

# 磁珠固定化凝血酶的制备 及其在槐米活性化合物筛选中的应用

张波<sup>1</sup>,胡瑾洁<sup>2</sup>,白小琳<sup>2</sup>,廖循<sup>2\*</sup>,侯梅芳<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>上海应用技术大学生态技术与工程学院,上海 201418;<sup>2</sup>中国科学院成都生物研究所;成都 610041

**摘要:**槐米是药食两用植物,有清肝明目和凉血止血之功效;其主要化学成分为黄酮类物质,具有抗氧化、抗凝血、降血压等多种生物活性。本文将凝血酶(THR)固定于氨基修饰的磁珠表面,以其为亲和固相萃取吸附剂,开发出一种快速筛选中药中凝血酶抑制剂的方法。首先合成了表面修饰氨基的磁珠,然后以戊二醛作为交联剂将凝血酶共价固定于磁珠表面得到磁珠固定化的凝血酶(MNP@THR)。利用TEM,VSM,FT-IR等对合成的固定化酶进行了表征,同时获得了优化的合成条件为:THR浓度200 μg/mg,pH值7.0,时间60 min,温度37℃为最佳合成条件,此时酶的固定化量为65 μg/mg。利用MNP@THR从槐米提取物中特异性地吸附得到两个活性化合物,并通过磁分离进行前处理后,由HPLC-ESI-MS鉴定其分别为槲皮素和芦丁。通过体外酶活抑制实验测出,槲皮素具有较好的抑制活性,其半数抑制浓度IC<sub>50</sub>为16.6 ± 0.68 μM;芦丁的凝血酶抑制活性较弱,IC<sub>50</sub>值为1.5 ± 0.14 mM。

**关键词:**固定化凝血酶;槐米;抑制剂筛选;亲和吸附

中图分类号:R917

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2018.10.024

## Preparation of Immobilized Thrombin and Its Application in Screening and Analyzing Bioactive Compounds from *Flos Sophorae Immaturus*

ZHANG Bo<sup>1</sup>,HU Jin-jie<sup>2</sup>,BAI Xiao-lin<sup>2</sup>,LIAO Xun<sup>2\*</sup>,HOU Mei-fang<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>The Ecological Technique and Engineering College,Shanghai Institute of Technology,Shanghai 201418,China

<sup>2</sup>Chengdu Institute of Biology,Chinese Academy of Sciences,Chengdu 610041,China

**Abstract:** *Flos Sophorae Immaturus* is an edible and medicinal plant, which has long been used in traditional Chinese Medicines for cleaning the liver and brightening the eye and cooling the blood. It contains a large number of flavonoids which possess various biological activities such as antioxidant, anticoagulation and hypotensive. In this work, a method for fat screening of thrombin ligands from traditional Chinese medicine by using immobilized thrombin as solid phase extraction adsorbent was developed. Thrombin (THR) was immobilized on the surface of amino-modified magnetic nanoparticles (MNP@THR) using glutaraldehyde as cross-linking agent. The immobilized enzyme were characterized by TEM, VSM, FTIR. And the optimal synthetic conditions were THR 200 μg/mg, pH 7.0, 35 °C and 60 min, on which the thrombin immobilization is 65 μg/mg. The prepared MNPs@THR could bind specifically the bioactive compounds existed in the *Flos Sophorae Immaturus* extracts. After magnetic separation, two active compounds extracted with MNP@THR were identified as quercetin and rutin by means of HPLC-ESI-MS. According to the enzymatic activity assay, quercetin was found to possess better inhibitory activity than rutin, with IC<sub>50</sub> of 16.6 ± 0.68 μM, while the one for rutin is 1.5 ± 0.14 mM.

**Key words:** immobilized thrombin; *Flos Sophorae Immaturus*; inhibitor screening; affinity adsorption

槐树属于豆科槐属植物,是一种落叶乔木,广泛分布在中国、日本、韩国、越南等国家。在中国药典

和欧洲药典中对槐树的使用都有记载。槐树的花蕾在传统中药中被称为槐米,具有药食两用的价值<sup>[1]</sup>。槐米含大量黄酮类化合物,现代药理研究表明,槐米中所含的芦丁对防止脑溢血和高血压等心脑血管疾病具有良好的功效,同时对微粒体和神经细胞的氧化损伤具有良好的保护作用<sup>[2]</sup>;槲皮素具

收稿日期:2017-10-16 接受日期:2018-02-07

基金项目:中国科学院 STS 项目(ZSTH-007)

