金属有机骨架固定化酶及其在中药酶抑制剂筛选中的 研究进展

刘海鹏¹,张勇²,王静¹,吕天赐¹,丁瑞鑫²,高桂花^{1,2*} (1.山东中医药大学药学院,济南 250355; 2.济宁医学院药学院,山东日照 276826)

[摘要] 酶因其高效率、专一性等特点在化工、制药等方面应用广泛,但是游离酶稳定性差、难以回收等不足限制了其应用,因此,酶的固定化及应用成为研究的热点之一。固定化载体的选择为酶固定化的关键步骤,金属有机骨架(MOFs)是由金属离子或金属簇与有机配体配位形成的多孔材料,作为一种新兴的固定化载体,其具有的高孔隙率、强稳定性和表面可修饰性等优点,使其成为理想的固定化酶载体。通过将游离酶固定在MOFs上,可有效解决游离酶上述的不足,大大拓宽了酶的适用环境。配体垂钓是一种从复杂的组分中找寻受体的特异性配体的方法,具有效率高、样品预处理简单和特异性强等优点。酶固定化后形成的 MOF-酶复合物可以充当配体垂钓的"钓竿",将目标物从复杂的组分体系中筛分出来。而中药的化学成分复杂、活性成分多样等特点使得配体垂钓技术在中药酶抑制剂筛选方面大展拳脚,筛选出来的酶抑制剂有望进一步开发成为药效好而不良反应低的先导化合物,因此 MOFs 固定化酶在中药活性成分筛选中具有广泛的应用前景。基于此,笔者总结了近年来 MOFs 固定化酶的方法,分析了各方法的特性及优缺点,对制备条件与制备机制的规律进行了总结。同时,对 MOFs 固定化酶在中药酶抑制剂筛选领域的应用与未来发展进行了总结与展望,以期为后续中药天然成分的开发和中药现代化的发展提供参考。

[关键词] 金属有机骨架;酶固定化;配体垂钓;酶抑制剂;中医药(TCM);研究进展

[中图分类号] R22;R28;R943;G254 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2024)07-0256-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20240262

[网络出版地址] https://link.cnki.net/urlid/11.3495.R.20231010.1048.002

[网络出版日期] 2023-10-11 13:56:17

Metal-organic Framework Immobilized Enzyme and Its Application in Screening of Enzyme Inhibitors of Traditional Chinese Medicine: A Review

LIU Haipeng¹, ZHANG Yong², WANG Jing¹, LYU Tianci¹, DING Ruixin², GAO Guihua^{1,2*}
(1. School of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China;
2. School of Pharmacy, Jining Medical University, Rizhao 276826, China)

[Abstract] Enzymes are widely used in chemical and pharmaceutical industries because of their advantages of high efficiency and specificity. However, the shortcomings of the free enzymes, such as poor stability and difficulty in recycling, limit their application. Therefore, the immobilization and application of enzymes have become one of the research hotspots. The selection of the immobilization carriers is a critical step in the process of enzyme immobilization. Metal-organic frameworks (MOFs), a kind of porous materials, are formed by the coordination of metal ions or metal clusters with organic ligands. As an emerging immobilization carrier, its advantages such as high porosity, strong stability, and surface modifiability make it ideal for immobilized enzyme carriers. By immobilizing the free enzyme on MOFs, the above mentioned deficiencies of

[[]收稿日期] 2023-07-31

[[]基金项目] 国家自然科学基金项目(82003706);山东省中医药科技项目(M-2023193);日照市自然科学基金项目(RZ2021ZR18)

[[]第一作者] 刘海鹏,在读硕士,从事药物分析新技术新方法研究,E-mail;liuhaipeng1005@163.com

[[]通信作者] * 高桂花,博士,副教授,从事药物分析新技术新方法研究,Tel:0633-2983690,E-mail:guihua526@163.com

the free enzymes can be effectively solved, which greatly broaden the applicable condition. Ligand fishing is a method to find receptor-specific ligands from complex components, which has the advantages of high efficiency, simple sample pretreatment and high specificity. The MOF-enzyme complex formed by enzyme immobilization can act as a "fishing rod" for ligand fishing, which can screen out the targets from the complex system of components. The complex chemical composition and various active ingredients of traditional Chinese medicine(TCM) make the ligand fishing technology to play a big role in the screening of enzyme inhibitors from TCM. And the screened enzyme inhibitors are expected to be further developed into the lead compounds with good efficacy and low adverse effects, so the immobilized enzymes of MOFs have a wide application in the screening of active ingredients from TCM. Based on this, this paper summarized the methods of immobilized enzymes of MOFs in recent years, analyzed the characteristics, advantages and disadvantages of each method, and summarized the laws of preparation conditions and mechanisms. Meanwhile, the application and future development of immobilized enzymes of MOFs in the field of enzyme inhibitor screening from TCM were also summarized and prospected, with a view to providing a reference for the development of natural ingredients and the modernization of TCM.

[Keywords] metal-organic framework; enzyme immobilization; ligand fishing; enzyme inhibitor; traditional Chinese medicine(TCM); research progress

中药因其良好的疗效、广泛的应用、较低的不 良反应,越来越受到全世界的关注[1-2],而从中药的 复杂化学组成中筛选出其发挥疗效的活性物质显 得尤为关键[3]。传统的中药筛选存在过程冗杂,方 法繁琐,耗时长、易出现假阳性结果、易受干扰及微 量活性成分检测丢失等问题[4]。配体垂钓技术是依 托分子间的亲和作用,筛选出相互作用的配体与受 体,再联用现代仪器分析手段,最终获得活性成分 的方法[5],适用于从中药的多组分体系中筛选出潜 在的药效活性成分。配体垂钓技术中配体与受体 的结合尤为关键,受体常常是一些酶、信号分子等, 其中酶作为一种具有专一性、高效性的高分子物 质,在温和的条件下即可发生化学反应,具有良好 的催化作用,在食品、化工、医药等领域具有广阔的 应用前景[6]。游离酶的稳定性差、难以回收,一般通 过将酶进行固定的方式解决这些问题,目前用于中 药筛选的固定化载体主要包括有机载体如壳聚糖[7] 和酶微柱[8]等,以及无机载体如二氧化硅[9]、石英毛 细管[10]和硅酸铝纳米管[11]等两大类,但普遍存在着 酶负载量低、固定后酶催化活性不高、酶的三维构 象易改变等问题。

