

酪氨酸衍生物调控酶催化路径可控合成功能黑色素^{*}

苏东芮^{a,b} 任小康^b 于云昊^b 赵鲁阳^{*,b}

王天宇^{*,a} 闫学海^{*,b,c,d}

(^a 北京科技大学 化学与生物工程学院 功能分子与晶态材料科学与应用北京市重点实验室 北京 100083)

(^b 中国科学院过程工程研究所 生化工程国家重点实验室 北京 100083)

(^c 中国科学院大学 化学工程学院 北京 100049)

(^d 中国科学院过程工程研究所 介尺度科学研究中心 北京 100083)

摘要 利用酶催化自组装将生物小分子构筑成具有独特功能的生物大分子聚合物是制备功能生物材料极具前景的新策略, 然而其挑战在于如何在底物层面调控生物大分子的结构和功能. 以从酪氨酸构筑黑色素为例, 通过底物结构的简单衍生化, 实现了对酶催化自组装过程中关键聚合位点的控制, 得到一系列尺寸、形貌各异的黑色素产物. 进一步表征了各黑色素产物的光热转换性能, 在细胞层次验证了结构修饰的黑色素用于光热材料的潜力. 揭示了通过改变底物核心基团周边化学结构调控酶催化路径, 进一步调控黑色素产物性质及功能的可行性, 为构筑新型功能黑色素材料提供了新思路, 同时对揭示生物大分子结构与生物功能的关系提供了有益启示.

关键词 黑色素; 酪氨酸酶; 酶催化自组装; 酪氨酸衍生物; 光热材料

Tyrosine Derivative Regulated Enzyme Catalytic Pathway for Controllable Synthesis of Functional Melanin^{*}

Su, Dongrui^{a,b} Ren, Xiaokang^b Yu, Yunhao^b Zhao, Luyang^{*,b}
Wang, Tianyu^{*,a} Yan, Xuehai^{*,b,c,d}

(^a Beijing Key Laboratory for Science and Application of Functional Molecular and Crystalline Materials, School of Chemistry and Chemical Engineering, University of Science and Technology Beijing, Beijing 100083)

(^b State Key Laboratory of Biochemical Engineering, Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100083)

(^c School of Chemical Engineering, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049)

(^d Center for Mesoscience, Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100083)

Abstract Construction of biomacromolecules via enzyme-mediated catalytic assembly from small biomolecules is fascinating for preparing functional biological materials. The challenge remains on how to control the structure and functions of biomacromolecules through substrate regulation. A sequence of crucial biomacromolecules, melanin, were prepared via simple substrate derivation, which controls the key polymerization sites in enzyme catalyzed self-assembly process. In detail, we designed three tyrosine derivatives, namely, 3-fluorotyrosine [Tyr(F)], *N*-acetyltyrosine [Tyr(*N*-Ac)], and tyrosine ethyl ester [Tyr(OEt)]. The three substrates corresponded to the blockage of different tyrosinase-mediated polymerization active site, and tyrosine was used as the reference. The above small molecules as substrates (1.0 mmol/L) and tyrosinase (2 U) were mixed in phosphate buffer (pH=8.5, 0.10 mol/L, 2.0 mL), which was stirred in an air environment of 25 °C. After 24 h, the reaction was quenched and the mixture was centrifuged to obtain different melanin nanoparticle products (MNPs). Characterizations from transmission electron microscopy (TEM), infrared spectroscopy (IR), and X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) showed that all the melanin products had eumelanin-like skeleton, but were different in the degree of polymerization and microscopic chemical structures. These structure-modified MNPs showed overall absorption in the ultraviolet-visible-near infrared (UV-vis-NIR) region, thus enabling photothermal conversion in the NIR-I region. The photothermal conversion efficiency of MNP, MNP(F), and MNP(OEt) (3 mg·mL⁻¹) was measured to be 46.6%, 37.0%, and 25.8% [laser 808 nm, 1.5 W, where MNP(*N*-Ac) was not available due to rather low temperature increase]. Interestingly, *in vitro* experiment showed that MNP(OEt) exhibited better photothermal cytotoxicity than MNP, and this was probably because MNP(OEt) had a smaller particle size and less negative ζ-potential, which could ease cell endocytosis. This work demonstrated the feasibility to regu-

^{*} Dedicated to the 90th anniversary of *Acta Chimica Sinica*.

^{*} E-mail: yanxh@ipe.ac.cn (X. Y.); zhaoly@ipe.ac.cn (Y. Z.); twang@ustb.edu.cn (T. W.)

Received May 19, 2023; published July 28, 2023.

Supporting information for this article is available free of charge via the Internet at <http://sioc-journal.cn>.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 22025207, 22232006, 22077122, 22072004).

^{*} 庆祝《化学学报》创刊 90 周年.

项目受国家自然科学基金(Nos. 22025207, 22232006, 22077122, 22072004)资助.

late enzyme-mediated catalytic pathway via simple substrate derivation. It provides insights for the construction of new functional melanin materials and for revealing the relationship between biological macromolecular structure and function.

Keywords melanin; tyrosinase; enzyme-mediated catalytic assembly; tyrosine derivative; photothermal material

1 引言

自然界以精妙的酶催化自组装过程将简单小分子构筑成具有各种独特功能的大分子聚合物^[1]。例如,以氨基酸为底物构筑结构和功能丰富的蛋白。生物大分子的功能与自身结构密切相关。然而,如何调控大分子的结构和功能始终是一个重要挑战。与经典自组装过程不同,通过酶催化组装过程构筑大分子涉及共价键的形成和底物小分子的化学进化^[2-4]。一个典型的化学进化的事例是酪氨酸经酪氨酸酶催化氧化生成黑色素^[5]。黑色素在生物体着色、抗辐射、自由基清除中发挥着重要作用^[6-8]。同时,黑色素还具有良好的吸光能力,极具作为生物相容性光热材料用于光热治疗的潜力^[9]。黑色素良好的物理化学性质和生物学功能引起了人们的广泛兴趣,越来越多的黑色素材料不断被合成并报道。然而,黑色素结构与功能的关系,以及通过不同酪氨酸底物合成黑色素的底层机制尚未明晰。因此,仍需要研究通过底物设计构筑具有不同结构黑色素,从而调控黑色素功能的新策略。

