纳米生物催化的研究现状和发展态势

高利增¹, 魏辉², 曲晓刚^{3*}

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

2. 南京大学现代工程与应用科学学院, 生物医学工程系, 南京 210093;

3. 中国科学院长春应用化学研究所, 稀土资源利用国家重点实验室, 化学生物学实验室, 长春 130022

* 联系人, E-mail: xqu@ciac.ac.cn

收稿日期: 2020-02-26; 接受日期: 2020-04-27; 网络版发表日期: 2020-06-29

国家自然科学基金(批准号: L1724022)资助

摘要 纳米生物催化领域包括: (i) 利用纳米技术或纳米材料调控生物催化剂的效率; (ii) 直接利用纳米材料或技术实现生物催化功能, 并拓展生物催化在非友好环境及疾病诊疗中的应用. 纳米生物催化已成为纳米生物学重要的研究领域, 主要涉及纳米载体固定化酶和纳米材料人工模拟酶(纳米酶). 一方面, 可以借助纳米技术或材料所具有的特殊纳米效应来增强生物催化剂的效率和稳定性. 另一方面, 从模拟酶的理念出发, 借助纳米材料自身所具有的催化能力, 直接实现对生化反应的催化, 这类具有酶学特性的纳米酶被视为新一代人工模拟酶. 近年来, 基于纳米载体固定化酶和纳米酶技术的纳米生物催化已在疾病诊断和治疗、化工制药、环境处理等领域得到了广泛研究, 并展示了其具有重要的应用价值. 本文简要综述了纳米载体固定化酶和纳米酶的发展历程及应用进展.

关键词 纳米生物催化, 酶, 纳米技术, 固定化酶, 人工模拟酶, 纳米酶

生命活动和机体代谢过程都是通过生物催化来完成的, 其中主要是酶催化的各种生化反应. 酶催化所具备的高效性、选择性和协同性保障了生理代谢通路的高效和有序. 酶分子具有精巧的三维结构, 大小为几纳米到几十纳米之间, 属于纳米尺度空间. 更为重要的是, 酶分子在有机体内(细胞或细菌内)工作的微环境同样是纳米尺度空间. 酶分子所处的微环境包含多种纳米尺度的分子, 如信号蛋白、DNA、RNA 及其组装体等, 酶分子之间或与其他蛋白质协同组装成分子机器, 协同完成多种生化反应. 这些生物催化不仅表明起催化作用的酶分子本身就具有纳米尺度特征, 而且其催化功能还受到纳米尺度因素的影响.

而纳米技术和纳米材料着眼于从纳米尺度设计、改造以及提升材料的性能和功能, 所以纳米技术与生物催化具有很好的交叉空间, 已成为纳米生物学的重要研究领域.

目前国际上对纳米生物催化尚未有一个清晰的概念和界定^[1-4]. 根据近年来该领域发展现状, 本文提出的纳米生物催化是指: (i) 利用纳米技术或纳米材料调控生物催化剂的效率; (ii) 直接利用纳米材料或技术实现生物催化功能, 并拓展生物催化在非友好环境及疾病诊疗中的应用. 一方面, 可以借助纳米技术或材料所具有的特殊纳米效应来增强生物催化剂的效率和稳定性^[5], 比较常见的是将天然酶组装到纳米体系

引用格式: 高利增, 魏辉, 曲晓刚. 纳米生物催化的研究现状和发展态势. 中国科学: 生命科学, 2020, 50: 682–697

Gao L Z, Wei H, Qu X G. Current developments and trends in nanobiocatalysis (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2020, 50: 682–697, doi: 10.1360/SSV-2020-0070

内, 这类工作多见于纳米生物催化领域的早期研究. 另一方面, 从模拟酶的理念出发, 借助纳米材料自身所具有的催化能力, 直接实现对生化反应的催化, 这种纳米材料从化学角度可以被看作纳米催化剂, 从酶学角度可以被看作人工模拟酶, 目前纳米酶是这一方向的研究热点^[6].

为什么需要纳米生物催化呢? 基于目前对生物医学知识的了解, 许多生理、病理过程都与生物催化尤其是酶催化相关, 比如糖酵解通路中己糖激酶缺乏导致溶血症状, 出现黄疸、慢性贫血及肝脾肿大; 而髓过氧化物酶活性强弱则与胃肠道恶性肿瘤发病相关. 但是目前直接采用生物酶来治疗疾病的方法却非常少, 主要原因是大部分酶的主要成分是蛋白质, 其稳定性差, 在体外或体内应用时对环境依赖性高. 环境变化(如温度、pH、离子强度)或复杂环境(如血液或器官内)极易导致蛋白结构破坏、蛋白降解从而失去活性. 除少数稳定性较好的酶外, 多数生物酶无法直接在体外或体内应用. 因此, 需要开发能够提高生物酶稳定性的方法, 或者开发人工模拟酶直接取代生物酶. 纳米生物催化研究内容正是针对这些问题, 主要包括纳米载体固定化酶和纳米酶, 前者能够有效提高生物酶的稳定性, 后者能够模拟酶的活性而且具有极高的稳定性. 所以借助纳米生物催化技术可以充分发挥酶催化高效、高选择性等优势, 同时又能解决其稳定性问题.

目前纳米生物催化应用受到越来越多的关注. 早期的纳米生物催化研究更多的集中在固定化酶方面, 将生物酶组装固定到纳米材料表面, 或者将其包裹于纳米材料内, 主要目的是提高酶的稳定性. 这些固定化酶应用主要集中在体外, 包括疾病诊断、制药、去污等. 近年来, 纳米生物催化的体内应用越来越多, 一方面可以利用纳米载体将酶导入体内实现对生化反应的调控, 另一方面具有酶活性的纳米材料也可以直接进入生物体内催化生化反应. 这些体内应用研究在疾病治疗方面展现出了巨大的应用前景, 尤其是围绕纳米酶开展的疾病疗法进入快速发展阶段, 对多种重大疾病, 如肿瘤、传染病、心血管疾病、老年神经疾病等均具有改善或治疗效果. 本文总结了近15年来纳米载体固定化酶和纳米酶的发展历程及应用的研究进展.

1 纳米载体固定化酶

1.1 固定化酶与纳米载体

天然酶无论在生物体内还是在工业生产中都起着十分重要的作用. 然而, 天然酶价格昂贵、稳定性差, 酶催化反应通常是在水溶液中进行, 难以与底物分离、回收和再利用. 为了解决这些问题, 德国科学家Grubhofer和Schleith^[7]在1953年提出了固定化酶的概念. 固定化酶是指通过化学或物理的手段, 将酶固定在一定区域内, 让酶分子仅在此区域内发挥催化作用. 固定化酶使得酶分子易于分离, 这样就克服了水相反应中酶无法回收利用的缺点. 自20世纪60年代以来, 固定化酶的研究取得了许多重要进展. 固定化酶不仅能提高酶的利用效率, 而且有望使生产工艺易于自动化, 从而节约能源、提高效率^[8]. 依据载体材料的不同组成, 可用于固定化酶的载体有无机载体、有机载体和复合载体等. 近年来, 随着纳米技术的发展, 纳米材料越来越多地被用于酶的固定化. 纳米材料作为酶的新型载体, 具有生物相容性好、比表面积大、利于扩散传质、酶负载量高及稳定性好等优点^[9].

1.2 纳米载体固定化酶发展状况

2000年以前, 纳米领域的发展还不够成熟, 研究者们大多用聚合物作为纳米载体用于酶的固定化. 例如1996年, Daubresse等人^[10]通过反相微乳聚合制备共聚物胶体纳米颗粒, 用于包裹碱性磷酸酶, 固定化后的酶性质没有发生变化. 同年, Gaspar团队^[11]将超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)固定在聚异丁基氨基丙烯酸酯纳米颗粒上, 发现pH会对整体酶活性造成影响. 2000年左右, 越来越多的人开始研究纳米载体, 材料的种类也不再局限于聚合物. 2003年, Chen团队^[12]利用碳二亚胺为缩合剂将脂肪酶固定化到四氧化三铁纳米粒子上. 2006年, Balkus团队^[13]较早提出使用金属有机框架(metal-organic framework, MOF)作为固定化酶的载体. 2007年, 谭蔚泓团队^[14]将二氧化硅纳米颗粒作为几种常见酶的固定化载体, 形成的固定化酶在有机相中的稳定性有明显提高. 近几年纳米技术的日益成熟, 也大大推动了纳米载体固定化酶领域的发展, 成为纳米生物催化领域中的研究热点.