随着磁性微球、纳米颗粒、石墨烯等新型材料的不断涌现,用于酶固定化的载体有了更多的选择。其中,金属有机骨架(MOFs)是由金属离子或金属簇与有机配体配位而成的一种多孔结晶材料,凭借其大的比表面积、高孔隙率、可重复利用和多活性位点等优点,成为固定化酶的理想载体,已被

证明可以提高酶包括催化活性、热稳定性、pH稳定性、有机溶剂稳定性、可回收性等在内的多种性能^[12]。形成的MOF-酶复合物可以进一步通过配体垂钓的方式达到中药活性组分快速筛分的目的,进而更好地阐明中药的药效物质基础。目前已有多名专家及课题组致力于MOFs固定化酶及中药活性组分筛选的研究,并已取得了相当的研究成果。本文综述了MOFs用于酶固定化的方法及MOF-酶复合物在中药酶抑制剂筛选中的应用,以期为中药物质基础研究和中药现代化的发展提供相关参考。

1 MOFs 固定化酶的制备方法

1.1 表面固定 主要包括物理吸附和共价交联 2种方法。物理吸附法是酶固定化策略中最常见也 是最简单的方法。其主要是通过氢键、范德华力、 静电或疏水作用及 π-π键等弱相互作用力将酶固定 在 MOFs 材料上[13]。而共价交联则是通过各种化学 键将酶与MOFs连接起来的方法[14]。表面固定作为 一种后合成策略,通常在比较温和的条件下完成固 定,避免了MOFs合成时恶劣的反应条件对酶活性 的影响,可以使酶的天然构象得以最大程度保留。 另外,表面固定主要取决于MOFs表面的化学性质, 对 MOFs 与酶的尺寸兼容性没有太大的限制,因此, 可以用来固定酶的 MOFs 比较多, 且大尺寸酶也可 用此方法进行固定。同时,由于表面固定采用的是 一些弱相互作用力和表面化学键,缺点也显而易 见。首先,该方法对酶的保护作用弱,使其应用受 限,难以在一些高温、强酸碱的环境下发挥作用; 其次,固定化酶稳定性较弱,在多次使用后容易发生酶的脱落与浸出,存在酶的回收问题及使用次数的限制。

1.1.1 物理吸附法 MOFs与酶之间的弱相互作用 力是物理吸附法固定的关键。WANG等[15]通过 π-π 堆叠的相互作用将酪氨酸酶吸附固定在 Cu-MOF上,大大提高了双酚A与酪氨酸酶反应的 有效浓度,可用于灵敏和快速检测塑料制品中的双 酚 A。TAN等[16]通过静电相互作用将葡萄糖氧化 酶(GOx)固定在PCN-222上,合成的MOF-酶复合 物表现出优异的热稳定性和催化活性。MOFs还可 以通过氢键和静电作用力提供大量的吸附位点,JIA 等[17]基于此作用力在合成的 meso-MIL-53 骨架上物 理固定漆酶,用于抗菌物质三氯生的催化降解。另 外, MOFs 与酶之间的疏水相互作用也被认为对酶 的物理吸附有一定影响, WANG等[18]通过配体交换 法,使MOFs在拥有最佳的疏水性后借助库仑力成 功吸附脂肪酶 B(CALB),得到的 MOF-酶复合物在 催化方面表现出优越的性能。

1.1.2 共价交联法 与物理吸附的弱作用力相比, 通过化学键连接的共价交联法则使 MOFs 与酶的结 合更为牢固,但需要注意所用的有机溶剂对酶的毒 性。碳二亚胺偶联法作为一种常用的共价连接的 方法,其原理是当MOFs上的羧基被激活剂如1-乙 基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺(EDC)激活后,生 成的活性中间体会进一步被蛋白质表面的氨基亲 核取代,伯胺与原来的羧基生成酰胺键从而完成酶 的固定。JUNG等[19]运用此方法,以N,N-二乙基甲 酰胺(DEF)为原料,用硝酸铟与1,4-苯二乙酸制备 了一种新型铟(Ⅲ)基一维配位聚合物,并偶联了表 皮生长因子(EGFP)和CALB。另一种共价交联法 是通过戊二醛等交联剂共价交联 MOFs 和酶表面的 氨基或羟基,生成酰胺键来实现酶的固定化。这种 方法通常需要对MOFs表面进行功能化修饰。 LONG等[20]对合成的双金属CoCu-MOF进行表面 氨基硅烷化修饰后,通过戊二醛将漆酶共价交联到 了材料表面,用于刚果红的降解。另外,Click反应 也可以用于生物大分子在MOFs表面的固定,可以 将生物分子上的二苯基环辛烯(DBCO)或炔基与 MOFs表面的叠氮化物功能基团连接起来。DBCO 和炔基均可以通过半胱氨酸残基与马来酰亚胺反 应引入,而MOFs表面叠氮化物功能基团可以通过 合成后修饰来实现。MORRIS等[21]利用附加 DBCO 的 DNA 和叠氮化的 MOFs 之间发生 Click 反应,制 备了第一个 MOFs 纳米颗粒-核酸偶联物。除此之外,生物分子还可以通过表面暴露的半胱氨酸残基共价锚定在 MOFs 表面。该方法首先通过预处理使蛋白质的硫醇基团暴露出来,再将其与酰亚胺作用形成稳定碳-硫键,最终完成生物大分子固定^[22]。