自然界中,黑色素主要以酪氨酸为底物,通过酪氨酸酶(EC 1.14.18.1、EC 1.10.3.1)催化氧化作用生成(图 1a)。调控黑色素结构和功能主要有三种策略,分别是底物选择、关键聚合位点的调控及组装聚合过程的控制^[10]。由于酪氨酸酶为杂泛性酶,对底物具有非专一性,很多其他化合物,如多巴胺(DOPA)、邻苯二醌和 5,6-二羟基吲哚(DHI)等邻醌或醌类小分子,也可作为酪氨酸酶催化的底物生成黑色素^[11-12]。这些黑色素依聚合单元的结构不同分别被命名为真黑素、神经黑素或褐黑素等,进一步形成各种多功能生物材料^[13-14]。另一方面,催化条件的调控,例如浓度、pH 值、缓冲液及氧气浓度等,有助于提升酶催化路径的选择性,达到可控制备功能黑色素材料的效果^[15-17]。尽管如此,对酶催化组装过程中关键聚合位点的控制仍然缺乏足够关注。这些关键聚合位点是指形成黑色素的底物如酪氨酸等在酶催化聚合过程中存在多个活性不同的反应位点^[18-19],是造成酶催化路径复杂性和产物多样性的直接因素之一^[20-21]。因而,对这些位点的选择性控制有可能显著改变黑色素的结构和功能。

本工作利用底物结构调控酪氨酸酶催化反应,依据已知酪氨酸酶催化机制,设计催化路径选择性底物制备结构功能不同的黑色素。通过对底物酪氨酸羧基、氨基以及侧链基团的修饰,控制酪氨酸酶催化的活性位点,得到一系列尺寸、形貌各异的黑色素产物。进一步表征了各黑色素产物的光热转换性能,在细胞层次验证了结构修饰的黑色素用于光热材料的潜力。本工作表明控制酪

氨酸酶催化位点能够有效调控黑色素产物结构及功能,有望成为构筑功能黑色素材料的新策略,同时对揭示生物大分子结构与生物功能的关系具有有益启示。

2 结果与讨论

2.1 酪氨酸衍生物酶催化制备黑色素与结构表征

酪氨酸(Tyr)经酪氨酸酶催化生成黑色素聚合物的反应中,酪氨酸有三个活性位点,分别为氨基、羧基和酚羟基邻位^[22-23](图 1a, 1b)。封闭其中一个活性位点,有可能改变黑色素的生成过程及产物结构。因此,我们设计了三种酪氨酸衍生物,分别为 3-氟酪氨酸[Tyr(F)]、*N*-乙酰酪氨酸[Tyr(*N*-Ac)]和酪氨酸乙酯[Tyr(OEt)](图 1b),对应封闭不同的活性位点,同时将酪氨酸用于对照实验。分别将上述小分子作为底物与酪氨酸酶在磷酸缓冲溶液(PBS)中混合,并在 25 °C 空气环境下搅拌,24 h 后停止反应,离心,得到不同的黑色素产物(图 1c)。根据底物不同,将由酪氨酸、3-氟酪氨酸、酪氨酸乙酯和 *N*-乙酰基酪氨酸所制得黑色素分别命名为原黑色素(MNP)、氟代黑色素[MNP(F)]、黑色素乙酯[MNP(OEt)]和 *N*-乙酰黑色素[MNP(*N*-Ac)](图 1d)。其中,原黑色素含黑色颗粒沉淀,黑色素乙酯含有可溶性黑色颗粒,而氟代黑色素和 *N*-乙酰黑色素未产生明显的沉淀。透射电子显微镜(TEM)图像显示,纯化后的原黑色素、氟代黑色素和黑色素乙酯均呈颗粒状结构(图 2a~2d),而 *N*-乙酰黑色素未观测到纳米物质的生成。以上现象说明底物酪氨酸的活性位点被封闭后,聚合生成黑色素的效率得到不同程度的降低,其中以 *N*-乙酰黑色素的聚合效率低,仅生成了具有类似黑色素结构的寡聚物。其原因可能为三个活性位点允许黑色素聚合形成交叉网络结构,而封闭活性位点抑制了这种结构形成,从而导致聚合度降低。

红外光谱表征结果显示,酪氨酸及其衍生物所生成黑色素具有相似的特征信号(图 2e),表明它们经历了相似的酶催化反应路径,可以形成与原黑色素(或真黑素)相似的化学结构和官能团。其中,四种黑色素在 1684 和 1601 cm^{-1} 处的特征信号分别对应醌和邻苯二酚基团^[9,24]。X 射线光电子能谱(XPS)表征结果显示,所有黑色素均含有碳、氮、氧元素,而氟代黑色素含有特征氟元素(图 2f)。具体而言,各黑色素产物的 C 1s 区域由三种信号峰组成,分别对应 C=C (284.8 eV)、C=O (286.3 eV)和 C(O)—O (288.9 eV)键结构,均源自真黑素结构^[25-27](图 S1, 见支持信息)。对应于 O 1s 区域的 O=C (533.4 eV)、O—C (531.7 eV)^[27-28]以及对应于 N 1s 区域的 C—N (401.8、400.7 eV)键结构^[29]均表现出明显的原黑色素结

