

蛋白质折叠调控策略的研究进展

黄 帆^{1,2}, 曲敖廷², 王建祖², 安英丽², 史林启^{2*}

(1. 北京协和医学院 & 中国医学科学院放射医学研究所, 天津市放射医学与分子核医学重点实验室, 天津 300192; 2. 功能高分子材料教育部重点实验室, 南开大学高分子化学研究所, 天津化学化工协同创新中心, 药物化学生物学国家重点实验室, 天津 300071)

摘要:蛋白质作为生命的物质基础, 只有通过正确地折叠和组装, 形成精确的三维空间结构, 才能保持生理活性, 并在生命体中发挥其正常的生物学功能。一旦蛋白质发生错误折叠和异常的聚集, 不仅会丧失其生物活性, 还会导致阿尔兹海默症、帕金森症、亨廷顿氏舞蹈症等神经退行性疾病以及某些癌症, 对人类的生命健康构成了严重的威胁。因此, 如何有效地调控蛋白质折叠已成为生命科学研究中最具有挑战性的课题之一。本文在简单介绍蛋白质折叠机制的基础上, 综述了近年来蛋白质折叠调控策略的研究进展, 着重讨论了基于纳米材料的调控方法, 并评述了该领域研究的发展趋势和方向。

关键词:蛋白质折叠; 蛋白质聚集; 分子伴侣; 纳米材料

蛋白质是生命体中功能最全面和结构最复杂的一类生物大分子^[1]。作为生命体中一切细胞和组织的重要组成成分, 蛋白质以发挥催化作用的酶、用于细胞骨架的结构蛋白、具有运输代谢物质作用的转运蛋白、发挥新陈代谢调节作用的调节蛋白和具有防御功能的免疫蛋白等形式, 参与了生命体中几乎每一个生物学过程, 因此是生命活动的主要承担者^[2]。人体细胞通常可以表达超过 10000 种不同的蛋白质, 它们都是由上千个氨基酸分子按照一定的序列在核糖体上合成的多肽直链组成的。为了获得生物活性并发挥生物功能, 这些多肽链必须迅速蜷曲并且正确折叠成“天然状态”, 然后通过进一步自组装形成特定的三维空间结构。这种多肽链从线性的氨基酸序列一维结构转变为具有精确特征的三维结构, 从而形成具有活性的天然蛋白质的过程叫做蛋白质折叠^[3,4]。蛋白质折叠问题被列为“21 世纪的生物物理学”的重要课题, 已成为现代生命科学研究的重大挑战之一。

通常在生理条件下, 蛋白质的天然三维空间结构处于热力学最稳定的状态(见图 1), 这是由蛋白质的氨基酸序列和多肽链周围的环境因素共同决定的^[5,6]。虽然小分子蛋白质在稀释的缓冲溶液中可以用极短的时间折叠到天然构象(几微秒内)^[7], 但是更大的多结构域蛋白在体外可能需要几分钟甚至几个小时才能完成折叠^[8], 而且还常常无法达到它们的天然构象状态。事实上, 由于生物体细胞内的环境极度拥挤, 胞质蛋白的总量可以达到 300~400g/L, 因此蛋白质在体内正确折叠非常具有挑战性。与此同时, 细胞内的复杂环境使得各种功能性大分子之间的相互作用和相互影响大大增强, 这就增加了蛋白质错误折叠和聚集沉淀的倾向, 从而导致多肽链正确折叠形成功能性三维结构更加困难^[9]。因此, 在生物体内只有很小的一部分蛋白质可以自发地形成天然折叠构象^[10]。在拥挤的细胞环境中, 蛋白质主要是在分子伴侣和折叠酶等辅助因子的帮助下, 有效地进行正确的折叠、组装、转运和降解, 减少新生多肽链和蛋白质在环境压力的驱动下发生错误折叠和聚集的概率, 从而维持生物体内的蛋白质稳态^[11~13]。

蛋白质不但在体内很难自发地正确折叠形成功能性天然构象, 还很容易受到外界环境的影响(如高温高压、紫外线照射、强酸碱或者变性剂等), 导致其发生错误折叠和聚集, 从而丧失生物活性^[14], 如具有

10.14028/j.cnki.1003-3726.2015.09.005

收稿: 2015-07-31; 修回: 2015-08-05;

基金项目: 国家自然科学基金(91127045, 51390483)及 973 计划(2011CB932503)资助项目;

作者简介: 黄帆(1987—), 男, 博士, 助理研究员, 主要从事功能高分子自组装方面的研究;

* 通讯联系人: 史林启(1963—), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事功能高分子方面的研究; E-mail: shilinqi@nankai.edu.cn.

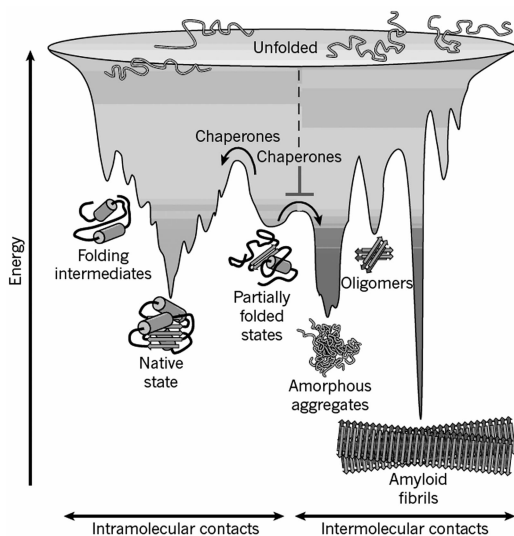


图 1 蛋白质正确折叠与错误聚集的相互竞争

Figure 1 Competing reactions of protein folding and aggregation

催化功能的酶等^[15,16]。某些特定的蛋白质错误折叠和聚集将会损害正常细胞的功能,甚至引起细胞凋亡,从而导致某些病理学反应,它们被称为蛋白质错误折叠疾病或者蛋白质构象疾病^[17]。现在已被广泛证明,包括阿尔兹海默症、帕金森症、亨廷顿氏舞蹈症等神经退行性疾病和癌症在内的各种各样的疾病都与蛋白质的错误折叠有着十分紧密的联系^[18]。因此,建立蛋白质折叠有效的调控方法和开发高效的蛋白质聚集抑制剂已经成为生物学、化学、材料学和医学等领域的热门研究方向。近年来,人们已经摸索出了许多调控蛋白质折叠、避免蛋白质聚集和保护蛋白质活性的技术和方法。本文将从蛋白质折叠中间体原理出发,综述近年来蛋白质折叠调控策略的研究进展,重点讨论基于纳米材料的调控方法,并在此基础上,评述该领域研究的发展趋势和方向。

1 蛋白质折叠中间体原理

虽然蛋白质折叠的研究起始于上世纪 70 年代初期^[19],但是迄今为止人们对于蛋白质折叠和聚集的确切机制仍不清楚^[20]。不过随着先进分析仪器的不断引入和系统性的深入研究,蛋白质折叠中间体原理得到了越来越多科学家的接受^[21,22]。图 2 显示了蛋白质折叠过程中不同的构象状态及它们之间的相互转化。遗传信息按照中心法则经过转录-翻译后,在核糖体上合成的新生多肽链是未折叠的,处于伸展状态(Unfolded)^[23]。正常地,这些初始状态的多肽链在拥挤的细胞环境中会迅速地自动蜷曲形成部分折叠的中间体(Partially unfolded),然后在自身氨基酸残基之间的相互作用和分子伴侣的辅助下进一步折叠成具有天然构象的活性蛋白质(Native)。然而在大多数情况下,由于热力学不稳定的部分折叠中间体表面暴露有大量的疏水性氨基酸残基,因此多肽链很容易通过分子间的疏水和氢键等相互作用发生错误折叠并聚集形成结构不同的聚集体,如无序形聚集体(Disorder aggregates)和结构高度有序的淀粉样纤维(Amyloid fibrils)等^[24]。蛋白质这些不同的构象状态在生物环境中可以通过分子伴侣、泛素-蛋白酶体降解和细胞自我吞噬等途径完成相互转化,从而维持生物体内的蛋白质稳态^[25,26]。

2 蛋白质折叠的调控策略

根据日臻成熟的蛋白质折叠中间体理论可知,加快蛋白质从折叠中间态向天然态的转变,抑制多肽链分子间的疏水和氢键等相互作用导致的不可逆聚集,是调控蛋白质正确折叠的关键。近年来的蛋白质

