



范克龙，中国科学院生物物理研究所副研究员。入选中国科协首批“青年人才托举工程”。长期研究铁蛋白纳米酶新功能及其生物医学应用。首次发现铁蛋白识别肿瘤，并据此设计纳米酶探针分子，用于肿瘤的诊断(*Nature Nanotechnol*, 2012)和治疗(*PNAS*, 2014)。根据天然酶的结构特性，提出了一种仿生优化纳米酶的新策略(*Chem, Commun*, 2017)，发展了一种快速、灵敏、简便检测的纳米酶试纸条新方法(*Biosensor Bioelectron*, 2015)，实现成果转化，获2015年度Atlas国际奖。相关研究成果入选“中国十大科学进展”(2012年)，获中国科学院院长特别奖(2013)，中国科学院优秀博士毕业论文(2015)等奖项。

纳米酶在疾病诊断中的应用 *

孟祥芹 范克龙 **

(中国科学院生物物理研究所，北京 100101)

摘要 纳米酶是近年来中国科学家发现的一类自身蕴含酶学特性的纳米材料。作为一种新型人工模拟酶，纳米酶具有经济、稳定、易于大批量生产的优势。更重要的是，纳米酶是一个双功能或者多功能的分子，它不仅具有催化活性，还兼有纳米材料特有的物理和化学性质，如磁性、荧光、光热特性等。纳米酶的出现为酶催化反应在疾病诊断中的应用提供了新思路，新方法和新工具。本文将重点介绍近几年纳米酶在疾病诊断方面的应用，涵盖了癌症、代谢性疾病、传染性疾病、神经退行性疾病、心血管疾病和炎症性疾病等不同疾病类型，并对该领域未来的发展方向进行了讨论和展望。

关键词 纳米酶，疾病诊断，纳米材料，模拟酶，免疫分析

学科分类号 Q811, Q814

DOI: 10.16476/j.pibb.2018.0039

疾病是机体在某些病因作用下，自身调节紊乱而发生的异常生命活动过程^[1]。疾病的发生常伴随基因、分子、细胞和组织等的异常，对这些标志物的检测为疾病的诊断提供了最直接的证据^[2-3]。1971年，瑞典科学家 Engvall 和 Perlmann^[4]开发了第一个基于酶催化反应的免疫球蛋白G比色检测方法。由于酶催化反应具有操作简单、反应条件温和、酶催化放大信号等特点，因此在疾病检测方面具有独特的优势。目前该方法已经在各种疾病的诊断方面显示出很高的应用价值，并成为一种有效的、不可或缺的工具^[5-8]。然而天然酶在应用时也存在生产成本高、稳定性差等局限性。为了克服这些缺点，科学家开始设计合成人工模拟酶，并取得

一系列研究进展，如分子印迹模拟酶、抗体酶、超分子模拟酶、脱氧核酶等^[9-11]。

2007年，中国科学家跨学科合作发现四氧化三铁(Fe_3O_4)材料在纳米尺寸时表现类似过氧化物酶的活性^[12]。这一发现引起了国内外多个领域科学家的高度关注，随后超过50种不同材料和结构的纳米酶相继被发现。这类自身蕴含酶学特性的纳米材

* 中国科学院前沿重点项目(QYZDY-SSW-SMC013)、中国科学院先导专项(No.XDA09030306, XDPB0304)和中国科协青年人才托举工程(2015QNRC001)资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 010-64888256, E-mail: fankelong@ibp.ac.cn

收稿日期: 2018-01-22, 接受日期: 2018-01-25

料被统称为“纳米酶(nanozyme)”^[13]。作为一类新型人工模拟酶, 纳米酶不仅具有经济、稳定、易于大批量生产的优势^[14], 更重要的是, 纳米酶兼具酶和纳米材料的“双重身份”。除了具有催化功能外, 还兼有纳米材料特有的理化特性, 如 Fe_3O_4 纳米酶不仅具有酶活性, 还具有超顺磁性, MoS_2 纳米颗粒既有催化活性, 又有近红外光热特性, 这使得纳米酶成为一种双功能或者多功能的分子^[15]。

纳米酶的出现为疾病的诊断提供了新的思路和方法。科学家利用纳米酶的特性发展了多种基于纳米酶的疾病诊断新方法, 应用范围包括癌症、代谢性疾病、传染性疾病、神经退行性疾病、心血管疾病及炎症性疾病等。下面我们将以疾病类型为分类, 系统地介绍纳米酶在疾病诊断方面的应用并对未来的发展方向作出展望。

1 纳米酶在癌症诊断中的应用

癌症是一类严重威胁人类健康的疾病。早期诊断是其治疗的关键, 研究发现, 早期肾癌的5年存活率为99%, 而二期以上病人的5年存活率只有16%^[16]。因此, 研发高灵敏、高特异的早期诊断方法对于癌症的治疗具有重要意义^[17-18]。纳米酶具有催化活性高、经济、稳定及多功能的优势, 将其与癌症的早期诊断技术相结合可用于癌症相关基因、分子、细胞和组织的检测, 为癌症的快速、准确诊断提供了新的思路。

1.1 纳米酶检测癌症相关基因

癌症的发生与基因的改变有关。原癌基因和抑癌基因是在细胞生长、增殖和调控中起重要作用的

基因。但在某些条件下, 如病毒感染、化学致癌物或辐射作用, 二者容易发生突变、缺失或失活, 从而引起细胞恶性转化, 导致肿瘤的发生。所以, 对癌症相关基因的检测是癌症早期诊断的方式之一^[19]。

目前常规的方法主要是通过聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增基因, 然后使用带标签的核酸探针进行识别并转化为可检测的信号如荧光、颜色、电流等。但是探针的标记不但耗时而且增加了操作的复杂性^[20]。王志飞等^[20]利用纳米酶设计了一种简单、无标签的DNA检测方法, 用于乳腺癌基因BRCA1^[21]的检测。如图1所示, 他们在介孔二氧化硅(mesoporous silica, mSiO₂)中装载铂纳米颗粒(Pt nanoparticles, Pt NPs), 构建Pt@mSiO₂纳米材料。Pt NPs具有过氧化物酶活性, 可在H₂O₂存在的情况下催化酶的底物TMB发生显色反应。利用静电吸附作用, 单链DNA探针(P1)被吸附到Pt@mSiO₂的表面, 使mSiO₂的孔道关闭, 内部的Pt NPs不能进行催化反应。然而, 当溶液中存在互补的待检DNA(T0)时, T0会与P1配对使其从Pt@mSiO₂的表面分离, 暴露的Pt NPs催化TMB的氧化。根据TMB氧化产物(oxidized TMB, oxTMB)在A₆₅₂处的特异吸收峰, 建立其与目标DNA的线性关系。结果表明, 这种无标签、纳米酶信号放大的方法对BRCA1的检测灵敏度可达3 nmol/L, 而且具有良好的单碱基对错配识别能力, 所以可检测到基因的单碱基突变。相比其他检测方法, 该方法不仅具有优异的灵敏度而且省略了探针的标记, 因此, 具有潜在的临床转化价值。

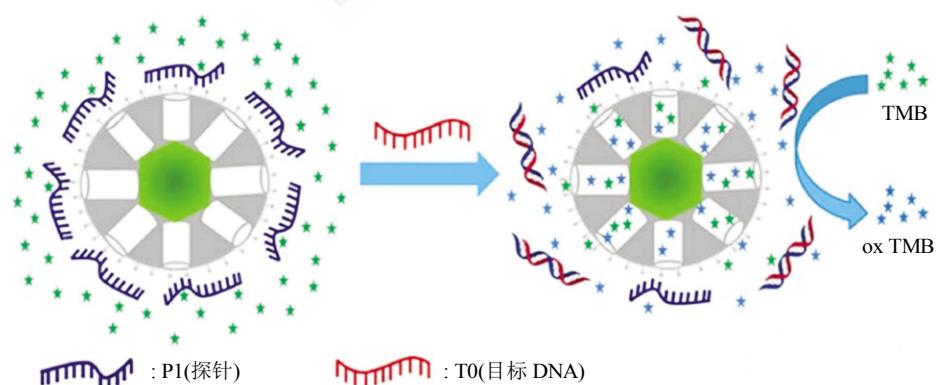


Fig.1 Label-free detection of DNA by Pt@mSiO₂ nanozyme^[20]

图1 Pt@mSiO₂纳米酶用于DNA的无标签检测^[20]

1.2 纳米酶检测肿瘤标志物分子

肿瘤标志分子检测对肿瘤的诊断、分类、分期、预后判断都具有重要的指导意义^[22]。临幊上常使用酶联免疫吸附测定法 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 检测肿瘤相关的标志分子，但是天然酶在应用时存在生产成本高、不稳定等缺点^[23]，而纳米酶相比天然酶具有经济、稳定、易于大批量生产的优势。目前，纳米酶检测法已被用于不同肿瘤标志物的检测，比如人类表皮生

长因子受体 2 (epithelial growth factor receptor 2, HER2)、前列腺特异抗原 (prostate specific antigen, PSA)、血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)、还原型谷胱甘肽 (glutathione, GSH)、细胞角蛋白 19 片段 (cytokeratin-19-fragment, CYFRA 21-1)、癌胚抗原 (carcinoembryonic antigen, CEA)、整合素蛋白 GP II b/III a 等(表 1)^[23-31]。

Table 1 Detection of cancer marker by nanozymes

表 1 纳米酶用于肿瘤分子标志物的检测

纳米酶	检测分子及样品	原理	检测线性范围及极限	临床使用可行性分析	参考文献
装载 Fe ₃ O ₄ 和 Pt 纳米颗粒的有序介孔碳复合物	HER2; 乳腺癌细胞裂解液	过氧化物酶活性；偶联 HER2 的抗体，双抗夹心比色法检测。	2.5~100 μg/L; 1.5 μg/L	检测极限满足临床检测 HER2 的最低标准 15 μg/L ^[23]	[23]
金 - 铂核壳结构的纳米复合物	PSA; 血清	辣根过氧化物酶活性；偶联抗体代替酶标二抗，双抗夹心比色法检测。	5~500 ng/L; 2.9 ng/L	检测 12 个血清样本，结果表明该方法与医院使用的 ECLIA 法，两个回归方程显示出良好的正相关性。	[24]
四氧化三铁磁珠	PSA; 血清	过氧化物酶活性；连接过氧化氢酶的检测探针消耗 H ₂ O ₂ ；双抗夹心反向比色法检测。	0.05~20 μg/L; 0.03 μg/L	检测 12 个临床 PSA 血清样本，结果与商业化的 ELISA 法具有很好的一致性。	[25]
以 DNA 为模板的银 / 铂双金属纳米簇	VEGF; 乳腺癌患者的血清	过氧化物酶活性；与 2 个 VEGE 的适配子结合，电化学检测。	6.0~20 pmol/L; 4.6 pmol/L	检测 6 例乳腺癌患者血清中 VEGF 浓度，与 ELISA 结果一致	[26]
石墨烯量子点	GSH; HeLa 细胞裂解液	过氧化物酶活性；GSH 消耗 H ₂ O ₂ ，减弱酶活性；比色法检测。	0.5~100 μmol/L; 0.5 μmol/L	标准加入法检测细胞裂解液中的 GSH，回归方程 R ² =0.9946，可测得细胞内 GSH 水平。	[27]
碳纳米棒	GSH; 人全血	过氧化物酶活性；GSH 的供氢能力可恢复 TMB 氧化产物为 TMB；比色法检测。	0~7 μmol/L; 0.3 μmol/L	标准加入法检测人全血样本中的 GSH，结果与 Ellman 法一致。相比 Ellman 法，该方法不受血红蛋白影响。	[28]
铂纳米颗粒	CYFRA 21-1; 血清	过氧化氢酶活性；V-chip 检测生成的 O ₂ ，从而检测 ELISA 中的待检物。	0.5~50 μg/L; 0.5 μg/L	标准加入法检测血清中 CYFRA 21-1，结果与缓冲液环境相同，表明该方法的灵敏度不受血清中物质的影响。	[29]
氧化铜纳米棒	CEA; 血清	过氧化物酶活性；其表面的抗体捕获抗原时，会阻碍底物结合；化学发光法。	0.1~60 μg/L; 0.05 μg/L	检测血清样本，结果与研究机构使用的电化学发光法一致，两方法误差小于 7.5%	[30]
金纳米颗粒	GP II b/III a; HEL 细胞	过氧化物酶活性和双光子发光特性，利用比色法和双光子显微镜实现定量和定位。	31.25~375 μg/L; 6.4×10 ⁶ 细胞	检测结果与电感耦合等离子体质谱分析法的结果相近。	[31]

韩国 Hyun Gyu Park 团队通过在有序介孔碳中装载 Fe₃O₄ 和 Pt 纳米酶，构建了一种过氧化物活性比 Fe₃O₄ 高 50 倍的复合纳米材料。在其表面偶联

乳腺癌标志分子 HER2 的抗体后，可作为检测探针代替传统免疫分析中的酶标二抗，从而成功建立了基于纳米酶的免疫比色检测方法^[23](图 2a)。该方法

对乳腺癌细胞裂解液中 HER2 的检测极限达到 $1.5 \mu\text{g/L}$, 满足临床检测的最低标准 $15 \mu\text{g/L}$ ^[32].