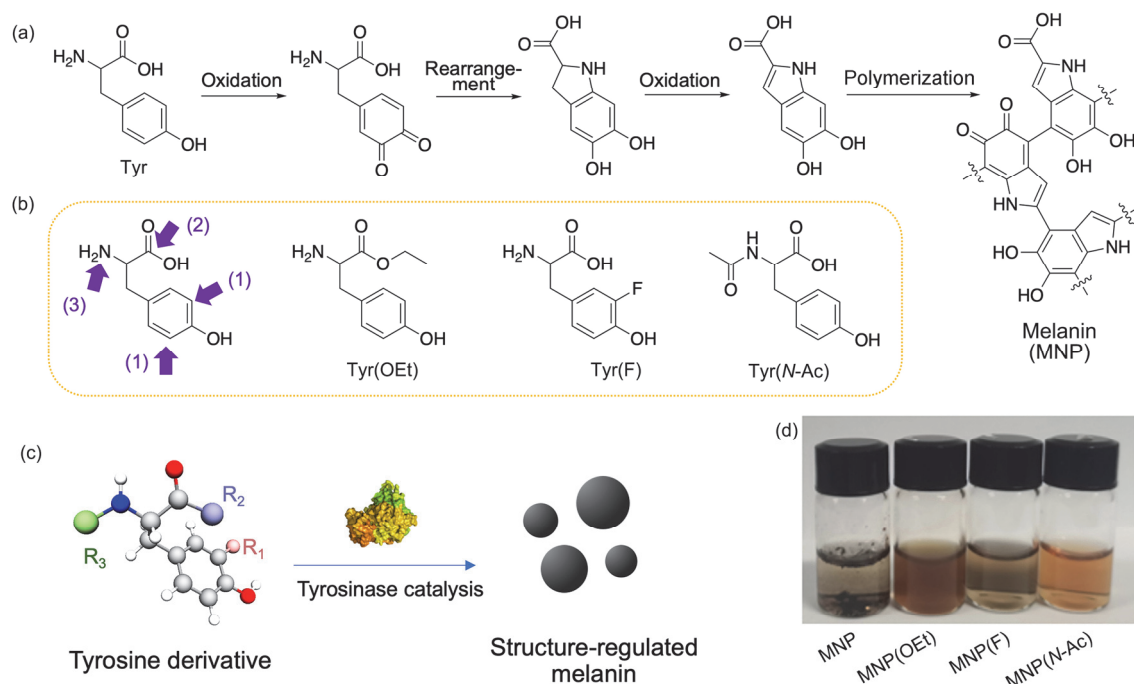


图 1 (a)酪氨酸酶催化酪氨酸(Tyr)底物生成黑色素机理、(b)酪氨酸反应聚合活性位点及本文采用的酪氨酸衍生物结构(依次为 Tyr(OEt)、Tyr(F)和 Tyr(N-Ac))、(c)通过酪氨酸底物衍生化进行活性位点调控, 经酪氨酸酶催化制备黑色素策略示意图以及(d)由不同底物制得黑色素溶液样品图像 [从左到右依次为 MNP、MNP(OEt)、MNP(F)和 MNP(N-Ac), 分别对应于由底物 Tyr、Tyr(OEt)、Tyr(F)和 Tyr(N-Ac)所得产物]

Figure 1 (a) Mechanism of tyrosinase catalysis from tyrosine (Tyr) substrate to melanin product, (b) active site of tyrosine reaction polymerization and the structure of tyrosine derivatives used in this work, (c) schematic diagram of tyrosinase-mediated melanin production by regulating the active polymerization site through the derivatization of tyrosine substrates, and (d) images of melanin solution samples prepared from different substrates [from left to right: MNP, MNP(OEt), MNP(F), and MNP(N-Ac) corresponding to Tyr, Tyr(OEt), Tyr(F), and Tyr(N-Ac)]

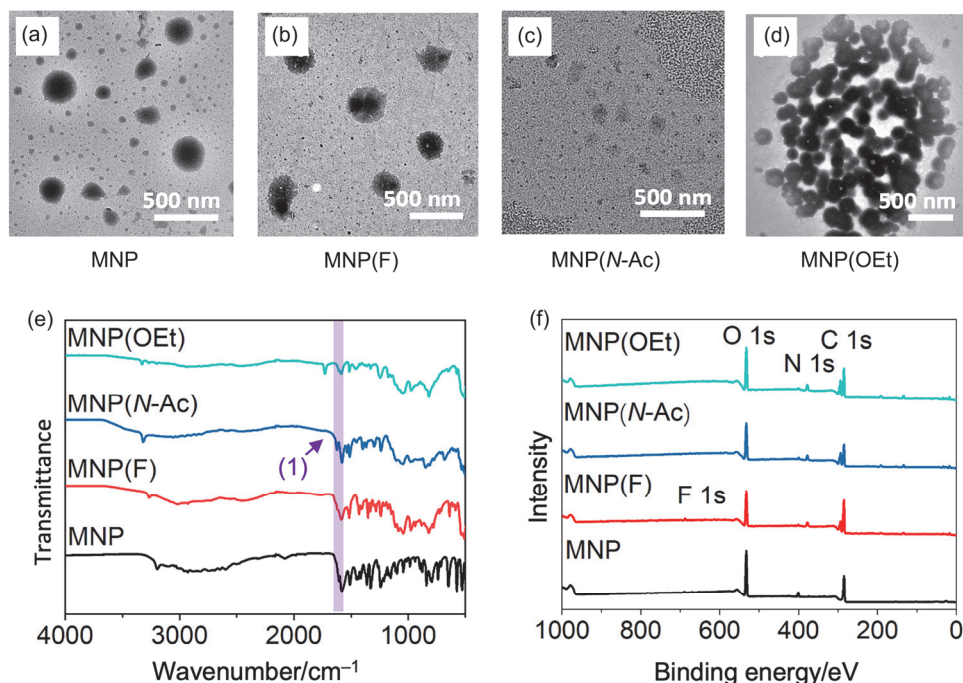


图 2 黑色素的形貌及结构表征

(a~d)原黑色素、氟代黑色素、*N*-乙酰黑色素和黑色素乙酯的 TEM 图像; (e)四种黑色素的红外光谱, 其中特征信号(1)指示醌和邻苯二酚结构; (f)四种黑色素的 XPS 全谱

Figure 2 Morphology and structural characterizations of melanin products

(a~d) TEM images of MNP, MNP(F), MNP(N-Ac) and MNP(OEt), respectively; (e) infrared spectra of four types of melanin, where the feature peaks (1) indicated catechol and quinone groups, respectively; (f) XPS spectra of four types of melanin

