

细菌生产人铁蛋白的新功能及应用

范克龙 周萌 阎锡蕴*

(中国科学院生物物理研究所 蛋白质与多肽药物所重点实验室 北京 100101)

摘要: 铁蛋白(Ferritin)是一种广泛存在于生物体中的笼状蛋白,由 24 个亚基自组装形成的蛋白质外壳和铁内核两部分组成,是维持机体铁代谢平衡的重要蛋白。最新发现,人血清铁蛋白含量的变化与某些疾病相关,特别是发现利用大肠杆菌重组表达、仿生合成的磁性人铁蛋白具有双功能特性,即识别肿瘤并使其可视化。此外,铁蛋白独特的结构及理化性质使其成为理想的纳米载体,用于构筑多功能肿瘤成像和药物输送的平台。本文重点介绍人铁蛋白的新功能及其在疾病诊断和肿瘤靶向治疗中的应用前景。

关键词: 铁蛋白, 转铁蛋白受体 1, 磁性铁蛋白, 癌症诊断及治疗

Novel properties and applications of human ferritin expressed by *Escherichia coli*

FAN Ke-Long ZHOU Meng YAN Xi-Yun*

(Key Laboratory of Protein and Peptide Pharmaceuticals, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100101, China)

Abstract: Ferritin is a cage-like protein ubiquitous distribution among living organisms. It is composed of a 24-subunit protein cage with an internal iron oxide core. Ferritin plays an important role in iron homeostasis based on its ability of iron detoxification and iron storage. Recently, serum ferritin levels are found to be changed in some pathologic process. Particularly, biomimetically synthesized magnetoferritin which using recombinant human ferritin expressed by *Escherichia coli* as templates, possess intrinsic dual functionality, targeting and visualizing tumor tissues. The unique properties of ferritin make it an ideal and powerful nanoplatfrom on which to construct multifunctional nanopartilces for imaging and delivery of drugs. Here, we summarized the new features of human ferritin and the research progress of ferritin-based applications in disease diagnosis and targeted cancer therapy.

Keywords: Ferritin, Transferrin receptor 1, Magnetoferritin, Cancer diagnosis and therapy

基金项目:“艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治”科技重大专项(No. 2012ZX10002009-016, 2013ZX10004102);
国家 973 计划项目(No. 2011CB933500)

*通讯作者: Tel: 86-10-64888583; 信箱: yanxy@ibp.ac.cn

收稿日期: 2013-11-19; 接受日期: 2014-01-10; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-01-15

1 铁蛋白

自从 1937 年捷克生物学家 Vilém Laufberger 教授从马的脾脏中首次分离出铁蛋白以来^[1], 科学家陆续在人类^[2]及其他哺乳动物^[3-7]、植物^[8-9]、真菌^[10-11]和细菌^[12-13]等多种生物体内发现了铁蛋白。从细菌到人类, 尽管不同生物的铁蛋白氨基酸序列具有极大的差别, 但其结构相似^[14-16]。如图 1A 所示, 典型的铁蛋白结构是由蛋白外壳和铁内核两部分构成, 其中蛋白外壳是由 24 个亚基自组装形成的笼状结构(外径 12 nm, 内径 8 nm), 铁内核的主要成分为水铁矿($5\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$)^[17-19]。

1.1 铁蛋白的分类

铁蛋白外壳通常是由两种蛋白亚基(H 和 L)组成^[21-22](图 1B)。在机体不同组织和器官中, 铁蛋白分子中含有 H 和 L 亚基的比例有所不同。例如, 在心脏中铁蛋白含 H 亚基的比例较高; 然而在肝脏中 L 亚基的比例高。此外, H 和 L 亚基比例的变化还随着机体病理的变化(炎症)而改变^[23]。因此, 铁蛋白最初的命名是根据其来源而定, 即从心脏(Heart)中分离获得, 称为 H 铁蛋白; 而从肝脏(Liver)中分离获得的成为 L 铁蛋白。铁蛋白的另一

种命名是根据其分子量而定, 即 H 亚基的分子量为 21 kD, 称为 H (Heavy)铁蛋白; 而 L 亚基为 19 kD, 称为 L (Light)铁蛋白^[21,24]。

除了来源及分子量不同之外, H 亚基和 L 亚基的结构与功能也各有特点。H 蛋白亚基含有亚铁氧化酶活性中心(Ferroxidase center), 而 L 亚基不具有亚铁氧化酶活性中心。在铁蛋白的整个矿化过程中, H 亚基能够将二价铁离子氧化为三价铁离子^[14,25], 并使其以水铁矿铁核的形式储存在蛋白壳内, 而 L 亚基发挥着协同作用, 辅助 H 亚基形成铁核^[26]。因此, 仅有 L 亚基构成的 L-铁蛋白的含铁量要比 H-铁蛋白低得多^[27]。根据铁蛋白是否含有铁核, 可以将其分为两种类型。不含铁核的铁蛋白称为脱铁铁蛋白(Apoferritin); 而含有铁核的称为全铁蛋白(Holo ferritin), 简称为铁蛋白(Ferritin)^[28]。

另外, 根据铁蛋白在细胞内和细胞外分布不同, 又将其分为胞内铁蛋白和分泌铁蛋白^[29]。胞内铁蛋白又根据其在细胞内的不同部位, 分为胞质铁蛋白、线粒体铁蛋白和细胞核铁蛋白^[30]。分泌铁蛋白则主要分布在血清^[31]、关节滑液^[32]和脑脊液中^[33]。

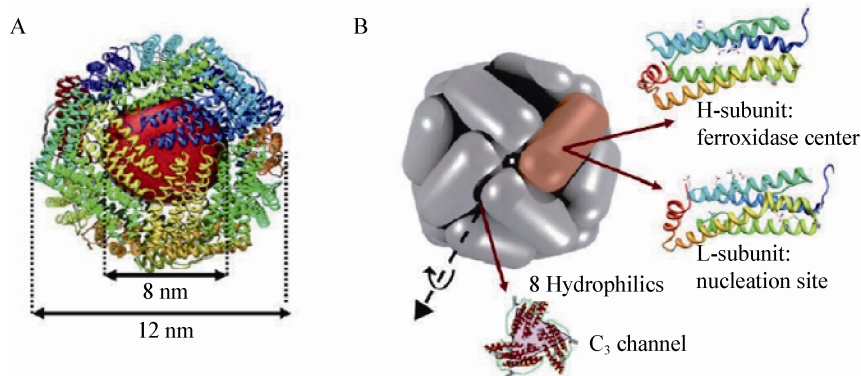


图 1 天然铁蛋白的结构示意图^[20]

Figure 1 The structure of native ferritin^[20]

注: A: 铁蛋白是由蛋白壳和铁核组成; B: 蛋白壳是由 H 亚基和 L 亚基以不同比例自组装形成具有立体对称结构的 24 聚体。其中 8 个亲水性的三重对称轴是金属离子进入蛋白壳内部的通道^[20]。H 亚基含有亚铁氧化酶活性中心。

Note: A: Ferritin is composed of a protein cage with an internal iron oxide core; B: 24-subunit oligomer with a combination of H- and L-subunits that form a spherical hollow structure of 12 nm with cubic symmetry. Eight hydrophilic channels around 3-fold axes are important for transport of metal in and out of protein^[20]. H-subunit possesses ferroxidase center.

1.2 铁蛋白的理化性质

铁蛋白除了不同于其他蛋白质的壳-铁核结构之外,其蛋白亚基间还存在大量的盐桥与氢键^[28,34],这些赋予了铁蛋白独特的物理和化学性质:(1)铁蛋白对 pH 敏感,在 pH 2.0 的酸性条件下,蛋白壳发生解体,而当 pH 恢复到生理条件(pH 7.0)时,解体的蛋白亚基又能重新组装成完整的铁蛋白^[35-36]。(2)铁蛋白非常稳定,能够耐受多种变性剂。一般的蛋白质在低浓度(1-4 mol/L)的脲或者盐酸胍溶液中就会变性,而铁蛋白能够耐受较高浓度的变性剂,只有 8 mol/L 的脲或者 6 mol/L 的盐酸胍才可以使蛋白壳完全解聚^[37]。(3)铁蛋白能够耐受高温。生物体的大多数蛋白对于温度非常敏感,一般高于生理条件下的温度很容易造成蛋白的变性。而铁蛋白可以在 70-80 °C 的高温环境下保持 10 min 以上,其天然蛋白结构不受影响^[38]。

最近,人们利用铁蛋白这些独特的理化性质,仿生合成铁蛋白并使其成为理想的纳米载体。例如,利用蛋白亚基自组装的特性,通过大肠杆菌表达系统,使大批量生产制备重组人铁蛋白成为可能;利用铁蛋白耐高温的特征,通过简单的升温使其分离纯化;利用其对 pH 的敏感性,通过改变 pH 而使其解体与聚合,向铁蛋白腔内装载药物或纳米颗粒,使其成为多功能纳米载体^[39]。

1.3 铁蛋白的功能

在大多数组织中,铁蛋白主要存在于细胞质、细胞核以及线粒体中,在铁的储存和维持体内的铁平衡方面具有重要的作用^[28]。铁是一种重要的微量元素,既有潜在的毒性又是生命必不可少的成分,是许多蛋白质的组成成分^[40-41]。铁储存和平衡主要通过食物摄取铁以及铁转运和铁储存蛋白的表达来维持的^[42]。

除了储存铁的功能之外,铁蛋白还具有重要的解毒作用。游离的二价铁离子具有致命性,因其能在富氧组织中通过 Fenton 反应催化产生活性羟基自由基,从而导致 DNA、脂质和蛋白质的损伤^[43]。而铁蛋白解毒功能是通过捕捉和隔绝细胞内的不

稳定铁池而实现的。由于铁蛋白中 H 亚基具有亚铁氧化酶活性位点,能够将毒性极大的二价铁离子氧化为毒性较小的三价铁离子^[25,44]。因此细胞核以及线粒体中的铁蛋白能够保护 DNA 和线粒体自身免受铁的毒害和氧化损伤^[45-46]。有关体液中铁蛋白的生理功能还了解甚少,目前的一些研究发现,体液铁蛋白可能参与铁的转运^[47]或者免疫调节等过程^[48-49]。

2 铁蛋白受体

早在 20 世纪 60 年代,科学家就已经发现人铁蛋白可以被肿瘤细胞选择性的内吞,提示细胞膜上可能存在铁蛋白受体^[50-52]。然而直到 2005 年,William Seaman 实验室首次报道小鼠 H-铁蛋白的受体是 TIM-2 (T cell immunoglobulin and mucin domain-containing protein-2)^[53]。2010 年,他们又发现人 H-铁蛋白的受体为转铁蛋白受体 1 (Transferrin receptor-1, TfR1)^[54]。

TfR1,又称 CD71,属于典型的 II 型跨膜糖蛋白,在细胞膜表面形成同源二聚体。TfR1 最初被发现为转铁蛋白(Transferrin, Tf)的受体,在调节铁转运进入细胞的过程中必不可少^[55]。事实上,Tf-TfR1 介导的转铁过程也是细胞摄取铁的最重要方式。除此之外,TfR1 还参与调节细胞的生长和增殖^[56-57]。H-铁蛋白结合到细胞表面的 TfR1 后,即被转运入胞内体和溶酶体中。TfR1 既结合 H-铁蛋白,又结合转铁蛋白的性质,说明了该受体在协调铁的转运和使用方面发挥重要的作用(图 2)。

3 天然铁蛋白与疾病

尽管血清铁蛋白的来源、生理功能及其受体仍不明确,但早在 1956 年,人们已经发现在患有肝病的病人血清中血清铁蛋白异常^[59]。随后,越来越多的临床数据表明,血清铁蛋白的升高或降低与许多疾病有关^[60]。目前检测血清铁蛋白的含量已经成为临床疾病检测的常规项目。例如,患有铁缺乏症的贫血病人通常血清铁蛋白含量较低,而患有血色素沉着症、感染、肝脏疾病和大部分肿瘤病人

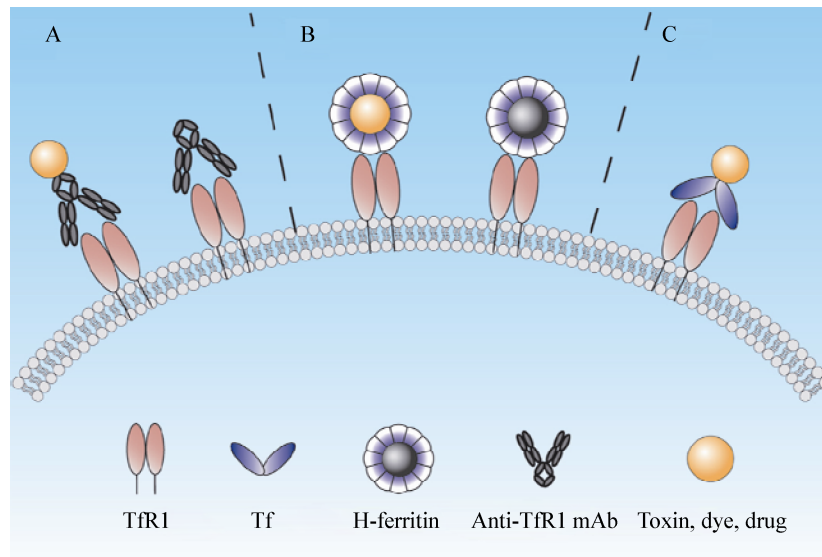


图 2 靶向 TfR1 的肿瘤诊断和治疗中策略^[58]

Figure 2 Strategies for targeting transferrin receptor 1 (TfR1) in tumor therapy and diagnosis^[58]

注: A: 抗 TfR1 单克隆抗体; B: H-铁蛋白; C: 转铁蛋白偶联化疗药物。

Note: A: Anti-TfR1 monoclonal antibodies or conjugated-antibodies; B: H-ferritin nanoparticles; C: Conjugated Tf as carrier to deliver chemotherapeutic drugs to treat or detect tumors.

