

融合铁蛋白表达、纯化及肿瘤摄取分析

严国银, 李军*, 李子洋

海南大学 药学院 热带生物资源教育部重点实验室, 海南 海口 570228

严国银, 李军, 李子洋. 融合铁蛋白表达、纯化及肿瘤摄取分析[J]. 生物工程学报, 2025, 41(4): 1372-1381.

YAN Guoyin, LI Jun, LI Ziyang. Expression, purification, and tumor uptake of fusion ferritin[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(4): 1372-1381.

摘要: 铁蛋白由于其靶向性、可逆性自组装、高生物相容性及易被修饰等优点, 被认为是一种理想的递送系统。本研究旨在表达纯化3种融合铁蛋白, 对其进行鉴定, 并探究其肿瘤靶向性。合成3种融合铁蛋白基因并克隆至原核表达载体, 使用镍柱进行亲和层析纯化重组蛋白, 通过非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(native-PAGE)、Western blotting、圆二色谱对融合铁蛋白进行鉴定。使用异硫氰酸荧光素酯(fluorescein 5-isothiocyanate, FITC)与融合铁蛋白进行反应, 利用激光共聚焦扫描显微镜进行体外肿瘤细胞靶向。同时将荧光染料胺活性琥珀酰亚胺酯(sulfo-cyanine7, Cy7-SE)与融合铁蛋白进行反应尾静脉注射入黑色素瘤小鼠进行体内肿瘤成像, 探究融合铁蛋白的肿瘤靶向性。结果显示, 本研究构建的融合铁蛋白使用异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(isopropylthio- β -D-galactoside, IPTG)进行诱导表达可获得约21 kDa的可溶性融合铁蛋白, 通过镍柱进行亲和层析纯化获得纯度较高的融合铁蛋白。Western blotting检测重组蛋白能被相应抗体识别。Native-PAGE、圆二色谱鉴定目的蛋白为具有 α 螺旋的多聚体。通过体内外肿瘤摄取实验, 证明了融合铁蛋白能够被肿瘤细胞和肿瘤组织摄取。本研究成功表达纯化融合铁蛋白并进行鉴定, 验证了其在体内外的肿瘤摄取情况, 为铁蛋白在生物医药领域的应用奠定了基础。

关键词: 铁蛋白; 纳米颗粒; 肿瘤摄取; 体内成像

资助项目: 国家自然科学基金(31560261); 海南省重点研发项目(ZDYF2020155); 海南省自然科学基金(818MS039); 中国药学会-以岭生物医药创新基金(CPAYLJ201902)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31560261), the Key Research and Development Project of Hainan Province (ZDYF2020155), the Natural Science Foundation of Hainan Province (818MS039), and the Chinese Pharmaceutical Society-Yiling Biomedical Innovation Fund (CPAYLJ201902).

*Corresponding author. E-mail: lijun_hnu@hainu.edu.cn

Received: 2024-09-23; Accepted: 2025-02-20; Published online: 2025-02-21

Expression, purification, and tumor uptake of fusion ferritin

YAN Guoyin, LI Jun*, LI Ziyang

Key Laboratory of Tropical Biological Resources of Ministry of Education, School of Pharmaceutical Sciences, Hainan University, Haikou 570228, Hainan, China

Abstract: Ferritin is considered as an ideal delivery system due to its precise targeting, reversible self-assembly, high biocompatibility, and easy modification. This study aims to express, purify, and identify three fusion ferritin proteins, and explore their tumor targeting. Three fusion ferritin genes were synthesized and cloned into prokaryotic expression vectors, and the recombinant proteins were purified by affinity chromatography with nickel columns. The fusion ferritin proteins were identified by native polyacrylamide gel electrophoresis (native-PAGE), Western blotting, and circular dichroism. Fluorescein 5-isothiocyanate (FITC) was used to react with fusion ferritin, and confocal laser scanning microscopy was employed to evaluate the tumor targeting of fusion ferritin. The reaction system of sulfo-cyanine7 (Cy7-SE) with fusion ferritin was injected into the tail vein of melanoma mice for *in vivo* tumor imaging to explore the tumor targeting of fusion ferritin. The results showed that soluble fusion ferritin proteins of about 21 kDa were expressed under the induction by isopropylthio- β -D-galactoside (IPTG), and the recombinant proteins with high purity were obtained. Western blotting showed that the recombinant proteins could be recognized by the corresponding antibodies. The target proteins were identified as multimers with α helices by native-PAGE and circular dichroism. *In vitro* and *in vivo* tumor uptake experiments demonstrated that fusion ferritin was taken up by tumor cells and tumor tissue. This study successfully expressed, purified, and identified fusion ferritin, and verified its tumor uptake *in vitro* and *in vivo*, which laid a foundation for the application of ferritin in biomedicine.

Keywords: ferritin; nanoparticles; tumor uptake; *in vivo* imaging

铁蛋白是一种广泛存在于动物、植物和微生物的铁储存蛋白，是天然的药物纳米载体^[1]。它是由 24 个相同或异源的 H 和 L 亚基形成的一个外径 12 nm、内径 8 nm 的空心蛋白笼^[2-3]。铁蛋白内腔可储存多达 4 500 个铁原子，这使得铁蛋白成为重要的铁储存蛋白，维持细胞和全身铁稳态，从而在生理功能和病理过程中发挥重要作用，如缺铁性贫血、血色素沉着症、细胞抗氧化及相关炎症、血管增殖和肿瘤^[4]。铁蛋白笼具有良好的自组装能力，在极端条件下，例如酸性 pH 值，铁蛋白的四元结构分解，一旦 pH 值恢复到生理范围，其亚基就会重新

