

二氧化硅纳米粒消化酶蛋白冠的形成及影响因素

邢 畅

(天津大学化工学院系统生物工程教育部重点实验室,天津 300350)

摘要:以胰蛋白酶和 α -糜蛋白酶为肠道内消化酶,在不同质量浓度蛋白酶存在的条件下,探究了不同粒径二氧化硅纳米粒蛋白冠的形成情况及其对蛋白酶活性和构象的影响。通过对酶吸附量、纳米粒粒径及 ζ 电位的检测和形貌的表征,得出二氧化硅纳米粒蛋白冠的形成与粒径大小、蛋白酶质量浓度有关,大尺寸纳米粒在高蛋白质量浓度下可吸附更多蛋白质,在蛋白酶质量浓度为0.5 mg/mL时,1 000 nm 二氧化硅纳米粒吸附胰蛋白酶和 α -糜蛋白酶的量为22.32 mg/m²及10.61 mg/m²。同时蛋白冠的形成会导致2种蛋白酶构象发生变化,抑制蛋白酶活性。

关键词:蛋白冠;胰蛋白酶; α -糜蛋白酶;二氧化硅纳米粒

中图分类号:R945

文献标志码:A

文章编号:0253-4320(2017)04-0071-04

DOI:10.16606/j.cnki.issn0253-4320.2017.04.017

Formation and influencing factors of protein corona on silicon dioxide nanoparticles

XING Chang

(Key Laboratory of Systems Bioengineering, Ministry of Education, School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300350, China)

Abstract: With trypsin and α -chymotrypsin as intestinal digestive enzymes, the formation of protein coronas on different silicon dioxide nanoparticles and their influence on the activity and conformation of the proteases are studied in the presence of different concentrations of protease. Based on enzyme adsorption quantity, nanoparticles size, detection of ζ potential and characterization of morphology, it is found that the formation of protein corona on silica nanoparticles is related to particle size of silica and concentration of protease. Large size nanoparticles could absorb more protein under high protein concentration. Silicon dioxide nanoparticles (1000 nm) could absorb 22.32 mg/m² of trypsin and 10.61 mg/m² of α -chymotrypsin when the concentration of protease is 0.5 mg/mL. The formation of protein corona could lead to the change of protease conformation and inhibit protease activity.

Key words: protein corona; trypsin; α -chymotrypsin; silicon dioxide nanoparticles

近年来,纳米材料广泛应用于化学、生物、医疗及药物制剂等领域^[1-3],具有尺寸小,比表面积大等优点,可进入细胞及细胞器等人体的各个角落,为纳米药物提供了巨大的发展空间,但同时也存在着一系列的生理毒性等问题^[4-6]。纳米颗粒进入生命体系后,很容易与生理环境中的各种蛋白分子发生相互作用,形成纳米颗粒-蛋白冠(nanoparticle-protein corona)^[7-10]。有研究表明,纳米药物进入血液后,表面会迅速被血浆中蛋白覆盖形成蛋白冠,影响血浆中蛋白的性质及纳米药物的功能^[11],如血清中免疫蛋白G吸附在纳米颗粒上会导致纳米粒在血液循环中被迅速清除,一些功能性蛋白也会由于纳米颗粒的存在致使其抗原决定簇被掩盖或功能紊乱而产生潜在毒性^[12-14]。目前,有关纳米粒进入肠道的吸收过程是否会吸附肠道内的多种消化酶并对肠道功能产生影响,纳米粒口服的安全性能否得到保障等方面的研究较少。笔者选取2种肠道内的主要消

化酶,对不同粒径的二氧化硅纳米粒在消化酶存在的环境下产生蛋白冠的情况进行模拟,并探究蛋白冠的形成对消化酶生物学特性的影响。

1 实验

1.1 材料

胰蛋白酶、 α -糜蛋白酶取自牛胰腺,购于Sigma Aldrich; *N*-苯甲酰-*L*-酪氨酸乙酯(BTEE)、*N* α -对甲苯磺酰基-*L*-精氨酸甲酯盐酸盐(TAME),质量分数为98%,购于上海阿拉丁公司;正硅酸乙酯、氨水、无水乙醇、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠,分析纯,购于天津市江天化工技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 不同粒径二氧化硅纳米粒的制备及表征

