稀土二氧化铈在生物领域的最新研究进展

徐灿, 曲晓刚*

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

*通讯作者, E-mail: xqu@ciac.ac.cn

收稿日期: 2013-11-20; 接受日期: 2013-11-27; 网络版发表日期: 2014-02-21

doi: 10.1360/032013-336

摘要 氧化铈纳米粒子因其优异的催化活性而一直以来备受关注. 它的催化性质来源于表面铈离子可以快速地进行 Ce^{4+} 和 Ce^{3+} 转变, 能够根据环境很容易地接受或失去电子. 长久以来, 其应用均集中在工业催化方面. 然而近年来, 它被发现具有多种生物酶, 如超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、磷酸酶、过氧化物酶和氧化酶等的模拟活性, 以及具有羟基自由基及氮氧化物自由基清除的能力. 这些多重酶活性使其在生物方面有着众多极具前景的潜在应用价值. 目前, 在生物领域其已被开发用于生物检测、疾病诊断及治疗、药物载体及生物支架等方面. 本文主要介绍其多种生物酶活性、活性原理, 及在生物领域中的最新研究进展.

关键词

氧化铈纳米粒子
酶模拟
生物检测
逻辑门
药物载体

1 引言

作为镧系金属^[1, 2]第一个具有 4f 电子的元素, 铈是物理学、化学、生物学及材料学等领域研究的热点. 当结合氧原子后, 铈形成具有萤石晶型结构的氧化铈^[3]. 氧化铈在工业生产方面具有广泛应用, 如用作抛光粉、玻璃脱色剂、耐高温材料、催化材料、燃料电池和太阳能电池等^[4, 5]. 虽然氧化铈具有较多的性质及应用, 但其最重要的应用是在催化方面. 在过去的几十年中, 氧化铈及氧化铈掺杂材料作为多种反应的催化剂已得到广泛应用. 在工业上, 其最主要的催化应用是作为三效催化剂的活性成分来处理汽车尾气(碳氢化合物、CO 和 NO 等)^[5]. 最近, 其多种生物酶活性被逐渐发现, 这使它不仅可以用作工业催化剂, 亦可作为生物模拟酶用于生物催化、生物医药、药物释放和生物支架等生物领域. 本文主要介绍其多种生物酶活性、活性原理及在生物领域中的最新研究进展.

2 氧化铈的催化原理

与其他镧系金属只表现出+3 价不同, 铈原子既可呈现+3 价(全还原态), 也可呈现+4 价(全氧化态). 这是因为它有两个部分充满的电子轨道, 4f 和 5d, 以及许多亚级激发态. 在氧化铈中, 铈离子优先形成较稳定的 Ce^{4+} . 它以萤石结构形成结晶, 1 个铈原子周围有 8 个氧原子, 形成四面体结构^[6]. 虽然如此, 其很容易出现内在空位缺陷, 一部分的铈以 Ce^{3+} 存在, 空缺正电荷以氧空位补偿.

氧化铈的催化活性来源于其快速的 $\text{Ce}^{4+}/\text{Ce}^{3+}$ 之间的转变. 铈离子可以很容易地大幅度调整其电子构型以适应所处化学环境^[7]. 它在晶格结构中还表现出氧空位(或缺陷), 在氧化还原反应中, 通过得失电子, 它可在 CeO_2 和 CeO_{2-x} 之间转换. Ce^{4+} 及低的表面缺陷形成能在氧化过程中起到关键作用, 而 Ce^{3+} 及在氧空位晶格中的自由移动的电子则在还原过程中起到关键作用. 另外, 氧化还原过程中得失氧原子对晶格中铈原子的排布影响很小, 因而此萤石型晶格

结构具有记忆功能^[7]. 这种结构特征使氧化铈具有优异的再生功能, 产生变化后倾向于恢复到原始状态, 这保证了其优异的催化功能, 可循环使用.

3 氧化铈的多种生物酶模拟活性

3.1 超氧化物歧化酶(SOD)模拟活性

超氧化物歧化酶(SOD)是一类将超氧化物分解成 H_2O_2 和 O_2 的一类酶, 与过氧化氢酶联合使用时, 超氧化物最终被分解为 H_2O 和氧气, 从而起到保护细胞免受超氧化物自由基损害的作用, 是细胞内一

类保护性酶.

Self 及合作者^[8]首次发现并研究了氧化铈纳米粒子在体外分解超氧化物的能力. 他们合成了两种具有不同 $\text{Ce}^{3+}/\text{Ce}^{4+}$ 比例的氧化铈纳米粒子, 发现具有高的 $\text{Ce}^{3+}/\text{Ce}^{4+}$ 比的纳米粒子具有更高的 SOD 模拟活性. 基于天然 SOD 酶反应原理, 他们提出了氧化铈的超氧化物歧化酶催化机理:

随后, Celardo 等^[9]在分子水平上提出了更详尽的反应机理, 如图 1(a)所示.

图 1 (a) 氧化铈纳米粒子的 SOD 酶模拟活性的可能机理; (b) 氧化铈纳米粒子的过氧化氢酶模拟活性的可能机理^[9]

3.2 过氧化氢酶(catalase)模拟活性

氧化铈的过氧化氢酶活性同样是由 Self 及合作者发现^[10]. 与 SOD 酶不同, 高的 $\text{Ce}^{4+}/\text{Ce}^{3+}$ 比具有更强的过氧化物酶活性. Celardo 等^[9]提出了分子水平上的反应机理(图 1(b)). 值得注意的是, 当氧化铈作为 SOD 酶模拟物时, H_2O_2 是其中一个终产物. 而在体内, H_2O_2 比超氧化物毒性更大, 因为它能通过 Fenton 反应产生最具破坏性的活性氧自由基——羟基自由基($\text{OH}\cdot$). 所以在体内, SOD 酶需与过氧化氢酶联合使用才能起到抗氧化保护作用. 幸运的是, 氧化铈纳米粒子同时具有过氧化氢酶及 SOD 酶的活性, 因此它能起到细胞保护作用. 但这种保护只有两种酶活性均衡时才能有效. 研究表明, 许多因素如纳米粒子大小、 $\text{Ce}^{3+}/\text{Ce}^{4+}$ 比值、溶液环境及 pH 条件均能影响氧化铈的酶活性^[8, 11, 12]. 对于 pH 环境, 中性条件下氧化铈同时表现 SOD 酶活性及过氧化氢酶活性; 而在酸性条件下, 过氧化氢酶活性几乎消失, 而 SOD 酶活性仅受轻微影响. 这说明在酸性条件下, H_2O_2 的生成速率大于其分解速率, 而多余的 H_2O_2 会造成细胞毒性^[12], 即中性条件下氧化铈具有很好的抗氧化能力, 而在酸性条件下, 其抗氧化能力消失并可能表现出毒性.