对于目标物质的检测, 除了制备高活性的纳米酶直接代替天然酶, 另外一种策略是, 通过目标物质产生或者消耗酶的底物如 H_2O_2 , 从而建立其浓度与酶活性的关系并实现检测. 还原型谷胱甘肽(GSH)是哺乳动物细胞中最丰富的抗氧化剂^[27], 在维持细胞内氧化还原环境、保护细胞免受氧化损伤中起重要作用. 细胞内 GSH 水平的失衡与癌症的发生密切相关^[33]. 在 H_2O_2 存在的情况下, GSH 会消耗 H_2O_2 转化为氧化谷胱甘肽(GSSG)^[34]. 杨黄浩课题组将这一反应与石墨烯量子点(graphene dots, GDs)的过氧化物酶活性结合, 实现对 GSH 的高灵敏检测^[27]. GSH 会消耗系统内的 H_2O_2 从而减弱 GDs 的酶活性, 使得生成的蓝色产物 oxTMB 减少, 通过标准加入法检测 HeLa 细胞裂解液中的 GSH, 发现产物吸收值的减少与加入 GSH 的浓度成正比(图 2b). 该方法可对细胞内 GSH 的浓度进行测定.

通过干预纳米酶和底物的结合, 来调节纳米酶的催化活性, 也可实现对目标物质的检测. 根据这一原理, 杨占军团队发展了一种基于氧化铜纳米酶活性的高效、无标签、化学发光免疫分析方法, 实现对血清中广谱癌症标志分子——癌胚抗原(CEA)^[35-36]的检测^[30]. 如图 2c, 他们将水热法合成的氧化铜纳米棒(cupric oxide nanorods, CuONRs)覆盖

在环氧树脂修饰的载玻片上, 形成可固定生物分子的支持物, 然后将抗 CEA 的抗体通过生物素和链霉亲和素的结合作用固定在上面. 与含 CEA 的样品孵育后, 发现形成的抗原 - 抗体复合物会抑制氧化铜纳米酶和底物鲁米诺的结合, 从而使得催化反应后的发光信号减弱. 该方法对 CEA 的检测线性范围为 $0.1\sim 60 \mu\text{g/L}$, 最低检测极限为 $0.05 \mu\text{g/L}$. 研究表明, 这种新型的化学发光免疫分析法与研究机构使用的电化学发光法对血清样本检测结果误差小于 7.5%, 证明了其在临床应用中的可行性.

纳米酶是一个多功能分子, 集物理、化学及催化功能于一身, 将这些性质有机地结合, 可以设计出新型的多功能材料. 高学云团队^[31]巧妙地将金(gold, Au)纳米颗粒的过氧化物酶活性和双光子发光特性结合起来, 构建了一种偶联分子肽的金纳米探针, 同时实现对整合素蛋白 GP II b/III a 的准确定量和定位. GP II b/III a 是细胞膜受体整合素家族的一员, 它的表达水平与血小板聚集密切相关, 还与癌症的发病和转移相关, 如前列腺癌和红白血病(HEL)^[37]. 利用 Au 颗粒的过氧化物酶活性, 在其表面偶联靶向肽段, 可对 GP II b/III a 进行比色法检测, 同时, 由于 Au 纳米颗粒独特的双光子发光特性, 在双光子发光显微镜下, 可直接观察到细胞膜上的整合素蛋白 GP II b/III a, 实现对它的准确定位. GP II b/III a 的定量和定位, 将为相关疾病的诊断和早期治疗提供有力的证据.

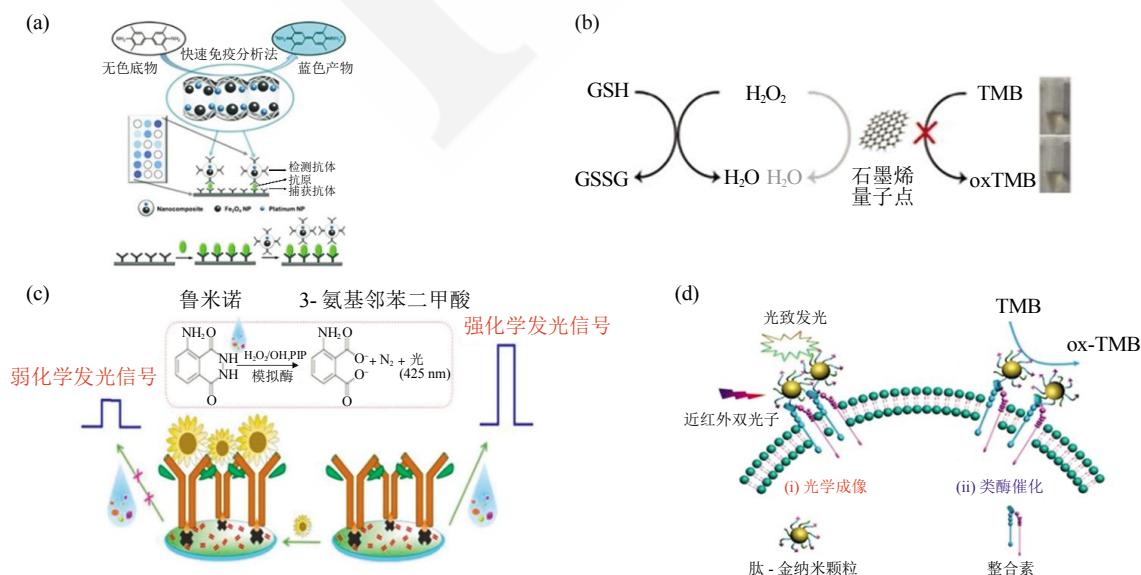


Fig. 2 Detection of tumor markers by nanozymes^[23, 27, 30-31]

图 2 纳米酶用于肿瘤分子标志物的检测^[23, 27, 30-31]

1.3 纳米酶检测肿瘤细胞

快速、灵敏和准确地检测肿瘤细胞在临幊上是至关重要的，因为它不仅可以监测疾病的进展，而且还有助于选择有效的治疗途径和改善临幊结果。目前，肿瘤细胞的检测方法大致可以分为三种：第一种是利用特定抗体并结合流式细胞仪对特定生物标志分子阳性的细胞进行分离和检测；第二种是利用细胞的生物物理特性，包括大小、形状和密度，采用离心和微滤方法进行富集和检测；第三种方法是PCR法，通过对特定基因的检测实现对肿瘤细胞的检测。然而，这些方法都存在预处理步骤繁琐，试验操作复杂等缺点^[38]。发挥纳米酶催化活性高及多功能的优势，与酶联免疫分析法结合，可发展多种快速、灵敏的肿瘤细胞检测方法^[17-18, 29, 39-44]。

韩国 Hyun Gyu Park 课题组在 Fe_3O_4 纳米酶表面偶联抗 HER2 的抗体，成功建立了针对乳腺癌肿

瘤细胞的纳米酶免疫比色检测法（图 3a），对 HER2 阳性的肿瘤细胞的检测极限是 341 个细胞^[18]。

随着对纳米酶研究的深入，科学家发现将不同纳米材料杂合到一起能展示出独特的优势，如增强酶活性、增加分散性和稳定性。例如，陈伟课题组构建了一种以氧化石墨烯(GO)为基底，原位合成多孔铂纳米颗粒(Pt NPs)的复合材料(Pt NPs/GO)（图 3b）。研究发现 Pt NPs/GO 具有极强的过氧化物酶活性。据此，他们对 Pt NPs/GO 进行了叶酸(folic acid, FA)的靶向性修饰，发现叶酸修饰后的 Pt NPs/GO 纳米酶(FA-Pt NPs/GO)可以特异地识别叶酸受体高表达的肿瘤细胞。基于 FA-Pt NPs/GO 的肿瘤细胞免疫检测法对肿瘤细胞的裸眼检测极限是 125 个细胞。借助酶标仪，其检测极限可到达 30 个细胞^[44]。

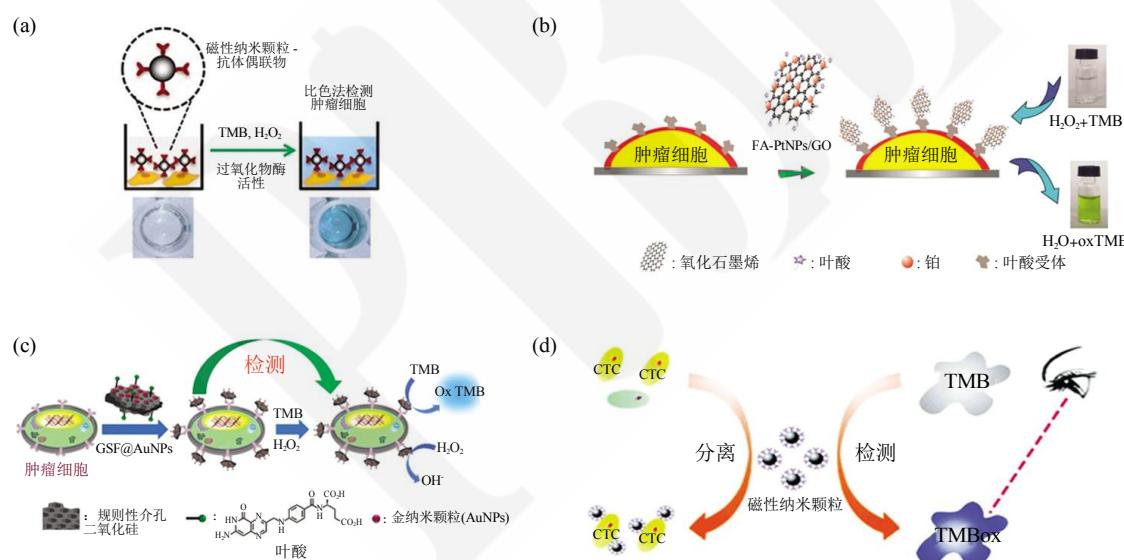


Fig. 3 Detection of tumor cells by nanozymes^[17-18, 42, 44]

图 3 纳米酶用于肿瘤细胞的检测^[17-18, 42, 44]

新加坡的 Yanli Zhao 团队将纳米酶和介孔材料组合构建新型的纳米酶复合物。他们利用共价偶联和修饰的方式，构建了一个规则性介孔二氧化硅(PMS)-还原型氧化石墨烯(RGO)的骨架结构，在其表面偶联肿瘤细胞靶向分子——叶酸(FA)后，将金(Au)纳米颗粒固定在 PMS 中得到 GSF@AuNPs 复合材料。Zhao 和同事们发现，GSF@AuNPs 具有增强的过氧化物酶活性，基于叶酸修饰的杂合纳米酶 GSF@AuNPs 可以特异性识别叶酸受体高表达的细胞。这套体系对肿瘤细胞的裸眼检测极限是

50 个细胞^[17]。

循环肿瘤细胞(circulating tumor cell, CTC)是指由原发或继发肿瘤进入外周血的肿瘤细胞。研究表明，CTC 可以作为监测肿瘤转移、复发以及评价肿瘤治疗效果的生物标志物^[45]。然而 CTC 数量的稀少性以及它的脆弱性增加了其检测的难度。最近，澳大利亚的 Matt Trau 课题组利用 Fe_3O_4 纳米酶的双功能特性——磁性及酶活性，建立了一种快速分离血清中 CTC 并实现比色检测的纳米酶免疫分析法(图 3d)^[42]。他们利用羧基修饰的 Fe_3O_4 纳米

酶共价偶联黑色素瘤特异性识别抗体，构建了特异性识别黑色素瘤的 Fe_3O_4 纳米酶，然后将这种纳米酶加入到病人血清中，利用 Fe_3O_4 纳米酶的磁性，实现对 CTC 的富集和分离；同时，利用其过氧化物酶活性，实现了对 CTC 细胞的可视化检测。Matt Trau 团队证实，这种基于 Fe_3O_4 纳米酶双功能的黑色素瘤 CTC 检测方法，对模拟病人血清的检测能力为：裸眼判断条件下，检出率为 50 个 CTC 细胞/ml 血清；借助分光光度计，检出率为 13 个 CTC 细胞/ml 血清^[42]。这种方便、省时、高灵敏的 CTC 检测方法，将会为临幊上黑色素瘤病人的肿瘤复发、转移提供诊断的依据，也是纳米酶多功能应用的一个很好的范例。

1.4 纳米酶检测肿瘤组织

免疫组织化学检测是目前国内外公认的肿瘤诊断的“金标准”^[46-48]，是病理诊断常用的技术手段。如图 4c 所示，其基本原理是基于抗体与肿瘤

相关抗原的特异性结合，通过一抗特异性识别肿瘤细胞，生物素标记的二抗进一步识别一抗，然后辣根过氧化物酶上标记的链霉素与生物素结合，最后利用过氧化物酶氧化显色底物来实现对肿瘤组织的检测。但是这种免疫检测方法需要多种抗体孵育和缓冲液反复冲洗，具有步骤复杂、操作时间长的缺点，而且结果分析受限于人们经验的主观判断，因此对该方法进行改进是临床所需的^[49-50]。

2012 年，我们课题组^[50]发明了一种基于纳米酶的肿瘤免疫组织化学检测新技术。其原理是我们首次发现人重链铁蛋白能够特异性地识别肿瘤组织，识别程度与肿瘤的恶性程度呈正相关，而且其中的铁核(纳米酶)具有过氧化物酶活性，可进行催化显色(图 4b)。由此，我们设计了一种兼具识别肿瘤并使其可视化的双功能探针，实现对肿瘤组织的快速、灵敏检测。

