

酶响应型肽水凝胶及应用研究进展*

白靖琨^{1,2)**} 盛成乐²⁾ 张宇¹⁾ 王景新¹⁾

(¹⁾ 中国石油大学生物工程与技术中心, 青岛 266580; ²⁾ 淄博职业学院制药与生物工程系, 淄博 255314)

摘要 酶响应型肽水凝胶可用于缓控释药物的释放, 并具有抗菌、抗肿瘤等作用, 是目前材料领域新兴的研究热点之一。本文总结了近年来国内外开发的酶响应型肽水凝胶材料, 重点介绍了包括谷氨酰胺转氨酶、激酶、磷酸酶、赖氨酸氧化酶(血浆氨氧化酶)、蛋白酶、酯酶、 β 内酰胺酶、基质金属蛋白酶等酶响应型肽水凝胶, 以及在酶的催化作用下, 水凝胶的形成、破坏或动态转换, 同时总结了它们的响应机理。此外, 介绍了酶响应型肽水凝胶的应用。酶响应型肽水凝胶具有广阔的发展前景, 是未来智能响应材料的发展方向之一。

关键词 酶, 肽, 水凝胶, 应用

学科分类号 TB381, O629.72

DOI: 10.16476/j.pibb.2016.0224

近几十年来, 对环境可感知且可响应, 并具有特定功能的智能响应材料已经出现, 可以满足更多的材料性能需求, 促进诸如医疗卫生^[1-2]、电子技术^[3]、能量存储^[4]等技术的发展。这种能够改变功能材料形态或功能的响应因素有很多, 如 pH^[5-7]、温度^[8-9]、光^[10-11]、电化学因素^[12-13]等等, 近年来, 酶催化作用下的肽自组装材料得到关注和研究^[14-15]。在生物体中, 所有生命活动最终受酶控制, 因此在相应酶刺激下形态或功能改变的生物材料具有广阔的应用前景。受此启发, 酶被越来越多地用于触发改变仿生材料的性能^[16-17]。

在生命活动中, 酶的底物主要由氨基酸组成。氨基酸通过酰胺键形成的肽分子, 由于其生物相容性好、可生物降解, 并具有一定的生物活性, 与传统自组装分子相比有着不可比拟的优点, 在分子自组装体系中占有重要地位, 在生命健康等领域具有良好的应用前景。酶响应型水凝胶即是在酶的催化下, 肽及衍生物等底物分子发生特定的化学反应, 化学结构发生改变, 肽分子等聚集成纳米尺寸的超分子单元, 单元间的作用力促使其在空间上规则排列, 如形成纳米纤维等, 再进一步表现为宏观上的相变, 如水凝胶结构的形成或溶胶-凝胶结构的转变等。

虽然国际上已经对酶响应型肽水凝胶进行了大

量的研究^[18], 但目前国内的相关报道较少, 所以我们结合近年来文献报道情况, 对酶响应型肽水凝胶的酶因素, 酶响应型肽水凝胶的形成、破坏、动态转换等相变, 以及酶响应型肽水凝胶的抗菌、抗肿瘤等应用分别进行介绍。

1 酶响应型肽水凝胶

酶通过催化作用能够诱导响应材料在原位形成水凝胶, 并且反应条件温和。酶催化方法相较于其他传统方法, 如物理交联法等, 能够避免制备的水凝胶物理性强度低、稳定性差等问题。同时, 酶催化下自组装形成的水凝胶, 有其自身的优越性: 如酶催化有专一的化学、区域选择性, 催化反应条件温和等。基于以上优点, 酶响应型水凝胶越来越多地得到人们的关注^[1, 15]。

就材料而言, 很多酶响应型水凝胶的组成材料主要是肽及其衍生物; 就酶响应型水凝胶的酶因素而言, 生物体内催化肽响应的酶种类繁多, 但目前已被用于诱导材料形成水凝胶或水凝胶破坏的酶种

* 国家自然科学基金资助项目(21373270, 21503275)。

** 通讯联系人。

Tel: 0532-86981131, E-mail: jkbaizg@163.com

收稿日期: 2016-07-13, 接受日期: 2016-09-30

类较少, 目前已用于研究的酶如谷氨酰胺转氨酶、 β 内酰胺酶、基质金属蛋白酶等、激酶、磷酸酶、赖氨酸氧化酶、蛋白酶、酯酶、

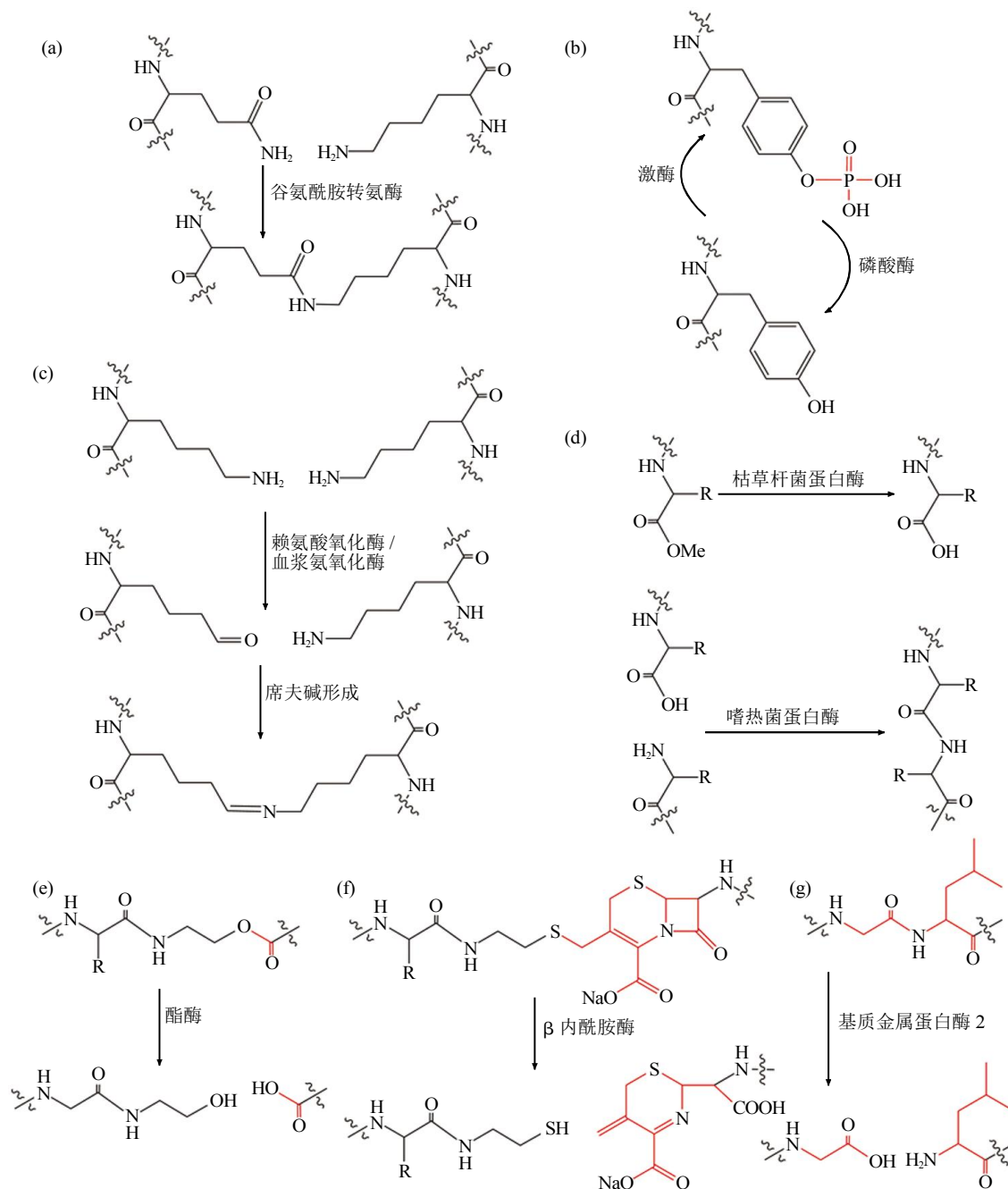


Fig. 1 Enzymatic reaction mechanism of different enzymes in the enzyme responsive peptide hydrogel

图 1 酶响应型肽水凝胶中不同酶的酶促反应机理

(a) 谷氨酰胺转氨酶. (b) 激酶与磷酸酶. (c) 赖氨酸氧化酶 / 血浆氨氧化酶. (d) 枯草杆菌蛋白酶与嗜热菌蛋白酶. (e) 酯酶. (f) β 内酰胺酶. (g) 基质金属蛋白酶 2.