1.2 合成后渗透 MOFs以其丰富的多孔结构,为固定化酶提供了一种优异的后合成策略,这种策略可以使酶通过扩散作用渗透进入到孔隙之中,从而固定在MOFs之中。与表面固定相比,酶是被物理吸附到MOFs内部的孔隙,而不是在表面,因此固定化酶具有更高的稳定性与更低的浸出率。另外,MOFs的合成大多要求严苛的温度和有机试剂,而孔隙渗入作为一种后合成的固定策略,在合成后以温和的条件固定,对酶的活性影响小,并且可以避免酶的表面聚集与拥挤,实现酶的高负载率。

但是孔隙渗入策略对 MOFs 和固定酶的尺寸有一定的限制,大多数 MOFs 的孔径都在 2 nm 以下,使得大多数酶难以渗入,严重阻碍了这种策略的应用。随着纳米技术的不断发展,介孔(2~50 nm)和大孔(>50 nm)MOFs 的出现使得这种策略的适用性更加广泛^[23]。PISKLAK等^[24]成功将微过氧化物酶-11(MP-11)固定在杂化周期性介孔有机二氧化硅材料和三维金属有机骨架中。FENG等^[25]开发了一系列稳定的 MOFs,并设计了超大介孔笼作为酶包封的单分子陷阱(SMTs),分别尝试封装了辣根过氧化物酶(HRP)、细胞色素 C(Cyt C)和 MP-11 这3种酶,结果显示,固定化酶较之游离酶具有更高的催化活性和更好的催化性能,且在催化和再循环过程中几乎不发生浸出,并能够保持其催化活性。

为了调整孔隙渗入过程中MOFs与酶尺寸的兼容性,许多学者将目光放在了改变MOFs的孔隙度上,并建立了许多新颖的方法。一种简单的方法是通过延长有机配体,使MOFs孔径增大。DENG等^[26]成功将MOF-74扩展成一系列孔径不等的等孔结构,扩大了原来的MOFs孔隙。但这种方法只能应用到有限的MOFs中,对于大多数的MOFs,由长配体形成的孔道极易坍塌。CAO等^[27]在温和的条件下,采用无模板策略,将纳米级微孔Cu-BTC颗粒填充形成介孔,制备出具有分层多孔结构的MOFs材料,并将脂肪酶固定在MOFs上,经过10次循环后,固定化的脂肪酶仍然保持稳定。YUE等^[28]也采用了无模板策略合成了一种微孔-介孔MOFs,通过使用不同的合成溶剂在不同的反应时间蚀刻孔壁,改变MOFs的孔隙率,并采用这种策略制备出孔隙

超过15 nm的介孔稳定骨架。除此之外,还有一种 模板导向的合成策略,可以将微孔 MOFs 转为介孔 结构,其产生的孔通常是由互生的MOFs多晶组装 而成。LIU等[29]利用十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB)作为结构导向模板试剂合成了微/介分层的 ZIF-8颗粒,对牛血清白蛋白(BSA)、牛血红蛋白 (BHb)和溶菌酶(LZM)具有优越的吸附能力。LIN 等[30]通过调制器诱导缺陷形成的方法制备了一种 磁性分层多孔 MOFs, 所得到的材料具有明确的核-壳结构、明显的微/介分层和强磁响应性,将酰胺酶 固定在这种高负载的多功能磁性载体中,使得洗涤 和回收更为简便。另外,有些学者则从酶的尺寸入 手,致力于改变酶的渗透性,如通过将CytC的蛋白 质结构部分展开,使其构象发生变化,可降低蛋白 质的整体尺寸,成功将其易位转运进入到 Tb-meso MOFs 中[31]。 NAVARRO-SÁNCHEZ 等[32] 在此基础 上将这种蛋白质易位机制扩展到了生物活性酶,利 用温和加热和非极性培养基成功诱导介孔 MIL-101 (A1)-NH,中天冬氨酸蛋白酶的易位。

1.3 原位合成 原位合成是酶固定化的一种有效的方法,主要包括仿生矿化、共沉淀和机械包埋等方法。这些方法通过将 MOFs 前体(金属和有机配体)与酶混合,在 MOFs 合成、生长的过程中,同步完成酶的包封。作为一种从头合成的封装策略,原位合成法具有很多优势,一是组装形成的 MOF-壳状结构对包覆的酶起到了很好的保护作用,使其能够在恶劣的外部环境下保持较高的催化活性和较强的稳定性;二是对包封酶的尺寸没有限制,大量的酶可以通过此方法来实现固定。而其缺点在于因为 MOFs 的合成与酶的包封是同时发生,这使得酶发挥催化作用的结构易被破坏。这就要求 MOFs 的合成条件要尽可能温和,以保留酶的活性构象。

1.3.1 仿生矿化法 生物矿化是在温和的条件下,在有机分子或生物分子的控制下合成无机矿物的方法^[33]。仿生矿化则是受此启发产生的一种策略,其作用机制是利用无机与有机金属界面之间的强相互作用,在一定条件下,蛋白质、酶等通过浓缩框架构建和促进生物大分子周围的结晶,迅速诱导金属骨架外壳的形成,从而将酶固定在 MOFs 之中。LIANG等^[34]首先通过仿生矿化对酶进行固定,通过乙酸锌与 2-甲基咪唑配位形成的 ZIF-8 咪唑骨架,成功封装了 BSA。进一步的研究结果表明,蛋白质的表面电荷是 MOFs 生长能力的一个关键因素,表面负电荷的增加可以促进仿生矿化,而正电荷的蛋

白质增多时,这一过程将受到阻碍[35]。

1.3.2 共沉淀法 共沉淀是酶原位合成的另一种方法,与仿生矿化不同的是,共沉淀法是将酶沉淀到 MOFs不断生长的表面,而酶并不参与 MOFs 的成核过程。HOU等[36]将 HRP等几种不同类型的酶通过共沉淀法固定到 MOFs上,制备了酶@MOF复合材料。通过热重法测得其载酶量约为 5%~10%。LYU等[37]采用共沉淀法将 Cyt C固定到 ZIF-8中,且嵌入的 Cyt C 活性比游离的 Cyt C 的活性提高了10倍,大大提高了游离酶的催化活性。