1.3 纳米载体固定化酶的类型

按照酶与纳米载体结合的方式, 固定化方法可分为吸附法、包埋法和共价偶联法三种^[3]。吸附法是将纳米载体(如纳米颗粒等)与含有所需酶溶液直接混合, 在合适条件下纳米载体可以通过静电等作用将酶分子吸附到纳米载体表面^[3]。包埋法, 顾名思义就是将酶包埋在特定载体中, 如可以将酶与聚合物单体混合, 进而通过单体聚合就可以把酶分子固定到聚合物中^[3]。共价结合法是利用酶分子的氨基酸残基所含的氨基、羧基或羟基等官能团, 与纳米载体相互补的官能团之间形成共价键来实现酶的固定化^[3]。

按照纳米载体材料的性质大致可将其分为: 金属、无机非金属、有机和复合物纳米载体^[3]。其中, 金属纳米载体包括金属单质、金属合金、金属氧化物、金属硫化物等。无机非金属纳米载体包括硅纳米材料、碳纳米材料等。有机纳米载体包括各种聚合物材料。与单一的纳米载体相比较, 纳米复合材料载体具有多种性能, 因而在保持酶活和增强酶的稳定性等方面有一定的优势。

化学修饰电极是纳米载体固定化酶的一个代表性应用: 用纳米粒子修饰电极, 并将酶固定在电极表面上制成酶电极, 从而进行生化分析检测。董绍俊团队在此领域开展了系统性研究工作, 发展了从化学修饰到自组装的研究策略, 围绕化学修饰电极、自组装、表征、理论和应用等方面展开研究, 开拓了界面修饰、自组装和表征方法; 在国内最早开展光透光谱电化学原位表征技术和方法研究, 建立了化学修饰电极电催化理论和方法, 发展了化学修饰电极的功能和应用。2002年, 她们通过金纳米颗粒自组装在3D的 γ -甲基丙烯酰氧丙基三甲氧基硅烷(γ -mercaptopropyltrimethoxysilane, MPTMS)溶胶-凝胶网络中制作成电极, 将辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)固定在电极上, 可以用作生物传感器, 用于过氧化氢的灵敏检测, 检测范围为 $5.0 \mu\text{mol/L} \sim 10 \text{ mmol/L}$, 检测下限为 $2.0 \mu\text{mol/L}$ 。

1.4 纳米载体固定化酶领域相关论文和专利

纳米载体固定化酶作为研究热点, 相关的学术研究论文层出不穷。从图1可以看出, 自2003年以来, 该领域文献产出增长明显, 发文量一直呈快速增长态势。

图1 纳米载体固定化酶领域研究论文的年度变化趋势 (web of science检索, 检索关键词: nano*+immobiliz*+enzyme*)
Figure 1 Number of published papers in the field of enzyme immobilization on nanocarriers. (The data is from web of science using keywords: nano*+immobiliz*+enzyme*)

2003年发文量为69篇, 2018年发文量达1023篇, 发文量增长了约14倍。图2显示了该领域发表研究论文前30位的国家(地区)分布情况。可以看出, 中国在该领域占有绝对优势, 第2~10名分别为: 美国、印度、韩国、日本、德国、伊朗、土耳其、西班牙、巴西。

纳米载体固定化酶领域发表论文量最多的前30种期刊中, 前5种期刊分别是: *Biosensors and Bioelectronics*(1021篇)、*Sensors and Actuators B: Chemical*(280篇)、*Talanta*(230篇)、*Analytical Chemistry*(205篇)、*Analytica Chimica Acta*(186篇)。可以看出, 国产期刊还有很大的提升空间。

除了学术、学位论文, 国内外相关专利也有很多。在ISI Derwent Innovations Index(DII)数据库中, 仅检索到17条专利文献(检索关键词: nano*+immobiliz*+enzyme*)。若采用谷歌学术(检索关键词: nano*+“immobilization* enzyme”或nano*+“enzyme immobilization”), 可检索到英文专利1600余项; 采用百度学术, 可检索到中文专利1170余项(检索关键词: 酶+纳米+固定化, 酶+纳米+固定, 酶+纳米+固载, 酶+纳米+负载, 酶+纳米+载体)。

1.5 纳米载体固定化酶主要研究机构与资助状况

全球纳米载体固定化酶领域发表论文前20位的研究机构中, 中国11家, 印度3家, 法国、美国、西班牙、韩国、巴西、俄罗斯各1家, 可见机构研究力量已经分布于全球。发文量排名前5位的机构依次是中国科学院、法国国家科学研究中心、北京化工大学、南京大

图 2 纳米载体固定化酶领域研究论文国家(地区)分布图(web of science检索, 检索关键词: nano*+immobiliz*+enzyme*)(注: 灰色为台湾地区所占份额)

Figure 2 Number of published papers versus countries (regions) of the publications in the field of enzyme immobilization on nanocarriers. (The data is from web of science using keywords: nano*+immobiliz*+enzyme*) (Note, Taiwan in grey)

学、印度智者达耶难陀大学。

从全球纳米载体固定化酶领域前30国家(地区)对该领域的资助情况可以看出, 纳米载体固定化酶得到了全世界各个国家(地区)相关机构的大力支持。中国的相关研究得到了国家自然科学基金、国家重大基础研究计划(973计划)、国家重点研发计划、中央高校基本科研专项资金、博士后基金、省部级及其他地方基金等的大力支持。美国在该领域的研究得到了美国国家科学基金会、美国国立卫生研究院、美国国立环境卫生研究所、美国能源部、美国国防部、美国空军研究实验室等的支持。其他国家和地区也均得到了各自国家(中央政府)的支持。

2 仿生纳米生物催化——纳米酶

2.1 纳米酶的定义与内涵

天然酶作为性能优异的生物催化剂, 具有催化效率高、底物专一性好、反应条件温和等优点, 因而在生物分析与检测、生命医学等研究领域有着非常广泛的应用。但是在实际使用中, 人们发现天然酶有着一些不可弥补的内在缺点: (i) 其催化活性依赖于蛋白分子的三维结构, 因此当周围环境变化时, 天然酶极易发生构象改变从而变性失活; (ii) 天然酶易被蛋白酶或微生物、细胞降解导致失活; (iii) 目前天然酶的制备

提纯成本仍然较高, 限制了其在生命医学和工业的进一步应用^[15-17]。

仿生体现了人类的智慧和创造力。为了弥补上述天然酶的这些缺点, 研究人员一直在努力利用仿生策略寻找各类天然酶的替代品, 即人工酶(artificial enzymes)^[18]。然而, 目前绝大多数人工酶的催化活性还比较低, 且制备也较复杂。因此, 如何提高人工酶的催化效率, 并发展更为可控高效的制备技术是该领域的核心与瓶颈问题, 也是许多研究者的愿望。

在这样的研究背景下, “纳米酶(nanozymes)”应运而生。纳米酶是指自身具有酶学特性的纳米材料, 是一种特殊的纳米效应, 它能够在生理条件下催化天然酶所介导的生化反应, 表现出酶所具有的反应动力学和催化机制^[19]。2007年, 阎锡蕴研究员团队在国际上报道了首例基于四氧化三铁纳米颗粒(Fe_3O_4 NPs)的无机纳米材料本身具有内在类似过氧化物酶(peroxidase)的催化活性^[20], 从酶学角度系统地研究了最适反应条件、酶促反应动力学和催化机制, 建立了系统表征纳米酶催化活性的方法, 并取代天然酶应用于疾病的快速诊断^[19]。这一原创性的发现改变了人们对于纳米材料生物惰性的传统认知。随后, 国内外许多实验室也陆续发现其他多种纳米材料具有类酶活性。2013年, 汪尔康研究员团队^[21]以纳米酶为题发表长篇综述文章。从此, 纳米酶作为新一代人工模拟酶, 引起了学术

界广泛关注^[22].

2.2 从人工酶到纳米酶

酶是活细胞产生的一类具有催化活性的生物分子(绝大多数为蛋白质). 德国科学家Wilhelm Kuhne早在1877年便将这类分子命名为“酶”, 但一直不知道是什么物质. 后来, 美国科学家James B. Sumner将鉴定出尿素酶为一种蛋白质^[19]. 天然酶催化效率虽然非常高, 但是具有稳定性差、成本高等缺点, 无法满足实际应用. 为了克服天然酶的缺点, 科学家尝试合成化合物来模拟天然酶的功能. 1970年, 在前期探索的基础上, 模拟酶一词被Ronald Breslow提出. 与天然酶相比, 模拟酶具有易于制备、成本低、稳定性高等优点. 迄今为止, 已有诸如有机小分子、高分子、超分子等多种材料被用于模拟各类天然酶.

随着纳米技术的发展, 纳米材料具有类酶催化的现象自1993年以来就偶有报道, 但是因为缺乏系统研究一直没有引起广泛关注. 直到2007年, 阎锡蕴团队报道了首例无机纳米材料本身具有类酶催化的活性. 自此以来, 纳米酶研究在全球范围内引起了生物学家、化学家、材料学家及医学家等研究者的极大兴趣和广泛关注. 之后众多科研工作者进一步开发新型纳米酶并拓展其在生物、医学、农业、环境治理、国防安全等诸多领域的应用(图3).

回顾纳米酶的发展历史, 可以发现纳米酶的研究呈现如下特点: (i) 具有酶活性的材料越来越多地被挖掘; (ii) 能够模拟的天然酶的种类主要是氧化还原酶类和水解酶类; (iii) 能够调控纳米酶的活性方法也取得了长足的进展; (iv) 纳米酶的应用领域越来越广泛, 机理研究越来越深入.