根据Stöber等^[15]所述方法制备SiO₂纳米粒,以正硅酸乙酯为原料,通过水解-缩合反应形成单分散球形SiO₂纳米粒,通过动态光散射测定样品水

合粒径及 ζ 电位,并用冷场发射扫描电子显微镜 S-4800(SEM)对其形貌进行表征。

1.2.2 二氧化硅纳米粒在蛋白酶溶液中的吸附

将制备的 3 种 SiO_2 纳米粒分别在 5 mL 0.05 mol/L, pH 6.8 的含有蛋白酶的磷酸盐缓冲液(PBS)中悬浮,其中含有胰蛋白酶或 α -糜蛋白酶(α -CT)的最终质量浓度分别为 0.5、0.2、0.05 mg/mL, SiO_2 纳米粒的最终质量浓度为 2 mg/mL。空白对照为含胰蛋白酶或 α -糜蛋白酶的质量浓度分别为 0.5、0.2、0.05 mg/mL 的 PBS 溶液。将悬浮液置于摇床中模拟肠道内环境,在 37°C, 80 r/min 条件下孵育 4 h 达到平衡状态。

1.2.3 二氧化硅纳米粒蛋白吸附量的测定

将 1.2.2 中孵育后的 SiO_2 -蛋白酶悬浮液及空白对照品在 13 000 r/min 条件下离心 10 min,将上清液用 BCA 试剂盒检测蛋白酶质量浓度,吸附在 SiO_2 纳米粒上的蛋白酶质量浓度即为: $C_{\text{空白}} - C_{\text{上清}}$ 。

1.2.4 蛋白冠二氧化硅纳米粒动态光散射及 ζ 电位测定

动态光散射(DLS)提供颗粒的流体动力学粒径分布,纳米颗粒与蛋白质结合后,可改变纳米粒表面电荷,纳米颗粒粒径及 ζ 电位的变化反映蛋白吸附情况。将 1.2.2 中孵育后的 SiO_2 -蛋白酶悬浮液在 13 000 r/min 条件下离心 10 min,沉淀重新分散在 PBS 中,洗涤,再次离心,反复 3 次将溶液中的蛋白酶清除,所得蛋白冠 SiO_2 纳米粒重新分散在 PBS 中,用马尔文粒度仪(Zetasizer nano ZS)测定其水合粒径及 ζ 电位。

1.2.5 蛋白冠二氧化硅纳米粒 SEM 形貌表征

将在 2 种 0.5 mg/mL 蛋白酶溶液中孵育的 SiO_2 纳米粒经 1.2.4 中所述的方法洗涤后重新分散在超纯水中,用扫描电子显微镜(SEM)进行观察,并与未在蛋白酶环境中孵育的纳米粒进行形貌对比。

1.2.6 蛋白冠二氧化硅纳米粒酶活的测定

利用 Hummel^[16] 所述方法检测 1.2.2 中所得的 3 种质量浓度酶孵育后的 2 种 SiO_2 -蛋白酶悬浮液的酶活性,并与相同质量浓度的胰蛋白酶、 α -糜蛋白酶溶液的酶活性进行对比,考察蛋白冠的形成对酶活性的影响。

1.2.7 蛋白冠构象检测

将 2 种 0.5 mg/mL 蛋白酶溶液中孵育的 SiO_2 纳米粒经 1.2.4 中所述的方法洗涤处理后进行稳态荧光及圆二色谱测试,空白对照为 0.1 mg/mL 胰蛋白酶及 α -糜蛋白酶溶液。荧光检测条件为:胰蛋白酶

$\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$, α -糜蛋白酶 $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$,发射光谱扫描范围为 300 ~ 500 nm。圆二色谱检测条件为: N_2 条件下,狭缝宽度为 1 nm,检测波长为 190 ~ 260 nm。

2 结果与讨论

2.1 二氧化硅纳米粒形貌分析

调节制备工艺中正硅酸乙酯、氨水、水及乙醇的比例,制备的不同粒径的二氧化硅的粒径及 ζ 电位如表 1 所示。由表 1 可以看出,所得 SiO_2 纳米粒水合粒径较均一, ζ 电位负电性较大,分散在水中比较稳定,表面光滑,圆整度很好,其 SEM 形貌如图 1 所示。