\* 通信作者 Tel:86-28-82890402;E-mail:liaoXun@cib.ac.cn, mlfhou@sit.edu.cn

有抗炎、抗氧化、抗过敏、抗菌、抗病毒等多方面的药理作用<sup>[3]</sup>。其他黄酮类物质如山柰酚、染料木素、异鼠李素及其糖苷等对心脑血管都具有一定的保护作用<sup>[4]</sup>。

血栓性疾病又称血栓栓塞性疾病,由血栓形成和血栓栓塞两种病理过程所引起,有极高的死亡率和发病率<sup>[5]</sup>。凝血酶在血栓形成过程中起着重要作用,凝血酶可以激活血小板,将纤维蛋白原解离形成纤维蛋白,进而导致血凝块的形成。反馈调节激活凝血因子V、VII、XI,进一步促进血液凝固<sup>[6]</sup>。临床上常用的抗凝防栓药有肝素、华法林、阿加曲班、希美加群等药物,但对患者长期的临床观测可知,这些药物具有一定的副作用<sup>[7-10]</sup>。从天然来源的药用动植物中寻找安全有效的活性物质(例如水蛭素<sup>[11-13]</sup>),是开发抗凝药物的必要途径,对于阐明其治疗血栓性疾病的物质基础,有效利用中药材资源具有重要意义。

固定化酶能够保持酶在极端条件(强酸、强碱、高离子浓度等)的稳定性,同时具有易于分离、可重复利用、降低反应成本等优点<sup>[14]</sup>。近年来已有用固定化酶作为亲和固相萃取吸附剂筛选传统中药酶抑制剂的相关报道<sup>[15-19]</sup>。本研究以戊二醛作为交联剂把凝血酶固定在氨基修饰的磁珠表面,制备得到固定化的磁珠。我们首次用此固定化凝血酶对槐米提取液进行研究,经亲和吸附得到与凝血酶特异性结合的活性物质,通过磁分离得到活性物质后,结合HPLC-ESI-MS鉴定出槐米中的凝血酶抑制剂的化学结构。

## 1 材料与仪器

### 1.1 材料与试剂

#### 1.1.1 植物材料

槐米购自北京同仁堂,80%甲醇回流提取备用。

#### 1.1.2 试剂和仪器

1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC·HCl)和N-羟基丁二酰亚胺(NHS)(西格玛化工有限公司);凝血酶(大连美仑生物技术有限公司);凝血酶发色底物S-2238(北京艾德豪克国际技术有限公司);阿加曲班(上海百舜生物科技有限公司);原硅酸四乙酯(TEOS)和3-氨丙基三甲氧基硅烷(APTMS)(梯希爱化成工业发展有限公司);三氯化铁、氧化亚铁、戊二醛、二甲基亚砷(天津科密欧化工试剂有限公司);芦丁和槲皮素(自制),其他试

剂均为分析纯(成都恒信化学试剂有限公司)。

岛津 LC-20A 高效液相色谱仪(日本岛津有限公司);全波长扫描式多功能读数仪(赛默飞世尔科技有限公司);电喷雾离子源离子阱质谱检测器(赛默飞世尔科技公司);超声波细胞粉碎机(上海比朗仪器有限公司);pHS-3 型数字式酸度计(上海雷磁仪器有限公司);傅立叶变换红外光谱仪(美国珀金埃尔默有限公司);透射电子显微镜(日本经营电子电气公司);振动样品磁强计(德国威乐有限公司)。

## 2 实验方法

### 2.1 固定化酶合成条件优化

#### 2.1.1 固定化酶的制备

在磷酸盐缓冲液(0.1 M, pH = 7.0)中,用戊二醛作为交联剂,把凝血酶固定在氨基修饰的磁珠表面。固定凝血酶(MNPs@THR)的操作步骤如下:首先通过共沉淀法合成四氧化三铁磁性( $Fe_3O_4$ )纳米粒子,然后用TEOS通过油包水反相乳液法在纳米粒子表面涂覆一层二氧化硅,再使用APTMS把氨基接在硅胶的末端<sup>[20]</sup>,最后用戊二醛作为交联剂,制备得到醛基修饰的磁珠。最后把合成的磁珠溶于缓冲液(0.1 M, pH = 7.0)中,加入一定体积的凝血酶,在涡旋振荡器上反应制备得到MNP@THR。