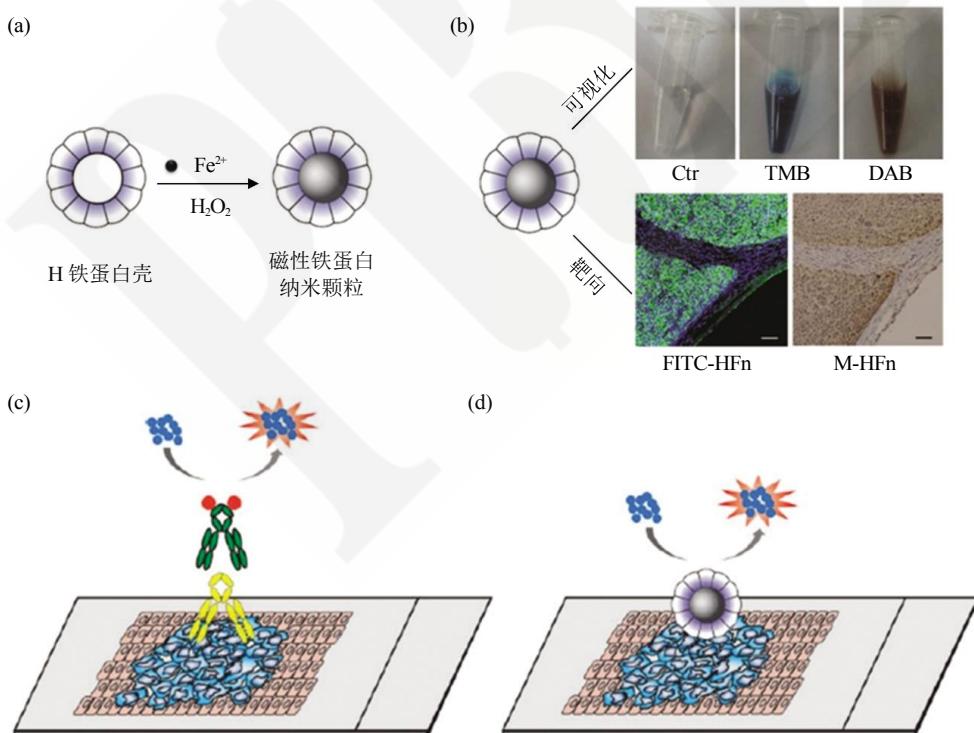


Fig. 4 Ferritin nanzyme based immunohistochemical assay for clinical tumor tissues diagnosis^[50-51]

图 4 铁蛋白纳米酶的临床肿瘤组织诊断法^[50-51]

结果表明，该方法与常规免疫组织化学检测方法相比，具有以下特点：a. 灵敏度高和特异性强；b. 操作简单、重复性好，该方法仅使用一种试剂和一个步骤，减少了人为操作对结果的影响；c. 速度快，新方法仅需要不到 1 h 的时间，而免

疫组化方法需要 3~4 h；d. 新方法成本低，无需使用造价昂贵、易变性的抗体。这些特性表明，铁蛋白纳米酶作为一种新型的试剂，有望成为一种快速、经济而且广谱的肿瘤诊断新工具。

随后，潘永信课题组证实，铁蛋白纳米酶中包

裹在 H- 铁蛋白壳中的磁性纳米酶的颗粒粒径越大，其过氧化物酶活性越高，同时对肿瘤组织的染色效果就越好^[52]。向 H- 铁蛋白壳中装载铁 - 钴杂合纳米酶，可以进一步提高铁蛋白纳米酶的过氧化物酶活性，从而进一步提高铁蛋白纳米酶对肿瘤组织检测的灵敏度^[53]。这些报道进一步证实了铁蛋白纳米酶用于肿瘤组织病理诊断的可行性和普适性。

Fe_3O_4 纳米酶被发现后，很多科学家将注意力放到了 Fe 的同族元素钴(Co)上^[54-55]。张宇团队发现同 Fe_3O_4 纳米酶类似，四氧化三钴(Co_3O_4)纳米颗粒同样具有非常强的类 HRP 酶活性。如图 5a 所示，利用化学偶联的方式，他们在 Co_3O_4 纳米酶表面修饰特异性靶向血管内皮生长因子受体(vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR)的抗体，从而成功地建立了用于临床肿瘤组织诊断的 Co_3O_4 纳米酶免疫分析法。结果表明，该方法可以特异性区

分 VEGFR 阳性的肿瘤组织与阴性的正常组织^[54]。

常规免疫组化结果分析时受主观性影响，因此定量免疫组化检测是临床的一个需求^[49]。DAB 沉淀物是常规免疫组织化学中过氧化物酶的催化产物，张宇团队发现 DAB 沉淀物具有暗视野成像的特殊光学性质。在此基础上，他们建立了一种新型的基于暗视野成像的免疫组化方法，实现对肿瘤组织的定量检测(图 5)^[49]。金纳米颗粒由于具有过氧化物酶活性和暗视野成像特性起到协同增强剂的作用。根据暗视野显微镜下 DAB 沉淀物和 Au 纳米酶的散射特征，可以定量地将肿瘤组织分为“-、+、++、+++”四个级别。利用这一系统检测表达 HER2 的肿瘤组织，灵敏度和特异性分别达到 96.70% 和 95.65%。与传统的方法相比，增强的暗视野图像可以通过软件定量分析，避免了主观判断带来的影响。

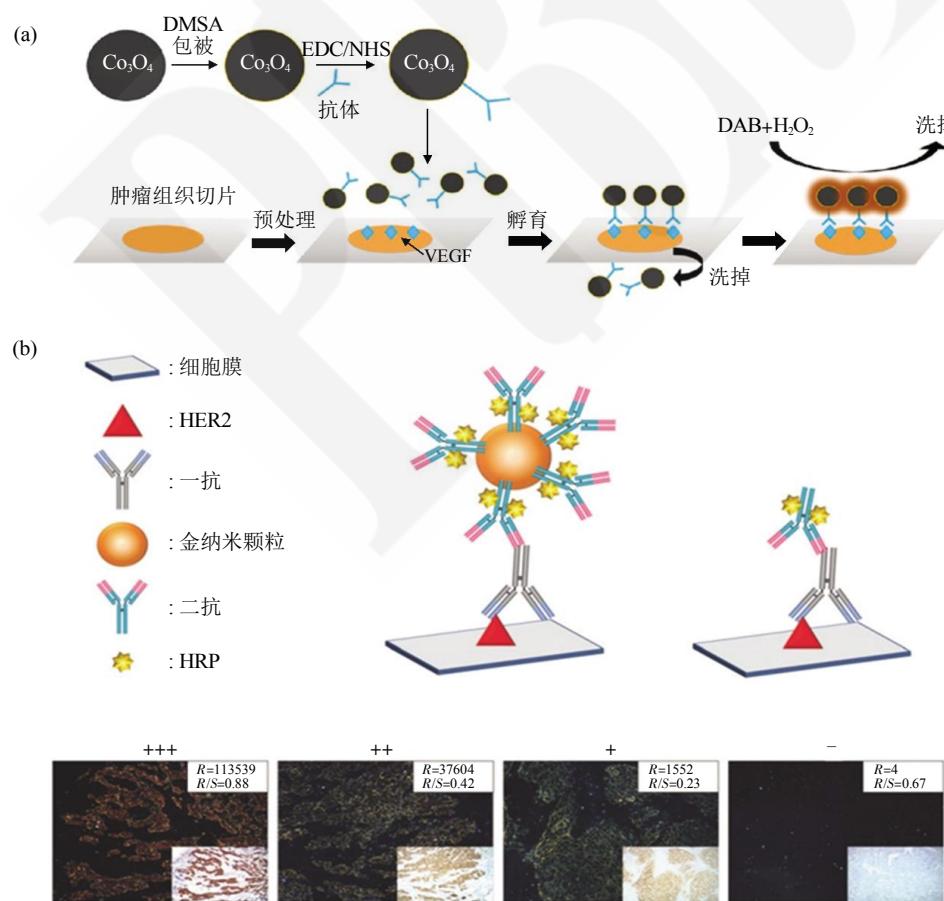


Fig. 5 Co_3O_4 nanozyme based immunohistochemical assay for clinical tumor tissues diagnosis^[54-55]

图 5 Co_3O_4 纳米酶的临床肿瘤组织诊断法^[54-55]

2 纳米酶在代谢性疾病诊断中的应用

代谢性疾病是由遗传因素和环境因素共同引起, 导致某些物质如葡萄糖、嘌呤、脂肪、蛋白质等代谢紊乱的疾病。临床诊断主要依靠对血液、尿液或其他组织液中的生物化学指标进行检查^[56]。目前, 已经有多种纳米酶用于代谢性疾病的诊断。

2.1 纳米酶检测糖尿病

糖尿病是一种常见的内分泌代谢性疾病, 由胰岛素分泌缺陷或其生理功能受损引起。其主要特点是持续的高血糖状态、尿糖阳性和糖耐量降低。糖尿病长期存在的高血糖, 会导致各种组织特别是眼、肾、心脏、血管、神经的慢性损害和功能障碍, 这些急慢性并发症给整个社会带来了巨大的医疗负担^[57]。对葡萄糖快速、灵敏的监测是健康人群及糖尿病患者身体保健的一个重要组成部分, 这包括血液葡萄糖和尿液葡萄糖的监测^[58]。健康人群和糖尿病患者血糖浓度的范围分别为3~8 mmol/L和

9~40 mmol/L^[59]; 健康人群尿糖一般呈现阴性, 而糖尿病患者尿糖为阳性(超过3 mmol/L)^[60]。所以, 建立简单、快速的葡萄糖检测传感器引起了科学家浓厚的兴趣^[58], 其中, 具有过氧化物酶活性的纳米酶已经被广泛用于各种葡萄糖传感器的制备。

汪尔康团队^[61]早在2008年首次将纳米酶用于葡萄糖的检测。他们将Fe₃O₄纳米酶与葡萄糖氧化酶(glucose oxidase, GOX)联合使用。GOX氧化葡萄糖产生H₂O₂, 在H₂O₂存在的条件下, 具有过氧化物酶活性的纳米酶催化ABTS生成有色产物, 根据有色产物的量可实现对葡萄糖的比色法检测(图6a)。随后, 许多其他具有过氧化物酶活性的纳米酶采用类似的方法建立了基于纳米酶的葡萄糖检测方法^[27, 62-104]。还有很多研究成功地将这些基于纳米酶的检测法用于血液或者尿液中葡萄糖的检测^[57, 105-117]。如黄玉明团队合成铁-钴双金属纳米合金作为过氧化物酶活性, 与葡萄糖氧化酶联合用于血清中葡萄糖的检测, 检测结果与血糖仪一致^[105]。

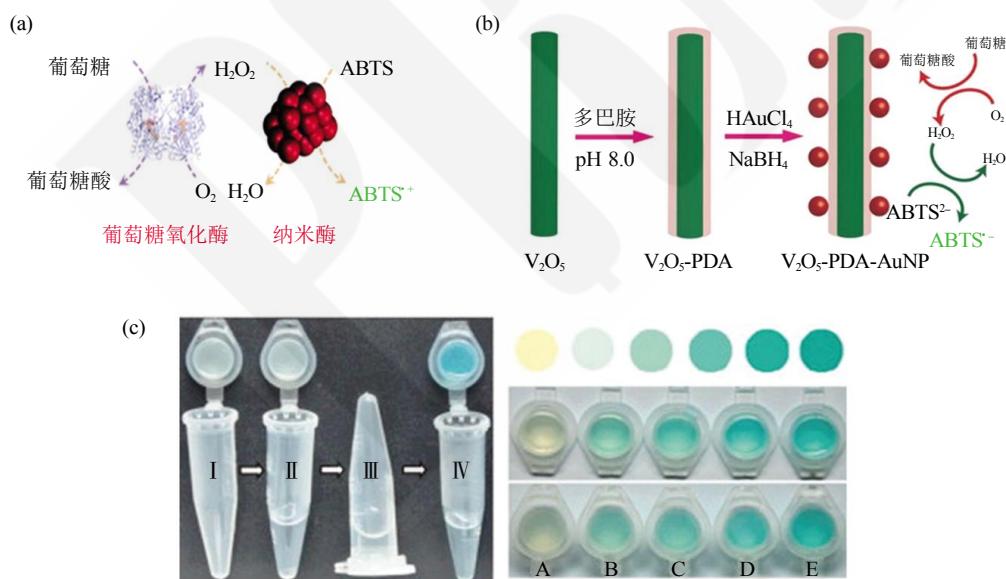


Fig. 6 Diabetes diagnosis by nanozymes^[61, 108, 113, 118]

图6 纳米酶用于糖尿病的诊断^[61, 108, 113, 118]

基于纳米酶的葡萄糖检测方法中, 大部分采用天然葡萄糖氧化酶和纳米酶结合的方式, 通过两种酶催化的级联反应实现对葡萄糖的检测。有趣的是, 曲晓刚团队报道了一种由两种纳米材料组合成的复合物, 在无需天然酶的情况下, 即可完成级联反应用于葡萄糖检测^[108]。如图6b, 他们利用多巴胺的自发聚合性质和还原剂硼氢化钠(NaBH₄)合成

得到五氧化二钒-聚合多巴胺-金(V₂O₅-PDA-AuNP)复合材料, 而V₂O₅和Au纳米材料分别具有过氧化物酶和葡萄糖氧化酶活性。通过模拟过氧化物酶和GOX的级联反应, V₂O₅-PDA-AuNP复合纳米材料即可用于葡萄糖的检测, 并成功实现对血清样本的检测。

