

DOI:10.13232/j.cnki.jnju.2021.03.007

蛋白冠的形成及其对纳米颗粒生物效应的影响概述

向芷芊, 缪爱军*

(污染控制与资源化研究国家重点实验室, 南京大学环境学院, 南京, 210023)

摘要: 纳米颗粒被广泛应用于社会生活的各个领域, 其生物效应亟须研究。一旦纳米颗粒与生物体液接触, 其表面会迅速吸附一层蛋白质分子(蛋白冠), 从而使得纳米颗粒具有了新的生物学特性。不同于体外环境, 含有蛋白冠的纳米颗粒才是它们在生物体内的真实状态。纳米颗粒的理化特性(例如粒径、形状、表面修饰等)可以影响蛋白冠的组成。与此同时, 外界环境条件(例如培养基组成、培养时间、温度、pH等)也是影响蛋白冠组成的重要因素。蛋白冠的存在会影响纳米颗粒和生物体间的相互作用, 改变纳米颗粒的生物吸收、生物分布以及生物毒性。尽管如此, 不同蛋白质分子与纳米颗粒表面特异性结合的内在机制目前尚不清楚, 同时生物体内蛋白冠-纳米颗粒复合体的动态变化研究手段还较少, 这些都是未来需要解决的问题。

关键词: 纳米颗粒, 蛋白冠, 影响因素, 生物吸收, 毒性

中图分类号: X171

文献标志码: A

Formation of protein corona and their influence on the biological effects of nanoparticles: A review

Xiang Zhiqian, Miao Aijun*

(State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, School of the Environment,
Nanjing University, Nanjing, 210023, China)

Abstract: Nanoparticles (NPs) have been widely used in different fields. Once NPs get in touch with organisms, a layer of protein molecules, called protein corona, will form on the NP surface quickly and NPs thus acquire new biological characteristics. Unlike the in vitro environment, the corona-containing structure is a real state of NPs in vivo. The physicochemical properties of NPs (e.g., size, shape, and surface modification) will affect the composition of protein corona. Environmental conditions (e.g., medium composition, incubation time, temperature, and pH) also play important roles in the formation of protein corona. On the other hand, the protein corona can affect the interactions between NPs and organisms, thus altering their biouptake, bio-distribution, and toxicity. Nevertheless, how different protein molecules specifically bind to the surface of nanoparticles is still unclear and methods to trace the dynamic changes of protein-NPs complex in living organisms are lacking. These are problems that need to be solved in the future.

Key words: nanoparticles, protein corona, affecting factors, biouptake, toxicity

纳米颗粒(NPs, nanoparticles)由于独特的物理、化学和生物特性, 如大小可控、表面性质可调、具有良好的生物相容性等优点^[1], 目前已经被广

泛用于化妆品、食品包装、能源生产和生物传感等领域^[2-4]。当NPs释放到环境中, 经由呼吸、饮食或皮肤渗透进入生物体内, 在接触生物体液的瞬

基金项目: 国家自然科学基金(21822605, 21677068)

收稿日期: 2021-03-23

* 通讯联系人, E-mail: miaoj@nju.edu.cn

间 NPs 迅速被蛋白质包裹形成蛋白冠-NPs 复合物. NPs 表面吸附不同蛋白分子后具有了全新的物理、化学性质,使得机体产生不同的生物反应,从而影响它们的生物学效应. 目前 NPs 的体外研究主要集中在药物载体修饰和靶向传递效率等功能设计方面,常常忽略 NPs 进入血液后会形成蛋白冠这一事实. 为了更好地发挥 NPs 的设计功能,同时更全面地评估其在医疗应用中的潜在风险,必须深入了解不同 NPs 与生物环境之间的相互作用以及蛋白冠如何改变 NPs 的生物学效应等问题^[5-6]. 在本综述总结了在蛋白冠-NPs 领域的最新进展,简要介绍了生物环境中影响蛋白冠形成的因素以及蛋白冠对 NPs 生物效应的影响等.

1 蛋白冠的形成及影响因素

由于 NPs 具有较大的比表面积,在与生物相关液体接触后其表面会迅速吸附蛋白质,形成“蛋白冠”^[7]. NPs 和蛋白质的结合主要由氢键、疏水作用、静电作用、范德华力等分子间作用力介导^[8]. 在此过程中,一部分具有较强结合力的蛋白质可以很快在 NPs 表面形成所谓的“硬蛋白冠”,其周围分布着作用力较弱的“软蛋白冠”. “软蛋白冠”与 NPs 结合力较弱,很容易被培养基中的游离蛋白取代,因此需要数小时甚至数天才能达到平衡^[1],有着较高的交换率且停留时间短^[8]. 相比较而言,硬蛋白冠的类型更丰富且更稳定,停留时间更长. 随着时间的推移,亲和力较强的蛋白逐渐取代亲和力较弱的蛋白,这种置换现象称为 Vroman 现象. 蛋白冠的形成除了与蛋白自身的特性相关外,还受 NPs 理化性质(尺寸、形状、表面修饰等)和外界环境条件(温度、pH、孵育时间等)影响^[7],具体如下.