#### 2.1.2 酶活力与酶固定化量的测定

凝血酶能够水解H-D-Phe-Pip-Arg-pNA·2HCl(凝血酶发色底物S-2238)产生对硝基苯胺(pNA)。用酶标仪测定不同浓度的pNA(0.05~0.5 mM)在405 nm处的紫外吸光度绘制产品的标准曲线。凝血酶体外活性测定如下<sup>[21]</sup>:将凝血酶和凝血酶发色底物S-2238分别溶解在磷酸缓冲液中,得到质量浓度为0.12 mg/mL(2.77 U/mL)的酶溶液和摩尔浓度为4 mM底物溶液。然后吸取10  $\mu$ L酶液、170  $\mu$ L的磷酸缓冲液加在96孔板中,在37  $^{\circ}$ C 孵育10 min,再加入20  $\mu$ L凝血酶底物,以不加酶液作为空白对照,每孔每分钟读一次,读取10个测量值即可结束测量。所有的测定重复进行三次,最终取值为平均值 $\pm$ 标准偏差。根据标准曲线,计算出pNA浓度。按照以下公式计算酶活力。

$$X = \frac{C_{pNA} \times V_{\text{总}}}{C_{\text{THR}} \times V_{\text{THR}} \times t}$$

公式中X表示酶的活力,单位为U/mg;其中 $C_{pNA}$ 表示生成底物的浓度; $V_{\text{总}}$ 表示反应体系的总体积; $C_{\text{THR}}$ 表示加入的酶的浓度; $V_{\text{THR}}$ 表示加入酶的体

积;  $t$  为反应时间。

同时按照上述的方法测定固定化酶的活性,其中酶液是固定化酶的溶液,以空白磁珠作为空白对照,测定固定化酶的活力。其中用  $R(\%)$  表示固定化酶的相对活力:定义为固定化酶的活力与游离酶的活性的比值的百分数。

以牛血清蛋白为标准蛋白,通过考马斯亮蓝法,用紫外可见光分光光度计测定波长 595 nm 下标准溶液(0、0.02、0.04、0.06、0.08、0.1 mg/mL)的吸光度,建立标准曲线,然后再用同样方法测定固定前、后溶液中游离的凝血酶的蛋白质含量,计算酶的固定化量。

### 2.1.3 固定化酶条件的优化

由于酶在固定化的过程中,酶的活力与酶的固定化量会受到酶浓度、缓冲液的 pH 值、以及合成时间与温度等外部条件的影响。在磁珠的质量浓度为 3 mg/mL 时考察 THR 的浓度(100、150、200、250、300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )。在确定了酶的浓度下,考察溶液 pH 值(6.0、6.5、7.0、7.5、8.0)对固定化过程影响;其他条件一定时考察反应时间(30、60、90、120、150 min)对其影响;考察了温度(25、30、35、40、45  $^{\circ}\text{C}$ )对固定化过程的影响。

### 2.2 合成材料的表征及酶固定化量的测定

用振动样品磁强计(VSM)对合成的  $\text{MNP}@ \text{SiO}_2$ 、 $\text{MNP}@ \text{SiO}_2@ \text{CHO}$ 、 $\text{MNP}@ \text{SiO}_2@ \text{CHO}@ \text{THR}$  进行磁学性能表征;用傅立叶红外光谱仪对  $\text{MNP}@ \text{SiO}_2@ \text{CHO}$  和  $\text{MNP}@ \text{SiO}_2@ \text{CHO}@ \text{THR}$  进行官能团表征;用透射电子显微镜对醛基和凝血酶修饰的磁性纳米粒子进行微观形态表征。以牛血清蛋白为标准蛋白,通过考马斯亮蓝法,用紫外可见光分光光度计测定波长 595 nm 下标准溶液(0、0.02、0.04、0.06、0.08、0.1 mg/mL)的吸光度,建立标准曲线,然后再用同样方法测定固定前、后溶液中游离的凝血酶的蛋白质含量,计算酶的固定化量。

### 2.3 制备槐米提取物

称取 1.0 g 槐米粉末,溶于 40 mL 80% 的甲醇中,超声破碎 30 min,过滤后取上清液浓缩至干,然后溶于一定体积磷酸缓冲液(0.1 M, pH = 7.0)中,制备的溶液为  $S_0$ ,浓度为 0.5 mg/mL。

### 2.4 槐米提取物中活性化合物的固相萃取

HPLC 分析槐米提取物中的化合物;使用 Tianhe  $C_{18}$ (4.6 mm  $\times$  250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ),以 0.1% 甲酸水溶液-甲醇为流动相梯度洗脱(表 1),检测波长为 280

nm,柱温 35  $^{\circ}\text{C}$ ,流速为 1.0 mL/min;流动相 A: 0.1% 甲酸水溶液;流动相 B: 甲醇;梯度洗脱程序:0 ~ 50 min, 20% ~ 100% B; 50 ~ 55 min, 100% ~ 100% B; 55 ~ 60 min, 100% ~ 20% B。