表 1 SiO_2 纳米粒粒径及 ζ 电位

样品	粒径/nm	ζ 电位/mV
1	100.2 ± 3.2	-36.4 ± 1.9
2	402.5 ± 4.3	-58.6 ± 0.9
3	1002.6 ± 2.8	-60.7 ± 2.1

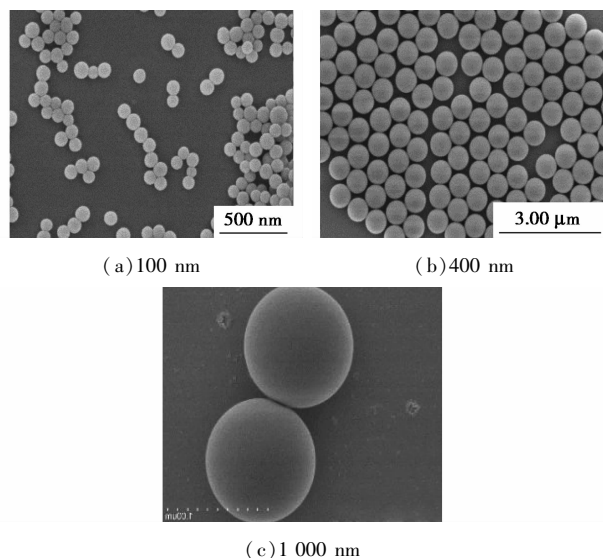


图 1 SiO_2 纳米粒 SEM 形貌图

2.2 二氧化硅纳米粒蛋白吸附量

实验结果表明, SiO_2 纳米粒在有蛋白酶存在的环境中会对 2 种蛋白酶产生吸附形成蛋白冠,以单位面积吸附蛋白酶量计算的吸附结果如表 2、表 3 所示。在 2 种蛋白酶分别存在的情况下,随着蛋白酶质量浓度及粒径的增加,吸附在 SiO_2 纳米粒上的量逐渐增加,在蛋白酶质量浓度为 0.5 mg/mL 时, 1 000 nm 二氧化硅纳米粒可吸附胰蛋白酶和 α -糜蛋白酶的量为 22.32 mg/m² 及 10.61 mg/m²。纳米粒的表面曲率对蛋白质的构型改变有重要的影响,纳米颗粒尺寸不同,蛋白质的表面覆盖明显不同,由于大尺寸纳米粒的表面可近似看作平面,可覆盖较多的蛋白质,而尺寸小的纳米颗粒会抑制蛋白的吸附,尤其是尺寸较大或者构型不容易改变的蛋白^[17]。

表2 不同粒径 SiO₂ 纳米粒对胰蛋白酶的吸附量

粒径/nm	胰蛋白酶吸附量/(mg·m ⁻²)		
	0.5	0.2	0.05
100	3.63	0.99	0.59
400	11.09	2.98	0.78
1000	22.32	3.21	0.91

表3 不同粒径 SiO₂ 纳米粒对 α-糜蛋白酶的吸附量

粒径/nm	α-糜蛋白酶吸附量/(mg·m ⁻²)		
	0.5	0.2	0.05
100	1.29	0.44	0.37
400	4.25	1.18	0.87
1000	10.62	5.98	2.23

2.3 二氧化硅纳米粒粒径及 ζ 电位的改变

SiO₂ 纳米粒吸附蛋白酶后粒径变化情况如表 4 所示。

表4 SiO₂ 纳米粒吸附蛋白酶后粒径变化

蛋白酶 质量浓度/ (mg·mL ⁻¹)	胰蛋白酶 吸附粒径/nm			α-糜蛋白酶 吸附粒径/nm		
	1	2	3	1	2	3
	0	100.2	402.5	1002.6	100.2	402.5
0.05	199.9	499.1	1919.0	152.2	578.5	2324.0
0.20	221.5	512.1	2013.0	159.6	619.9	2485.0
0.50	225.2	518.6	2275.0	167.4	653.7	3245.0

由表 4 可知,吸附胰蛋白酶后,原 100 nm SiO₂ 纳米粒粒径增加 90 ~ 120 nm; 400 nm SiO₂ 纳米粒粒径增加 100 ~ 120 nm; 1 000 nm SiO₂ 纳米粒粒径增加 900 ~ 1 200 nm。吸附 α-糜蛋白酶后,粒径增加量分别为 50 ~ 70、80 ~ 160、1 200 ~ 2 200 nm。