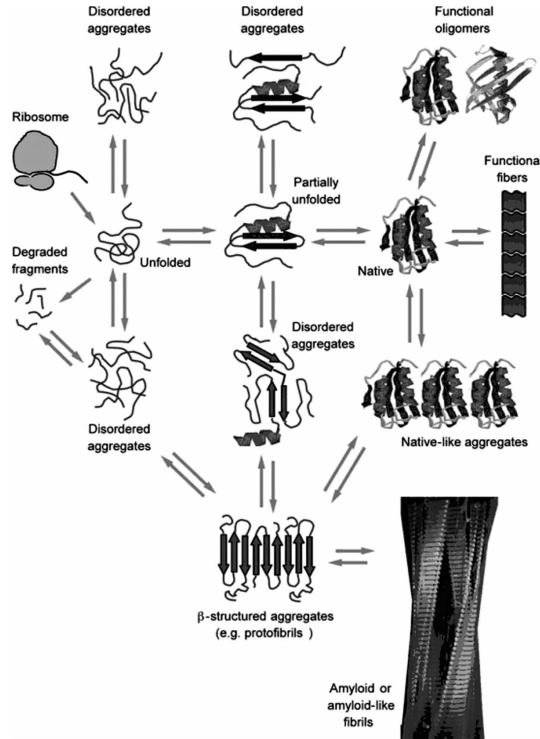


图 2 多肽链的不同结构形态及其之间相互转化关系图

Figure 2 A unified view of some of the types of structure that can be formed by polypeptide chains and the means by which they can be interconverted

折叠调控策略研究,正是基于这一思路展开的。目前,文献中报道较多的包括蛋白质折叠助剂、小分子与多肽抑制剂和基于纳米材料的调控方法。

2.1 蛋白质折叠助剂

蛋白质折叠助剂(Folding Aids)指的是能够辅助蛋白质从部分折叠的中间态向正确折叠的天然活性状态转变的物质。最为常见的折叠助剂主要包括表面活性剂、渗透剂和脂质体等。折叠助剂的主要作用是通过促进蛋白质的正确折叠,减少其错误折叠和聚集的概率,从而提高具有正确的天然结构的蛋白质的收率。但是对于不同的折叠助剂,其作用机理各不相同,因此适用范围也存在差异。

表面活性剂的分子结构具有两亲性,能够很好地屏蔽蛋白质不稳定中间态暴露在表面的疏水作用位点,因此可以有效地阻止蛋白质聚集,促进蛋白质复性^[27]。目前,借助表面活性剂辅助蛋白质折叠的方法主要有胶束辅助法、反相胶束法和人工分子伴侣法:(1)胶束辅助法是由 Tandon 和 Horowitz 首创的^[28],他们利用非离子表面活性剂十二烷基麦芽苷成功地辅助了盐酸胍变性的硫氰酸酶复性,而且发现在一定的蛋白质浓度条件下,复性率会随着表面活性剂浓度的增加而迅速增大,当达到一定的极值后又逐渐减小。有研究者指出当表面活性剂的浓度高于其临界胶束浓度时,会以胶束的形式与蛋白折叠中间体的疏水位点相结合形成复合物,从而抑制蛋白质自身的聚集并辅助其复性,这一推测通过实验已得到了验证^[29];(2)Hagen 等在 1990 年设计出了反相胶束法,实质是利用表面活性剂 AOT 和异辛烷在溶液中形成稳定的反相胶束,并通过控制条件使每一个反相胶束中仅包含一个蛋白质分子,这样就可以保持蛋白质分子折叠的独立性,避免其与相邻的蛋白质分子相互作用导致聚集^[30]。虽然经过这种方法处理的变性蛋白质复性率较高,但是过程中需要加入大量的表面活性剂和有机溶剂,操作复杂,成本较高,而且只有破坏反相胶束后才能得到最终产品,因此分离过程比较困难;(3)受天然分子伴侣辅助蛋白质复性的启发,Rozema 和 Gellman 在胶束辅助法的基础上提出了人工分子伴侣法,其基本原理分为两步(如图 3 所示):首先采用表面活性剂与变性的蛋白质通过疏水作用相结合形成复合物,抑制肽链间的相互聚

集,这一过程称为“捕获阶段”;然后向体系中加入环糊精等剥离剂,使之通过强烈的竞争性结合作用将表面活性剂与蛋白质分离,从而释放出正确折叠的蛋白质,因此被称为“剥离阶段”^[31]。Gellman 等成功地把这种人工分子伴侣的方法应用于碳酸酐酶 B、柠檬酸合成酶和溶菌酶的复性中,并且利用圆二色光谱分析证实了表面活性剂与变性蛋白所形成的复合物的存在^[32~34]。与 GroE 体系等天然分子伴侣相比,这种人工分子伴侣的方法具有成本低廉、性质稳定并有利于提高工业生产效率等优点。

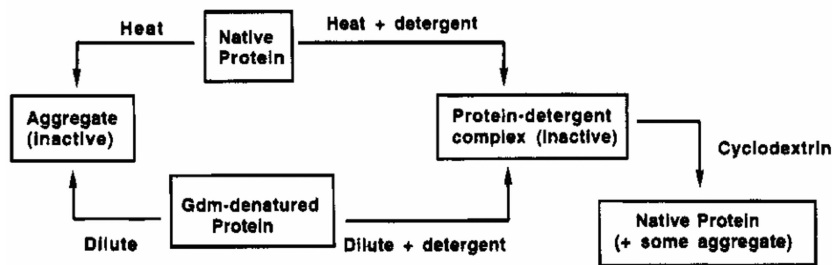


图 3 人工分子伴侣辅助蛋白质折叠的过程图

Figure 3 Schematic view of artificial chaperone-assisted protein refolding

折叠助剂中的渗透剂主要包括聚乙二醇^[35]、L-精氨酸^[36]、甘油^[37]、尿素^[38]、盐酸胍^[39]、环糊精^[40]、海藻糖^[41]、脯氨酸^[42]、甜菜碱^[43]等。虽然添加渗透剂辅助蛋白折叠的机理尚不完全清楚,但一般认为主要是以下两个原因:(1)稳定天然蛋白质的结构,使错误折叠的蛋白质不稳定;(2)提高蛋白折叠中间态的溶解性。不同渗透剂的作用机理不同。例如,聚乙二醇可以与蛋白的折叠中间态短暂地结合,提高折叠中间体的溶解性并降低其聚集率。海藻糖具有提高天然态蛋白质热力学稳定性的作用,从而抑制变性蛋白质不可逆聚集体的形成。低浓度的变性剂的作用(如盐酸胍)则是降低错误折叠蛋白质的稳定性,从而促进蛋白质的复性。这些渗透剂虽然复性效果一般,但是价格低廉且比较易于分离,因此具有一定的使用价值。

至于脂质体,目前认为它可以与蛋白折叠中间体结合,通过促进形成正确的二硫键,提高复性的收率。这种方法专一性强,但是应用范围比较有限,现有的研究结果仅涉及溶菌酶等少数几种酶的复性体系^[44,45]。

2.2 小分子和多肽抑制剂

设计一些干扰和阻止蛋白质的聚集过程的小分子化合物抑制剂是研发治疗蛋白质聚集疾病药物的重要方向之一。传统的抑制剂主要包括有机小分子抑制剂和多肽抑制剂。大量的研究表明,表面活性剂、铜/锌离子螯合剂、已知的生物活性分子(例如白藜芦醇、姜黄素、阿朴吗啡等)和染料分子(如刚果红、硫磺素以及它们的衍生物)都可以调控淀粉样蛋白聚集结构^[46]。另一方面,与小分子抑制剂相比,多肽抑制剂具有优良的生物相容性和较低的免疫原性,因此也被人们广泛关注。这些多肽抑制剂大多是形成淀粉样聚集的最小多肽片段的衍生物,例如 β -淀粉样蛋白(A β)的疏水核心区 16~20 位氨基酸(KLVFF)和人胰岛淀粉样蛋白(hIAPP)的 20~25 位氨基酸(SNNFGA)等^[47,48]。目前,利用 β -折叠抑制剂(脯氨酸,D-缩氨酸类肽)通过点替换和 N-甲基化等化学修饰是获得新型多肽抑制剂的最常用的办法^[49]。这些抑制剂往往是通过替换作用破坏淀粉样蛋白之间形成的氢键网络结构,从而抑制淀粉样聚集体的形成(见图 4)^[50]。尽管上述提到的许多抑制剂在体外的细胞实验中展现出具有抑制蛋白聚集诱导的细胞毒性的作用,甚至有的还可以缓解患有蛋白聚集疾病的转基因老鼠的症状,但是需要指出的是,它们作为临床治疗药物都具有强烈的副作用。

2.3 基于纳米材料的调控方法

近年来,随着纳米技术的快速发展,越来越多的纳米材料被应用于药物控制释放、生物成像和疾病诊断等生物医药领域。一般情况下,纳米材料由于相对较大的比表面积使其具有优异的吸附能力,因此它

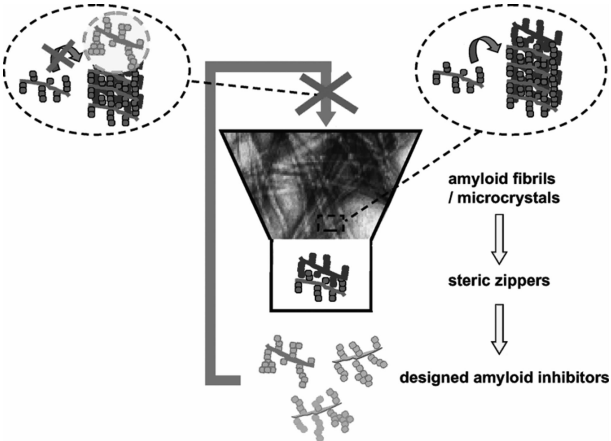


图 4 Eisenberg 课题组基于多肽抑制剂的设计。抑制剂用于(a)与 A β 蛋白的 β 折叠紧密结合并 (b)通过其与 A β 蛋白的侧链位阻效应阻断 A β 蛋白的进一步聚集