1.1 纳米颗粒的理化性质

1.1.1 化学组成 蛋白冠形成的影响因素中, NPs 自身的化学组成是首要考虑对象. 研究发现纳米银颗粒周围形成的血清蛋白冠与具有相同表面配体修饰的纳米金颗粒相比,只有 36.9% 的蛋白类型是相同的^[9]. Saha et al^[10]也发现在血清孵育过程中,免疫球蛋白和载脂蛋白是吸附在纳米金上的主要蛋白类型(占 60%),与纳米金表面组

成和疏水性等性质几乎无关. 常见的聚合物、油脂和无机纳米材料表现出不同的蛋白结合模式^[11]. Jansch et al^[12]和 Gunawan et al^[13]将水包油纳米乳剂和纳米氧化铁分别暴露在人体血浆中,并通过双向凝胶电泳对其蛋白冠进行表征,发现纳米氧化铁表面主要吸附了免疫球蛋白和纤维蛋白原,而载脂蛋白却相对吸附得较少. 与此同时,水包油纳米乳剂优先结合载脂蛋白,而不是纤维蛋白原. 类似地,Strojan et al^[14]发现,纳米钴铁氧化物和纳米二氧化硅在胎牛血清中孵育后两者所结合免疫相关蛋白组成差异显著,前者仅结合 α -2-人体血清-糖蛋白,而后者倾向于吸附补体因子 H,补体 C3 和 C4.

1.1.2 尺寸 NPs 的尺寸大小与表面曲率有关,是影响蛋白冠形成的最重要因素之一^[15]. 颗粒大小一方面直接导致了其相应表面积的变化,另一方面蛋白质在不同曲率 NPs 的表面往往经历不同的构象变化,最终影响表面所吸附蛋白的数量、稳定性以及平衡时间^[16]. Piella et al^[17]研究了不同粒径纳米金表面蛋白冠的形成过程,发现蛋白冠的厚度取决于纳米金的尺寸:越小的颗粒,蛋白冠层越薄,其结合蛋白达到平衡的时间也越快. 然而,Perevedentseva et al^[18]发现 100 nm 的金刚石表面吸附溶菌酶需要 10~15 min 达到平衡,而 5 nm 的金刚石却需要 30~40 min. 这主要是因为溶菌酶与 5 nm 金刚石结合的过程中,单个 NP 发生团聚,溶菌酶会和聚集的 NPs 相互作用. 由于 NPs 聚集体形状不均一旦颗粒间隙会形成可以吸附蛋白的孔隙,溶菌酶不断地与这些微孔结构结合,致使吸附蛋白达到平衡的时间延长. 此外,蛋白结合常数和结合位点数在很大程度上也取决于 NPs 的尺寸^[19]. Yin et al^[20]发现人体人血白蛋白的结合常数随着金纳米簇大小的增加而增加,表明粒径变化也可以改变蛋白质的结合能力. 与此同时,也有研究指出随着粒径增大,NPs 吸附蛋白质的数量反而减少. Zhang et al^[21]发现纳米二氧化硅表面硬蛋白冠和软蛋白冠中的蛋白种类随粒径增加而减少. 上述结果表明粒径在蛋白冠形成过程中起重要作用,但实际条件下两者之间的具体关系有待进一步研究^[19].

1.1.3 形状 蛋白冠的形成还取决于 NPs 的

形状. 目前已发现人血白蛋白与免疫球蛋白的吸附对 NPs 形状有依赖性^[22]. NPs 的形状可以改变其表面结合蛋白质的结构、种类和数量. Kantiá Nandi et al^[23]通过透射电子显微镜和圆二色光谱分析发现当 Ps 的形状从球形变成三角形后, 与其结合的血红蛋白和白蛋白旋性降低. Madathiparambil Visalakshan et al^[22]制备了两种具有相同尺寸、孔隙率、化学性质和表面电位仅形状不同的纳米二氧化硅, 将它们暴露于人体血浆中, 发现棒状颗粒比球状颗粒吸附的蛋白更多. García-Álvarez et al^[24]将聚乙二醇(PEG, polyethylene glycol)修饰的纳米金棒和纳米金星放在 Swiss 小鼠血液中孵育形成蛋白冠, 发现星状颗粒吸附结合的蛋白质数量明显更多.