1.1 谷氨酰胺转氨酶响应型水凝胶

谷氨酰胺转氨酶(transglutaminase, TG 酶)含有巯基, 可催化肽键的形成, 并进一步修饰蛋白

质, 如多肽的共价连接或谷氨酰胺残基的脱氨作用等^[19-20]. 谷氨酰胺转氨酶可温和替代化学交联法, 它能催化蛋白质的游离氨基与 γ - 碳酰胺之间发生

共价交联, 形成分子间或分子内聚合物, 同时将氨基脱去(图 1a)^[21], 有助于减少肽分子携带的正电荷, 故而可以在不加入辅助因子的情况下, 组装成稳定的高分子网络结构, 形成自支撑水凝胶。

Davis 等^[22]设计一种富含赖氨酸的肽聚合物, 及一种富含谷氨酰胺的肽聚合物, 在加入 TG 酶后, 可原位快速形成水凝胶, 成胶 1 h 后, 用流变仪进行频率扫描, 储能模量稳定在 10 kPa 左右, 扫描电镜显示成胶后自组装形貌为网络结构, 作为组织材料用于哺乳动物细胞培养, 其生物毒性低。Collier 等^[23]设计肽分子 Q11(Ac-QQKFQFQFEQQ-Am), 通过圆二色谱和红外光谱检测发现, 形成 β 折叠结构, 在 Q11 溶液中加入盐离子, 或改变 pH 值, 放置一定时间后, 透射电镜负染和冷冻电镜观察发现形成高度交联的网状纤维结构。在溶液中加入赖氨酸替代物 MDC 与 TG 酶, 通过 MALDI-TOF 质谱(基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱)和 HPLC(高效液相色谱)证明, Q11 与赖氨酸替代物 MDC 在 TG 酶作用下生成共价交联产物, 有多达 5 个谷氨酰胺可与 MDC 交联, 此方法可用于肽的装配后修饰。Schmid 等^[24]报道, TG 酶会诱导不溶性病变的产生, 研究淀粉样蛋白 A β 加入 TG 酶后的改变, 通过质谱数据中 0.984 Da 的减少, 发现第 15 位谷氨酰胺氨基的丢失, 证明 TG 酶诱导分子内交联导致单体结构改变, 谷氨酰胺转化为谷氨酸。通过 MALDI-TOF 质谱分析证明, 在谷氨酰胺转氨酶作用下生成分子间共价交联的 A β ₁₋₄₀ 二聚物, 透射电镜发现加入 TG 酶 1 h 后有聚集体出现。作者所在课题组设计两亲性短肽 Ac-I₃QGK-NH₂, 在水溶液中自组装形成纳米带, 加入谷氨酰胺转氨酶后, 形成具有一定机械强度的水凝胶, 储能模量在 5 kPa 以上, 破坏后可快速恢复。透射电子显微镜和原子力显微镜观测发现此时形成纳米纤维, 通过 HPLC 和 MALDI-TOF 质谱分析发现, 短肽在酶的催化作用下共价交联形成二聚体; 动物出血时, 凝血因子 X III 在凝血酶作用下生成有活性的 TGase(X III a 因子)。所以相较于其他止血方法, 短肽 Ac-I₃QGK-NH₂ 溶液可以更快速有效地止血、凝血和促进血小板黏附, 同时该短肽对正常哺乳动物细胞毒性低, 不会引起非特异性免疫反应, 在临床止血上具有一定的应用潜力^[25]。

1.2 激酶/磷酸酶响应型水凝胶

激酶(kinase)是可以从高能供体分子(如 ATP 等)转移磷酸基团到底物上的一类酶, 磷酸酶

(phosphatase)可催化除去底物上的磷酸基, 增强底物的疏水性(图 1b)^[26-28], 而在水环境中, 疏水性底物可通过非共价相互作用(例如 π - π 相互作用、氢键、电荷间作用力等)自组装成三维网络结构并形成水凝胶^[29]。

2004 年, 杨志谋等^[29]第一个报道磷酸酶响应下超分子水凝胶的形成, 研究人员用碱性磷酸酶作用于两亲性底物磷酸化酪氨酸(Fmoc-pY, Fmoc=芴甲氧羰基), 使其去磷酸化形成 Fmoc-Y, 在 π - π 堆积作用下形成自支撑水凝胶, 储能模量在 1 kPa 左右, 圆二色谱显示 α 螺旋结构的形成, 扫描电镜与透射电镜观察发现形成网状纤维结构。自这一开创性的工作开始, 其他的一些磷酸酶催化的肽水凝胶陆续被设计, 包括 Nap-FFGepY(Nap=萘基)^[27], Nap-FFpY^[30], Nap-GFFpY-OMe^[31], Ac-YYYpY-OMe(Ac=酰基)^[32], Fmoc-FpY^[33]。杨志谋课题组研究浓度为 1.0%(质量百分比)的 Fmoc-pY-OMe 肽溶液, 在分别加入终浓度 16 U/ml 和 4 U/ml 磷酸酶的作用下, 去磷酸化生成 Fmoc-Y-OMe, 10 min 内快速形成水凝胶。透射电镜和扫描电镜观察发现, 自组装形貌为宽纤维和薄膜, 高效液相色谱结果表明, 产物转化率分别为 64.3%和 62.8%, pH 值从 0~9 范围内, 水凝胶稳定; 论文研究了凝胶的形成机理, 认为芴基反平行排列于纳米纤维的中心, 有助于自组装形貌的形成^[28]。徐兵课题组研究 1a(Fmoc-pYGG^DA^DA)与万古霉素结合后, 加入碱性磷酸酶, 1a 去磷酸化生成 1b(Fmoc-YGG^DA^DA), 自组装形成聚集体, 通过等温滴定量热法(ITC)测定 1a, 1b 与万古霉素结合的解离常数(K_d), 1a 在加入碱性磷酸酶后, 光散射强度随时间增加逐渐增大, 在 2.5 h 左右达到峰值, 然后逐渐降低, 万古霉素、1a 与 1b 对人宫颈癌 HeLa 细胞的半抑制浓度(IC_{50})都大于 500 μ mol/L, 同时加入相同摩尔比的 1a 与万古霉素, 半抑制浓度低于 300 μ mol/L, 两者共组装提高了抗肿瘤活性^[34]。

杨志谋课题组研究在磷酸酶作用下, L-型短肽 Nap-GFFpY-OMe 或 D-型短肽 Nap-G^DFF^DpY-OMe 与卵清蛋白共组装形成的水凝胶可以作为优良的疫苗佐剂, 与临床上使用的明矾佐剂相比, 该肽水凝胶可提高抗原吸收, 诱导树突状细胞成熟, 促进生发中心的形成, L-型与 D-型肽水凝胶可以分别增加约 1.3 倍和 3.8 倍的免疫球蛋白 G(IgG)的产生, 同时具有良好的生物相容性^[35]。此外, Ulijn 课题组进一步研究磷酸酶催化下的分子自组装与胶束 -

纤维转换之间的关系^[36]。

通过激酶的磷酸化和磷酸酶的去磷酸化可以改变底物的两亲性, 利用这对酶催化各自的互补逆向反应, 可以获得动态可逆的超分子水凝胶。徐兵课题组设计两亲性肽(Nap-FFGEY), 在该酶体系下, 诱导凝胶形成溶胶(激酶)和溶胶形成凝胶(磷酸酶), ATP 决定了自组装状态^[27]。Webber 等^[37]设计了两亲肽 PA1(KRRASVAGK [C₁₂]-NH₂), 1 mmol/L 肽 PA1 在 Tris-HCl 缓冲液中可自组装形成水凝胶, 冷冻电镜观察自组装形貌为纳米纤维结构, 在蛋白激酶 A 和 ATP 的作用下丝氨酸磷酸化, 两亲肽的亲水性增强, 水凝胶破坏, 转化为溶胶, 纳米结构消失, 圆二色谱显示二级结构从 β 折叠转变为无规卷曲。

1.3 赖氨酸氧化酶响应型水凝胶

赖氨酸氧化酶(lysyl oxidase, LO)是细胞外基质形成和修复的关键因素, 该酶可催化赖氨酸的伯氨基氧化成活泼的醛基, 并进一步交联形成席夫碱(图 1c)^[38-39]。赖氨酸氧化酶可用于形成和修复细胞外基质^[40]。血浆氨氧化酶(plasma amine oxidase, PAO)的功能也是对伯氨基进行氧化, 并且已经商业化^[41]。这两种酶可以随时间延长提高生物材料或者组织的强度^[42]。

利用血浆氨氧化酶, Hartgerink 课题组^[41]设计多域肽 K₂(SL)₆K₂, 通过血浆氨氧化酶氧化赖氨酸侧链上的 ϵ -氨基形成醛, 并最终形成希夫碱, 使肽分子携带正电荷减少, 促使肽溶液形成水凝胶, 同时形成大量的纳米纤维结构。由于血浆氨氧化酶具有持续活性, 该酶形成的水凝胶强度随时间增加, 加入血浆氨氧化酶的高效抑制剂后, 则无法形成水凝胶。白靖琨等^[43]设计两亲性短肽 Ac-A₉K₂-NH₂, 在水溶液中自组装形貌为纳米棒, 在加入血浆氨氧化酶后自组装形成纳米纤维, 同时形成自支撑水凝胶, 机械强度在 300 Pa 以上, 研究了酶催化水凝胶形成的机理: MALDI-TOF 质谱检测发现, 赖氨酸侧链的 ϵ -氨基在酶的催化氧化下, 发生分子内或分子间共价交联形成希夫碱, 希夫碱进一步吸收羟醛缩合释放的 H, 最终形成更为稳定的碳氮化合物, 肽分子携带的正电荷减少, 分子间斥力降低, 有助于水凝胶的形成, 该水凝胶具有良好的破坏-恢复性能, 以及良好的抑菌作用。