将 10.0 mg  $\text{MNP}@ \text{thr}$  和 3 mL 的  $S_0$ (0.5 mg/mL)溶液混合加入 5 mL 的离心管中,涡旋振荡孵育 30 min,磁分离倒掉上清液;然后再用磷酸缓冲液重复清洗三次,最后用 500  $\mu\text{L}$  乙腈洗脱,乙腈洗脱后得到的溶液命名为  $S_5$ ,取出垂钓液供 HPLC 和 HPLC-ESI-MS 分析。

采用负离子模式得到 ESI-MS 质谱图,质谱检测器参数为雾化壳气为氮气 35 units,毛细管温度 250  $^{\circ}\text{C}$ ,毛细管电压 2.5 kV,碰撞气为氦气碰撞能量范围为 35% ~ 50%,进样速度为 0.3 mL/min,所有数据采集和处理采用 Finnigan Xcalibur<sup>TM</sup> cour data system Rev. 1.2 (ThermoQuest LC/MS Division),梯度洗脱程序如上。

### 2.5 凝血酶抑制实验

阳性对照阿加曲班、芦丁和槲皮素的凝血酶抑制活性测定如下:将三种化合物配置成一定浓度梯度的溶液(1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、10.0 mM),分别取 20  $\mu\text{L}$  加入 96 孔板中,再分别加入 10  $\mu\text{L}$  酶液、150  $\mu\text{L}$  的磷酸缓冲液,37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 10 min,然后再加入 20  $\mu\text{L}$  凝血酶底物,在波长 405 nm 处,通过酶标仪测定底物生成对硝基苯胺量,每小孔每分钟读一次,读取 10 个测量值即可结束测量,每个小孔重复三次,计算出阿加曲班、芦丁和槲皮素对凝血酶的抑制率。设不加样品的吸光度为  $C_0$ ,加样品的之后的吸光度为  $C_1$ ,凝血酶抑制率的计算公式为  $1 - C_1/C_0$ 。

分别配制 0.12 mg/mL 的凝血酶溶液和浓度接近  $\text{IC}_{50}$  值的抑制剂溶液,以不加抑制剂作为对照组,加抑制剂作为实验组,测定底物浓度为 0.5、1、1.5、2、4 mM 时的酶反应速率,然后以横坐标为底物的倒数  $1/[S]$ ,纵坐标为酶反应速率的倒数  $1/V$ ,做 Lineweaver-Burk 双倒数作图,然后根据对照组与实验组的交点位置判定抑制剂的抑制类型。

## 3 结果和分析

### 3.1 固定化酶的条件优化与表征

如图 1 所示:凝血酶固定的最佳反应条件为:THR 浓度 200  $\mu\text{g}/\text{mg}$ ,缓冲液 pH 值为 7.0,反应时间为 60 min,反应温度为 37  $^{\circ}\text{C}$ 。此时固定化凝血酶相对活力为 30.4%,酶的固定化量为 65.5  $\mu\text{g}/\text{mg}$ 。