1.1.4 表面修饰 NPs 的表面修饰可以改变其表面电荷和疏水性/亲水性^[15]. 表面电荷决定了 NPs 吸附蛋白质的数量. 与表面带电荷的 NPs 相比, 不带电的 NPs 表面普遍结合更少的蛋白. 一般情况下, 血浆蛋白在 pH 7.4 的生理环境下大多带负电荷, 因此血液中带正电荷的 NPs 会比带负电荷的 NPs 吸附更多的蛋白^[25]. 据报道带正电荷的纳米金和纳米银吸附的蛋白是带负电的同种 NPs 的 2~4 倍, 而带负电的柠檬酸基团和中性的聚丙烯吡咯烷酮表面修饰则对蛋白冠组分的影响较小^[26]. Sakulkhu et al^[27]发现暴露于血浆环境时, 血清蛋白会优先吸附到带正电的超顺磁性氧化铁纳米颗粒表面. 另外, NPs 电荷的改变还可以影响表面吸附蛋白的构象稳定性. 蛋白质在与中性带电颗粒相互作用后仍然保持其天然结构, 但与带电 NPs 的表面结合后会有较大的结构变化. 这可以通过蛋白质带电荷残基和 NPs 配体之间的静电作用来解释: 对于带负电基团的 NPs, 蛋白质带正电荷的侧链与 NPs 表面负电荷部分由于静电作用相互结合, 而蛋白质非极性侧链可与 NPs 表面的非极性位点结合, 因此蛋白质的结构会随着 NPs 的离子移动和共价结合作用而扭曲^[19].

除了表面电荷, NPs 的疏水性或亲水性也是影响蛋白冠组成的关键因素. 与亲水性相比, 疏水性表面对蛋白质有更大的亲和力, 并且有更强的使吸附蛋白变性的趋势. 这可能是由于 NPs 的表面疏水性分子与蛋白相互作用时促进蛋白结构

的展开而引起^[28]. Ahsan et al^[8]合成了不同疏水性的 NPs, 结果发现它们结合蛋白的数量和类型存在明显差异. 疏水性较高的 NPs 优先结合载脂蛋白、白蛋白和纤维蛋白原, 而疏水性较弱的 NPs 除了吸附微量白蛋白外几乎不结合其他蛋白质. Aggarwal et al^[29]也发现载脂蛋白对疏水性高的 NPs 的亲和力是疏水性低的 NPs 的 50 倍, 表明蛋白质对疏水性更高的表面具有更强的亲和力. 因此亲水性的聚合物可以明显降低吸附蛋白的数量, 称为“隐身效应”, 有助于避免 NPs 被免疫系统清除. 例如, 表面修饰 PEG 是减少 NPs 受免疫识别的常用和首选方法. PEG 是典型的亲水性分子, 可以共价连接到 NPs 表面, 从而减少蛋白质的吸附并延长 NPs 的血液循环时间^[29-30].

1.2 环境条件

1.2.1 培养基组成 培养基中存在着上千种蛋白质, 它们相互竞争吸附到 NPs 表面, 蛋白冠通常富含 10~50 种对 NPs 具有高亲和力的蛋白质^[7]. 当培养基中的糖类、脂质或盐类等小分子组分不同时, NPs 表面会形成不同的蛋白冠^[13]. Maiorano et al^[31]在添加了胎牛血清的 DMEM(达尔伯克氏改良伊格尔氏培养基)和 RPMI(罗斯维帕克培养基)培养基中分别孵育不同尺寸的纳米金, 两种培养基中的氨基酸、葡萄糖和盐含量不同. 通过一维凝胶电泳和液相二级质谱技术分析了纳米金在这两种培养基中所形成的蛋白冠组成, 发现 DMEM 培养基中纳米金表面蛋白冠的形成比 RPMI 培养基中慢, 但 RPMI 培养基中的蛋白冠的蛋白丰度较低且稳定性较差. 有报道纳米四氧化三铁在正常和高血脂血清中所形成的蛋白冠组成有很大差异, 在高血脂血清中 NPs 表面胆固醇的吸附量明显增加. 培养基是体外实验的研究系统, 对于人体来说, 体液环境才是人体细胞赖以生存的巨大“培养基”, 不同组织的组织液也有不同, 其中富含的各种有机物和无机盐等代谢物质对体内蛋白冠的形成也必然会有影响.

1.2.2 孵育时间 当 NPs 与生物相关液体接触时, 尽管蛋白冠在 NPs 表面快速形成, 然而其组成随时间动态变化, 直到产生稳定的内层硬蛋白冠^[32-33]. Hadjidemetriou et al^[34]以阿霉素-PEG-脂质体为 NPs 代表研究其表面蛋白冠组成随时间

的变化,将脂质体通过静脉注射到小鼠体内,并在 10 min, 1 h 和 3 h 后进行血液采样. 通过动态光散射和透射电子显微镜分析,结果显示脂质体表面结合的蛋白总量不随时间变化,但不同时间点表面结合的最丰富的蛋白不同:在 10 min 时,含量最多的是巨球蛋白;而在第 3 h,血红蛋白和载脂蛋白含量最高. 同样, Pisani et al.^[35] 为了研究 NPs-蛋白复合体的形成演变周期,将磁性介孔纳米二氧化硅置于胎牛血清和人体血清中分别进行孵育培养. 结果发现,从 30 s 到 7 d,培养在胎牛血清中的 NPs 表面蛋白质数量从 90 增加到 128,而人体血清中培养的 NPs 其蛋白质数量从 134 增加到 153. 与胎牛血清相比, NPs 在人体血清中吸附的蛋白质数量增长更快,且更早达到平衡.