1.4 蛋白酶响应型水凝胶

蛋白酶(protease)是水解蛋白肽链的一类酶, 主要作用是水解氨基酸链的肽键^[44-45]。目前研究较多

的是枯草杆菌蛋白酶(subtilisin)^[46]和嗜热菌蛋白酶(thermolysin)(图 1d)^[47]。Uljin 等^[48]采用枯草杆菌蛋白酶使 Fmoc-L₂-OMe 的酯键裂解形成 Fmoc-L₂, 增加前体溶解度, 此时形成水凝胶, 自组装形貌为纳米管结构, 红外光谱表明二级结构为 β 折叠结构, 高效液相色谱检测到了新产物的生成。Hirst 等^[46]进一步报道枯草杆菌蛋白酶触发水凝胶的形成, 考察了 Fmoc-R¹R²-OMe(R¹/R²=Y, F, L, V)在枯草杆菌蛋白酶作用下生成 Fmoc-R¹R²的变化, 甲氧基通过枯草杆菌蛋白酶的水解作用除去, 肽分子自组装形成纳米纤维, 同时形成水凝胶。

与枯草杆菌蛋白酶催化酯键的裂解不同, 嗜热菌蛋白酶主要催化两肽化学键的形成, 可被用来连接两条不同的肽(图 1d)^[47]。对于侧链上含疏水基团、芳香基团的氨基酸, 嗜热菌蛋白酶的催化效果尤其好。Uljin 等通过耦合非凝胶二肽(FF)到一个单一的 Fmoc 保护氨基酸(Fmoc-F), 通过嗜热菌蛋白酶的反水解作用, 产生自组装的 Fmoc 三肽(Fmoc-F₃), 形成自支撑水凝胶, 并用于细胞培养, 扫描电镜显示自组装形貌为网状纤维结构, 使用高效液相色谱考察了产物的转化率^[47]。Hughes 等^[49]进一步利用此方法制备二维纳米结构, 由 Fmoc-S 和 F-OMe 通过嗜热菌蛋白酶反水解形成 Fmoc-SF-OMe, 同时形成水凝胶, 电镜和冷冻电镜观察自组装形貌为宽片状结构。Hughes 等^[50]继续研究了利用嗜热菌蛋白酶形成 Fmoc-SL-OMe、Fmoc-TF-OMe、Fmoc-TL-OMe, 使用红外光谱对产物进行了考察, 透射电镜观察 Fmoc-SL-OMe 为带状结构, Fmoc-TF-OMe 为扭曲的长纤维, TL 为扭曲的短纤维, 流变学实验表明 Fmoc-TF-OMe 的机械强度优于 Fmoc-TL-OMe 和 Fmoc-SL-OMe, 储能模量可达到 10 kPa。

1.5 酯酶响应型水凝胶

酯酶(esterase)一般指水解脂肪酸酯的脂肪酶, 但部分酯酶也可以催化氨基酸等的酯水解反应^[51]。Palocci 等采用酯酶展开反水解诱导从 Fmoc-F 和 F₂ 水凝胶化为 Fmoc-F₃, 通过流变学实验研究了水凝胶的黏弹性, 机械强度在 10 Pa 左右, SEM 和 AFM 图像证实肽自组装产生超分子聚集体, 驱动力为 Fmoc 基团的 π - π 堆积作用^[52]。徐兵课题组设计分子 1a(C₁₀H₇CH₂C(O)-phe-phe-NHCH₂CH₂OC(O)CH₂CH₂C(O)OH), 在酯酶作用下酯键断裂, 生成 2a(C₁₀H₇CH₂C(O)-phe-phe-NHCH₂CH₂OH), 在浓度超过 0.08%(质量百分比)时形成水凝胶, 自组装形

貌为纳米纤维(图 1e), 1a 分子可以进入 HeLa 细胞内部, HeLa 细胞释放的酯酶可诱导生成 2a, 在胞内形成水凝胶, 导致 HeLa 细胞的死亡, 同时 MTT 实验证明该水凝胶对成纤维细胞 NIH3T3 毒性低^[53]. 刘育课题组设计 SC4A 与肉豆蔻酰胆碱组成的囊泡, 加入胆碱酯酶后, 透射电镜和扫描电镜观测到囊泡破坏, 包裹模型药物实验表明该囊泡可用于药物的控制释放与传递^[54]. 徐兵课题组配制 0.4%(质量百分比)浓度的 D-1(Nap-^DF^DF^DG-CO(O)-(CH₂)₂-C(O)-N(H)-(CH₂)₂-SO₃H)肽溶液, 在羧酸酯酶的作用下, 酯键断裂生成 D-2(Nap-^DF^DF^DG-COOH), 自组装形成纳米纤维结构, 静态光散射强度明显提高, 同时形成自支撑水凝胶. 在 D-1 与顺铂共同存在的情况下, 人卵巢癌细胞 SKOV3 与 A2780 细胞死亡率明显高于只加入顺铂时, 提高了顺铂的抗肿瘤活性; 使用荧光染料鬼笔环肽对 SKOV3 细胞染色发现, 在加入 D-1 后肌动蛋白丝明显减少, 说明酶诱导肽自组装形成的纳米纤维表现出一定的细胞毒性, 最终提高对耐药性卵巢癌细胞的抗肿瘤效果^[55].

1.6 β 内酰胺酶响应型水凝胶

β 内酰胺酶(β -lactamase)诱导催化抗生素分子中的四元环结构, 即 β 内酰胺环的断裂^[56](图 1f). 开环后, 抗生素分子的抗菌特性失去, 从而使细菌产生耐药性. 通过内酰胺酶的作用, 内酰胺环被打开, 凝胶基元被释放并自组装, 进一步形成纳米纤维和水凝胶. β 内酰胺酶在细胞内引发自组装进而形成水凝胶, 所以可以应用于内酰胺酶的检测, 或者杀死特定的细菌, 因为此类超分子水凝胶可以在细胞内形成^[57-58]. 杨志谋等^[57]研究自组装分子 Fmoc-FF 通过 β 内酰胺键耦合到一个亲水基团上, 无明显自组装形貌, 在 β 内酰胺酶的作用下释放肽分子, 1 h 后产物产率为 49.0%, 形成不透明水凝胶, 自组装体为纳米纤维结构, 加入 β 内酰胺酶的抑制剂, 则无法诱导形成水凝胶, 加入超声破碎后的大肠杆菌, 能够诱导产生水凝胶, 高效液相色谱结果显示产物产率可高达 99.7%, 提供了检测 β 内酰胺酶的一种新方法.

1.7 基质金属蛋白酶响应型水凝胶

基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)可降解特定的氨基酸序列, 因其需要金属离子如 Ca²⁺、Zn²⁺ 等作为辅助因子而得名^[59-62]. MMP 家族各成员具有一定的底物特异性. Hartgerink 等设计了一个酶 MMP-2 敏感的自组装两亲性肽^[63], MMP-2 可特异性降解肽序列 GTAGLIGQ 的甘氨酸

(G)与亮氨酸(L)之间的连接位点, 该肽暴露于 MMP-2, 水凝胶并没有被直接破坏, 而是缓慢坍塌, 表现为胶束的增加与纤维的缩短. Langer 等设计了 MMP-2 敏感序列(RADA)₃PVGLIG(RADA)₃, 可形成超分子水凝胶, 形貌为纳米纤维结构, 二级结构为 β 折叠, 加酶降解后, 质谱分析发现产物(RADA)₃PVG 与 LIG(RADA)₃ 的生成, 形成的水凝胶在加酶后机械强度没有明显改变, 但是表面硬度大幅降低^[64]. 徐兵课题组^[65]设计短肽 FFFFCGLDD, 在 pH 6.0 时形成水凝胶, 升高 pH 至 7.4 时水凝胶破坏, GLDD 是 MMP-9 的作用位点, 在加入 MMP-9 后, 肽分子酶促降解脱去 LDD, 导致较小的自组装肽基元 FFFFCG 释放, 并再次形成水凝胶, 高效液相色谱检测生成 31.8%的 FFFFCG, 同时有 15.4%的 FFFF 生成, 此时储能模量稳定在 100 Pa 以上, 透射电镜显示自组装形貌为纳米纤维(图 1g). Ulijn 课题组研究两亲肽 GFFLGLDD 在浓度为 5 mmol/L 时自组装形成球形胶束, 在加入终浓度为 50 μ g/L 的 MMP-9 后, 裂解主要产生肽片段 GFFLGL, 自组装形成纳米纤维结构, 同时有少量肽片段 GFF 与 LGLD、GF 与 FLGLDD 生成, 但并未裂解产生期望中的短肽 GFFLG, 此结果说明 MMP-9 还可降解 F 与 L、F 与 F 之间的肽键, 最终在基质金属蛋白酶 MMP-9 的作用下, 完成了球形胶束到纳米纤维的转换, 并释放抗肿瘤药物阿霉素^[66].