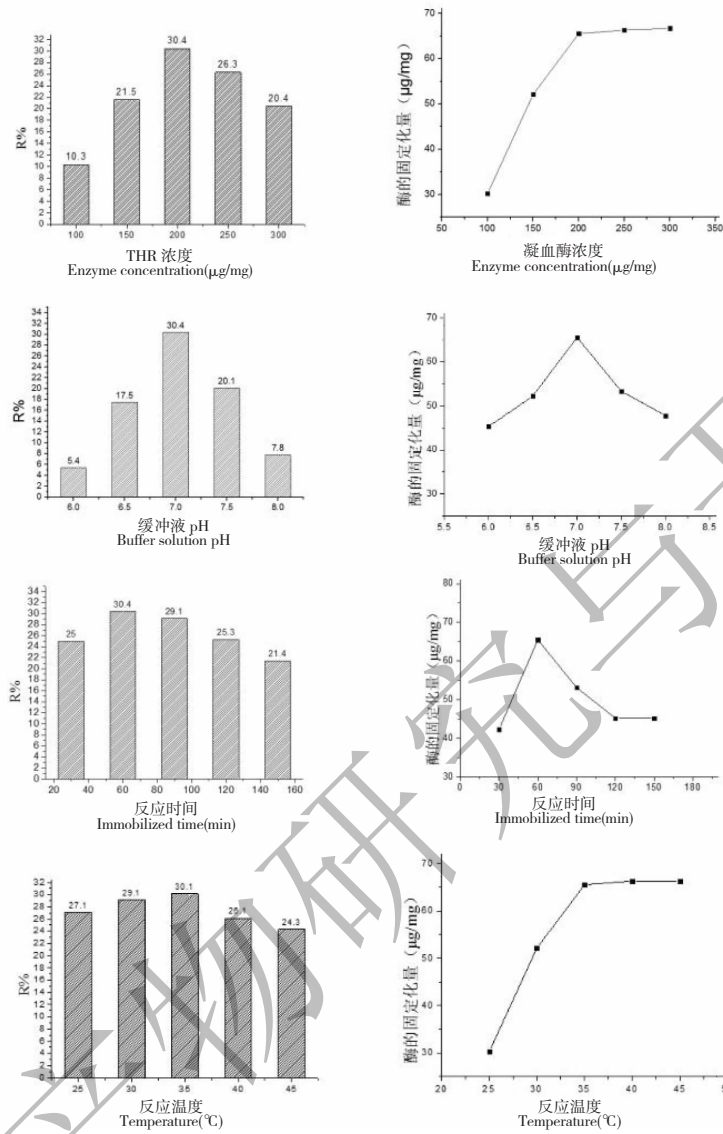


图1 THR 浓度、缓冲液 pH 值、反应时间和温度对凝血酶相对活性和固定化量的影响

Fig. 1 Influence of enzyme concentration,buffer solution pH,immobilized time and temperature on the immobilized thrombin activity and immobilized amounts

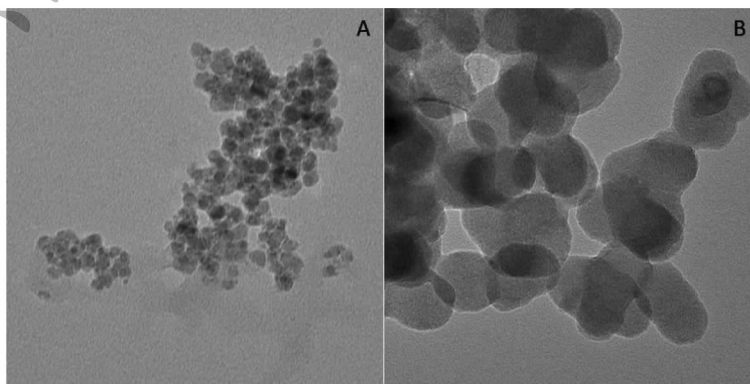


图2 MNPs@CHO (A) 和 MNPs@THR (B) 的透射电镜表征图

Fig. 2 TEM images of MNPs@CHO (A) and MNPs@THR (B)

从图2(A)可以看出磁珠粒径均一,直径约为22 nm。磁性纳米粒子存在一定程度的聚集。图B能够看到凝血酶修饰的磁珠边界变得模糊,表面透明,同时直径约为52 nm,这说明凝血酶成功的固定在了磁珠的表面。

利用傅里叶变换红外分光光度计分别对 MNP@CHO 和 MNP@THR 进行表征,如图3所示。两种磁性纳米复合物在  $580\text{ cm}^{-1}$  处的红外吸收峰归属于 Fe-O 键的伸缩振动,  $1047\text{ cm}^{-1}$  处的吸收峰是 Si-O-Si 键的不对称伸缩振动,图3B中的  $1457$ 、 $1585$ 、 $1665\text{ cm}^{-1}$  处的吸收峰分别是酰胺键中 C-N 键的弯曲振动、N-H 键弯曲振动和 C=O 键的伸缩振动,这三个吸收峰即为凝血酶的特征吸收峰;  $2852\text{ cm}^{-1}$  处的峰归属甲基中 C-H 的对称振动;  $2923\text{ cm}^{-1}$  处的峰归属于亚甲基 C-H 键的非对称伸缩振动<sup>[22]</sup>,说明凝血酶成功的固定在磁珠表面。

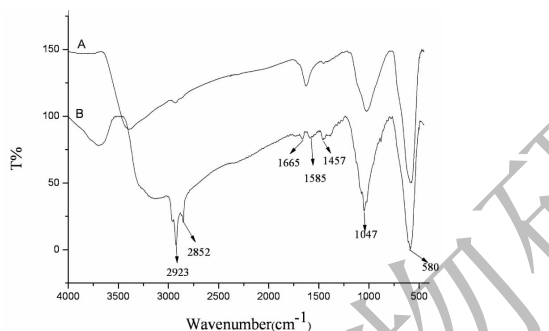


图3 MNP@CHO (A) 和 MNP@THR (B) 的红外图谱

Fig. 3 FTIR spectra of MNP@CHO (A) and MNP@THR

在室温下通过 VSM 分析 MNP@SiO<sub>2</sub>、MNP@CHO 和 MNP@THR 的磁学性质,结果如图4所示。MNP@SiO<sub>2</sub>、MNP@CHO 和 MNP@THR 的磁饱和强度分别为  $54.75$ 、 $44.52$  和  $24.85\text{ emu g}^{-1}$ ,磁饱和