构。氟代黑色素显示 C—F (686.8 eV), 证实氟的存在(图 S1, 见支持信息)。以上结果表明, 氨基酸及其衍生物经酶催化聚合生成了具有典型真黑色素结构特征的黑色素聚合物。

2.2 酪氨酸酶催化机制

进一步通过分子对接模拟研究对酪氨酸底物的化学修饰如何影响酪氨酸酶催化反应。取双胞菌酪氨酸酶的一个亚基(PDB ID: 5M6B, A 链)为受体, 酪氨酸、3-氟酪氨酸、酪氨酸乙酯和 *N*-乙酰酪氨酸分别作为配体。如图 3 所示, 四种酪氨酸底物在酶活性口袋中均处于相似的位置, 并具有相似的构象, 表明四种底物与酪氨酸酶可能具有相似的作用, 经历相似的催化反应过程。然而, 四种底物与酪氨酸酶的结合能有显著差异, 其中酪氨酸、酪氨酸乙酯与酶的结合能分别为 -0.64 和 -0.46 $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, 表明二者对酪氨酸酶表现出相似的亲和力, 在酪氨酸酶介导的催化下具有相似的反应活性; 而 3-氟酪氨酸与酶的结合能为 1.54 $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, 相比前者反应活性稍弱, *N*-乙酰酪氨酸与酶的结合能高达 9.57 $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, 是一种能量不利的结合状态, 意味着 *N*-乙酰酪氨酸不能很好地与酶结合, 从而进行催化反应。通过进一步能量分析得知, *N*-乙酰酪氨酸与酶结合能的主要贡献来源于分子间作用能和范德华、氢键溶解能。以上结果表明,

封闭酪氨酸的活性位点不同程度上降低了底物与酶的结合能力, 从而抑制了酶催化反应进行。其中封闭氨基位点对聚合反应的抑制程度最大, 原因可能为乙酰基团增大了分子位阻, 同时降低了原有氨基与酶的氢键及库仑相互作用。该模拟结果与实验一致, 即酪氨酸乙酯、3-氟酪氨酸与酶作用得可溶性黑色素颗粒, *N*-乙酰酪氨酸与酶作用仅得到褐色寡聚物。

2.3 黑色素光热性能研究

光热治疗是一种选择性或特异性高、生物入侵性小的肿瘤治疗方法, 近十年一直处于癌症治疗的前沿领域^[30-31]。其中光热材料是影响光热治疗效果的重要因素^[32-35]。黑色素因在紫外-可见-近红外区具有广谱吸收, 特别是在近红外 I 区(780~900 nm)具备吸光能力, 因而具有潜在的近红外光热转换性能, 可作为生物相容性吸光材料用于光热治疗。我们取基于等摩尔浓度(1.0 mmol/L)底物反应得到的四种黑色素样品进行吸收光谱测试, 发现四种黑色素在 300~900 nm 区域具有全谱吸收(图 4a)。其中原黑色素和黑色素乙酯在 808 nm 处的吸光度分别为 0.18 和 0.21, 远高于氟代黑色素和 *N*-乙酰黑色素的吸光度(分别为 0.06 和 0.05, 图 S2, 见支持信息)。这可能是由于酪氨酸和酪氨酸乙酯经酶催化完全反应, 得到了较高浓度的黑色素颗粒, 而 3-氟酪氨酸与 *N*-乙酰酪氨酸的催化反应不完全, 生成黑色素量较低。我们进一步研究了四种黑色素样品在 808 nm 激光(功率密度为 $1.5\text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$)照射下的光热效应。结果表明, 在相同辐照时间下, 不同样品升温呈现较大差异。其中原黑色素、氟代黑色素和黑色素乙酯具有相近的升温幅度, 分别为 20.9、18.2 和 19.8 $^{\circ}\text{C}$, 而 *N*-乙酰黑色素由于产率低, 升温幅度小于 2 $^{\circ}\text{C}$ (图 4b)。同时, 在 5 个辐照开/关周期内, 样品颜色和产热能力均无明显变化, 表明它们具有良好的光稳定性。通过数据拟合计算了不同黑色素的光热转换效率, 其中原黑色素和黑色素乙酯的光热转换效率较高, 分别为 47.3% 和 39.6%。相比之下, 氟代黑色素由于纳米颗粒较少, 光热转换效率相对较低, 仅为 25.8%(表 1)。 *N*-乙酰黑色素由于在同浓度情况下升温不明显, 数据拟合误差较大, 无法得到光热效率进行对比。

通常材料的光热性能取决于吸光能力和光热转换效率两方面因素^[36-37]。以上结果表明, 在底物酪氨酸羧基处引入乙酯基尽管降低了黑色素的光热转换效率, 但同时能够提升黑色素的吸光度, 从而表现出与原黑色素相当的升温效果。出现这一现象的原因可能为, 封闭底物羧基改变了酶催化路径, 导致黑色素化学结构及聚合度发生变化, 能带带隙降低。循环伏安曲线测试证实^[38-39](图 S3, 见支持信息), 原黑色素对应价带和导带的相对电势分别为 0.15 和 -0.72 V, 而黑色素乙酯对应价带和导带的相对电势分别为 0.20 和 -0.48 V, 比较可知后者具有更窄的电子带隙。由于氟代黑色素和 *N*-乙酰黑色素水溶性强, 难以镀在电极上, 故未能通过循环