组装成笼状结构。在其空区域可以容纳小分子药物或其他金属离子，从而实现载药功能^[5]。2005 年，Simek 和 Akif Kilic^[6]首次报道了使用马脾铁蛋白封装阿霉素。随后，铁蛋白凭借其良好的生物相容性^[7]、生物降解性^[8]、非免疫原性^[9]和肿瘤靶向能力^[10-13]等优点在药物递送、成像诊断、肿瘤治疗、疫苗等领域受到广泛关注。

铁蛋白在医疗领域中广泛应用，可以将药物负载到铁蛋白纳米颗粒中，实现肿瘤靶向递送，提高治疗效果并减少副作用^[12-15]。将铁蛋白应用于磁共振成像，为疾病诊断提供了新工具^[16-18]。将铁蛋白应用于光热疗法和光动力治

疗中可以提高肿瘤部位的温度或生成活性氧，达到消除癌细胞的效果^[19]。在铁蛋白表面修饰特定的功能基团，能够实现对靶细胞或组织的高效识别和特异性作用^[20-21]。此外，铁蛋白具有热稳定性和化学稳定性，特别适合通过受控的分解与复合过程进行复合，能够满足疫苗对稳定性的要求^[22-24]。本研究利用大肠杆菌原核表达系统可溶性表达融合铁蛋白并进行纯化获得高纯度铁蛋白；通过 native-PAGE、圆二色谱方法观察融合铁蛋白的结构与组装，并通过体外肿瘤细胞实验和体内肿瘤成像实验探究其肿瘤摄取情况，以期为融合铁蛋白的载药及纳米疫苗的研制提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

融合铁蛋白质粒由生工生物工程(上海)股份有限公司合成并转化至大肠杆菌(*Escherichia coli*)，即为 BL21(DE3)/DS8189-4、BL21(DE3)/DS8489-3、BL21(DE3)/DS8489-4；6–8 周龄 C57BL/6J 雄性小鼠购买自斯贝福(北京)生物技术有限公司，人非小细胞肺癌细胞(A549)、人肝癌细胞(HepG2)、人肾小管上皮细胞(HK-2)、人胚胎肾细胞(HEK293)、小鼠皮肤黑色素瘤细胞(B16-F10)由海南大学梁金强课题组提供。本研究涉及的动物实验由海南大学药学院实验动物中心伦理委员会审核批准(批准号：HPIACUC2024072)。

1.2 试剂

IPTG、卡那霉素、SDS-PAGE 变性丙烯酰胺凝胶快速制备试剂盒、native-PAGE 变性丙烯酰胺凝胶快速制备试剂盒、兔抗 6×His 多克隆抗体、考马斯亮蓝染色液、Ni-NTA6FF 预装重力柱购自生工生物工程(上海)股份有限公司；山羊抗兔 IgG H&L 购自上海碧云天生物技术股份有限公司；LB 肉汤(不含糖)、LB 琼脂购自广东环凯微生物科技有限公司，FITC 购自阿拉丁

公司，Cy7-SE 染料购自上海麦克林生化科技股份有限公司。

1.3 仪器

蛋白电泳仪(DYY-6)，购自北京市六一仪器厂；超声波细胞粉碎机(JY92-11N)，购自宁波新芝生物科技股份有限公司；净化工作台，购自苏州净化设备有限公司；圆二色谱仪，购自 Bio Tek 公司；激光共聚焦显微镜，购自奥林巴斯公司；全光谱深层生物成像系统，购自广州博路腾生物科技有限公司。

1.4 方法

1.4.1 融合铁蛋白的表达及可溶性分析

挑取重组菌 *E. coli* BL21(DE3)/DS8189-4、*E. coli* BL21(DE3)/DS8489-3、*E. coli* BL21(DE3)/DS8489-4 于 LB 平板划线，37 °C 培养过夜。挑取 3 个生长良好的单菌落接种于含卡那霉素的 5 mL LB 培养液的试管中。37 °C、180 r/min 条件下振摇菌体至 OD_{600} 约 0.5 诱导融合蛋白表达。向菌液中加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L，37 °C、180 r/min 振摇 6 h。收集菌体，弃上清。用 PBS 缓冲液重悬离心后沉淀，超声波破碎至菌液澄清透明。 $10\ 000\times g$ 、4 °C 离心 30 min。取超声上清和沉淀进行 12% SDS-PAGE。

1.4.2 融合铁蛋白的纯化

采用镍柱亲和层析的方法纯化带有 His 标签的目的蛋白。用 10 倍柱体积的结合缓冲液平衡柱子，将粗蛋白液加入柱子上，收集流穿液到离心管中。使用 10 倍柱体积的含 20 mmol/L 吲哚洗杂缓冲液清洗柱子，并收集流穿液。洗杂至流穿液在 280 nm 处的吸光度接近基线。使用 10 倍柱体积含 300 mmol/L 吲哚的洗脱缓冲液进行洗脱。收集洗脱液。收集流穿样、洗脱样进行 SDS-PAGE 电泳，分析蛋白纯化效果。

1.4.3 Western blotting 鉴定

将纯化的可溶性蛋白进行 SDS-PAGE 后，将蛋白通过低温湿转移至聚偏氟乙烯(polyvinylidene

fluoride, PVDF)膜上。使用 5% 脱脂奶粉封闭膜 2 h, 随后用 1×TBST 缓冲液洗涤膜。加入 1:1 000 稀释的 His 兔单克隆抗体, 4 °C 孵育过夜。用 1×TBST 缓冲液洗膜 3 次, 每次 10 min。之后加入 1:1 000 稀释的山羊抗兔辣根酶标记 IgG, 孵育 2 h, 再用 1×TBST 缓冲液洗膜 3 次, 每次 10 min。最后, 滴加 ECL 显色液在显影仪中获取条带。