血清铁蛋白水平升高^[60-61]。

目前,血清铁蛋白作为肿瘤标志物,已经成为临床上肿瘤筛查的一个常规指标。例如,血清铁蛋白含量的升高不仅作为乳腺癌诊断的参考,而且还作为肿瘤复发的检测标志^[61-62]。Matzner 等发现在其检测的所有急性白血病复发的患者中,血清铁蛋白含量均有大幅度升高^[63],而且与疾病的恶性程度有关。Szymendera 和 Volpino 等分别在睾丸生殖细胞肿瘤和肺癌患者中发现血清铁蛋白含量的升高^[64-65]。另外还有研究发现,黑色素瘤细胞能够分泌铁蛋白并促进黑色素瘤的发展^[66]。

分泌铁蛋白中,除了血清铁蛋白以外,还发现脑脊液中的铁蛋白水平与脑部恶性肿瘤有关^[67]。而呼出气体中的铁蛋白含量的变化可作为潜在的肺癌标志物^[68]。

血清铁蛋白与肿瘤的关系不仅体现在含量的变化,而且其亚基的成分也发生异常。正常生理情况下,血清铁蛋白主要由 L 亚基构成。但在许多恶性肿瘤中,血清铁蛋白 H 亚基的比例增高^[60]。众多研究表明, H-铁蛋白在致瘤细胞系以及许多

恶性肿瘤组织中是高表达的^[29-30,60-61]。尽管这种变化的机理还未明确,但这些研究表明 H-铁蛋白在恶性肿瘤中可能起到重要作用,并对于多种癌症可能是一个潜在的生物标志物。

H-铁蛋白的受体(TfR1)也是肿瘤标志分子。有研究表明, TfR1 在肿瘤细胞中的表达量是正常细胞的 100 倍^[55,69]。这可能与肿瘤细胞增殖旺盛,对铁的需求量大有关。目前, TfR1 不仅作为肿瘤检测与治疗的新靶标分子^[55,70],还作为乳腺癌^[71]、白血病^[72-73]、肺癌^[74]和膀胱癌^[75]的预后指标。

在靶向治疗方面, TfR1 的抗体或其天然配体转铁蛋白偶联细胞毒性药物或放射性核素,已被用于肿瘤靶向治疗^[70]。例如,转铁蛋白偶联白喉毒素(Tf-CRM107)治疗恶性脑胶质细胞瘤,已进入三期临床试验^[76-77];抗转铁蛋白受体 1 抗体偶联蓖麻毒素蛋白 A 链(454A12-RTA)已进入二期临床试验,用于脑膜瘤的治疗^[70]。如图 2 所示,除了转铁蛋白和抗 TfR1 抗体来靶向表达 TfR1 的肿瘤细胞,作为 TfR1 的新配体,人 H-铁蛋白纳米颗粒也可以靶向表达 TfR1 的不同肿瘤细胞和组织^[78]。

4 磁性铁蛋白的仿生合成

天然铁蛋白具有自然形成 24 聚体的特性,使得重组铁蛋白在大肠杆菌中大批量制备成为可能。如图 1B 所示,铁蛋白外壳上存在的 8 条亲水性金属离子通道^[79-80],允许金属离子进入铁蛋白空腔;而蛋白外壳内表面的静电特征,有利于金属离子的沉积和成核。大肠杆菌重组表达 H 或/和 L 亚基能够自组装形成与天然铁蛋白相似的 24 聚体,粒径均一,分散性好。这些独特的性质使其可以作为优良的生物模板来仿生合成铁蛋白纳米颗粒,而不破坏蛋白外壳的完整性。尽管这种仿生合成的铁蛋白与天然铁蛋白结构相似,但其内核的晶型不同。天然铁蛋白的内核是水铁矿($5\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$),而仿生合成铁蛋白是磁铁矿(Fe_3O_4)^[81]。因此,被命名为磁性铁蛋白(Magnetoferritin)。

随着分子生物学和纳米技术的交叉与快速发展,仿生合成铁蛋白技术也在不断完善。早在 1991 年,英国巴斯大学 Stephen Mann 实验室率先合成了首例磁性铁蛋白。他们利用天然马脾铁蛋白为模板,人工除去其天然内核(水铁矿),并在马脾铁蛋白的空腔内合成磁性铁核(Fe_3O_4)^[44,82-83]。这项工作开辟了仿生合成纳米颗粒的新领域。随后,一系列的无机纳米颗粒都在天然马脾铁蛋白的空腔内合成^[84-89]。然而,这种方法存在的问题是,在利用马脾铁蛋白外壳作为模板合成纳米颗粒前,需要先去除此中的天然水铁矿内核,而去核的过程需要强还原剂处理。后者会使铁蛋白壳受损,导致有些亚铁离子没有进入到蛋白壳内,而是吸附到蛋白壳外表面被氧化,从而导致合成的铁蛋白聚集^[90-91]。

为了解决这个问题,2006 年,美国蒙大拿州立大学的 Trevor Douglas 实验室首次利用大肠杆菌重组表达人 H-铁蛋白的方法,获得含铁原子数极少的空壳铁蛋白,并以其为模板,仿生合成磁性铁蛋白^[81]。这种新技术不仅省略了分离纯化天然马铁蛋白的繁琐过程,而且避免了由于去核步骤导致的蛋白外壳受损,同时使得整个仿生合成速率加

快,保持了良好的蛋白壳完整性。目前,这种技术已经被国内外学者广泛采用^[92-93]。

与其他纳米颗粒相比,仿生合成磁性铁蛋白具有以下优点:(1) 粒径大小为 12 nm,有利于其在肿瘤中的渗透和积累。已有文献报道,由于肿瘤组织中血管丰富、血管壁间隙较宽、结构完整性差,淋巴回流缺失,造成粒径在 11–15 nm 之间的颗粒可以增强在肿瘤中的积累^[94]。(2) 粒径均匀。以铁蛋白为模板仿生合成,无需额外条件的控制,即可制备出分散性好、粒径均一的纳米颗粒。(3) 生物相容性好。人体天然铁蛋白外壳,在体内应用时不易引起免疫排斥反应,具有低毒性的特点。(4) 易于靶向性修饰。铁蛋白外壳不仅可以通过化学方法进行修饰,而且还可以通过基因融合,使其成为多功能纳米载体。(5) 磁性铁蛋白的内核为 Fe_3O_4 纳米颗粒,具有双功能的特性——超顺磁性和过氧化物酶活性。磁性铁蛋白内核的粒径在 4–7 nm 左右,具有超顺磁性,使得其可以发展为 MRI 显影剂。2007 年,我国科学家发现, Fe_3O_4 磁性纳米颗粒具有过氧化物酶的活性^[95]。在 H_2O_2 存在的情况下, Fe_3O_4 磁性纳米颗粒可以将显色底物催化氧化,从而产生颜色反应。而磁性铁蛋白纳米颗粒所具有的这些独特的优势,使其拥有能更好地用于肿瘤诊断与治疗的应用前景。

5 铁蛋白与癌症诊断

5.1 磁性铁蛋白的双功能特性与肿瘤病理检测

经过修饰或标记的纳米颗粒已经被广泛用于提供疾病的诊断^[96-97]、治疗^[98-99]及预后方面的信息^[100-101]。为实现这些目的,纳米颗粒通常与配体,如抗体、肽或小分子连接,以提高纳米颗粒的肿瘤靶向性。但是,这种修饰往往会改变其本身所具有的理化性质,增加纳米颗粒的聚集、降低靶向性和增加非特异性吸附,最终造成癌症诊断灵敏度和特异性的降低^[102-105]。

最新研究发现,以大肠杆菌重组人 H-铁蛋白为模板,仿生合成的磁性铁蛋白是一个双功能分

子。其外壳无需任何标记或者修饰,即可直接靶向肿瘤组织。如图 3 所示,H-铁蛋白不仅特异识别临床多种肿瘤组织,而且其结合的程度与临床肿瘤组织的恶性程度成正相关。H-铁蛋白直接靶向肿瘤组织的分子基础是,H-铁蛋白的受体 TfR1 是一个肿瘤标志分子。TfR1 的过度表达与肿瘤的恶性程度也是正相关的。所以,H-铁蛋白与抗 TfR1 抗体和转铁蛋白一样,不需要进行任何的修饰或标记,即可直接靶向过表达 TfR1 的肿瘤细胞和肿瘤组织^[78]。

另一个重要发现是磁性铁蛋白具有内在的过氧化物酶活性(图 4B)。在 H₂O₂ 存在的情况下,磁性铁蛋白能催化过氧化物酶的底物 TMB 及 DAB,发生与过氧化物酶相同的显色反应。

基于磁性铁蛋白新功能的发现,科学家利用它

靶向肿瘤并使其可视化的双功能特性,发展了一种基于纳米粒的免疫组织化学检测肿瘤新技术。

免疫组化是目前国内外公认的肿瘤诊断的“金标准”^{[[106-108]},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。但是这种免疫染色法需要多种抗体孵育,缓冲液的反复冲洗,步骤复杂,操作时间长。

与常规免疫组织化学方法相比,这种基于磁性铁蛋白的新方法具有以下特点:(1)灵敏度高和特异性强,利用基于磁性铁蛋白的肿瘤诊断新方法,通过对人体常见的多种实体瘤的大量临床组织样

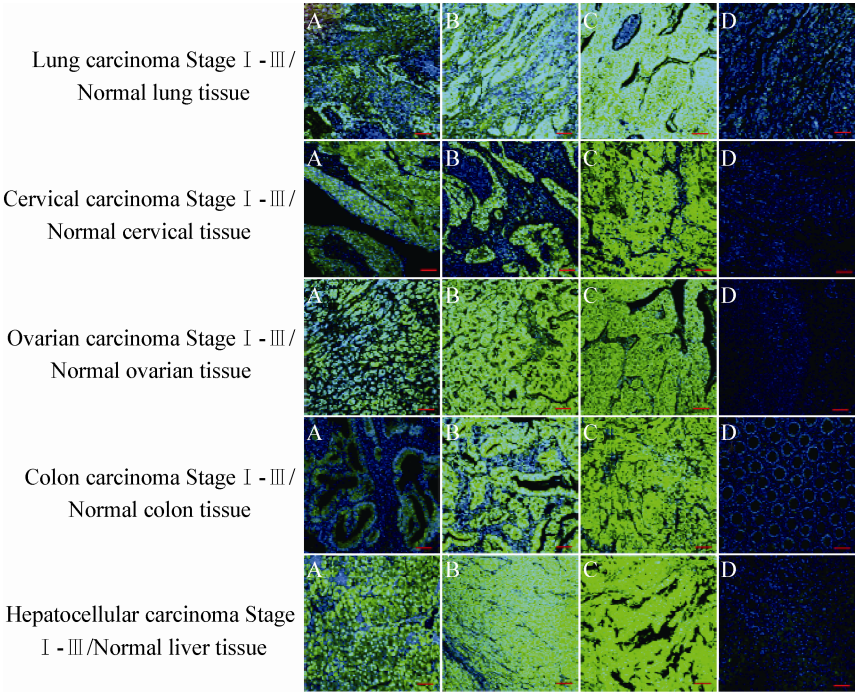


图 3 H-铁蛋白特异性识别多种人体肿瘤组织

Figure 3 H-ferritin can specifically target many kinds of human cancer tissues

注:FITC 标记的 H-铁蛋白可以特异性的结合到临床常见的实体瘤组织上,而且其染色程度与临床癌症组织的恶性程度呈正相关。图中,从左到右,A,B,C,D 分别对应着癌症组织的 1 级,2 级,3 级和正常/癌旁组织^[78]。

Note: H-ferritin based fluorescence staining positively correlated with differentiation, grades and growth patterns of lung squamous cell carcinoma, cervical squamous cell carcinoma, ovarian serous papillary carcinoma and colonic adenocarcinoma, hepatocellular carcinoma. The corresponding normal tissues, necrotic tumours, chronic inflammatory tissues and hyperplastic tissues showed negative staining^[78].