3.3 羟基自由基($\cdot\text{OH}$)的清除能力

以人骨髓细胞为模型, Hickman 及合作者^[13]发现, 超小的氧化铈纳米粒子(2~5 nm)可以起到保护神经免受 H_2O_2 破坏的作用. 因为 H_2O_2 在体内会生成羟基自由基, 这一途径在氧化损伤中起主导作用. 他们认为, 氧化铈纳米粒子保护脊髓细胞免受 H_2O_2 破坏的原理是其自由基清除能力. 用 H_2O_2 直接处理氧化铈纳米粒子溶液, 溶液颜色从微黄色变成橘红色, 表明 Ce^{3+} (无色)会与自由基反应并被氧化成 Ce^{4+} (黄色). 放置 30 天后, 溶液颜色褪去, 又恢复到原始状态(图 2), 表明了氧化铈的可再生能力. 这种自我再生能力是氧化铈作为抗氧化剂的关键. 氧化铈与羟基自由基的反应如图 2 所示.

在后续的研究中, Perez 课题组^[14]发现, 这种再生能力与 pH 有关(图 3). 在生理中性条件(pH 7.4)或弱碱性条件下, 这种再生能力被很好地保留, 然而在酸性条件下却消失. 因此, 他们修正了氧化铈与羟基自由基的反应机理.

图 2 氧化铈纳米粒子对 H_2O_2 的可逆颜色响应及其清除羟基自由基的原理^[13]

图 3 pH 对氧化铈纳米粒子清除羟基自由基能力的影响^[14]

上述均是侧面证据, 2011 年, Xue 等^[15]通过甲基紫反应提供了氧化铈清除羟基自由基的直接证据. 他们进一步证明了氧化铈只能部分, 不能全部清除羟基自由基的影响. 这种活力与纳米粒子大小及表

面 Ce^{3+} 含量有关.

3.4 氧化氮自由基($\cdot\text{NO}$)清除作用

氧化氮自由基($\cdot\text{NO}$)具有双重生物效应, 包括有益与有害的^[16]. 它可以与超氧自由基反应生成毒性更大的亚硝酸盐阴离子(ONOO^-). 很多疾病均表现出不正常的高 $\cdot\text{NO}$ 含量, 因此, 清除多余的 $\cdot\text{NO}$ 非常重要.

受氧化铈纳米粒子可清除工业上的 NO 废气及对 $\cdot\text{NO}$ 的吸附和分解能力的启发, Self 及合作者^[17]探索并证明了在生理条件下氧化铈纳米粒子清除 $\cdot\text{NO}$ 的能力. 而且有趣的是, 与对 $\cdot\text{OH}$ 的清除能力不同, 低 $\text{Ce}^{3+}/\text{Ce}^{4+}$ 比的氧化铈纳米粒子具有更高的 $\cdot\text{NO}$ 清除能力, 原理如下:

3.5 过氧化物酶模拟活性

如前所述, 过渡态金属的过氧化物酶模拟活性一般具有类似 Fenton 反应的催化原理. Self 及其合作者^[18]发现, 在双氧水存在条件下, 铈离子亦可表现出 Fenton 类似反应:

这一发现为含铈的纳米材料作为过氧化物酶模拟物提供了可能性. 在随后的研究中, Lv 课题组^[19]证明, 通过水热法合成的氧化铈纳米粒子具有过氧化物酶活性. 基于此特性, 该课题组开发了一种简便的葡萄糖比色检测方法. 过氧化物酶模拟活性使氧化铈纳米粒子在环境学、生物技术和医药领域有着广阔的应用前景.

3.6 过氧化物酶模拟活性

Perez 课题组^[20]采用水相合成法合成出左旋糖苷及聚丙烯酸保护的不同大小的水溶性氧化铈纳米粒子, 发现它们具有过氧化物酶模拟活性. 其可在无 H_2O_2 的条件下氧化有机底物小分子(如 TMB 和 ABTS 等)生成比色产物. 此活性与 pH、聚合物层厚度及颗粒大小有关. 酸性条件、聚合物保护层薄、颗粒小的氧化铈纳米粒子具有较强的氧化酶活性.

3.7 磷酸酶模拟活性

磷酸酶^[21]是一类可以水解脱去磷酸基团生成磷酸盐的酶. 生物体的磷酸化/去磷酸化在许多生物过程中发挥着重要作用. 包括信号转导、细胞分化、增殖和新陈代谢等. 一些金属离子及其复合物被报道具有人工磷酸酶活性^[22]. 其大多是路易斯(Lewis)酸类, 最普遍的原理包括 Lewis 酸活化、亲核进攻及最后磷酸基团离去. 作为路易斯酸, 镧系金属及其配合物亦被发现具有水解磷酸酯的功能^[22, 23].

最近, 氧化铈被报道可以水解许多生物相关小分子的磷酸酯键. Qian 及合作者^[24]发现, 氧化铈可以有效地对磷酸蛋白进行去磷酸化. 氧化铈作为磷酸酶具有众多优点: (1) 其安全简单并可通过离心去除; (2) 其催化活性很高, 可以在 10 min 内完成磷酸蛋白的去磷酸化; (3) 与天然磷酸酶不同, 温度对氧化铈的去磷酸化能力几乎无影响, 这有利于实际应用. Kuchma 等^[25]报道了氧化铈纳米粒子可水解多种带磷酸酯键的生物相关分子(腺苷三磷酸、邻-磷酸-L-酪氨酸及对硝基苯基磷酸酯等).