Figure 4 Design of peptide-based inhibitors of amyloid formation as described by Eisenberg et al. Inhibitors were designed to a) bind tightly to existing amyloid b sheets and b) block addition of further amyloid peptide β strands (inset, top right) through side-chainmediated steric clashes between the inhibitor (green structure in yellow circle; inset, top left) and the amyloid peptide (inset, top left)

们能够很容易地结合或者负载小分子药物、探针和蛋白质等其它分子。由于蛋白质是生命体中最重要的一类生物大分子,因此研究纳米材料与蛋白质之间的相互作用具有十分重要的意义。大量研究表明,蛋白质与纳米粒子的表面结合往往会使蛋白的构象发生变化,并且还会影响其折叠与聚集的过程,这引起了人们极大的兴趣和广泛的关注^[51]。目前,调控蛋白质折叠与聚集的纳米材料最具有代表性的有两类——无机纳米粒子和高分子纳米材料。

2.3.1 无机纳米粒子 无机纳米粒子通常是非常稳定的,不易被分解,特别是暴露在热、光和酸等条件下。与此同时,它们能够提供较高的比表面积和良好的吸附性能,并且具有可控的形貌和尺寸以及独特的光学、电学和磁学等优良的性能。几种典型的无机纳米粒子显示出潜在的调控蛋白折叠应用前景,主要包括金纳米粒子、磁性纳米粒子和量子点等。

2.3.1.1 金纳米粒子 金纳米粒子不仅易于合成,具有较好的化学稳定性和生物相容性,而且由于其高密度和特有的光学性质,所以很容易被人们利用显微镜技术和光谱技术检测。与此同时,各种各样具有生物学应用的基团或试剂可以通过金-硫醇之间的化学反应被修饰到金纳米粒子的表面,使其表面功能化。因此,金纳米粒子能够监测蛋白质-蛋白质之间的相互作用,可以被广泛地应用于免疫组织化学、光热疗法和放射疗法、分子成像造影剂等方面^[52]。更重要的是,金纳米粒子可以调控蛋白质折叠的结构与活性^[53~55],并且可以作为有效的抑制剂和筛选剂用于抗淀粉样蛋白的聚集和纤维化^[56,57]。

Rotello 课题组通过化学修饰的办法制备了表面阴离子功能化的金纳米粒子,并研究了它与糜蛋白酶之间的相互作用^[58]。研究表明,由于糜蛋白酶的活性中心被一圈阳离子氨基酸残基所包围,因此这种表面带有负电性的金纳米粒子可以通过强烈的静电作用与蛋白质结合,使蛋白质的结构发生变化,诱导蛋白质变性,从而抑制了酶的活性(见图 5A)。随后,研究者们利用不同的阳离子表明活性剂破坏了糜蛋白酶与金纳米粒子之间的“不可逆”相互作用,使蛋白质被释放出来从而恢复酶活性,并通过动态光散射实验和酶活性测试得以证实。与此同时,研究者们对这种蛋白的复性过程提出了两种不同的机制,如图 5B 所示。第一种可能的作用机制是烷基链表面活性剂 1 在金纳米粒子表面附近形成双层结构,导致蛋白质被释放出来;另一种机制是烷基链表面活性剂 2 和 3 通过直接与金纳米粒子表面的单修饰层相互作用或者修饰链的替换将蛋白质释放出来。这些研究结果为调控蛋白质折叠促进其复性开辟了一个新的途径。

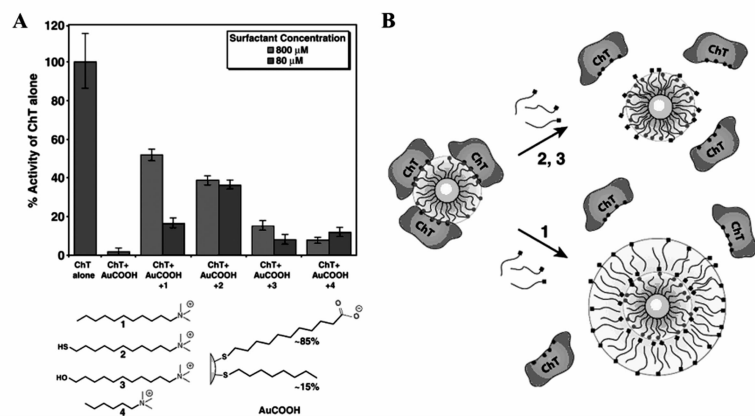


图 5 (A)通过将 ChT 结合到 AuNPs 表面实现表面活性剂为媒介的酶活性保护；
(B)利用表面活性剂将 ChT 从单层修饰的 AuNPs 表面剥离的示意图

Figure 5 (A) Surfactant mediated restoration of enzymatic activity of ChT bound to AuNPs surface;
(B) Schematic representation of monolayer modification on surfactant addition resulting in disassociation of ChT from AuNPs

随后, Rotello 等^[59] 还利用这种表面带有大量负电荷的金纳米粒子作为人工分子伴侣, 与阳离子蛋白质(糜蛋白酶、溶菌酶和木瓜蛋白酶)通过静电作用形成复合物, 从而阻止蛋白质在高温条件下失活聚集。然后通过加入 100mM NaCl 提高溶液的离子强度, 降低蛋白质与金纳米粒子的静电相互作用, 使恢复活性的蛋白质从复合物上脱离, 从而辅助完成蛋白质复性的过程, 如图 6 所示。

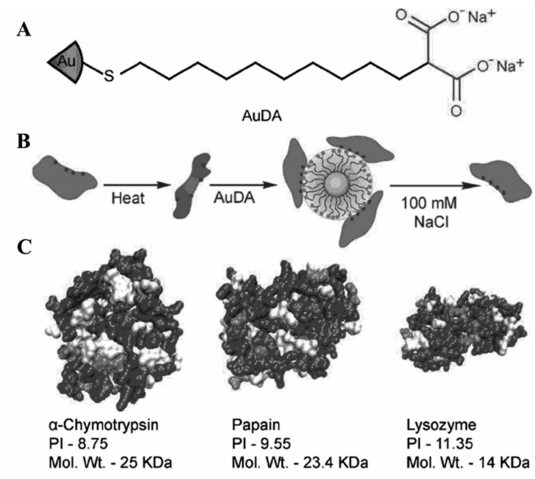


图 6 (A)表面负电性的 AuDA 的结构及(B)以 AuDA 为媒介在热失活条件下辅助正电性蛋白质重折叠的示意图。
(C)在重折叠研究中使用的三种正电性蛋白质的表面结构特征图。颜色注释:碱性残基(蓝色),酸性残基(红色),
极性残基(绿色)以及非极性残基(灰色)。

Figure 6 (A) Schematic representation of the structure of the negative charged AuDA and (B) thermal denaturation followed by nanoparticle mediated refolding of positive charged proteins. (C) Surface structural features of three positively charged proteins used in the refolding study. Colour scheme for the proteins: basic residues (blue), acidic residues (red), polar residues (green) and nonpolar residues (grey).

金纳米粒子在干扰淀粉样蛋白聚集过程和淀粉样蛋白疗法方面的应用也具有十分广泛的研究。由于金纳米粒子具有较高的比表面积, 因此它很容易与蛋白质相互作用。Chen 等研究了金纳米粒子对于 $A\beta_{40}$ 蛋白聚集过程的影响, 他们发现裸金纳米粒子可以通过使 $A\beta$ 蛋白形成较小的纤维片段或者球形低聚物, 达到抑制 $A\beta$ 纤维化的效果^[60]。除了裸金纳米粒子, 金纳米粒子的表面修饰对于影响淀粉样聚集过程同样具有重要作用, 如表面电荷、反应性配体或靶向特异性结合的抗体等。溶菌酶形成的淀粉样聚集

体可以被表面覆盖谷胱甘肽(GSH)的金纳米粒子破坏,而单独的 GSH 不显示任何明显的效果^[61]。人们合成了表面修饰 *N*-乙酰基-*L*-半胱氨酸(NAC)和 3-巯基丙酸(MPA)的金纳米粒子并研究表面电荷对于淀粉样聚集的影响,结果发现微量负电荷的 NAC 似乎与淀粉样纤维之间具有更强的相互作用^[62]。这些研究结果都证实了金纳米粒子干扰蛋白质聚集过程的可能性。

