

· 论著 ·

青霉属生物中分离出的抗真菌四肽的固相合成

杨璐晶¹, 王 露¹, 李文娟², 李仁武², 王晓燕², 胡宏岗² (第二军医大学 1. 研究生管理大队 2. 药学院, 上海 200433)

[摘要] 目的 以固相合成法合成抗真菌四肽 D-Phe-Val-D-Val-Tyr-OH。方法 采用固相合成法通过 4 步反应顺利获得目标四肽, 所得化合物的结构通过 MS、¹H NMR 等光谱确证。结果 合成得到了抗真菌四肽 D-Phe-Val-D-Val-Tyr-OH, 总收率为 47.0%。结论 合成方法具有可行性, 操作简便、总收率高, 目标化合物可用于抗真菌药物研究。

[关键词] 抗真菌; 四肽; 固相合成

[中图分类号] R978.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2014)05-0342-03

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2014.05.006

Solid-phase synthesis of the antifungal tetrapeptide from the culture of *penicillium canescens*

YANG Lujing¹, WANG Lu¹, LI Wenjuan², LI Renwu², WANG Xiaoyan², HU Honggang² (1. Brigade of Postgraduate Administration, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective** To synthesize the antifungal tetrapeptide by solid-phase synthesis method. **Methods** The solid-phase peptide synthesis was chosen for getting the desired target tetrapeptide and its structure was confirmed by MS and ¹H NMR. **Results** The synthesis of the D-Phe-Val-D-Val-Tyr-OH was realized with yield of 47%. **Conclusion** The synthetic method was feasible and practical. The desired target tetrapeptide could be used for screening of antifungal activity.

[Key words] antifungal; tetrapeptide; solid-phase synthesis

随着人类社会的发展与进步, 人口不断增加, 环境污染日益严重, 可供人类生存所必需的农田逐年减少。因此, 农作物的产率就极大的引起了人们的关注, 而真菌感染正是影响农作物产率的一个重要因素。抗菌肽通常序列短, 由微生物集体合成, 是机体天然防御的一部分。抗菌肽可以抵御真菌入侵, 对各种植物疾病有良好的作用^[1]。因此, 抗菌肽有可能成为一种新型农药用于现代农业^[2]。

近期研究表明, 从变灰青霉中分离得到的直链四肽 D-Phe-Val-D-Val-Tyr-OH 有显著的抗菌活性, 该化合物对 *Fusarium virguliforme* (为大豆猝死综合征病原菌) 的 MIC 达 $9.5 \times 10^{-3} \mu\text{mol/L}$, 其抗真菌能力优于市场上广泛使用的抗菌药物^[3], 其化学合成方法尚未见报道。固相多肽合成是近年来迅速发展的一种快捷高效的获得多肽的方法。所以, 本研究首次采用固相多肽合成, 以 2-氯三苯基氯树脂为

固相载体, 首先将 C 端的酪氨酸与树脂相连, 再将其余 3 个氨基酸逐一与酪氨酸进行连接, 合成完毕后将四肽从树脂上剪切下来, 并脱去侧链上的保护, 获得目标多肽。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 恒温磁力搅拌器(上海志威电器有限公司)、旋转蒸发器(LOOYE ZX98-1), 水浴锅(LOOYE ZX98-1), 2ZX-4 型旋片真空泵(上海豫康科教仪器设备有限公司), 低温冷却循环泵(上海豫康科教仪器设备有限公司), 循环水式多用真空泵 SHB-III(A)(上海豫康科教仪器设备有限公司), ZF7B 三用紫外分析仪(上海康化生化仪器制造厂), Selecta 固相合成仪。

1.2 试剂 Fmoc-氨基酸(吉尔生化)、2-氯三苯基氯树脂(CTC)、N,N'-二环己基碳二亚胺(DCC)、1-羟基苯并三氮唑(HOBt)、三氟乙酸(TFA)、N,N'-二异丙基乙胺(DIPEA)、三氟乙醇(TFE)均购自上海吉尔生化有限公司; 茚三酮、哌啶、甲醇、N,N-二甲基甲酰胺(DMF)、二氯甲烷(DCM)、N-甲基吡咯烷酮(NMP)均为市售分析纯试剂; 乙腈(色谱纯, J&K)。