更令人惊喜的是, 付凤富团队不仅设计了纳米

酶检测葡萄糖的新方法，还研发了一种基于纳米酶的试剂盒^[119]。如图 6c，他们将具有过氧化物酶活性的纳米酶、底物 TMB、GOX 与琼脂糖凝胶混合，凝固在离心管的盖子上，然后加入待检血清样本，盖上盖子并颠倒，使血清中的葡萄糖与凝胶充分反应，发生颜色变化。依据正常人和糖尿患者血清中葡萄糖浓度的不同，凝胶会分别发生由淡黄色到黄绿色和蓝绿色的改变，从而成功地实现不同人群血清中葡萄糖的可视化检测。

尿糖的检测在糖尿病诊断中也是非常重要的，尿液中葡萄糖的存在往往是糖尿病恶化的迹象^[117]。有多个纳米酶构建的葡萄糖传感器已经用于糖尿病患者尿糖的检测^[109, 114, 117]，并表现很好的检测效果，比如基于 $ZnFe_2O_4$ 纳米酶的检测结果与医院使用的 GOD-PAP 法一致。证明了基于纳米酶的葡萄糖检测方法在临床应用上具有可行性。

2.2 纳米酶检测其他代谢性疾病

嘌呤代谢的紊乱常表现为血、尿中尿酸水平的变化。尿酸水平的异常会导致包括关节炎、尿石症和自毁容貌综合征等各种疾病^[120-122]。一般来说，尿酸的分析方法包括非酶法和酶法。与毛细管电泳和高效液相色谱^[123-124]等非酶法相比，基于尿酸酶的酶法^[125-126]具有较高的特异性。天然过氧化物酶通过检测尿酸氧化生成的 H_2O_2 被广泛用于制造含酶的尿酸检测传感器^[127]。

作为过氧化物酶的替代品，有多种纳米酶已经用于血清和尿液中尿酸的检测^[128-130]。为相关疾病的筛查和诊断提供了新的工具。

3 纳米酶在传染性疾病诊断中的应用

传染性疾病是由各种病原体引起的能在人与人、动物与动物或人与动物之间相互传播的一类疾病。病原体中大部分是微生物，小部分为寄生虫。对感染者的快速诊断和隔离可有效阻断其传播途径，从而避免大范围的感染和传播^[131]。鉴于快速诊断对传染病防治的重要性，很多科学家开展了纳米酶在传染病快速诊断方面的应用^[18, 23, 132-135]。

2014 年埃博拉(Ebola virus disease, EVD)在西非的爆发，是自 1976 年首次发现 EVD 以来最大的一次疫情^[136]。在当时缺乏有效的疫苗和治疗方法时，抑制埃博拉病毒(Ebola virus, EBOV)传播的一种基本方法就是快速诊断并隔离 EBOV 感染者。所以，迫切需要一种快速、高敏感度和易于操作的埃博拉诊断试剂。针对这个情况，我们课题组

发明了一种纳米酶试纸条法^[134](图 7a)，利用 Fe_3O_4 纳米酶代替胶体金试纸条中的胶体金纳米颗粒，然后偶联 EBOV 抗体，构建纳米酶探针。通过结合 Fe_3O_4 纳米酶的磁性和催化活性，使得纳米酶探针具有三个功能：识别并分离病毒，催化酶的反应使 EBOV 可视化。结果表明，纳米酶试纸条能够将免疫层析法对埃博拉病毒的检测灵敏度提高 100 倍，可以在 30 min 内快速检测到 240 个 pfu/ml 的假病毒，与 ELISA 的灵敏度相当。同时，纳米酶试纸条法操作更简单，无需任何特殊装备。纳米酶试纸条法的灵敏度和特异性同时在新布尼亚病毒、禽流感病毒的检测上得到了验证。这一基于纳米酶的免疫层析新方法作为一个平台技术，目前已经被广泛用于肿瘤筛查(便潜血)、法医鉴定、病毒检测、农药残留及国防安全等方面。

美国的 Lidong Qin^[132]课题组从核酸的角度对埃博拉病毒进行检测。他们采用微流体平台技术——体积芯片法，构建了一个多级体积芯片并与 DNA 免疫分析方法结合，实现对埃博拉病毒基因序列的检测。如图 7b，三组分夹心的 DNA 杂交引入过氧化氢酶，引起过氧化氢的分解，但产生的氧气并不直接推动墨水形成柱状图，它会推动过氧化氢，与提前装置好的铂(Pt)过氧化氢纳米酶反应，通过 3 次级联反应，从而推动红色墨水形成不同高度的柱状图。在 Pt 纳米酶的信号扩增作用下，该方法可检测到低至 20 pmol/L 的埃博拉病毒基因序列，而且不需要辅助工具、数据处理或计算机图形绘制。另外，研究表明，该方法的检测信号不受血清中其他物质的干扰，并且能够成功地识别单核苷酸多态性即基因序列单个碱基的基因错配，大大增加了该技术的临床应用可行性和应用范围。

艾滋病是一种由感染艾滋病病毒(human immunodeficiency virus, HIV)引起的危害性极大的传染病。HIV 能攻击人体免疫系统，使人体丧失免疫功能。因此，人体易于感染各种疾病，并可发生恶性肿瘤，病死率较高。在 HIV 的检测方面，目前主要有抗体、抗原及病毒基因测定等方法，其中病毒基因测定方法近年来得到越来越多的重视^[137]。

王光丽课题组^[133]发现，汞离子(Hg^{2+})可以特异地刺激牛血清白蛋白包裹的银纳米颗粒(BSA-Ag NCs)产生氧化酶活性。基于此发现，她们发明了一种无标签且无需 H_2O_2 的 HIV 病毒基因测定方法。如图 7c 所示， Hg^{2+} 容易与探针分子 DNA 中的胸腺嘧啶碱基(T)紧密结合形成 T- Hg^{2+} - T 发夹状结

构, 若待检样品中存在靶向 DNA 分子, 探针与靶向 DNA 分子杂交, 发夹状结构打开, Hg^{2+} 被释放出来。游离的 Hg^{2+} 会触发 BSA-Ag NCs 的氧化酶活性, 在分子氧的作用下催化 TMB 发生显色反应, 从而实现对病毒基因的检测。研究发现, 该系统可以检测到 20 nmol/L 的 HIV 病毒 DNA 片段 HIV-1^[137], 而且能区分含单个碱基突变的 DNA 序列。这一新型病毒基因测定方法具有不依赖 H_2O_2 、灵敏度高、特异性强而且不需要对待检 DNA 进行额外修饰等优点, 在临床样品的检测方面具有潜在的应用价值。

根据核酸分子对纳米酶活性的调节作用也可实现对传染病原微生物的检测。韩国的 Hyun Gyu Park 团队^[135]利用 DNA 分子对二氧化铈(CeO_2)氧化酶活性的抑制作用, 建立了一种快速检测性病病原菌——沙眼衣原体的诊断方法。如图 7d 所示, 在不含目标病原菌时, DNA 分子的 PCR 扩增反应不含有核酸产物, 所以 CeO_2 会正常氧化底物发生显

色反应。当含有目标病原菌时, PCR 产物中的核酸分子会抑制 CeO_2 的酶活性, 主要通过以下几个方式: a. 带负电荷的 DNA 磷酸骨架通过静电相互作用吸附于带正电的纳米颗粒表面, 阻止底物 TMB 与 CeO_2 表面的接触; b. 带负电荷的 DNA 与带正电荷的底物 TMB 结合; c. 溶液中的 DNA 导致 CeO_2 颗粒的聚集, 降低 CeO_2 纳米酶的有效浓度。这些联合作用会显著降低 CeO_2 的氧化酶活性, 并相应降低 TMB 氧化所产生的颜色信号。有无核酸两种情况产生的比色信号差异, 用肉眼即可分辨出来, 而且该方法不需要对 PCR 产物进行后提纯, 整个反应仅需 1 min。这些优点为该技术实现临床应用产品的转化提供了可行性。

除此之外, 用纳米酶代替传统 ELISA 反应中的 HRP 酶, 也已经用于痢疾病原体——轮状病毒的检测^[18, 23]。可看出, 纳米酶的出现为传染病的快速诊断提供了新思路、新方法和新工具。

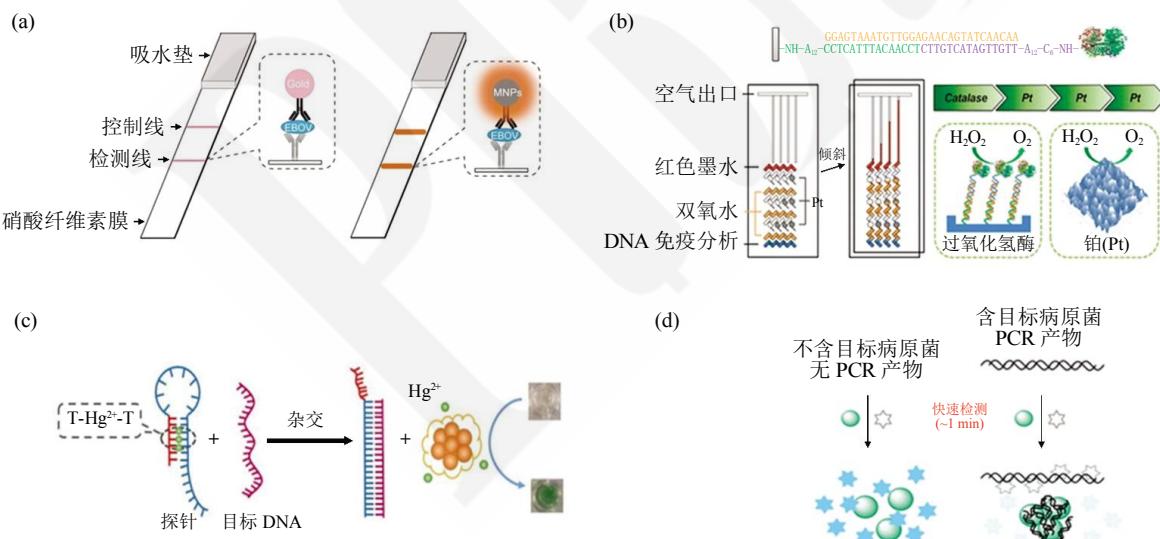


Fig. 7 Infectious diseases diagnosis by nanozymes^[132–135]

图 7 纳米酶用于传染性疾病的诊断^[132–135]

4 纳米酶在神经退行性疾病诊断中的应用

神经退行性疾病是一组因脑组织不同区域神经元慢性、进行性变形和缺失而产生的疾病, 主要包括帕金森病、阿尔茨海默病、亨廷顿氏舞蹈病和精神分裂症等^[138]。研究发现乙酰胆碱(acetylcholine, ACh)、半胱氨酸(cysteine, Cys)、同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、多巴胺(dopamine, DA)等分子在体内水平的异常与许多神经退行性疾病的发生密切相关^[139], 比如高水平的 Cys 和 Hcy 经常伴随阿尔茨海默病的发生^[140–141]; 在帕金森患者体内观察到 VEGF 的下调^[142]和多巴胺的严重缺少; 精神分裂与多巴胺水平的异常升高有关^[143], 所以灵敏且特异地检测血液中上述分子的浓度对于神经退行性疾病的诊断具有重要意义。目前, 已经有一些纳米酶相关的研究用于神经退行性疾病的诊断^[26, 144–151]。

(dopamine, DA)等分子在体内水平的异常与许多神经退行性疾病的发生密切相关^[139], 比如高水平的 Cys 和 Hcy 经常伴随阿尔茨海默病的发生^[140–141]; 在帕金森患者体内观察到 VEGF 的下调^[142]和多巴胺的严重缺少; 精神分裂与多巴胺水平的异常升高有关^[143], 所以灵敏且特异地检测血液中上述分子的浓度对于神经退行性疾病的诊断具有重要意义。目前, 已经有一些纳米酶相关的研究用于神经退行性疾病的诊断^[26, 144–151]。

中国台湾的 Huan-Tsung Chang 调课题组将具有过氧化物酶活性的金 / 银纳米材料与乙酰胆碱酯酶和胆碱氧化酶结合，通过乙酰胆碱与乙酰胆碱酯酶和胆碱氧化酶的连续反应生成 H_2O_2 ，利用金 / 银纳米材料的过氧化物酶活性，实现对乙酰胆碱的比色法检测^[149]。

含有硫醇基团的分子如半胱氨酸、同型半胱氨酸与金属纳米材料之间存在很强的亲疏特性^[152]。这种相互作用，会影响纳米材料的理化性质和类酶活性。基于此，彭池方团队建立了一种对半胱氨酸

的纳米酶比色检测方法。如图 8a，以 DNA 为模板的银 / 铂纳米簇(DNA-Ag/Pt NCs)具有过氧化物酶活性，而且纳米簇与半胱氨酸存在亲疏性，所以半胱氨酸会与纳米簇结合并抑制它的过氧化物酶活性。根据氧化产物的减少可实现对半胱氨酸的比色法检测，检测极限为 2 nmol/L^[150]。叶芳贵课题组发现半胱氨酸不仅会抑制金属纳米酶的酶活性，而且会减少其氧化产物，结合这两种效果，他们将对半胱氨酸的检测极限发展到 1.2 nmol/L^[145]。