2.3 纳米酶的种类及机制

纳米酶的出现改变了人们的传统观念, 正如德国科学家Wolfgang Tremel教授^[23]撰写的综述文章所指出的那样, 纳米酶属于纳米材料自身所蕴含的生物效应. 这不仅让人们纳米材料的生物学特性有了更深入的认识, 打破了无机/有机、生命/非生命的界限, 还突破了基于传统化学合成人工模拟酶的思路^[19].

纳米酶因为材料本身可能具备多种类酶活性, 一方面可加以利用, 另一方面则需要加以规避, 使得在应用中不产生其他干扰即提高特异性. 在实现纳米酶

的较高催化特异性方面, 迄今为止, 研究人员发展了三种可以实现纳米酶较高催化特异性的技术. (i) 在纳米颗粒表面修饰有生物识别性能的单层膜. 如Scri-min团队^[24,25]在金纳米颗粒表面修饰了能同时结合催化剂和底物的单层膜, 实现了对酯键的特异性剪切. 然而这种方法受限于单层膜的种类, 目前基于此方法的纳米酶绝大多数仍只是实现了对特定酯键的水解. (ii) Liu团队^[26]最近利用分子印迹聚合物包埋纳米酶的技术, 使得纳米酶对其底物的催化选择性得到了显著提升. 该方法具有一定普适性, 可用于基于 Fe_3O_4 NPs, AuNPs, CeO_2 NPs等纳米酶的催化特异性调控. (iii) 可以将纳米酶和天然酶相结合, 实现对目标分子的特异识别和催化^[27]. 如若将葡萄糖氧化酶(glucose oxidase, GOx)和类过氧化物酶的纳米酶相偶联, 则能实现对葡萄糖的高选择性检测. 这种方法具有一定的普适性, 可以推广至其他天然酶. 以上三种方法为建立高效生物分析检测方法等应用奠定了基础.

纳米酶从材料上可以分为四大类: 金属材料、金属氧化物材料、碳基材料和其他材料. 目前关于纳米酶的催化机制研究取得了一些进展, 研究较为深入的是氧化还原酶类, 包括过氧化物酶、氧化酶、过氧化氢酶和超氧化物歧化酶.

(1) 金属纳米酶. 目前, 金属纳米酶材料以贵金属为主, 包括金、银、铂、钯等以及有这些金属组合的双金属材料. 人们对金属材料纳米酶活性的催化机制研究较为深入^[28], 主要以Au(111)面所具有的氧化酶、过氧化物酶、过氧化氢酶和超氧化物歧化酶活性为主, 包括 H_2O_2 , O_2 和 O_2^- 在Au(111)面的吸附、分解反应等^[29,30]; 并发现其他贵金属如Ag、Pt和Pd的(111)面, 以及这些贵金属不同比例的合金(AuAg, AuPd, AuPt等)的(111)面表现出相似的催化分子机制和决速步骤.

(2) 金属氧化物纳米酶. 基于金属氧化物的纳米酶(如四氧化三铁、二氧化铈、四氧化三钴等), 以过渡金属氧化物为主, 大多数存在两种不同催化机制, 包括芬顿(Fenton)反应机制^[31]和电荷转移机制^[32], 表现出多种类酶催化活性. 以 CeO_2 为例, Self和其他课题组的研究表明, CeO_2 NPs之所以能够保护细胞是因为其具有清除自由基的能力, 这一点证明 CeO_2 NPs具有类SOD酶的活性, 催化活性与颗粒尺寸大小和颗粒表面铈的价态($\text{Ce}^{3+}/\text{Ce}^{4+}$)密切相关^[33-35]. 此外, 通过掺杂其

图 3 纳米酶简要发展历程(作为参考, 同时标注了天然酶及其他模拟酶重要发展历程)(网络版彩图)

Figure 3 A brief timeline for the development of nanozymes (natural enzymes and artificial enzymes are listed for comparison)(color online)

他元素(比如Mn)还可以调控CeO₂ NPs的催化活性^[36]. 对于CeO₂ NPs的类过氧化氢酶活性研究在实验和理论方面也都有相关报道^[37~39]. 研究发现, CeO₂ NPs亦具有水解酶的催化活性. 如具有磷酸酶的催化活性, 能够催化水解含有磷脂键的小分子(如para-Nitrophenylphosphate, pNPP). 通过第一性原理计算表明, 该水解反应遵循S_N2反应机制^[40]. 阎锡蕴及合作者研究表明, 氧化铁纳米酶的催化遵循米氏方程, 其催化为乒乓机制. 进一步的实验研究表明, 氧化铁纳米颗粒模拟过氧化物酶的催化反应, 涉及羟基自由基等可能的机制^[41].

(3) 碳纳米酶. 碳纳米材料模拟酶也引起了研究者的广泛兴趣. 石墨烯氧化物^[42~44]、碳纳米管^[45,46]、富勒烯的羧基化衍生物^[47]等都被发现具有过氧化物酶活性. Qu团队^[48]通过巧妙选择反应试剂将石墨烯氧化物中特定的含氧官能团失活, 系统研究了这些含氧官能团在类酶催化过程中的作用. 研究发现, 石墨烯氧化物中底物结合位点是石墨烯结构中的羧基, 催化位点是羰基, 而羟基可抑制酶活性. Gao团队^[49]用第一性原理方法计算研究了碳纳米材料的类过氧化物酶催化机制. 计算结果表明, 该催化循环分为两部分: 首先, H₂O₂在羧基的作用下分解产生羟基自由基; 其次, 底

物TMB被第一步产生的羟基自由基氧化而生成有颜色的产物TMB_{ox}.

(4) 其他纳米酶. 其他各种纳米材料(如普鲁士蓝、MOF等)被用来模拟各类天然酶. 其相应的催化机制也有较为深入的研究. 如Gu团队^[50]较为系统地研究了普鲁士蓝的多酶活性, 发现其催化活性与氧化还原电位密切相关. 而MOF材料的模拟酶性质则与其连接金属及配体密切相关. Wei团队发现, 基于卟啉结构的MOF, 其模拟过氧化物酶的催化活性主要来自于金属化的卟啉而非连接的金属原子, 多种单原子纳米酶也能够实现类似的催化活性^[51~56].

2.4 纳米酶领域论文和专利

如今纳米酶的相关研究工作已经进入第13个年头, 纳米酶目前已经在检测、诊断、治疗等领域展示出独特的魅力, 论文产出呈现指数型增长(图4). 此外, 也有不少的专利产出. 由此可见, 纳米酶的影响力正在与日俱增, 其广阔的应用前景和值得深入探究的催化机制也吸引着越来越多的科研工作者投身其中. 值得一提的是, 2007年, 阎锡蕴院士团队发表在*Nature Nanotechnology*的文章已被引用约1900次. 在过去的10多

图 4 纳米酶及相关领域研究论文数量变化趋势. (web of science检索, 检索关键词: “nanozymes” or “nanozyme” or “nano* peroxidase-like” or “nano* peroxidase mim*” or “nano* enzyme mim*” or “nanoenzym*” or “nano* catalase-like” or “nano* catalase mim*” or “nano* oxidase-like” or “nano* oxidase mim*” or “nano* SOD-like” or “nano* SOD mim*” or “nano* superoxide dismutase-like” or “nano* superoxide dismutase mim*” or “nano* artificial enzym*”)

Figure 4 Number of published papers in the field of nanozymes. (The data is from web of science using the keywords including “nanozymes” or “nanozyme” or “nano* peroxidase-like” or “nano* peroxidase mim*” or “nano* enzyme mim*” or “nanoenzym*” or “nano* catalase-like” or “nano* catalase mim*” or “nano* oxidase-like” or “nano* oxidase mim*” or “nano* SOD-like” or “nano* SOD mim*” or “nano* superoxide dismutase-like” or “nano* superoxide dismutase mim*” or “nano* artificial enzym*”)

年间,“纳米酶”作为新名词已被收入教科书,多个杂志设立了“纳米酶”专栏,施普林格(Springer)出版集团邀请中国科学家编写*Nanozymology*英文专著已于2020年3月正式出版.

纳米酶及相关领域发表论文章数最多的前30种期刊中,前5种期刊分别是: *Biosensors and Bioelectronics* (666篇)、*Biomaterials* (258篇)、*Small* (242篇)、*Chemical Communications* (230篇)、*Sensors and Actuators B Chemical* (202篇). 可以看出,国产期刊应加强对这个领域的关注.

2.5 纳米酶相关主要研究机构与资助状况

全球目前有来自中国、美国、英国、德国、法国、日本、意大利、加拿大、以色列、俄国、韩国、印度等30多个国家350余课题组从事纳米酶的研究(图5),超过300多种不同材料和结构的纳米酶被发现和报道,纳米酶的应用研究也已经拓展到了生物、医学、农业、化工、环境治理和国防安全等多个领域,逐渐形成了具有多学科交叉特色的纳米酶研究新领域.