2 酶响应型肽水凝胶的相变

在酶的催化作用下, 肽及衍生物等组装基元会发生化学结构的改变, 引起纳米球、纳米纤维、纳米管等自组装形貌的改变, 或从无自组装形貌到形成特定的自组装体. 在这个过程中, 自组装形貌的部分改变会引发水凝胶的相变行为, 如水凝胶的形成或破坏, 以及溶胶-凝胶结构的动态转换.

2.1 酶响应型肽水凝胶的形成

催化肽及衍生物、合成高聚物等材料响应的酶, 多用于水凝胶形成, 但催化机理各不相同: 谷氨酰胺转氨酶催化游离氨基与 γ -碳酰胺之间形成新的酰胺键, 可用于共价化合物的生成^[25, 67]; 磷酸酶催化底物去磷酸化, 使底物疏水性增强^[27, 68]; 赖氨酸氧化酶催化伯氨基氧化成醛基, 进一步反应形成希夫碱, 可降低赖氨酸侧链所带电荷^[41, 43]; 枯草杆菌蛋白酶裂解酯键, 增加前体的溶解度^[46, 69]; 基质金属蛋白酶通过降解特定氨基酸序列^[70], 释放自

组装基元, 引起水凝胶的形成^[63].

如 Tanaka 等^[71]设计酶响应型抗肿瘤水凝胶前体因子 ER-C16 (十六烷酰 -GGGHGPLGLARK-CONH₂), 该序列含有基质金属蛋白酶 MMP-7 降解序列 PLGL, 自身无法形成自组装体, 可以在加入 MMP-7 后, 降解产生凝胶因子 G-C16(十六烷酰 -GGGHGPLG)与肽片段 LARK-CONH₂, 透射电镜结果显示 G-C16 自组装形成纳米纤维结构, 同时形成水凝胶, 活 / 死细胞染色实验表明, G-C16 可以进入 HeLa 细胞内部, 并形成纳米纤维结构, 从而特异性杀死 HeLa 癌细胞, 同时对正常细胞皮肤血管内皮细胞(MvE 细胞)毒性低.

2.2 酶响应型肽水凝胶的破坏

激酶催化底物磷酸化^[72], 亲水性增强, 水凝胶破坏^[37], 枯草杆菌蛋白酶裂解酯键, 也可降解水凝胶^[15]. 酯酶催化酯键断裂^[53], 也可用于破坏囊泡^[54]. 基质金属蛋白酶降解特定氨基酸序列, 使凝胶因子破坏, 也可用于水凝胶的坍塌^[63].

如 Khelfallah 等^[73]使用短肽 GGL 连接聚氧乙烷 PEO 形成超分子凝胶, 加入谷草杆菌蛋白酶催化

肽分子的降解, 最终引起水凝胶的破坏, 同时通过重量测定分析了水凝胶的降解率. Moore 课题组^[15]研究短肽 CYKC 连接的高聚物, 自组装形成水凝胶, 在加入枯草杆菌蛋白酶后, 酪氨酸与赖氨酸之间的肽键断裂, 三维交联网络结构转化为水溶性聚合物, 水凝胶破坏, 此技术可用于生物传感等领域.

2.3 酶响应型肽水凝胶的动态转换

磷酸酶 / 激酶系统可催化肽、聚合物等的去磷酸化和磷酸化作用, 引起凝胶因子亲疏水性的改变^[26-27, 74-75], 枯草杆菌蛋白酶 / 嗜热菌蛋白酶系统可用于酶响应材料的水解和反水解, 引起分子结构的改变^[48, 76], 此系统已成功用于溶胶 - 凝胶之间的状态转换. 杨志谋课题组使用磷酸酶 / 酪氨酸酶诱导水凝胶的动态转换, 该课题组研究肽序列 Ac-YYYPY-OMe, 在加入磷酸酶后去磷酸化生成 Ac-YYYY-OMe, 形成水凝胶, 流变实验显示储能模量为 900 Pa 左右, 自组装形貌为纳米纤维结构, 再加入酪氨酸酶, 酪氨酸氧化生成醌类化合物, 水凝胶破坏形成褐色溶液(图 2), MTT 实验表明, 水凝胶对成纤维细胞 NIH 3T3 毒性低^[32].

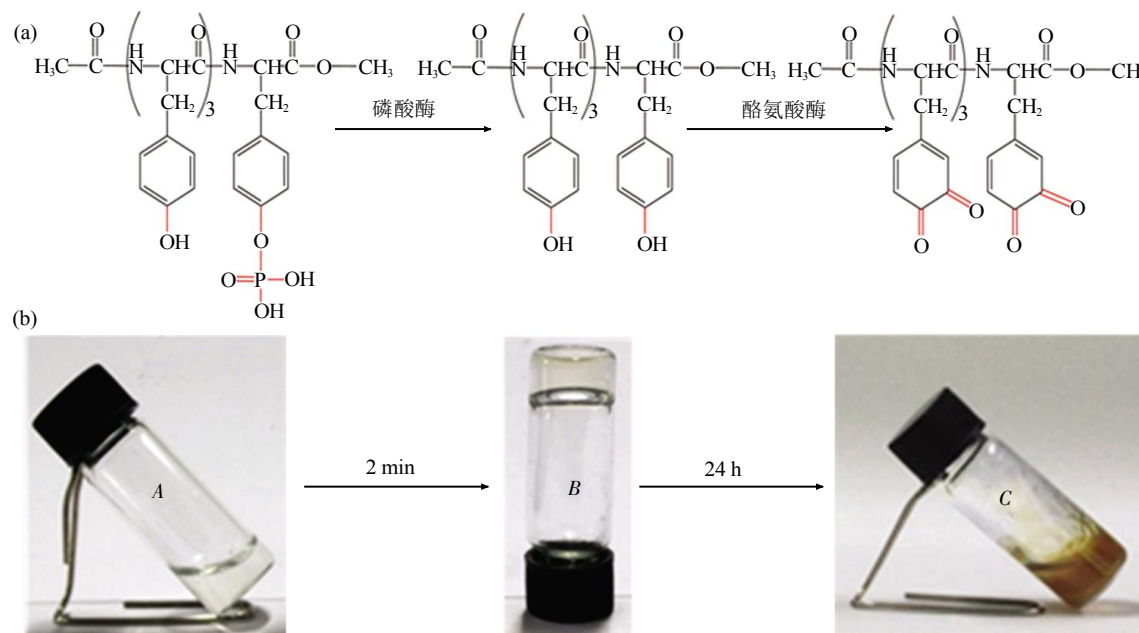


Fig. 2 Dynamic phase transition of enzyme responsive peptide hydrogel

图 2 酶响应型肽水凝胶的动态相变

(a)酪氨酸酶和磷酸酶催化溶胶凝胶相转变的示意图. (b)光学图像. A: Ac-YYYPY-OMe 的溶胶, B: 磷酸酶处理后形成凝胶, C: 酪氨酸酶处理后再次形成溶胶.

3 酶响应型肽水凝胶的应用

目前关于水凝胶的研究多集中在合成高分子水凝胶上^[8], 高分子水凝胶具有一定的缺点, 如稳定性好、不易降解、生物可控降解性差。此外, 部分自组装水凝胶因子中含有 PAs^[77]、Nap-FFG^[78]、Fmoc-FF^[79]等脂肪链、萘和 Fmoc 稠环芳香烃等, 在临床应用时可能引起机体的非特异性免疫反应。与之相比, 肽水凝胶毒性低、生物相容性好、易降解。基于肽纳米材料作为自组装基元形成的水凝胶, 可执行各种功能, 如模仿细胞的三维环境^[58], 或在生物医学应用中作为可注射支架^[27]。

酶广泛存在生物机体内, 酶促反应是维持生命活动的重要过程。例如在 ECM 形成和重构中酶发挥着关键作用, 基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP) 通过降解基质成分而实现 ECM 重构和组织再生^[80]; 谷氨酰胺转氨酶 (transglutaminase, TG) 通过共价交联纤维蛋白可以加速凝血, 促进伤口的愈合^[81]。更为重要的是, 酶促反应具有专一性强、条件温和、转化效率高等特点, 而且酶促肽水凝胶降解时只产生氨基酸, 对机体不会产生不良影响, 导入机体后, 一般不会引起免疫反应和组织炎症。通常当材料暴露在酶促反应附近, 其属性会发生改变, 利用此特点, 酶响应材料可用于分析检测^[82-85]、药物传递^[86-88]等, 目前, 科研人员多将其用于缓控释药物、抗菌、抗肿瘤等方面。