2.3.1.2 磁性纳米粒子 磁性氧化铁纳米粒子作为纳米载体具有很多优点,如良好的磁性能、生物相容性、生物可降解性、相对低毒性、化学稳定性、容易合成、结构和性能易于控制、价格低廉等。如今,磁性纳米粒子作为一种智能化材料,在药物输送、细胞分离、酶固定化、DNA 提取和磁共振成像等生物医学领域的研究已被广泛报道^[63]。除此之外,为了揭示蛋白质聚集和磁性纳米粒子之间的关系,人们也进行了许多相关方面的研究。

Margel 课题组合成了粒径为 15.0 ± 2.1 nm 的磁赤铁矿($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$)纳米粒子,然后研究了这种磁性纳米粒子对于胰岛素聚集过程的影响^[64]。结果发现, $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 纳米粒子虽然不能影响胰岛素的纤维化聚集动力学过程,但是能够选择性地与胰岛素纤维结合,所以这种淀粉样纤维/ $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 纳米粒子的组装体可以通过磁场从水溶液中完全除去。因此,这种选择性萃取的方法对于由淀粉样蛋白聚集导致的疾病具有很好的应用潜力。

最近,Mahmoudi 等则系统地研究了具有超顺磁性的氧化铁纳米粒子(SPIONs)与淀粉样蛋白之间的相互作用,如图 7 所示^[65]。结果发现,SPIONs 的物理化学性质,如表面涂层、表面电荷、粒子浓度等,都会对 $\text{A}\beta$ 蛋白的纤维化动力学过程产生不同的影响。在 SPIONs 存在的条件下, $\text{A}\beta$ 蛋白聚集过程中的滞后阶段或者生长阶段会发生变化。同时,SPIONs 的表面积对于 $\text{A}\beta$ 纤维化聚集具有“双重”效果,即低浓度的 SPIONs 会抑制蛋白的聚集,而高浓度的 SPIONs 会加快 $\text{A}\beta$ 纤维化的速率。另外,表面带有正电荷的 SPIONs 比负电荷或者不带电荷的 SPIONs 更倾向于促进蛋白的聚集。

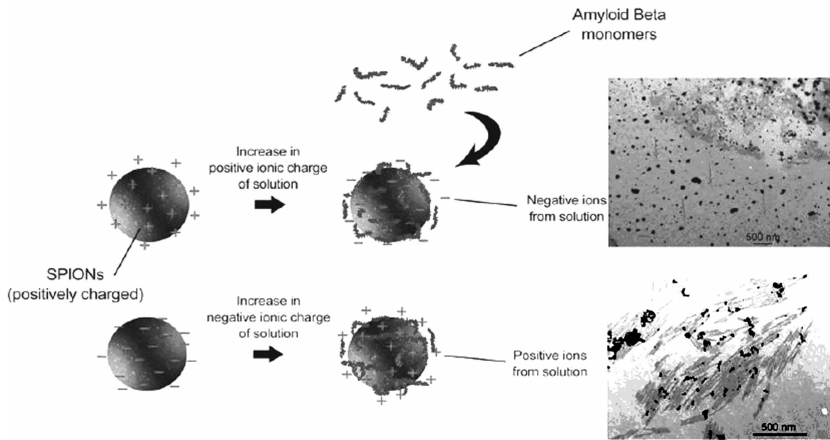


图 7 超顺磁性氧化铁纳米粒子在溶液中对 $\text{A}\beta$ 蛋白聚集的影响

Figure 7 The influence of the physiochemical properties of superparamagnetic iron oxide nanoparticles on amyloid β protein fibrillation in solution

鉴于磁性纳米粒子的特殊性质,利用其将淀粉样变性疾病的诊断和治疗相结合是一种非常有应用前景的方法。Skaat 和 Margel 通过沉淀法对 HSA 对带有荧光素的 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 纳米粒子修饰一层人血清白蛋白,然后将不同的多肽片段利用 PEG 连接在纳米粒子表面,制备了具有生物活性的荧光磁性氧化铁纳米粒子($\text{F-}\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3 \sim \text{HSA-PEG-peptides nanoparticles}$)^[66]。他们发现这种纳米粒子可以有效地调控 $\text{A}\beta_{40}$ 淀粉样蛋白纤维形成的动力学过程,如图 8 所示。值得注意的是,这种具有荧光的磁性纳米粒子能够同时用于磁共振成像和荧光成像,因此可能成为一种潜在的监测 $\text{A}\beta$ 蛋白聚集过程的有效工具。

2.3.1.3 量子点 量子点凭借其独特的性质得到了广泛的关注,如优良的光致发光性能、激发光谱宽且连续分布,发射光谱窄且对称、颜色可调、光化学稳定性高、荧光寿命长、水溶性和生物相容性好等。除了

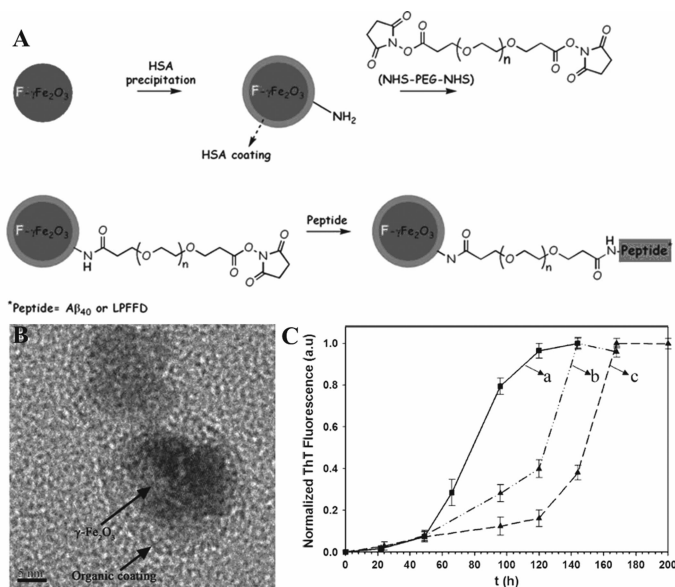


图 8 (A) F- γ -Fe₂O₃ 纳米粒子表面通过共价键结合 A β ₄₀ 和 LPFFD 多肽的过程。

(B) 表面修饰多肽后的 F- γ -Fe₂O₃ 纳米粒子的高分辨率透射电子显微镜照片。

(C) F- γ -Fe₂O₃ ~ HSA-PEG-LPFFD 纳米粒子对于 A β ₄₀ 聚集过程的影响。

Figure 8 (A) Covalent conjugation of the A β ₄₀ and the LPFFD peptides to the F- γ -Fe₂O₃ nanoparticles.

(B) HRTEM images of the F- γ -Fe₂O₃ ~ HSA-PEG-peptides nanoparticles.

(C) Kinetics of A β ₄₀ aggregation with and without F- γ -Fe₂O₃ ~ HSA-PEG-LPFFD nanoparticles.

在细胞标记和组织成像方面具有十分重要的应用前景,利用量子点调控蛋白质折叠与聚集过程的研究也越来越多。

一般而言,通过不同的封端剂调控量子点的结构会加速或者抑制淀粉样蛋白的聚集过程^[67]。Vannoy 等向人血清白蛋白体系中加入二氢硫辛酸(DHLA)改性的量子点,结果发现这种水溶性的量子点可以作为成核中心促进 HSA 的聚集和蛋白纤维的形成^[68]。Li 课题组通过研究发现表面覆盖 N-乙酰-L-半胱氨酸的 CdTe 量子点(NAC-QDs)在生理 pH 条件下能够极大地抑制 A β 多肽的成核和生长过程,从而阻止 A β 纤维的形成,并且这种影响具有浓度依赖性。这种抑制效果很有可能是由于 NAC-QDs 和淀粉样纤维之间具有很强的氢键作用,导致核纤维、原纤维和成熟纤维上的生长的活性位点被屏蔽造成的^[69]。随后,Li 课题组进一步研究了不同尺寸和表面功能化的量子点对于 A β ₄₀ 纤维化过程的影响。结果显示,纳米粒子尺寸大小和所带电荷微小的变化都有可能对于淀粉样蛋白聚集产生相反的效果,因此纳米粒子的电荷-表面积比例、功能化基团和浓度对于调控蛋白质聚集都是十分关键的^[70]。最近,Li 等还发现 NAC-QDs 还可以降低淀粉样蛋白诱导的细胞毒性,具有保护神经元细胞的功能^[71]。

值得一提的是,Kotov 课题组采用了与其它量子点不同的方法,利用巯基乙酸稳定的 CdTe 量子点(TGA-QDs)强烈地抑制了 A β ₄₀ 蛋白的聚集过程^[72]。在这种情况下,TGA-QDs 与一些蛋白质具有类似的尺寸、电荷和结合能力,所以和多肽类的抑制剂更为相似。TGA-QDs 的分子结构如图 9 所示。这项研究进一步证明,在纳米粒子表面进行精妙的化学修饰可以有效地调控蛋白的聚集过程,并为设计理想的纳米粒子用于调控蛋白折叠提供了重要的依据。