[基金项目] 国家科技重大专项(2012ZX09502001-005)。

[作者简介] 杨璐晶, 本科。Tel: 13482493775, E-mail: 2286890046@qq.com。

[通讯作者] 胡宏岗。Tel: (021) 81871228-48, E-mail: hhu66@smmu.edu.cn。

2 合成实验

2.1 合成路线

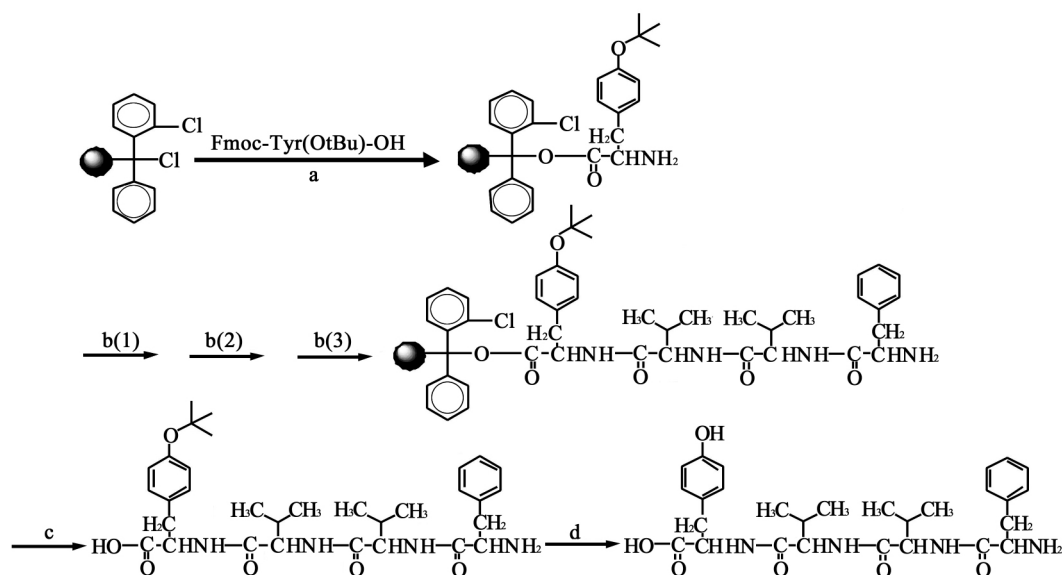


图1 D-Phe-Val-D-Val-Tyr-OH 合成路线

a: DCM/DIPEA, 3 h; b(1): HOBt/DMF/DCC/DCM, Fmoc-D-Val-OH, 30 min, b(2): HOBt/DMF/DCC/DCM, Fmoc-Val-OH, 30 min; b(3): HOBt/DMF/DCC/DCM, Fmoc-D-Phe-OH, 30 min; c: TFE/AcOH/DCM(1:1:8), 1 h; d: TFA/DCM(1:3), 30 min

2.2 Fmoc-酪氨酸与树脂相连^[4] 取 CTC 树脂 1.0 g(取代度为 1.08 mmol/g) 加入到固相合成反应管中,用 DCM 30 ml 浸泡 30 min 使 CTC 树脂充分溶胀,活化待用。随后加入 Fmoc-Tyr(OtBu)-OH (749 mg, 1.5 mmol)、二氯甲烷 15 ml、DIPEA 0.42 ml, 震荡反应 3 h。反应结束后,将液体滤去,依次用甲醇、二氯甲烷洗涤树脂各 3 次,抽干待用。

2.3 氨基酸的逐步连接 在上步反应树脂中加入 20% 哌啶-DMF 溶液 15 ml 震荡反应 30 min。将称量好的 Fmoc-氨基酸(2 eq)与 HOBt(3 eq) 溶于 5 ml DMF 溶液中,再加入 DCC(3 eq)、二氯甲烷 15 ml, 震荡反应 30 min。并用 20% 哌啶-DMF 溶液 15 ml 脱去 Fmoc,然后将下一个 Fmoc-氨基酸活化,将活化液过滤至固相反应管中,震荡反应 2 h,反应完毕后用 DMF、二氯甲烷各洗涤 3 次。根据多肽序列如此重复脱保护→缩合→脱保护,直到所有氨基酸连接完毕。