研究机构涉及中国科学院、南京大学、东南大学、清华大学、北京大学、复旦大学、浙江大学、苏州大学、斯坦福大学、加州大学、华盛顿州立大学、密歇根大学、莱斯大学、IBM研究院、美国国立卫生研究院、伦敦大学、新加坡国立大学、南洋理工大学、莫斯科国立大学、国立首尔大学、韩国科学技术学院、马克斯普朗克聚合物研究所、滑铁卢大学、台湾大学等国内外知名高校和研究所. 人才队伍涉及院士、杰青、青千、优青等不同层次、不同年龄的梯队. 已经在*Nature*, *Science*, *Nature Nanotechnology*, *Proc Natl Acad Sci USA*, *Journal of the American Chemical Society*, *Angewandte Chemie International Edition*, *Advanced Materials*, *ACS Nano*, *Chemical Science*, *Biomaterials*, *Analytic Chemistry*等高水平期刊发表众多论文,且多篇文章为高引用论文并获得专题报道,产生了较为广泛的影响. 纳米酶相关项目“纳米材料若干新功能的发现及应用”曾获2012年国家自然科学奖二等奖(主要完成人: 阎锡蕴、梁伟、汪尔康、顾宁、杨东玲).

从全球纳米酶及相关领域前30国家(地区)对该领域的资助情况可以看出,纳米载体固定化酶得到了全世界各个国家(地区)相关机构的大力支持. 中国的相关研究得到了国家自然科学基金、国家重大基础研究计划、国家重点研发计划、中央高校基本科研专项资金、博士后基金、省部级及其他地方基金等的大力支持. 2017年,国家科学技术部设立了纳米酶研究重大研发计划. 在国家重点研发专项“纳米计划”中,“铁基纳米材料类酶效应与急性髓系白血病诊疗技术”项目获得了立项,支持对铁基纳米酶的深入系统研究,建立纳米酶催化理论模型,指导新型纳米酶的设计和规模化可控制备,并应用于白血病诊疗新技术的开发. 美国在该领域的研究得到了美国国家科学基金会、美国国立卫生研究院、美国国防部、美国空军研究实验室等的支持. 其他国家和地区也均得到了各自国家(中央政府)的支持.

2.6 纳米酶领域国内外的的发展状况与趋势

纳米酶领域受到了广泛关注,越来越多的人接受纳米酶新概念. 纳米酶作为新一代人工酶,不仅具有催化效率高、稳定性好及功能多样化的特点;更重要的是,纳米酶是纳米尺度下自身所蕴含的生物效应.

图 5 纳米酶及相关领域研究论文国家(地区)分布图(web of science检索, 检索关键词: “nanozymes” or “nanozyme” or “nano* peroxidase-like” or “nano* peroxidase mim*” or “nano* enzyme mim*” or “nanoenzym*” or “nano* catalase-like” or “nano* catalase mim*” or “nano* oxidase-like” or “nano* oxidase mim*” or “nano* SOD-like” or “nano* SOD mim*” or “nano* superoxide dismutase-like” or “nano* superoxide dismutase mim*” or “nano* artificial enzym*”). (注: 灰色为台湾地区所占份额)

Figure 5 Number of published papers versus countries (regions) of the publications in the filed of nanozymes. (The data is from web of science using the keywords including “nanozymes” or “nanozyme” or “nano* peroxidase-like” or “nano* peroxidase mim*” or “nano* enzyme mim*” or “nanoenzym*” or “nano* catalase-like” or “nano* catalase mim*” or “nano* oxidase-like” or “nano* oxidase mim*” or “nano* SOD-like” or “nano* SOD mim*” or “nano* superoxide dismutase-like” or “nano* superoxide dismutase mim*” or “nano* artificial enzym*”) (Note, Taiwan in grey)

纳米酶的出现, 不仅是纳米生物学领域的新兴热点, 还将物理、化学和生物催化等多种特性集于一身, 围绕纳米酶的基础和应用研究均具有广阔的前景。

目前纳米酶的发展日益活跃, 众多国内外学者投入其中, 众多交叉领域的学者(生物、材料、物理、化学、医学、理论计算、临床医生)相互合作交流, 研究工作从分子层面的机理研究到调控优化开发新型的纳米酶再到生物、医学、环境治理等多个应用领域较为全面地开展。最近许多研究表明, 纳米酶具有调控活性氧(reactive oxygen species, ROS)的能力, 在氧化还原代谢类疾病、神经退行性疾病、心脑血管病和肿瘤等重大疾病上都表现出一定的治疗效果。有望开发出一种基于纳米酶催化的新型治疗策略。

纳米酶新概念经过10多年的发展已经在全球获得广泛认同。在这个新兴的纳米生物研究领域, 中国科学家所做的贡献和所获得的国际竞争力有目共睹。纳米酶的发现、概念提出和应用都是来自生物、化学、材料、物理和医学等多个领域交叉合作研究的成果, 是我国科学家跨学科研究的典范。美国高登会议和世界生命科学大会邀请多位中国科学家做纳米酶主题报告。近10年来, 中国科学家发表的纳米酶论文数量占比

高达70%, 其中高引用论文占比高达80%, 前10名均来自中国学者。第一篇综述性论文和第一本关于纳米酶的专著都来自中国学者。第一个基于纳米酶的检测医疗器械也即将问世。在纳米酶基础研究和成果转化应用研究方面, 中国科学家都居于领先地位。

从这10多年的发展可以看出, 纳米酶领域的研究主要呈现两种发展态势: (i) 纳米酶的学科内涵进一步丰富并加强。未来纳米酶的基础理论创新将会更多^[57], 将会更深入探索纳米酶催化的本质, 从随机发现逐渐向理性设计过渡, 将新的单原子催化、有机金属框架材料等方法和技术引入纳米酶设计, 不断丰富纳米酶的材料类型和活性类型, 精确控制催化活性位点结构和催化选择性, 为人工模拟酶注入新的活力。(ii) 纳米酶的转化应用进入快速发展阶段。纳米酶作为新材料具有催化活性高、稳定、经济以及多功能等特点, 目前在生物医学诊断和治疗、环境处理、化工等多个领域已经展示出潜在的应用前景。具有自主知识产权的纳米酶免疫层析医疗器械已经获得医疗器械注册证, 纳米酶试纸条作为首个纳米酶产品即将上市。同时多个纳米酶检测和分析国家标准开始制定和推出, 2019年8月30日首个国家标准《纳米技术 氧化铁

纳米颗粒类过氧化物酶活性测量方法》(GB/T 37966-2019)发布并开始实施, 为开发具有自主产权的纳米酶产品奠定了基础, 有望加快纳米酶产业的发展。

3 纳米生物催化应用

纳米生物催化所介导的反应在生物医学领域具有重要的应用前景。首先, 催化反应可以促进检测信号放大, 简单的酶促反应可以在短时间内产生大量信号分子; 其次, 纳米生物催化系统进入生物体内可以介导或者改变生化代谢水平, 导致细胞功能改变或者死亡; 最后, 催化可以介导分子合成或分解, 产生有效的药物。纳米生物催化基于催化核心特点可以分为三类: 第一类是天然酶纳米复合物, 将天然酶组装到纳米材料表面, 提高酶的稳定性和使用效率; 第二类是纳米酶, 直接利用纳米材料内在的类酶活性催化生化反应, 具有效率高、稳定性好和成本低等优点; 第三类是纳米酶与天然酶结合形成的杂合催化系统, 可以执行多步连续催化反应。第二类和第三类纳米生物催化体系是目前研究最多的领域, 其中第三类属于目前的前沿热点。由于纳米酶既具有类酶特性又具有纳米材料的多功能性, 它在生化监测、疾病诊断、肿瘤诊疗、抗氧化、抗菌和环境处理等方面具有重要的作用, 是纳米生物催化应用的典型代表。

纳米生物催化的应用早期聚焦于体外检测, 最近逐渐向体内治疗拓展。在检测和诊断方面, 纳米生物催化可以用来构建更加高效、灵敏和特异的检测技术平台, 或者优化现有的检测系统, 应用于糖尿病、肿瘤、代谢性疾病的诊断。而在疾病治疗方面, 纳米生物催化提供了新的思路, 使得酶催化疗法成为可能。很多疾病的发生都与体内酶活性或功能异常相关, 但是无法直接使用天然酶来治疗疾病, 因为天然酶易失活和降解、成本高, 而其他模拟酶活性低不适合体内应用。纳米生物催化尤其是纳米酶, 基于其酶活性和纳米特性, 可以进入体内调节细胞内微环境, 发挥疾病治疗或缓解的作用。纳米生物催化聚焦于对人类健康具有重大威胁的疾病, 包括传染病监测、肿瘤、心血管疾病、神经退行和衰老、耐药细菌感染等。本文简要介绍了近年来纳米载体固定化酶的标志性进展, 对纳米酶相关的生物医学应用进行了总结。

3.1 纳米载体固定化酶的生物医学应用

纳米载体固定化酶技术具有广泛的应用领域, 早期是把天然酶应用到非友好环境下, 比如有机溶剂、高温等, 使其能够突破生理环境的极限, 应用到生物燃料、制药等工业生产领域。近年来, 固定化酶在生物医学的应用, 尤其是体内疾病治疗应用受到广泛关注。本文列举了几个典型的生物医学应用, 以供读者了解该方向的热点。