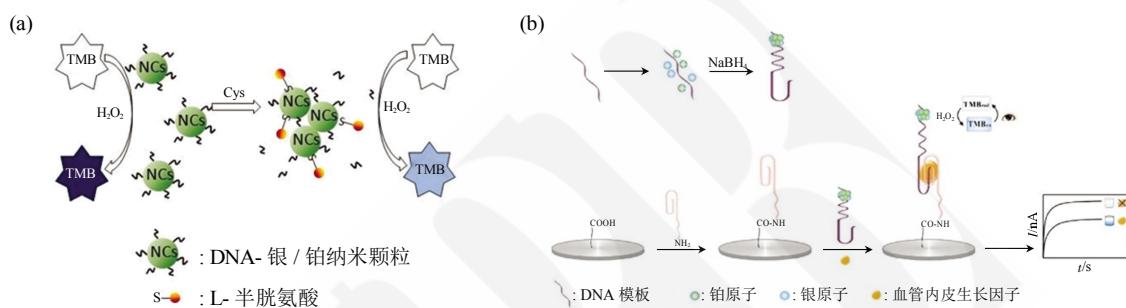


Fig. 8 Neurodegenerative diseases diagnosis by nanozymes^[26, 150]

图 8 纳米酶用于神经性疾病的诊断^[26, 150]

近年来，基于适配子与靶向分子相互作用的适配子传感器越来越受到人们的关注^[26]。适配子是一段人工合成可以特异地识别靶标物质的单链寡核苷酸(DNA 或 RNA)，由于其具有高亲和力、高特异性的优势，目前已在构建各种适配子传感器中的得到广泛应用^[14]。如图 8b 所示，陈敬华团队将纳米酶与适配子结合，构建了一种无标签的电化学方法用于 VEGF 的检测^[26]。首先他们用含有模板 DNA 和 1 个 12 分子 VEGF 适配子的单链 DNA 合成适配子修饰的银 / 铂双金属纳米簇(Ag/Pt NCs)，然后将一段 13 分子的 VEGF 适配子通过酰胺键共价连接到玻璃碳电极上。以 DNA-Ag/Pt NCs 为检测探针，若检测样品中含有 VEGF，则 2 个适配子将会与其结合，构成循环通路，溶液中电流强度增加。随着 VEGF 浓度的增加，电流强度会相应增强，从而提供一种 VEGF 的电化学检测方法。将该系统用于血清样本的检测，结果与 ELISA 的方法一致，证明了它的潜在应用价值。

5 纳米酶在心血管疾病诊断中应用

心血管疾病是一种严重威胁人类健康，特别是 50 岁以上中老年人健康的常见病，具有“发病率

高、死亡率高、致残率高、复发率高、并发症多”——“四高一多”的特点。主要包括冠心病、高血压、高血脂、周围血管疾病等。对心血管疾病相关标志因子的检测，是诊断和评价血管及心脏状态的依据。临幊上常用的检测指标有 B 型利钠肽、超敏肌钙蛋白 T、同型半胱氨酸、抗坏血酸、凝血酶、总胆固醇等^[153]。目前，已经报道了一些纳米酶在心血管疾病诊断中的应用^[12, 147, 154-158]。

除了常见的通过调节纳米酶的活性，或者将纳米酶与抗体、适配子结合应用于各种标志分子检测，美国的 Lidong Qin 课题组报告一种数字体积芯片法(digital volumetric bar-chart chip, DV -chip)，实现对 B 型利钠肽(B-type natriuretic peptide, BNP)的超灵敏检测和分级^[158]。BNP 是诊断心力衰竭的重要生物标志物^[159-160]，临幊设置了 29 pmol/L 和 116 pmol/L 这两个血清的浓度以区分疾病的不同阶段^[161]。所以 BNP 的定量监测，对于评估疾病的严重程度并决定进一步的治疗措施非常重要。

数字体积芯片法的设计思路如图 9 所示，3 个对照样本，浓度分别为 C1、C2、C3 装载于平台的顶部，待检样本装载于平台的底部。具有过氧化氢模拟酶活性的 Pt NPs 连接抗体作为 ELISA 的检测

探针, 其催化 H_2O_2 产生的氧气量与 Pt NPs 的数量有关, 而 Pt NPs 的数量与生物标志物的浓度有关。所以, 可以根据产生的氧气的多少, 判断实验组和对照组浓度的高低。若对照组产生氧气多于实验组即红色墨水向下流, 则记录为 0, 表明对照组浓度高于实验组, 相反, 若对照组产生氧气少于实验组即红色墨水向上流, 则记录为 1, 表明对照组

浓度低于实验组。使用临幊上设置的分级浓度作为对照样本的浓度, 即可根据红色墨水的流向, 清晰准确地判断疾病所处的阶段。另外, 他们还对 20 例心脏衰竭患者的 BNP 血清样品分別进行芯片法和 ELISA 法检测, 结果表明芯片数据与临幊使用的 ELISA 方法结果一致。

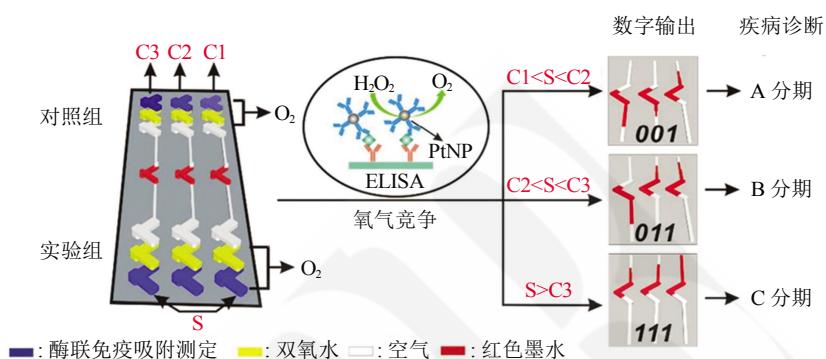


Fig. 9 Cardiovascular diseases diagnosis by nanozymes^[158]

图 9 纳米酶用于心血管疾病的诊断^[158]

6 纳米酶在炎症性疾病诊断中的应用

炎症是指具有血管系统的活体组织对各种致炎因子所作的防御反应, 是十分常见而又重要的基本病理过程。体表的外伤感染和各器官的大部分常见病, 如肺炎、肝炎、肾炎、疖、痈等都属于炎症性疾病。炎症性疾病的发生会引起发热、白细胞增多, 单核巨噬细胞系统增生、实质器官病变等危害, 长期的炎症还会引发其他的身体疾病, 如癌症、心血管疾病等^[162-163]。所以, 对炎症的及时诊断和治疗是非常重要的。纳米酶在这方面已经取得一些研究进展^[164]。

王光丽课题组^[164]发现用牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)固定的金纳米簇(gold nanoclusters, Au NCs)即 BSA-Au NCs, 在可见光照射下表现出氧化模拟酶活性。基于此发现, 她们发展了一种简单、经济、快速的比色法用于检测尿液中的胰蛋白酶。胰蛋白酶在消化过程中起到降解多种蛋白质的作用, 是最重要的消化酶^[165-166], 而且, 胰蛋白酶在控制胰腺外分泌功能方面也起着关键的作用, 所以成为胰腺炎的生物标志分子^[167]。如图 10, 在可见光照射下, BSA-Au NCs 表现出氧化酶活性, 氧化 TMB 生成有色产物, 而当溶液中存

在胰蛋白酶时, 胰蛋白酶会降解 BSA-Au NCs 中的 BSA, 从而使 Au 颗粒发生聚集而失去酶活性。研究发现, 该方法对胰蛋白酶的检测极限是 0.6 mg/L, 远低于胰蛋白酶在病人尿液或血清中的平均水平。然后她们使用标准加入法检测尿液中的胰蛋白酶, 检测恢复值为 96.1%~98.4%, 表明该方法在临幊样本检测中的准确性。

相比其他基于天然酶的检测, 基于 BSA-Au NCs 光致酶活性的方法具有一个显著的优点, 它可以通过调节照射光源的有无和波长来调节纳米酶的活性。王光丽等研究了光照引起纳米酶活性的机制。发现当反应体系用氮气代替氧气时, TMB 的氧化受到抑制, 表明氧气在反应中的必要性。同时使用一系列清除剂用来清除反应过程中可能起作用的活性氧, 包括羟自由基($\cdot OH$), 超氧化物阴离子(O_2^-)和光催化产生的空穴(h^+), 以判断各成分在催化中起的作用。研究发现, 加入 $\cdot OH$ 和 O_2^- 的清除剂叔丁醇和超氧化物歧化酶, 能轻微地抑制 TMB 的氧化, 而加入 h^+ 的抑制剂 EDTA, 能明显抑制 TMB 的氧化, 同时使用电化学的方法可以检测到在可见光照射下产生明显的光电流。据此, 她们提出可能的光致催化机理(图 10b): BSA-Au NC 吸收可见光生成电子(e^-)——光致空穴(h^+)对, 并与氧气

或者水分子反应产生活性氧如 $\cdot\text{OH}$ 和 O_2^- , 然后氧化TMB即表现出氧化酶活性. 这项研究不仅提供

了一种快速检测胰腺炎的方法, 而且提出一种新型光致纳米酶, 拓展了纳米酶的类型和应用范围.

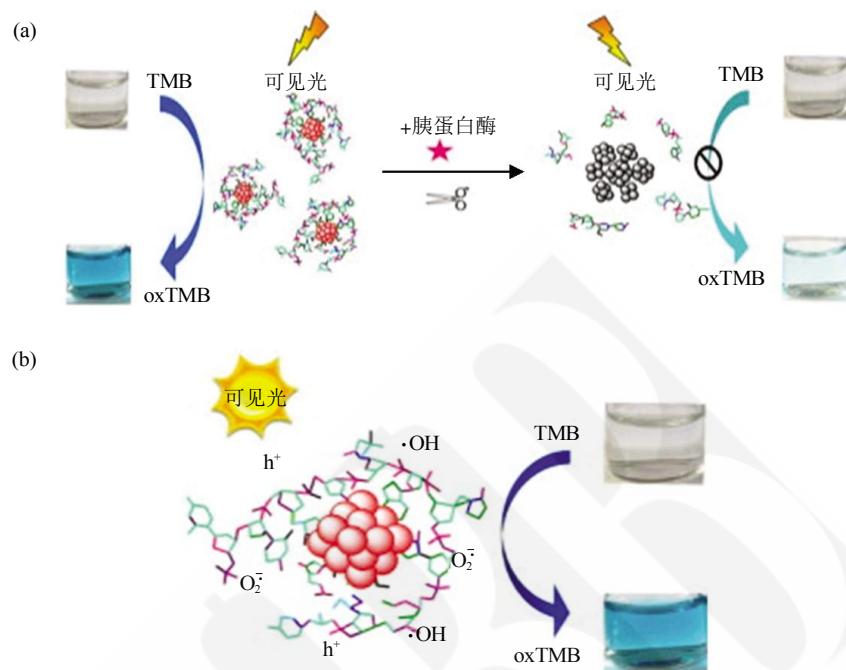


Fig. 10 Inflammatory diseases diagnosis by nanozymes^[164]

图 10 纳米酶用于炎症性疾病的诊断^[164]

7 小结与讨论

在本文中, 我们总结了近几年纳米酶在疾病诊断中的应用, 涉及的疾病有癌症、代谢性疾病、传染性疾病、神经退行性疾病、心血管疾病及炎症性疾病等. 国内外科学家建立了多种基于纳米酶的诊断方法, 这些方法检测的目标物质从基因、分子到细胞和组织. 同时, 基于纳米酶的诊断方法应用于临床样本检测时, 表现出较高的灵敏度和准确性, 体现了纳米酶在疾病诊断方面的实际应用价值.

随着纳米酶在疾病诊断研究方面的逐渐增多, 很多问题也慢慢浮现出来. 下面我们将问题及可能的解决方案归纳如下: 第一, 基于纳米酶的疾病诊断方法, 绝大多数是依据纳米酶的催化活性, 使其信号放大、提高灵敏度. 因此, 如何提高纳米酶的催化活性和稳定性, 将是纳米酶在疾病诊断应用中的关键问题. 根据纳米酶的特点, 可以从以下方面开展: 如调节纳米酶的尺寸、形态和结构, 在其表面修饰官能基团, 制备杂合组份的纳米酶或者发展纳米酶的激活剂等^[104, 168-172]. 第二, 检测探针特异

性识别靶标物质是准确检测疾病的前提. 目前基于纳米酶的诊断方法主要是通过在纳米酶表面修饰抗体、多肽、小分子或者适配子等靶向分子, 赋予其靶向性, 从而特异性地识别待检物质. 然而, 这种方法会存在一些非特异性吸附的情况^[173-176], 使得探针的特异性降低, 而且操作步骤比较繁琐, 增加了临床转化的难度. 针对这种情况, 在纳米酶表面修饰阻碍生物分子结合的基团如烷基、羧酸盐基团^[173-176], 或者省略抗体等的连接, 以具有直接靶向性的分子如铁蛋白为模板合成纳米酶, 都会降低纳米酶的非特异性吸附, 从而提高对疾病检测的准确性, 并提高临床转化的可能性. 第三, 更多地利用纳米酶的催化活性和本身的理化性质如磁性、荧光、光热特性等, 巧妙地设计并创造出新的双功能或者多功能分子, 将会拓展纳米酶在疾病诊断以及其他方面的应用.