1.3.3 机械封装法 机械封装作为一种固相机械 化学策略,其优势在于合成过程中有机溶剂用量极低,从而能够保持酶的生物活性。WEI等[38]采用机械封装方法将β-葡萄糖苷酶、转化酶、β-半乳糖苷酶和过氧化氢酶等通过球磨工艺封装到 ZIF-8、UiO-66-NH₂和 Zn-MOF-74中,包封酶的活性大大提高,即使在酸性条件下,也能一定程度上抵抗蛋白酶的分解。MOFs材料固定化酶的制备方法见表 1。

综上所述,基于MOFs的酶固定化可根据各制 备方法的特点进行选择。物理吸附作为最简便的 方法,固定条件温和,酶的活性较高,但表面的弱相 互作用力使得酶易脱落;共价交联则常是通过使用 各类交联剂如戊二醛、EDC来生成各种共价键如酰 胺键、二硫键等实现酶与MOFs的偶联,在这种方法 中, 酶在复合物的最外层, 具有不错的酶负载量及 酶活性。合成后渗透对尺寸有一定的要求,酶与 MOFs 孔径的尺寸越契合,越有利于酶扩散进入 MOFs内部,越能增大MOFs内部的相互作用力,减 少酶的渗出,并且能够最大程度保留酶的空间结 构。同时,MOFs上未被酶填充的孔隙,可以允许底 物分子进入与酶发生反应。另外,一系列孔径的 MOFs 如 300~10 000 nm 的 NU-1003、PCN-333 等都 可作为优良的载体 MOFs,或是通过延长有机配体、 刻蚀、模板法、蛋白展开或易位转运等方法将尺寸 不合适的酶与MOFs固定到一起也是不错的选择。 对于仿生矿化而言,研究最多的MOFs是ZIF-8,表 面化学性质是影响矿化反应速率的重要因素,表面 正电荷化更有利于快速诱导沉淀形成,具有较低等 电点的蛋白质在碱性反应条件下更容易去质子化 形成沉淀[35]。共沉淀法采用一步封装得到的复合 物尺寸均匀,且与原MOFs的结构和晶型更为相似, 同时MOFs的刚性结构能大大提高内嵌酶的结构稳 定性,使酶能够在极端的环境下发挥作用。

在对酶的固定过程中为了保持酶的活性,选取

表 1 MOFs 材料固定化酶的制备方法

Table 1 Preparation methods of enzyme immobilization on MOFs

酶	MOF	固定方法	反应条件	交联剂	酶负载量	酶活力	参考文献
纤维素酶	UiO-66-NH ₂	物理吸附	醋 酸 缓 冲 液 (pH 4.8, 50 mmol·L ⁻¹)	-	350 mg·g ⁻¹	90%	[39]
漆酶	meso-MIL-53(A1)	物理吸附	150 r·min ⁻¹ ,30 ℃摇匀固定 50 h	-	218 mg·g ⁻¹	93.8%	[17]
重组Ⅲ类多聚 磷酸激酶 2	MIL-101-NH ₂	物理吸附	pH 9.0,4 ℃下搅拌 1 h	-	0.122 g•g ⁻¹	-	[40]
碳酸酐酶	MIL-160 ZIF-8	物理吸附	Tris(pH 7.5),200 r·min ⁻¹ 振 荡培养 2 h	-	0.035,0.054 mg·g ⁻¹	72%、36%	[41]
脂肪酶	${\rm UiO\text{-}66\text{-}NH}_2$	共价交联	PBS(pH 7.5,50 mmol·L ⁻¹)、 4℃下沉淀,搅拌交联 2 h	戊二醛	98.31 mg·g ⁻¹	104.4%	[42]
α-葡萄糖苷酶 (GAA)	ZIF-67	共价交联	APTES 氨基化 MOF, 220 r·min ⁻¹ 振摇8h	戊二醛	79.07 μg·g ⁻¹	-	[43]
CALB	1D-MOF	共价交联	水介质	EDC	0.12 mg·g ⁻¹	15 μmol·min ⁻¹ ·mg ⁻¹	[19]
超氧化物歧化 酶、过氧化氢酶	PCN-333	合成后渗透	去离子水,涡旋20 min	-	0.80 \ 1.26 g·g ⁻¹	与游离酶相当	[44]
有机磷酸酐酶	NU-1003	合成后渗透	三氟乙酸,BTP缓冲溶液(pH7.2),悬浮72 h	-	0.12~0.20 g·g·¹	接近游离酶	[45]
甲酸脱氢酶	NU-1006	合成后渗透	Tris(pH 7.5,500 mmol·L ⁻¹), 室温浸泡4h	-	-	约为游离酶的3 倍	[46]
脂肪酶	ZIF-8	仿生矿化	氨基酸修饰,200 r·min ⁻¹ ,室 温搅拌45 min	-	固定化产率99%	135%	[47]
HRP	ZIF-8	仿生矿化	30 ℃,水浴放置 16 h	EDC/N-羟基 琥珀酰亚胺	11.6%	催化活性提高了 5.6倍	[48]
血红蛋白、肌 红蛋白	ZIF-8	仿生矿化	琥珀酸或乙酸酐修饰,PBS (pH 7.4,100 mmol·L ⁻¹)	EDC/HCl,乙 二胺	-	-	[35]
HRP	ZIF-8	共沉淀	去 离 子 水 , 室 温 , 500 r·min ⁻¹ ,搅拌30 min	-	5%~10%	-	[36]
Cyt C	ZIF-8	共沉淀	甲醇,混合反应	聚乙烯吡咯 烷酮	10%	比游离酶增加了 10倍	[37]