疏水性 SiO₂ 纳米粒表面带负电,对于 2 种带正电的蛋白酶有静电作用,因此,通过表面电位的改变可以间接反映出纳米粒吸附蛋白情况,如表 5 所示。由表 5 可以看出,2 种蛋白酶环境中存在的 SiO₂ 纳米粒表面 ζ 电位均有明显增加,可证明 SiO₂ 纳米粒表面蛋白冠的形成。

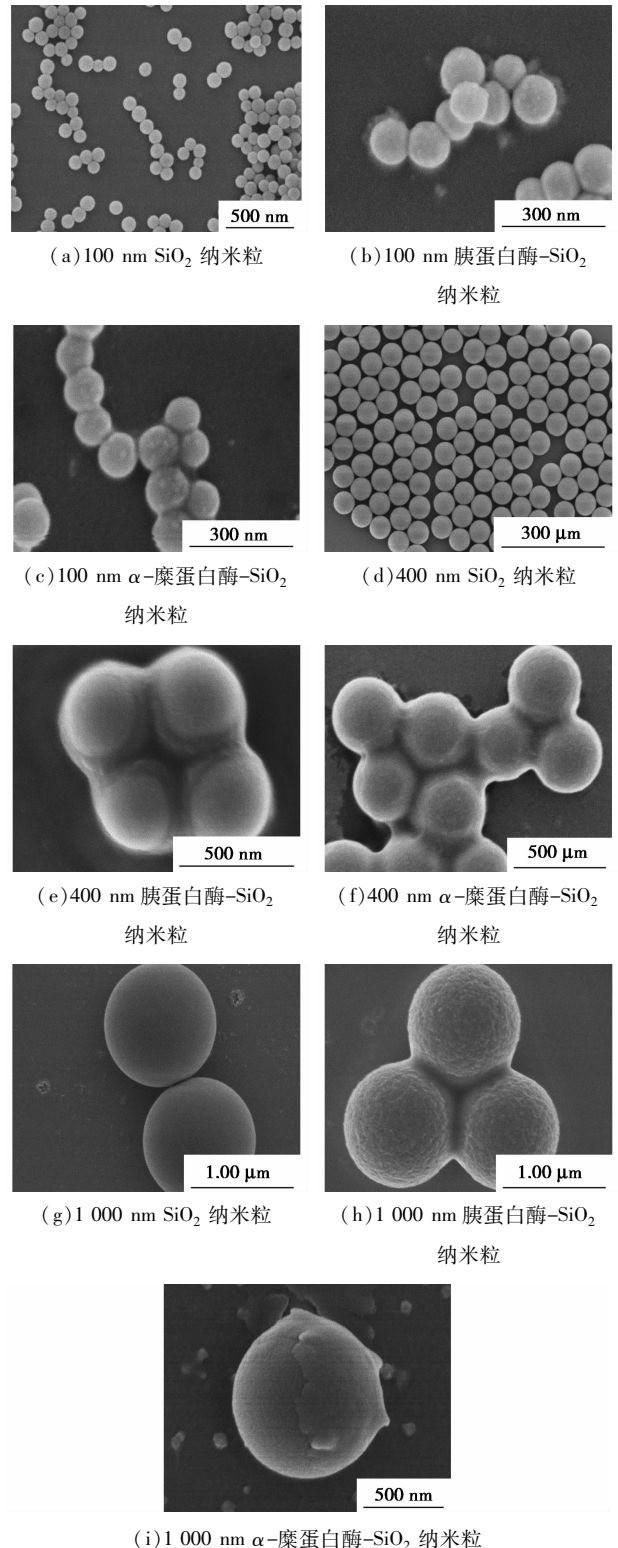
表5 SiO₂ 纳米粒吸附蛋白酶后 ζ 电位变化

蛋白酶 质量浓度/ (mg·mL ⁻¹)	胰蛋白酶 吸附粒径/nm			α-糜蛋白酶 吸附粒径/nm		
	1	2	3	1	2	3
	0	-36.4	-58.6	-60.7	-36.4	-58.6
0.05	-34.1	-47.7	-48.1	-28.2	-31.4	-30.5
0.20	-30.9	-41.7	-41.4	-27.7	-29.5	-29.2
0.50	-30.0	-38.5	-40.0	-27.2	-28.9	-26.3