1.2.3 温度 环境温度的波动对蛋白冠的形成也会产生不同的作用. 一方面,温度会影响蛋白质的扩散和对 NPs 的亲合力,探究这些细微的温度变化对 NPs 表面蛋白质吸附的影响至关重要^[36]. 据报道,当温度从 15 °C 升高到 41 °C 时,吸附在纳米铜上的蛋白质数量显著增加^[37-38]. Mahmoudi et al.^[39] 研究温度对铁铂合金纳米颗粒吸附人血清蛋白和脱辅基转铁蛋白的影响. 通过荧光相关光谱法定量分析发现,在较低温度下(12 °C 和 23 °C)这两种蛋白都会在 NPs 表面沉积形成蛋白冠,此后增加各自蛋白浓度对蛋白冠的厚度没有影响;而在较高温度下(43 °C)两种蛋白在铁铂合金纳米颗粒表面形成的吸附层厚度减小,其原因可能在于温度增加时,(1)蛋白分子构象发生变化;(2)吸附在 NPs 表面的蛋白质数量降低;(3)铁铂合金纳米颗粒表面的聚合物涂层柔韧性增加导致蛋白质分子插入聚合物外壳. 另一方面,温度升高还会引起血清中蛋白组分的变化,最值得关注的是补体蛋白和免疫球蛋白的聚集和消耗. Lesniak et al.^[40] 将胎牛血清在 56 °C 水浴加热 30 min 得到热灭活的胎牛血清. 将热灭活和未灭活的血清分别与聚苯乙烯 NPs 在 37 °C 下孵育一定时间后,发现聚苯乙烯 NPs 在热灭活后的血清中形成的蛋白冠更厚,其在 A549 细胞(腺癌人类肺泡基底上皮细胞)中的累积也随之降低. 这可能是由于灭活过程中热诱导的补体因子耗竭,进而影响 A549 细胞对于基于补体的 NPs 的吸收.

1.2.4 环境 pH 环境 pH 不仅控制着 NPs 表面的质子化状态从而影响其聚集趋势,而且还会影响 NPs 与蛋白质间的结合力并进一步改变蛋白质的吸附模式^[41]. 在生物吸收过程中,纳米材料会经历多种不同 pH 的液体环境,例如暴露介质(pH 6.9~7.4)、血液(pH 7.35~7.45)、细胞内液(pH 6.8~7)和溶酶体(pH 4.5~5)^[37]. 随着暴露溶液的 pH 逐渐接近蛋白质的等电点,蛋白质在溶液中的稳定性逐渐降低,趋于团聚并吸附到可利用的 NPs 表面^[42-43]. 生物器官和细胞水平之间所覆盖的 pH 范围比较大,并且会随疾病状态而改变. 例如,肿瘤总是产生酸性微环境,并包含特定类型的蛋白质,可以特异修饰 NPs;而另一些负载在 NPs 外部的蛋白或肽类药物并不能适应这种极端环境,从而影响预期药物释放效果^[44].

2 蛋白冠对纳米颗粒生物效应的影响

NPs 暴露于生物体液时, NPs 的特性影响蛋白冠的数量和种类,反过来蛋白冠的形成也使 NPs 具有全新的特性,从而影响纳米材料的生物学特性,包括生物吸收、生物分布和生物毒性^[4,45].

2.1 对生物吸收的影响 生物吸收 NPs 的过程主要有两步,即首先 NPs 吸附到细胞膜表面,然后通过能量依赖或者非能量依赖途径被细胞内化. NPs 形成蛋白冠后其吸收过程也随之改变^[46]. 一方面,蛋白冠的存在可以抑制 NPs 的吸收. 发现在使用无血清培养基时,纳米金的吸收相对于含血清培养基增加了 150%^[28]. Lesniak et al.^[47] 报道,无血清条件下纳米二氧化硅在 A549 细胞中不仅表现出比有血清条件下更高的累积性能,而且具有更高的细胞膜粘附性. 究其原因可能是添加血清后, NPs 表面产生具有快速交换的高流动性蛋白冠,使得 NPs 的 zeta 电位降低而难以吸附到质膜上,最终抑制了 NPs 与质膜的结合和吸收^[48]. 另一方面,也有研究表明蛋白冠会促进 NPs 的吸收,这主要是由于蛋白冠增加了 NPs 表面能被膜受体识别和促进跨膜内化的配体^[45,49]. 有报道指出,富含调理素和凝血蛋白的蛋白冠会激活免疫细胞,促进吞噬细胞通过受体介导的吞噬作用吸收 NPs. Qiu et al.^[49] 发现带正电的金纳米棒吸附蛋白质的能力最强,同时具有较高

细胞摄取率. 同样, 具有磁性的 NPs 在表面形成蛋白冠后, 其细胞吸收过程更快^[50].