适宜酶生存环境的缓冲环境是必要的。同时酶与 MOFs之间的浓度对酶的活性也有很大影响,浓度 过高会导致大的空间位阻,不利于酶发挥催化作 用:浓度过低则会影响固定效率与负载量。因此, 选定合适的酶与金属离子的浓度是固定化不可忽 视的重要问题。目前,有多种方法可对固定化酶进 行表征。酶的负载量可以通过热重分析法、蛋白定 量法(BCA)及Bradford法等进行计算。BCA和 Bradford 法是通过测定固定前后蛋白-试剂络合物 吸光度的变化来计算负载量,但这种方法在金属离 子影响吸光度时则不适用。热重分析法则适用于 绝大多数 MOFs 的固定化酶,是利用高温加热时酶 与MOFs的分解温度不同从而产生的重量变化来计 算固定的酶量。酶的活性则可以采用滴定法、光度 法、异硫氰酸荧光素(FTIC)标记法等进行测定,其 中光度法和FTIC标记法以其简便精确更受青睐。

2 MOFs 固定化酶在中药酶抑制剂筛选中的应用

随着中药国际化与现代化的不断发展,阐明中药的药效基础与作用机制也越发重要^[49]。其中微量组分不易分离与识别的问题亟待解决,而基于MOFs固定化酶的配体垂钓策略很好的解决了这个难题,目前已被成功应用于多种中药酶抑制剂类活性成分的筛选。

2.1 脂肪酶抑制剂的筛选 胰脂肪酶是人体的一种消化酶,在十二指肠中可以分解食物中的脂肪,进而转化成人体的脂肪,因此,抑制胰脂肪酶的活性通常被认为是治疗肥胖的关键^[50]。CHEN等^[42]采用戊二醛共价交联法将脂肪酶固定到UiO-66-NH₂上,得到的复合物拥有令人满意的负载能力(98.31 mg·g⁻¹)和相对高的活性回收率(104.4%)。该团队首次将该MOF-酶复合物用于从夏枯草中筛

选活性组分,结果在夏枯草中共筛选到13个活性物质,并采用高效液相色谱-四级杆-飞行时间串联质谱法(HPLC-Q-TOF-MS/MS)识别出其中的12个物质。此外,他们还通过活性测定和分子对接验证了这些配体物质的脂肪酶抑制活性。受此启发,XU等^[51]将脂肪酶共价固定在UiO-66-NH₂上,并引入了Fe₃O₄,制备了具有超顺磁性的磁性纳米复合物,并将其用于筛选黄芩中的脂肪酶抑制剂,垂钓出7种特异性配体,并通过质谱分析鉴定。此外,添加磁性材料后的复合物固液分离更快速,回收更方便。

2.2 GAA抑制剂的筛选 GAA抑制剂是治疗二型糖尿病的有效药物,对酶的抑制作用延缓了碳水化合物的吸收,从而起到降低血糖的作用[52]。CHEN等[53]关注到中药芍药种子的 GAA抑制活性,他们使用共价交联法将 GAA固定在 UiO-66-NH₂上,并在对芍药活性成分配体垂钓的过程中引入 GAA竞争性抑制剂作为指标,从而获得比指示剂活性更高的抑制剂,使垂钓更为高效。包含蛇葡萄素在内的9种有效的化合物被特异性捕获,并表现出较强的体外抑制活性。WU等[43]制备了磁性纳米材料Fe₃O₄@ZIF-67,并以其作为载体固定 GAA。该团队采用了在线配体垂钓技术,连续的分离、洗脱和分析过程,大大节省了时间并简化了程序,从新茶提取物中垂钓得到的儿茶素等3种抑制剂均具有较强

的GAA抑制活性。

2.3 α -淀粉酶抑制剂的筛选 α -淀粉酶能将淀粉转化为糖类,通过抑制 α -淀粉酶的活性来减少糖类的形成也是一种控制血糖浓度的有效手段[54]。张勇等[55]通过共价交联将 α -淀粉酶固定在MIL-53(A1)-NH₂的表面,通过响应面法对反应条件进行优化,得到的复合物的酶负载量为289 mg·g⁻¹,酶活力为游离酶的76%。使用该MOF-酶复合物成功从葛根提取物中垂钓出多种 α -淀粉酶的活性抑制配体,并识别出了其中11种特异性结合的物质,通过分子对接研究了配体与酶的结合情况,这项研究提供了一个从中药中高效简便筛选 α -淀粉酶抑制剂的方法,为传统中药的开发利用提供了理论支持。

2.4 血管紧张素转化酶抑制剂的筛选 高血压作为一种常见的慢性病,是多种心血管疾病的重要诱因 [56]。血管紧张素转化酶可将血管紧张素 I 水解转化为能强烈收缩血管的血管紧张素 II,使血压升高 [57],血管紧张素转化酶抑制剂可以抑制该酶的活性,可用于预防和控制高血压 [58]。FENG等 [59]通过一锅合成法制备了磁性 MOFs 材料 Fe₃O₄@ZIF-90,将猪肺中提取的血管紧张素转化酶吸附交联到该磁性 MOF 材料上,用于筛选裙带菜中的血管紧张素转化酶抑制剂,得到了新的抑制肽 KNFL。固定 化酶 配体 垂 钓 在 中 药 组 分 筛 选 中 的 应 用 见表 2。

表 2 固定化酶配体垂钓在中药组分筛选中的应用

Table 2 Application of immobilized enzyme ligand fishing in screening components from traditional Chinese medicine

MOF材料	固定酶	来源	垂钓出的活性组分	参考文献
UiO-66-NH ₂	脂肪酶	夏枯草	3,4-二羟基苯甲醛、咖啡酸、芦丁、槲皮素 3-O-洋槐糖苷、槲皮素-3-葡萄糖醛酸苷、槲皮素-3-O-半乳糖苷-7-O-葡糖苷、迷迭香酸、迷迭香酸甲酯、2α,3α,24-三羟基齐墩果烷-12-烯-28-酸、科罗索酸、齐墩果酸、熊果酸	
UiO-66-NH ₂	脂肪酶	黄芩	2',3,5,6',7-五羟基黄酮、高黄芩素、黄芩苷、千层纸素 A-7- O -葡萄糖醛酸苷、汉黄芩苷、黄芩黄酮 II 、汉黄芩素、千层纸素 A	[51]
UiO-66-NH ₂	GAA	芍药	三聚苗 A、三聚苗 B、白藜芦醇、vitisin E、木犀草素、蛇葡萄素 E	[53]
Fe ₃ O ₄ @ZIF-67	GAA	信阳毛尖茶	儿茶素、表没食子儿茶素没食子酸酯、表儿茶素没食子酸酯	[43]
MIL-53(A1)-NH ₂	α-淀粉酶	葛根	3′-羟基葛根素、葛根素、3′-甲氧基葛根素、葛根素芹菜糖苷、大豆苷、染料木苷、黄豆黄素、4′-O-甲基葛根素、芒柄花苷、齐墩果酸、大豆素	[55]
$Fe_3O_4@ZIF-90$	血管紧张素转化酶	裙带菜	5个组分,并发现了新抑制肽 KNFL	[59]