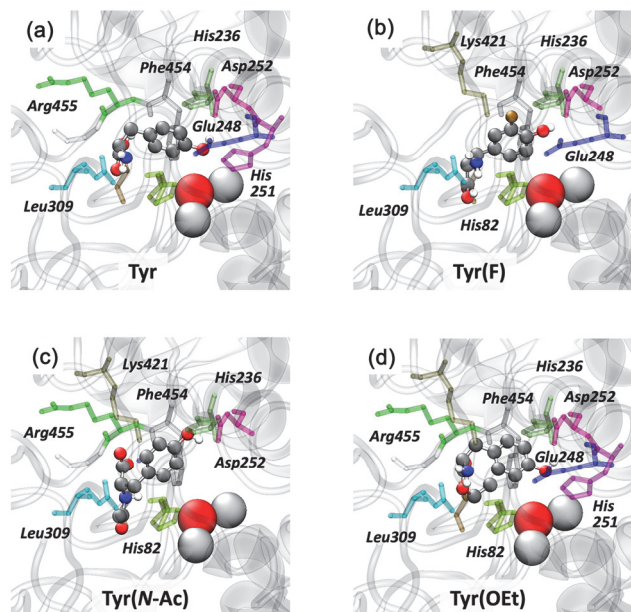


图 3 分子对接模拟不同酪氨酸底物在酪氨酸酶活性口袋中具有能量极小值的结构示意图。(a~d)底物依次为酪氨酸、3-氟-酪氨酸、*N*-乙酰酪氨酸和酪氨酸乙酯。其中底物(省略非活性氢原子)以球棍模型表示, 与底物相距 3 Å 以内的氨基酸残基以彩色棍模型表示, 双铜催化核心以球模型表示。

Figure 3 Structural diagram of molecular docking simulation of different tyrosine substrates with energy minima in the tyrosinase activity pocket. The substrates (a~d) are Tyr, Tyr(F), Tyr(N-Ac), and Tyr(OEt), respectively. The substrate (omitting nonactive hydrogen atoms) is represented by a ball stick model, the amino acid residues within 3 Å of the substrate are represented by a colored stick model, and the oxo-dicopper catalytic core is represented by a ball model.

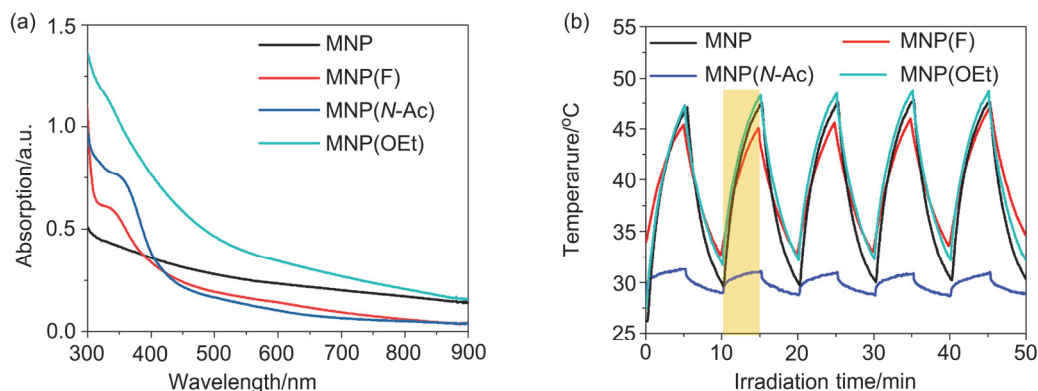


图4 四种黑色素的光热转换效果表征

(a)四种黑色素的紫外-可见-近红外吸收光谱; (b)四种黑色素在激光照射下的升降温循环曲线(其中黑色素样品浓度均为 $3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 激光为 808 nm , 功率为 1.5 W , 取黄色区域中的曲线段用于光热效率计算)

Figure 4 Characterization of the photothermal conversion effect of four types of melanins

(a) UV-Vis-NIR absorption spectra of four types of melanins; (b) temperature rise-fall cycles of four types of melanin under laser irradiation (the concentration of melanin sample is $3.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, the laser is 808 nm , and the laser power density is $1.5 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$. The curve segments in the yellow area are taken for photothermal efficiency calculation)

表1 黑色素、氟代黑色素和黑色素乙酯光热效率计算参数

Table 1 Photothermal conversion efficiency calculation parameters of MNP, MNP(F), and MNP(OEt)

	$[(Q_{\text{NP}} + Q_{\text{dis}})/\zeta + T_0]^a / \text{K}$	C_0^a / K	$(-\zeta/C_p)^a / \text{s}^{-1}$	A^b	$\zeta / (\text{W} \cdot \text{K}^{-1})$	Q_{NP} / W	η	R^{2c}
MNP	49.5	-19.8	-0.00751	1.073	0.031	0.650	0.473	1.000
MNP(F)	50.7	-18.2	-0.00432	1.959	0.018	0.386	0.260	1.000
MNP(OEt)	51.4	-18.4	-0.00610	1.431	0.026	0.572	0.396	0.999

^a Fitted parameters according to Eqs. 1~3; ^b sample absorption at 808 nm ; ^c regression coefficient-square. Other constants include $Q_{\text{dis}} = 0.02 \text{ W}$, and $T_0 = 28.2 \text{ }^\circ\text{C}$.

伏安图测出其能带间隙。此外,在相同浓度下,黑色素乙酯在 808 nm 附近的吸收最强(图4a)。因此在近红外光照条件下,黑色素乙酯相比于原黑色素更易产生电子转移,从而表现出高效的光能吸收与光热转化效果。

2.4 细胞层次黑色素光治疗效果研究

进一步在细胞层次验证了上述黑色素材料光热转化性能的差异。具体采用噻唑蓝(MTT)法评估四种黑色素材料对 4T1 肿瘤细胞的光热治疗性能(图 5)。取最大质量浓度为 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的四种黑色素样品分别与 4T1 细胞在黑暗中共孵育 24 h,未观察到样品对细胞活性明显的抑制作用,表明四种黑色素在 $0 \sim 1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的较大浓度范围内均具有良好的生物相容性。用近红外激光(808 nm , $1.5 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$)进一步照射与黑色素共孵育的细胞 3 min,细胞活性有不同程度的降低。与 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的原黑色素、氟代黑色素、黑色素乙酯和 *N*-乙酰黑色素共孵育细胞的活性分别为 93.0%、84.9%、58.9%和 78.3%。其中,黑色素乙酯表现出比其他三种材料更强的光热抗肿瘤活性,在 $0.125 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 这一较低浓度下,能使 4T1 细胞存活率显著下降至 64.8%。而与同一浓度下其它三种黑色素共孵育的细胞的存活率均高于 80%。这一结果显示黑色素乙酯具有潜在的光热治疗性能。这主要归因于黑色素乙酯具有较小而均一的颗粒尺寸,相对有利于细胞内化。相比之下,原黑色素具有更高的