2.4 蛋白冠二氧化硅纳米粒 SEM 形貌分析

蛋白冠 SiO₂ 纳米粒 SEM 形貌如图 2 所示,由

图 2 中可以看出,原 SiO₂ 纳米粒表面光滑,分散性较好,吸附蛋白冠以后的纳米粒表面被蛋白酶覆盖,有相互粘连的现象出现。

图2 SiO₂ 纳米粒吸附蛋白酶前后 SEM 图

2.5 二氧化硅纳米粒蛋白冠活性及构象分析

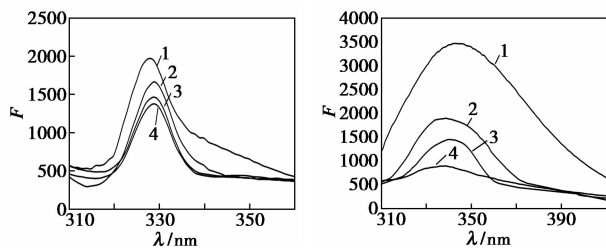
以等质量浓度的蛋白酶分解相应底物的活性为

100%，计算溶液中含有 SiO₂ 纳米粒时各体系酶的相对活性，结果如表 6 所示。由表 6 可以看出，各粒径 SiO₂ 纳米粒存在时，蛋白酶活性均受到抑制，1 000 nm SiO₂ 纳米粒存在时，2 种蛋白酶活性降低较大，而酶质量浓度越低吸附在纳米粒上的相对量越大，酶活性受到的抑制程度越大。

表 6 蛋白酶吸附在 SiO₂ 纳米粒表面后酶活变化

粒径/ nm	胰蛋白酶相对活性/%			α-糜蛋白酶相对活性/%		
	0.50	0.20	0.05	0.50	0.20	0.05
100	86.96	75.01	48.91	94.92	86.69	80.84
400	67.71	55.12	36.46	76.88	60.26	24.35
1000	66.67	39.13	28.53	40.13	35.49	20.29

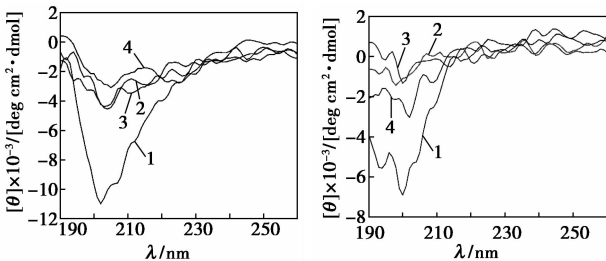
通过 2 种蛋白酶内部色氨酸 (Trp) 的内源荧光检测纳米颗粒作用后蛋白质微环境的改变，如图 3 所示。由图 3 中可看出，胰蛋白酶形成蛋白冠以后，最大发射波长发生红移，胰蛋白酶分子的微环境疏水性降低，极性增加，亲水性增大。α-糜蛋白酶形成蛋白冠以后，最大发射波长发生蓝移，并且随着粒径的减小，荧光发射峰强度显著下降并发生淬灭，SiO₂ 纳米粒与胰蛋白酶发生相互作用，微环境疏水性增加。



(a) 胰蛋白酶 (b) α-糜蛋白酶

1—0.1 mg/mL 蛋白酶; 2—1 000 nm 蛋白酶-SiO₂ 纳米粒;
3—400 nm 蛋白酶-SiO₂ 纳米粒;
4—100 nm 蛋白酶-SiO₂ 纳米粒

图 3 不同粒径 SiO₂ 纳米粒蛋白冠的荧光光谱



(a) 胰蛋白酶 (b) α-糜蛋白酶

1—0.1 mg/mL 蛋白酶; 2—1 000 nm 蛋白酶-SiO₂ 纳米粒;
3—400 nm 蛋白酶-SiO₂ 纳米粒;
4—100 nm 蛋白酶-SiO₂ 纳米粒

图 4 不同粒径 SiO₂ 纳米粒蛋白冠的圆二色谱

2 种蛋白酶在不同粒径 SiO₂ 纳米粒表面形成蛋白冠的圆二色谱图如图 4 所示。由图 4 可以看出，形成蛋白冠以后，胰蛋白酶 202 nm 处负峰为 α-螺旋，峰值显著减弱，α-糜蛋白酶的 α-螺旋同样数量减少，峰形接近于无规则卷曲形式，蛋白酶分子结构松散，氢键结构被破坏，酶结构发生破坏，这是由于胰蛋白酶活性受到抑制。