2.2 对生物分布的影响 蛋白冠的差异不仅影响 NPs 的吸收, 还影响 NPs 在生物体内的分布和后续效应^[45]. 已有研究发现不同表面修饰的 NPs 在结合差异蛋白后可以诱导 NPs 的不同生物分布. Stepien et al^[51]报道了雄性和雌性瑞士小鼠中 PEG 或葡萄糖修饰的氧化铁 NPs 的生物分布情况. 在进行体内研究前将这些 NPs 暴露于各种血清蛋白中, 并使用液相二级质谱对形成的蛋白冠进行表征. 数据显示, 在这两种类型的 NPs 周围观察到具有不同组成但总量相似的蛋白质. 葡萄糖-NPs 周围的蛋白冠富含调理素蛋白, 而 PEG-NPs 周围的蛋白冠富含白蛋白. 通过静脉内注射, 使用荧光显微镜监测它们在器官中的位置, 发现葡萄糖-NPs 主要富集在肝脏和脾脏中, 而 PEG-NPs 多见于肾脏、心脏、肺和胸腺等器官. 此外, 他们还发现小鼠巨噬细胞没有吞噬 PEG-NPs, 但葡萄糖-NPs 却被大量摄取, 这可能是因为与葡萄糖-NPs 相比, PEG-NPs 蛋白冠中白蛋白与补体蛋白的比例更高, 不易被吞噬细胞识别.

2.3 对生物毒性的影响 NPs 进入生物体后, 通过线粒体损伤和细胞核损伤, 引起炎症和氧化应激. 越来越多的证据表明生物和纳米材料相互作用是了解 NPs 在其生命循环周期中毒性效应的关键因素, 而蛋白冠在其中的影响格外显著^[52]. 许多研究表明蛋白冠可以减轻 NPs 的原始细胞毒性. 首先, 蛋白冠对 NPs 诱导的细胞损伤有保护作用. 裸露的 NPs 与细胞相互作用时会破坏质膜的完整性, 导致细胞破裂^[53]. 而蛋白质的覆盖使 NPs 表面具有更高的生物相容性, 减少了 NPs 对细胞膜的损害^[54-56]. 研究表明氧化石墨烯纳米片的细胞毒性主要是由于其直接与细胞相互作用导致细胞膜破裂而产生的^[57]. 但是胎牛血清蛋白冠的存在可以防止细胞膜和纳米片之间的直接相互作用, 从而大大降低了这种纳米材料的细胞毒性. 其次, 蛋白冠可以减少细胞内活性氧的产生. 蛋白冠进入细胞后可能会发生水解, 蛋白冠降解速率越慢, 细胞内抗氧化剂消耗越慢, 从而有助于抑制活性氧水平的升高. 研究发现, 人血白蛋白、免疫球蛋白和纤维蛋白原在纳米金表面形成三种

不同蛋白冠, 在进入 HeLa 细胞后发生降解. 白蛋白的水解速率大于其他两种蛋白, 相应地, 白蛋白-纳米金处理后的细胞活力低于球蛋白-纳米金和纤维蛋白原-纳米金处理后的细胞, 表明降解更慢的蛋白冠有助于维持更高的细胞活力^[58]. 最后, 蛋白质还可以通过减少 NPs 的摄取来降低细胞毒性. Kong et al^[59]报道牛血清白蛋白、牛转铁蛋白、牛免疫球蛋白和牛纤维蛋白原减少了 NPs 的细胞摄取, 从而抑制了由未修饰的纳米四氧化三铁 (20 nm) 引起的 HeLa 细胞自噬.

除了降低毒性, 也有少数报道指出蛋白冠可以增强细胞毒性. 蛋白冠进入细胞后会诱导一些调控蛋白的过量表达, 导致细胞功能异常. Li et al^[60]发现尽管人体血清降低了空气中纳米级 PM_{2.5} 颗粒与细胞膜的物理相互作用, 但与裸露的 NPs 相比, 有蛋白的 PM_{2.5} 颗粒大大促进了 α -平滑肌肌动蛋白的表达, 而 α -平滑肌肌动蛋白是异常增殖的标志之一, 因此纳米级 PM_{2.5} 表面的蛋白冠可以刺激人肺纤维细胞的异常增殖, 并可能进一步诱发人肺纤维化. 同时, 裸露的 NPs 在免疫系统中往往是“盲视”的, 而 NPs 表面组成复杂的蛋白冠可成为能够被模式识别受体识别的危险信号, 增加 NPs 被免疫系统检测到的机会, 诱导多种 NPs 对巨噬细胞的促炎反应^[25]. 这一领域最重要的例子是带负电荷的纳米金与血液中的纤维蛋白原相互作用, 结合并诱导蛋白原的展开, 当纳米金与白细胞表面整合素受体相互作用时, 使得 NF- κ B (核因子激活的 B 细胞的 κ -轻链增强) 信号通路被激活, 从而导致人髓系白血病单核细胞释放炎症因子^[53,61].