光热转换效率,却无法有效杀伤 4T1 细胞,这主要是由于原黑色素颗粒尺寸较大(约 $1 \mu\text{m}$),导致肿瘤细胞膜无法很好吸收,从而使自身光热治疗效果受到限制。因此,酪氨酸乙酯可以更好被细胞所吸收,并通过光热杀伤手段,达到杀死 4T1 肿瘤细胞的目的。以上结果表明,通过控制聚合位点能够有效调控黑色素产物的结构和形貌,从而改变黑色素的光热性能。在酪氨酸羧基处引入酯基封闭羧基聚合位点,能够改善黑色素的光热治疗效果。

3 结论

通过对底物酪氨酸的简单衍生化,获得了一系列具有不同结构和功能的黑色素。这种底物衍生化方式实现了对酪氨酸酶催化组装过程中关键聚合位点的调控,使黑色素的聚合度显著降低,有望发展成为一种调控黑色素及其它酪氨酸酶催化产物的新策略,同时对研究酪氨酸酶催化过程机制具有有益启示。所得黑色素中黑色素乙酯相比由酪氨酸底物得到的原黑色素具有更优的粒径尺寸及分布和更好的光热治疗效果,这一材料有望进一步发展成为临床所需的光热材料;同时表明底物衍生化是一种简单而有效的调控黑色素结构和功能的策略。与传统控制反应条件方法相比,底物衍生化策略的优势在于:(1)对反应路径及产物结构和性质的改变更显著,

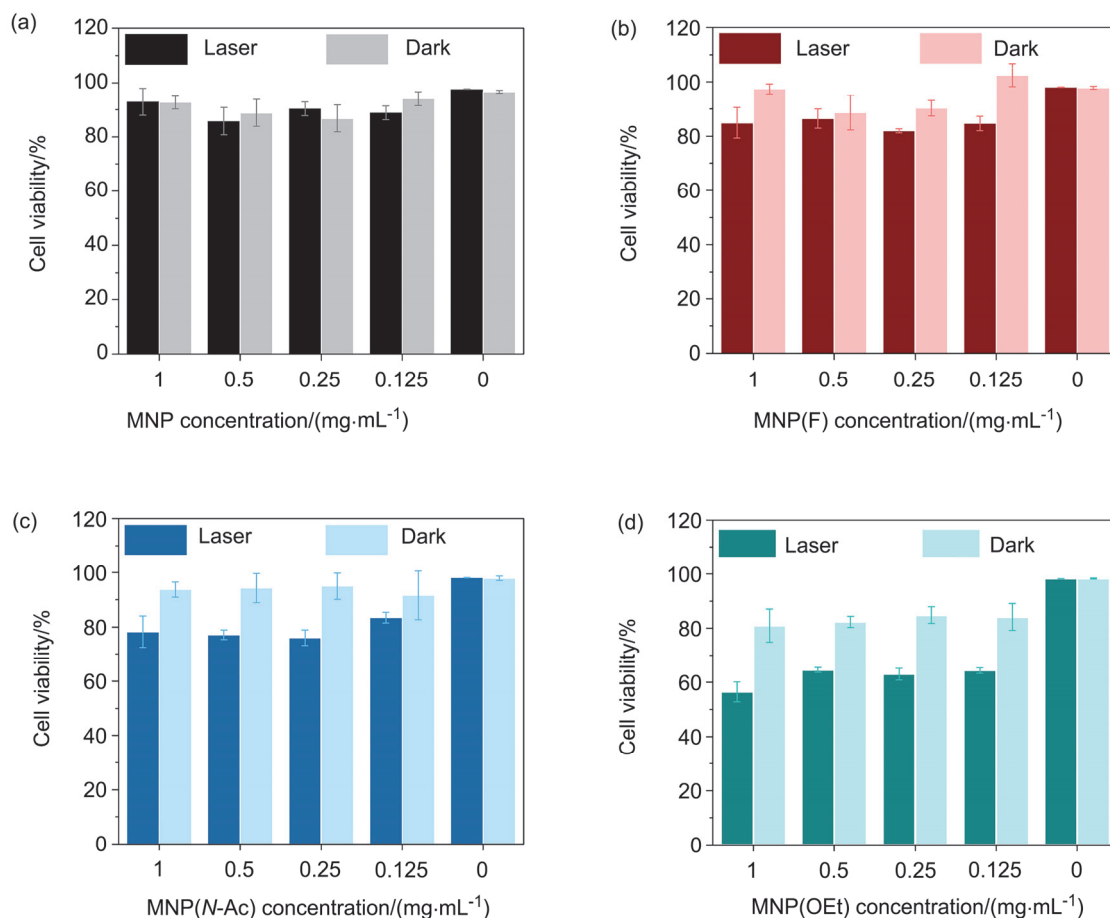


图5 4T1 细胞分别与(a)原黑色素、(b)氟代黑色素、(c) *N*-乙酰黑色素和(d)黑色素乙酯共孵育 24 h, 然后用 808 nm 激光($1.5 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$)照射 3 min 的存活率[误差棒代表标准偏差($n=6$)]

Figure 5 MTT assay of 4T1 cell viability after exposure to different concentrations of (a) MNP, (b) MNP(F), (c) MNP(*N*-Ac), and (d) MNP(OEt) with or without 808 nm laser irradiation ($1.5 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$) for 3 min [error bars represent the standard deviation ($n=6$)]

(2)具有多样性和可扩展性, (3)有可能为材料引入新元素新结构. 因此, 这不仅为构筑新型黑色素材料提供了新思路, 还有助于探索黑色素材料的新功能新应用, 同时对揭示生物大分子结构与生物功能关系具有借鉴意义.