3.1 药物释放

不同于 pH、温度等智能响应材料, 在刺激因素消失后, 材料响应的功能消失, 酶响应材料在酶消失后, 响应仍存在。此外, 生物体内存在大量的酶, 所以, 水凝胶在酶响应下降解, 有望用于药物在体内的缓慢释放或控制释放。如将一些特异性酶切位点引入到作为凝胶基元的肽序列中, 在该酶催化下可促使肽段断裂, 从而导致凝胶坍塌^[63], 可携带药物治疗释放特异性酶的病变细胞。杨志谋课题组设计 Ac-YYYY-OMe 肽序列形成的水凝胶, 包埋刚果红染料后, 通过加入不同浓度的酪氨酸酶, 紫外测定显示可有效控制刚果红的释放量^[32]。Stupp 课题组设计两亲肽形成的水凝胶, 在加入激酶后形成溶胶, 可用于释放抗癌药物阿霉素, 杀死乳腺癌细胞, 但对小鼠成纤维细胞毒性低^[37]。

Ulijn 课题组研究两亲肽 GFFLGLDD 在加入乳腺癌细胞株 MDA-MB-231-luc-D3H2LN 后, 细胞

释放基质金属蛋白酶 MMP-9, 催化两亲肽断裂释放自组装基元 GFFLGL, 自组装形貌从球形胶束转换为纤维, 释放抗肿瘤药物阿霉素。通过小鼠体内实验研究发现, 同时注射短肽 GFFLGLDD 与阿霉素, 与单独注射阿霉素相比, 肿瘤体积减小更加明显, 抑制细胞生长效果更好。两亲肽在肿瘤部位的特异性裂解, 引起化疗药物的局部释放, 从而有效提高抗肿瘤效果, 但与下述研究不同, 该研究实现抗肿瘤效果的本质是通过肽材料的药物释放完成的^[66]。李峻柏课题组也设计含肽分子的自组装体作为药物载体包埋阿霉素, 在胰酶触发下释放药物, 实现低浓度下杀死人宫颈癌 HeLa 细胞^[89]。

3.2 抗肿瘤作用

徐兵课题组使用万古霉素(VAN)通过配体受体间的相互作用, 催化 D-Ala-D-Ala 衍生物 Fmoc-KGG(D)A(D)A 形成聚集体。该聚集体可引起 HeLa 细胞的程序性死亡。而如果把肽分子进行修改, 去掉 Fmoc 基团, 或者将 D-Ala 换成 L-Ala, 则对 HeLa 细胞的毒性消失^[90], 此工作为理解小分子的分子聚集毒性提供了帮助。Ulijn 报道 Fmoc-葡萄糖胺-6-磷酸去磷酸化形成纳米纤维, 同时伴随凝胶的形成, 可以抑制释放碱性磷酸酶的人骨肉瘤细胞 SaOs-2 的生长, 而小鼠成软骨细胞 ATDC5 不产生碱性磷酸酶, 不能诱导凝胶的生成, 可正常生长^[91]。徐兵课题组进一步研究两亲肽 Nap-FFpY-HNMe (1p)、Nap-FFpY-HNNH₂ (2p)、Nap-FFpY-OMe(3p)、Nap-FFpY-OH(4p)在加入碱性磷酸酶后, 肽分子 C 端去磷酸化分别生成 1、2、3、4, 自组装能力增强, 形成纳米纤维结构, 静态光散射强度明显提高, 在 0.5%肽浓度(质量百分比)加入 0.05 U/ml 碱性磷酸酶后, 10 min 内快速形成水凝胶, 储能模量 1p>2p>3p>4p, 其中 1p 加入碱性磷酸酶后储能模量接近 100 Pa, 能够有效抑制人骨肉瘤细胞 SaOs-2 的生长, 1p、2p、3p 与 4p 对 SaOs-2 细胞的 IC₅₀(90%抑制浓度)依次为 36、97、37 与 470 μmol/L, 同时对人骨髓基质细胞 HS-5 毒性低, 在 1p、2p、3p 环境中加入碱性磷酸酶的抑制剂左旋咪唑, 细胞存活率有所提高, 在 1p、2p、3p 环境中加入凋亡抑制剂(zVAD-fmk), 细胞存活率变化不大, 而加入坏死抑制剂(Nec-1), 细胞存活率明显提高, 说明加入两亲肽导致 Saos-2 细胞的死亡, 较多的依赖于细胞坏死机制而非细胞凋亡机制^[92]。该课题组继续研究在酶诱导下肽分子的胞内自组装, 以及其在癌细胞治疗中的应用, 同时对该

抗肿瘤机制进行研究^[93-94]。此外, Maruyama 等^[71]、杨志谋课题组^[95]等也报道了通过小分子自组装形成纳米纤维抑制肿瘤细胞的生长。

3.3 抗菌作用

Schneider 课题组以发卡肽 MAX1 (VKVKV-KVKV^D PPTKVVKVKV)^[72]为基础, 设计了一系列抗菌肽, 如 MARG1 (VKVKVRVKV^D PPTKVKVRV-KV)^[96]。此外, 研究富含精氨酸的肽序列 PEP6R (VKVRVRVRV^D PPTRVRVRVKV), 在 300 mmol/L NaCl 存在的条件下可自组装形成水凝胶, 可有效杀灭在水凝胶上方加入的革兰氏阳性菌金黄色葡萄球菌, 以及大肠杆菌、耐药铜绿假单胞菌等革兰氏阴性菌。激光共聚焦扫描显微镜进行 Z 轴扫描发现, 水凝胶上方细菌呈碘化丙啶(PI)染色后的红色, 显示为死菌, 原子力显微镜三维正交投影图像显示此时大肠杆菌表面细胞膜破损, 在水凝胶上方培养小鼠间充质干细胞 C3H10T1/2, 活/死细胞染色显示大部分细胞存活, 表现出优良的细胞相容性^[97]。作者等设计两亲性短肽 Ac-A₉K₂-NH₂ 在血浆氨氧化酶作用下形成水凝胶, 通过增加细胞膜的通透性, 有效抑制细菌的生长, 对金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌等革兰氏阳性菌、大肠杆菌和绿脓杆菌等革兰氏阴性菌具有高效抑菌效果, 24 h 后的抑菌率在 70% 以上, 同时对哺乳动物细胞显示出极低的细胞毒性。在水凝胶上进行细菌-细胞共培养后, 使用荧光染料碘化丙啶(红色)和 SYTO 9(绿色)对样品双染后发现, 大部分细胞呈表示存活的绿色, 大部分细菌呈表示死亡的红色(图 3), 对照组结果相反。在共培养条件下, 肽水凝胶表现出优异的选择性, 有利于哺乳动物细胞 MIH 3T3 的黏附和增殖, 同时杀死致病菌, 作为组织培养材料可以有效避免细菌污染^[43]。

此外, 杨志谋课题组设计磷酸酶响应型短肽 Nap-G^PF^DpY-OMe 水凝胶作为潜在的疫苗佐剂^[35], 作者所在课题组设计谷氨酰胺转氨酶响应型短肽 Ac-I₃QGK-NH₂ 水凝胶具有快速止血和凝血性能^[25]。酶催化诱导水凝胶的形成、水凝胶到溶胶的转化、以及荧光强度的变化, 同样可以用于酶的检测。McNeill^[98], 张先正^[99-100], 徐兵^[101]、杨志谋^[102]等对此进行了研究。McNeil 课题组通过基质金属蛋白酶 MMP-9 诱导下水凝胶的形成检测蛋白酶活性^[103]; 杨志谋课题组通过酶诱导下肽纳米球的解组装用于酪氨酸酶的检测^[104], 并综述了可视的凝胶-溶胶转变应用于酶的检测^[105]; 徐兵等进一步研究磷酸酶

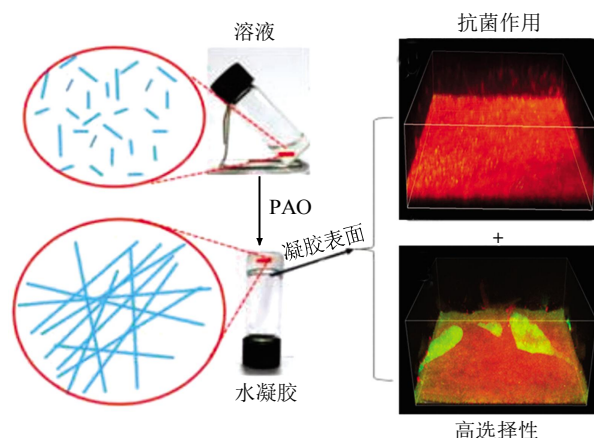


Fig. 3 The aqueous solution of Ac-A₉K₂-NH₂ formed hydrogel under the action of Plasma Ammonia Oxidase, and laser scanning confocal microscopy images of NIH 3T3 cells after the introduction of bacteria