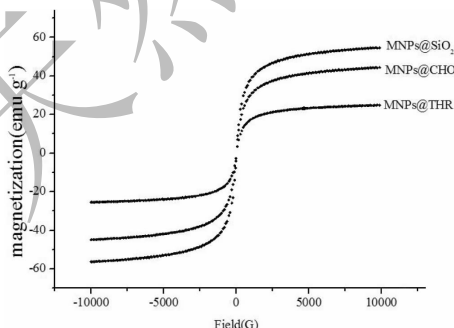


图4 MNP@SiO<sub>2</sub>、MNP@CHO 和 MNP@THR 的磁滞曲线

Fig. 4 VSM patterns of MNP@SiO<sub>2</sub>、MNP@CHO and MNP@THR

强度的依次减弱表明 MNP 磁珠依次被醛基和凝血酶修饰。该结果和上述的 FT-IR 结果相一致,表明凝血酶成功地固定在磁珠表面。

### 3.2 槐米提取物中凝血酶抑制剂的筛选实验

凝血酶能够催化底物凝血酶发色底物 S-2238。水解产生对硝基苯胺,通过测定对硝基苯胺的量能够得到凝血酶的活性。将游离酶、MNP@THR 分别与底物混合反应,分别测定产生对硝基苯胺的量,测得的活性大小为游离酶 > MNP@THR,能够说明固定化凝血酶(MNP@THR)具有游离酶的活性。因此可以使用 MNP@THR 进行后续的实验。

槐米提取物(S<sub>0</sub>)和筛选试验的结果(S<sub>5</sub>)的高效液相色谱如图5所示,对富集出来的 S5 进行液质

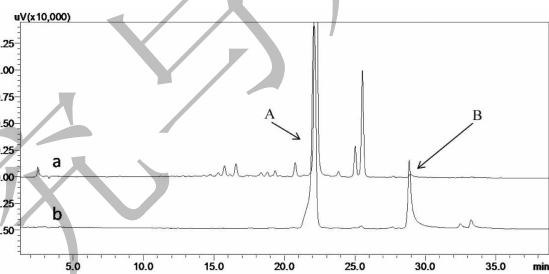


图5 槐米提取物(a) S<sub>0</sub> 和垂钓洗脱液(b) S<sub>5</sub> 的高效液相色谱图

Fig. 5 The HPLC chromatograms of (a) the *Sophora japonica* extract (S<sub>0</sub>) and the (b) acetonitrile eluent from MNP@THR after extraction (S<sub>5</sub>)

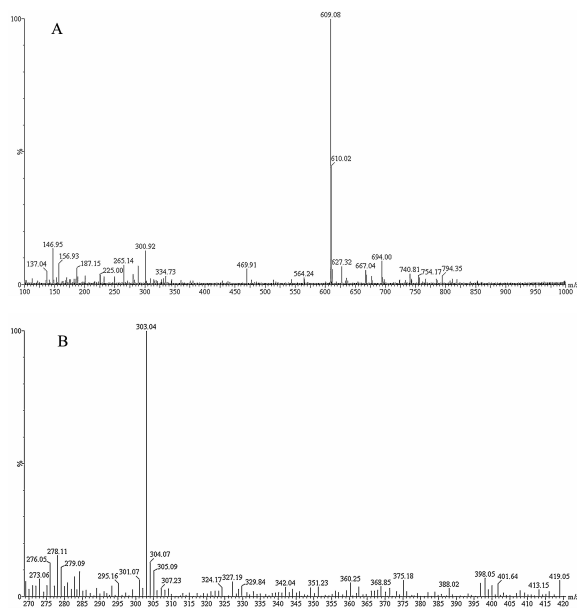


图6 A 与 B 化合物 HPLC-ESI-MS 分析

Fig. 6 HPLC-ESI-MS analysis of compound A and B

联用分析。如图6所示:主峰A所代表的化合物  $m/z$  609.08  $[M - H]^-$ , 主峰B所代表的化合物  $m/z$  303.94  $[M - H]^+$  被“垂钓”出。化合物A和B的质谱数据, 结合与标准品的 HPLC 保留时间的对照, 这两个化合物分别被鉴定为芦丁和槲皮素。在  $S_5$  中含有大量的芦丁和槲皮素, 说明固定化的凝血酶能通过生物亲和作用特异性地结合槐米提取液中的凝血酶抑制剂槲皮素和芦丁, 表明利用固定化的凝血酶从中药提取液中筛选活性小分子的方法是可行的。