1.4.4 Native-PAGE 分析

选用 8% 的浓缩胶和 12% 的分离胶进行 native-PAGE 电泳。

1.4.5 圆二色谱鉴定

通过圆二色谱仪分析融合铁蛋白的二级结构。融合铁蛋白浓度为 0.25 mg/mL, 比色皿光程为 1 mm, 以缓冲溶液为背景; 扫描波长为 200–250 nm, 温度 25 °C。

1.4.6 CCK-8 法检测细胞毒性

A549、HepG2、HK-2、HEK29 细胞在 CO₂ 培养箱中稳定培养后, 进行铺板, 将细胞消化后, 接种 5×10³ 个细胞至 96 孔板中过夜, 细胞贴壁后, 分别加入配制好的 8189-4、8489-3、8489-4 这 3 种融合铁蛋白, 浓度分别为 0、0.5、1、2.5、5、10 μmol/L, 每组设置 4 个复孔, 重复 3 次铺板。于培养箱中孵育 24 h 后, 弃去旧培养液, 加入 CCK-8 工作液(无血清培养基与 CCK-8 试剂按 1:10 配制), 培养箱中孵育 1 h 后, 酶标仪中测定 450 nm 的吸光度。

1.4.7 体外肿瘤细胞成像

将稳定生长的 A549 细胞接种于共聚焦皿中, 在恒温培养箱中, 培养过夜使细胞贴壁; 分为 PBS 组、FITC 组、FITC 结合铁蛋白组并设置 3 组重复。加入 FITC (终浓度 20 nmol/L)、FITC 结合铁蛋白(浓度为 0.25 mg/mL), 于 CO₂ 培养箱中避光孵育 4 h, 加 PBS 润洗 3 次。Hoechst 染料按 1:1 000 加入, 避光染色 15 min,

再用 PBS 清洗 3 次后, 最后在共聚焦显微镜系统下随机获取 5 个视野图像。

1.4.8 体内肿瘤组织成像

铁蛋白与 Cy7-SE 结合: 将纯化的铁蛋白利用脱盐柱进行缓冲液置换, 将 1 mg 铁蛋白与 Cy7-SE 按照 1:10 的摩尔比反应 60 min, 中间每隔 15 min 上下颠倒混匀。将反应中过量的荧光染料于 PBS 缓冲液中在 4 °C 条件下, 使用磁力搅拌器搅拌至透析液清亮无颜色为止, 全程需处于避光环境。

实验动物模型: 6–8 周龄 SPF 级 C57BL/6J 雄性小鼠, 平均体重(25±1) g。小鼠饲养于海南大学药学院实验中心 SPF 动物设施内, 实验动物使用许可证号: SYXK(琼)2023-0031。温度维持在 20–26 °C, 相对湿度 40–70%, 并遵循 12:12 h 的昼夜循环, 小鼠自由进水进食。检疫 7 d 后进行实验, 将 3×10⁵ 个黑色素瘤细胞用 PBS 重悬后植入小鼠右腋侧皮下, 10 d 后选肿瘤长径和短径在 0.5–1 cm 之间的成瘤小鼠进行实验操作。

组织成像: 黑色素瘤小鼠(每组 3 只)尾静脉注射 100 μL 1 mg/mL Cy7-SE 标记的 3 种铁蛋白、游离 Cy7-SE 溶液(0.1 mg/mL)、PBS, 30 min 后使用全光谱深层生物成像系统在 745 nm 观察荧光分布, 监测图像。

1.4.9 统计分析

使用 GraphPad Prism v8.0.1 对数据进行分析。每组实验的组间差异使用单因素方差分析(ANOVA)分析数据。数据在每组中以 mean±SEM 表示。ns 表示 $P \geq 0.05$, * 表示 $P < 0.05$, ** 表示 $P < 0.01$, *** 表示 $P < 0.001$ 。

2 结果与分析

2.1 重组铁蛋白的诱导表达与纯化

重组蛋白理论分子质量约为 21 kDa。SDS-

PAGE 结果显示，重组菌在诱导前，在 21 kDa 附近并无明显蛋白表达。而重组菌在诱导后，在 21 kDa 附近有明显的蛋白质表达，与预期相符。经过超声破碎后，取上清及沉淀进行 SDS-PAGE 鉴定。由图 1 可知，目的蛋白大部分存在于上清，只有小部分存在于沉淀，说明

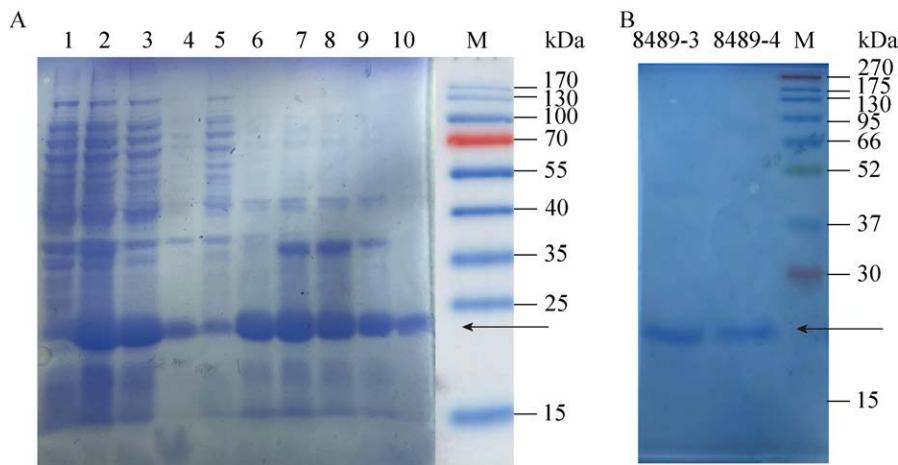


图 1 蛋白纯化 A: 融合铁蛋白 8189-4 的纯化。Lane 1: 诱导前; Lane 2: 诱导后; Lane 3: 诱导上清; Lane 4: 诱导沉淀; Lane 5: 流穿液; Lane 6–10: 300 mmol/L 咪唑洗脱液; M: 蛋白 marker。B: 纯化后的融合铁蛋白 8489-3、8489-4。

Figure 1 Protein purification. A: Purification of fusion ferritin 8189-4. Lane 1: Before induction; Lane 2: After induction; Lane 3: Induced supernatant; Lane 4: Induced precipitation; Lane 5: Flow-through fluid; Lane 6–10: 300 mmol/L imidazole eluent; M: Protein marker. B: Purification of fusion ferritin 8489-3 and 8489-4.