(1) 酒精中毒防治。利用单链DNA作为支架将乙醇氧化酶和过氧化氢酶组合在一起, 然后在其表面包裹聚合物, 形成壳层包被的纳米复合酶。这两个酶可以发生串联反应, 即乙醇氧化酶催化底物酒精产生过氧化氢, 而过氧化氢作为过氧化氢酶的底物被分解成氧气和水, 这种串联反应能够有效降低酒精浓度并将其转化为无害物质^[58]。

(2) 多酶组装纳米能源系统。精子得以快速游动的能量来源是组装于精子尾巴上的葡萄糖代谢通路, 这一通路以葡萄糖为原料催化产生ATP用于精子运动^[59]。葡萄糖代谢通路共有10种酶组成, 将一分子葡萄糖分解为2分子丙酮酸, 在此过程中消耗2个ATP, 新产生4个ATP和2个NADH。ATP可以作为能源参与多种活动, 如分子马达运动、细胞膜转运、精子快速运动, 因此ATP可以作为能源用于药物运输, 也可以转换为机械能或电能为纳米器件用于生命体内时提供能量。利用纳米载体固定化酶技术可将10种酶组装于纳米颗粒, 初步实现了以葡萄糖产生ATP的代谢通路体外重建^[60,61]。

(3) 胰岛素智能释放。将胰岛素与葡萄糖氧化酶封装于微纳囊泡开发智能胰岛素贴片, 当血糖升高时, 葡萄糖就会渗入这些小泡, 并被葡萄糖氧化酶所氧化, 产生缺氧或富含双氧水的环境。这会促进小泡破裂, 并快速释放出其中的胰岛素, 起到“自动降血糖”的作用^[62]。

(4) 基因编辑。对Cas9蛋白酶进行改造, 在Cas9蛋白的N末端添加不同长度的谷氨酸多肽链, 从而使Cas9蛋白局部出现负电域, 促进Cas9蛋白与纯金纳米颗粒的结合, 同时把sgRNA(single guide RNA)共同装载到金纳米颗粒上, 通过这种组合, Cas9蛋白酶和sgRNA导入细胞中的成功率达到90%, 可以对目的基因进行编辑^[63]。

(5) 纳米机器人治疗肿瘤。基于超分子自组装的

DNA纳米机器人, 将凝血酶包裹在分子机器的内部空腔, 同时在分子机器两端装载核酸适配体靶向识别和定位到肿瘤部位. 当DNA纳米机器人到达肿瘤血管时, 核酸适配体特异识别标志物结合到血管表面并引起机器结构变化, 由管状结构打开变为平面结构, 将内部装载的凝血酶暴露出来, 诱导凝血反应产生血栓, 使得肿瘤发生栓塞阻断营养供给从而抑制肿瘤生长. 这种纳米机器人对乳腺原位肿瘤、黑色素瘤、卵巢皮下移植瘤和原发肺部肿瘤等多种肿瘤都展现出了良好的疗效^[64].

3.2 纳米酶的生物医学应用

纳米酶具有活性高、稳定性强、低成本和适宜规模化生产等优点, 在生物医学领域中无论体外诊断还是体内应用都具有巨大的应用前景. 本文重点介绍了其在生化监测、抗肿瘤、抗菌、抗氧化等方面的应用(图6).

(1) 双氧水和血液生化检测. 具有过氧化物酶活性的纳米酶可以直接检测双氧水^[27,65,66]. 纳米酶与葡萄糖氧化酶联用构建葡萄糖传感器可用于糖尿病患者血糖和尿糖的检测, 与其他天然酶联用还可用于检测半乳糖、尿酸、胆固醇、乙醇、乙酰胆碱等生化分子^[27,67~73], 并能够用于活体实时监测^[74~76].

(2) 传染病监测. 许多纳米酶具有过氧化物酶活性, 可以替代辣根过氧化物酶应用于免疫检测. 比如氧化铁纳米酶, 既具有过氧化物酶活性, 又具有超顺磁性, 在外加磁场作用下能够定向移动^[20]. 因此, 将氧化铁纳米颗粒的磁性与催化活性相结合, 可以建立集分离、富集和检测于一体的新型酶联免疫分析方法, 解决现阶段免疫检测技术灵敏度不够以及痕量物质检测困难的问题^[77]. 利用纳米酶可对很多病原实现快速检测, 包括蛋白、核酸、抗原、病毒、细菌和细胞等^[78~84].

(3) 纳米酶应用于肿瘤诊疗. 纳米酶的出现为肿瘤诊断提供了新的思路: 可以从诸多层面实现肿瘤的快速检测, 包括癌症基因、肿瘤标志物、肿瘤细胞和肿瘤组织^[85~87].

例如, 基于铁蛋白纳米酶的肿瘤免疫组织化学检测新技术^[88], 其外层的人重链铁蛋白能够特异性地识别肿瘤组织, 而其中心的铁核具有过氧化物酶活性, 可进行催化显色, 将肿瘤识别和检测结合于一体. 该

图6 纳米酶生物医学应用领域(来自web of science)(网络版彩图)

Figure 6 Biomedical applications of nanozymes (The data is from web of science) (color online)

方法检测肿瘤不仅灵敏度高、特异性强, 而且操作简单、快速, 仅使用一种试剂和一个步骤, 整个过程需要不到1 h的时间, 优于传统的免疫组化方法(需要3~4 h). 更为重要的是, 铁蛋白纳米酶检测无需使用抗体, 从而大大降低了成本. 这些特点表明, 铁蛋白纳米酶有望为肿瘤诊断提供一种快速、简便、经济而且广谱的新工具.

此外, 纳米酶作为肿瘤治疗的一种新的酶疗法^[31,89~93], 可以通过其过氧化物模拟酶的性质直接杀死肿瘤细胞, 或者通过过氧化氢酶活性改善肿瘤乏氧微环境, 提高疗效. 纳米酶催化介导的抗肿瘤策略能以肿瘤内的双氧水、GSH、葡萄糖等代谢分子为底物, 通过催化改变肿瘤内的ROS状态, 达到肿瘤治疗的目的^[91,94,95].

(4) 纳米酶抗氧化应用. 纳米酶具有促氧化和抗氧化活性, 其抗氧化活性在许多重大疾病, 如心血管、中风、阿尔兹海默症和衰老等领域有较好的应用前景, 因为这些疾病都与自由基相关. 纳米酶具有清除自由基调节ROS水平的能力, 因此在心血管抗氧化、抗炎、神经保护、细胞保种等方面具有重要作用^[96].

(5) 纳米酶在抗菌及传染病防治中的应用. 以纳米酶为核心的纳米生物催化系统具有多种氧化还原酶类活性, 能够根据pH等条件调节ROS的水平, 因此基于这种原理可以快速杀死多种超级耐药病菌并清除生物膜; 此外, 纳米酶作为纳米材料具有高稳定性、高生物相容性、低成本等优点, 在龋齿防治、感染伤口愈合和败血症等方面具有潜在的应用价值^[97~99]. 除了生物

医学应用之外, 纳米酶还可用于环境防污, 抑制微生物在侵蚀和破坏材料表面结构和性能。比如, 具有卤代过氧化物酶活性五氧化二钒纳米酶(vanadium haloperoxidase), 用作涂层材料可抑制生物膜(biofilm)的生长, 在轮船、军舰外壳防污(antifouling)方面具有潜在的应用价值^[100]。氧化铁纳米酶能够引发流感病毒脂质囊膜发生脂质过氧化, 造成病毒结构破坏和失活, 因此氧化铁纳米酶具有灭活病毒的能力, 将这类纳米酶添加入口罩中可以提高口罩病毒防护效果^[101]。

(6) 环境监测和洗消。纳米酶与天然酶复合体系用于检测有机磷农药甲基对氧磷及神经毒剂沙林^[73], 灵敏度都在纳摩尔级别, 远低于美国制定的军队战士饮用水标准所允许的沙林浓度(10 $\mu\text{g/L}$ 水)。纳米酶可用于含还原性有机污染物的工业废水、制药废水、弹药废水(如三硝基甲苯)的处理^[102], 也可用于含微量有机物的污水处理站出水的深度处理^[103~105]。另外, 从纳米酶应用于有机污染物的消除来看, 纳米酶能应用于苯酚、磺胺类及染料的降解, 也能应用于有机磷、有机硫化物的降解和化学毒剂的消毒, 且具有合成简单、可重复利用等优点, 在环境污染处理方面具有较广泛的应用潜力。

4 总结

纳米生物催化在许多重要领域都展示出了巨大的应用潜力和前景。尤其是在生物医学领域, 对许多重大疾病, 诸如癌症、心血管疾病、传染病、神经退行性疾病等, 无论是诊断还是治疗均能发挥重要作用, 是开展精准治疗、诊疗一体化中的关键技术环节。纳米生物催化治疗疾病的一个显著优点是避免使用传统药物, 而是借助催化活性直接将生物体内的原有物质转化为具有疗效的成分, 达到疾病诊疗的目的。