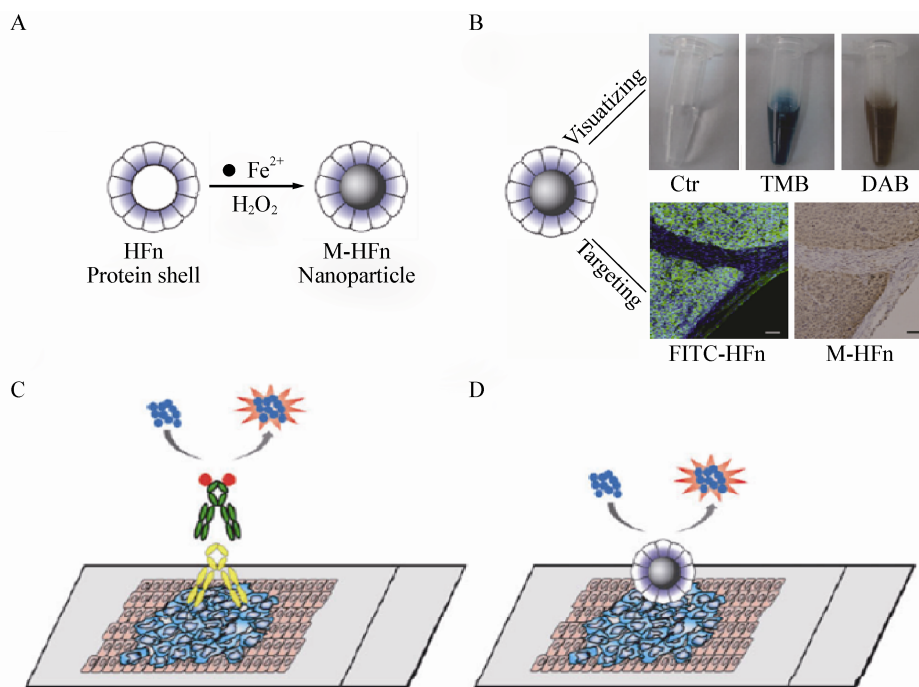


图4 磁性铁蛋白纳米颗粒可以靶向肿瘤并使其可视化

Figure 4 Magnetoferritin nanoparticles for targeting and visualizing tumor tissues

注：A：仿生合成磁性铁蛋白的示意图^[78]；B：磁性铁蛋白是一个双功能分子——靶向肿瘤并使其可视化^[58]；C：常规免疫组化方法；D：磁性铁蛋白检测肿瘤新技术^[58]。

Note: A: Schematic showing the preparation of M-HFn nanoparticles and their structure^[78]; B: M-HFn nanoparticles with intrinsic dual functions, targeting tumor tissues without any modification, and giving a color signaling by its peroxidase-like activity^[58]; C: Antibody-based immunohistochemistry; D: M-HFn based immunostaining^[58].

本的筛查,发现新方法对肿瘤组织的识别具有灵敏度高和特异性强的特点。另外,利用基于 TfR1 抗体的传统免疫组织化学方法和基于磁性铁蛋白的新方法对临床肝细胞肝癌组织连续切片的染色结果显示,新方法能够更加特异性地区分肝细胞肝癌组织和正常肝组织^[78];(2) 操作简单、重复性好。传统的免疫组化要使用一抗、二抗或酶标的三抗,每次孵化之间还有多步实验操作。实验结果很容易受到实验人员的熟练程度和主观性的影响。而新方法简单易操作,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;(3) 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;(4) 新方法成本低,无需使用造价昂贵、易变性的抗体。人 H-铁蛋白在大肠杆菌中即能方便地表达。同时仿生合成磁性铁蛋白纳米颗粒花费低,而且仅通过简单的在无氧条件下,用 H_2O_2 氧化分布在 H-

铁蛋白中的 Fe^{2+} 即能大量制得。所有这些特性表明,磁性铁蛋白作为一种新型的试剂,有望成为一种快速、花费低而且具有广谱性的肿瘤诊断工具。

5.2 铁蛋白与体内影像

磁性铁蛋白是典型的超顺磁性纳米颗粒,具有粒径均一、单分散性好的特点。除此之外,其铁核粒径可以随着反应过程中加入铁原子量的多少而改变,还可以在合成过程中添加其他的微量重金属来改变铁核的磁学特性^[109]。研究发现,仿生合成的磁性铁蛋白的弛豫效能要优于同等尺寸的商品化纳米磁性颗粒^[110-111]。更重要的是,铁蛋白是人体的天然蛋白质,因此,拥有天然的低毒性和低免疫反应的特性;由于磁性铁蛋白纳米颗粒的尺寸为 12 nm,是纳米颗粒在肿瘤血管渗透和滞留的理想尺度,有利于其在肿瘤部位的聚集。另外,人 H-铁蛋白无需任何修饰,本身可以靶向肿瘤细胞并滞

留在肿瘤组织中。综上所述。我们不难发现,磁性铁蛋白的安全性、靶向性和低成本、易于批量生产的特性使其有望成为一种理想的 MRI 显影剂,应用于体内肿瘤成像。

除了体外仿生合成的磁性铁蛋白纳米颗粒,体内的铁蛋白或可直接用于疾病的成像^[112-113]。Kim 等以及 Choia 等已经开发出一种模型,该模型允许肿瘤细胞过表达 H-铁蛋白,应用于核磁共振,实现体内的肿瘤成像和检测淋巴结中肿瘤的转移^[114-115],能够进行长期的体内成像。然而,尚不清楚铁蛋白表达水平在肿瘤发生过程中的变化,并且这种内源性的铁蛋白很难获得足够强的肿瘤成像对比信号,而 H-铁蛋白除了储存铁的功能之外,在免疫抑制^[48]或者炎症发生^[60]等多方面均有作用,因此高表达 H-铁蛋白的安全性还需要进行进一步的评估。

5.3 铁蛋白与肿瘤多模成像

铁蛋白纳米颗粒因其结构上的特殊性,使得其成为一种易于进行各种修饰或者标记的纳米平台(图 5)。Douglas 实验室通过基因工程的方法在 H-铁蛋白蛋白壳上融合表达 RGD-4C,使之通过与肿瘤新生血管内皮上或者是肿瘤细胞本身高表达的整合素分子 $\alpha_v\beta_3$ 结合而靶向肿瘤^[81]。事实上任何能够靶向肿瘤标志物的配体均能用于铁蛋白纳米

颗粒的修饰,例如促黑激素(MSH)及其受体或者表皮生长因子(EGF)及其受体^[116]。一段结合 Fc 段的多肽也可以通过基因改造引入铁蛋白外壳,使铁蛋白纳米颗粒靶向肿瘤细胞^[117]。除了仅使用一种配体进行修饰,NIH 的 Xiaoyuan Chen 研究组最近通过化学修饰和基因工程合成了一种嵌合的笼状铁蛋白纳米颗粒,用于增加铁蛋白的多功能性和多模态成像,来提高肿瘤成像的分辨率和灵敏度^[39]。如图 6A 所示,这种嵌合铁蛋白的修饰充分地利用了铁蛋白蛋白壳可以被用来修饰或者标记的 3 个界面。

对肿瘤部位的靶向策略,除了直接靶向肿瘤细胞外,肿瘤微环境也越来越引起人们的关注^[118]。在肿瘤微环境中高表达的一些蛋白酶或活性蛋白的底物成为靶向肿瘤的新策略。如图 7 所示,研究人员将基质金属蛋白酶(MMP)的蛋白酶底物作为连接荧光分子和铁蛋白壳的接头蛋白,通过化学修饰的方法连接到铁蛋白纳米颗粒的外表面。然后通过 pH 控制的蛋白亚基的解聚/聚合,制备出条件激活的嵌合铁蛋白荧光成像试剂。嵌合铁蛋白荧光成像纳米颗粒仅可以被肿瘤区域富集的 MMP 裂解,从而使嵌合铁蛋白荧光成像纳米颗粒进入激活状态,对肿瘤部位进行非常特异性的成像^[119]。最近,国家纳米中心聂广军实验室则利用类似的方法,在铁蛋白纳米颗粒表面连接成纤维细胞活化蛋白 α (FAP- α)的底物,可以被肿瘤微环境中肿瘤相关成纤维细胞富集的 FAP- α 来裂解,从而实现了对肿瘤微环境的特异性成像^[120]。

磁性铁蛋白纳米颗粒是一个理想的核磁共振成像(MRI)造影剂,可用于肿瘤的诊断^[110]。核磁共振成像在无损成像的同时,还能提供较高的高空间分辨率以及解剖和生理学上的有关信息。正常情况下,使用磁性铁蛋白纳米颗粒成像时,会使核磁共振的 T2 或 T2*加权信号强度减小^[81,110]。这种造影剂使肿瘤区域相比正常组织的信号减弱。但是阴性对照也可能是由于伪影产生。所以这种阴性对照的产生,使得核磁共振很难获得肿瘤诊断的准确信息。

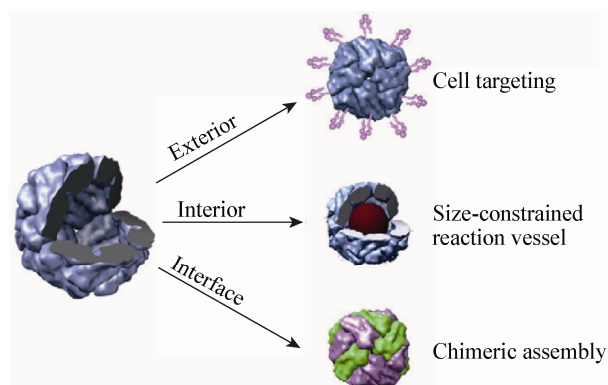


图 5 铁蛋白蛋白壳的 3 个界面都可以用来进行功能化的修饰或者标记^[36]

Figure 5 A schematic illustration of the three interfaces of a protein cage that can be exploited to impart designed functionalities^[36]