4 生物应用

4.1 核苷三磷酸(NTPs)对氧化铈纳米粒子酶活性的增强作用以及在检测核酸错配类型上的应用

腺苷三磷酸(ATP)和其他核苷三磷酸(NTPs), 包括鸟苷三磷酸(GTP)、胞苷三磷酸(CTP)以及尿苷三磷酸(UTP)常被作为辅酶, 参与很多酶催化反应^[26, 27]. 它们在水解过程中伴随着巨大的吉布斯自由能的释放($\text{NTP} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NDP} + \text{Pi}$, $\Delta G^0 = -30.5 \text{ kJ/mol}$), 因此, 其可与一些酶催化的生化反应耦合而提高其催化效率^[26, 27]. 曲晓刚课题组^[28]发现, 这些“能量货币”不仅可以作为生物酶的辅酶, 还可用于提高纳米酶(如氧化铈纳米粒子)的活性.

不同类型的核苷三磷酸(NTPs)对氧化铈的氧化酶活性均有提高作用, 且提高效率随 NTPs 的种类不同而不同. 如图 4 所示, 低浓度的 NTPs 便对氧化铈的酶活性有很大的影响. 几种类型的 NTPs 对氧化铈酶活性提高的效率依次为 $\text{GTP} > \text{ATP} > \text{UTP} \approx \text{CTP}$. 此处, NTPs 发挥着类似“辅酶”的作用. NTPs 可以通过磷酸根及碱基与铈离子之间的螯合作用与氧化铈结合. 由于氧化铈的磷酸酶模拟性质, 它可以原位催

图4 (a) 低浓度的 NTPs 对氧化铈纳米粒子氧化酶活性的影响; (b) 在不存在(control)以及存在 8 $\mu\text{mol/L}$ NTPs 条件下的氧化铈的氧化酶活性; (c) 在不存在(control)以及存在 8 $\mu\text{mol/L}$ NTPs 时氧化铈-ABTS 体系反应 0.5 h 后的照片; (d) 不同碱基的化学结构; (e) ATP 与金属离子螯合作用的示意图; (f) ATP 与氧化铈的相互作用, 以及对其氧化酶活性影响的示意图^[28]

化 NTPs 的水解。而 NTPs 水解过程释放出来的能量又可反馈回来与氧化铈催化的氧化反应耦合, 转移反应的氧化还原电位, 并增加电子传递速率^[29], 从而提高氧化铈的氧化酶活性。

不同 NTPs 对氧化铈酶活性提高效率的不同源于氧化铈对其水解催化能力的差异(图 4)。镧系金属催化核苷酸磷酸衍生物去磷酸化原理在于镧系金属通过亲核进攻活化磷酸基团, 使其易于水解。而不同种类 NTPs 对氧化铈的结合能力不同。对于核苷酸磷酸衍生物, 它们可以同时通过碱基与磷酸骨架来对镧系金属进行螯合^[30~33]。对于不同的 NTPs, 虽然三磷酸骨架对氧化铈的螯合作用相似, 但是碱基之间却

存在着很大的差异。在 pH 7.0 条件下, 结合能力大小为: G (N-7) > C (N-3) > A (N-7)。而 pH 4.0 时, 胞嘧啶上的 N-3 被质子化, 失去螯合能力。因此, 在 pH 4.0 条件下螯合能力大小为: G > A > C $\approx$ T(U)。因为金属与碱基之间的螯合能力对促进 NTPs 的水解能力影响很大^[32, 33], 因此, 不同碱基对氧化铈结合能力的差别导致氧化铈对不同 NTPs 去磷酸化(水解)能力的不同, 从而决定了其对氧化铈氧化酶活性提高效率的不同(图 4(f))。

基于此效应, 该课题组设计了一系列对单核酸多态性(SNP)中错配碱基对的比色分型方法。SNP 是人类基因中最常见的突变形式。SNP 分型被认为是很有潜力和开发价值的恶性肿瘤早期诊断和风险评估工具。最近, 生物技术的发展为 SNP 分型提供了多种方法^[34~36]。在这些方法中, 比色法非常有吸引力, 因为可以很容易地通过肉眼直接识别。然而, 目前为止, 关于此方法用于 SNP 分型仅有少量报道, 而且在这些报道中, 需要提前确定寡核苷酸的序列以及错配碱基的位置^[35, 36]。最近, 曲晓刚课题组^[28]设计的 SNPs 分型方法避免了这一缺点, 不需要知道核酸序列及错配位置既可测定。

(1) 原位非标记法

将靶 DNA (prDNA)与目标 DNA 分别退火形成双链 DNA, 然后将其分别加入含不同类型 NTPs 的溶液中进行孵育, 接着加入氧化铈及 ABTS, 测反应活性。如图 5 所示, 红色柱表示在没有 DNA 的条件下, 氧化铈在不同 NTPs 存在下的酶活性, 与单独氧化铈相比, 其具有不同程度的升高。而加入互补核酸链后使所有氧化铈-NTPs 体系的酶活性均有轻微程度的降低(图 5(B)), 这是由屏蔽效应所致(图 5(A))^[37]。而在加入错配的 dsDNA 后, 由于互补配对效应, 可以削弱相应的与错配碱基互补的 NTPs 对氧化铈的相互作用, 降低其对氧化铈酶活性提高的能力。因此, 基于此原理, 可以通过测定加入待测 dsDNA 前后氧化铈-NTPs 体系酶活性的变化反推 dsDNA 的错配碱基类型。

(2) 可磁分离循环利用的 SNP 定型法

虽然原位非标记法具有成本低、操作简单及分析快等优点, 但它易受 DNA 序列、碱基错配类型以及 pH 的影响(如在酸性条件下, 会发生 C-C⁺配对), 这对分析结果造成一定的影响。此外, prDNA 不能回收再利用。因此, 该课题组进一步设计了一种受环境影

图 5 (A) 原位非标记比色法 SNP 分型示意图. 以 ATP、CG 及 CT dsDNA 为模型. (a) ATP 与氧化铈之间的相互作用; (b) ATP 和 GC DNA 与氧化铈之间的相互作用; (c) ATP 和 CT DNA 与氧化铈之间的相互作用; (B~E) CG、CA、CC 及 CT DNA 比色检测结果柱状图. 其中, CG 为完全互补核酸, CA、CC 和 CT 为错配核酸^[28]