3 结论与展望

综上, 本文重点总结了近年来影响蛋白冠形成的因素和蛋白冠改变纳米材料生物学效应的研究和进展. 纳米颗粒进入生物体内会迅速和体液中的蛋白质相互作用形成“蛋白冠”, 而纳米颗粒理化性质 (化学组成、粒径、形状、表面修饰等) 和外界环境条件 (培养基组成、培养时间、温度、pH 等) 是影响蛋白冠形成的关键因素. 同时, 蛋白冠的存在使纳米颗粒自身特性发生改变, 从而影响纳米材料的生物吸收、生物分布和生物毒性. 关

于蛋白冠的形成及组成研究已有很多进展,目前最常用的蛋白结构分析法有动态光散射、差速离心沉淀法进法和透射电子显微法,蛋白定量分析技术有比辛尼酸分析法、布拉德福德测定法和热重分析法,蛋白质构象检测手段包括圆二色性光谱、傅里叶红外光谱、拉曼光谱和核磁共振光谱等。然而由于蛋白与 NPs 的结合机制多种多样,很多技术方法只能针对特定 NPs 表面蛋白冠的分析,存在很大的局限。同时,蛋白冠的演变是复杂的动态过程,给样品采集的实时性增加了难度。因此,未来需要考虑多技术方案,不仅要有效区分硬蛋白和软蛋白的组成,还要追踪纳米颗粒-蛋白复合体在生物体内的归趋。总之,了解蛋白冠-纳米颗粒复合体及其可能的动态变化对评估纳米材料在生物体内的分布和毒性至关重要,这将有助于纳米材料的有效功能设计和安全应用。

参考文献

- [1] Capjak I, Goreta S Š, Jurašin D D, et al. How protein coronas determine the fate of engineered nanoparticles in biological environment. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 2017, 68 (4): 245—253.
- [2] Dykman L, Khlebtsov N. Gold nanoparticles in biomedical applications: Recent advances and perspectives. *Chemical Society Reviews*, 2012, 41 (6): 2256—2282.
- [3] Elechalawar C K, Hossen M N, McNally L, et al. Analysing the nanoparticle-protein corona for potential molecular target identification. *Journal of Controlled Release*, 2020 (322): 122—136.
- [4] Di Gioacchino M, Petrarca C, Gatta A, et al. Nanoparticle-based immunotherapy: State of the art and future perspectives. *Expert Review of Clinical Immunology*, 2020, 16 (5): 513—525.
- [5] Qin M, Zhang J, Li M, et al. Proteomic analysis of intracellular protein corona of nanoparticles elucidates nano-trafficking network and nano-bio interactions. *Theranostics*, 2020, 10 (3): 1213.
- [6] Liu J, Peng Q. Protein-gold nanoparticle interactions and their possible impact on biomedical applications. *Acta Biomaterialia*, 2017 (55): 13—27.
- [7] Abdelhamid H N, Wu H F. Proteomics analysis of the mode of antibacterial action of nanoparticles and their interactions with proteins. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2015 (65): 30—46.
- [8] Ahsan S M, Rao C M, Ahmad M F. Nanoparticle-protein interaction: The significance and role of protein corona. *Cellular and Molecular Toxicology of Nanoparticles*, 2018: 175—198.
- [9] Walkey C D, Olsen J B, Song F, et al. Protein corona fingerprinting predicts the cellular interaction of gold and silver nanoparticles. *ACS Nano*, 2014, 8 (3): 2439—2455.
- [10] Saha K, Rahimi M, Yazdani M, et al. Regulation of macrophage recognition through the interplay of nanoparticle surface functionality and protein corona. *ACS Nano*, 2016, 10 (4): 4421—4430.
- [11] Chen D, Ganesh S, Wang W, et al. Plasma protein adsorption and biological identity of systemically administered nanoparticles. *Nanomedicine*, 2017, 12 (17): 2113—2135.
- [12] Jansch M, Stumpf P, Graf C, et al. Adsorption kinetics of plasma proteins on ultrasmall superparamagnetic iron oxide (USPIO) nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 2012, 428 (1—2): 125—133.
- [13] Gunawan C, Lim M, Marquis C P, et al. Nanoparticle-protein corona complexes govern the biological fates and functions of nanoparticles. *Journal of Materials Chemistry B*, 2014, 2 (15): 2060—2083.
- [14] Strojan K, Leonardi A, Bregar V B, et al. Dispersion of nanoparticles in different media importantly determines the composition of their protein corona. *PLoS one*, 2017, 12 (1): e0169552.
- [15] Xiao W, Gao H. The impact of protein corona on the behavior and targeting capability of nanoparticle-based delivery system. *International Journal of Pharmaceutics*, 2018, 552 (1—2): 328—339.
- [16] Jain P, Pawar R S, Pandey R S, et al. In-vitro in-vivo correlation (IVIVC) in nanomedicine: Is protein corona the missing link? *Biotechnology Advances*, 2017, 35 (7): 889—904.
- [17] Piella J, Bastús N G, Puntès V. Size-dependent protein-nanoparticle interactions in citrate-stabilized gold nanoparticles: The emergence of the protein corona. *Bioconjugate Chemistry*, 2017, 28 (1): 88—97.
- [18] Perevedentseva E, Cai P J, Chiu Y C, et al. Characterizing protein activities on the lysozyme and nanodiamond complex prepared for bio applications. *Langmuir*, 2011, 27 (3): 1085—1091.