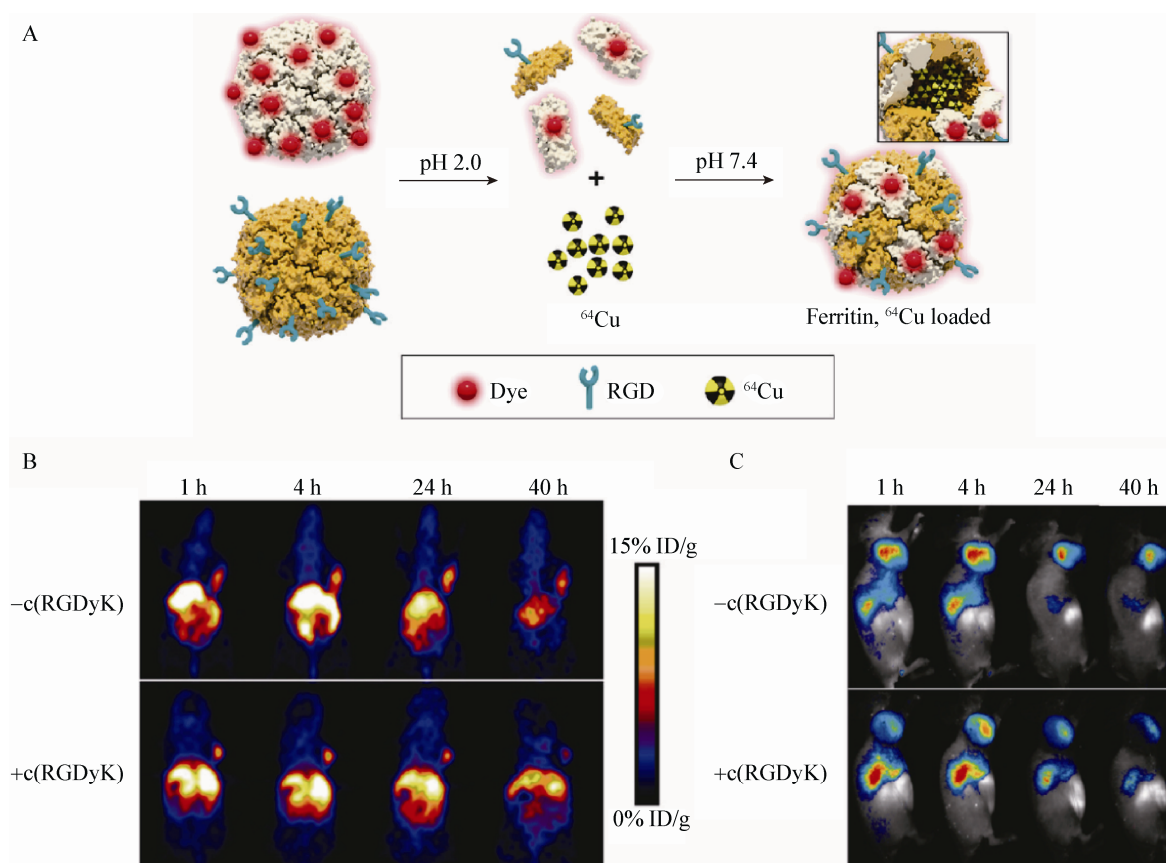


图 6 嵌合铁蛋白纳米颗粒用于多功能装载和多模成像^[39]

Figure 6 Chimeric ferritin nanoparticles for multiple function loading and multimodal imaging^[39]

注：A：多功能嵌合 H-铁蛋白纳米颗粒的制备过程。蛋白肽段 RGD-4C 和荧光分子 Cy5.5 分别通过基因工程和化学修饰的方法标记到铁蛋白蛋白壳表面。64Cu 放射性核素则通过 pH 变化使 H-铁蛋白蛋白壳解聚-聚合的方式来装载到铁蛋白内部；B、C：在尾静脉注射该嵌合 H-铁蛋白纳米颗粒后，对 U87MG 荷瘤小鼠体内的(B)正电子发射断层扫描成像和(C)近红外成像。对照组，在注射铁蛋白纳米颗粒前，提前 30 min 用足量剂量的 c(RGDyK)预处理^[39]。

Note: A: Schematic illustration of the process of triple-loading. *In vivo* (B) PET and (C) NIRF images after the administration of ferritin probes. In the comparison group, a blocking dose of c(RGDyK) was injected 30 min prior to the ferritin probe administration^[39].

因此，人们采用了多模态成像的技术，即将核磁共振成像与其他成像方式，如荧光成像或正电子发射断层扫描成像(PET)结合起来。基于铁蛋白纳米颗粒特殊的结构，通过两种方法的修饰，可以在单次检查成像中实现多模态成像。一是通过化学方法或基因工程手段修饰，在铁蛋白纳米颗粒外表面引入官能团。例如，可以将一种荧光染料共价结合于 H-铁蛋白表面^[81]，或者通过基因工程将绿色荧光蛋白(GFP)融合入 H-铁蛋白的蛋白质外壳中^[93]。但是，荧光成像是一种无损伤成像，可能无法获得足够的荧光信号强度，特别是肿瘤位于组织深处

时，即使采用原位曝光，光线也不能有效地穿透皮肤和深处组织。

新型荧光成像技术需要克服上述限制。研究人员已经开发出了近红外荧光(NIRF)成像。如图 6B、C 所示，将荧光分子 Cy5.5 标记 H-蛋白纳米材料，用于移植瘤小鼠体内成像，成像手段可以仅为近红外荧光成像，或者近红外荧光成像与正电子发射断层扫描成像结合起来的的多模态成像^[39,119]。另一种方法通过 pH 控制下蛋白外壳的解聚/聚合改变纳米粒子包被功能性造影剂来实现。钆[Gd(III)]的螯合物可被加载到铁蛋白纳米颗粒的核心，由于其

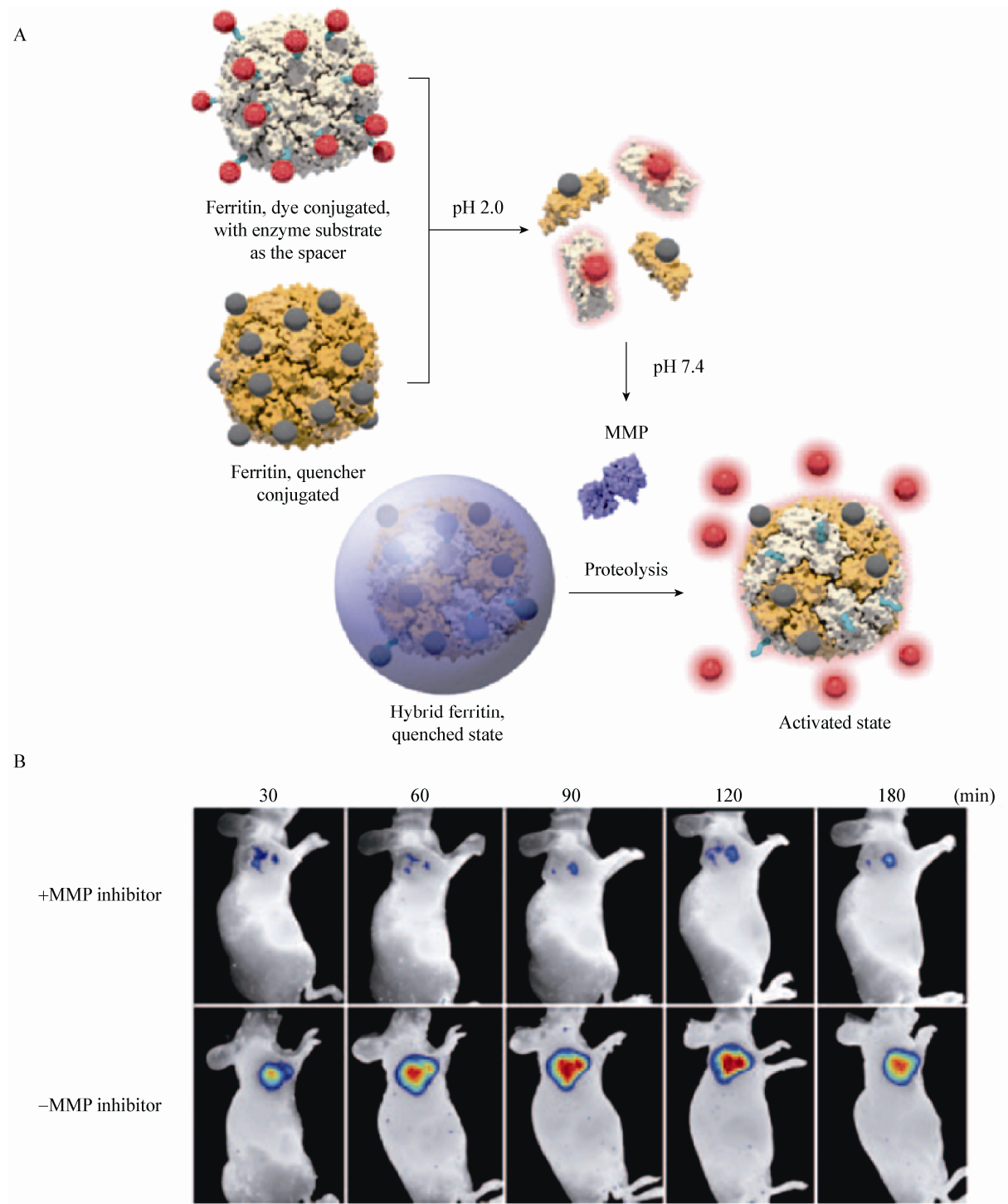


图 7 嵌合铁蛋白纳米颗粒作为可激活性荧光探针用于肿瘤成像^[119]

Figure 7 Hybrid ferritin nanoparticles as activatable probes for tumor imaging^[119]

注：A：基于 H-铁蛋白的可激活性嵌合铁蛋白肿瘤成像试剂的制备过程；B：UM-SCC-22B 移植瘤小鼠在 MMP 酶抑制剂处理或者非预处理的条件下，瘤内注射嵌合铁蛋白成像试剂后的近红外体内成像图^[119]。

Note: A: Formation of ferritin cage-based activatable probes; B: *In vivo* NIRF imaging of 22B tumor xenografted mice after intratumoral injection of ferritin-cage-based activatable probes with and without MMP inhibitor^[119].

较高的 R1 弛豫效能增强 T1 加权信号,可用于肿瘤的核磁共振成像^[121-122]。放射性同位素是另一个可以被加载到纳米颗粒内核用于多模式成像的潜在造影剂。Chen 实验室将 ^{64}Cu 加载到 H-铁蛋白内核,在对肿瘤的单次成像中将正电子发射断层扫描成像与近红外荧光成像结合起来。这样,通过一般性的修改和功能化,使铁蛋白纳米颗粒提供了肿瘤诊断多模式成像中一个十分有前景的纳米平台^[39]。

6 铁蛋白与肿瘤治疗

铁蛋白是一种典型的笼状蛋白,具有生物相容性好、尺寸均一、易于在肿瘤中渗透和积累的特点。同时,铁蛋白外壳可以通过基因工程或者化学修饰的方法进行靶向性修饰^[39,81,93,119]。另外,利用铁蛋白在 pH 变化条件下的解聚/聚合操作,可以制作多功能的嵌合铁蛋白纳米颗粒^[39,119]和向铁蛋白内部空腔中装载各种小分子药物^[123-125]。铁蛋白拥有的这些天然优势提示其可能成为一种理想的肿瘤治疗药物载体。

向铁蛋白壳内部装载药物的策略主要由两种:第一种是在 pH 控制下,通过解聚和重新聚合铁蛋白外壳的方法,将化学药物封装入铁蛋白中^[123-128];如将阿霉素(Dox)通过 pH 控制下,解聚/聚合的方法封装入脱铁铁蛋白后,每个铁蛋白分子最大载药量为 28 Dox,并且装载药物的铁蛋白仍能保持较高的稳定性^[127]。通过类似的过程,每个铁蛋白可以封装 11 个左右的顺铂分子^[129]。而且运载顺铂的铁蛋白可引发胃癌细胞的凋亡。第二种是利用铁蛋白蛋白壳上的亲水性通道,将化疗药物与金属离子结合,通过金属离子将其装载到蛋白壳内部^[130-131]。如图 8 所示, Jin Xie 实验室以 RGD 修饰过的 H-铁蛋白为载体,运载化疗药物 Dox 实现对肿瘤的杀伤。他们在铁蛋白外壳上引入 RGD4C,使铁蛋白壳作为载体时能够特异性靶向肿瘤细胞。后在 Cu(II)的协助下,将抗肿瘤药物 Dox 封装入 RGD-H-铁蛋白内部。对 U87MG 皮下肿瘤模型的研究显示,装载阿霉素的铁蛋白其循环半衰期较长,肿瘤吸收较高,能更好地抑制肿瘤生长,并且