2.2 融合铁蛋白的 Western blotting 鉴定

由于融合铁蛋白含有 His 标签，可进行 Western blotting 鉴定。将重组菌破碎，离心后取上清进行 SDS-PAGE 蛋白凝胶电泳。湿转法将蛋白转移到 PVDF 膜上后，使用 His 特异性抗体进行 Western blotting。由图 2 可知，3 种融合铁蛋白均能被 His 抗体识别，表明 3 种融合铁蛋白有良好的反应原性。

2.3 融合铁蛋白的 native-PAGE 分析

Native-PAGE 分析结果显示(图 3)，在非变性还原条件下 8189-4 融合铁蛋白分子量大于 270 kDa (使用的蛋白质标准品最大分子质量标准为 270 kDa)，8489-3 融合蛋白约 120 kDa，

融合蛋白主要以可溶性形式表达。重组菌超声破碎后，将含有重组蛋白的上清进行镍柱亲和层析纯化，之后进行 12% SDS-PAGE 分析。结果显示，重组蛋白进行分离纯化后得到纯度较高的融合铁蛋白，电泳显示为单一条带，纯度大于 90%。

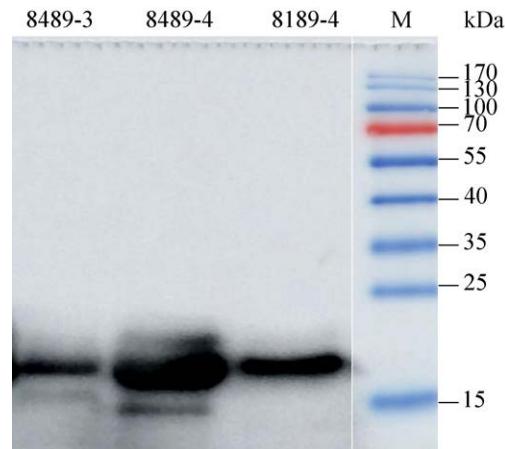


图 2 三种融合铁蛋白的 Western blotting 分析 Figure 2 Western blotting analysis of three fusion ferritins.

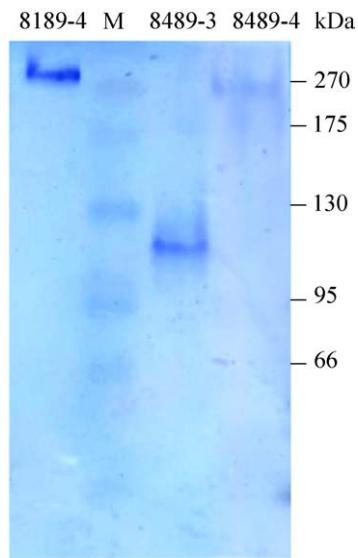


图 3 Native-PAGE 鉴定
Figure 3 Native-PAGE identification.

8489-4 融合蛋白约 270 kDa，表明 3 种融合铁蛋白形成了不同形式的聚体。此外，无论是进行 SDS-PAGE 还是 native-PAGE，样品都呈现为单一条带，表明纯化的融合铁蛋白有较好的纯度。

2.4 融合铁蛋白的二级结构鉴定

铁蛋白的圆二色光谱图应呈现较为典型的螺旋光谱曲线。螺旋结构在 208 nm 和 222 nm 附近有特征吸收峰。通过透析将纯化得到的蛋白缓冲液更换为 PBS，调整融合蛋白浓度。使用圆二色谱仪在室温下测定 200–250 nm 的光谱，结果如图 4 所示，在 208 nm 和 222 nm 附近可以明显观察到特征吸收，表明目的蛋白的二级结构为明显的 α 螺旋。

2.5 细胞毒性检测

采用 CCK-8 法检测融合铁蛋白对 A549、HepG2、HK-2、HEK293 细胞的细胞毒性。实验结果表明(图 5)，在所有测试浓度(0–10 $\mu\text{mol/L}$)

内，细胞存活率均高于 95%，表明融合铁蛋白对 A549、HepG、HK-2、HEK293 细胞几乎没有细胞毒性。

2.6 体外肿瘤细胞摄取

将 PBS、游离 FITC、FITC 标记的铁蛋白与 A549 细胞培养 4 h，使用激光共聚焦扫描显微镜评估融合蛋白被肿瘤细胞摄取情况。实验结果表明(图 6)，FITC 标记的 3 种铁蛋白可以进入细胞膜，被 A549 细胞摄取，而 PBS、游离 FITC 组未观察到摄取情况。

2.7 小鼠体内肿瘤组织摄取

将 1 mg/mL 融合铁蛋白与荧光染料 Cy7-SE 结合，尾静脉注射 100 μL 至黑色素瘤小鼠中，用 PBS 组、游离 Cy7-SE 组作对比。体内肿瘤摄取实验表明(图 7)，注射游离 Cy7-SE 的小鼠体内，肿瘤部位几乎没有观察到荧光信号，而经 Cy7-SE 标记后的融合铁蛋白在尾静脉注射小鼠 30 min 后，肿瘤部位的荧光信号较强，证明了融合铁蛋白能够靶向至肿瘤部位。