3 总结与展望

MOFs以其高比表面积、丰富的孔隙结构、刚性骨架和酸碱稳定性等优点^[60],成为酶固定化的优良载体,极大提高了酶的应用性和稳定性。本文综述了表面固定、合成后渗透和原位合成3种主要的酶固定化方法。表面固定作为最简单的固定方法,常

作为固定化酶的首选,如何改善浸出率,提高重复利用性是关键问题。合成后渗透作为一种后合成策略,大大提高了固定酶的牢固程度,减少了酶的脱落与渗出。MOFs的壳状结构使固定的酶对酸碱、苛刻环境的耐受程度更高,且MOFs内部的分层孔径既能固定又可以使底物进入其中与酶发生反

应。然而,由于酶的尺寸往往要大于MOFs材料的孔径,这使得酶难以进入MOFs的孔隙之中,因此解决二者的尺寸兼容性是该方法的主要难点,即既要保证酶的进入,还要保证酶与底物接触发挥作用。原位合成对二者的尺寸没有要求,结合的牢固程度最高,但是要求MOFs合成条件温和,否则极易造成酶的构象被破坏。3种方法各有优缺点,在方法选取上可根据实验的需要进行调整。

目前,MOFs固定化酶在催化^[61]、传感器^[62]、和 靶向治疗[63]等方面应用较多,在中药活性成分筛选 方面报道尚少。中药作为中国传统药物,历史悠 久,活性成分是其发挥药效的基础。然而,传统的 中药分离手段过程冗杂、特异性差,难以找到浓度 小的目标物。配体垂钓通过靶标与配体的特异性 结合,能精准"钓"出目标活性成分,达到筛分快速、 操作简便的目的。MOF-酶复合物因其更优异的比 表面积与生物相容性及酶负载量高、酶催化活性 强[64-66]等优点,在配体垂钓中展现出明显的优势,因 此,采用MOFs固定化酶进行配体垂钓来筛选中药 活性组分不失为一种高效简便的方法。受制于 MOFs 固定化酶技术,目前国内外相关的文献较少, 但随着研究的不断深入,包括界面结合的相互作用 情况、酶在MOFs内部的空间构象变化、新的表征酶 活与酶载量的方法等, MOF-酶复合物作为"钓竿" 的优势会越来越显著。另外,文献报道的用于中药 筛选的 MOFs 固定化酶方法,以表面固定的共价交 联为主,而微介孔的合成后渗透的酶固定化方法也 将在中药活性物质的配体垂钓中展现巨大的潜力。 总之,中药不良反应小、种类众多,筛选出的活性组 分有望成为研究替代不良反应大的药物的先导化 合物,同时基于MOFs的中药配体垂钓能够阐明复 方及复杂靶点药物的物质基础,进而明确其不良反 应,对推动中药现代化意义深远。

[参考文献]

- [1] GAO H, WANG Z, LI Y, et al. Overview of the quality standard research of traditional Chinese medicine [J]. Front Med, 2011, 5(2): 195-202.
- [2] GAO X, YANG X W, MARRIOTT P J. Evaluation of Coptidis Rhizoma-Euodiae Fructus couple and Zuojin products based on HPLC fingerprint chromatogram and simultaneous determination of main bioactive constituents [J]. Pharm Biol, 2013, 51(11):1384-1392.
- [3] 王常瞵,高鹏,姜晶晶,等.中药黄芩指纹图谱研究进展[J].辽宁中医药大学学报,2020,22(4):82-86.

- [4] 邬思琪,杨华,李萍.亲和超滤结合液质技术在中药 有效成分发现中的应用[J]. 药学学报,2016,51(7): 1060-1067.
- [5] 孔伟浩,徐依桐,徐达峰,等. 靶向垂钓技术在中药活性成分筛选中的研究进展[J]. 中国现代应用药学, 2021,38(18):2288-2295.
- [6] 冯小倩,徐晴,张立慧,等.金属有机框架材料固定化酶的研究进展[J].生物加工过程,2022,20(5):490-499.
- [7] RIBEIRO E S, DE FARIAS B S, SANT'ANNA CADAVAL JUNIOR T R, et al. Chitosan-based nanofibers for enzyme immobilization [J]. Int J Biol Macromol, 2021, 183:1959-1970.
- [8] PENG M J, SHI S Y, CHEN L, et al. Online coupling solid-phase ligand-fishing with high-performance liquid chromatography-diode array detector-tandem mass spectrometry for rapid screening and identification of xanthine oxidase inhibitors in natural products [J]. Anal Bioanal Chem, 2016, 408(24):6693-6701.
- [9] HOU X, LOU X, GUO Q, et al. Development of an immobilized liposome chromatography method for screening and characterizing α -glucosidase-binding compounds [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2020, 1148:122097.
- [10] ZHAO H, CHEN Z. Screening of neuraminidase inhibitors from traditional Chinese medicines by integrating capillary electrophoresis with immobilized enzyme microreactor[J]. J Chromatogr A, 2014, 1340: 139-145.
- [11] WANG H, ZHAO X, WANG S, et al. Fabrication of enzyme-immobilized halloysite nanotubes for affinity enrichment of lipase inhibitors from complex mixtures [J]. J Chromatogr A, 2015, 1392:20-27.
- [12] SHER H, ALI H, RASHID M H, et al. Enzyme immobilization on metal-organic framework (MOF): Effects on thermostability and function [J]. Protein Pept Lett, 2019, 26(9):636-647.
- [13] PATIDAR M K, NIGHOJKAR S, KUMAR A, et al. Pectinolytic enzymes-solid state fermentation, assay methods and applications in fruit juice industries: A review[J]. 3 Biotech, 2018, 8(4): 199.
- [14] LIANG W, WIED P, CARRARO F, et al. Metalorganic framework-based enzyme biocomposites [J]. Chem Rev, 2021, 121(3):1077-1129.
- [15] WANG X, LU X, WU L, et al. 3D metal-organic framework as highly efficient biosensing platform for ultrasensitive and rapid detection of bisphenol A [J]. Biosens Bioelectron, 2015, 65: 295-301.
- [16] TAN W, WEIT, HUO J, et al. Electrostatic interactioninduced formation of enzyme-on-MOF as chemo-