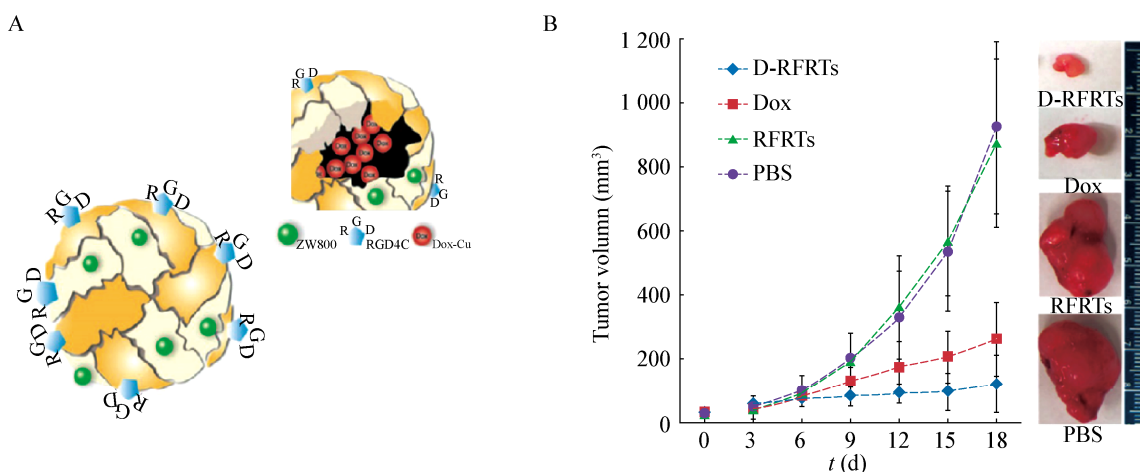


图 8 RGD 修饰的铁蛋白颗粒作为抗肿瘤药物载体^[130]

Figure 8 RGD modified ferritin nanoparticles as anti-tumor drug carrier^[130]

注: A: 装载 Cu-Dox 的 RGD-H-铁蛋白纳米颗粒 D-RFRTs 的示意图。Dox 首先与 Cu 结合成为复合物,然后被装载到 RGD-H-铁蛋白内部。装载药物的颗粒表面还可以用荧光分子 ZW800 来进行化学修饰; B: U87MG 裸鼠移植瘤模型的治疗研究。D-RFRTs 治疗组的移植瘤体积与 PBS、RFRTs、Dox 治疗组相比,有明显差异^[130]。

Note: A: Schematic illustration of D-RFRTs. Dox was precomplexed with Cu, and then encapsulated into RFRTs; B: Therapy studies performed on U87MG tumor-bearing nude mice. On day 18, significant difference in tumor growth was found between D-RFRT treated mice and those treated with PBS, RFRTs and free Dox^[130].

比游离的阿霉素对心脏的毒性小^[130]。随后, 该研究组又以类似的方法, 在 RGD4C 修饰过的铁蛋白内部包裹入光敏剂, 如十六氟酞菁锌(ZnF_{16}Pc), 用于对多种疾病的光动力学治疗。对 U87MG 皮下肿瘤模型的研究显示, 被铁蛋白装载的 ZnF_{16}Pc 在肿瘤中具有更高的积累率, 很好地抑制肿瘤的生长, 并且对皮肤及其他器官的毒性也更小^[131]。

除了将化学药物封装在核心, 铁蛋白外壳可以通过基因工程负载蛋白质类药物, 如抗体、毒素和多肽。据报道, 抗体修饰的铁蛋白可靶向乳腺癌细胞, 在肿瘤治疗中具有潜在的应用^[117]。同样地, 抗体与抗原结合的单链可变区部分(scFv)也可以通过基因工程融合入铁蛋白^[132]。因此, 通过铁蛋白纳米颗粒平台将多模态成像与药物的靶向运输结合起来, 用于癌症的诊断与治疗的研究将是十分有意义的。

7 铁蛋白在其他领域的应用

7.1 铁蛋白用于其他疾病的诊断

作为功能强大的纳米平台, 铁蛋白纳米颗粒除了在肿瘤诊断和治疗方面有天然的优势, 在转化医学的其他领域也显现了巨大的应用潜力。Douglas 和 McConnell 实验室合作发现, 人类 H-铁蛋白很容易被巨噬细胞吞噬, 提供强有力的 T_2^* 磁共振造影。它们可以作为核磁共振成像的造影剂, 用以评估炎症状态, 如动脉粥样硬化斑块恶化及恢复^[110,133-134]。另外, 铁蛋白纳米颗粒也可被用于干细胞的研究, 即通过无创的体内实时成像, 追踪细胞的增殖、分化和迁移。干细胞中高表达的内源性铁蛋白可以作为一个有效的造影剂, 通过核磁共振追踪细胞迁移入血管梗塞的心脏^[135-136]。最近, Scara5 被鉴定为鼠 L-铁蛋白的受体, 并在鼠的肾脏中高表达^[137], 因此富含 L 蛋白亚基的铁蛋白可以利用其靶向性, 被开发为肾脏成像的造影剂。国家纳米中心的聂广军实验室发现在脱铁马脾铁蛋白内(由 22 个 L-铁蛋白亚基和 2 个 H-铁蛋白亚基构成)仿生合成成对纳米金簇(Au-Ft)后, 利用金纳米簇固有的光致发光特性及铁蛋白本身的靶向性,

可用于肾脏的远红外荧光成像^[138]。

7.2 铁蛋白与疫苗

由 24 个蛋白亚基自组装构成的铁蛋白, 每一个亚基都可以很方便地进行基因改造, 而经过改造后的亚基仍旧可以自组装形成 24 聚体。科学家基于铁蛋白的这些特征, 开始研究能否将其作为一个抗原呈递和疫苗开发的平台^[139]。2006 年, 美国新世纪医药公司(New Century Pharmaceuticals)首先用铁蛋白作为呈递抗原的疫苗研发平台。他们在铁蛋白 L 亚基的 N 端融合表达 HIV-1 病毒的 Tat 肽段, 用自组装形成的 24 聚体融合蛋白免疫动物后, 发现能够激起机体的免疫应答^[139]。最近, NIH 过敏与传染病研究所的疫苗研究中心又成功的将铁蛋白应用于流感疫苗的研发^[140]。该研究组将流感病毒的血凝素蛋白 HA 与微生物铁蛋白(*H. pylori* 幽门螺杆菌铁蛋白)亚基的 N 端融合在一起, 在铁蛋白自组装成为球状结构时, 引入的血凝素 HA 由蛋白核心向外伸出, 在蛋白表面组成 8 个突起, 模拟流感病毒表面的 HA 突起。如图 9A 所示, 因为在铁蛋白表面, 融合表达的 HA 三聚体和天然的 HA 三聚体基本相同, 一个铁蛋白纳米颗粒拥有 8 个 HA 三聚体突起。在将这种融合 HA 的铁蛋白颗粒免疫动物时, 成功产生中和性抗体, 起到了流感病毒疫苗的效果。实验发现, 这种复合体诱导产生的流感病毒中和抗体的水平比传统灭活病毒疫苗高 10 倍以上, 并且能够识别流感病毒 HA 蛋白的两个高度保守位点, 即 HA 三聚体蛋白的茎部和头部, 因此这种新型的疫苗较传统灭活病毒疫苗的效力更强, 免疫范围更广。此外, 这种新型的纳米颗粒疫苗完全由重组合成, 避免了在鸡胚或细胞中培养有潜在危险性的病毒, 还允许通过修饰提高其免疫原性, 为新一代流感疫苗的研制提供了新方法, 该方法或许还可适用于研制类似病原体的疫苗。

7.3 铁蛋白与生物大分子检测

利用铁蛋白的蛋白壳易于进行各种化学修饰和标记的特征, 科学家们开发了一系列基于铁蛋白的生物大分子检测系统。这一策略的实现主要是通

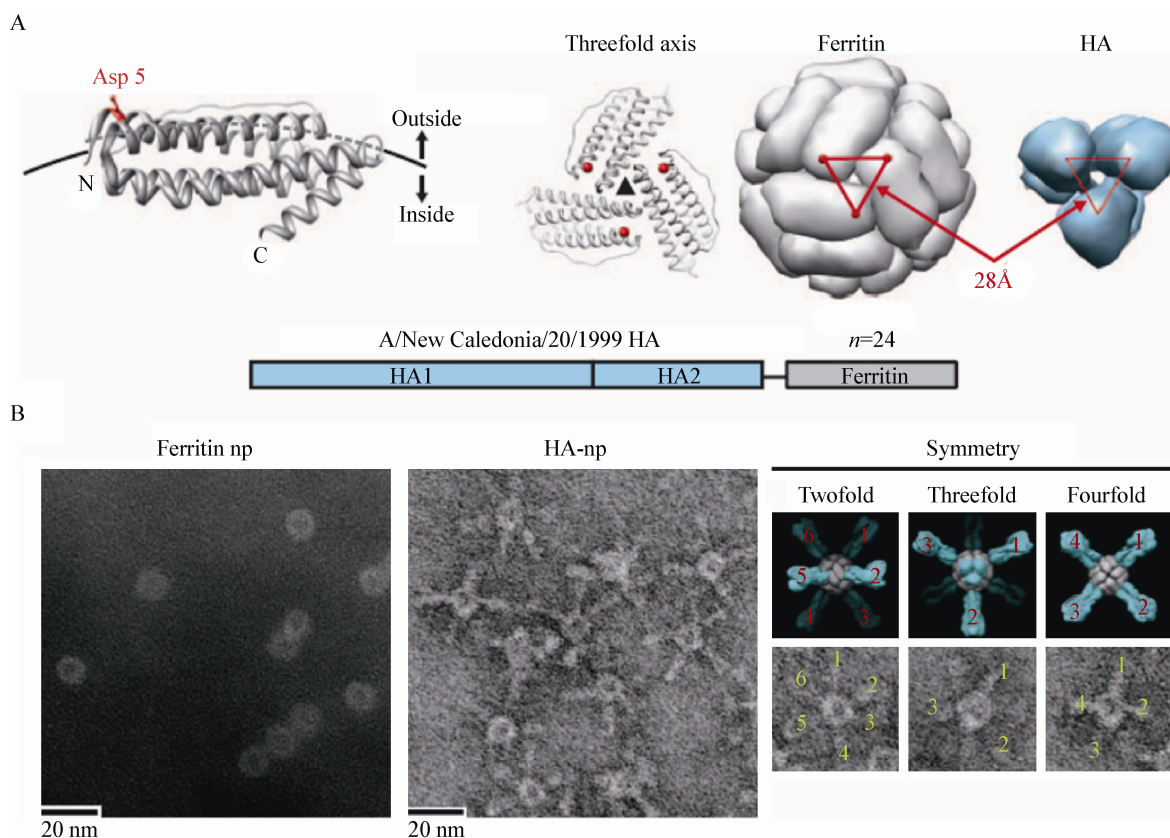


图 9 融合表达 HA 蛋白的铁蛋白纳米颗粒(HA-np)的分子设计及表征^[140]

Figure 9 Molecular design and characterization of ferritin nanoparticles displaying influenza virus HA^[140]

注：A：从左至右分别是铁蛋白亚基、铁蛋白蛋白壳上的三重对称轴位置、铁蛋白纳米颗粒及 HA 的三聚体蛋白，其中三重对称轴处的 Asp5 形成的三角形用红色标出，融合表达在铁蛋白表面的 HA 三聚体的距离和天然 HA 三聚体的距离是基本一样的；B：对铁蛋白纳米颗粒和 HA-np 的透射电镜表征^[140]。

Note: A: A subunit of *H. pylori* non-haem ferritin (PDB: 3bve) (left). The NH₂- and COOH-termini are labelled as N and C, respectively. Three subunits surrounding a threefold axis are shown (middle) and the Asp 5 is coloured in red. An assembled ferritin nanoparticle and an HA trimer (PDB: 3sm5) (viewed from membrane proximal end) (right). A triangle connecting the Asp 5 residues at the threefold axis is shown in red. The same triangle is drawn on the HA trimer (right). A schematic representation of the HA-ferritin fusion protein is shown (bottom); B: Negatively stained TEM images of nanoparticles (np) (left and middle). Computational models and observed TEM image (right, top and bottom panels) representing octahedral two-, three- and fourfold axes of HA-nanoparticles are shown as indicated. Visible HA spikes are numbered in the images^[140].