我国针对纳米生物催化的研究走在世界前列, 尤其是针对纳米酶, 无论是概念、机理、设计和应用均处于领先地位, 对纳米酶这一概念的清晰定位, 相关生物和化学机理分析与模型, 以及标志性的生物医学应用均由我国科学家率先提出和完成。而且随着这一领域的发展, 许多新的概念学说和技术不断涌现, 比如最近施剑林和陈雨团队提出了纳米催化医学的概念, 极大地推动纳米生物催化的发展和应用。尤其是纳

米生物催化对诸多疾病的治疗, 其基础是基于酶催化体内生物反应, 从蛋白质功能水平调节细胞活性, 比如保护细胞或者杀死恶性肿瘤细胞, 这种酶学疗法将会与目前所开展的基因编辑疗法、免疫疗法形成互补。因为纳米生物催化所介导的生化反应既可影响DNA的变异和RNA的活性, 又能调控免疫系统的激活和分化。所以我们应该加强这一领域的研究, 尤其是纳米酶, 不仅确保我们的研究始终处于该领域的领先地位, 开创和发展多种原创性的概念、学说、方法和技术, 还要与我国社会发展需求结合, 充分借助交叉领域的优势和特色, 培育和建立具有突破性和变革性的新技术, 为我国人民的生活和健康服务。

但是到目前为止, 尚未有比较成熟的纳米生物催化技术或产品真正应用于临床或市场。主要有以下3方面原因。

(1) 无法精准控制纳米生物催化的活性或效率。利用天然酶固定或包埋到纳米材料体系中, 但是天然酶容易变性失活, 而且固定或包埋后往往严重降低其活性。以纳米酶为主的模拟酶虽然稳定性有了巨大改善, 但是其在体内的催化效率和选择性不易控制。需要开发能够精准控制体内纳米生物催化行为的新技术和新方法。

(2) 纳米生物催化体系的生物安全性。无论是纳米包装的天然酶还是纳米酶等模拟酶到达体内后的代谢行为和免疫原性都尚未获得充分研究, 尤其是动物实验。目前很多类似催化体系仅在小鼠中测试, 更高级动物模型甚至临床测试需要进一步开展。

(3) 目前尚没有纳米生物催化应用的工业标准。对于材料性质, 尤其是催化性能的要求尚缺少明确的标准, 比如催化效率需要达到多少可以用于体内治疗。因此需要进一步明确和制定相关标准化指标以指导纳米生物催化在不同领域的应用。

我国在纳米生物催化涉及开发与应用方面均处在世界前列, 尤其是纳米酶的开发和应用, 以及许多标志性的原创工作和应用均由我国科学家完成。因此, 我们应该抓住领先时机, 充分利用目前积累的基础和优势推动国内纳米生物催化领域的发展, 聚焦国家需求和民生健康中的重大问题, 发展具有变革性的思维、概念、学说和技术, 引领这一领域发展, 为国家和社会发展服务。

参考文献

- 1 Min K, Yoo Y J. Recent progress in nanobiocatalysis for enzyme immobilization and its application. *Biotechnol Bioproc E*, 2014, 19: 553–567
- 2 Kim J. Nanobiocatalysis and its potential applications. *Top Catal*, 2012, 55: 1055–1056
- 3 Kim J B. Nanobiocatalysis and its potential applications. *J Biotech*, 2010, 150: 71
- 4 Kim J, Grate J W, Wang P. Nanobiocatalysis and its potential applications. *Trends Biotech*, 2008, 26: 639–646
- 5 Cao S, Xu P, Ma Y, et al. Recent advances in immobilized enzymes on nanocarriers. *Chin J Catal*, 2016, 37: 1814–1823
- 6 Gao L Z, Yan X Y. Discovery and current application of nanozymes (in Chinese). *Prog Biochem Biophys*, 2013, 40: 892–902 [高利增, 阎锡蕴. 纳米酶的发现与应用. *生物化学与生物物理进展*, 2013, 40: 892–902]
- 7 Grubhofer N, Schleith L. Modifizierte ionenaustauscher als spezifische adsorbentien. *Naturwissenschaften*, 1953, 40: 508
- 8 Xin B J, Xing G W. Magnetic iron oxide nanoparticles immobilized enzymes (in Chinese). *Prog Chem*, 2010, 22: 593–602 [辛宝娟, 邢国文. 氧化铁磁性纳米粒子固定化酶. *化学进展*, 2010, 22: 593–602]
- 9 Yin Y L, Wang A L, Cao J, et al. Nanoparticles carrier for immobilized enzymes (in Chinese). *Mod Chem Ind*, 2007, 27: 67–70 [尹艳丽, 王爱玲, 曹健, 等. 纳米载体固定化酶的研究. *现代化工*, 2007, 27: 67–70]
- 10 Daubresse C, Grandfils C, Jérôme R, et al. Enzyme immobilization in reactive nanoparticles produced by inverse microemulsion polymerization. *Colloid Polym Sci*, 1996, 274: 482–489
- 11 Martins M B F, Simões S I D, Cruz M E M, et al. Development of enzyme-loaded nanoparticles: Effect of pH. *J Mater Sci-Mater Med*, 1996, 7: 413–414
- 12 Huang S H, Liao M H, Chen D H. Direct binding and characterization of lipase onto magnetic nanoparticles. *Biotechnol Prog*, 2003, 19: 1095–1100
- 13 Pisklak T J, Macías M, Coutinho D H, et al. Hybrid materials for immobilization of MP-11 catalyst. *Top Catal*, 2006, 38: 269–278
- 14 Shi H, He X X, Wang K M, et al. Bioeffects of silica nanoparticles and silica microparticles as carriers for enzyme immobilization (in Chinese). *Chem Res Chin Univ*, 2007, 28: 1690–1695 [石慧, 何晓晓, 王柯敏, 等. 二氧化硅纳米与微米颗粒作为固定化酶载体的生物效应. *高等学校化学学报*, 2007, 28: 1690–1695]
- 15 Chattopadhyay K, Mazumdar S. Structural and conformational stability of horseradish peroxidase: Effect of temperature and pH. *Biochemistry*, 2000, 39: 263–270
- 16 DePillis G D, Wariishi H, Gold M H, et al. Inactivation of lignin peroxidase by phenylhydrazine and sodium azide. *Arch Biochem Biophys*, 1990, 280: 217–223
- 17 Holzbaur I E, English A M, Ismail A A. FTIR study of the thermal denaturation of horseradish and cytochrome *c* peroxidases in D₂O. *Biochemistry*, 1996, 35: 5488–5494
- 18 Breslow, R. *Artificial Enzymes*. New Jersey: John Wiley & Sons Inc, 2006
- 19 Yan X Y. Nanozyme: a new type of artificial enzyme (in Chinese). *Prog Biochem Biophys*, 2018, 45: 101–104 [阎锡蕴. 纳米酶: 新一代人工模拟酶. *生物化学与生物物理进展*, 2018, 45: 101–104]
- 20 Gao L, Zhuang J, Nie L, et al. Intrinsic peroxidase-like activity of ferromagnetic nanoparticles. *Nat Nanotech*, 2007, 2: 577–583
- 21 Wei H, Wang E. Nanomaterials with enzyme-like characteristics (nanozymes): next-generation artificial enzymes. *Chem Soc Rev*, 2013, 42: 6060
- 22 Wu J, Wang X, Wang Q, et al. Nanomaterials with enzyme-like characteristics (nanozymes): next-generation artificial enzymes (II). *Chem Soc Rev*, 2019, 48: 1004–1076
- 23 Ragg R, Tahir M N, Tremel W. Solids Go bio: inorganic nanoparticles as enzyme mimics. *Eur J Inorg Chem*, 2016, 2016(13–14): 1906–1915
- 24 Manea F, Houillon F B, Pasquato L, et al. Nanozymes: gold-nanoparticle-based transphosphorylation catalysts. *Angew Chem Int Ed*, 2004, 43: 6165–6169
- 25 Zaramella D, Scrimin P, Prins L J. Self-assembly of a catalytic multivalent peptide-nanoparticle complex. *J Am Chem Soc*, 2012, 134: 8396–8399
- 26 Zhang Z, Zhang X, Liu B, et al. Molecular imprinting on inorganic nanozymes for hundred-fold enzyme specificity. *J Am Chem Soc*, 2017, 139: 5412–5419
- 27 Wei H, Wang E. Fe₃O₄ magnetic nanoparticles as peroxidase mimetics and their applications in H₂O₂ and glucose detection. *Anal Chem*, 2008,