Hong 等利用化学改性的方法将链末端功能化的硫代烷基和硫代烷基化的乙二醇寡聚物(OEG)配体修饰到硒化镉(CdSe)量子点表面,制备了不同表面功能化的水溶性 CdSe 纳米粒子,并研究了糜蛋白酶与这些表面性质不同的 CdSe 之间的相互作用^[73]。实验结果表明,以 OEG 的羟基为末端的纳米粒子与糜蛋白酶之间没有相互作用,以羧基硫代烷基配体为末端的纳米粒子会导致糜蛋白酶变性失活,而以

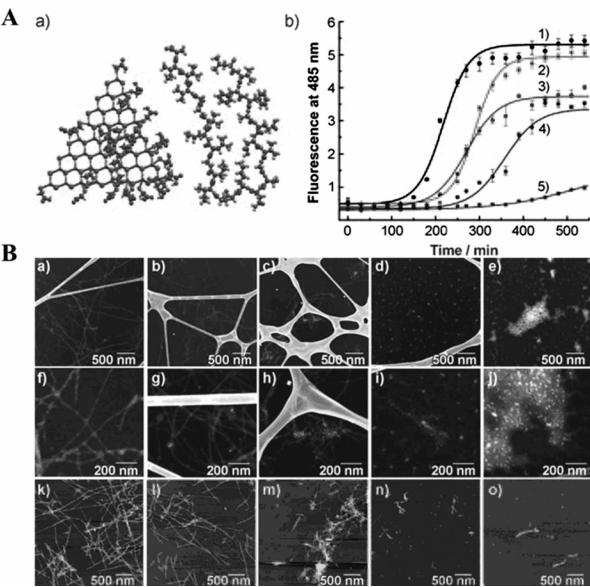


图 9 (A)CdTe 纳米粒子与 Aβ₄₂ 在结构上的相似性。用 ThT 荧光表征 CdTe 纳米粒子对于 Aβ₄₂ 纤维化聚集过程的影响。(B)不同浓度的 CdTe 纳米粒子与 Aβ₄₂ 在一起孵化后的 TEM(a-j)和 AFM(k-o)照片。
[CdTe]/[Aβ₄₂]摩尔比:(a,f,k)0,(b,g,l)0.001,(c,h,m)0.005,(d,i,n)0.01,(e,j,o)0.05。

Figure 9 (A) Molecular structures of CdTe NPs and Aβ₄₂ with similarities. Kinetics of Aβ₄₂ fibrillization with and without CdTe NPs was monitored by ThT fluorescence. (B) TEM (a-j) and AFM (k-o) images of Aβ₄₂ incubated with and without CdTe NPs. [CdTe]/[Aβ₄₂] molar ratios: (a,f,k) 0, (b,g,l) 0.001, (c,h,m) 0.005, (d,i,n) 0.01, and (e,j,o) 0.05.

羧基为末端的 OEG 配体虽然会抑制酶的活性,但是会保留酶的二级结构,因此可以通过提高体系中的离子强度使酶活性可逆地完全恢复,如图 10 所示。这是因为乙二醇单元能够抵抗生物大分子之间的非特异性相互作用,所以在功能基团之间插入乙二醇单元可以屏蔽蛋白质分子表面之间的疏水性单分子层,同时烷基链单分子层会削弱纳米粒子结合蛋白质的非特异性相互作用。因此,调整纳米粒子表面的性质可以调控蛋白质的结构和功能,这对提高蛋白质稳定性和蛋白质药物投递的研究具有十分重要的意义。

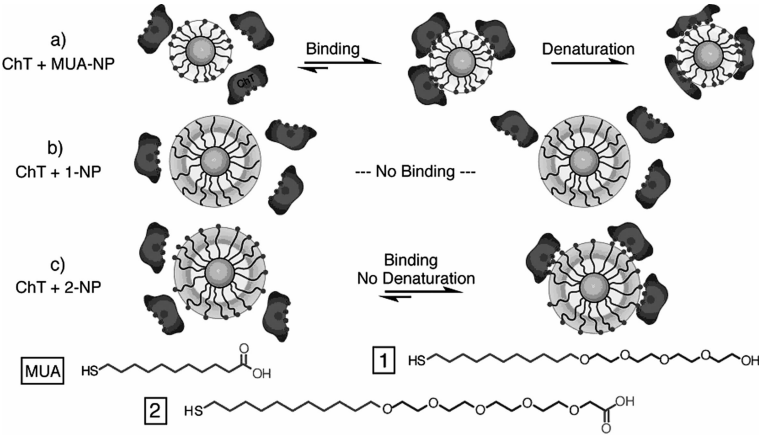


图 10 用于修饰 CdSe 纳米粒子的配体以及蛋白质-纳米粒子相互作用的示意图

Figure 10 Ligands used for CdSe nanoparticles, and schematic depiction of protein-nanoparticle interactions

2.3.2 高分子纳米材料 高分子纳米材料在生物学和医学的实际应用中要优于无机纳米材料,这一观点已被人们广泛认可^[74]。例如,高分子纳米材料分子结构的灵活设计性和丰富多样的功能化基团使这

些材料的表面很容易被修饰,从而达到控制材料物理化学性质和与蛋白质相互作用位点的效果。另外,由于高分子纳米材料通常可以在人体内被降解,所以它们的毒性较低。利用高分子纳米材料调控蛋白质折叠的方法主要分为合成高分子聚合物、纳米凝胶和高分子纳米粒子。

2.3.2.1 合成高分子聚合物 生物高分子聚合物,如蛋白质、多糖和核酸等,是构成生命有机体的基本单元。凭借诸多优良的特性,利用合成高分子聚合物模拟这些生物大分子已经发展成为了一个非常活跃的研究领域^[75]。众所周知,当外界环境发生变化时,蛋白质的折叠与聚集状态很容易发生变化。而很多合成高分子聚合物自身的分子构象也可以在受到外界刺激(如温度、pH 值、离子强度和光强度等)时发生相应的改变^[76]。因此,史林启等想到利用亲疏水性质随环境的改变而改变的温敏性聚合物来调控蛋白质的折叠,防止蛋白质的高温失活(见图 11)^[77]。他们将温敏性聚合物聚 *N*-异丙基丙烯酰胺(PNIPAM)和碳酸脱水酶(CAB)一同包裹在由反相微乳液构筑的受限空间中,高温时 PNIPAM 变得疏水从而吸附变性的 CAB,以防止 CAB 之间发生聚集;低温时 PNIPAM 变得亲水自发地将 CAB 释放出来,使其能再折叠达到恢复活性的目的。这项工作建立了一种根据环境变化自动调节、保护复性一体化的酶保护体系。之后,他们通过引入在微乳液中具有界面活性的脂肪酶^[78],进一步扩展了这种方法的使用范围,并提高了其实际应用的价值。

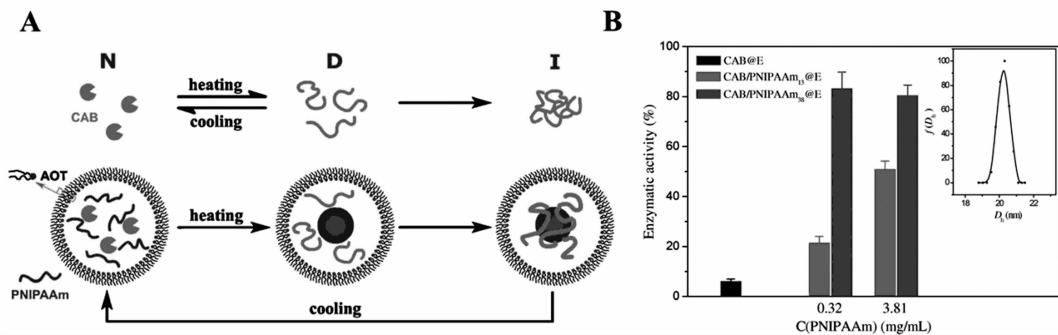


图 11 (A)利用 PNIPAM 在微乳液液滴内保护 CAB 免于热失活的机理图(N:天然态,D:变性态,I:失活态);

(B)单独 CAB 和含有 PNIPAM 的微乳液液滴内的 CAB 经热处理后的残留酶活性

Figure 11 (A) Schematic illustration of protecting CAB against heat inactivation by PNIPAM in microemulsion

(N: native, D: denatured, I: inactive); (B) Residual enzymatic activity of free CAB and CAB with PNIPAM in a microemulsion after heat treatment.