过生物素(Biotin)-链霉素(Streptavidin)的亲合作用实现的。即在铁蛋白蛋白壳标记生物素，然后将目的分子同样用生物素标记。利用链霉素和生物素的亲合作用，将目的分子同铁蛋白连接。比如，Li 等利用这种方法，将寡聚核苷酸连接到装载铁核的铁蛋白表面，然后利用寡聚核苷酸链和目的 DNA 杂交的方法实现对目的 DNA 的检测^[141]。美国西北太平洋国家实验室的 Yuehe Lin 实验室利用铁蛋白及生物素-链霉素系统建立了一系列的高灵敏度生物大分子检测系统。比如用于检测 TNF- α 及

MCP-1 等生物标记物的高灵敏度电化学免疫分析法^[142]；利用装载铁核的铁蛋白具有的过氧化物酶活性，连接抗人血浆铜蓝蛋白抗体建立的检测人血浆铜蓝蛋白的双抗夹心免疫分析法^[143]。Lin 实验室的研究还发现，将葡萄糖氧化酶通过生物素法固定在铁蛋白表面，可以增加葡萄糖氧化酶的活性与稳定性^[144]。另外，他们利用戊二醛法对铁蛋白表面进行 HRP 酶和 Aptamer 的双标记，并基于双标的铁蛋白建立了一种针对凝血酶的高灵敏度检测系统^[145]。

相对于化学修饰,采用与铁蛋白亚基融合表达方法的^{最大优势}是解决了化学标记时,被标记蛋白方向随机,从而降低检测灵敏度的问题。在标记蛋白与铁蛋白亚基融合表达以后,铁蛋白亚基自组装的同时,可以将融合蛋白以同样的方式展示在蛋白壳的外表面。韩国大学的 Jeewon Lee 实验室在 2007 年以 H-铁蛋白为基础,采用融合表达的方法,在铁蛋白表面展示特异性抗原。然后利用铁蛋白表面抗原与相关抗体结合的特异性和标记在抗体上的量子点的灵敏度实现了对 I 型糖尿病相关蛋白谷氨酸脱羧酶自身抗体及乙肝表面抗原的(10^{-18} mol/L)超高灵敏度检测,并在病人血清中得到验证^[146]。最近, Lee 实验室利用基因工程的方法,在 H-铁蛋白蛋白壳表面展示了 AIDS 病毒表面抗原 gp41 和修格兰氏症候群病相关抗原 Ro/La。通过采用一步共聚的方法构建了基于铁蛋白的水凝胶检测系统。在水凝胶里面,展示相关抗原的铁蛋白分布均匀,并更加稳定。Lee 等采用这种基于铁蛋白的水凝胶系统,将临床上不好区分的 AIDS 病造成的类修格兰仕症候群与真正的修格兰仕症候群区分开来^[147]。

8 结论与展望

从铁蛋白被分离出来至今,科学家对于铁蛋白的研究已经超过了 75 年。最近的研究表明,铁蛋白不仅维持体内铁稳态,还参与了多种病理过程。血清铁蛋白和人 H-铁蛋白受体 TfR1 已被确定为肿瘤标志物,并被广泛应用于肿瘤的筛查。虽然铁蛋白的新功能不断被揭示,仿生合成铁蛋白的技术也层出不穷,但是关于铁蛋白基本的生物学功能还不十分清楚。例如,分泌性铁蛋白的来源及人 L-铁蛋白受体的问题,铁蛋白纳米颗粒在体内的代谢途径及毒性问题。铁蛋白作为理想的纳米载体,在肿瘤的诊断、成像、治疗和纳米疫苗方面的应用效果,仍旧值得我们期待。

参 考 文 献

- [1] Laufberger V. Sur la cristallisation de la ferritine[J]. Bulletin de la Société de Chimie Biologique, 1937, 19: 1575-1582.
- [2] Saltman P, Fiskin R, Stitt C, et al. Characterization of 2 types of ferritin from human liver[J]. Federation Proceedings, 1959, 18(1): 315-315.
- [3] Gerrity RG, Thomas K, Rosenthal J, et al. Accumulation of ferritin in the aortic intima of hyperlipemic swine[J]. Journal of Cell Biology, 1981, 91(2): A417-A417.
- [4] Kuff EL, Dalton AJ. Identification of molecular ferritin in homogenates and sections of rat liver[J]. Journal of Ultrastructure Research, 1957, 1(1): 62-73.
- [5] Bondareff W. Distribution of ferritin in cerebral cortex of mouse revealed by electron microscopy[J]. Experimental Neurology, 1964, 10(5): 377-382.
- [6] Farah MO, Lengemann FW, Kogan P, et al. Isolation of sheep spleen ferritin[J]. Research in Veterinary Science, 1984, 37(1): 1-6.
- [7] Hampton JC. Electron microscope study of the source and distribution of ferritin in hepatic parenchymal cells of the newborn rabbit[J]. Blood, 1960, 15(4): 480-490.
- [8] Proudhon D, Briat JF, Lescure AM. Iron induction of ferritin synthesis in soybean cell-suspensions[J]. Plant Physiology, 1989, 90(2): 586-590.
- [9] Lobreaux S, Massenet O, Briat JF. Iron induces ferritin synthesis in maize plantlets[J]. Plant Molecular Biology, 1992, 19(4): 563-575.
- [10] David CN, Easterbr K. Ferritin in the fungus phycomyces[J]. Journal of Cell Biology, 1971, 48(1): 15-28.
- [11] Peat A, Banbury GH. Occurrence of ferritin-like particles in a fungus[J]. Planta, 1968, 79(3): 268-270.
- [12] Andrews SC, Harrison PM, Guest JR. Cloning, sequencing, and mapping of the bacterioferritin gene (*bfr*) of *Escherichia coli* k-12[J]. Journal of Bacteriology, 1989, 171(7): 3940-3947.
- [13] Frazier BA, Pfeifer JD, Russell DG, et al. Paracrystalline inclusions of a novel ferritin containing nonheme iron, produced by the human gastric pathogen helicobacter-pylori-evidence for a 3rd class of ferritins[J]. Journal of Bacteriology, 1993, 175(4): 966-972.
- [14] Lawson DM, Artymiuk PJ, Yewdall SJ, et al. Solving the structure of human h-ferritin by genetically engineering intermolecular crystal contacts[J]. Nature, 1991, 349(6309): 541-544.
- [15] Trikha J, Theil EC, Allewell NM. High-resolution crystal-structures of amphibian red-cell l-ferritin-potential roles for structural plasticity and solvation in function[J]. Journal of Molecular Biology, 1995, 248(5): 949-967.
- [16] Hempstead PD, Hudson AJ, Artymiuk PJ, et al. Direct observation of the iron-binding sites in a ferritin[J]. FEBS Letters, 1994, 350(2/3): 258-262.
- [17] Towe KM. Structural distinction between ferritin and iron-dextran (imferon) — an electron-diffraction comparison[J]. Journal of Biological Chemistry, 1981, 256(18): 9377-9378.
- [18] Harrison PM, Andrews SC, Artymiuk PJ, et al. Probing structure-function relations in ferritin and

- bacterioferritin[J]. *Advances in Inorganic Chemistry*, 1991, 36: 449-486.
- [19] Harrison PM, Fischbac Fa, Hoy TG, et al. Ferric oxyhydroxide core of ferritin[J]. *Nature*, 1967, 216(5121): 1188-1190.
- [20] Dominguez-Vera JM, Fernandez B, Galvez N. Native and synthetic ferritins for nanobiomedical applications: Recent advances and new perspectives[J]. *Future Medicinal Chemistry*, 2010, 2(4): 609-618.
- [21] Arosio P, Adelman TG, Drysdale JW. Ferritin heterogeneity — further evidence for heteropolymers[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1978, 253(12): 4451-4458.
- [22] Watanabe N, Drysdale J. Studies on heterogeneity in ferritin subunits[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1983, 743(1): 98-105.
- [23] Torti FM, Torti SV. Regulation of ferritin genes and protein[J]. *Blood*, 2002, 99(10): 3505-3516.
- [24] Boyd D, Vecoli C, Belcher DM, et al. Structural and functional-relationships of human ferritin-H and ferritin-L chains deduced from cDNA clones[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1985, 260(21): 1755-1761.
- [25] Cozzi A, Corsi B, Levi S, et al. Overexpression of wild type and mutated human ferritin H-chain in HeLa cells-*in vivo* role of ferritin ferroxidase activity[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(33): 25122-25129.
- [26] Levi S, Yewdall SJ, Harrison PM, et al. Evidence that H-chains and L-chains have cooperative roles in the iron-uptake mechanism of human ferritin[J]. *Biochemical Journal*, 1992, 288: 591-596.
- [27] Levi S, Salfeld J, Franceschinelli F, et al. Expression and structural and functional-properties of human ferritin L-chain from *Escherichia-coli*[J]. *Biochemistry*, 1989, 28(12): 5179-5184.
- [28] Harrison PM, Arosio P. The ferritins: Molecular properties, iron storage function and cellular regulation[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1996, 1275(3): 161-203.
- [29] Meyron-Holtz EG, Moshe-Belizowski S, Cohen LA. A possible role for secreted ferritin in tissue iron distribution[J]. *Journal of Neural Transmission*, 2011, 118(3): 337-47.
- [30] Arosio P, Ingrassia R, Cavadini P. Ferritins: A family of molecules for iron storage, antioxidation and more[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2009, 1790(7): 589-599.
- [31] Beck JR, Meier FA, French EE, et al. Serum-ferritin[J]. *The Lancet*, 1979, 1(8125): 1080.
- [32] Blake DR, Bacon PA, Eastham EJ, et al. Synovial-fluid ferritin in rheumatoid-arthritis[J]. *British Medical Journal*, 1980, 281(6242): 715-716.
- [33] Sindic CJM, Colletcassart D, Cambiaso CL, et al. The clinical relevance of ferritin concentration in the cerebrospinal-fluid[J]. *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry*, 1981, 44(4): 329-333.
- [34] Santambrogio P, Levi S, Arosio P, et al. Evidence that a salt bridge in the light chain contributes to the physical stability difference between heavy and light human ferritins[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1992, 267(20): 14077-14083.
- [35] Kang S, Oltrogge LM, Broomell CC, et al. Controlled assembly of bifunctional chimeric protein cages and composition analysis using noncovalent mass spectrometry[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2008, 130(49): 16527-16529.
- [36] Uchida M, Kang S, Reichhardt C, et al. The ferritin superfamily: Supramolecular templates for materials synthesis[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2010, 1800(8): 834-845.
- [37] Santambrogio P, Pinto P, Levi S, et al. Effects of modifications near the 2-, 3- and 4-fold symmetry axes on human ferritin renaturation[J]. *Biochemical Journal*, 1997, 322 (Pt 2): 461-468.
- [38] Stefanini S, Cavallo S, Wang CQ, et al. Thermal stability of horse spleen apoferritin and human recombinant H apoferritin[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1996, 325(1): 58-64.
- [39] Lin X, Xie J, Niu G, et al. Chimeric ferritin nanocages for multiple function loading and multimodal imaging[J]. *Nano Letters*, 2011, 11(2): 814-819.
- [40] Outten FW, Theil EC. Iron-based redox switches in biology[J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2009, 11(5): 1029-1046.
- [41] Andrews NC. Forging a field: The golden age of iron biology[J]. *Blood*, 2008, 112(2): 219-230.
- [42] Nadadur SS, Srirama K, Mudipalli A. Iron transport & homeostasis mechanisms: Their role in health & disease[J]. *Indian Journal of Medical Research*, 2008, 128(4): 533-544.
- [43] Cadenas E. Biochemistry of oxygen-toxicity[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 1989, 58: 79-110.
- [44] Meldrum FC, Wade VJ, Nimmo DL, et al. Synthesis of inorganic nanophase materials in supramolecular protein cages[J]. *Nature*, 1991, 349(6311): 684-687.
- [45] Alkhateeb AA, Connor JR. Nuclear ferritin: A new role for ferritin in cell biology[J]. *Biochimica et Biophysica Acta-general Subjects*, 2010, 1800(8): 793-797.
- [46] Levi S, Arosio P. Mitochondrial ferritin[J]. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2004, 36(10): 1887-1889.
- [47] Todorich B, Zhang X, Slagle-Webb B, et al. TIM-2 is the receptor for H-ferritin on oligodendrocytes[J]. *Journal of Neurochemistry*, 2008, 107(6): 1495-1505.
- [48] Recalcati S, Invernizzi P, Arosio P, et al. New functions for an iron storage protein: The role of ferritin in immunity and autoimmunity[J]. *Journal of Autoimmunity*, 2008, 30(1/2): 84-89.
- [49] Bresgen N, Ohlenschlager I, Fiedler B, et al. Ferritin — a mediator of apoptosis?[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2007, 212(1): 157-164.
- [50] Ryser H, Caulfield JB, Aub JC. Studies on protein uptake by isolated tumor cells: I. Electron microscopic evidence of ferritin uptake by ehrlich ascites tumor cells[J]. *Journal of Cell Biology*, 1962, 14: 255-268.
- [51] Caulfield JB. Studies on ferritin uptake by isolated tumor cells[J]. *Laboratory Investigation*, 1963, 12(10): 14077-14083.