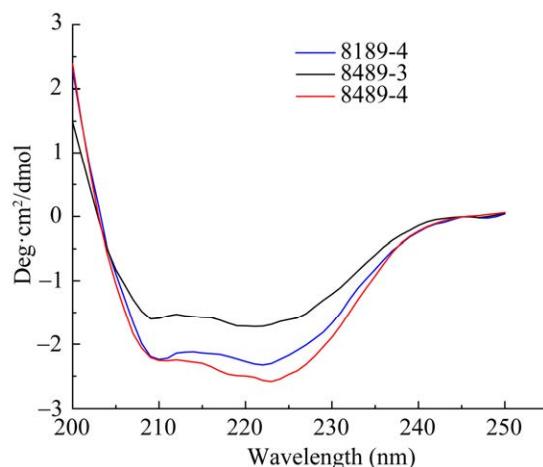


图 4 圆二色谱鉴定
Figure 4 Circular dichroism identification.

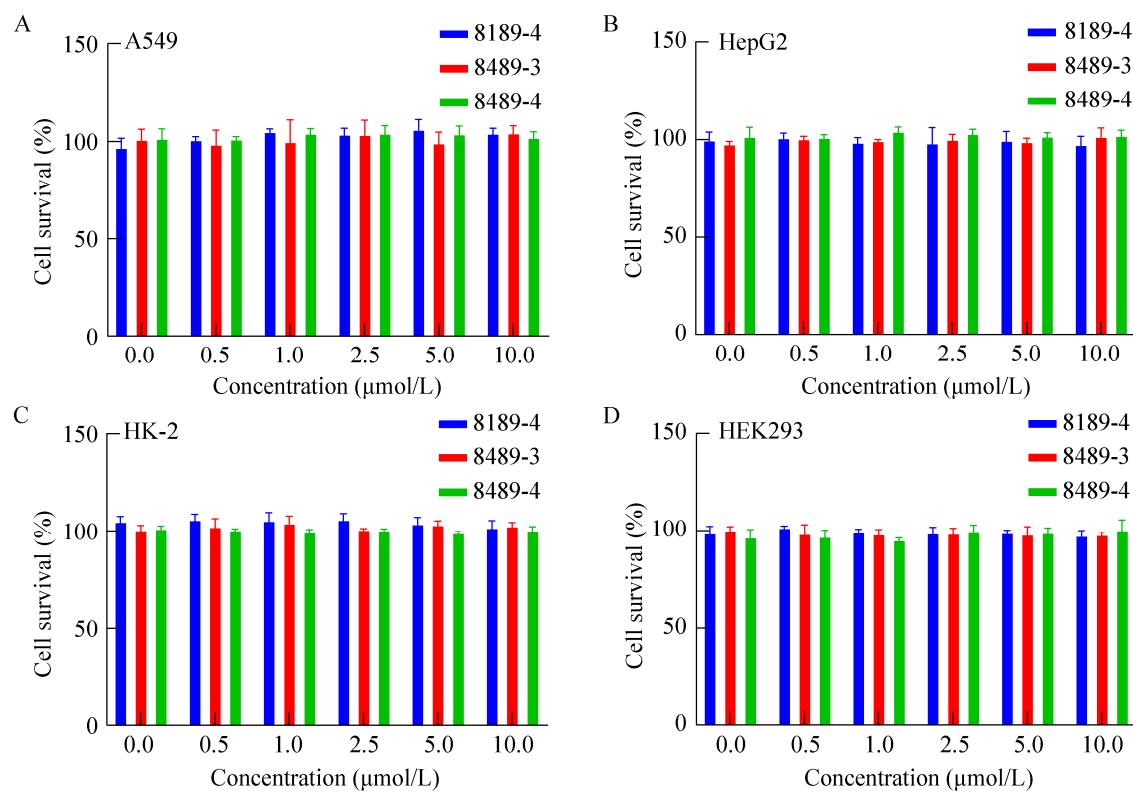


图 5 细胞毒性分析($n=3$) A: 融合铁蛋白对 A549 的细胞毒性; B: 融合铁蛋白对 HepG2 的细胞毒性; C: 融合铁蛋白对 HK-2 的细胞毒性; D: 融合铁蛋白对 HEK293 的细胞毒性。

Figure 5 Cytotoxicity analysis ($n=3$). A: Cytotoxicity of fused ferritin to A549; B: Cytotoxicity of fused ferritin to HepG2; C: Cytotoxicity of fused ferritin to HK-2; D: Cytotoxicity of fused ferritin to HEK293.