3 结论

二氧化硅纳米粒接触胰蛋白酶和 α-糜蛋白酶溶液时会对蛋白酶产生吸附作用形成蛋白冠，吸附蛋白的量与纳米粒粒径及蛋白酶质量浓度有关。纳米粒粒径越大，蛋白质量浓度越高，吸附蛋白质形成蛋白冠的质量越大，在蛋白酶质量浓度为 0.5 mg/mL 时，1 000 nm SiO₂ 纳米粒可吸附胰蛋白酶和 α-糜蛋白酶的量为 22.32 mg/m² 及 10.61 mg/m²。同时蛋白冠的形成对蛋白酶活性产生抑制，2 种蛋白酶二级结构发生变化。

参考文献

- [1] Zhu Y, Cai X Q, Li J, et al. Synchrotron-based X-ray microscopic studies for bioeffects of nanomaterials [J]. *Nanomedicine*, 2014, 10:515-524.
- [2] Gao J, Zheng Y, Jehng J M, et al. Identification of molybdenum oxide nanostructures on zeolites for natural gas conversion [J]. *Science*, 2015, 348:686-690.
- [3] Rawat P, Manghani K, Gupta S, et al. Talegaonkar. Design and development of bioceramic based functionalized PLGA nanoparticles of risedronate for bone targeting: In-vitro characterization and pharmacodynamic evaluation [J]. *Pharmaceutical Research*, 2015, 32: 3149-3158.
- [4] Hama S, Itakura S, Nakai M, et al. Overcoming the polyethylene glycol dilemma via pathological environment-sensitive change of the surface property of nanoparticles for cellular entry [J]. *Journal of Controlled Release*, 2015, 206:67-74.
- [5] Yameen B, Choi W I, Vilos C, et al. Insight into nanoparticle cellular uptake and intracellular targeting [J]. *Journal of Controlled Release*, 2014, 190:485-499.
- [6] Mahmoudi M, Lynch I, Eftehadi M R, et al. Protein-nanoparticle interactions: Opportunities and challenges [J]. *Chem Rev*, 2011, 111: 5610-5637.
- [7] 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 [J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2009, 61:428-437.
- [8] Monopoli M P, Walczyk D, Campbell A, et al. Physical-chemical aspects of protein corona: Relevance to in vitro and in vivo biological impacts of nanoparticles [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2011, 133:2525-2534.

(下转第 76 页)

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

天然鳞片石墨原料来自内蒙古兴和,系选矿和提纯后的产品,粒度 +0.30 mm (+50 目),固定碳质量分数为 98.86%。所用试剂 KMnO_4 (质量分数 $\geq 99.5\%$)、 HNO_3 (质量分数为 65% ~ 68%)、高氯酸(质量分数为 70% ~ 72%)、 H_2O_2 (质量分数为 30%),均为分析纯。用 AB204-S 电子天平称样,精度为 0.001 g,插层时使用 HH-4 电热恒温水浴锅控温;固液分离用 LD-5 盘式真空过滤机抽滤,用 101-3AB 电热鼓风干燥箱烘样,用 SRJX 型箱式电阻炉加热测定膨胀容积。石墨原料多元素分析结果如表 1 所示,X 射线衍射分析图谱如图 1 所示。

表 1 石墨原料化学多元素分析结果 %

元素	SiO_2	Al_2O_3	Fe_2O_3	Na_2O	MgO	K_2O
质量分数	0.060	0.008	0.012	0.004	0.006	0.002
元素	CaO	TiO_2	Cl	烧失量	固定碳	
质量分数	0.002	0.003	0.005	99.89	98.86	

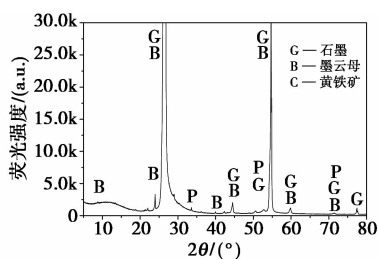


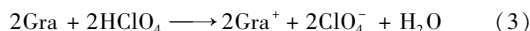
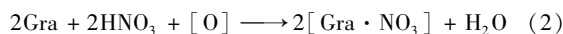
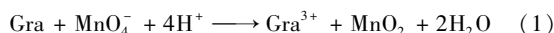
图 1 石墨原料 XRD 分析图谱