基于疏水相互作用的蛋白质折叠调控体系仅仅是保护蛋白质活性的一条途径。大量研究数据表明,分子间的静电作用力在稳定蛋白质方面也发挥着关键的作用。于是,Kataoka 课题组报道了一种能够开关控制酶活性的超分子组装体^[79]。他们利用阴离子嵌段聚合物聚乙二醇-*b*-聚天冬氨酸(PEG-*b*-PAsp)与阳离子的溶菌酶通过静电作用形成聚离子胶束,将溶菌酶包裹在胶束核的内部,抑制了酶的活性。然后通过改变溶液的离子强度,使胶束可逆的形成和解离,同时导致酶分子周期性的包裹与释放,从而达到了控制酶活性的目的。

另一方面,Nagasaki 等^[80]则利用阳离子嵌段聚合物聚乙二醇-*g*-聚甲基丙烯酸二乙氨基乙酯(PEG-*g*-PEAMA)的正电性,与溶菌酶(Lysozyme)的负电活性中心通过静电相互作用相结合,从而使溶菌酶抵抗高温下的热失活。当加入阴离子聚合物聚丙烯酸(PAAc)时,溶菌酶被释放出来,恢复活性(见图 12)。

2.3.2.2 纳米凝胶 纳米凝胶是高分子链通过化学或物理交联形成的具有三维网络结构的纳米尺寸(<100nm)水凝胶纳米粒子。由于在生物医学领域展现出非常好的应用前景,如药物投递体系和生物成像等,纳米凝胶在近些年来吸引了人们越来越多的研究兴趣。通常的高分子纳米粒子都具有一个致密的聚合物内核结构,如纳米球。而相比之下,纳米凝胶则能够利用其内部的聚合物网络稳定地捕捉生物活性化合物,例如药物、蛋白质、DNA 或 RNA 等。而且它可以对外界环境的刺激(温度和 pH 值等)进行快



图 12 通过使用阳离子嵌段共聚物形成复合体实现酶活性的调控和保护

Figure 12 Regulation and preservation of the enzymatic activity by the complex formation with a cationic smart copolymer

速地响应^[81]。因此基于上述特性,纳米凝胶对于生物活性物质的控制释放十分有用。

Akiyoshi 课题组利用胆固醇修饰的多糖制备纳米凝胶 CHP 模拟了天然分子伴侣的功能^[82]。当蛋白质受到高温变性或化学变性(尿素或盐酸胍)时,CHP 纳米凝胶能够捕捉蛋白折叠中间体形成复合物,从而阻止了变性蛋白的不可逆聚集。当向体系中加入 β -环糊精(β -CD)时,被包裹在纳米凝胶的蛋白折叠中间体便会被释放出来并折叠成天然状态。这是由于 β -环糊精将 CHP-蛋白中间体复合物解离,形成 CHP-CD 复合物导致的。这整个过程与天然分子伴侣的两步机制非常相似,如图 13 所示。

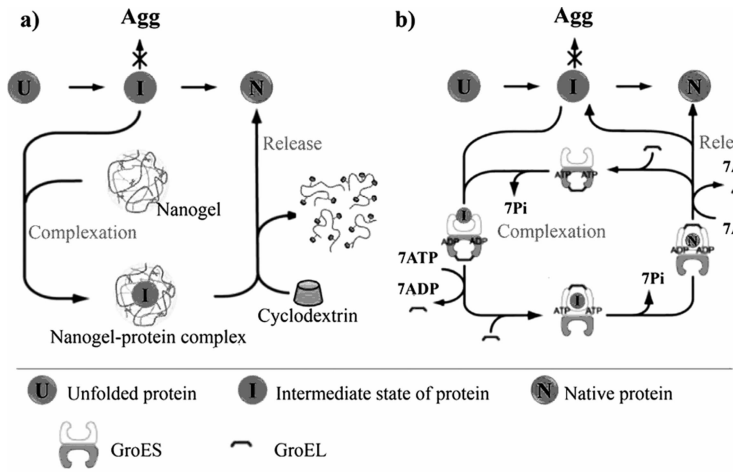


图 13 人工(a)和天然(b)分子伴侣作用机制的比较

Figure 13 Comparison of the mechanisms of artificial (a) and natural (b) molecular chaperones

随后,Akiyoshi 等尝试将他们制备的这种 CHP 纳米凝胶应用于 $A\beta$ 蛋白,结果发现每一个 CHP 纳米凝胶可以结合 6~8 个 $A\beta$ 蛋白分子,导致 $A\beta$ 蛋白的聚集过程和对 PC12 细胞的毒性被有效地抑制^[83]。此外,氨基修饰具有正电荷的纳米凝胶($CHPNH_2$)表现出更好的抑制效果,说明静电作用在抑制蛋白聚集方面具有重要作用。但是电中性的 CHP 是无毒的,而带有正电荷的衍生物 $CHPNH_2$ 是具有一定细胞毒性的,特别是对于培养的初级大脑皮层细胞而言^[84]。

Akiyoshi 等的“两步法”在帮助蛋白复性过程中存在着不足之处,即在诱导蛋白变性的因素撤除后,需要人为地加入剥离剂环糊精才能将与纳米凝胶复合的蛋白折叠中间体释放出来已恢复活性。这样不但步骤繁琐,费时费力,而且会在人工伴侣体系中引入新的物质,使体系变得更加复杂。于是,Shea 课题组最近报道了一种基于聚 *N*-异丙基丙烯酰胺(PNIPAM)的共聚物纳米凝胶。这种纳米凝胶在高温时会通过疏水作用捕捉目标酶分子形成复合物,阻止蛋白的不可逆活性丧失;当温度降低后,酶分子便会被自动的释放出来完成复性,如图 14 所示。这个方法简化了过程,实现了“一步法”保护酶活性的目的^[85]。纳米凝胶中负电性和疏水性单体的合适比例是实现这个功能的关键。除此之外,由于纳米凝胶在室温下对酶并没有很强的亲和力,所以它们在溶液中不会影响酶的活性,并且很容易通过过滤的方法将其与酶

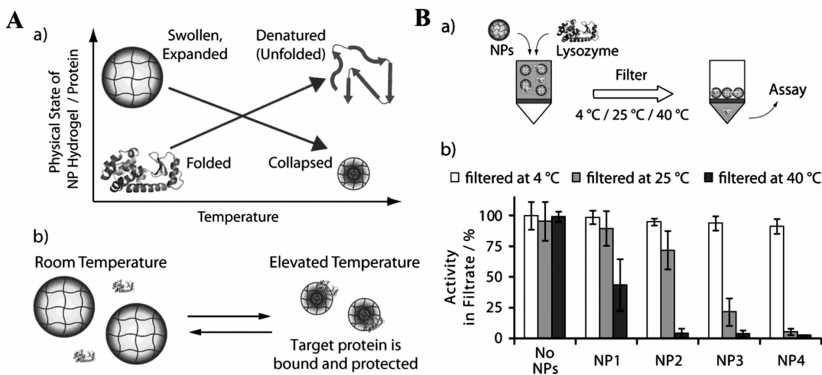


图 14 (A)通过使用基于 *N*-异丙基丙烯酰胺(NiPAM)的共聚物纳米凝胶实现对蛋白质的温度响应性“捕获-释放”的机理;(B)溶菌酶与聚合物纳米凝胶的结合及过滤后活性的研究。

Figure 14 (A) Illustration of temperature-responsive “catch-and-release” of a protein by *N*-isopropylacrylamide (NiPAM)-based polymer NP hydrogel; (B) Procedure for studying the binding of lysozyme to polymer NP hydrogels and the activity in the filtrates.

溶液分离。这个方法在提高蛋白热稳定性方面将有很好的应用前景。

2.3.2.3 高分子纳米粒子 高分子纳米粒子主要是由嵌段共聚物自组装、聚合物共混或者以聚合物链模板化的自组装等方式形成的。人们可以通过调节高分子聚合物的分子结构、成分组成和制备方法等，得到各种各样的高分子纳米粒子来广泛地迎合各种需求^[86]。由于多功能的分子设计可以使高分子纳米粒子具有丰富多彩的表面化学性质，因此调控使用高分子纳米粒子调控蛋白质的折叠与聚集引起了越来越多研究人员的重视。

最近，史林启课题组利用混合壳层的复合胶束精妙地模拟了天然分子伴侣的结构与功能(见图15)^[87]。这种复合胶束表面的两种混合链段分别为生物相容性的 PEG 和温度响应性的 PNIPAM，通过改变温度，PNIPAM 链段能够可逆地在胶束表面形成疏水微区，有效地结合高温变性的蛋白质，阻止其聚集失活，然后在低温下将其释放，辅助蛋白质复性。这种基于复合胶束的人工分子伴侣对十余种结构和功能各异的酶都具有很好的热稳定性保护效果，因此实际应用的潜力巨大。与此同时，他们还发现这种复合胶束可以用于维持 Aβ 的平衡和降低 Aβ 相关的细胞毒性^[88]，因此在提高阿尔兹海默症治疗效果方面也具有潜在的潜在应用价值。