图 3 Ac-A₉K₂-NH₂ 溶液在血浆氨氧化酶的作用下形成水凝胶, 以及在水凝胶表面培养细菌与 NIH 3T3 细胞后的共聚焦显微镜图片

催化形成的水凝胶诱导肿瘤细胞的凋亡^[106-107]; Ulijn 等^[108-109]则对酶催化肽序列反应过程中的酶催化动力学进行了探讨。

4 总结与展望

作为一类智能响应材料, 酶响应型水凝胶的构筑材料多为肽及衍生物, 用于刺激水凝胶形成或破坏的酶在生命体内大量存在, 在医学健康领域有广阔的应用前景。在酶响应型水凝胶的相变过程中, 酶的催化刺激是途径, 其机理是改变材料的疏水性或溶解度, 降低或增加材料携带电荷, 释放或破坏自组装基元等, 最终在酶的刺激响应下, 肽及衍生物等材料实现水凝胶的形成、破坏或动态转换等相变行为。酶响应型水凝胶可被用于细胞的三维培养, 作为可注射骨架等。部分肽水凝胶抗菌效果显著, 不会产生耐药性, 且对肿瘤细胞有毒害作用, 同时对正常细胞毒性低, 可用于抗菌、抗肿瘤, 还可用于药物释放等, 发展潜力巨大。

酶响应型水凝胶应用前景广泛, 已经得到越来越多科研人员的关注, 但该领域研究时间较短, 需要不断开发用于酶响应型水凝胶的新型材料, 重点开发功能性肽材料。对于肽材料的设计, 就分子结构而言, 可以考虑以下方面: 亲疏水氨基酸残基的

种类、数目、排列顺序、引入其他功能性或响应性基团、加入保护基等；共组装体系的构建，可将肽与肽、肽与表面活性剂、肽与染料分子、肽与其他酶响应底物等结合。就酶而言，除了目前已用于材料响应的酶，可进一步开发用于生物体内、易引起材料功能响应、活性高的酶；除了研究较多的以肽为底物的酶，还可以研究以糖、酯、核酸等为底物的酶。就功能而言，可以研究控制药物释放的水凝胶降解机制，开发响应于多个酶，按需求控制多种药物释放时间的酶响应型水凝胶，最终建立多重响应、时空可控的酶响应型水凝胶系统。

参 考 文 献

- [1] Ikeda M, Tanida T, Yoshii T, *et al.* Installing logic-gate responses to a variety of biological substances in supramolecular hydrogel-enzyme hybrids. *Nat Chem*, 2014, **6**(6): 511–518
- [2] Meevoy M A, Correll N. Materials science. Materials that couple sensing, actuation, computation, and communication. *Science*, 2015, **347**(6228): 1261689
- [3] Wu D, Huang L, Pan B, *et al.* Experimental study and numerical simulation of active vibration control of a highly flexible beam using piezoelectric intelligent material. *Aerospace Science & Technology*, 2014, **37**: 10–19
- [4] Pielichowska K, Pielichowski K. Phase change materials for thermal energy storage. *Progress in Materials Science*, 2014, **65**(10): 67–123
- [5] Moitra P, Kumar K, Kondaiah P, *et al.* Efficacious anticancer drug delivery mediated by a pH-sensitive self-assembly of a conserved tripeptide derived from tyrosine kinase NGF receptor. *Angewandte Chemie International Edition*, 2014, **53**(4): 1113–1117
- [6] Zhang S, Bellinger A M, Glettig D L, *et al.* A pH-responsive supramolecular polymer gel as an enteric elastomer for use in gastric devices. *Nature Materials*, 2015, **14**(10): 1065–1071
- [7] Kim K S, Park W, Hu J, *et al.* A cancer-recognizable MRI contrast agents using pH-responsive polymeric micelle. *Biomaterials*, 2014, **35**(1): 337–343
- [8] 许舒欣, 王伟伟, 邓联东, 等. 聚乙二醇 / 聚己内酯嵌段共聚物温敏水凝胶及其在局部药物递送中的应用. *生物化学与生物物理进展*, 2013, **40**(10): 1031–1038
Xu S X, Wang W W, Deng L D, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2013, **40**(10): 1031–1038
- [9] Wei H, Yu J, Song X Y, *et al.* Tunable temperature-responsive supramolecular hydrogels formed by prodrugs as a codelivery system. *Acs Applied Materials & Interfaces*, 2014, **6**(13): 10623–10630
- [10] Son S, Shin E, Kim B S. Light-responsive micelles of spiropyran initiated hyperbranched polyglycerol for smart drug delivery. *Biomacromolecules*, 2014, **15**(2): 628–634
- [11] Borges J, Rodrigues L C, Rui L R, *et al.* Layer-by-layer assembly of light-responsive polymeric multilayer systems. *Advanced Functional Materials*, 2014, **24**(36): 5624–5648
- [12] Peng L, Zhang H, Feng A, *et al.* Electrochemical redox responsive supramolecular self-healing hydrogels based on host-guest interaction. *Polym Chem*, 2015, **6**(6): 3652–3659
- [13] Simon P, Gogotsi Y, Dunn B. Where do batteries end and supercapacitors begin? *Science*, 2014, **343**(6176): 1210–1211
- [14] Cobo I, Li M, Sumerlin B S, *et al.* Smart hybrid materials by conjugation of responsive polymers to biomacromolecules. *Nature Material*, 2015, **14**(2): 143–159
- [15] Plunkett K N, Berkowski K L, Moore J S. Chymotrypsin responsive hydrogel: application of a disulfide exchange protocol for the preparation of methacrylamide containing peptides. *Biomacromolecules*, 2005, **6**(2): 632–637
- [16] Shieh F K, Wang S C, Yen C I, *et al.* Imparting functionality to biocatalysts *via* embedding enzymes into nanoporous materials by a *de novo* approach: size-selective sheltering of catalase in metal-organic framework microcrystals. *Journal of the American Chemical Society*, 2015, **137**(13): 4276–4279
- [17] Gajanayake T, Olariu R, Leclère F M, *et al.* A single localized dose of enzyme-responsive hydrogel improves long-term survival of a vascularized composite allograft. *Science Translational Medicine*, 2014, **6**(249): 155–170
- [18] Du X, Zhou J, Shi J, *et al.* Supramolecular hydrogelators and hydrogels: from soft matter to molecular biomaterials. *Chemical Reviews*, 2015, **115**(24): 13165–13307
- [19] Keillor J W, Apperley K Y P, Akbar A. Inhibitors of tissue transglutaminase. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2015, **36**(1): 32–40
- [20] Keillor J W, Clouthier C M, Apperley K Y P, *et al.* Acyl transfer mechanisms of tissue transglutaminase. *Bioorganic Chemistry*, 2014, **57**: 186–197
- [21] Teixeira L S M, Feijen J, Van Blitterswijk C A, *et al.* Enzyme-catalyzed crosslinkable hydrogels: emerging strategies for tissue engineering. *Biomaterials*, 2012, **33**(5): 1281–1290
- [22] Davis N E, Ding S, Forster R E, *et al.* Modular enzymatically crosslinked protein polymer hydrogels for *in situ* gelation. *Biomaterials*, 2010, **31**(28): 7288–7297
- [23] Collier J H, Messersmith P B. Enzymatic modification of self-assembled peptide structures with tissue transglutaminase. *Bioconjugate Chem*, 2003, **14**(4): 748–755
- [24] Schmid A W, Condemi E, Tuchscherer G, *et al.* Tissue transglutaminase-mediated glutamine deamidation of β -amyloid peptide increases peptide solubility, whereas enzymatic cross-linking and peptide fragmentation may serve as molecular triggers for rapid peptide aggregation. *Journal of Biological Chemistry*, 2011, **286**(14): 12172–12188
- [25] Chen C, Zhang Y, Fei R, *et al.* Hydrogelation of the short self-assembling peptide I3QGK regulated by transglutaminase and use for rapid hemostasis. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2016, **21**(8): 17833–17841
- [26] Yang Z, Liang G, Xu B. Enzymatic hydrogelation of small molecules. *Accounts of Chemical Research*, 2008, **41**(2): 315–326