### 3.3 筛选化合物的抑制活性

据报道黄酮类物质例如芦丁和槲皮素具有很好

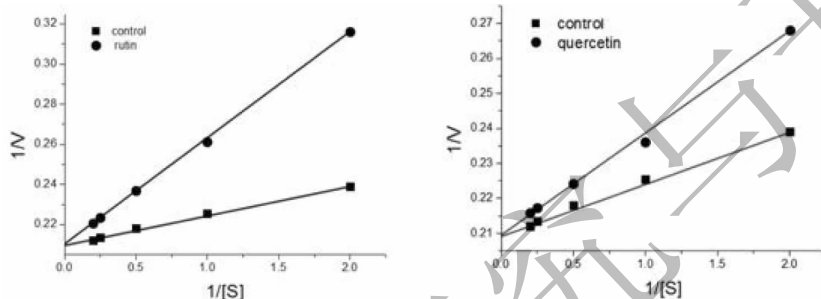


图7 芦丁和槲皮素对凝血酶的抑制类型

Fig. 7 Inhibition types of rutin and quercetin on thrombin

## 4 结论

本文用共沉淀法合成了磁珠, 用戊二醛作为交联剂将凝血酶固定在磁性纳米粒子表面。通过对凝血酶合成条件的优化, 得到了凝血酶最佳的固定条件: THR 浓度  $200 \mu\text{g}/\text{mg}$ , 缓冲液 pH 值为 7.0, 反应时间为 60 min, 反应温度为  $37^\circ\text{C}$ 。酶的固定化量为  $65.5 \mu\text{g}/\text{mg}$ ; 固定化凝血酶的活力为自由酶的 30.4%。通过对磁珠和固定化酶的红外图谱和磁滞曲线的对比分析, 证明凝血酶成功固定在磁珠表面。我们以该磁珠固定化的凝血酶为亲和固相萃取吸附剂, 结合 HPLC-MS 的手段开发了从中药提取液中快速分离酶抑制剂的方法。以槐米提取液为研究对象, 从中鉴定出两个活性成分: 芦丁和槲皮素。该方法操作简便, 不需要用柱层析法对浸膏进行系统分离, 也可避免提取物在分离过程中变质的可能, 具有高效、高通量的潜力, 具有广阔的应用前景。

### 参考文献

1 Wang LY, Ma YQ, Yu ZB, et al. Nourishment of flos sophorae and study of instant drink made from it [J]. *Chin Agric Sci Bull* (中国农学通报), 2008, 24: 70-73.

的凝血酶抑制活性, 槐米中含有大量的芦丁和槲皮素, 槐米也常用来用于治疗与出血有关的疾病。本实验利用固定化的凝血酶从槐米提取物中成功筛选出了芦丁和槲皮素。用阿加曲班作为阳性对照, 通过测定凝血酶发色底物 S-2238 产生对硝基苯胺的量, 能够得到阿加曲班的  $IC_{50}$  值为  $0.984 \pm 0.055 \mu\text{M}$ 。槲皮素对凝血酶有较强的抑制活性,  $IC_{50}$  值为  $16.6 \pm 0.68 \mu\text{M}$ , 芦丁的凝血酶抑制活性较弱,  $IC_{50}$  值为  $1.5 \pm 0.14 \text{ mM}$ 。两种抑制剂对凝血酶的抑制类型见图 7, 槲皮素和芦丁对凝血酶均表现为竞争性抑制。

2 Lu YH (卢艳花), Du ZB (杜长斌), Liu JW (刘建文), et al. Protective effects of flos sophorae immaturus on lipid peroxidation and trauma of neuronal cells [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2003, 23: 846-847.

3 Luo MX (骆明旭), Luo D (罗丹), Zhao WH (赵万红). Research progress on pharmacological action of quercetin [J]. *Chin J Ethnomed Ethnopharm* (中国民族民间医药), 2014, 17: 12-14.

4 Liu YY (刘元昀), Liu HM (刘会敏), Wang J (王憬), et al. Investigation of the contents of main flavonoid aglycones in flos sophorae immaturus [J]. *J Hebei Normal Univ: Nat Sci Ed* (河北师范大学学报), 2015, 39: 252-256.

5 Zhou Y (周莹), He ZL (何志龙), Kong Y (孔毅). Research progress on thrombin inhibitor [J]. *Chin Pharm* (中国药业), 2013, 22: 9-12.