最后, 鉴于纳米酶在疾病检测方面优异的表现, 接下来更多的努力应该投入到纳米酶产品的开发中. 开展各类技术产品的临床前研究, 测定其临床应用的稳定性、特异性及灵敏度, 并制定完整的

生产工艺、制造规程和质量标准, 从而实现纳米酶的产品转化, 使纳米酶从实验室走向市场, 并真正用于人类健康及生活品质的改善。

参 考 文 献

- [1] Lips-Castro W. A brief history of the natural causes of human disease. *Gac Med Mex*, 2015, **151**(6): 806–818
- [2] Rao C Y, Goryoka G W, Henao O L, et al. Global disease detection-achievements in applied public health research, capacity building, and public health diplomacy, 2001–2016. *Emerg Infect Dis*, 2017, **23**(13): S138–S146
- [3] Giljohann D A, Mirkin C A. Drivers of biodiagnostic development. *Nature*, 2009, **462**(7272): 461–464
- [4] Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay (Elisa) quantitative assay of immunoglobulin-G. *Immunochemistry*, 1971, **8**(9): 871–874
- [5] De La Rica R, Stevens M M. Plasmonic ELISA for the ultrasensitive detection of disease biomarkers with the naked eye. *Nature Nanotechnology*, 2012, **7**(12): 821–824
- [6] Luo X L, Davis J J. Electrical biosensors and the label free detection of protein disease biomarkers. *Chemical Society Reviews*, 2013, **42**(13): 5944–5962
- [7] Elandaloussi L M, Leite R M, Afonso R, et al. Development of a PCR-ELISA assay for diagnosis of *Perkinsus marinus* and *Perkinsus atlanticus* infections in bivalve molluscs. *Mol Cell Probe*, 2004, **18**(2): 89–96
- [8] Lequin R M. Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Clin Chem*, 2005, **51**(12): 2415–2418
- [9] Wulff G. Enzyme-like catalysis by molecularly imprinted polymers. *Chem Rev*, 2002, **102**(1): 1–27
- [10] Fruk I, Niemeyer C M. Covalent hemin-DNA adducts for generating a novel class of artificial heme enzymes. *Angew Chem Int Edit*, 2005, **44**(17): 2603–2606
- [11] Han M J, Yoo K S, Chang J Y, et al. 5-(beta-cyclodextrinylamino)-5-deoxy-alpha-D-riboses as models for nuclease, ligase, phosphatase, and phosphorylase. *Angew Chem Int Edit*, 2000, **39**(2): 347–349
- [12] Gao L, Zhuang J, Nie L, et al. Intrinsic peroxidase-like activity of ferromagnetic nanoparticles. *Nat Nanotechnol*, 2007, **2**(9): 577–583
- [13] Gao L, Yan X. Nanozymes: an emerging field bridging nanotechnology and biology. *Sci China Life Sci*, 2016, **59** (4): 400–402
- [14] Wei H, Wang E. Nanomaterials with enzyme-like characteristics (nanozymes): next-generation artificial enzymes. *Chem Soc Rev*, 2013, **42**(14): 6060–6093
- [15] Gao L, Yan X. Discovery and current application of nanozyme. *Prog Biochem Biophys*, 2013, **40**(10): 892–902
- [16] Linehan W M, Bratslavsky G, Pinto P A, et al. Molecular diagnosis and therapy of kidney cancer. *Annu Rev Med*, 2010, **61**: 329–343
- [17] Maji S K, Mandal A K, Nguyen K T, et al. Cancer cell detection and therapeutics using peroxidase-active nanohybrid of gold nanoparticle-loaded mesoporous silica-coated graphene. *Acs Appl Mater Inter*, 2015, **7**(18): 9807–9816
- [18] Woo M-A, Kim M I, Jung J H, et al. A novel colorimetric immunoassay utilizing the peroxidase mimicking activity of magnetic nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences*, 2013, **14**(5): 9999–10014
- [19] He X W, Ma N. A general strategy for label-free sensitive DNA detection based on quantum dot doping. *Anal Chem*, 2014, **86**(7): 3676–3681
- [20] Wang Z, Yang X, Feng J, et al. Label-free detection of DNA by combining gated mesoporous silica and catalytic signal amplification of platinum nanoparticles. *Analyst*, 2014, **139** (23): 6088–6091
- [21] Paul A, Paul S. The breast cancer susceptibility genes (BRCA) in breast and ovarian cancers. *Front Biosci-Landmrk*, 2014, **19** (4): 605–618
- [22] Kulasingam V, Diamandis E P. Strategies for discovering novel cancer biomarkers through utilization of emerging technologies. *Nat Clin Pract Oncol*, 2008, **5**(10): 588–599
- [23] 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**(1): 36–41
- [24] Gao Z, Xu M, Lu M, et al. Urchin-like (gold core)@ (platinum shell) nanohybrids: A highly efficient peroxidase-mimetic system for *in situ* amplified colorimetric immunoassay. *Biosens Bioelectron*, 2015, **70**: 194–201
- [25] Gao Z, Xu M, Hou L, et al. Magnetic bead-based reverse colorimetric immunoassay strategy for sensing biomolecules. *Anal Chem*, 2013, **85**(14): 6945–6952
- [26] Fu X-M, Liu Z-J, Cai S-X, et al. Electrochemical aptasensor for the detection of vascular endothelial growth factor (VEGF) based on DNA-templated Ag/Pt bimetallic nanoclusters. *Chinese Chemical Letters*, 2016, **27**(6): 920–926
- [27] Zheng A X, Cong Z X, Wang J R, et al. Highly-efficient peroxidase-like catalytic activity of graphene dots for biosensing. *Biosens Bioelectron*, 2013, **49**(11): 519–524
- [28] Shamsipur M, Safavi A, Mohammadpour Z. Indirect colorimetric detection of glutathione based on its radical restoration ability using carbon nanodots as nanozymes. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2014, **199**(4): 463–469
- [29] Song Y, Xia X, Wu X, et al. Integration of platinum nanoparticles with a volumetric bar-chart chip for biomarker assays. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2014, **53**(46): 12451–12455
- [30] Li J, Cao Y, Hinman S S, et al. Efficient label-free chemiluminescent immunosensor based on dual functional cupric oxide nanorods as peroxidase mimics. *Biosens Bioelectron*, 2018, **100**: 304–311
- [31] Gao L, Liu M, Ma G, et al. Peptide-conjugated gold nanoprobe—intrinsic nanozyme-linked immunosorbent assay of integrin expression level on cell membrane. *ACS NANO*, 2015, **9** (11): 10979–10990
- [32] Bramwell V H C, Doig G S, Tuck A B, et al. Changes over time of extracellular domain of HER2 (ECD/HER2) serum levels have prognostic value in metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Tr*, 2009, **114**(3): 503–511
- [33] Estrela J M, Ortega A, Obrador E. Glutathione in cancer biology and therapy. *Crit Rev Cl Lab Sci*, 2006, **43**(2): 143–181
- [34] Ma Y H, Zhang Z Y, Ren C L, et al. A novel colorimetric determination of reduced glutathione in A549 cells based on Fe₃O₄ magnetic nanoparticles as peroxidase mimetics. *Analyst*, 2012,

- 137(2): 485–489
- [35] Gao J, Guo Z K, Su F J, et al. Ultrasensitive electrochemical immunoassay for CEA through host-guest interaction of beta-cyclodextrin functionalized graphene and Cu@Ag core-shell nanoparticles with adamantane-modified antibody. *Biosensors & Bioelectronics*, 2015, **63**: 465–471
- [36] Xu Y S, Zhang X P, Luan C X, et al. Hybrid hydrogel photonic barcodes for multiplex detection of tumor markers. *Biosensors & Bioelectronics*, 2017, **87**: 264–270
- [37] Ylanne J, Cheresh D A, Virtanen I. Localization of beta-1-subunit, beta-3-subunit, alpha-5-subunit, alpha-V-subunit and alpha-IIb-subunit of the integrin family in spreading human erythroleukemia-cells. *Blood*, 1990, **76**(3): 570–577
- [38] Politaki E, Agelaki S, Apostolaki S, et al. A comparison of three methods for the detection of circulating tumor cells in patients with early and metastatic breast cancer. *Cell Physiol Biochem*, 2017, **44**(2): 594–606
- [39] Sun C, Chen X, Xu J, et al. Fabrication of an inorganic – organic hybrid based on an iron-substituted polyoxotungstate as a peroxidase for colorimetric immunoassays of H₂O₂ and cancer cells. *Journal of Materials Chemistry A*, 2013, **1**(15): 4699–4705
- [40] Asati A, Kaittanis C, Santra S, et al. pH-tunable oxidase-like activity of cerium oxide nanoparticles achieving sensitive fluorogenic detection of cancer biomarkers at neutral pH. *Anal Chem*, 2011, **83**(7): 2547–2553
- [41] Lee Y C, Kim M I, Woo M A, et al. Effective peroxidase-like activity of a water-solubilized Fe-aminoclay for use in immunoassay. *Biosens Bioelectron*, 2013, **42**: 373–378
- [42] Li J, Wang J, Wang Y, et al. Simple and rapid colorimetric detection of melanoma circulating tumor cells using bifunctional magnetic nanoparticles. *Analyst*, 2017, **142**(24): 4788–4793
- [43] Wang G L, Xu X F, Qiu L, et al. Dual responsive enzyme mimicking activity of AgX (X = Cl, Br, I) nanoparticles and its application for cancer cell detection. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2014, **6**(9): 6434–6442
- [44] Zhang L N, Deng H H, Lin F L, et al. *In situ* growth of porous platinum nanoparticles on graphene oxide for colorimetric detection of cancer cells. *Anal Chem*, 2014, **86**(5): 2711–2718
- [45] Nagrath S, Sequist L V, Maheswaran S, et al. Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. *Nature*, 2007, **450**(7173): 1235–1239
- [46] Shi S R, Liu C, Pootrakul L, et al. Evaluation of the value of frozen tissue section used as "gold standard" for immunohistochemistry. *Am J Clin Pathol*, 2008, **129**(3): 358–366
- [47] Taylor C R. Standardization in immunohistochemistry: the role of antigen retrieval in molecular morphology. *Biotech Histochem*, 2006, **81**(1): 3–12
- [48] O'leary T J. Standardization in immunohistochemistry. *Appl Immunohisto M M*, 2001, **9**(1): 3–8
- [49] Fan L, Tian Y, Yin R, et al. Enzyme catalysis enhanced dark-field imaging as a novel immunohistochemical method. *Nanoscale*, 2016, **8**(16): 8553–8558
- [50] Fan K, Cao C, Pan Y, et al. Magnetoferitin nanoparticles for targeting and visualizing tumour tissues. *Nat Nanotechnol*, 2012, **7**(7): 459–464
- [51] Fan K, Zhou M, Yan X. Novel properties and applications of human ferritin expressed by *Escherichia coli*. *Microbiology China*, 2014, **41**(3): 520–538
- [52] Cai Y, Cao C Q, He X Q, et al. Enhanced magnetic resonance imaging and staining of cancer cells using ferrimagnetic H-ferritin nanoparticles with increasing core size. *Int J Nanomed*, 2015, **10**: 2619–2634
- [53] Zhang T, Cao C, Tang X, et al. Enhanced peroxidase activity and tumour tissue visualization by cobalt-doped magnetoferitin nanoparticles. *Nanotechnology*, 2017, **28**(4): 045704
- [54] Dong J, Song L, Yin J J, et al. Co (3)O (4) nanoparticles with multi-enzyme activities and their application in immunohistochemical assay. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2014, **6**(3): 1959–1970
- [55] Zhang W, Dong J, Wu Y, et al. Shape-dependent enzyme-like activity of Co₃O₄ nanoparticles and their conjugation with his-tagged EGFR single-domain antibody. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2017, **154**: 55–62
- [56] Taylor V, Macqueen G. Associations between bipolar disorder and metabolic syndrome: A review. *J Clin Psychiatr*, 2006, **67** (7): 1034–1041
- [57] Dutta A K, Das S, Samanta S, et al. CuS nanoparticles as a mimic peroxidase for colorimetric estimation of human blood glucose level. *Talanta*, 2013, **107**: 361–367
- [58] Lu J, Bu R F, Sun Z L, et al. Comparable efficacy of self-monitoring of quantitative urine glucose with self-monitoring of blood glucose on glycaemic control in non-insulin-treated type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pr*, 2011, **93**(2): 179–186
- [59] Xu Y, Pehrsson P E, Chen L W, et al. Double-stranded DNA single-walled carbon nanotube hybrids for optical hydrogen peroxide and glucose sensing. *J Phys Chem C*, 2007, **111** (24): 8638–8643
- [60] Urakami T, Suzuki J, Yoshida A, et al. Incidence of children with slowly progressive form of type 1 diabetes detected by the urine glucose screening at schools in the Tokyo Metropolitan Area. *Diabetes Res Clin Pr*, 2008, **80**(3): 473–476
- [61] Wei H, Wang E. Fe₃O₄ magnetic nanoparticles as peroxidase mimetics and their applications in H₂O₂ and glucose detection. *Anal Chem*, 2008, **80**(6): 2250–2254
- [62] Zhao K, Gu W, Zheng S S, et al. SDS-MoS₂ nanoparticles as highly-efficient peroxidase mimetics for colorimetric detection of H₂O₂ and glucose. *Talanta*, 2015, **141**: 47–52
- [63] Wang Y H, Zhou B, Wu S, et al. Colorimetric detection of hydrogen peroxide and glucose using the magnetic mesoporous silica nanoparticles. *Talanta*, 2015, **134**: 712–717
- [64] Qiao F M, Chen L J, Li X N, et al. Peroxidase-like activity of manganese selenide nanoparticles and its analytical application for visual detection of hydrogen peroxide and glucose. *Sensor Actuat B-Chem*, 2014, **193**: 255–262
- [65] Dutta A K, Maji S K, Mondal A, et al. Iron selenide thin film: Peroxidase-like behavior, glucose detection and amperometric sensing of hydrogen peroxide. *Sensor Actuat B-Chem*, 2012, **173**: 724–731
- [66] Zhang Y F, Xu C L, Li B X. Self-assembly of hemin on carbon nanotube as highly active peroxidase mimetic and its application for biosensing. *Rsc Adv*, 2013, **3**(17): 6044–6050
- [67] Yang W S, Hao J H, Zhang Z, et al. CoxFe_{3-x}O₄ hierarchical nanocubes as peroxidase mimetics and their applications in H₂O₂ and glucose detection. *Rsc Adv*, 2014, **4**(67): 35500–35504