- 1018-1025.
- [52] Easty GC, Yarnell MM, Andrews RD. The uptake of proteins by normal and tumour cells *in vitro*[J]. British Journal of Cancer, 1964, 18: 354-367.
 - [53] Chen TT, Li L, Chung DH, et al. Tim-2 is expressed on b cells and in liver and kidney and is a receptor for h-ferritin endocytosis[J]. Journal of Experimental Medicine, 2005, 202(7): 955-965.
 - [54] Li L, Fang CJ, Ryan JC, et al. Binding and uptake of h-ferritin are mediated by human transferrin receptor-1[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2010, 107(8): 3505-3510.
 - [55] Daniels TR, Delgado T, Helguera G, et al. The transferrin receptor part ii: Targeted delivery of therapeutic agents into cancer cells[J]. Clinical Immunology, 2006, 121(2): 159-176.
 - [56] Neckers LM, Trepel JB. Transferrin receptor expression and the control of cell-growth[J]. Cancer Investigation, 1986, 4(5): 461-470.
 - [57] O'Donnell KA, Yu D, Zeller KI, et al. Activation of transferrin receptor 1 by c-myc enhances cellular proliferation and tumorigenesis[J]. Molecular and Cellular Biology, 2006, 26(6): 2373-2386.
 - [58] Fan K, Gao L, Yan X. Human ferritin for tumor detection and therapy[J]. Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology, 2013, 5(4): 287-298.
 - [59] Reissmann KR, Dietrich MR. On the presence of ferritin in the peripheral blood of patients with hepatocellular disease[J]. Journal of Clinical Investigation, 1956, 35(6): 588-595.
 - [60] Wang W, Knovich MA, Coffman LG, et al. Serum ferritin: Past, present and future[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2010, 1800(8): 760-769.
 - [61] Knovich MA, Storey JA, Coffman LG, et al. Ferritin for the clinician[J]. Blood Reviews, 2009, 23(3): 95-104.
 - [62] Jezequel P, Campion L, Spyrtos F, et al. Validation of tumor-associated macrophage ferritin light chain as a prognostic biomarker in node-negative breast cancer tumors: A multicentric 2004 national phrc study[J]. International Journal of Cancer, 2012, 131(2): 426-437.
 - [63] Matzner Y, Konijn AM, Hershko C. Serum ferritin in hematologic malignancies[J]. American Journal of Hematology, 1980, 9(1): 13-22.
 - [64] Volpino P, Cangemi V, Caputo V, et al. Clinical usefulness of serum ferritin measurements in lung-cancer patients[J]. Journal of Nuclear Medicine and Allied Sciences, 1984, 28(1): 27-30.
 - [65] Szymendera JJ, Kozlowszczudzinska I, Madej G, et al. Clinical usefulness of serum ferritin measurements in patients with testicular germ-cell tumors[J]. Oncology, 1985, 42(4): 253-258.
 - [66] Gray CP, Arosio P, Hersey P. Association of increased levels of heavy-chain ferritin with increased cd4+ cd25+ regulatory t-cell levels in patients with melanoma[J]. Clinical Cancer Research, 2003, 9(7): 2551-2559.
 - [67] de Almeida SM, da Cunha DS, Yamada E, et al. Quantification of cerebrospinal fluid ferritin as a biomarker for cns malignant infiltration[J]. Arquivos De Neuro-psiquiatria, 2008, 66(3B): 720-724.
 - [68] Carpagnano GE, Lacedonia D, Palladino GP, et al. Could exhaled ferritin and sod be used as markers for lung cancer and prognosis prediction purposes?[J]. European Journal of Clinical Investigation, 2012, 42(5): 478-486.
 - [69] Daniels TR, Delgado T, Rodriguez JA, et al. The transferrin receptor part i: Biology and targeting with cytotoxic antibodies for the treatment of cancer[J]. Clinical Immunology, 2006, 121(2): 144-158.
 - [70] Daniels TR, Bernabeu E, Rodriguez JA, et al. The transferrin receptor and the targeted delivery of therapeutic agents against cancer[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2012, 1820(3): 291-317.
 - [71] Yang DC, Wang F, Elliott RL, et al. Expression of transferrin receptor and ferritin h-chain mrna are associated with clinical and histopathological prognostic indicators in breast cancer[J]. Anticancer Research, 2001, 21(1B): 541-549.
 - [72] Habeshaw JA, Lister TA, Stansfeld AG, et al. Correlation of transferrin receptor expression with histological class and outcome in non-hodgkin lymphoma[J]. The Lancet, 1983, 1(8323): 498-501.
 - [73] Das Gupta A, Shah VI. Correlation of transferrin receptor expression with histologic grade and immunophenotype in chronic lymphocytic leukemia and non-hodgkin's lymphoma[J]. Hematologic Pathology, 1990, 4(1): 37-41.
 - [74] Kondo K, Noguchi M, Mukai K, et al. Transferrin receptor expression in adenocarcinoma of the lung as a histopathologic indicator of prognosis[J]. Chest, 1990, 97(6): 1367-1371.
 - [75] Seymour GJ, Walsh MD, Lavin MF, et al. Transferrin receptor expression by human bladder transitional cell carcinomas[J]. Urological Research, 1987, 15(6): 341-344.
 - [76] Laske DW, Youle RJ, Oldfield EH. Tumor regression with regional distribution of the targeted toxin tf-crm107 in patients with malignant brain tumors[J]. Nature Medicine, 1997, 3(12): 1362-1368.
 - [77] Weaver M, Laske DW. Transferrin receptor ligand-targeted toxin conjugate (tf-crm107) for therapy of malignant gliomas[J]. Journal of Neuro-Oncology, 2003, 65(1): 3-13.
 - [78] Fan K, Cao C, Pan Y, et al. Magnetoferritin nanoparticles for targeting and visualizing tumour tissues[J]. Nature Nanotechnology, 2012, 7(7): 459-464.
 - [79] Wardeska JG, Viglione B, Chasteen ND. Metal-ion complexes of apoferritin-evidence for initial binding in the hydrophilic channels[J]. Journal of Biological Chemistry, 1986, 261(15): 6677-6683.
 - [80] Treffry A, Bauminger ER, Hechel D, et al. Defining the roles of the threefold channels in iron uptake, iron oxidation and iron-core formation in ferritin-a study aided by site-directed mutagenesis[J]. Biochemical Journal, 1993, 296: 721-728.
 - [81] Uchida M, Flenniken ML, Allen M, et al. Targeting of cancer cells with ferrimagnetic ferritin cage nanoparticles[J]. Journal of the American Chemical

- Society, 2006, 128(51): 16626-16633.
- [82] Meldrum FC, Heywood BR, Mann S. Magnetoferritin: *In vitro* synthesis of a novel magnetic protein[J]. Science, 1992, 257(5069): 522-523.
- [83] Mann S, Archibald DD, Didymus JM, et al. Crystallization at inorganic-organic interfaces-biomaterials and biomimetic synthesis[J]. Science, 1993, 261(5126): 1286-1292.
- [84] Mackle P, Charnock JM, Garner CD, et al. Characterization of the manganese core of reconstituted ferritin by x-ray-absorption spectroscopy[J]. Journal of the American Chemical Society, 1993, 115(18): 8471-8472.
- [85] Liu XY, Wei W, Wang CL, et al. Apoferritin-camouflaged pt nanoparticles: Surface effects on cellular uptake and cytotoxicity[J]. Journal of Materials Chemistry, 2011, 21(20): 7105-7110.
- [86] Tsukamoto R, Iwahori K, Muraoka M, et al. Synthesis of co₃o₄ nanoparticles using the cage-shaped protein, apoferritin[J]. Bulletin of The Chemical Society of Japan, 2005, 78(11): 2075-2081.
- [87] Okuda M, Iwahori K, Yamashita I, et al. Fabrication of nickel and chromium nanoparticles using the protein cage of apoferritin[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2003, 84(2): 187-194.
- [88] Klem MT, Mosolf J, Young M, et al. Photochemical mineralization of europium, titanium, and iron oxyhydroxide nanoparticles in the ferritin protein cage[J]. Inorganic Chemistry, 2008, 47(7): 2237-2239.
- [89] Okuda M, Kobayashi Y, Suzuki K, et al. Self-organized inorganic nanoparticle arrays on protein lattices[J]. Nano Letters, 2005, 5(5): 991-993.
- [90] Wong KKW, Douglas T, Gider S, et al. Biomimetic synthesis and characterization of magnetic proteins (magnetoferritin)[J]. Chemistry of Materials, 1998, 10(1): 279-285.
- [91] Moskowitz BM, Frankel RB, Walton SA, et al. Determination of the preexponential frequency factor for superparamagnetic maghemite particles in magnetoferritin[J]. Journal of Geophysical Research-Solid Earth, 1997, 102(B10): 22671-22680.
- [92] Cao CQ, Tian LX, Liu QS, et al. Magnetic characterization of noninteracting, randomly oriented, nanometer-scale ferrimagnetic particles[J]. Journal of Geophysical Research-Solid Earth, 2010, 115(B7). DOI: 10.1029/2009JB006855.
- [93] Li K, Zhang ZP, Luo M, et al. Multifunctional ferritin cage nanostructures for fluorescence and mr imaging of tumor cells[J]. Nanoscale, 2012, 4(1): 188-193.
- [94] Dreher MR, Liu WG, Michelich CR, et al. Tumor vascular permeability, accumulation, and penetration of macromolecular drug carriers[J]. Journal of the National Cancer Institute, 2006, 98(5): 335-344.
- [95] Gao L, Zhuang J, Nie L, et al. Intrinsic peroxidase-like activity of ferromagnetic nanoparticles[J]. Nature Nanotechnology, 2007, 2(9): 577-583.
- [96] Stoeva SI, Lee JS, Smith JE, et al. Multiplexed detection of protein cancer markers with biobarcode nanoparticles[J]. Journal of the American Chemical Society, 2006, 128(26): 8378-8379.
- [97] Winter PM, Caruthers SD, Kassner A, et al. Molecular imaging of angiogenesis in nascent vx-2 rabbit tumors using a novel alpha(nu)beta3-targeted nanoparticle and 1.5 tesla magnetic resonance imaging[J]. Cancer Research, 2003, 63(18): 5838-5843.
- [98] Janib SM, Moses AS, MacKay JA. Imaging and drug delivery using theranostic nanoparticles[J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2010, 62(11): 1052-1063.
- [99] Zrazhevskiy P, Sena M, Gao XH. Designing multifunctional quantum dots for bioimaging, detection, and drug delivery[J]. Chemical Society Reviews, 2010, 39(11): 4326-4354.
- [100] Li RL, Dai H, Wheeler TM, et al. Prognostic value of akt-1 in human prostate cancer: A computerized quantitative assessment with quantum dot technology[J]. Clinical Cancer Research, 2009, 15(10): 3568-3573.
- [101] Karathanasis E, Chan L, Balusu SR, et al. Multifunctional nanocarriers for mammographic quantification of tumor dosing and prognosis of breast cancer therapy[J]. Biomaterials, 2008, 29(36): 4815-4822.
- [102] Chen HW, Wang LY, Yeh J, et al. Reducing non-specific binding and uptake of nanoparticles and improving cell targeting with an antifouling pco-b-p gamma mps copolymer coating[J]. Biomaterials, 2010, 31(20): 5397-5407.
- [103] Bagwe RP, Hilliard LR, Tan W. Surface modification of silica nanoparticles to reduce aggregation and nonspecific binding[J]. Langmuir, 2006, 22(9): 4357-4362.
- [104] Grubbs RB. Roles of polymer ligands in nanoparticle stabilization[J]. Polymer Reviews, 2007, 47(2): 197-215.
- [105] Doshi N, Mitragotri S. Designer biomaterials for nanomedicine[J]. Advanced Functional Materials, 2009, 19(24): 3843-3854.
- [106] Shi SR, Liu C, Pootrakul L, et al. Evaluation of the value of frozen tissue section used as "gold standard" for immunohistochemistry[J]. American Journal of Clinical Pathology, 2008, 129(3): 358-366.
- [107] Taylor CR. Standardization in immunohistochemistry: The role of antigen retrieval in molecular morphology[J]. Biotechnic & Histochemistry, 2006, 81(1): 3-12.
- [108] O'Leary TJ. Standardization in immunohistochemistry[J]. Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology, 2001, 9(1): 3-8.
- [109] Szabo I, Crich SG, Alberti D, et al. Mn loaded apoferritin as an mri sensor of melanin formation in melanoma cells[J]. Chemical Communications, 2012, 48(18): 2436-2438.
- [110] Uchida M, Terashima M, Cunningham CH, et al. A human ferritin iron oxide nano-composite magnetic resonance contrast agent[J]. Magnetic Resonance in Medicine, 2008, 60(5): 1073-1081.
- [111] Bulte JWM, Douglas T, Mann S, et al. Magnetoferritin-biomineralization as a novel molecular approach in the design of iron-oxide-based magnetic-resonance contrast agents[J]. Investigative Radiology, 1994, 29: S214-S216.
- [112] Gilad AA, Winnard PT, van Zijl PCM, et al. Developing