- [19] Falahati M, Attar F, Sharifi M, et al. A health concern regarding the protein corona, aggregation and disaggregation. *Biochimica et Biophysica Acta: General Subjects*, 2019, 1863 (5): 971—991.
- [20] Yin M M, Dong P, Chen W Q, et al. Thermodynamics and mechanisms of the interactions between ultrasmall fluorescent gold nanoclusters and human serum albumin, γ -globulins, and transferrin: A spectroscopic approach. *Langmuir*, 2017, 33(21): 5108—5116.
- [21] Zhang H, Peng J, Li X, et al. A nano-bio interfacial protein corona on silica nanoparticle. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2018 (167): 220—228.
- [22] Visalakshan R M, García L E G, Benzigar M R, et al. The influence of nanoparticle shape on protein corona formation. *Small*, 2020, 16 (25): 2000285.
- [23] KantiáNandi C. Effect of surface chemistry and morphology of gold nanoparticle on the structure and activity of common blood proteins. *New Journal of Chemistry*, 2016, 40 (6): 4879—4883.
- [24] García - Álvarez R, Hadjidemetriou M, Sánchez - Iglesias A, et al. In vivo formation of protein corona on gold nanoparticles. The effect of their size and shape. *Nanoscale*, 2018, 10 (3): 1256—1264.
- [25] Liu N, Tang M, Ding J. The interaction between nanoparticles-protein corona complex and cells and its toxic effect on cells. *Chemosphere*, 2020 (245): 125624.
- [26] Lai W, Wang Q, Li L, et al. Interaction of gold and silver nanoparticles with human plasma: Analysis of protein corona reveals specific binding patterns. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2017 (152): 317—325.
- [27] Sakulkhu U, Mahmoudi M, Maurizi L, et al. Significance of surface charge and shell material of superparamagnetic iron oxide nanoparticle (SPION) based core/shell nanoparticles on the composition of the protein corona. *Biomaterials Science*, 2015, 3 (2): 265—278.
- [28] Breznica P, Koliqi R, Daka A. A review of the current understanding of nanoparticles protein corona composition. *Medicine and Pharmacy Reports*, 2020, 93 (4): 342.
- [29] Aggarwal P, Hall J B, McLeland C B, et al. Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2009, 61 (6): 428—437.
- [30] Pelaz B, Pino P D, Maffre P, et al. Surface functionalization of nanoparticles with polyethylene glycol: Effects on protein adsorption and cellular uptake. *ACS Nano*, 2015, 9 (7): 6996.
- [31] Maiorano G, Sabella S, Sorce B, et al. Effects of cell culture media on the dynamic formation of protein - nanoparticle complexes and influence on the cellular response. *ACS Nano*, 2010, 4 (12): 7481—7491.
- [32] Casals E, Pfaller T, Duschl A, et al. Time evolution of the nanoparticle protein corona. *ACS Nano*, 2010, 4 (7): 3623—3632.
- [33] Casals E, Pfaller T, Duschl A, et al. Hardening of the nanoparticle - protein corona in metal (Au, Ag) and oxide (Fe_3O_4 , CoO , and CeO_2) nanoparticles. *Small*, 2011, 7 (24): 3479—3486.
- [34] Hadjidemetriou M, Al-Ahmady Z, Kostarelos K. Time - evolution of in vivo protein corona onto blood - circulating PEGylated liposomal doxorubicin (DOXIL) nanoparticles. *Nanoscale*, 2016, 8 (13): 6948—6957.
- [35] Pisani C, Gaillard J C, Odorico M, et al. The timeline of corona formation around silica nanocarriers highlights the role of the protein interactome. *Nanoscale*, 2017, 9 (5): 1840—1851.
- [36] Rampado R, Crotti S, Caliceti P, et al. Recent advances in understanding the protein corona of nanoparticles and in the formulation of "Stealthy" Nanomaterials. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2020 (8): 166.
- [37] Nguyen V H, Lee B J. Protein corona: A new approach for nanomedicine design. *International Journal of Nanomedicine*, 2017 (12): 3137.
- [38] Bhogale A, Patel N, Mariam J, et al. Comprehensive studies on the interaction of copper nanoparticles with bovine serum albumin using various spectroscopies. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2014 (113): 276—284.
- [39] Mahmoudi M, Abdelmonem A M, Behzadi S, et al. Temperature: The "ignored" factor at the nanobio interface. *ACS Nano*, 2013, 7 (8): 6555—6562.
- [40] Lesniak A, Campbell A, Monopoli M P, et al. Serum heat inactivation affects protein corona composition and nanoparticle uptake. *Biomaterials*, 2010, 31 (36): 9511—9518.