响小、可回收利用的方法. 在此方法中, SH-修饰的 prDNA (SH- prDNA) 通过 S-Au 键连在纳米金@二氧化硅@四氧化三铁(AuNPs@SiO₂@Fe₃O₄)复合材料的表面, 与待检测 DNA 一同退火处理. 磁分离后将得到的双链 DNA (dsDNA)-NPs 与 4 种 NTPs 溶液分别在中性缓冲液中孵育. 之后, 将 dsDNA-NPs 磁分离, 剩下的 NTPs 用酸性溶液稀释至原来的体积, 测定其对氧化铈的氧化酶活性提高的效率. 结果表明(图 6), 与完全互补的 dsDNA-NPs 孵育后, 各个 NTPs 对氧化铈氧化酶活性的提高效率没有受到明显影响, 而与错配 dsDNA-NPs 孵育后, 由于一部分与错配碱基互补的 NTPs 与错配碱基结合而被共同磁分离出去, 其

图 6 可循环性 dsDNA-NPs 法分型 CG (a)、CA (b)、CC (c) 及 CT DNA (d); (e) 可视化 SNPs 的分型^[28]

对氧化铈的氧化酶活性提高的效率则明显降低. 基于此原理, 可以通过测定加入待测 dsDNA 前后氧化铈-NTPs 体系酶活性的变化反推 dsDNA 的错配碱基类型. 基于其显色特征, 错配碱基类型可以通过肉眼直接观察(图 6(e)).

(3) 一锅法 SNP 分型

基于前一方法, 我们课题组又设计了更加快速便捷的一锅法(图 7). 首先, 不同于前面的与 4 种 NTPs 分别孵育的方法, 此方法将 dsDNA-NPs 与 4 种 NTPs 的混合液共同孵育, 含错配碱基的 dsDNA-NPs 可以通过碱基互补捕获相应的 NTPs. 孵育后将 dsDNA-NTPs-NPs 磁分离, 重新分散在缓冲液中. 然后将此溶液加热, 让互补的 NTPs 脱落下来, 将 dsDNA-NPs 再次磁分离. 剩下溶液的成分与 dsDNA 的错配类型有关. 对于完全互补的 dsDNA, 溶液中无 NTPs 留下. 对于同种碱基错配(X-X 错配), 溶液中将存在近似双倍错配核酸浓度的同一种 NTP. 而对于不同种碱基错配(X-Y 错配), 溶液中将存在与错配核酸浓度相当的两种 NTPs. 由于不同 SNPs 对应着剩下溶液中不同的组分, 其对氧化铈氧化酶活性的提

图7 (a) 一锅法分型 SNP 示意图; (b) $\Delta(\text{Relative activity})$ (相对活力差)与 SNP 错配类型的标准图. $\Delta(\text{Relative activity}) = (A - A_0)/A_0$, A_0 表示不存在 NTPs 时的氧化铈氧化酶活性, A 表示在存在与 SNP 错配碱基相对应的 NTPs 时的氧化铈氧化酶活性; (c) CG、CA、CC 及 CT DNA 在经过如图(a)所示方法处理后对氧化铈氧化酶活性的影响; (d) 图(c)中对应的 $\Delta(\text{Relative activity})$ 值^[28]

高效率也将不同, 以此为特征可以判断 SNPs 错配碱基类型.

4.2 利用氧化铈纳米颗粒作为信号传感器构建比色逻辑网络

氧化铈模拟酶活性被发现以来, 在生物分析方面的大部分应用是利用其催化有机底物变色的性质, 实际上, 氧化铈纳米粒子本身即可作为比色剂. 已知氧化铈纳米粒子的颜色与其表面铈离子的价态有关, Ce^{4+} 离子比例越高, 其颜色越黄. 例如, H_2O_2 存在条件下, 氧化铈粒子中 Ce^{3+} 能有效地转化成 Ce^{4+} , 溶液

颜色也快速地从无色变成黄色. 而在放置一段时间后, 表面 Ce^{4+} 离子能重新恢复为 Ce^{3+} , 溶液又能从黄色再次变成无色, 且在加热的条件下可加速这一恢复过程(图 8).

受到这些现象的启发, Lin 等^[38]利用天然酶作为输入信号和可再生的氧化铈纳米颗粒作为信号传感器, 构建了一种免标记、可重置、肉眼可视的逻辑网络. 他们定义无色状态为 OFF, 黄色状态为 ON. 由于 H_2O_2 是体内多种氧化代谢的产物, 因此, 将多种 H_2O_2 相关的生物酶反应与氧化铈联合, 可生成一个多信号输入的逻辑网络. 此网络可进行布林逻辑计算, 并来模拟自然界的生物化学过程. 而氧化铈的可再生能力使此逻辑网通过加热迅速重置, 回到原始态. 近年来, 将非常规的化学计算用于构建各种布尔逻辑体系引起了人们的广泛关注. 虽然基于化学反应的计算体系已取得了显著的进展, 但是这些逻辑系统经常遭受某些限制. 此设计解决了传统化学逻辑门的两个弊端: (1) 由于化学反应间的互相干扰或不兼容, 很难构成一个大的网络系统; (2) 无法重置. 此逻辑网还被证明可成功用于实际样品的逻辑检测, 实现传统检测很难完成同时检测不同目标物并分析其间的关系. 更重要的是, 此逻辑体系可运用于试纸上, 因而该策略还具有成本低、易操作和易携带等优点.