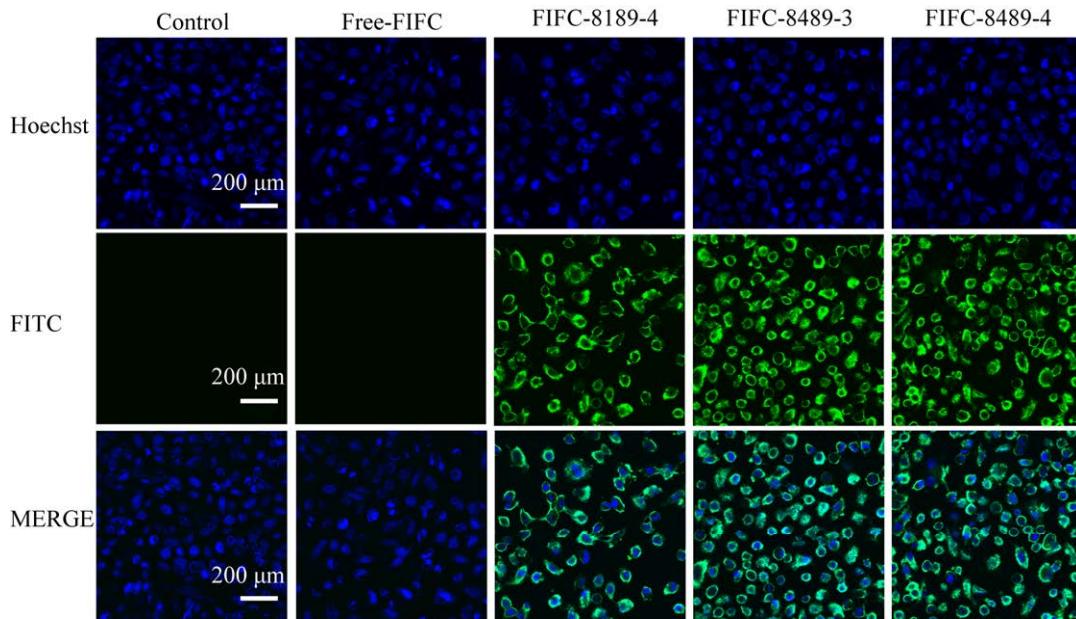


图 6 A549 对融合铁蛋白的摄取($n=3$)

Figure 6 Uptake of fusion ferritin by A549 ($n=3$).

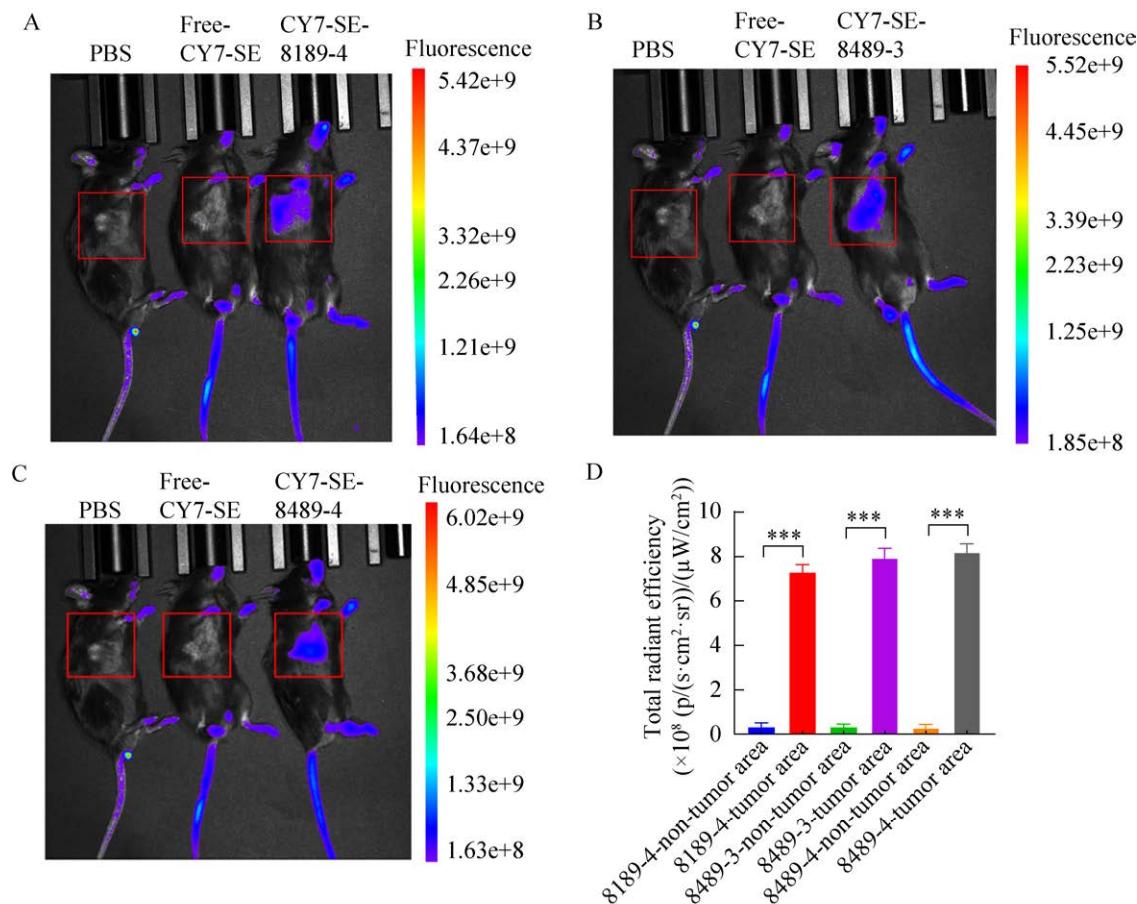


图 7 融合铁蛋白在小鼠黑色素瘤体内成像($n=3$)

A: 8189-4 组体内成像。B: 8489-3 组体内成像。C: 8489-4 组体内成像。红色方框表示肿瘤部位。D: 体内荧光强度。***表示与非肿瘤区域相比差异极显著($P<0.001$)。

Figure 7 Targeting of fused ferritin in mouse melanoma ($n=3$). A: Fusion ferritin 8189-4 *in vivo* imaging. B: Fusion ferritin 8489-3 *in vivo* imaging. C: Fusion ferritin 8489-4 *in vivo* imaging. The red box indicates the tumor site. D: *In vivo* fluorescence intensity. *** indicates that the difference is extremely significant compared with the non-tumor area ($P<0.001$).