2.4 四肽的游离和脱侧链保护 本研究采用稀酸体系将多肽从树脂上进行游离。具体操作如下:在上步反应树脂中加入乙酸:三氟乙醇:二氯甲烷=1:1:8(V/V/V) 30 ml 震荡反应 1 h,过滤,树脂再用二氯甲烷洗涤 3 次,浓缩滤液(期间加入甲苯除去残留乙酸)得带保护的多肽粗品 409 mg。并且在粗品中加入 TFA:DCM=1:3(V/V) 20 ml,搅拌反应 30 min,浓缩得目标多肽粗品,再用制备型高效液相进行纯化得纯品 267.5 mg,收率 47.0%,纯度大于 95%。¹H-

NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ 9.22~9.20 (m, 1H, NH), 8.46 (d, 1H, *J*=9.2 Hz, NH), 8.32 (d, 1H, *J*=8.4 Hz, NH), 8.13 (d, 1H, *J*=9.2 Hz, NH), 7.32~7.20 (m, 5H, Ar-H), 7.00 (d, 2H, *J*=8.4 Hz, Ar-H), 6.63 (d, 2H, *J*=8.4 Hz, Ar-H), 4.56~4.53 (m, 1H, α-H), 4.39~4.34 (m, 1H, α-H), 4.34~4.31 (m, 1H, α-H), 4.56~4.53 (m, 1H, α-H), 4.26 (t, 1H, *J*=7.5 Hz), 3.06~3.02 (m, 1H), 2.96~2.90 (m, 2H), 2.70~2.65 (m, 1H), 1.86~1.74 (m, 2H), 0.68~0.62 (m, 9H, CH₃), 0.54 (d, 3H, *J*=6.8 Hz, CH₃) *m/z* C₂₈H₃₉N₄O₆ [M+H]⁺: 527.36。

3 结果与讨论

本研究通过 4 步反应合成得到了目标化合物 D-Phe-Val-D-Val-Tyr-OH, 终产物的合成收率为 47.0%。其结构经核磁和质谱确证,合成方法简便易行,反应条件温和,收率高,合成得到的目标化合物可用于抗真菌活性研究。

在用二氯甲烷洗涤树脂过程中,遇到过抽滤速度瞬间减慢的情况,经过分析可能原因是固相合成管在震荡时发生堵塞。在浓缩滤液得粗品的过程中,蒸发得不带固体粗品,经过分析可能的原因为粗品溶解在稀酸体系中,所以加入甲苯降低其溶解度,并且得到了多肽粗品。(下转第 378 页)

30 例中仅 2 例 (6.67%) 出现不良反应 (头晕),均在休息后自行缓解,未出现滞针、断针、感染等不良反应。不良反应少说明电针组的安全性更高。

3 讨论

惊恐障碍是一种急性焦虑障碍,患者表现为反复出现心悸、出汗、震颤等自主神经症状,常伴有强烈的濒死感和失控感,并害怕产生不幸后果的惊恐发作^[3]。一般起病于 20 岁左右,反复发作数周至数年,严重影响患者的日常生活和工作,一般人群发病率约 1.4%^[4]。目前惊恐障碍治疗的目标为减少或消除患者惊恐发作次数,改善期待性焦虑、回避行为及共患疾病,提高患者生活质量,提高其社会适应能力和劳动能力,减轻医疗负担。西医治疗此病常采用 SSRI 类抗抑郁药治疗,其中帕罗西汀是 5-HT 再摄取抑制剂中抗焦虑效果最好、疗效确切、适应证中覆盖焦虑障碍谱系最广的一种^[5,6],但因患者个体对这类药物敏感,依从性不佳,不能长期遵医嘱服药,以致病情反复,延误治疗。因此,中医治疗因其起效快、疗效显著、副作用小的特点为越来越多的患者所接受^[7]。

惊恐障碍归类于中医心悸、惊悸、脏燥等。其发生与精神因素有关,多为情志所伤,早期与心、脑有关。针灸治疗强调辨病与辨证相结合,注意辨病,关注病位。从心、脑入手,以头部穴位为主,兼以心经及心包经穴位。百会、四神聪、印堂合用可达调神开窍、安神定志之功,内关、神门可起宁心安神之效,太阳镇静安神作用强,可有效改善心悸、失眠等症状。