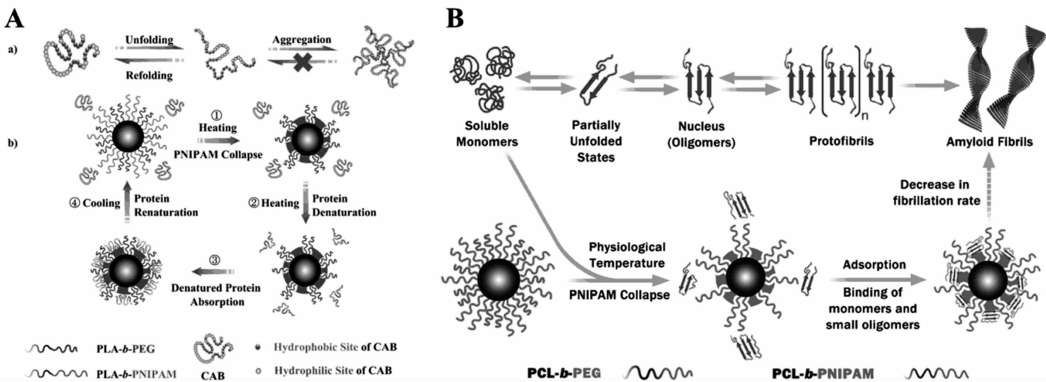


图 15 (A)MSPMs 阻止蛋白质变性聚集及辅助变性蛋白质复性的机理；
(B)MSPMs 和 Aβ 的相互作用及其对于 Aβ 聚集过程的影响

Figure 15 (A) Mechanism of the stabilization and refolding of the heat-denatured proteins, assisted by the MSPMs; (B) Representation of the possible mechanism of interaction between MSPMs and Aβ peptide on the kinetics of amyloid fibrillation process

Dawson 课题组利用不带电的共聚物 *N*-异丙基丙烯酰胺/*N*-叔丁基丙烯酰胺(NIPAM/BAM)制备了一系列不同性质的高分子纳米粒子。选择 NIPAM/BAM 共聚物作为研究对象是因为聚合物纳米粒子的表面性质很容易通过两种组分不同的单体比例进行调控,即 NIPAM 组分的比率越大,纳米粒子的氢键结合能力越高,这是因为 NIPAM 结构中的异丙基基团比 BAM 的叔丁基具有更小的空间位阻效应。研究发现,NIPAM/BAM 聚合物纳米粒子能够通过吸附 $A\beta$ 单体或寡聚物,阻断它们之间的结合位点,从而影响 $A\beta$ 聚集的成核阶段,减缓蛋白的纤维化过程(见图 16)^[89]。他们还发现这种聚合物纳米粒子对 hIAPP 产生类似的减缓聚集的效果^[90]。在这两种情况下,共聚物中 NIPAM 组分的比例越高抑制效果越明显,这说明氢键作用可能是影响淀粉样蛋白聚集的关键因素。

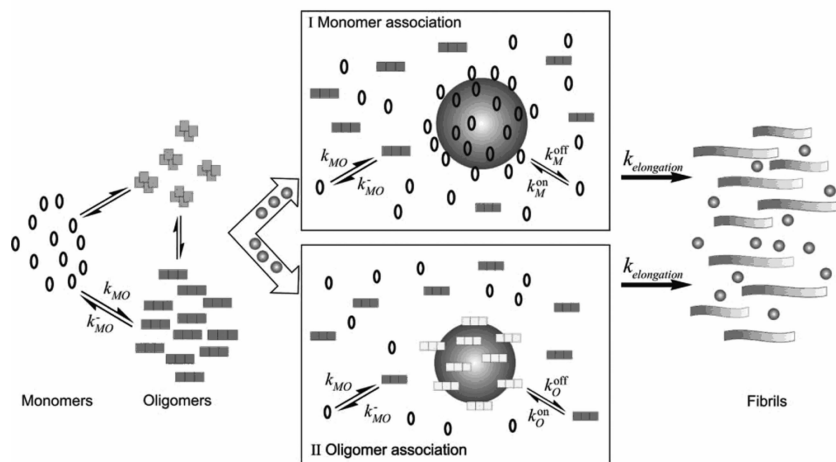


图 16 聚合物纳米粒子与 $A\beta$ 相互作用的可能机理。

灰色球体代表聚合物纳米粒子,黄色团簇代表定形与无定形寡聚物。

Figure 16 Schematic representation of the possible modes of interaction between copolymeric nanoparticles and $A\beta$.

Gray spheres indicate nanoparticles, and yellow clusters indicate structured and unstructured oligomers.

Margel 课题组设计了一种均匀的基于氨基酸多肽的生物相容性高分子纳米粒子^[91]。他们发现利用苯丙氨酸-苯丙氨酸二肽(FF)修饰的聚合物,聚(*N*-丙烯酰-*L*-苯丙氨酸-*L*-苯丙氨酸甲酯),自组装形成纳米粒子能够显著地减慢 $A\beta_{40}$ 蛋白二级结构由无规线团向 β -折叠的转变,导致 $A\beta_{40}$ 的纤维化聚集过程被大大抑制。相反地,如果将聚合物中的苯丙氨酸替换为丙氨酸,那么便会促进 $A\beta_{40}$ 的聚集。这个实验结果表明,聚合物纳米粒子中 FF 残基与 $A\beta$ 蛋白中相应氨基酸残基之间的疏水性相互作用是非常重要的。

3 总结和展望

蛋白质折叠调控策略的研究,不仅对基因重组蛋白类药物的生产具有重要意义,而且对于探索蛋白质错误折叠疾病的机理和推进其治疗药物的开发也具有积极的指导作用。与传统的蛋白质折叠助剂、小分子与多肽抑制剂的方法相比,纳米材料凭借其诸多独特的性能,在蛋白质折叠与聚集方面展现出了更加优异的调控效果,尤其是利用高分子纳米材料模拟自然界中天然的分子伴侣,为今后进一步开发和完善的蛋白质折叠调控策略提供了新的思路。不过,虽然这些蛋白质折叠调控策略的研究有了很多进展,但目前这些方法大多仍处于实验室研究的阶段,要想实现真正的临床应用和工业化生产仍然任重道远。随着人们对于蛋白质折叠的认识逐渐地深入和生物纳米技术的不断发展,相信在不久的将来,基于纳米材料的蛋白质折叠调控方法将越来越成为重点的研究方向并取得重大突破。

参考文献:

[1] Hartl F U, Bracher A, Hayer-Hartl M. Nature, 2011, 475(7356): 324~332.

- [2] Vendruscolo M, Zurdo J, MacPhee C E, et al. *Phil Trans R Soc Lond A*, 2003, 361(1807): 1205~1222.
- [3] Dobson C M. *Nature*, 2003, 426(6968): 884~890.
- [4] Goldberg M E. *Trends Pharmacol Sci*, 1985, 10(10): 388~391.
- [5] Dobson C M, Šali A, Karplus M. *Angew Chem Int Ed*, 1998, 37(7): 868~893.
- [6] Anfinsen C B. *Biochem J*, 1972, 128(4): 737.
- [7] Kubelka J, Hofrichter J, Eaton W A. *Curr Opin Struc Biol*, 2004, 14(1): 76~88.
- [8] Herbst R, Schäfer U, Seckler R. *J Biol Chem*, 1997, 272(11): 7099~7105.
- [9] Ellis R J, Minton A P. *Biol Chem*, 2006, 387(5): 485~497.
- [10] Dunker A K, Silman I, Uversky V N, et al. *Curr Opin Struc Biol*, 2008, 18(6): 756~764.
- [11] Taipale M, Jarosz D F, Lindquist S. *Nat Rev Mol Cell Bio*, 2010, 11(7): 515~528.
- [12] Hartl F U, Hayer-Hartl M. *Science*, 2002, 295(5561): 1852~1858.
- [13] Frydman J. *Annu Rev Biochem*, 2001, 70(1): 603~647.
- [14] Fágáin C Ó. *Biochim Biophys Acta*, 1995, 1252(1): 1~14.
- [15] Ladero M, Ruiz G, Pessela B, et al. *Biochem Eng J*, 2006, 31(1): 14~24.
- [16] Ulbrich R, Schellenberger A, Damerau W. *Biotechnol Bioeng*, 1986, 28(4): 511~522.
- [17] Stefani M, Dobson C M. *J Mol Med*, 2003, 81(11): 678~699.
- [18] Thomas P J, Qu B, Pedersen P L. *Trends Pharmacol Sci*, 1995, 20(11): 456~459.
- [19] Anfinsen C B. *Science*, 1973, 181(4096): 223~230.
- [20] Daggett V, Fersht A R. *Trends Pharmacol Sci*, 2003, 28(1): 18~25.
- [21] Chiti F, Dobson C M. *Nat Chem Biol*, 2009, 5(1): 15~22.
- [22] Jahn T R, Parker M J, Homans S W, et al. *Nat Struct Mol Biol*, 2006, 13(3): 195~201.
- [23] Vendruscolo M, Dobson C M. *Nat Chem Biol*, 2013, 9(4): 216~217.
- [24] Stefani M. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1739(1): 5~25.
- [25] Preissler S, Deuerling E. *Trends Pharmacol Sci*, 2012, 37(7): 274~283.
- [26] Ciechanover A. *Cell*, 1994, 79(1): 13~21.
- [27] Randolph T W, Jones L S. *Pharm Biotechnol*, 2002, 13: 159~175.
- [28] Tandon S, Horowitz P. *J Biol Chem*, 1986, 261(33): 15615~15618.
- [29] Tandon S, Horowitz P M. *J Biol Chem*, 1987, 262(10): 4486~4491.
- [30] Hagen A J, Hatton T A, Wang D I. *Biotechnol Bioeng*, 1990, 35(10): 955~965.
- [31] Rozema D, Gellman S H. *J Am Chem Soc*, 1995, 117(8): 2373~2374.
- [32] Daugherty D L, Rozema D, Hanson P E, et al. *J Biol Chem*, 1998, 273(51): 33961~33971.
- [33] Rozema D, Gellman S H. *J Biol Chem*, 1996, 271(7): 3478~3487.
- [34] Rozema D, Gellman S H. *Biochemistry*, 1996, 35(49): 15760~15771.
- [35] Cleland J L, Builder S E, Swartz J R, et al. *Nat Biotechnol*, 1992, 10(9): 1013~1019.
- [36] Reddy K, Charan R, Lilie H, et al. *Protein Sci*, 2005, 14(4): 929~935.
- [37] Rariy R V, Klibanov A M. *P Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(25): 13520~13523.
- [38] Creighton T E. *J Mol Biol*, 1980, 137(1): 61~80.
- [39] Hagihara Y, Aimoto S, Fink A L, et al. *J Mol Biol*, 1993, 231(2): 180~184.
- [40] Karuppiiah N, Sharma A. *Biochem Bioph Res Co*, 1995, 211(1): 60~66.
- [41] Singer M A, Lindquist S. *Mol Cell*, 1998, 1(5): 639~648.
- [42] Samuel D, Kumar T K S, Ganesh G, et al. *Protein Sci*, 2000, 9(02): 344~352.
- [43] Bourot S, Sire O, Trautwetter A, et al. *J Biol Chem*, 2000, 275(2): 1050~1056.
- [44] Yoshimoto M, Shimanouchi T, Umakoshi H, et al. *J Chromatogr B*, 2000, 743(1): 93~99.
- [45] Kuboi R, Mawatari T, Yoshimoto M. *J Biosci Bioeng*, 2000, 90(1): 14~19.
- [46] Re F, Airoldi C, Zona C, et al. *Curr Med Chem*, 2010, 17(27): 2990~3006.
- [47] Tatarek-Nossol M, Yan L, Schmauder A, et al. *Chem Biol*, 2005, 12(7): 797~809.
- [48] Lowe T L, Strzelec A, Kiessling L L, et al. *Biochemistry*, 2001, 40(26): 7882~7889.
- [49] Kokkoni N, Stott K, Amijee H, et al. *Biochemistry*, 2006, 45(32): 9906~9918.
- [50] Kapurniotu A. *Angew Chem Int Ed*, 2011, 50(48): 11293~11294.
- [51] Zhang M, Mao X, Yu Y, et al. *Adv Mater*, 2013, 25(28): 3780~3801.