3 讨论与结论

铁蛋白作为一种铁储存蛋白，在细胞的铁稳态和抗氧化中起着关键作用^[25]。由于其独特结构，铁蛋白已成为一种有前途的药物递送载体，可用于生物分析、影像诊断和药物开发^[8-9]。基于铁蛋白的制剂在过去 10 年中蓬勃发展，关于铁蛋白的疫苗也已进入临床试验。但铁蛋白的递送及铁蛋白疫苗的研制仍需要面临一些挑战，如铁蛋白包载不同药物时难以把控的载药

量及包封率、异源铁蛋白的免疫原性、基于基因工程的铁蛋白载体是基提纯工艺复杂等限制了其应用和商业化，使基于铁蛋白的药物研制大部分处于研究阶段^[26-28]。

铁蛋白在原核表达中通常以包涵体形式存在，这不利于其广泛应用^[29]。为获得可溶性铁蛋白以便于后续对载药进行探索，本研究利用大肠杆菌原核表达系统，融合 His 标签成功表达可溶性融合铁蛋白并加以纯化，SDS-PAGE

结果表明得到了纯度 90%以上的融合铁蛋白，这一结果可为其他包涵体铁蛋白的可溶性表达及纯化提供参考。生物安全性是药物递送系统中重要的检测指标^[30]。本研究采用 CCK-8 法测试了融合铁蛋白的细胞相容性，发现无论是正常细胞 HK-2、HEK293，还是肿瘤细胞 A549、HepG 与 10 μmol/L 的融合铁蛋白孵育后细胞活力都在 95%以上，表明融合铁蛋白具有较好的细胞相容性，可以作为良好的药物递送系统。

铁蛋白纳米笼的表面具有多个位点，很容易通过化学或生物修饰进行功能化。铁蛋白表面的赖氨酸残基氨基和半胱氨酸残基的巯基通常用作与功能化片段或化学交联剂反应的位点^[25]。有研究表明，铁蛋白重链的受体转铁蛋白受体 1 (transferrin receptor 1, TfR1)在 3/4 的肿瘤细胞中高表达^[31]。由于铁蛋白对 TfR1 的内在亲和力，铁蛋白可以靶向积累在某些疾病部位^[17]。通过修饰铁蛋白表面，携带可以产生颜色、荧光或辐射的试剂，铁蛋白就可以作为一种疾病可视化纳米探针候选物。本研究使用 FITC 与融合铁蛋白进行氨基反应，进行体外肿瘤细胞摄取，同时为了验证融合铁蛋白在小鼠体内的肿瘤靶向性，将 Cy7-SE 标记的融合铁蛋白通过尾静脉注射到黑色素瘤小鼠体内，并且在注射 30 min 后对小鼠进行荧光成像。结果显示融合铁蛋白能被肿瘤细胞和肿瘤组织摄取，有利于实现靶向肿瘤的荧光成像。

虽然研究的融合铁蛋白具有良好的生物安全性和被肿瘤摄取的能力，能够达到肿瘤成像的目的，为肿瘤的精准治疗提供了新的可能，但仍有许多方面值得探究，如融合铁蛋白的稳定性、肿瘤摄取的机制、如何利用融合铁蛋白将化疗药物递送至肿瘤细胞，协同发挥更好的抗肿瘤疗效，达到肿瘤的治疗和诊断一体化。

本研究表达纯化了 3 种融合铁蛋白，通过细胞摄取实验与小鼠模型探索了其肿瘤摄取情况，为后续融合铁蛋白载药及疫苗研究奠定了基础。

作者贡献声明

严国银：方案设计、实验操作、初稿写作、稿件润色修改；李子洋：实验操作、提供材料、稿件润色修改；李军：方案设计、经费支持。

作者利益冲突公开声明

作者声明没有任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

REFERENCES

- ZHU YJ, ZHU YF, CAO TM, LIU XY, LIU XY, YAN Y, SHI YJ, WANG JC. Ferritin-based nanomedicine for disease treatment[J]. Medical Review, 2023, 3(1): 49-74.
- LAWSON DM, ARTYMIUK PJ, YEWDALL SJ, SMITH JMA, LIVINGSTONE JC, TREFFRY A, LUZZAGO A, LEVI S, AROSIO P, CESARENI G, THOMAS CD, SHAW WV, HARRISON PM. Solving the structure of human H ferritin by genetically engineering intermolecular crystal contacts[J]. Nature, 1991, 349: 541-544.
- HARRISON PM, AROSIO P. The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, 1996, 1275(3): 161-203.
- PLAYS M, MÜLLER S, RODRIGUEZ R. Chemistry and biology of ferritin[J]. Metallomics, 2021, 13(5): mfab021.
- TESAROVA B, MUSILEK K, REX S, HEGER Z. Taking advantage of cellular uptake of ferritin nanocages for targeted drug delivery[J]. Journal of Controlled Release, 2020, 325: 176-190.
- SIMSEK E, AKIF KILIC M. Magic ferritin: a novel chemotherapeutic encapsulation bullet[J]. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 2005, 293(1): 509-513.
- ZHANG CX, ZHANG XR, ZHAO GH. Ferritin nanocage: a versatile nanocarrier utilized in the field of food, nutrition, and medicine[J]. Nanomaterials, 2020, 10(9): 1894.
- HONG S, CHOI DW, KIM HN, PARK CG, LEE W, PARK HH. Protein-based nanoparticles as drug delivery systems[J]. Pharmaceutics, 2020, 12(7): 604.
- XU XL, TIAN KW, LOU XF, DU YZ. Potential of ferritin-based platforms for tumor immunotherapy[J]. Molecules, 2022, 27(9): 2716.
- KUNA K, BADDAM SR, KALAGARA S, AKKIRAJU