电针治疗已成为临床针灸常规治疗手段之一。电针可根据治疗需要,通过调整频率、波形、强度等参数,连续增加刺激量,从而提高疗效。较高频率的电针具有镇静、镇痛的作用,对精神疾病有一定疗效,中枢神经系统四大神经递质 5-羟色胺 (5-HT)、

去甲肾上腺素 (NE)、多巴胺 (DA) 及 γ -氨基丁酸 (GABA) 之间的失衡是导致焦虑产生的重要机制之一^[8]。5-HT、NE、DA 的异常升高可导致焦虑产生,GABA 是脑内主要的抑制性神经递质,可有效改善恐惧症状。惊恐障碍的发生与神经递质失衡密切相关,电针可调节大脑皮质内单胺类神经递质和 GABA 含量,促其恢复平衡状态,从而有效缓解焦虑、惊恐症状。本研究采用 100 Hz 电针对惊恐障碍患者进行治疗,改善患者交感神经亢奋的自主神经症状。本研究结果显示,电针组与帕罗西汀组治疗前后 HAMA、SAS 评分均显著降低,两组疗效相当。而电针组起效快,可迅速改善躯体症状,增强患者信心,增加患者治疗的依从性,且电针组较帕罗西汀组临床安全性好。本研究为应用电针治疗惊恐障碍提供了较为全面的循证医学证据。

【参考文献】

[1] 贾建平. 神经病学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 336.
 [2] 冉超群, 谭小林, 杨波, 等. 心理行为干预联合帕罗西汀治疗惊恐障碍患者的临床疗效[J]. 中国精神医学杂志, 2012, 22(1): 43-44.
 [3] 沈迪文, 曹秋云, 杨海龙, 等. 惊恐障碍在综合性医院识别现状和艾司西酞普兰治疗效果[J]. 临床神经医学杂志, 2012, 22(2): 128-130.
 [4] Michael G, Philip C, Paul H. Shorter oxford textbook of psychiatry [M]. New York: Oxford University Press, 2006: 193.
 [5] 王彤宇, 刘建杰. 帕罗西汀治疗卒中后焦虑的疗效观察[J]. 天津医药, 2011, 39(9): 78-79.
 [6] 赵文统, 赵素梅. 帕罗西汀治疗老年脑卒中后焦虑患者 30 例临床观察[J]. 实用心脑血管病杂志, 2007, 15(3): 86-87.
 [7] 孔莉, 颜红. 针药结合治疗惊恐障碍 50 例[J]. 光明中医, 2012, 27(4): 748-750.
 [8] 刘军, 王昭. 电针治疗中风后焦虑障碍 81 例临床疗效评价[J]. 环球中医药, 2010, 3(6): 427-430.
 [收稿日期] 2013-10-30 [修回日期] 2014-03-11
 [本文编辑] 陈静 李睿曼

(上接第 343 页)

抗菌肽的发现促进农业发展,使农作物产量有了进一步提高的可能。但是,在抗菌肽广泛应用于农业生产前,还需要验证和考虑很多问题。如需要进一步实验验证抗菌肽的安全性,需要考虑真菌等微生物对抗菌肽的耐药性等。所以,要想在农业生产上真正使用抗菌肽还需要进行很多研究。

【参考文献】

[1] Montesinos E, Bardaji E. Synthetic antimicrobial peptides as ag-

ricultural pesticides for plant disease control[J]. Chem Biodiver, 2008, 5(7): 1225-1237.
 [2] Chernysh S, Kim SI, Bekker G, et al. Antiviral and antitumor peptides from insects[J]. Proc Natl Acad Sci, 2002, 99(20): 12628-12632.
 [3] Bertinetti BV, Peña NI, Cabrera GM. An antifungal tetrapeptide from the culture of *penicillium canescens* [J]. Chem Biodiver, 2009, 6(8): 1178-1184.
 [4] 胡春玲. 鳖甲抗肝纤维化活性多肽的固相合成[J]. 医药导报, 2011, 30(5): 561-562.
 [收稿日期] 2013-04-28 [修回日期] 2013-10-22
 [本文编辑] 陈静