Lin 等^[38]首先设计了一个 AND 逻辑门, 其以 β -半乳糖苷酶和葡萄糖氧化酶作为输入信号, 以含有

图8 (a) 氧化铈粒子在 425 nm 处的吸收值; (b) 溶液颜色随体系加入 H_2O_2 (4 mmol/L) 和加热操作之间的交替转变而发生可逆变化^[38]

氧化铈溶液的颜色变化作为输出信号(图 9(a)). 其构建原理是基于酶催化的串联反应, 即 β -半乳糖苷酶催化乳糖水解成葡萄糖和半乳糖, 生成的葡萄糖可被葡萄糖氧化酶进一步催化生成过氧化氢. 当同时存在以上两种酶的条件下(1, 1), 氧化铈溶液才能发生显色反应(ON, 1), 当只有其中一种酶或两者均不存在时为无色(OFF, 0). 因此, 成功构建了 AND 门. 类似地, 葡萄糖氧化酶和黄嘌呤氧化酶均会催化各自的底物产生过氧化氢, 他们将其设计为 OR 逻辑门(图 9(b)). 而利用葡萄糖氧化酶(或黄嘌呤氧化酶)产生过氧化氢, 过氧化氢酶能分解过氧化氢这一现象, 他们又构建以葡萄糖氧化酶(或黄嘌呤氧化酶)和过氧化氢酶为输入信号的 INHIBIT 逻辑门. 当仅输入葡萄糖氧化酶时, 输出信号为 1, 其余皆为 0 (图 9(c)), 从而实现了 INHIBIT 逻辑操作. 上述逻辑体系通过加热很容易将其恢复到初始状态, 而无需通过复杂、耗时的步骤.

接着, 该课题组又将单独的逻辑门组装成多个功能逻辑网络. 由于反应间的相互干扰和各个逻辑

门之间的不互相兼容, 很难将基于普通化学反应的逻辑门串联成大型的逻辑网络. 与基于普通化学反应的逻辑体系不同, 基于酶催化反应的逻辑体系可以在同一温和条件下发生反应且不互相影响, 因此, 可轻易地实现各独立逻辑门的组装. 图 10(a)提供了一个(A AND B) AND NOT C 的逻辑表达式, 表示的是只有在两个物种(A 和 B)处于高浓度和另一个物种(C)处于低浓度时其输出信号才为 1, 这一逻辑体系对医疗上的快速筛查具有很大的意义. 同样, 以 4 种酶作为输入信号可以构建[(A AND B) OR C] AND NOT D 的布尔逻辑电路计算. 图 10(b)所示为该逻辑网络特征的布尔逻辑函数真值表. 基于酶反应的复杂性, 有望在将来设计更加复杂的各种逻辑网络体系.

进一步将该体系用于多元分析物的逻辑检测(图 11). 相比传统检测方法, 逻辑检测更加聪明, 它可以将布尔逻辑运算“编程”到生物运算系统, 进而智能分析不同目标待测物之间的关系. 以 β -半乳糖苷酶、葡萄糖氧化酶和黄嘌呤氧化酶作为模型系统为例, 通过输出信号, 可以在逻辑上判断是否有该三种酶的存在. 同时, 该策略也可以被扩展到其他有过氧化氢生成的催化反应, 如检测胆碱与胆碱氧化酶、乳酸与乳酸氧化酶、谷氨酸与谷氨酸氧化酶等. 基于图案化试纸的逻辑体系在智能且简单医疗设备构建和生物运算系统设计等方面具有巨大的潜力.

4.3 基于氧化铈纳米粒子多重酶活性的氧化铈-介孔硅多功能可控药物释放体系

在药物运载体系中, 除了发挥药物载体的作用外, 许多纳米材料本身便具有潜在的药理学活性, 可用于治疗一些重大疾病, 如病毒感染、心脑血管疾病、神经退行性疾病以及癌症等. 在这些具有药理学活性的材料中, 氧化铈纳米粒子因其优异、独特、多样的性质表现突出^[9]. 由于上述的多重酶活性, 在生理 pH (7.4)条件下, 它具有抗氧化能力, 并且在体外细胞实验以及体内动物模型实验中均表现出良好的抗活性氧(ROS)损伤功能.

然而, 到目前为止, 氧化铈纳米粒子的毒性仍存在争议. 有少量研究表明, 氧化铈能产生活性氧, 引起氧化损伤, 如 DNA 功能破坏、细胞膜过氧化等^[39]. 关于这些矛盾的结论, 近期研究表明, 包括 pH 在内的一些因素会影响氧化铈的性质^[12]. 在正常生理中

图 9 不同逻辑操作的 4 种输入组合所对应的溶液颜色变化、在 425 nm 处的吸收强度柱状图及逻辑门真值表^[38]. (a) AND 门; (b) OR 门; (c) INHIBIT 门

图 12 (a) 基于氧化铈纳米粒子和介孔硅的 pH 可控药物释放体系示意图; (b) 氧化铈纳米粒子在不同 pH 条件下不同的酶活性和对细胞的影响^[40]

胞活性实验进行评估. 人胚肾(HEK293)细胞作为正常细胞模型, 肺癌细胞(A549)作为癌细胞模型. MTT 实验表明, 单独 β -CD@CeO₂ 没有细胞毒性, 相反, 纳米粒子可以在不同程度上提高 HEK293 和 A549 的细胞活性(图 13(b)). 结果还表明, β -CD@CeO₂ 对 HEK293 的活性提高作用比对 A549 更强, 这可能是由于肿瘤细胞质内的 pH 比正常细胞低^[42]. 这与先前的研究结果一致. 氧化铈的细胞毒作用与表面电荷及尺寸有关, 3~4 nm 的带中性电荷的氧化铈对细胞

无毒, 因为它们主要在中性细胞质中, 在此条件下表现出抗氧化活性, 可以提高细胞活力. 该结果表明, 氧化铈纳米粒子在从 MSN 上释放下来后, 在随后的代谢过程中无毒.

与单独的 β -CD@CeO₂ 不同, CeO₂-MSN 显示出明显的细胞毒性(图 13(c, d)). 如前所述, 氧化铈的毒性取决于它在细胞器内分布的位置. 因为有着约 100 nm 尺寸的 MSN 被报道通过溶酶体内吞途径进入细胞^[41], CeO₂-MSN 也有可能具有相同的细胞内吞途径.