- [27] Yang Z, Liang G, Wang L, *et al.* Using a kinase/phosphatase switch to regulate a supramolecular hydrogel and forming the supramolecular hydrogel *in vivo*. Journal of the American Chemical Society, 2006, **128**(9): 3038–3043
- [28] Gao J, Wang H, Wang L, *et al.* Enzyme promotes the hydrogelation from a hydrophobic small molecule. Journal of the American Chemical Society, 2009, **131**(32): 11286–11287
- [29] Yang Z, Gu H, Fu D, *et al.* Enzymatic formation of supramolecular hydrogels. Adv Mater, 2004, **16**(16): 1440–1444
- [30] Wang Q G, Yang Z M, Gao Y, *et al.* Enzymatic hydrogelation to immobilize an enzyme for high activity and stability. Soft Matter, 2008, **4**(3): 550–553
- [31] Wang H M, Ren C H, Song Z J, *et al.* Enzyme-triggered self-assembly of a small molecule: a supramolecular hydrogel with leaf-like structures and an ultra-low minimum gelation concentration. Nanotechnology, 2010, **21**(22): 225606–225610
- [32] Gao J, Zheng W T, Kong D L, *et al.* Dual enzymes regulate the molecular self-assembly of tetra-peptide derivatives. Soft Matter, 2011, **7**(21): 10443–10448
- [33] Sadownik J W, Leckie J, Ulijn R V. Micelle to fibre biocatalytic supramolecular transformation of an aromatic peptide amphiphile. Chemical Communications, 2011, **47**(2): 728–730
- [34] Shi J, Du X, Yuan D, *et al.* Enzyme transformation to modulate the ligand-receptor interactions between small molecules. Chemical Communications, 2015, **51**(23): 4899–4901
- [35] Wang H, Luo Z, Wang Y, *et al.* Enzyme-catalyzed formation of supramolecular hydrogels as promising vaccine adjuvants. Advanced Functional Materials, 2016, **26**(26): 1822–1829
- [36] Leckie J, Hope A, Hughes M, *et al.* Nanopropulsion by biocatalytic self-assembly. ACS Nano, 2014, **8**(9): 9580–9589
- [37] Webber M J, Newcomb C J, Bitton R, *et al.* Switching of self-assembly in a peptide nanostructure with a specific enzyme. Soft Matter, 2011, **7**(20): 9665–9672
- [38] Moon H J, Finney J, Ronnebaum T, *et al.* Human lysyl oxidase-like 2. Bioorganic Chemistry, 2014, **57**: 231–241
- [39] Domeradka N E, Werten M W, Wolf F A, *et al.* Protein cross-linking tools for the construction of nanomaterials. Current Opinion in Biotechnology, 2016, **39**(4): 61–67
- [40] Kagan H M, Li W. Lysyl oxidase: properties, specificity, and biological roles inside and outside of the cell. J Cell Biochem, 2003, **88**(4): 660–672
- [41] Bakota E L, Aulisa L, Galler K M, *et al.* Enzymatic cross-linking of a nanofibrous peptide hydrogel. Biomacromolecules, 2011, **12**(1): 82–87
- [42] Kothapalli C R, Ramamurthi A. Lysyl oxidase enhances elastin synthesis and matrix formation by vascular smooth muscle cells. Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, 2009, **3**(8): 655–661
- [43] Bai J, Chen C, Wang J, *et al.* Enzymatic regulation of self-assembling peptide A9K2 nanostructures and hydrogelation with highly selective antibacterial activities. ACS Applied Materials & Interfaces, 2016, **21**(8): 15093–15102
- [44] Wade R J, Bassin E J, Rodell C B, *et al.* Protease-degradable electrospun fibrous hydrogels. Nature Communications, 2015, **6**: 6639–6639
- [45] Chandrawati R. Enzyme-responsive polymer hydrogels for therapeutic delivery. Experimental Biology & Medicine, 2016, **241**(9): 972–979
- [46] Hirst A R, Roy S, Arora M, *et al.* Biocatalytic induction of supramolecular order. Nat Chem, 2010, **2**(12): 1089–1094
- [47] Toledano S, Williams R J, Jayawarna V, *et al.* Enzyme-triggered self-assembly of peptide hydrogels *via* reversed hydrolysis. Journal of the American Chemical Society, 2006, **128**(4): 1070–1071
- [48] Das A K, Collins R, Ulijn R V. Exploiting enzymatic (reversed) hydrolysis in directed self-assembly of peptide nanostructures. Small, 2008, **4**(2): 279–287
- [49] Hughes M, Xu H, Frederix P W, *et al.* Biocatalytic self-assembly of 2D peptide-based nanostructures. Soft Matter, 2011, **7**(21): 10032–10038
- [50] Hughes M, Frederix P W J M, Raeburn J, *et al.* Sequence/structure relationships in aromatic dipeptide hydrogels formed under thermodynamic control by enzyme-assisted self-assembly. Soft Matter, 2012, **8**(20): 5595–5602
- [51] H S, Cheng R, Deng C, *et al.* Enzymatically and reductively degradable α -amino acid-based poly(ester amide)s: synthesis, cell compatibility, and intracellular anticancer drug delivery. Biomacromolecules, 2015, **16**(2): 597–605
- [52] Chronopoulou L, Lorenzoni S, Masci G, *et al.* Lipase-supported synthesis of peptidic hydrogels. Soft Matter, 2010, **6**(11): 2525–2532
- [53] Yang Z, Xu K, Guo Z, *et al.* Intracellular enzymatic formation of nanofibers results in hydrogelation and regulated cell death. Adv Mater, 2007, **19**(20): 3152–3156
- [54] Guo D-S, Wang K, Wang Y-X, *et al.* Cholinesterase-responsive supramolecular vesicle. Journal of the American Chemical Society, 2012, **134**(24): 10244–10250
- [55] Li J, Kuang Y, Shi J, *et al.* Enzyme-instructed intracellular molecular self-assembly to boost activity of cisplatin against drug-resistant ovarian cancer cells. Angewandte Chemie, 2015, **127**(45): 13505–13509
- [56] Li W, Dong K, Ren J, *et al.* A β -lactamase-imprinted responsive hydrogel for the treatment of antibiotic-resistant bacteria. Angewandte Chemie International Edition, 2016, **128**(28): 8181–8185
- [57] Yang Z, Ho P-L, Liang G, *et al.* Using β -lactamase to trigger supramolecular hydrogelation. Journal of the American Chemical Society, 2007, **129**(2): 266–267
- [58] Yang Z, Liang G, Guo Z, *et al.* Intracellular hydrogelation of small molecules inhibits bacterial growth. Angewandte Chemie International Edition, 2007, **46**(43): 8216–8219
- [59] Howes J M, Bihan D, Slatter D A, *et al.* The recognition of collagen and triple-helical toolkit peptides by MMP-13: sequence specificity for binding and cleavage. Journal of Biological Chemistry, 2014, **289**(35): 24091–24101

- [60] Biela A, Watkinson M, Meier U C, *et al.* Disposable MMP-9 sensor based on the degradation of peptide cross-linked Hydrogel films using electrochemical impedance spectroscopy. *Biosensors & Bioelectronics*, 2015, **68**: 660–667
- [61] Hernandezguillamon M, Mawhirt S, Blais S, *et al.* Sequential amyloid- β degradation by the matrix metalloproteases MMP-2 and MMP-9. *Journal of Biological Chemistry*, 2015, **290**(24): 15078–15091
- [62] Van Hove A H, Burke K, Antonienko E, *et al.* Enzymatically-responsive pro-angiogenic peptide-releasing poly(ethylene glycol) hydrogels promote vascularization *in vivo*. *Journal of Controlled Release*, 2015, **217**: 191–201
- [63] Jun H W, Yuwono V, Paramonov S E, *et al.* Enzyme-mediated degradation of peptide-amphiphile nanofiber networks. *Adv Mater*, 2005, **17**(21): 2612–2617
- [64] Chau Y, Luo Y, Cheung A C Y, *et al.* Incorporation of a matrix metalloproteinase-sensitive substrate into self-assembling peptides - A model for biofunctional scaffolds. *Biomaterials*, 2008, **29**(11): 1713–1719
- [65] Yang Z M, Ma M L, Xu B. Using matrix metalloprotease-9 (MMP-9) to trigger supramolecular hydrogelation. *Soft Matter*, 2009, **5**(13): 2546–2548
- [66] Kalafatovic D, Nobis M, Son J, *et al.* MMP-9 triggered self-assembly of doxorubicin nanofiber depots halts tumor growth. *Biomaterials*, 2016, **98**: 192–202
- [67] Zhu Z, Lanier T C, Farkas B E, *et al.* Transglutaminase and high pressure effects on heat-induced gelation of Alaska pollock (Theragra chalcogramma) surimi. *Journal of Food Engineering*, 2014, **131**(3): 154–160
- [68] Li J, Liu X, Chu H, *et al.* Specific dephosphorylation of Janus Kinase 2 by protein tyrosine phosphatases. *Proteomics*, 2015, **15**(1): 68–76
- [69] Levine P M, Craven T W, Bonneau R, *et al.* Semisynthesis of peptoid-protein hybrids by chemical ligation at serine. *Organic Letters*, 2014, **16**(2): 512–515
- [70] Ratnikov B I, Cieplak P, Gramatikoff K, *et al.* Basis for substrate recognition and distinction by matrix metalloproteinases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, **111**(40): 4148–4155
- [71] Tanaka A, Fukuoka Y, Morimoto Y, *et al.* Cancer cell death induced by the intracellular self-assembly of an enzyme-responsive supramolecular gelator. *Journal of the American Chemical Society*, 2015, **137**(2): 770–775
- [72] Roskoski R. Src protein-tyrosine kinase structure, mechanism, and small molecule inhibitors. *Pharmacological Research*, 2015, **94**: 9–25
- [73] Khelfallah N S, Decher G, Mésini P J. Synthesis of a new PHEMA/PEO enzymatically biodegradable hydrogel. *Macromol Rapid Comm*, 2006, **27**(13): 1004–1008
- [74] Zhou J, Du X, Gao Y, *et al.* Aromatic-aromatic interactions enhance interfiber contacts for enzymatic formation of a spontaneously aligned supramolecular hydrogel. *Journal of the American Chemical Society*, 2014, **136**(8): 2970–2973
- [75] Lee S, Pant H C, Shea T B. Divergent and convergent roles for kinases and phosphatases in neurofilament dynamics. *Journal of Cell Science*, 2014, **127**(18): 4064–4077
- [76] Scott F, Ulijn R V. Design of nanostructures based on aromatic peptide amphiphiles. *Chem Soc Rev*, 2014, **46**(6): 8150–8177
- [77] Hartgerink J D, Beniash E, Stupp S I. Self-assembly and mineralization of peptide-amphiphile nanofibers. *Science*, 2001, **294**(5547): 1684–1688
- [78] Zheng W, Gao J, Song L, *et al.* Surface-induced hydrogelation inhibits platelet aggregation. *Journal of the American Chemical Society*, 2013, **135**(1): 266–271
- [79] Mahler A, Reches M, Rechter M, *et al.* Rigid, self-assembled hydrogel composed of a modified aromatic dipeptide. *Adv Mater*, 2006, **18**(11): 1365–1370
- [80] Johnson L L, Dyer R, Hupe D J. Matrix metalloproteinases. *Current Opinion in Chemical Biology*, 1998, **2**(4): 466–471
- [81] Heath D J, Christian P, Griffin M. Involvement of tissue transglutaminase in the stabilisation of biomaterial/tissue interfaces important in medical devices. *Biomaterials*, 2002, **23**(6): 1519–1526
- [82] Ghadiali J E, Cohen B E, Stevens M M. Protein kinase-actuated resonance energy transfer in quantum dot-peptide conjugates. *ACS Nano*, 2010, **4**(8): 4915–4919
- [83] Ghadiali J E, Lowe S B, Stevens M M. Quantum-dot-based FRET detection of histone acetyltransferase activity. *Angewandte Chemie*, 2011, **123**(15): 3479–3482
- [84] Bonomi R, Cazzolaro A, Sansone A, *et al.* Detection of enzyme activity through catalytic signal amplification with functionalized gold nanoparticles. *Angewandte Chemie International Edition*, 2011, **50**(10): 2307–2312
- [85] Privman M, Tam T K, Pita M, *et al.* Switchable electrode controlled by enzyme logic network system: approaching physiologically regulated bioelectronics. *Journal of the American Chemical Society*, 2008, **131**(3): 1314–1321
- [86] Gordijo C R, Koulajian K, Shuhendler A J, *et al.* Nanotechnology-enabled closed loop insulin delivery device: *in vitro* and *in vivo* evaluation of glucose-regulated insulin release for diabetes control. *Advanced Functional Materials*, 2011, **21**(1): 73–82
- [87] Gordijo C R, Shuhendler A J, Wu X Y. Glucose-responsive bioinorganic nanohybrid membrane for self-regulated insulin release. *Advanced Functional Materials*, 2010, **20**(9): 1404–1412
- [88] Liu J S, Du X Z, Zhang X F. Enzyme-inspired controlled release of cucurbituril nanovalves by using magnetic mesoporous silica. *Chem-Eur J*, 2011, **17**(3): 810–815
- [89] Zhang H, Fei J, Yan X, *et al.* Enzyme-responsive release of doxorubicin from monodisperse dipeptide-based nanocarriers for highly efficient cancer treatment *in vitro*. *Advanced Functional Materials*, 2014, **25**(8): 1193–1204
- [90] Shi J, Du X, Huang Y, *et al.* Ligand-receptor interaction catalyzes the aggregation of small molecules to induce cell necroptosis. *Journal of the American Chemical Society*, 2014, **137**(1): 26–29
- [91] Pires R A, Abul-Haija Y M, Costa D S, *et al.* Controlling cancer