- 80: 2250–2254
- 28 Shen X M, Gao X J, Gao X F. Theoretical studies on the mechanisms of the enzyme-like activities of precious-metal and carbon nanomaterials (in Chinese). *Prog Biochem Biophys*, 2018, 45: 204–217 [沈小美, 高雪皎, 高兴发. 贵金属和碳纳米酶分子机制的理论研究. *生物化学与生物物理进展*, 2018, 45: 204–217]
- 29 Li J, Liu W, Wu X, et al. Mechanism of pH-switchable peroxidase and catalase-like activities of gold, silver, platinum and palladium. *Biomaterials*, 2015, 48: 37–44
- 30 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 Am Chem Soc*, 2015, 137: 15882–15891
- 31 Chen Z, Yin J J, Zhou Y T, et al. Dual enzyme-like activities of iron oxide nanoparticles and their implication for diminishing cytotoxicity. *ACS Nano*, 2012, 6: 4001–4012
- 32 Dong J, Song L, Yin J J, et al. Co₃O₄ nanoparticles with multi-enzyme activities and their application in immunohistochemical assay. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2014, 6: 1959–1970
- 33 Korsvik C, Patil S, Seal S, et al. Superoxide dismutase mimetic properties exhibited by vacancy engineered ceria nanoparticles. *Chem Commun*, 2007, 10: 1056
- 34 Heckert E G, Karakoti A S, Seal S, et al. The role of cerium redox state in the SOD mimetic activity of nanoceria. *Biomaterials*, 2008, 29: 2705–2709
- 35 Sardesai N P, Andreescu D, Andreescu S. Electroanalytical evaluation of antioxidant activity of cerium oxide nanoparticles by nanoparticle collisions at microelectrodes. *J Am Chem Soc*, 2013, 135: 16770–16773
- 36 Fernandez-Garcia S, Jiang L, Tinoco M, et al. Enhanced hydroxyl radical scavenging activity by doping lanthanum in ceria nanocubes. *J Phys Chem C*, 2016, 120: 1891–1901
- 37 Celardo I, De Nicola M, Mandoli C, et al. Ce³⁺ ions determine redox-dependent anti-apoptotic effect of cerium oxide nanoparticles. *ACS Nano*, 2011, 5: 4537–4549
- 38 Pirmohamed T, Dowding J M, Singh S, et al. Nanoceria exhibit redox state-dependent catalase mimetic activity. *Chem Commun*, 2010, 46: 2736
- 39 Nicolini V, Gambuzzi E, Malavasi G, et al. Evidence of catalase mimetic activity in Ce³⁺/Ce⁴⁺ doped bioactive glasses. *J Phys Chem B*, 2015, 119: 4009–4019
- 40 Kuchma M H, Komanski C B, Colon J, et al. Phosphate ester hydrolysis of biologically relevant molecules by cerium oxide nanoparticles. *Nanomed-Nanotechnol Biol Med*, 2010, 6: 738–744
- 41 Wang N, Zhu L, Wang D, et al. Sono-assisted preparation of highly-efficient peroxidase-like Fe₃O₄ magnetic nanoparticles for catalytic removal of organic pollutants with H₂O₂. *Ultrason Sonochem*, 2010, 17: 526–533
- 42 Song Y, Qu K, Zhao C, et al. Graphene oxide: intrinsic peroxidase catalytic activity and its application to glucose detection. *Adv Mater*, 2010, 22: 2206–2210
- 43 Sun W, Ju X, Zhang Y, et al. Application of carboxyl functionalized graphene oxide as mimetic peroxidase for sensitive voltammetric detection of H₂O₂ with 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine. *Electrochem Commun*, 2013, 26: 113–116
- 44 Sun H, Gao N, Dong K, et al. Graphene quantum dots-band-aids used for wound disinfection. *ACS Nano*, 2014, 8: 6202–6210
- 45 Song Y, Wang X, Zhao C, et al. Label-free colorimetric detection of single nucleotide polymorphism by using single-walled carbon nanotube intrinsic peroxidase-like activity. *Chem Eur J*, 2010, 16: 3617–3621
- 46 Sun H, Wu L, Wei W, et al. Recent advances in graphene quantum dots for sensing. *Mater Today*, 2013, 16: 433–442
- 47 Li R, Zhen M, Guan M, et al. A novel glucose colorimetric sensor based on intrinsic peroxidase-like activity of C₆₀-carboxyfullerenes. *Biosens Bioelectron*, 2013, 47: 502–507
- 48 Sun H, Zhao A, Gao N, et al. Deciphering a nanocarbon-based artificial peroxidase: chemical identification of the catalytically active and substrate-binding sites on graphene quantum dots. *Angew Chem Int Ed*, 2015, 54: 7176–7180
- 49 Zhao R, Zhao X, Gao X. Molecular-level insights into intrinsic peroxidase-like activity of nanocarbon oxides. *Chem Eur J*, 2015, 21: 960–964
- 50 Zhang W, Hu S, Yin J J, et al. Prussian blue nanoparticles as multienzyme mimetics and reactive oxygen species scavengers. *J Am Chem Soc*, 2016, 138: 5860–5865
- 51 Cheng H, Liu Y, Hu Y, et al. Monitoring of heparin activity in live rats using metal-organic framework nanosheets as peroxidase mimics. *Anal Chem*, 2017, 89: 11552–11559

- 52 Xu B, Wang H, Wang W, et al. A single-atom nanozyme for wound disinfection applications. *Angew Chem Int Ed*, 2019, 58: 4911–4916
- 53 Huang L, Chen J, Gan L, et al. Single-atom nanozymes. *Sci Adv*, 2019, 5: eaav5490
- 54 Jiao L, Xu W, Yan H, et al. Fe-N-C single-atom nanozymes for the intracellular hydrogen peroxide detection. *Anal Chem*, 2019, 91: 11994–11999
- 55 Lin S, Wei H. Design of high performance nanozymes: a single-atom strategy. *Sci China Life Sci*, 2019, 62: 710–712
- 56 Wu Y, Jiao L, Luo X, et al. Oxidase-like Fe-N-C single-atom nanozymes for the detection of acetylcholinesterase activity. *Small*, 2019, 15: 1903108
- 57 Nanozymes: the challenges and opportunities of a China leading research area—the meeting brief on the 606th Xiangshan Science Conferences. *Prog Biochem Biophys*, 2018, 45: 272–276 [纳米酶: 中国原创领域的机遇与挑战——香山科学会议第606次学术研讨会简报. *生物化学与生物物理进展*, 2018, 45: 272–276]
- 58 Liu Y, Du J, Yan M, et al. Biomimetic enzyme nanocomplexes and their use as antidotes and preventive measures for alcohol intoxication. *Nat Nanotech*, 2013, 8: 187–192
- 59 Mukai C, Bergkvist M, Nelson J L, et al. Sequential reactions of surface-tethered glycolytic enzymes. *Chem Biol*, 2009, 16: 1013–1020
- 60 Mukai C, Gao L, Bergkvist M, et al. Biomimicry enhances sequential reactions of tethered glycolytic enzymes, TPI and GAPDHS. *PLoS ONE*, 2013, 8: e61434
- 61 Mukai C, Gao L, Nelson J L, et al. Biomimicry promotes the efficiency of a 10-step sequential enzymatic reaction on nanoparticles, converting glucose to lactate. *Angew Chem Int Ed*, 2017, 56: 235–238
- 62 Yu J, Zhang Y, Ye Y, et al. Microneedle-array patches loaded with hypoxia-sensitive vesicles provide fast glucose-responsive insulin delivery. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112: 8260–8265
- 63 Mout R, Ray M, Yesilbag Tonga G, et al. Direct cytosolic delivery of CRISPR/Cas9-ribonucleoprotein for efficient gene editing. *ACS Nano*, 2017, 11: 2452–2458
- 64 Li S, Jiang Q, Liu S, et al. A DNA nanorobot functions as a cancer therapeutic in response to a molecular trigger *in vivo*. *Nat Biotechnol*, 2018, 36: 258–264
- 65 Zhuang J, Zhang J, Gao L, et al. A novel application of iron oxide nanoparticles for detection of hydrogen peroxide in acid rain. *Mater Lett*, 2008, 62: 3972–3974
- 66 Dai Z, Liu S, Bao J, et al. Nanostructured FeS as a mimic peroxidase for biocatalysis and biosensing. *Chem Eur J*, 2009, 15: 4321–4326
- 67 Qu K, Shi P, Ren J, et al. Nanocomposite incorporating V₂O₅ nanowires and gold nanoparticles for mimicking an enzyme cascade reaction and its application in the detection of biomolecules. *Chem Eur J*, 2014, 20: 7501–7506
- 68 Su L, Feng J, Zhou X, et al. Colorimetric detection of urine glucose based ZnFe₂O₄ magnetic nanoparticles. *Anal Chem*, 2012, 84: 5753–5758
- 69 Kim M I, Shim J, Li T, et al. Fabrication of nanoporous nanocomposites entrapping Fe₃O₄ magnetic nanoparticles and oxidases for colorimetric biosensing. *Chem Eur J*, 2011, 17: 10700–10707
- 70 Kim M I, Shim J, Li T, et al. Colorimetric quantification of galactose using a nanostructured multi-catalyst system entrapping galactose oxidase and magnetic nanoparticles as peroxidase mimetics. *Analyst*, 2012, 137: 1137
- 71 Kim M I, Shim J, Parab H J, et al. A convenient alcohol sensor using one-pot nanocomposite entrapping alcohol oxidase and magnetic nanoparticles as peroxidase mimetics. *J Nanosci Nanotechnol*, 2012, 12: 5914–5919
- 72 Tang Y R, Zhang Y, Liu R, et al. Application of NaYF₄:Yb,Er nanoparticles as peroxidase mimetics in uric acid detection. *Chin J Anal Chem*, 2013, 41: 330–336
- 73 Liang M, Fan K, Pan Y, et al. Fe₃O₄ magnetic nanoparticle peroxidase mimetic-based colorimetric assay for the rapid detection of organophosphorus pesticide and nerve agent. *Anal Chem*, 2013, 85: 308–312
- 74 Cheng H, Zhang L, He J, et al. Integrated nanozymes with nanoscale proximity for *in vivo* neurochemical monitoring in living brains. *Anal Chem*, 2016, 88: 5489–5497
- 75 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. *ACS Nano*, 2017, 11: 5558–5566
- 76 Wang X, Cao W, Qin L, et al. Boosting the peroxidase-like activity of nanostructured nickel by inducing its 3+ oxidation state in LaNiO₃ perovskite and its application for biomedical assays. *Theranostics*, 2017, 7: 2277–2286
- 77 Duan D, Fan K, Zhang D, et al. Nanozyme-strip for rapid local diagnosis of Ebola. *Biosens Bioelectron*, 2015, 74: 134–141