- PC, TADE RS, ENAGANTI S. Emerging natural polymer-based architected nanotherapeutics for the treatment of cancer[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 262: 129434.
- [11] SUN XR, HONG YL, GONG YB, ZHENG SS, XIE DH. Bioengineered ferritin nanocarriers for cancer therapy[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(13): 7023.
- [12] MA YM, DONG YX, LI X, WANG F, ZHANG Y. Tumor-penetrating peptide-functionalized ferritin enhances antitumor activity of paclitaxel[J]. ACS Applied Bio Materials, 2021, 4(3): 2654-2663.
- [13] JIANG B, ZHANG RF, ZHANG JL, HOU YX, CHEN XH, ZHOU M, TIAN XY, HAO CY, FAN KL, YAN XY. GRP78-targeted ferritin nanocaged ultra-high dose of doxorubicin for hepatocellular carcinoma therapy[J]. Theranostics, 2019, 9(8): 2167-2182.
- [14] HE JY, FAN KL, YAN XY. Ferritin drug carrier (FDC) for tumor targeting therapy[J]. Journal of Controlled Release, 2019, 311/312: 288-300.
- [15] LIU MM, JIN D, YU WX, YU JJ, CAO KM, CHENG JJ, ZHENG XH, WANG A, LIU YZ. Enhancing tumor immunotherapy by multivalent anti-PD-L1 nanobody assembled via ferritin nanocage[J]. Advanced Science, 2024, 11(20): e2308248.
- [16] SONG NN, ZHANG JL, ZHAI J, HONG JJ, YUAN C, LIANG MM. Ferritin: a multifunctional nanoplatform for biological detection, imaging diagnosis, and drug delivery[J]. Accounts of Chemical Research, 2021, 54(17): 3313-3325.
- [17] VERONIAINA H, PAN XH, WU ZH, QI XL. Apoferritin: a potential nanocarrier for cancer imaging and drug delivery[J]. Expert Review of Anticancer Therapy, 2021, 21(8): 901-913.
- [18] MAININI F, BONIZZI A, SEVIERI M, SITIA L, TRUFFI M, CORSI F, MAZZUCHELLI S. Protein-based nanoparticles for the imaging and treatment of solid tumors: the case of ferritin nanocages, a narrative review[J]. Pharmaceutics, 2021, 13(12): 2000.
- [19] DENG GD, LI Y, LIANG N, HU PP, ZHANG Y, QIAO LL, ZHANG YY, XIE J, LUO H, WANG F, CHEN FJ, LIU FJ, XU DG, ZHANG JD. Ferritin in cancer therapy: a pleiotropic tumoraffin nanocage-based transport[J]. Cancer Medicine, 2023, 12(10): 11570-11588.
- [20] INCOCCIATI A, KUBEŠ J, PIACENTINI R, CAPPELLETTI C, BOTTA S, BERTUCCINI L, ŠIMŮNEK T, BOFFI A, MACONE A, BONAMORE A. Hydrophobicity-enhanced ferritin nanoparticles for efficient encapsulation and targeted delivery of hydrophobic drugs to tumor cells[J]. Protein Science, 2023, 32(12): e4819.
- [21] SALINAS ND, MA R, McALEESE H, OUAHES T, LONG CA, MIURA K, LAMBERT LE, TOLIA NH. A self-assembling Pfs230D1-ferritin nanoparticle vaccine has potent and durable malaria transmission-reducing activity[J]. Vaccines, 2024, 12(5): 546.
- [22] PAN JD, CUI ZQ. Self-assembled nanoparticles: exciting platforms for vaccination[J]. Biotechnology Journal, 2020, 15(12): e2000087.
- [23] RODRIGUES MQ, ALVES PM, ROLDÃO A. Functionalizing ferritin nanoparticles for vaccine development[J]. Pharmaceutics, 2021, 13(10): 1621.
- [24] REUTOVICH AA, SRIVASTAVA AK, AROSIO P, BOU-ABDALLAH F. Ferritin nanocages as efficient nanocarriers and promising platforms for COVID-19 and other vaccines development[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 2023, 1867(3): 130288.
- [25] MOHANTY A, PARIDA A, RAUT RK, BEHERA RK. Ferritin: a promising nanoreactor and nanocarrier for bionanotechnology[J]. ACS Bio & Med Chem Au, 2022, 2(3): 258-281.
- [26] ALJABALI AAA, REZIGUE M, ALSHAREDEH RH, OBEID MA, MISHRA V, SERRANO-AROCA Á, TAMBUWALA MM. Protein-based drug delivery nanomedicine platforms: recent developments[J]. Pharmaceutical Nanotechnology, 2022, 10(4): 257-267.
- [27] NGUYEN QD, KIKUCHI K, MAITY B, UENO T. The versatile manipulations of self-assembled proteins in vaccine design[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(4): 1934.
- [28] 成金妹, 李嘉昕, 段晓品. 基于铁蛋白的递送系统在生物医学领域的研究进展[J]. 中国药科大学学报, 2024, 55(4): 530-537.
- CHENG JM, LI JX, DUAN XP. Applications of ferritin-based delivery system in biomedical field[J]. Journal of China Pharmaceutical University, 2024, 55(4): 530-537 (in Chinese).
- [29] SANTAMBROGIO P, LEVI S, COZZI A, ROVIDA E, ALBERTINI A, AROSIO P. Production and characterization of recombinant heteropolymers of human ferritin H and L chains[J]. Journal of Biological Chemistry, 1993, 268(17): 12744-12748.
- [30] CHEN YQ, XU C, SUN MY, ZHAO GH, WANG ZJ, LV CY. Versatile ferritin nanocages: applications in detection and bioimaging[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2024, 262: 116567.
- [31] LIU QQ, WANG CY, ZHU MS, LIU JM, DUAN QN, MIDGLEY AC, LIU RM, JIANG B, KONG DL, CHEN Q, ZHUANG J, HUANG XL. Self-assembly of heterogeneous ferritin nanocages for tumor uptake and penetration[J]. Advanced Science, 2024, 11(17): e2309271.