biocatalyst for cascade reaction with unexpectedly acidstable catalytic performance [J]. ACS Appl Mater imidazolate framework (ZIF-8) [J]. Dalton Trans,

2017,46(7):2114-2121.

[17] JIA Y, CHEN Y, LUO J, et al. Immobilization of laccase onto meso-MIL-53(Al)via physical adsorption for the catalytic conversion of triclosan[J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2019, 184:109670.

Interfaces, 2019, 11(40): 36782-36788.

- [18] WANG Y, ZHANG N, ZHANG E, et al.

 Heterogeneous metal-organic-framework-based biohybrid catalysts for cascade reactions in organic solvent[J]. Chemistry, 2019, 25(7):1716-1721.
- [19] JUNG S, KIM Y, KIM S J, et al. Bio-functionalization of metal-organic frameworks by covalent protein conjugation [J]. Chem Commun (Camb), 2011, 47 (10):2904-2906.
- [20] LONG H, LI X, LIU X, et al. Immobilization of laccase by alkali-etched bimetallic CoCu-MOF to enhance enzyme loading and congo red degradation [J]. Langmuir, 2023, 39(24):8404-8413.
- [21] MORRIS W, BRILEY W E, AUYEUNG E, et al.

 Nucleic acid-metal organic framework (MOF)

 nanoparticle conjugates[J]. J Am Chem Soc, 2014, 136

 (20):7261-7264.
- [22] YANG Y, CHEN Q, WU JP, et al. Reduction-responsive codelivery system based on a metal-organic framework for eliciting potent cellular immune response [J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2018, 10(15): 12463-12473.
- [23] YE N, KOU X, SHEN J, et al. Metal-organic frameworks:

 A new platform for enzyme immobilization [J].

 Chembiochem, 2020, 21(18): 2585-2590.
- [24] PISKLAK J T, MACIAS M, COUTINHO H D, et al. Hybrid materials for immobilization of MP-11 catalyst [J]. Top Catal, 2006, 38(4): 269-278.
- [25] FENG D, LIU T F, SU J, et al. Stable metal-organic frameworks containing single-molecule traps for enzyme encapsulation [J]. Nat Commun, 2015, 6:5979.
- [26] DENG H, GRUNDER S, CORDOVA K E, et al. Large-pore apertures in a series of metal-organic frameworks [J]. Science, 2012, 336(6084): 1018-1023.
- [27] CAO Y, WU Z, WANG T, et al. Immobilization of Bacillus subtilis lipase on a Cu-BTC based hierarchically porous metal-organic framework material: A biocatalyst for esterification [J]. Dalton Trans, 2016, 45(16):6998-7003.
- [28] YUE Y, QIAO Z A, FULVIO P F, et al. Template-free synthesis of hierarchical porous metal-organic frameworks [J]. J Am Chem Soc, 2013, 135(26):9572-9575.
- [29] LIU G, XU Y, HAN Y, et al. Immobilization of

- [30] LIN C, XU K, ZHENG R, et al. Immobilization of amidase into a magnetic hierarchically porous metalorganic framework for efficient biocatalysis [J]. Chem Commun (Camb), 2019, 55(40):5697-5700.
- [31] CHEN Y, LYKOURINOU V, VETROMILE C, et al. How can proteins enter the interior of a MOF? Investigation of cytochrome C translocation into a MOF consisting of mesoporous cages with microporous windows[J]. J Am Chem Soc, 2012, 134(32):13188-13191.
- [32] NAVARRO-SÁNCHEZ J, ALMORA-BARRIOS N, LERMA-BERLANGA B, et al. Translocation of enzymes into a mesoporous MOF for enhanced catalytic activity under extreme conditions [J]. Chem Sci, 2019, 10(14):4082-4088.
- [33] 李涵,姚奇志,周根陶. 纳米尺度下的生物矿物和生物矿化:基于介晶的视角[J]. 地球科学,2018,43 (5):1425-1438.
- [34] LIANG K, RICCO R, DOHERTY C M, et al.

 Biomimetic mineralization of metal-organic frameworks as protective coatings for biomacromolecules[J]. Nat Commun, 2015, 6:7240.
- [35] MADDIGAN N K, TARZIA A, HUANG D M, et al. Protein surface functionalisation as a general strategy for facilitating biomimetic mineralisation of ZIF-8[J]. Chem Sci, 2018, 9(18):4217-4223.
- [36] HOU M, GE J. Armoring enzymes by metal-organic frameworks by the coprecipitation method [J]. Methods Enzymol, 2017, 590: 59-75.
- [37] LYU F, ZHANG Y, ZARE R N, et al. One-pot synthesis of protein-embedded metal-organic frameworks with enhanced biological activities [J]. Nano Lett, 2014, 14(10):5761-5765.
- [38] WEI T H, WU S H, HUANG Y D, et al. Rapid mechanochemical encapsulation of biocatalysts into robust metal-organic frameworks [J]. Nat Commun, 2019,10(1):5002.
- [39] AHMED I N, YANG X L, DUBALE A A, et al. Hydrolysis of cellulose using cellulase physically immobilized on highly stable zirconium based metal-organic frameworks [J]. Bioresour Technol, 2018, 270: 377-382.
- [40] NIU H, DING M, SUN X, et al. Immobilization of a polyphosphate kinase 2 by coordinative self-assembly of his-tagged units with metal-organic frameworks and its application in ATP regeneration from AMP [J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2019, 181:261-269.