4 实验部分

4.1 黑色素制备方法

分别将酪氨酸或酪氨酸衍生物(1.0 mmol)溶解在 100 mL 的磷酸缓冲液中(以磷酸二氢钾和磷酸氢二钾配置, 0.10 mol/L , $\text{pH}=8.5$), 再向溶液中加入双胞菌酪氨酸酶($10 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$, $100 \mu\text{L}$), 25°C 温和搅拌 24 h. 混合物通过离心除去不溶性沉淀, 再经超滤(底物为酪氨酸、酪氨酸乙酯或 3-氟-酪氨酸的情况)或凝胶排阻色谱(底物为 *N*-乙酰酪氨酸的情况)除去缓冲盐及小分子, 然后在真空下冷冻干燥, 得到黑色固体, 即黑色素纳米颗粒. 由底物酪氨酸、3-氟-酪氨酸、酪氨酸乙酯、*N*-乙酰酪氨酸制备所得黑色素分别记为黑色素、氟代黑色素、黑色

素乙酯和 *N*-乙酰黑色素.

4.2 光热转换效率测试及计算

分别取黑色素、氟代黑色素、黑色素乙酯和 *N*-乙酰黑色素 3.0 mg (冻干后的固体粉末)溶于 1.0 mL 水中, 将溶液转移至比色皿. 用 808 nm 激光(1.5 W)照射 5 min , 然后自然冷却 5 min , 反复循环 5 次.

光热转换效率(η)计算方法为:

$$\eta = \frac{Q_{\text{NP}}}{I_0(1-10^{-A})} \quad (1)$$

其中 Q_{NP} 体系光热转化功率, I_0 为入射光功率, A 为样品吸光度. 根据能量守恒, Q_{NP} 的计算方法为:

$$C_p \frac{dT}{dt} = Q_{\text{NP}} + Q_{\text{dis}} - \xi(T - T_0) \quad (2)$$

其中 Q_{dis} 为非样品导致的光热转换功率, ξ 体系与环境热交换系数, T 体系当前温度, T_0 环境温度, C_p 体系热容. 对微分方程(Eq. 2)求解升温曲线函数:

$$T = C_0 e^{-\frac{\xi}{C_p} t} + \frac{Q_{\text{NP}} + Q_{\text{dis}}}{\xi} + T_0 \quad (3)$$

然后对升温曲线进行三参数指数函数拟合, 可得到 C_0 (积分常数)、 $-\zeta/C_p$ 、 $[(Q_{NP}+Q_{dis})/(\zeta+T_0)]$. 上述可直接测量样品得到的物理量为 A , 测试条件或环境参量为 $I_0=1.5\text{ W}$, $Q_{dis}=0.02\text{ W}$, $T_0=28.2\text{ }^\circ\text{C}$, $C_p=4.18\text{ J}\cdot\text{K}^{-1}$, 由此解得 Q_{NP} 和 η .

4.3 细胞层次光热性能测试

4.3.1 细胞培养

小鼠乳腺癌细胞 4T1 细胞系购自中国科学院细胞库, 在 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 和二氧化碳体积分数为 5% 的环境条件下培养, 培养基为含有体积分数为 10% 胎牛血清和 1% 青霉素-链霉素的 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 培养液.

4.3.2 抗肿瘤细胞活性研究

采用 MTT 法评估经不同黑色素样品处理后的细胞活性. 将 4T1 细胞在 96 孔板中以密度为每孔 10^4 个细胞进行接种, 并孵育 12 h. 然后分别用不同浓度的每种黑色素样品处理细胞, 用 808 nm 激光 ($1.5\text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$) 光照 3 min, 孵育 24 h. 弃去培养液, 细胞用 PBS 清洗 2 遍. 每孔加入含 MTT ($0.5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 的细胞培养基 ($100\text{ }\mu\text{L}$) 继续培养 4 h. 小心吸除孔内培养液. 每孔加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ 二甲基亚砜 (DMSO), 避光放置 15 min. 用酶标仪测量每个样品 570 nm 处的吸光度, 最后计算得出细胞存活率.