- [52] Jain P K, Huang X, El-Sayed I H, et al. *Accounts Chem Res*, 2008, 41(12): 1578~1586.
- [53] De M, Miranda O R, Rana S, et al. *Chem Commun*, 2009, 16): 2157~2159.
- [54] You C, Arvizo R R, Rotello V M. *Chem Commun*, 2006, 27): 2905~2907.
- [55] Sandanaraj B S, Vutukuri D R, Simard J M, et al. *J Am Chem Soc*, 2005, 127(30): 10693~10698.
- [56] Choi Y, Cho Y, Kim M, et al. *Anal Chem*, 2012, 84(20): 8595~8601.
- [57] Han S, Chang Y J, Jung E S, et al. *Int J Nanomed*, 2011, 6:1.
- [58] Fischer N O, Verma A, Goodman C M, et al. *J Am Chem Soc*, 2003, 125(44): 13387~13391.
- [59] De M, Rotello V M. *Chem Commun*, 2008, 30): 3504~3506.
- [60] Liao Y H, Chang Y J, Yoshiike Y, et al. *Small*, 2012, 8(23): 3631~3639.
- [61] Antosova A, Gazova Z, Fedunova D, et al. *Mater Sci Eng C*, 2012, 32(8): 2529~2535.
- [62] Chan H, Xiao L, Yeung K, et al. *Biomaterials*, 2012, 33(18): 4443~4450.
- [63] Gao J, Gu H, Xu B. *Accounts Chem Res*, 2009, 42(8): 1097~1107.
- [64] Skaat H, Sorci M, Belfort G, et al. *J Biomed Mater Res A*, 2009, 91(2): 342~351.
- [65] Mahmoudi M, Quinlan-Pluck F, Monopoli M P, et al. *ACS Chem Neurosci*, 2013, 4(3): 475~485.
- [66] Skaat H, Shafir G, Margel S. *J Nanopart Res*, 2011, 13(8): 3521~3534.
- [67] Auer S, Trovato A, Vendruscolo M A. *PLoS Comput Biol*, 2009, 5(8): e1000458.
- [68] Vannoy C H, Leblanc R M. *J Phys Chem B*, 2010, 114(33): 10881~10888.
- [69] Xiao L, Zhao D, Chan W, et al. *Biomaterials*, 2010, 31(1): 91~98.
- [70] Chan H, Xiao L, Yeung K, et al. *Biomaterials*, 2012, 33(18): 4443~4450.
- [71] Ng O T, Wong Y, Chan H, et al. *Biomater Sci*, 2013, 1(6): 577~580.
- [72] Yoo S I, Yang M, Brender J R, et al. *Angew Chem Int Ed*, 2011, 50(22): 5110~5115.
- [73] Hong R, Fischer N O, Verma A, et al. *J Am Chem Soc*, 2004, 126(3): 739~743.
- [74] Nicolas J, Mura S, Brambilla D, et al. *Chem Soc Rev*, 2013, 42(3): 1147~1235.
- [75] Gil E S, Hudson S M. *Prog Polym Sci*, 2004, 29(12): 1173~1222.
- [76] de las Heras Alarcón C, Pennadam S, Alexander C. *Chem Soc Rev*, 2005, 34(3): 276~285.
- [77] Tao Q, Li A, Liu X, et al. *Phys Chem Chem Phys*, 2011, 13(36): 16265~16271.
- [78] Tao Q, Li A, Liu X, et al. *Colloids Surf B*, 2013, 111: 587~593.
- [79] Harada A, Kataoka K. *J Am Chem Soc*, 1999, 121(39): 9241~9242.
- [80] Ganguli S, Yoshimoto K, Tomita S, et al. *J Am Chem Soc*, 2009, 131(18): 6549~6553.
- [81] Sasaki Y, Akiyoshi K. *Chem Rec*, 2010, 10(6): 366~376.
- [82] Nomura Y, Sasaki Y, Takagi M, et al. *Biomacromolecules*, 2005, 6(1): 447~452.
- [83] Ikeda K, Okada T, Sawada S, et al. *FEBS Lett*, 2006, 580(28): 6587~6595.
- [84] Boridy S, Takahashi H, Akiyoshi K, et al. *Biomaterials*, 2009, 30(29): 5583~5591.
- [85] Beierle J M, Yoshimatsu K, Chou B, et al. *Angew Chem Int Ed*, 2014, 53(35): 9275~9279.
- [86] Ge Z, Liu S. *Chem Soc Rev*, 2013, 42(17): 7289~7325.
- [87] Liu X, Liu Y, Zhang Z, et al. *Chem-Eur J*, 2013, 19(23): 7437~7442.
- [88] Huang F, Wang J, Qu A, et al. *Angew Chem Int Ed*, 2014, 53(34): 8985~8990.
- [89] Cabaleiro-Lago C, Quinlan-Pluck F, Lynch I, et al. *J Am Chem Soc*, 2008, 130(46): 15437~15443.
- [90] Cabaleiro-Lago C, Lynch I, Dawson K A, et al. *Langmuir*, 2009, 26(5): 3453~3461.
- [91] Skaat H, Chen R, Grinberg I, et al. *Biomacromolecules*, 2012, 13(9): 2662~2670.

Recent Progress in Regulation Strategy of Protein Folding

HUANG Fan^{1,2}, QU Ao-ting², WANG Jian-zu², AN Ying-li², SHI Lin-qi^{2*}

(1. *Tianjin Key Laboratory of Radiation Medicine and Molecular Nuclear Medicine, Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Science & Peking Union Medical College, Tianjin 300192, China;*

2. *Key Laboratory of Functional Polymer Materials, Ministry of Education, Institute of Polymer Chemistry, Collaborative Innovation Center of Chemical Science and Engineering (Tianjin), State Key Laboratory of Medicinal Chemical Biology, Nankai University, Tianjin 300071, China)*

Abstract: Proteins, as the material basis of life, must fold and assembled property into precise three-dimensional conformations to maintain their physiological activity, and to fulfill their normal biological functions. Once misfolding and abnormal aggregation, proteins will not only lose their biological activity, but also lead to a number of serious diseases, such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease, Huntington's disease and some types of cancers, which are terrible threaten to human life and health. Therefore, how to effectively regulate protein folding has become one of the most challenging problems in life sciences. On the basis of a brief introduction of protein folding mechanism, we reviewed the recent progress in the development of protein folding control strategy, discussed the methods based on nanomaterials in detail and finally proposed the development trend of this field.

Key words: Protein folding; Protein aggregation; Molecular chaperone; Nanomaterials