- mr reporter genes: Promises and pitfalls[J]. *NMR in Biomedicine*, 2007, 20(3): 275-290.
- [113] Cohen B, Ziv K, Plaks V, et al. Ferritin nanoparticles as magnetic resonance reporter gene[J]. *Wiley Interdisciplinary Reviews-Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 2009, 1(2): 181-188.
- [114] Kim HS, Cho HR, Choi SH, et al. *In vivo* imaging of tumor transduced with bimodal lentiviral vector encoding human ferritin and green fluorescent protein on a 1.5t clinical magnetic resonance scanner[J]. *Cancer Research*, 2010, 70(18): 7315-7324.
- [115] Choi SH, Cho HR, Kim HS, et al. Imaging and quantification of metastatic melanoma cells in lymph nodes with a ferritin mr reporter in living mice[J]. *Nmr in Biomedicine*, 2012, 25(5): 737-745.
- [116] Li X, Qiu LH, Zhu P, et al. Epidermal growth factor-ferritin h-chain protein nanoparticles for tumor active targeting[J]. *Small*, 2012, 8(16): 2505-2514.
- [117] Kang HJ, Kang YJ, Lee YM, et al. Developing an antibody-binding protein cage as a molecular recognition drug modular nanoplatform[J]. *Biomaterials*, 2012, 33(21): 5423-5430.
- [118] Albini A, Sporn MB. The tumour microenvironment as a target for chemoprevention[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2007, 7(2): 139-147.
- [119] Lin X, Xie J, Zhu L, et al. Hybrid ferritin nanoparticles as activatable probes for tumor imaging[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2011, 50(7): 1569-1572.
- [120] Ji T, Zhao Y, Wang J, et al. Tumor fibroblast specific activation of a hybrid ferritin nanocage-based optical probe for tumor microenvironment imaging[J]. *Small*, 2013, 9(14): 2427-2431.
- [121] Aime S, Frullano L, Crich SG. Compartmentalization of a gadolinium complex in the apoferritin cavity: A route to obtain high relaxivity contrast agents for magnetic resonance imaging[J]. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2002, 114(6): 1059-1061.
- [122] Crich SG, Bussolati B, Tei L, et al. Magnetic resonance visualization of tumor angiogenesis by targeting neural cell adhesion molecules with the highly sensitive gadolinium-loaded apoferritin probe[J]. *Cancer Research*, 2006, 66(18): 9196-9201.
- [123] Ma-Ham AH, Wu H, Wang J, et al. Apoferritin-based nanomedicine platform for drug delivery: Equilibrium binding study of daunomycin with DNA[J]. *Journal of Materials Chemistry*, 2011, 21(24): 8700-8708.
- [124] Yan F, Zhang Y, Yuan HK, et al. Apoferritin protein cages: A novel drug nanocarrier for photodynamic therapy[J]. *Chemical Communications*, 2008: 4579-4581.
- [125] Yang Z, Wang XY, Diao HJ, et al. Encapsulation of platinum anticancer drugs by apoferritin[J]. *Chemical Communications*, 2007: 3453-3455.
- [126] Simsek E, Kilic MA. Magic ferritin: A novel chemotherapeutic encapsulation bullet[J]. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2005, 293(1): 509-513.
- [127] Kilic MA, Ozlu E, Calis S. A novel protein-based anticancer drug encapsulating nanosphere: Apoferritin-doxorubicin complex[J]. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 2012, 8(3): 508-514.
- [128] Xing R, Wang X, Zhang C, et al. Characterization and cellular uptake of platinum anticancer drugs encapsulated in apoferritin[J]. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2009, 103(7): 1039-1044.
- [129] Ji XT, Huang L, Huang HQ. Construction of nanometer cisplatin core-ferritin (ncc-f) and proteomic analysis of gastric cancer cell apoptosis induced with cisplatin released from the ncc-f[J]. *Journal of Proteomics*, 2012, 75(11): 3145-3157.
- [130] Zhen Z, Tang W, Chen H, et al. Rgd-modified apoferritin nanoparticles for efficient drug delivery to tumors[J]. *ACS Nano*, 2013, 7(6): 4830-4837.
- [131] Zhen Z, Tang W, Guo C, et al. Ferritin nanocages to encapsulate and deliver photosensitizers for efficient photodynamic therapy against cancer[J]. *ACS Nano*, 2013, 7(8): 6988-6996.
- [132] Dehal PK, Livingston CF, Dunn CG, et al. Magnetizable antibody-like proteins[J]. *Biotechnology Journal*, 2010, 5(6): 596-604.
- [133] Terashima M, Uchida M, Kosuge H, et al. Human ferritin cages for imaging vascular macrophages[J]. *Biomaterials*, 2011, 32(5): 1430-1437.
- [134] Kitagawa T, Kosuge H, Uchida M, et al. Rgd-conjugated human ferritin nanoparticles for imaging vascular inflammation and angiogenesis in experimental carotid and aortic disease[J]. *Molecular Imaging and Biology*, 2012, 14(3): 315-324.
- [135] Naumova AV, Reinecke H, Yarnykh V, et al. Ferritin overexpression for noninvasive magnetic resonance imaging-based tracking of stem cells transplanted into the heart[J]. *Molecular Imaging*, 2010, 9(4): 201-210.
- [136] Campan M, Lionetti V, Aquaro GD, et al. Ferritin as a reporter gene for *in vivo* tracking of stem cells by 1.5-t cardiac mri in a rat model of myocardial infarction[J]. *American Journal of Physiology-heart and Circulatory Physiology*, 2011, 300(6): H2238-H2250.
- [137] Li JY, Paragas N, Ned RM, et al. Scara5 is a ferritin receptor mediating non-transferrin iron delivery[J]. *Developmental Cell*, 2009, 16(1): 35-46.
- [138] Sun CJ, Yang H, Yuan Y, et al. Controlling assembly of paired gold clusters within apoferritin nanoreactor for *in vivo* kidney targeting and biomedical imaging[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2011, 133(22): 8617-8624.
- [139] Chester Q, Li ES, Carter DC. Ferritin nanoparticle technology. A new platform for antigen presentation and vaccine development[J]. *Industrial Biotechnology*, 2006, 2(2): 143-147.
- [140] Kanekiyo M, Wei CJ, Yassine HM, et al. Self-assembling influenza nanoparticle vaccines elicit broadly neutralizing h1n1 antibodies[J]. *Nature*, 2013, 499(7456): 102-106.
- [141] Li M, Mann S. DNA-directed assembly of multifunctional nanoparticle networks using metallic and bioinorganic building blocks[J]. *Journal of Materials Chemistry*, 2004,

- 14(14): 2260-2263.
- [142] Liu G, Wu H, Wang J, et al. Apoferritin-templated synthesis of metal phosphate nanoparticle labels for electrochemical immunoassay[J]. *Small*, 2006, 2(10): 1139-1143.
- [143] Tang ZW, Wu H, Zhang YY, et al. Enzyme-mimic activity of ferric nano-core residing in ferritin and its biosensing applications[J]. *Analytical Chemistry*, 2011, 83(22): 8611-8616.
- [144] Zhang YY, Tang ZW, Wang J, et al. Apoferritin nanoparticle: A novel and biocompatible carrier for enzyme immobilization with enhanced activity and stability[J]. *Journal of Materials Chemistry*, 2011, 21(43): 17468-17475.
- [145] Zhao J, Liu ML, Zhang YY, et al. Apoferritin protein nanoparticles dually labeled with aptamer and horseradish peroxidase as a sensing probe for thrombin detection[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2013, 759: 53-60.
- [146] Lee SH, Lee H, Park JS, et al. A novel approach to ultrasensitive diagnosis using supramolecular protein nanoparticles[J]. *FASEB Journal*, 2007, 21(7): 1324-1334.
- [147] Lee EJ, Ahn KY, Lee JH, et al. A novel bioassay platform using ferritin-based nanoprobe hydrogel[J]. *Advanced Materials*, 2012, 24(35): 4739-4744.
- ~~~~~

(上接 p.503)

征 稿 简 则

3.3 摘要写作注意事项

3.3.1 英文摘要: 1) 建议使用第一人称, 以此可区分研究结果是引用文献还是作者得出的; 2) 建议用主动语态, 被动语态表达拖拉模糊, 尽量不用, 这样可以避免长句, 以求简单清晰; 3) 建议使用过去时态, 要求语法正确, 句子通顺; 4) 英文摘要的内容应与中文摘要一致, 但可比中文摘要更详尽, 写完后务必请英文较好且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。5) 摘要中不要使用缩写语, 除非是人人皆知的, 如: DNA, ATP 等; 6) 在英文摘要中, 不要使用中文字体标点符号。

3.3.2 关键词: 应明确、具体, 一些模糊、笼统的词语最好不用, 如基因、表达……

4 特别说明

4.1 关于测序类论文

凡涉及测定 DNA、RNA 或蛋白质序列的论文, 请先通过国际基因库 EMBL (欧洲) 或 GenBank (美国) 或 DDBJ (日本), 申请得到国际基因库登录号 (Accession No.) 后再投来。

4.2 关于版权

4.2.1 本刊只接受未公开发表的文章, 请勿一稿两投。

4.2.2 凡在本刊通过审稿、同意刊出的文章, 所有形式的 (即各种文字、各种介质的) 版权均属本刊编辑部所有。作者如有异议, 敬请事先声明。

4.2.3 对录用的稿件编辑部有权进行文字加工, 但如涉及内容的大量改动, 将请作者过目同意。

4.2.4 文责自负。作者必须保证论文的真实性, 因抄袭剽窃、弄虚作假等行为引发的一切后果, 由作者自负。

4.3 审稿程序及提前发表

4.3.1 来稿刊登与否由编委会最后审定。对不录用的稿件, 一般在收稿 2 个月之内通过 E-mail 说明原因, 作者登陆我刊系统也可查看。稿件经过初审、终审通过后, 作者根据编辑部返回的退修意见进行修改补充, 然后以投稿时的用户名和密码登陆我刊系统上传修改稿, 待编辑部复审后将给作者发稿件录用通知单, 稿件按照投稿先后排队发表。

4.3.2 对投稿的个人和单位一视同仁。坚持文稿质量为唯一标准, 对稿件采取择优先登的原则。如作者要求提前发表, 请在投稿的同时提出书面报告, 说明该研究成果的重要性、创新性、竞争性和提前发表的必要性, 经过我刊的严格审查并通过后, 可予提前刊出。

5 发表费及稿费

论文一经录用, 将在发表前根据版面收取一定的发表费并酌付稿酬、赠送样刊。

6 联系方式

地址: 北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部(100101)

Tel: 010-64807511

E-mail: tongbao@im.ac.cn

网址: <http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>