由表 1 可知,石墨原料固定碳的质量分数为 98.86%,属高碳石墨,杂质主要为硅、铝、铁;而钠、镁、钾、钙等质量分数较少。由 XRD 图谱可知,原料中主要矿物为石墨(Graphite),杂质有黑云母

(Biotite)、黄铁矿(Pyrite)。

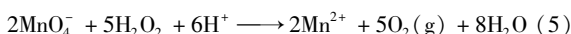
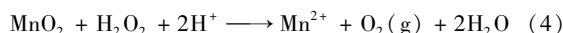
1.2 无硫可膨胀石墨制备原理

以高锰酸钾、硝酸和高氯酸作为制备可膨胀石墨的氧化剂以及插层剂,避免了含硫成分,可制得无硫可膨胀石墨。高锰酸钾可破坏石墨层间的范德华力,打开石墨层边缘,降低插层反应的活化能。硝酸分解的 NO_2 和硝酸中 NO_3^- 阴离子的大 π 键 π_3^4 都能够传递电子,促进氧化反应^[17]。理论上硝酸可轻易氧化石墨并进入石墨层间,但以硝酸作为氧化插层剂制备的可膨胀石墨插层不均匀。若只采用高锰酸钾则会大大增加可膨胀石墨的灰分,而加入硝酸可降低灰分。高氯酸为主插层剂,在高锰酸钾和硝酸辅助下插入石墨层间,形成石墨层间化合物。用高锰酸钾、硝酸和高氯酸制备可膨胀石墨的化学反应为:



其中,Gra 代表石墨。

由式(1)可知,高锰酸钾氧化石墨过程中生成难溶于水的 MnO_2 ,水洗过程中滴加少量过氧化氢不仅可以溶解 MnO_2 ,而且消耗剩余的高锰酸钾,使反应液脱色,减少水洗耗用量。过氧化氢与 MnO_2 和高锰酸钾的反应式为:



1.3 可膨胀石墨制备工艺与方法

以高锰酸钾和硝酸作氧化剂,高氯酸为插层剂,直接插层制备可膨胀石墨的试验流程如图 2 所示。

混酸由高氯酸和硝酸在室温下混合而成;准确称取 3.0 g 天然鳞片石墨、0.3 g 高锰酸钾;设定所需的反应温度和时间;反应过程中每隔 6 ~ 8min 搅

teins and peptides with nanoparticles [J]. ACS Nano, 2012, 6: 4585 - 4602.

[14] Deng Z J, Liang M, Toth I, et al. Molecular interaction of poly (acrylic acid) gold nanoparticles with human fibrinogen [J]. ACS Nano, 2012, 6: 8962 - 8969.

[15] Stöber W, Fink A, Bohn E. Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range [J]. Journal of Colloid and Interface Science, 1968, 26: 62269.

[16] Hummel B C W. A modified spectrophotometric determination of chymotrypsin, trypsin, and thrombin [J]. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology, 1959, 37(12): 1393 - 1399.

[17] Klein J. Probing the interactions of proteins and nanoparticles [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2007, 104: 2029 - 2030. ■

(上接第 74 页)

[9] Shemetov A A, Nabiev I, Sukhanova A. Molecular interaction of proteins and peptides with nanoparticles [J]. ACS Nano, 2011, 6: 4585 - 4602.

[10] Walkey C D, Chan W C. Understanding and controlling the interaction of nanomaterials with proteins in a physiological environment [J]. ChemInform, 2012, 41: 2780 - 2799.

[11] Salvati A, Pitek A S, Monopoli M P, et al. Transferrin-functionalized nanoparticles lose their targeting capabilities when a biomolecule corona adsorbs on the surface [J]. Nature Nanotechnology, 2013, 8: 137 - 143.

[12] Jansch M, Jindal A B, Sharmila B M, et al. Influence of particle shape on plasma protein adsorption and macrophage uptake [J]. Pharmazie, 2013, 68: 27 - 33.

[13] Shemetov A A, Nabiev I, Sukhanova A. Molecular interaction of pro-