图 13 (a) 不同 pH 条件下 CeO₂-MSN-dye 中染料分子(dye)随时间的释放曲线; (b) 不同浓度的 β -CD@CeO₂ 对 HEK293 及 A549 细胞活性的影响; (c) 不同浓度的氧化铈、氧化铈-MSN 以及 CeO₂-MSN-FUDR (以包含氧化铈的浓度计算)对 A549 细胞活性的影响; (d) 不同浓度的 FUDR、FUDR-MSN 以及 CeO₂-MSN-FUDR (以包含 FUDR 的浓度计算)对 A549 细胞活性的影响。孵育时间均为 24 h^[40]

这一推断被胞内定位实验所证实. 为了便于胞内追踪, 荧光分子异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)被引入 MSN 壁中. 荧光显微镜被用来监测氧化铈-FITC-MSN 在 A549 细胞中的分布(图 14). 红色荧光的溶酶体追踪试剂(Lysotracker)用来标记酸性细胞器. DAPI 染料用于标记细胞核. 荧光成像结果表明, 氧化铈-FITC-MSN (绿色)不连续地分布在细胞核外, 且大部分与 Lysotracker 红色荧光重叠(图 14), 说明氧化铈-FITC-MSN 进入细胞后主要分布在酸性的溶酶体中. 这为 CeO₂-MSN 纳米粒子的细胞毒作用提供了解释.

MTT 结果还表明, 经 CeO₂-MSN-FUDR 处理后, A549 细胞活力大大降低, 且其降低幅度大于经单独的 CeO₂-MSN 与 FUDR 处理后的总和. 这说明, 在氧化铈与 FUDR 之间存在着正协同效应. 这种协同效应可能归因于在 CeO₂-MSN 对细胞引起氧化损伤后异常脆弱, 其更容易被抗癌药物 FUDR 杀死. 此载药体系可大大减少药物的使用量, 减轻因抗癌药物而引起的副作用.

图 14 A549 细胞与 40 μ g/mL 氧化铈-FITC-MSN 孵育 3 h 后的荧光显微镜成像^[40]. (a) Lysotracker; (b) FITC- β -CD@氧化铈; (c) DAPI; (d) 叠加图

4.4 基于氧化铈纳米粒子-介孔硅的针对阿尔兹海默症的载药体系

老年痴呆症(又称阿尔兹海默症, Alzheimer's disease, AD)是最常见的一类神经退行性疾病, 多发于老年期, 可引起痴呆. 其主要病理特征之一是脑内细胞外淀粉样蛋白(amyloid β -peptides, $A\beta$)聚集形成淀粉样斑块及细胞内神经元纤维缠结^[43]. 它有着多病因及致病机制, 其中 $A\beta$ 与金属(如 Cu 和 Zn 等)组成的复合物产生 H_2O_2 或自由基等并由此引发氧化损伤是其中一个重要病因^[44]. 因此, 金属整合剂类试剂成为治疗此病的一类重要潜在药物. 然而, 非特异性的整合剂不能靶向选择 $A\beta$ -金属复合体, 这造成了它们临床使用的障碍. Franz 课题组^[45]和 Fridkin 课题组^[46]开发了一类新型的整合剂前体, 在到达靶点被活化之前, 此前体不能与金属整合. 虽然此概念非常有前景, 但是, 它的应用因为小分子难以跨越血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)到达靶点而受到限制.

基于药物运载的理念, Li 等^[47]开发了一种基于氧化铈-介孔硅的载药体系, 该体系将金属整合剂类药物装载在介孔硅的孔道中, 用氧化铈封口. 该体系具有三大优点: (1) 合适尺寸的纳米载药系统可携带小分子药物通过 BBB, 克服了单独小分子无法通过 BBB 的限制; (2) 该体系封盖具有 H_2O_2 刺激打开的性质, 只有在 H_2O_2 存在下才能释放药物, 因此对 $A\beta$ -金属体系有着智能响应; (3) 由于优异的抗氧化性能, 氧化铈纳米粒子被报道具有保护神经细胞免受 $A\beta$ 损伤的功能, 因此, 其除了封盖的作用外, 还可作为辅助试剂协同治疗 AD 病. 具体设计方案如图 15 所示. 介孔硅表面用苯硼酸修饰(MSN-BA), 5-氯-7-碘-8-羟基喹啉(CQ)作为模型药物可以装入介孔硅孔内. 氧化铈纳米粒子表面用葡萄糖修饰保护(得到 G-CeO₂NPs), 基于葡萄糖与苯硼酸的相互作用, 可将氧化铈纳米粒子通过硼酯键拉到介孔硅的表面, 因此可作为封盖将药物包封. 该键可对 $A\beta$ -金属复合物产生的 H_2O_2 作出响应被切断, 从而氧化铈纳米粒子脱离介孔硅表面, 孔打开, 药物释放.

体外释放实验表明, H_2O_2 可以成功地刺激该体系释放药物分子, 而无 H_2O_2 的存在下则无明显释放. 通过原子力及透射电镜实验还证明 $A\beta$ -金属体系(以 $A\beta$ -Cu²⁺ 为模型体系)可以成功刺激 CQ 的释放, 并且释放出的 CQ 可以解聚 $A\beta$, 使其由毒性较大的寡聚

图 15 基于氧化铈纳米粒子-介孔硅的针对阿尔兹海默症的载药体系示意图^[47]

图 16 分化的 PC12 细胞形态扫描显微镜图^[47]. (a) 对照; (b) 加入 $A\beta$ -Cu²⁺ 复合物后; (c) 加入 $A\beta$ -Cu²⁺ 复合物以及 G-CeO₂-NP; (d) 加入 $A\beta$ -Cu²⁺ 复合物以及 MSN-CQ-G-CeO₂NP

体变为无毒的单体. 在大鼠嗜铬细胞瘤(PC12)细胞中加入 $A\beta$ -Cu²⁺ 模拟 AD 损伤神经细胞模型. MSN-CQ-G-CeO₂NPs 载药体系可降低活性氧(ROS)的含量, 并成功提高 PC12 细胞的活力并保护细胞形态(图 16). 这些结果是由金属整合剂的抗聚集效应与氧化铈纳米粒子抗氧化能力的协同作用所致. 由于良好的生物相容性, 其易被细胞内吞, 可通过血脑屏障等优点, 该体系有望在未来用于医药领域.