- [41] Curtis C, Toghani D, Wong B, et al. Colloidal stability as a determinant of nanoparticle behavior in the brain. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2018 (170):673–682.
- [42] Pinals R L, Chio L, Ledesma F, et al. Engineering at the nano-bio interface: Harnessing the protein corona towards nanoparticle design and function. *Analyst*, 2020, 145 (15):5090–5112.
- [43] Tonigold M, Simon J, Estupiñán D, et al. Pre-adsorption of antibodies enables targeting of nanocarriers despite a biomolecular corona. *Nature Nanotechnology*, 2018, 13 (9):862–869.
- [44] Naidu P S R, Denham E, Bartlett C A, et al. Protein corona formation moderates the release kinetics of ion channel antagonists from transferrin-functionalized polymeric nanoparticles. *RSC Advances*, 2020, 10 (5):2856–2869.
- [45] Forest V, Pourchez J. Preferential binding of positive nanoparticles on cell membranes is due to electrostatic interactions: A too simplistic explanation that does not take into account the nanoparticle protein corona. *Materials Science and Engineering: C*, 2017 (70):889–896.
- [46] Ovais M, Nethi S K, Ullah S, et al. Recent advances in the analysis of nanoparticle-protein coronas. *Nanomedicine*, 2020, 15 (10):1037–1061.
- [47] Lesniak A, Fenaroli F, Monopoli M P, et al. Effects of the presence or absence of a protein corona on silica nanoparticle uptake and impact on cells. *ACS Nano*, 2012, 6 (7):5845–5857.
- [48] Smith P J, Giroud M, Wiggins H L, et al. Cellular entry of nanoparticles via serum sensitive clathrin-mediated endocytosis, and plasma membrane permeabilization. *International Journal of Nanomedicine*, 2012 (7):2045–2055.
- [49] Qiu Y, Liu Y, Wang L, et al. Surface chemistry and aspect ratio mediated cellular uptake of Au nanorods. *Biomaterials*, 2010, 31 (30):7606–7619.
- [50] Yallapu M M, Chauhan N, Othman S F, et al. Implications of protein corona on physico-chemical and biological properties of magnetic nanoparticles. *Biomaterials*, 2015 (46):1–12.
- [51] Stepien G, Moros M, Pérez-Hernández M, et al. Effect of surface chemistry and associated protein corona on the long-term biodegradation of iron oxide nanoparticles in vivo. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2018, 10 (5):4548–4560.
- [52] Corbo C, Molinaro R, Tabatabaei M, et al. Personalized protein corona on nanoparticles and its clinical implications. *Biomaterials Science*, 2017, 5 (3):378–387.
- [53] Lee Y K, Choi E J, Webster T J, et al. Effect of the protein corona on nanoparticles for modulating cytotoxicity and immunotoxicity. *International Journal of Nanomedicine*, 2015 (10):97–113.
- [54] Wang F, Yu L, Monopoli M P, et al. The biomolecular corona is retained during nanoparticle uptake and protects the cells from the damage induced by cationic nanoparticles until degraded in the lysosomes. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2013, 9 (8):1159–1168.
- [55] Clift M J D, Bhattacharjee S, Brown D M, et al. The effects of serum on the toxicity of manufactured nanoparticles. *Toxicology Letters*, 2010, 198 (3):358–365.
- [56] Tedja R, Lim M, Amal R, et al. Effects of serum adsorption on cellular uptake profile and consequent impact of titanium dioxide nanoparticles on human lung cell lines. *ACS Nano*, 2012, 6 (5):4083–4093.
- [57] Chong Y, Ge C, Yang Z, et al. Reduced cytotoxicity of graphene nanosheets mediated by blood-protein coating. *ACS Nano*, 2015, 9 (6):5713–5724.
- [58] Ma Z, Bai J, Jiang X. Monitoring of the enzymatic degradation of protein corona and evaluating the accompanying cytotoxicity of nanoparticles. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2015, 7 (32):17614–17622.
- [59] Kong H, Xia K, Ren N, et al. Serum protein corona-responsive autophagy tuning in cells. *Nanoscale*, 2018, 10 (37):18055–18063.
- [60] Li Y, Wang P, Hu C, et al. Protein corona of airborne nanoscale PM_{2.5} induces aberrant proliferation of human lung fibroblasts based on a 3D organotypic culture. *Scientific Reports*, 2018, 8 (1):1939.
- [61] Deng Z J, Liang M, Monteiro M, et al. Nanoparticle-induced unfolding of fibrinogen promotes Mac-1 receptor activation and inflammation. *Nature Nanotechnology*, 2011, 6 (1):39–44.

(责任编辑 杨 贞)