- [68] Dalui A, Pradhan B, Thupakula U, et al. Insight into the mechanism revealing the peroxidase mimetic catalytic activity of quaternary CuZnFeS nanocrystals: colorimetric biosensing of hydrogen peroxide and glucose. *Nanoscale*, 2015, **7**(19): 9062–9074
- [69] Chen L J, Sun K F, Li P P, et al. DNA-enhanced peroxidase-like activity of layered double hydroxide nanosheets and applications in H₂O₂ and glucose sensing. *Nanoscale*, 2013, **5**(22): 10982–10988
- [70] Chang Q, Tang H Q. Optical determination of glucose and hydrogen peroxide using a nanocomposite prepared from glucose oxidase and magnetite nanoparticles immobilized on graphene oxide. *Microchim Acta*, 2014, **181**(5–6): 527–534
- [71] Liu Q Y, Zhang L Y, Li H, et al. One-pot synthesis of porphyrin functionalized gamma-Fe₂O₃ nanocomposites as peroxidase mimics for H₂O₂ and glucose detection. *Mat Sci Eng C-Mater*, 2015, **55**: 193–200
- [72] Zhang W, Zhang Y, Chen Y H, et al. Prussian blue modified ferritin as peroxidase mimetics and its applications in biological detection. *J Nanosci Nanotechno*, 2013, **13**(1): 60–67
- [73] Wu D, Deng X, Huang X M, et al. Low-cost preparation of photoluminescent carbon nanodots and application as peroxidase mimetics in colorimetric detection of H₂O₂ and glucose. *J Nanosci Nanotechno*, 2013, **13**(10): 6611–6616
- [74] Zhang R Z, He S J, Zhang C M, et al. Three-dimensional Fe- and N-incorporated carbon structures as peroxidase mimics for fluorescence detection of hydrogen peroxide and glucose. *J Mater Chem B*, 2015, **3**(20): 4146–4154
- [75] Yao W T, Zhu H Z, Li W G, et al. Intrinsic peroxidase catalytic activity of Fe₃S₈ nanowires templated from [Fe₁₆S₂₀]/diethylenetriamine hybrid nanowires. *Chempluschem*, 2013, **78**(7): 723–727
- [76] Wang T, Fu Y C, Chai L Y, et al. Filling carbon nanotubes with prussian blue nanoparticles of high peroxidase-like catalytic activity for colorimetric chemoand biosensing. *Chem-Eur J*, 2014, **20**(9): 2623–2630
- [77] Qin F X, Jia S Y, Wang F F, et al. Hemin@metal-organic framework with peroxidase-like activity and its application to glucose detection. *Catal Sci Technol*, 2013, **3**(10): 2761–2768
- [78] Zheng A X, Cong Z X, Wang J R, et al. Highly-efficient peroxidase-like catalytic activity of graphene dots for biosensing. *Biosensors & Bioelectronics*, 2013, **49**: 519–524
- [79] Liu Q Y, Yang Y T, Li H, et al. NiO nanoparticles modified with 5,10,15,20-tetrakis (4-carboxyl phenyl)-porphyrin: Promising peroxidase mimetics for H₂O₂ and glucose detection. *Biosensors & Bioelectronics*, 2015, **64**: 147–153
- [80] Hu A L, Liu Y H, Deng H H, et al. Fluorescent hydrogen peroxide sensor based on cupric oxide nanoparticles and its application for glucose and L-lactate detection. *Biosensors & Bioelectronics*, 2014, **61**: 374–378
- [81] Pan Y, Li N, Mu J S, et al. Biogenic magnetic nanoparticles from *Burkholderia* sp. YN01 exhibiting intrinsic peroxidase-like activity and their applications. *Appl Microbiol Biot*, 2015, **99**(2): 703–715
- [82] Lin L P, Song X H, Chen Y Y, et al. Intrinsic peroxidase-like catalytic activity of nitrogen-doped graphene quantum dots and their application in the colorimetric detection of H₂O₂ and glucose. *Anal Chim Acta*, 2015, **869**: 89–95
- [83] Qiao F M, Wang Z Z, Xu K, et al. Double enzymatic cascade reactions within FeSe-Pt@SiO₂ nanospheres: synthesis and application toward colorimetric biosensing of H₂O₂ and glucose. *Analyst*, 2015, **140**(19): 6684–6691
- [84] Chen Q, Chen J, Gao C J, et al. Hemin-functionalized WS₂ nanosheets as highly active peroxidase mimetics for label-free colorimetric detection of H₂O₂ and glucose. *Analyst*, 2015, **140**(8): 2857–2863
- [85] Tian J Q, Liu Q, Asiri A M, et al. Ultrathin graphitic carbon nitride nanosheets: a novel peroxidase mimetic, Fe doping-mediated catalytic performance enhancement and application to rapid, highly sensitive optical detection of glucose. *Nanoscale*, 2013, **5** (23): 11604–11609
- [86] Shi Y, Huang J, Wang J N, et al. A magnetic nanoscale Fe₃O₄/P beta-CD composite as an efficient peroxidase mimetic for glucose detection. *Talanta*, 2015, **143**: 457–463
- [87] Li Q, Tang G G, Xiong X W, et al. Carbon coated magnetite nanoparticles with improved water-dispersion and peroxidase-like activity for colorimetric sensing of glucose. *Sensor Actuat B-Chem*, 2015, **215**: 86–92
- [88] Dutta A K, Maji S K, Biswas P, et al. New peroxidase-substrate 3,5-di-tert-butylcatechol for colorimetric determination of blood glucose in presence of Prussian Blue-modified iron oxide nanoparticles. *Sensor Actuat B-Chem*, 2013, **177**: 676–683
- [89] Han L, Zeng L X, Wei M D, et al. A V₂O₅-ordered mesoporous carbon composite with novel peroxidase-like activity towards the glucose colorimetric assay. *Nanoscale*, 2015, **7**(27): 11678–11685
- [90] Liu Q Y, Li H, Zhao Q R, et al. Glucose-sensitive colorimetric sensor based on peroxidase mimics activity of porphyrin-Fe(3)o(4) nanocomposites. *Mat Sci Eng C-Mater*, 2014, **41**: 142–151
- [91] Liu Q Y, Jia Q Y, Zhu R R, et al. 5,10,15,20-Tetrakis(4-carboxyl phenyl) porphyrin-CdS nanocomposites with intrinsic peroxidase-like activity for glucose colorimetric detection. *Mat Sci Eng C-Mater*, 2014, **42**: 177–184
- [92] Chen Y X, Zhang H H, Xue H G, et al. Construction of a non-enzymatic glucose sensor based on copolymer P4VP-co-PAN and Fe₂O₃ nanoparticles. *Mat Sci Eng C-Mater*, 2014, **35**: 420–425
- [93] Liu B W, Sun Z Y, Huang P J J, et al. Hydrogen Peroxide Displacing DNA from Nanoceria: mechanism and detection of glucose in serum. *J Am Chem Soc*, 2015, **137**(3): 1290–1295
- [94] Wang H, Li S, Si Y M, et al. Recyclable enzyme mimic of cubic Fe₃O₄ nanoparticles loaded on graphene oxide-dispersed carbon nanotubes with enhanced peroxidase-like catalysis and electrocatalysis. *J Mater Chem B*, 2014, **2**(28): 4442–4448
- [95] Lang N J, Liu B W, Liu J W. Characterization of glucose oxidation by gold nanoparticles using nanoceria. *J Colloid Interf Sci*, 2014, **428**: 78–83
- [96] Tian T, Ai L H, Liu X M, et al. Synthesis of hierarchical FeWO₄ architectures with {100}-faceted nanosheet assemblies as a robust biomimetic catalyst. *Ind Eng Chem Res*, 2015, **54**(4): 1171–1178
- [97] Wan L J, Liu J H, Huang X J. Novel magnetic nickel telluride nanowires decorated with thorns: synthesis and their intrinsic peroxidase-like activity for detection of glucose. *Chem Commun*, 2014, **50**(88): 13589–13591
- [98] Xing Z C, Tian J Q, Asiri A M, et al. Two-dimensional hybrid mesoporous Fe₃O₄-graphene nanostructures: A highly active and reusable peroxidase mimetic toward rapid, highly sensitive optical detection of glucose. *Biosensors & Bioelectronics*, 2014, **52**: 452–457

- [99] Liu Y, Yuan M, Qiao L J, et al. An efficient colorimetric biosensor for glucose based on peroxidase-like protein- Fe_3O_4 and glucose oxidase nanocomposites. *Biosensors & Bioelectronics*, 2014, **52**: 391–396
- [100] Xie J X, Cao H Y, Jiang H, et al. Co_3O_4 -reduced graphene oxide nanocomposite as an effective peroxidase mimetic and its application in visual biosensing of glucose. *Anal Chim Acta*, 2013, **796**: 92–100
- [101] Zhu S Y, Zhao X E, You J M, et al. Carboxylic-group-functionalized single-walled carbon nanohorns as peroxidase mimetics and their application to glucose detection. *Analyst*, 2015, **140**(18): 6398–6403
- [102] Lu C, Liu X J, Li Y F, et al. Multifunctional janus hematite silica nanoparticles: mimicking peroxidase-like activity and sensitive colorimetric detection of glucose. *ACS Appl Mater Inter*, 2015, **7**(28): 15395–15402
- [103] Han L, Li C C, Zhang T, et al. Au@Ag heterogeneous nanorods as nanzyme interfaces with peroxidase-like activity and their application for one-pot analysis of glucose at nearly neutral pH. *ACS Appl Mater Inter*, 2015, **7**(26): 14463–14470
- [104] Liu J B, Hu X N, Hou S, et al. Au@Pt core/shell nanorods with peroxidase- and ascorbate oxidase-like activities for improved detection of glucose. *Sensor Actuat B-Chem*, 2012, **166**: 708–714
- [105] Chen Y, Cao H, Shi W, et al. Fe-Co bimetallic alloy nanoparticles as a highly active peroxidase mimetic and its application in biosensing. *Chem Commun (Camb)*, 2013, **49**(44): 5013–5015
- [106] Li R, Zhen M, Guan M, et al. A novel glucose colorimetric sensor based on intrinsic peroxidase-like activity of C_{60} -carboxyfullerenes. *Biosens Bioelectron*, 2013, **47**: 502–507
- [107] Lin T, Zhong L, Guo L, et al. Seeing diabetes: visual detection of glucose based on the intrinsic peroxidase-like activity of MoS_2 nanosheets. *Nanoscale*, 2014, **6**(20): 11856–11862
- [108] Qu K, Shi P, Ren J, et al. Nanocomposite incorporating V_2O_5 nanowires and gold nanoparticles for mimicking an enzyme cascade reaction and its application in the detection of biomolecules. *Chemistry*, 2014, **20**(24): 7501–7506
- [109] Su L, Qin W, Zhang H, et al. The peroxidase/catalase-like activities of MFe(2)O(4) (M=Mg, Ni, Cu) MNPs and their application in colorimetric biosensing of glucose. *Biosens Bioelectron*, 2015, **63**: 384–391
- [110] Qiao F, Wang Z, Xu K, et al. Double enzymatic cascade reactions within FeSe-Pt@ SiO_2 nanospheres: synthesis and application toward colorimetric biosensing of H_2O_2 and glucose. *Analyst*, 2015, **140**(19): 6684–6691
- [111] Rauf S, Nawaz M a H, Muhammad N, et al. Protic ionic liquids as a versatile modulator and stabilizer in regulating artificial peroxidase activity of carbon materials for glucose colorimetric sensing. *Journal of Molecular Liquids*, 2017, **243**: 333–340
- [112] Lin T R, Zhong L S, Wang J, et al. Graphite-like carbon nitrides as peroxidase mimetics and their applications to glucose detection. *Biosensors & Bioelectronics*, 2014, **59**: 89–93
- [113] Lin T R, Zhong L S, Song Z P, et al. Visual detection of blood glucose based on peroxidase-like activity of WS2 nanosheets. *Biosensors & Bioelectronics*, 2014, **62**: 302–307
- [114] Mitra K, Ghosh A B, Sarkar A, et al. Colorimetric estimation of human glucose level using gamma- Fe_2O_3 nanoparticles: An easily recoverable effective mimic peroxidase. *Biochem Biophys Res Co*, 2014, **451**(1): 30–35
- [115] Shi W B, Wang Q L, Long Y J, et al. Carbon nanodots as peroxidase mimetics and their applications to glucose detection. *Chem Commun*, 2011, **47**(23): 6695–6697
- [116] Liu Y L, Zhao X J, Yang X X, et al. A nanosized metal-organic framework of Fe-MIL-88NH(2) as a novel peroxidase mimic used for colorimetric detection of glucose. *Analyst*, 2013, **138** (16): 4526–4531
- [117] Su L, Feng J, Zhou X, et al. Colorimetric detection of urine glucose based ZnFe_2O_4 magnetic nanoparticles. *Anal Chem*, 2012, **84**(13): 5753–5758
- [118] Wang X, Hu Y, Wei H. Nanozymes in bionanotechnology: from sensing to therapeutics and beyond. *Inorganic Chemistry Frontiers*, 2016, **3**(1): 41–60
- [119] Lin T, Zhong L, Song Z, et al. Visual detection of blood glucose based on peroxidase-like activity of WS2 nanosheets. *Biosens Bioelectron*, 2014, **62**: 302–307
- [120] Huang S H, Shih Y C, Wu C Y, et al. Detection of serum uric acid using the optical polymeric enzyme biochip system. *Biosensors & Bioelectronics*, 2004, **19**(12): 1627–1633
- [121] Zhang Y, Shen W, Gu R, et al. Amperometric biosensor for uric acid based on uricase-immobilized silk * bioin membrane. *Anal Chim Acta*, 1998, **369**(1): 123–128
- [122] Rahman M A, Won M S, Shim Y B. Xanthine sensors based on anodic and cathodic detection of enzymatically generated hydrogen peroxide. *Electroanal*, 2007, **19**(6): 631–637
- [123] Wang Q J, Chen X, Ding F, et al. Determination of water-soluble small molecular antioxidants by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Chinese J Anal Chem*, 2005, **33** (7): 969–971
- [124] Liu M, He Y H, Lu J R. Chemiluminescence reaction of potassium permanganate-formaldehyde-uric acid system. *Chinese J Anal Chem*, 2005, **33**(4): 535–537
- [125] Chen Z C, Wang H Y, He J S, et al. Development and clinical application of biosensor for detecting uric acid in whole-blood. *Chinese J Anal Chem*, 2007, **35**(4): 615–618
- [126] Kasai S, Hirano Y, Motochi N, et al. Simultaneous detection of uric acid and glucose on a dual-enzyme chip using scanning electrochemical microscopy/scanning chemiluminescence microscopy. *Anal Chim Acta*, 2002, **458**(2): 263–270
- [127] Sanz V, De Marcos S, Galban J. Uric acid determination using uricase and the autotransducer molecular absorption properties of peroxidase. *Anal Chim Acta*, 2008, **607**(2): 211–218
- [128] Tang Y-R, Zhang Y, Liu R, et al. Application of $\text{NaYF}_4:\text{Yb},\text{Er}$ nanoparticles as peroxidase mimetics in uric acid detection. *Chinese J Anal Chem*, 2013, **41**(3): 330–336
- [129] Fang A, Wu Q, Lu Q, et al. Upconversion ratiometric fluorescence and colorimetric dual-readout assay for uric acid. *Biosens Bioelectron*, 2016, **86**(2016): 664–670
- [130] Niu X, He Y, Zhang W, et al. Elimination of background color interference by immobilizing Prussian blue on carbon cloth: A monolithic peroxidase mimic for on-demand photometric sensing. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2018, **256**: 151–159
- [131] Cohen M L. Changing patterns of infectious disease. *Nature*, 2000, **406**(6797): 762–767
- [132] Song Y, Wang Y, Qin L. A multistage volumetric bar chart chip for visualized quantification of DNA. *J Am Chem Soc*, 2013, **135**(45):