5 结论与展望

综上所述, 由于氧化铈纳米粒子的多重酶模拟

活性, 其在生物领域有着众多潜在的应用价值. 近年来, 氧化铈在生物分析、药物释放及疾病治疗等方面的应用已被成功探索. 但是, 与其成熟的工业应用相比, 氧化铈的生物学应用还在雏形阶段, 离实际还存在一定的距离. 许多问题仍亟待解决, 如氧化铈纳米粒子的酶活性与其自身合成方法、颗粒大小、表面修饰和电荷状态的关系等. 由于氧化铈本身存在着具

有争议性的毒性问题, 在将其应用于生物领域前需进行系统的探索及长期动物模型试验等, 探索其毒性原理及原因, 从而通过改进合成、表面修饰或其他方法来降低其毒性. 而目前为止, 尚缺乏一套完整的考察体系. 尽管如此, 目前为止的研究结果得到的氧化铈重大生物活性使其在医学、分析领域有着诱人的应用前景, 值得科研工作者进一步探索.

致谢 本工作得到国家重点基础研究发展项目(2011CB936004)和国家自然科学基金(21210002, 91213302)支持, 特此一并致谢.

参考文献

- Hu Z, Haneklaus S, Sparovek G, Schnug E. Rare earth elements in soils. *Commun Soil Sci Plant Anal*, 2006, 37: 1381–1420
- Bouzigues C, Gacoin T, Alexandrou A. Biological applications of rare-earth based nanoparticles. *Acs Nano*, 2011, 5: 8488–8505
- Conesa JC. Computer modeling of surfaces and defects on cerium dioxide. *Surf Sci*, 1995, 339: 337–352
- Stambouli AB, Traversa E. Solid oxide fuel cells (SOFCs): a review of an environmentally clean and efficient source of energy. *Renew Sust Energ Rev*, 2002, 6: 433–455
- Trovarelli A, de Leitenburg C, Boaro M, Dolcetti G. The utilization of ceria in industrial catalysis. *Catal Today*, 1999, 50: 353–367
- Suzuki T, Kosacki I, Anderson HU, Colomban P. Electrical conductivity and lattice defects in nanocrystalline cerium oxide thin films. *J Am Ceram Soc*, 2001, 84: 2007–2014
- Skorodumova NV, Simak SI, Lundqvist BI, Abrikosov IA, Johansson B. Quantum origin of the oxygen storage capability of ceria. *Phys Rev Lett*, 2002, 89: 166601
- Korsvik C, Patil S, Seal S, Self WT. Superoxide dismutase mimetic properties exhibited by vacancy engineered ceria nanoparticles. *Chem Commun*, 2007: 1056–1058
- Celardo I, Pedersen JZ, Traversa E, Ghibelli L. Pharmacological potential of cerium oxide nanoparticles. *Nanoscale*, 2011, 3: 1411–1420
- Pirmohamed T, Dowding JM, Singh S, Wasserman B, Heckert E, Karakoti AS, King JES, Seal S, Self WT. Nanoceria exhibit redox state-dependent catalase mimetic activity. *Chem Commun*, 2010, 46: 2736–2738
- Singh S, Dosani T, Karakoti AS, Kumar A, Seal S, Self WT. A phosphate-dependent shift in redox state of cerium oxide nanoparticles and its effects on catalytic properties. *Biomaterials*, 2011, 32: 6745–6753
- Alili L, Sack M, Karakoti AS, Teuber S, Puschmann K, Hirst SM, Reilly CM, Zanger K, Stahl W, Das S, Seal S, Brenneisen P. Combined cytotoxic and anti-invasive properties of redox-active nanoparticles in tumor-stroma interactions. *Biomaterials*, 2011, 32: 2918–2929
- Hickman JJ, Das M, Patil S, Bhargava N, Kang JF, Riedel L, Seal S. Auto-catalytic ceria nanoparticles offer neuroprotection to adult rat spinal cord neurons. *Tissue Eng*, 2007, 13: 873–874
- Perez JM, Asati A, Nath S, Kaftanis C. Synthesis of biocompatible dextran-coated nanoceria with pH-dependent antioxidant properties. *Small*, 2008, 4: 552–556
- Xue Y, Luan QF, Yang D, Yao X, Zhou KB. Direct evidence for hydroxyl radical scavenging activity of cerium oxide nanoparticles. *J Phys Chem C*, 2011, 115: 4433–4438
- Knott AB, Bossy-Wetzel E. Nitric oxide in health and disease of the nervous system. *Antioxid Redox Sign*, 2009, 11: 541–553
- Dowding JM, Dosani T, Kumar A, Seal S, Self WT. Cerium oxide nanoparticles scavenge nitric oxide radical ((NO)-N-center dot). *Chem Commun*, 2012, 48: 4896–4898
- Heckert EG, Seal S, Self WT. Fenton-like reaction catalyzed by the rare earth inner transition metal cerium. *Environ Sci Technol*, 2008, 42: 5014–5019
- Jiao X, Song HJ, Zhao HH, Bai W, Zhang LC, Lv Y. Well-redispersed ceria nanoparticles: promising peroxidase mimetics for H₂O₂ and glucose detection. *Anal Methods*, 2012, 4: 3261–3267
- Asati A, Santra S, Kaftanis C, Nath S, Perez JM. Oxidase-like activity of polymer-coated cerium oxide nanoparticles. *Angew Chem Int Ed*, 2009, 48: 2308–2312