6 Shen HL (沈惠亮), Wu Q (吴倩), Wang JQ (王镜淇), et al. Research advances of natural thrombin inhibitors [J]. *Anhui Med Pharm J* (安徽医药), 2016, 20: 617-620.

7 Zhao B (赵冰), Yu M (于敏), Mo W (莫炜). Research progress in small molecule direct thrombin inhibitors [J]. *Pharm Biotechnol* (药物生物技术), 2015, 22: 64-68.

8 Alban S. Pharmacological strategies for inhibition of thrombin activity [J]. *Curr Pharm Design*, 2008, 14: 1152.

9 Bamrah RK, Pham DC, Rana F. Argatroban in heparin-in-

- duced thrombocytopenia: rationale for use and place in therapy[J]. *Ther Adv Chronic Dis*, 2013, 4:302-304.
- 10 Mohapatra R, Tran M, Gore JM, *et al.* A review of the oral direct thrombin inhibitor ximelagatran; not yet the end of the warfarin era[J]. *Am Heart J*, 2005, 150:19-26
- 11 Weitz JI, Crowther M. Direct thrombin inhibitors[J]. *Thromb Res*, 2005, 106:275-284.
- 12 Weitz JI. A novel approach to thrombin inhibition [J]. *Thromb Res*, 2003, 109:17-22.
- 13 Hanessian S, Simard D, Bayrakdarian D, *et al.* Design, synthesis, and thrombin-inhibitory activity of pyridin-2-ones as P-2/P-3 core motifs [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2008, 18:1972-1976.
- 14 Wilhelm T, Volker K. Immobilized enzymes: crystals or carriers[J]. *Trends In Biotech*, 1999, 17:326-335.
- 15 Liu L, Shi S, Chen X, *et al.* Analysis of tyrosinase binders from *Glycyrrhiza uralensis* root: evaluation and comparison of tyrosinase immobilized magnetic fishing-HPLC and reverse ultrafiltration-HPLC[J]. *J Chromatogr B*, 2013, 932:19-25.
- 16 Liu L, Shi S, Zhao H, *et al.* Selective fishing and analysis of xanthine oxidase binders from two Fabaceae species by coupling enzyme functionalized core-shell magnetic nanoparticles with HPLC-MS[J]. *J Chromatogr B*, 2014, 945:163-170.
- 17 Vanzolini KL, Jiang Z, Zhang X, *et al.* Acetylcholinesterase immobilized capillary reactors coupled to protein coated magnetic beads: A new tool for plant extract ligand screening [J]. *Talanta*, 2013, 11:647-652.
- 18 Zhang Y, Shi S, Chen X, *et al.* Functionalized magnetic nanoparticles coupled with mass spectrometry for screening and identification of cyclooxygenase-1 inhibitors from natural products[J]. *J Chromatogr B*, 2014, 960:126-132.
- 19 Zhao H, Chen H. Screening of neuraminidase inhibitors from traditional Chinese medicines by integrating capillary electrophoresis with immobilized enzyme microreactor[J]. *J Chromatogr A*, 2014, 1340:139-145.
- 20 Vogt C, Toprak MS, Muhammed M, *et al.* High quality and tuneable silica shell-magnetic core nanoparticles[J]. *J Nanopart Res*, 2010, 12:1137-1147.
- 21 Dang QD, Dicera E. A Simple Activity Assay for Thrombin and Hirudin[J]. *J Protein Chem*, 1994, 13:367-373.
- 22 Kong DX(孔德鑫), Wang ML(王满莲), Zou R(邹蓉), *et al.* Rapid Identification for quality of *Ardisia japonica* (Homsted) BL. based on Infrared spectroscopy and chemometrics [J]. *Genom Appl Biol* (基因组学与应用生物学), 2013, 32:771-775.
- 2007, 8:519-529.
- 17 Ong HK, Soo BPC, Chu KL, *et al.* XBP-1, a cellular target for the development of novel anti-viral strategies[J]. *Curr Protein Pept Sci*, 2018, 19:145-154.
- 18 Iurlaro R, Munoz-Pinedo C. Cell death induced by endoplasmic reticulum stress[J]. *Febs J*, 2016, 283:2640-2652.

(上接第 1797 页)

- 15 Han KL, Choi JS, Lee JY, *et al.* Therapeutic potential of peroxisome proliferators-activated receptor- $\alpha$ /  $\gamma$  dual agonist with alleviation of endoplasmic reticulum stress for the treatment of diabetes[J]. *Diabetes*, 2008, 57:737-745.
- 16 Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*,