- 16785–16788
- [133]Wang G L, Jin L Y, Wu X M, et al. Label-free colorimetric sensor for mercury(II) and DNA on the basis of mercury(II)-switched-on the oxidase-mimicking activity of silver nanoclusters. *Anal Chim Acta*, 2015, **871**: 1–8
- [134]Duan D, Fan K, Zhang D, et al. Nanozyme-strip for rapid local diagnosis of Ebola. *Biosens Bioelectron*, 2015, **74**(1): 134–141
- [135]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 (Camb)*, 2014, **50**(67): 9577–9580
- [136]Beeching N J, Fenech M, Houlihan C F. Ebola virus disease. *Br Med J*, 2014, **349**(1946): g7348
- [137]Cao Y W C, Jin R C, Mirkin C A. Nanoparticles with Raman spectroscopic fingerprints for DNA and RNA detection. *Science*, 2002, **297**(5586): 1536–1540
- [138]Lashuel H A, Hartley D, Petre B M, et al. Neurodegenerative disease - Amyloid pores from pathogenic mutations. *Nature*, 2002, **418**(6895): 291–291
- [139]De Bundel D, Sarre S, Van Eeckhaut A, et al. Critical evaluation of acetylcholine determination in rat brain microdialysates using ion-pair liquid chromatography with amperometric detection. *Sensors-Basel*, 2008, **8**(8): 5171–5185
- [140]Shen L M, Chen Q, Sun Z Y, et al. Assay of biothiols by regulating the growth of silver nanoparticles with C-dots as reducing agent. *Anal Chem*, 2014, **86**(10): 5002–5008
- [141]Seshadri S, Beiser A, Selhub J, et al. Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease. *New Engl J Med*, 2002, **346**(7): 476–483
- [142]Storkbaum E, Lambrechts D, Carmeliet P. VEGF: once regarded as a specific angiogenic factor, now implicated in neuroprotection. *Bioessays*, 2004, **26**(9): 943–954
- [143]Wightman R M, May L J, Michael A C. Detection of dopamine dynamics in the brain. *Anal Chem*, 1988, **60**(13): A769–&
- [144]Hayat A, Cunningham J, Bulbul G, et al. Evaluation of the oxidase-like activity of nanoceria and its application in colorimetric assays. *Anal Chim Acta*, 2015, **885**: 140–147
- [145]Lin X Q, Deng H H, Wu G W, et al. Platinum nanoparticles/graphene-oxide hybrid with excellent peroxidase-like activity and its application for cysteine detection. *Analyst*, 2015, **140**(15): 5251–5256
- [146]Niu X, Xu Y, Dong Y, et al. Visual and quantitative determination of dopamine based on $\text{Co}_{\text{x}}\text{Fe}_{3-x}\text{O}_4$ magnetic nanoparticles as peroxidase mimetics. *J Alloy Compd*, 2014, **587**: 74–81
- [147]Sun Y, Wang J, Li W, et al. DNA-stabilized bimetallic nanozyme and its application on colorimetric assay of biothiols. *Biosens Bioelectron*, 2015, **74**: 1038–1046
- [148]Tao Y, Lin Y, Ren J, et al. A dual fluorometric and colorimetric sensor for dopamine based on BSA-stabilized Au nanoclusters. *Biosens Bioelectron*, 2013, **42**: 41–46
- [149]Wang C I, Chen W T, Chang H T. Enzyme mimics of Au/Ag nanoparticles for fluorescent detection of acetylcholine. *Anal Chem*, 2012, **84**(22): 9706–9712
- [150]Wu L-L, Wang L-Y, Xie Z-J, et al. Colorimetric assay of 1-cysteine based on peroxidase-mimicking DNA-Ag/Pt nanoclusters. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2016, **235**: 110–116
- [151]Xiong Y, Chen S, Ye F, et al. Synthesis of a mixed valence state Ce-MOF as an oxidase mimetic for the colorimetric detection of biothiols. *Chem Commun*, 2015, **51**(22): 4635–4638
- [152]Farhadi K, Forough M, Pourhosseini A, et al. Highly sensitive and selective colorimetric probe for determination of L-cysteine in aqueous media based on Ag/Pd bimetallic nanoparticles. *Sensor Actuat B-Chem*, 2014, **202**: 993–1001
- [153]Nordestgaard B G, Varbo A. Triglycerides and cardiovascular disease. *Lancet*, 2014, **384**(9943): 626–635
- [154]Jing P, Xu W, Yi H, et al. An amplified electrochemical aptasensor for thrombin detection based on pseudobienzymic Fe_3O_4 -Au nanocomposites and electroactive hemin/G-quadruplex as signal enhancers. *Analyst*, 2014, **139**(7): 1756–1761
- [155]Tan H, Ma C, Gao L, et al. Metal-organic framework-derived copper nanoparticle@carbon nanocomposites as peroxidase mimics for colorimetric sensing of ascorbic acid. *Chemistry*, 2014, **20**(49): 16377–16383
- [156]Xu W, Xue S, Yi H, et al. A sensitive electrochemical aptasensor based on the co-catalysis of hemin/G-quadruplex, platinum nanoparticles and flower-like MnO_2 nanosphere functionalized multi-walled carbon nanotubes. *Chem Commun (Camb)*, 2015, **51**(8): 1472–1474
- [157]Zheng C, Zheng A X, Liu B, et al. One-pot synthesized DNA-templated Ag/Pt bimetallic nanoclusters as peroxidase mimics for colorimetric detection of thrombin. *Chem Commun (Camb)*, 2014, **50**(86): 13103–13106
- [158]Li Y, Xuan J, Song Y, et al. A microfluidic platform with digital readout and ultra-low detection limit for quantitative point-of-care diagnostics. *Lab Chip*, 2015, **15**(16): 3300–3306
- [159]Januzzi J L, Troughton R. Are serial BNP measurements useful in heart failure management? serial natriuretic peptide measurements are useful in heart failure management. *Circulation*, 2013, **127**(4): 500–507
- [160]O'donoghue M, Braunwald E. Natriuretic peptides in heart failure: should therapy be guided by BNP levels? *Nat Rev Cardiol*, 2010, **7**(1): 13–20
- [161]Chan C P Y, Mak W C, Cheung K Y, et al. Evidence-based point-of-care diagnostics: current status and emerging technologies. *Annu Rev Anal Chem*, 2013, **6**: 191–211
- [162]Coussens L M, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*, 2002, **420**(6917): 860–867
- [163]Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*, 2002, **420**(6917): 868–874
- [164]Wang G L, Jin L Y, Dong Y M, et al. Intrinsic enzyme mimicking activity of gold nanoclusters upon visible light triggering and its application for colorimetric trypsin detection. *Biosens Bioelectron*, 2015, **64**: 523–529
- [165]Olsen J V, Ong S E, Mann M. Trypsin cleaves exclusively C-terminal to arginine and lysine residues. *Mol Cell Proteomics*, 2004, **3**(6): 608–614
- [166]Strader M B, Tabb D L, Hervey W J, et al. Efficient and specific trypsin digestion of microgram to nanogram quantities of proteins in organic-aqueous solvent systems. *Anal Chem*, 2006, **78** (1): 125–134
- [167]Md. D T, Frep. J B M C. Extensive investigation of patients with mild elevations of serum amylase and/or lipase is ‘low yield’. *Can J Gastroenterol*, 2002, **16**(12): 849–854
- [168]Asati A, Santra S, Kaittanis C, et al. Oxidase-like activity of

- polymer-coated cerium oxide nanoparticles. *Angew Chem Int Edit*, 2009, **48**(13): 2308–2312
- [169] Wan Y, Qi P, Zhang D, et al. Manganese oxide nanowire-mediated enzyme-linked immunosorbent assay. *Biosensors & Bioelectronics*, 2012, **33**(1): 69–74
- [170] Kong L, Cai X, Zhou X H, et al. Nanoceria extend photoreceptor cell lifespan in tubby mice by modulation of apoptosis/survival signaling pathways. *Neurobiol Dis*, 2011, **42**(3): 514–523
- [171] Singh S, Dosani T, Karakoti A S, et al. A phosphate-dependent shift in redox state of cerium oxide nanoparticles and its effects on catalytic properties. *Biomaterials*, 2011, **32**(28): 6745–6753
- [172] Lee Y M, Garcia M A, Huls N a F, et al. Synthetic tuning of the catalytic properties of Au-Fe₃O₄ nanoparticles. *Angew Chem Int Edit*, 2010, **49**(7): 1271–1274
- [173] Chen H W, Wang L Y, Yeh J, et al. Reducing non-specific binding and uptake of nanoparticles and improving cell targeting with an antifouling PEO-b-P gamma MPS copolymer coating. *Biomaterials*, 2010, **31**(20): 5397–5407
- [174] Bagwe R P, Hilliard L R, Tan W. Surface modification of silica nanoparticles to reduce aggregation and nonspecific binding. *Langmuir*, 2006, **22**(9): 4357–4362
- [175] Grubbs R B. Roles of polymer ligands in nanoparticle stabilization. *Polym Rev*, 2007, **47**(2): 197–215
- [176] Doshi N, Mitragotri S. Designer biomaterials for nanomedicine. *Adv Funct Mater*, 2009, **19**(24): 3843–3854

Application of Nanozymes in Disease Diagnosis*

MENG Xiang-Qin, FAN Ke-Long^{**}

(Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract Nanozyme is a type of nanomaterial that possesses intrinsic enzyme-like activity, first discovered by Chinese scientists recently. As a new type of artificial enzyme, nanozyme has the advantage of low cost, high stability, ease for mass production. More importantly, it has multi-functionality, including enzymatic activity as well as other specific nanoscale properties such as magnetics, optics, and phototherapy. The emergence of nanozymes provides us with new ideas, new methods and new tools for the application of enzymic catalytic reaction in disease diagnosis. This review focuses on the application of nanozymes in disease diagnosis in recent years, including cancers, metabolic diseases, infectious diseases, neurodegenerative diseases, cardiovascular diseases and inflammatory diseases and so on. We also address the current challenges and possible directions to fulfill their prominent potential in future.

Key words nanozyme, disease diagnosis, nanomaterials, mimic enzymes, immunoassay

DOI: 10.16476/j.pibb.2018.0039

* This work was supported by grants from The Key Research Program of Frontier Sciences(QYZDY-SSW-SMC013), The Strategic Priority Research Program of CAS (XDA09030306, XDPB0304), Chinese Academy of Sciences Young Elite Scientist Sponsorship Program by CAST(2015QNRC001).

**Corresponding author.

Tel: 86-10-64888256, E-mail: fankelong@ibp.ac.cn

Received: January 22, 2018 Accepted: January 25, 2018