- 21 Cohen P. The origins of protein phosphorylation. *Nat Cell Biol*, 2002, 4: E127–E130
- 22 Chin J. Artificial dinuclear phosphoesterases. *Curr Opin Chem Biol*, 1997, 1: 514–521
- 23 Franklin SJ. Lanthanide-mediated DNA hydrolysis. *Curr Opin Chem Biol*, 2001, 5: 201–208
- 24 Tan F, Zhang YJ, Wang JL, Wei JY, Cai Y, Qian XH. An efficient method for dephosphorylation of phosphopeptides by cerium oxide. *J Mass Spectrom*, 2008, 43: 628–632
- 25 Kuchma MH, Komanski CB, Colon J, Teblum A, Masunov AE, Alvarado B, Babu S, Seal S, Summy J, Baker CH. Phosphate ester hydrolysis of biologically relevant molecules by cerium oxide nanoparticles. *Nanomed Nanotechnol*, 2010, 6: 738–744
- 26 Naitoh K. Inevitability of nTP: information—energy carriers. *Artif Life Robotics*, 2008, 13: 81–83
- 27 Hanson RW. The role of Atp in metabolism. *Biochem Educ*, 1989, 17: 86–92
- 28 Xu C, Liu Z, Wu L, Ren JS, Qu XG. Nucleoside triphosphates as promoters to enhance nanoceria enzyme-like activity and for single-nucleotide polymorphism typing. *Adv Funct Mater*, 2014, 24: 1624–1630
- 29 Kurnikov IV, Charnley AK, Beratan DN. From ATP to electron transfer: electrostatics and free-energy transduction in nitrogenase. *J Phys Chem B*, 2001, 105: 5359–5367
- 30 Klakamp SL, Horrocks WD. Lanthanide ion luminescence as a probe of DNA-structure. 1. Guanine-containing oligomers and nucleotides. *J Inorg Biochem*, 1992, 46: 175–192
- 31 Klakamp SL, Horrocks WD. Lanthanide ion luminescence as a probe of DNA-structure. 2. Non-guanine-containing oligomers and nucleotides. *J Inorg Biochem*, 1992, 46: 193–205
- 32 Sigel H. Interactions of metal-ions with nucleotides and nucleic-acids and their constituents. *Chem Soc Rev*, 1993, 22: 255–267
- 33 Sigel H. Have adenosine 5'-triphosphate (Atp4-) and related purine-nucleotides played a role in early evolution—Atp, its own enzyme in metal-ion facilitated hydrolysis. *Inorg Chim Acta*, 1992, 198: 1–11
- 34 Inouye M, Ikeda R, Takase M, Tsuru T, Chiba J. Single-nucleotide polymorphism detection with “wire-like” DNA probes that display quasi “on-off” digital action. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 11606–11610
- 35 Sato K, Hosokawa K, Maeda M. Non-cross-linking gold nanoparticle aggregation as a detection method for single-base substitutions. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33: e4
- 36 Kolpashchikov DM. Split DNA enzyme for visual single nucleotide polymorphism typing. *J Am Chem Soc*, 2008, 130: 2934–2935
- 37 Park KS, Kim MI, Cho DY, Park HG. Label-free colorimetric detection of nucleic acids based on target-induced shielding against the peroxidase-mimicking activity of magnetic nanoparticles. *Small*, 2011, 7: 1521–1525
- 38 Lin YH, Xu C, Ren JS, Qu XG. Using thermally regenerable cerium oxide nanoparticles in biocomputing to perform label-free, resettable, and colorimetric logic operations. *Angew Chem Int Ed*, 2012, 51: 12579–12583
- 39 Yokel RA, Florence RL, Unrine JM, Tseng MT, Graham UM, Wu P, Grulke EA, Sultana R, Hardas SS, Butterfield DA. Biodistribution and oxidative stress effects of a systemically-introduced commercial ceria engineered nanomaterial. *Nanotoxicology*, 2009, 3: 234–248
- 40 Xu C, Lin YH, Wang JS, Wu L, Wei WL, Ren JS, Qu XG. Nanoceria-triggered synergetic drug release based on CeO₂-capped mesoporous silica host-guest interactions and switchable enzymatic activity and cellular effects of CeO₂. *Adv Healthc Mater*, 2013, 2: 1591–1599
- 41 Lu F, Wu SH, Hung Y, Mou CY. Size effect on cell uptake in well-suspended, uniform mesoporous silica nanoparticles. *Small*, 2009, 5: 1408–1413
- 42 Sethuraman VA, Bae YH. TAT peptide-based micelle system for potential active targeting of anti-cancer agents to acidic solid tumors. *J Control Release*, 2007, 118: 216–224
- 43 Geng J, Li M, Ren JS, Wang E, Qu XG. Polyoxometalates as inhibitors of the aggregation of amyloid β peptides associated with Alzheimer's disease. *Angew Chem Int Ed*, 2011, 50: 4184–4188
- 44 Varadarajan S, Yatin S, Aksenova M, Butterfield DA. Review: Alzheimer's amyloid β -peptide-associated free radical oxidative stress and neurotoxicity. *J Struct Biol*, 2000, 130: 184–208
- 45 Dickens MG, Franz KJ. A prochelator activated by hydrogen peroxide prevents metal-induced amyloid β aggregation. *ChemBioChem*, 2010, 11: 59–62
- 46 Zheng H, Youdim MBH, Fridkin M. Site-activated multifunctional chelator with acetylcholinesterase and neuroprotective-neurorestorative moieties for Alzheimer's therapy. *J Med Chem*, 2009, 52: 4095–4098
- 47 Li M, Shi P, Xu C, Ren JS, Qu XG. Cerium oxide caged metal chelator: anti-aggregation and anti-oxidation integrated H₂O₂-responsive controlled drug release for potential Alzheimer's disease treatment. *Chem Sci*, 2013, 4: 2536–2542

Recent progress of rare earth cerium oxide nanoparticles applied in biology

XU Can, QU XiaoGang*

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

*Corresponding author (email: xqu@ciac.ac.cn)

Abstract: Cerium oxide nanoparticles received much attention because of its excellent catalytic activities. The activities derive from the quick and expedient mutation of the oxidation state between Ce^{4+} and Ce^{3+} . The cerium ions have the ability to easily and drastically adjust its electronic configuration to best fit its immediate environment. Being mature engineer nanoparticles with various industrial applications, recently, the cerium oxide nanoparticles were found to have multi-enzyme (including superoxide oxidase, catalase, oxidase, peroxidase etc.) mimetic properties and have hydroxyl radical scavenging and nitric oxide radical scavenging abilities. It has emerged as a fascinating and lucrative material in biological field including bioanalysis, biomedicine, drug delivery, bioscaffold and so on. This review will provide a comprehensive introduction to the catalytic mechanisms, the multi-enzyme like activities, and the potential applications in biological fields of cerium oxide nanoparticles.

Keywords: cerium oxide nanoparticles, enzyme mimetic, bioanalysis, logic gate, drug delivery