [144] Yang M., Li J., Gu P., et al. The application of nanoparticles in cancer immunotherapy: targeting tumor microenvironment[J]. *Bioact. Mater.* **2021**, 6(7): 1973-1987.
- [145] Bing J., Demin D., Lizeng G., et al. Standardized assays for determining the catalytic activity and kinetics of peroxidase-like nanozymes[J]. *Nat. Protoc.* **2018**, 7(13): 1506-1520.
- [146] Kurikka V. P., et al. ChemInform abstract: sonochemical preparation and size-dependent properties of nanostructured  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  Particles[J]. *J. Cheminf.* **2010**, 12:198-215.
- [147] Jnaneshwara D. M., Avadhani D. N., Prasad B. D., et al. Electron paramagnetic resonance, magnetic and electrical properties of  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  nanoparticles[J]. *J. Magn. Magn. Mater.* **2013**, 339:40-45.
- [148] Wei Z., Zou H., Liu G., et al. Peroxidase-mimicking evodiamine/indocyanine green nanoliposomes for multimodal imaging-guided theranostics for oral squamous cell carcinoma[J]. *Bioact. Mater.* **2021**, 6(7):2144-2157.
- [149] Sharma R., Kreisel A., Sulangi M. A., et al. Multi-atom quasiparticle scattering interference for superconductor energy gap symmetry determination[J]. *Quantum Mater.* **2020**, 1(6):7.
- [150] Hejazi I., Hajalizadeh B., Seyfi J., et al. Role of nanoparticles in phase separation and final morphology of superhydrophobic polypropylene/zinc oxide nanocomposite surfaces[J]. *Appl. Surf. Sci.* **2014**, 293:116-123.
- [151] Bhattacharyya S., Kudgus R. A., Bhattacharya R., et al. Inorganic nanoparticles in cancer therapy[J]. *Pharm. Res.* **2011**, 28(2):237.
- [152] Tarokh A., Pebdeni A. B., Othman H. O., et al. Sensitive colorimetric aptasensor based on  $\text{g-C}_3\text{N}_4 @ \text{Cu}_2\text{O}$  composites for detection of *Salmonella typhimurium* in food and water[J]. *Nat. Commun.* **2021**, 188(3):87.
- [153] Yang S., Zhao H., et al. Selectively potentiating hypoxia levels by combretastatin A4 nanomedicine: toward highly enhanced hypoxia-activated prodrug tirapazamine therapy for metastatic tumors[J]. *Adv. Mater.* **2019**, 11(31):1805955.

- [154] Comijn J., Berx G., Vermassen P., et al. The two-handed e box binding zincfinger protein SIP1 downregulates E-Cadherin and induces invasion[J]. *Molecular Cell* **2001**, 7(6):1267-1278.
- [155] Brahmer J. R., Tykodi S. S., Chow L. Q. M., et al. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer[J]. *Int. J. Urol.* **2012**, 188(6):2148-2149.
- [156] Liu J., Hu X., Hou S., et al. Screening of inhibitors for oxidase mimics of Au@Pt nanorods by catalytic oxidation of OPD[J]. *Chem. Commun.* **2011**, 47(39):10981-10983.

## 博士期间科研成果

1. **Shiyan Fu**, RuihaoYang, Lei Zhang, Weiwei Liu, Guangyuan Du, Yang Cao, Zhigang Xua, Hongjuan Cui, Yuejun Kang\*, Peng Xue\*. Biomimetic CoO@AuPt Nanozyme Responsive to Multiple Tumor Microenvironmental Clues for Augmenting Chemodynamic Therapy. **Biomaterials** **2020**, 257:120279.(IF=**10.317**)
2. **Shiyan Fu**, RuihaoYang, Junjie Ren, Jiahui Liu, Lei Zhang, Zhigang Xu, Yuejun Kang\*, Peng Xue\*. Catalytically active CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> nanoflowers for augmented sonodynamic and chemodynamic combination therapy with elicitation of robust immune response. **ACS nano** **2021**, (Revision)
3. Ruihao Yang, **Shiyan Fu**, Ruidong Li, Lei Zhang, Zhigang Xu, Yang Cao, Hongjuan Cui, Yuejun Kang, Peng Xue\*. “Facile Engineering of Silk Fibroin Capped AuPt Bimetallic Nanozyme Responsive to Tumor Microenvironmental Factors for Enhanced Nanocatalytic Therapy”. **Theranostics** **2021**, 11:107-116.(IF=**8.579**)

### 申报专利

[1] 薛鹏、傅仕艳、康跃军、张蕾，具有类生物酶活性的中空氧化钴@金铂纳米球的制备方法，专利号：201911210641

### 科研创新项目

重庆市研究生科研创新项目（项目负责人）

项目名称：人工纳米酶介导的声动力疗法用于治疗乳腺癌

项目编号：CYB20095



## 致 谢

三年前，带着一个月的宝宝我来到西大报道。在这片土地上，经历着初为人母的喜悦，经历着奋斗的充实，经历着人间百态，也经历着始终的坚持。感谢西大，给我再次成长的机会。

在这段愉快地求学生涯中，感谢恩师康跃军教授和薛鹏副教授。感谢康跃军老师给了我来西南大学深造的机会，并且在学习和生活中给予我的关怀和指导。感谢两位老师在实验和论文写作上对我的辛勤指导。康跃军老师亲切柔和、兢兢业业、朴实儒雅，始终教导我们自律、上进和坚持梦想等，三年前能作为老师的学生再次深造，我深感荣幸，毕业之际我带着硕果即将离开，满心感恩。老师对我最重要的教导不是几篇 SCI，是潜移默化的让我学到了如何做人、做事、提升自身修养。慢慢的，我对生活有了更加平实的态度，对科学研究也更加热爱。我很幸运，再次感谢老师在我人生道路上给予的引导，往后的我会继续努力，脚踏实地努力不断进步。薛鹏老师诲人不倦、尽心尽力、亦师亦友，一直督促着我们的学习积极性，如果没有老师的监督和付出，也不会有我的顺利毕业，能遇见两位老师，我何其幸运！祝愿老师们身体健康，事事如意，成果不断！

感谢课题组的孙利红、李倩、杨瑞昊、侯猛猛、高雅师姐、刘佳慧、任俊洁、焦晓丹、周志毫、余宏练、李永灿、何梦婷、赵印民、黄建森、汪杰和梁洁对我学习生活上的帮助，谢谢你们让我感受到了实验室的温馨。感谢西南大学材料与能源学院所有授课老师，感谢学院所有大型仪器的测试同学，谢谢你们的无私付出。

感谢我的爸爸妈妈对我的培育之恩，感谢郭旭先生对我的支持和爱护，感谢郭瀚泽小宝宝的到来，未来我们一起学习和成长。感谢我的哥嫂的关心和帮助，唯愿你们身体健康康、平平安安。

感谢西大，感谢这片土地上这些可爱的人们。

傅仕艳

2021年5月