- 78 Kim M I, Ye Y, Woo M A, et al. A highly efficient colorimetric immunoassay using a nanocomposite entrapping magnetic and platinum nanoparticles in ordered mesoporous carbon. *Adv Healthc Mater*, 2014, 3: 36–41
- 79 Park J Y, Jeong H Y, Kim M I, et al. Colorimetric detection system for *Salmonella typhimurium* based on peroxidase-like activity of magnetic nanoparticles with DNA aptamers. *J Nanomater*, 2015, 2015: 1–9
- 80 Yang X, Zhou X, Zhu M, et al. Sensitive detection of *Listeria monocytogenes* based on highly efficient enrichment with vancomycin-conjugated brush-like magnetic nano-platforms. *Biosens Bioelectron*, 2017, 91: 238–245
- 81 Wang S, Deng W, Yang L, et al. Copper-based metal-organic framework nanoparticles with peroxidase-like activity for sensitive colorimetric detection of *Staphylococcus aureus*. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2017, 9: 24440–24445
- 82 Song Y, Wang Y, Qin L. A multistage volumetric bar chart chip for visualized quantification of DNA. *J Am Chem Soc*, 2013, 135: 16785–16788
- 83 Thiramanas R, Jangpatrapongsa K, Tangboriboonrat P, et al. Detection of *Vibrio cholerae* using the intrinsic catalytic activity of a magnetic polymeric nanoparticle. *Anal Chem*, 2013, 85: 5996–6002
- 84 Kim M I, Park K S, Park H G. Ultrafast colorimetric detection of nucleic acids based on the inhibition of the oxidase activity of cerium oxide nanoparticles. *Chem Commun*, 2014, 50: 9577–9580
- 85 Meng X Q, Fan K L. Application of nanozymes in disease diagnosis (in Chinese). *Prog Biochem Biophys*, 2018, 45: 218–236 [孟祥芹, 范克龙. 纳米酶在疾病诊断中的应用. *生物化学与生物物理进展*, 2018, 45: 218–236]
- 86 Zhang Y, Jin Y, Cui H, et al. Nanozyme-based catalytic theranostics. *RSC Adv*, 2020, 10: 10–20
- 87 Ding H, Cai Y, Gao L, et al. Exosome-like nanozyme vesicles for H₂O₂-responsive catalytic photoacoustic imaging of xenograft nasopharyngeal carcinoma. *Nano Lett*, 2019, 19: 203–209
- 88 Fan K, Cao C, Pan Y, et al. Magnetoferritin nanoparticles for targeting and visualizing tumour tissues. *Nat Nanotech*, 2012, 7: 459–464
- 89 Zhang D, Zhao Y X, Gao Y J, et al. Anti-bacterial and in vivo tumor treatment by reactive oxygen species generated by magnetic nanoparticles. *J Mater Chem B*, 2013, 1: 5100
- 90 Zanganeh S, Hutter G, Spitler R, et al. Iron oxide nanoparticles inhibit tumour growth by inducing pro-inflammatory macrophage polarization in tumour tissues. *Nat Nanotech*, 2016, 11: 986–994
- 91 Huo M, Wang L, Chen Y, et al. Tumor-selective catalytic nanomedicine by nanocatalyst delivery. *Nat Commun*, 2017, 8: 357
- 92 Fan W, Lu N, Huang P, et al. Glucose-responsive sequential generation of hydrogen peroxide and nitric oxide for synergistic cancer starving-like/gas therapy. *Angew Chem Int Ed*, 2017, 56: 1229–1233
- 93 Wang Z, Zhang Y, Ju E, et al. Biomimetic nanoflowers by self-assembly of nanozymes to induce intracellular oxidative damage against hypoxic tumors. *Nat Commun*, 2018, 9: 3334
- 94 Jiang D, Ni D, Rosenkrans Z T, et al. Nanozyme: new horizons for responsive biomedical applications. *Chem Soc Rev*, 2019, 48: 3683–3704
- 95 Fan K, Xi J, Fan L, et al. *In vivo* guiding nitrogen-doped carbon nanozyme for tumor catalytic therapy. *Nat Commun*, 2018, 9: 1440
- 96 Sang Y, Cao F, Li W, et al. Bioinspired construction of a nanozyme-based H₂O₂ homeostasis disruptor for intensive chemodynamic therapy. *J Am Chem Soc*, 2020, 142: 5177–5183
- 97 Huang Y Y, Lin Y H, Pu F, et al. The current progress of nanozymes in disease treatments (in Chinese). *Prog Biochem Biophys*, 2018, 45: 256–267 [黄燕燕, 林友辉, 蒲芳, 等. 纳米酶在疾病治疗中的最新进展. *生物化学与生物物理进展*, 2018, 45: 256–267]
- 98 Tang Y, Qiu Z Y, Xu Z B, et al. Antibacterial mechanism and applications of nanozymes (in Chinese). *Prog Biochem Biophys*, 2018, 45: 118–128 [唐燕, 仇智月, 许卓斌, 等. 纳米酶的抗菌机理与应用. *生物化学与生物物理进展*, 2018, 45: 118–128]
- 99 Cao F, Zhang L, Wang H, et al. Defect-rich adhesive nanozymes as efficient antibiotics for enhanced bacterial inhibition. *Angew Chem Int Ed*, 2019, 58: 16236–16242
- 100 Cao F, Zhang L, You Y, et al. An enzyme-mimicking single-atom catalyst as an efficient multiple reactive oxygen and nitrogen species scavenger for sepsis management. *Angew Chem Int Ed*, 2020, 59: 5108–5115
- 101 Natalio F, André R, Hartog A F, et al. Vanadium pentoxide nanoparticles mimic vanadium haloperoxidases and thwart biofilm formation. *Nat Nanotech*, 2012, 7: 530–535
- 102 Qin T, Ma R, Yin Y, et al. Catalytic inactivation of influenza virus by iron oxide nanozyme. *Theranostics*, 2019, 9: 6920–6935
- 103 Zhang J, Zhuang J, Gao L, et al. Decomposing phenol by the hidden talent of ferromagnetic nanoparticles. *Chemosphere*, 2008, 73: 1524–1528
- 104 Yan X Y. Chap 2, Nanozymes. In: *Novel Properties and Biomedical Applications of Nanomaterials* (in Chinese). Beijing: Science Press, 2014.

110–160 [阎锡蕴. 第二章 纳米酶. 纳米材料新特性及生物医学应用. 纳米科学与技术丛书. 北京: 科学出版社, 2014. 110–160]

105 Huang Y, Ren J, Qu X. Nanozymes: Classification, catalytic mechanisms, activity regulation, and applications. *Chem Rev*, 2019, 119: 4357–4412

Current developments and trends in nanobiocatalysis

GAO LiZeng¹, WEI Hui² & QU XiaoGang³

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

2 Department of Biomedical Engineering, College of Engineering and Applied Sciences, Nanjing University, Nanjing 210093, China;

3 Laboratory of Chemical Biology and State Key Laboratory of Rare Earth Resource Utilization, Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130022, China

The field of nanobiocatalysis focuses on improving catalytic efficiency of biocatalysts or developing artificial enzymes using nanotechnology and nanomaterials, broadening their applications in an unfriendly environment, and *in vitro* and *in vivo* disease diagnosis and treatment. Nanobiocatalysis typically contains enzyme immobilization on nanocarriers and artificial enzymes based on nanomaterials (nanozymes). The latter is one of the representative interdisciplinary fields in nanobiology. On one hand, natural enzymes can be immobilized on nanocarriers to improve catalytic efficiency and stability. On the other hand, nanomaterials themselves may exhibit intrinsic enzyme-like properties which catalyze the biochemical reactions of the substrates of natural enzymes, providing a new generation of artificial enzymes. Nanobiocatalysis has been successfully explored, and has identified great potential in many important fields, including biomedicine, chemical industry, pharmacy, and environment engineering. In this review, we briefly summarize recent progress and developing trend for both enzyme immobilization on nanocarriers and nanozymes.

nanobiocatalysis, enzymes, nanotechnology, enzyme immobilization, artificial enzymes, nanozymes

doi: [10.1360/SSV-2020-0070](https://doi.org/10.1360/SSV-2020-0070)