- cell fate using localized biocatalytic self-assembly of an aromatic carbohydrate amphiphile. *Journal of the American Chemical Society*, 2015, **137**(2): 576–579
- [92] Feng Z, Wang H, Du X, *et al.* Minimal C-terminal modification boosts peptide self-assembling ability for necroptosis of cancer cells. *Chemical Communications*, 2016, **52**(37): 6332–6335
- [93] Kuang Y, Long M J, Zhou J, *et al.* Prion-like nanofibrils of small molecules (PriSM) selectively inhibit cancer cells by impeding cytoskeleton dynamics. *Journal of Biological Chemistry*, 2014, **289**(42): 29208–29218
- [94] Kuang Y, Shi J, Li J, *et al.* Pericellular hydrogel/nanonets inhibit cancer cells. *Angewandte Chemie International Edition*, 2014, **53**(31): 8104–8107
- [95] Yang C, Bian M, Yang Z. A polymer additive boosts the anti-cancer efficacy of supramolecular nanofibers of taxol. *Biomaterials Science*, 2014, **2**(5): 651–654
- [96] Salick D A, Pochan D J, Schneider J P. Design of an injectable β -hairpin peptide hydrogel that kills methicillin-resistant staphylococcus aureus. *Adv Mater*, 2009, **21**(41): 4120–4123
- [97] Veiga A S, Sinthuvanich C, Gaspar D, *et al.* Arginine-rich self-assembling peptides as potent antibacterial gels. *Biomaterials*, 2012, **33**(35): 8907–8916
- [98] Zumstein M T, Kohler H E, Mcneill K, *et al.* Enzymatic hydrolysis of polyester thin films: real-time analysis of film mass changes and dissipation dynamics. *Environmental Science & Technology*, 2015, **50**(1): 197–206
- [99] Cao F Y, Fan J X, Long Y, *et al.* A smart fluorescence nanoprobe for the detection of cellular alkaline phosphatase activity and early osteogenic differentiation. *Nanomedicine Nanotechnology Biology & Medicine*, 2016, **12**(5): 1313–1322
- [100] Li S Y, Liu L H, Cheng H, *et al.* A dual-FRET-based fluorescence probe for the sequential detection of MMP-2 and caspase-3. *Chemical Communications*, 2015, **51**(77): 14520–14523
- [101] Zhou J, Du X, Berciu C, *et al.* Enzyme-instructed self-assembly for spatiotemporal profiling of the activities of alkaline phosphatases on live cells. *Chem*, 2016, **1**(2): 246–263
- [102] Xu T, Liang C, Ji S, *et al.* Surface-induced hydrogelation for fluorescence and naked-eye detections of enzyme activity in blood. *Analytical Chemistry*, 2016, **88**(14): 7318–7323
- [103] Abe H, Goto M, Kamiya N. Enzymatic single-step preparation of multifunctional proteins. *Chemical Communications*, 2010, **46**(38): 7160–7162
- [104] Gao J, Shi Y, Wang Y, *et al.* Enzyme-controllable F-NMR turn on through disassembly of peptide-based nanospheres for enzyme detection. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2014, **12**(9): 1383–1386
- [105] Ren C, Zhang J, Chen M, *et al.* Self-assembling small molecules for the detection of important analytes. *Chemical Society Reviews*, 2014, **43**(21): 7257–7266
- [106] Jie Z, Du X, Yamagata N, *et al.* Enzyme-instructed self-assembly of small d-peptides as a multiple-step process for selectively killing cancer cells. *Journal of the American Chemical Society*, 2016, **138**(11): 3813–3823
- [107] Zhou J, Du X, Xu B. Regulating the rate of molecular self-assembly for targeting cancer cells. *Angewandte Chemie International Edition*, 2016, **128**(19): 5864–5869
- [108] Pappas C G, Sasselli I R, Ulijn R V. Biocatalytic pathway selection in transient tripeptide nanostructures?. *Angewandte Chemie*, 2015, **54**(28): 8119–8123
- [109] Scott F, Ulijn R V. Design of nanostructures based on aromatic peptide amphiphiles. *Chemical Society Reviews*, 2014, **43** (23): 8150–8177

Progress in Enzyme Responsive Peptide Hydrogel and Its Applications*

BAI Jing-Kun^{1,2)**}, SHENG Cheng-Le²⁾, ZHANG Yu¹⁾, WANG Jing-Xin¹⁾

¹⁾ Center for Bioengineering & Biotechnology, China University of Petroleum (East China), Qingdao 266580, China;

²⁾ Department of Pharmaceutical and Biological Engineering, Zibo Vocational Institute, Zibo 255314, China)

Abstract Enzyme responsive peptide hydrogel has been an emerging hot issue in the field of material. It can be used for the release of controlled release drug, and it has antibacterial and anti-tumor effect. In this paper, enzyme responsive hydrogel systems of peptides developed at home and abroad in recent years were summarized. Several enzymes that catalyze the material's response were introduced emphatically, including transglutaminase, kinase, phosphatase, lysyl oxidase (plasma amine oxidase), protease, esterase, β -lactamase and matrix metalloproteinase. Under their catalysis, the macroscopic structure of the hydrogel changes, such as the formation, destruction or dynamic translation of the hydrogel; furthermore, their catalyzing mechanisms were summarized. In addition, the applications of enzyme responsive peptide hydrogel were introduced. It had broad prospects for development, which was one of the developing directions of intelligent response materials in the future.

Key words enzyme, peptide, hydrogel, application

DOI: 10.16476/j.pibb.2016.0224

* This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China(21373270, 21503275).

**Corresponding author.

Tel: 86-532-86981131, E-mail: jkbaizg@163.com

Received: July 13, 2016 Accepted: September 30, 2016