References

- [1] Sorrenti, A.; Leira-Iglesias, J.; Markvoort, A. J.; de Greef, T. F. A.; Hermans, T. M. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46*, 5476.
- [2] Li, Y.; Sun, P.; Zhao, L.; Yan, X.; Ng, D. K. P.; Lo, P. C. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2020**, *59*, 23228.
- [3] Chen, K.; Xing, R.; Yan, X. *Aggregate* **2021**, *2*, 84.
- [4] Han, J.; Liu, K.; Chang, R.; Zhao, L.; Yan, X. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2019**, *58*, 2000.
- [5] Lampel, A.; McPhee, S. A.; Park, H.; Scott, G. G.; Humagain, S.; Hekstra, D. R.; Yoo, B.; Frederix, P. W. J. M.; Li, T.; Abzalimov, R. R.; Greenbaum, S. G.; Tuttle, T.; Hu, C.; Bettinger, C. J.; Ulijn, R. V. *Science* **2017**, *1068*, 1064.
- [6] Wang, Y.; Dong, W. *Mater. China* **2019**, *38*, 470 (in Chinese). (汪洋, 东为富, 中国材料进展, **2019**, *38*, 470).
- [7] Ren, Y.; Yang, L.; Gao, L.; Wang, F.; Shi, N.; Zhao, Y.; Guo, L.; Wang, H. *Mater. Rep.* **2020**, *34*, 11145 (in Chinese). (任燕玲, 杨柳, 高莉, 王芳, 史楠, 赵英虎, 郭丽晓, 王海宾, 材料导报, **2020**, *34*, 11145).
- [8] Zhou, J.; Wang, H.; Tong, L. *Chin. Sci. Bull.* **2023**, *68*, 1406 (in Chinese). (周建良, 王怀雨, 童丽萍, 科学通报, **2023**, *68*, 1406).
- [9] Yang, P.; Zhang, S.; Zhang, N.; Wang, Y.; Zhong, J.; Sun, X.; Qi, Y.; Chen, X.; Li, Z.; Li, Y. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2019**, *11*, 42671.
- [10] D'Ischia, M.; Napolitano, A.; Ball, V.; Chen, C. T.; Buehler, M. J. *Acc. Chem. Res.* **2014**, *47*, 3541.
- [11] Cao, W.; Zhou, X.; McCallum, N. C.; Hu, Z.; Ni, Q. Z.; Kapoor, U.; Heil, C. M.; Cay, K. S.; Zand, T.; Mantanona, A. J.; Jayaraman, A.; Dhinojwala, A.; Deheyn, D. D.; Shawkey, M. D.; Burkart, M. D.; Rinehart, J. D.; Gianneschi, N. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143*, 2622.
- [12] Partlow, B. P.; Applegate, M. B.; Omenetto, F. G.; Kaplan, D. L. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2016**, *2*, 2108.
- [13] McCallum, N. C.; Son, F. A.; Clemons, T. D.; Weigand, S. J.; Gnaneekaran, K.; Battistella, C.; Barnes, B. E.; Abeyratne-Perera, H.; Siwicka, Z. E.; Forman, C. J.; Zhou, X.; Moore, M. H.; Savin, D. A.; Stupp, S. I.; Wang, Z.; Vora, G. J.; Johnson, B. J.; Farha, O. K.; Gianneschi, N. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143*, 4005.
- [14] Cao, W.; McCallum, N. C.; Ni, Q. Z.; Li, W.; Boyce, H.; Mao, H.; Zhou, X.; Sun, H.; Thompson, M. P.; Battistella, C.; Wasielewski, M. R.; Dhinojwala, A.; Shawkey, M. D.; Burkart, M. D.; Wang, Z.; Gianneschi, N. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 12802.
- [15] Della Vecchia, N. F.; Luchini, A.; Napolitano, A.; D'Errico, G.; Vitiello, G.; Szekely, N.; d'Ischia, M.; Paduano, L. *Langmuir* **2014**, *30*, 9811.
- [16] Ren, X.; Zhao, L.; Yuan, C.; Shi, M.; Xing, R. *Chem. Eng. J.* **2022**, *450*, 138293.
- [17] Ren, X.; Zou, Q.; Yuan, C.; Chang, R.; Xing, R.; Yan, X. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2019**, *58*, 5872.
- [18] Ito, S. *Pigment Cell Res.* **2003**, *16*, 230.
- [19] Ito, S.; Wakamatsu, K. *Photochem. Photobiol.* **2008**, *84*, 582.
- [20] Lampel, A.; McPhee, S. A.; Kassem, S.; Sementa, D.; Massarano, T.; Aramini, J. M.; He, Y.; Ulijn, R. V. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2021**, *60*, 7564.
- [21] Zhao, L.; Ren, X.; Yan, X. *CCS Chem.* **2021**, *3*, 678.
- [22] Yasunobu, K. T.; Peterson, E. W.; Mason, H. S. *J. Biol. Chem.* **1959**, *234*, 3291.
- [23] Ramsden, C. A.; Riley, P. A. *Bioorganic Med. Chem.* **2014**, *22*, 2388.
- [24] Yang, P.; Gu, Z.; Zhu, F.; Li, Y. *CCS Chem.* **2020**, *2*, 128.
- [25] Zong, S.; Wang, L.; Yang, Z.; Wang, H.; Wang, Z.; Cui, Y. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2019**, *11*, 5896.
- [26] Xi, Z. Y.; Xu, Y. Y.; Zhu, L. P.; Wang, Y.; Zhu, B. K. *J. Membr. Sci.* **2009**, *327*, 244.
- [27] Panzella, L.; Gentile, G.; D'Errico, G.; Della Vecchia, N. F.; Errico, M. E.; Napolitano, A.; Carfagna, C.; D'Ischia, M. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2013**, *52*, 12684.
- [28] Stypczyńska, A.; Nixon, T.; Mason, N. *Eur. Phys. J. D* **2014**, *68*, 333.
- [29] Ding, Y.; Weng, L.-T.; Yang, M.; Yang, Z.; Lu, X.; Huang, N.; Leng, Y. *Langmuir* **2014**, *30*, 12258.
- [30] Guo, C.; Wang, B.; Ma, X. *Acta Chim. Sinica* **2021**, *79*, 967 (in Chinese). (郭彩霞, 王博, 马小杰, 化学学报, **2021**, *79*, 967).
- [31] Zou, Q.; Abbas, M.; Zhao, L.; Li, S.; Shen, G.; Yan, X. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 1921.
- [32] Zhao, L.; Zou, Q.; Yan, X. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2019**, *92*, 70.
- [33] Chang, R.; Zhao, L.; Xing, R.; Li, J.; Yan, X. *Chem. Soc. Rev.* **2023**, *52*, 2688.
- [34] Chang, R.; Zou, Q.; Zhao, L.; Liu, Y.; Xing, R.; Yan, X. *Adv. Mater.* **2022**, *34*, 2200139.
- [35] Li, S.; Zhang, W.; Xing, R.; Yuan, C.; Xue, H.; Yan, X. *Adv. Mater.* **2021**, *33*, 2100595.
- [36] Zhao, L.; Liu, Y.; Chang, R.; Xing, R.; Yan, X. *Adv. Funct. Mater.* **2019**, *29*, 1806877.
- [37] Zhao, L.; Liu, Y.; Xing, R.; Yan, X. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2020**, *59*, 3793.
- [38] Qiu, B.; Xue, L.; Yang, Y.; Bin, H.; Zhang, Y.; Zhang, C.; Xiao, M.; Park, K.; Morrison, W.; Zhang, Z. G.; Li, Y. *Chem. Mater.* **2017**, *29*, 7543.
- [39] Yang, Y.; Zhang, Z. G.; Bin, H.; Chen, S.; Gao, L.; Xue, L.; Yang, C.; Li, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 15011.

(Zhao, C.)