- [41] LIU Q, CHAPMAN J, HUANG A, et al. User-tailored metal-organic frameworks as supports for carbonic anhydrase [J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2018, 10 (48):41326-41337.
- [42] CHEN X, XUE S, LIN Y, et al. Immobilization of porcine pancreatic lipase onto a metal-organic framework, PPL@MOF: A new platform for efficient ligand discovery from natural herbs [J]. Anal Chim Acta, 2020, 1099:94-102.
- [43] WU X, QIU B, CHEN Y, et al. Online coupling Fe₃O₄@ZIF-67@α -glucosidase biomicroreactor with high performance liquid chromatography for rapid screening of α-glucosidase inhibitors in tea and their inhibitory activity research[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2020, 1159;122398.
- [44] LIAN X, ERAZO-OLIVERAS A, PELLOIS J P, et al. High efficiency and long-term intracellular activity of an enzymatic nanofactory based on metal-organic frameworks [J]. Nat Commun, 2017, 8(1):2075.
- [45] LI P, MOON S Y, GUELTA M A, et al. Nanosizing a metal-organic framework enzyme carrier for accelerating nerve agent hydrolysis [J]. ACS Nano, 2016, 10(10):9174-9182.
- [46] CHEN Y, LI P, NOH H, et al. Stabilization of formate dehydrogenase in a metal-organic framework for bioelectrocatalytic reduction of CO₂[J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2019, 58(23): 7682-7686.
- [47] NADAR S S, RATHOD V K. Immobilization of proline activated lipase within metal organic framework(MOF)
 [J]. Int J Biol Macromol, 2020, 152; 1108-1112.
- [48] LIU Y, LIU Y, GU L, et al. Modulating the biofunctionality of enzyme-MOF nanobiocatalyst through structure-switching aptamer for continuous degradation of BPA[J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2021,208:112099.
- [49] 谢成志,任建勋.中药及复方功效的网络药理学研究与思考[J].中国实验方剂学杂志,2024,30(1):198-207.
- [50] 刘甜甜. 脂肪酶抑制剂的筛选及改善肥胖相关代谢作用研究[D]. 厦门:厦门大学,2020.
- [51] XU J, CAO P, FAN Z, et al. Rapid screening of lipase inhibitors in *Scutellaria baicalensis* by using porcine pancreatic lipase immobilized on magnetic core-shell metal-organic frameworks [J]. Molecules, 2022, 27 (11):3475.
- [52] 胡付豪,梁新丽,黄小英,等. 天然植物挥发油干预2型糖尿病的机制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2023,29(11):276-282.
- [53] CHEN X, WU Y, GU Y, et al. Efficient discovery of potent α-glucosidase inhibitors from *Paeoniae lactiflora*

- using enzyme-MOF nanocomposites and competitive indicators [J]. Food Funct, 2023, 14(1):171-180.
- [54] BARRETT M L, UDANI J K. A proprietary alphaamylase inhibitor from white bean (*Phaseolus vulgaris*): A review of clinical studies on weight loss and glycemic control[J]. Nutr J, 2011, 10:24.
- [55] 张勇,王静,陈宇萌,等. α -淀粉酶功能化 MIL-53 (A1)-NH₂对葛根提取物的配体垂钓研究[J].中国现代应用药学,2023,40(6):730-735.
- [56] DOYLE A E. Hypertension and vascular disease [J]. Am J Hypertens, 1991, 4(2 Pt 2): 103S-106S.
- [57] 王向阳,从俊峰,顾双.5种蔬菜和水果抑制血管紧张素 转化酶的研究[J].中国食品学报,2020,20(11):45-52.
- [58] 王成,郭长磊,李霞,等.金丝桃苷对高血压大鼠降血压作用及与血管紧张素转化酶抑制作用的关系[J].中药药理与临床,2018,34(5):33-39.
- [59] FENG X, LIAO D, SUN L, et al. Affinity purification of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides from wakame (*Undaria pinnatifida*) using immobilized ACE on magnetic metal organic frameworks[J]. Mar Drugs, 2021, 19(3):177.
- [60] 徐冉,李智慧,吴一楠,等.金属有机骨架材料固定化酶的研究进展[J].材料导报,2021,35(S2):285-293.
- [61] TAN W, WEI T, HUO J, et al. Electrostatic interaction-induced formation of enzyme-on-mof as chemo-biocatalyst for cascade reaction with unexpectedly acid-stable catalytic performance [J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2019, 11(40):36782-36788.
- [62] ALI G K, OMER K M. Ultrasensitive aptamerfunctionalized Cu-MOF fluorescent nanozyme as an optical biosensor for detection of C-reactive protein [J]. Anal Biochem, 2022, 658;114928.
- [63] WU P H, CHENG P F, KAVEEVIVITCHAI W, et al. MOF-based nanozyme grafted with cooperative Pt(IV) prodrug for synergistic anticancer therapy [J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2023, 225:113264.
- [64] 陈凯先,张卫东. 中药现代化与中药创新[J]. 中国食品药品监管,2022(8):4-13.
- [65] SHEN Y, WANG M, ZHOU J, et al. Construction of Fe₃O₄@α -glucosidase magnetic nanoparticles for ligand fishing of α -glucosidase inhibitors from a natural tonic Epimedii Folium [J]. Int J Biol Macromol, 2020, 165(Pt A): 1361-1372.
- [66] WANG Z, LI X, CHEN M, et al. A strategy for screening of α-glucosidase inhibitors from *Morus alba* root bark based on the ligand fishing combined with high-performance liquid chromatography mass spectrometer and molecular docking [J]. Talanta, 2018, 180: 337-345.

[责任编辑 李嘉麟]