

· 研究报告 ·

抗肿瘤多肽蜂毒素的固相合成

李文娟¹, 李任武^{2a}, 吴茂诚^{2a}, 王傅喆^{2b}, 秦丽萍^{2b}, 李 柏^{2b}, 胡宏岗^{2a} (1. 烟台大学药学院, 山东 烟台 264005; 2. 第二军医大学, a. 药学院有机化学教研室, b. 长海医院中医系, 上海 200433)

[摘要] 目的 合成具有抗肿瘤活性的二十六肽蜂毒素。方法 采用 Fmoc 固相逐步化学合成, 确立了以 Wang 树脂为固相载体, HOBt/DCC 为缩合剂的合成工艺。结果 通过本法能够顺利合成得到二十六肽蜂毒素, 收率达 32%。结论 该合成方法具有可行性强、操作简便、总收率高等特点, 适用于长链多肽的合成。

[关键词] 蜂毒素; 固相合成; 逐步缩合

[中图分类号] R996.3, R914.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2014)01-0051-02

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2014.01.013

Solid-phase synthesis of melittin of anti-tumor peptide

LI Wenjuan¹, LI Renwu^{2a}, WU Maocheng^{2a}, WANG Fuzhe^{2b}, QIN Liping^{2b}, LI Bai^{2b}, HU Honggang^{2a} (1. School of Pharmacy, Yantai University, Yantai 264005, China; 2a. Department of Organic Chemistry, School of Pharmacy, Second Military Medical University, 2b. Department of Traditional Chinese Medicine, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective** To synthesize the antitumor activity of twenty-six peptide melittin. **Methods** The melittin was synthesized by stepwise solid-phase peptide synthesis (SPPS). During the synthesis of melittin, wang-resin was chosen as solid supporter and HOBt/DCC were used as the coupling reagent. **Results** The melittin was synthesized with yield of 32%. **Conclusion** The synthetic method was feasible, simple and with high yield for long chain polypeptide synthesis.

[Key words] melittin; solid-phase peptide synthesis; stepwise synthesis

蜂毒作为一味传统中药用于治疗疾病由来已久, 对自身免疫性疾病亦有较好的疗效。蜂毒素作为蜂毒主要组成成分越来越受到人们的重视。近年来, 有关蜂毒及其蜂毒素抗肿瘤的机制研究取得了新进展^[1, 2]。国外早有研究报道认为, 蜂毒素能够影响多种细胞信号通路, 可能是一种新型抗肿瘤先导化合物^[3, 4]。蜂毒素由 26 个氨基酸残基构成, 氨基酸残基组成为: Gly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Lys-Arg-Lys-Arg-Gln-Gln-NH₂, 相对分子质量为 2 846 u。国内外有关蜂毒素的全合成途径未曾有文献报道, 本实验室首次通过固相逐步合成法对直链二十六肽蜂毒素的合成工艺进行研究。

1 仪器和试剂

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(上海康生化仪器制造厂)。

1.2 试剂 Fmoc-氨基酸、Wang 树脂、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-二异丙基乙基胺(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; 乙腈为色谱纯(J & K)。

2 合成实验

2.1 蜂毒素的固相逐步合成 蜂毒素的化学合成采用 Fmoc 固相合成法, 由羧基端向氨基端方向合成。合成工艺如下: 将 0.5 g Wang 树脂(0.8 mmol/g)、Fmoc-氨基酸、DIPEA(0.6 mmol)、DCM(20 ml)加入到多肽固相合成反应器中, 振荡反应 2 h, 随后用 10 ml 哌啶:DMF(1:4)脱除氨基保护基 Fmoc。随后, 依次将树脂和下一氨基酸的活化酯进行反应, 使

[基金项目] 国家自然科学基金(20902109)。

[作者简介] 李文娟, 女, 硕士研究生。Tel: 13916267045, E-mail: lwjytu@163.com。

[通讯作者] 胡宏岗。Tel: 13818676980, E-mail: huhonggang_fox@msn.com。

用的活化试剂为 HOBt/DCC(1.2 mmol/ 1.2 mmol), 反应溶剂为 NMP(10ml)、DCM(10 ml), 室温下震荡反应。缩合过程中采用茚三酮定性显色监测反应进程。使用切割试剂(TFA-DCM = (19 : 1)(V/V) 将目标多肽从树脂上裂解下来, 同时除去侧链保护基。溶液经浓缩后即得到蜂毒素粗品。

2.2 蜂毒素的分析纯化

2.2.1 蜂毒素粗品的纯化

蜂毒素粗品通过反相制备液相进行纯化。色谱条件: 岛津公司 LC-6A 制备液相色谱仪。色谱柱: ODS C₁₈ 柱(20 mm × 250 mm, 5 μm)。流动相 A 为 0.1% TFA/水, 流动相 B 为 0.1% TFA/乙腈, 梯度洗脱: 20% B(25 min) → 80% B(5 min) → 100% B(5 min), 流速 10 ml/min, 检测波长 220 nm, 进样量 200 μl。冻干后得到的纯品为白色固体粉末, 收率为 32%。HR-Q-TOF-MS: m/q [M + 4H⁺] / 4 712.450 5。

2.2.2 蜂毒素粗品的 HPLC 纯度测定

蜂毒素粗品经纯化后, 分析终产物的纯度。色谱条件: SPD-M20A 型高效液相色谱仪(日本岛津公司)。色谱柱: ODS C₁₈ 柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm, 100 Å, Hypersil)。流动相 A 为 0.1% TFA/水, 流动相 B 为 0.1% TFA/乙腈, 梯度洗脱 20% B(25 min) → 80% B(5 min) → 100% B(5 min), 流速 1 ml/min, 检测波长 220 nm, 进样量 20 μl。经测定, 本法所制备蜂毒素的纯度 >97% (图 1)。

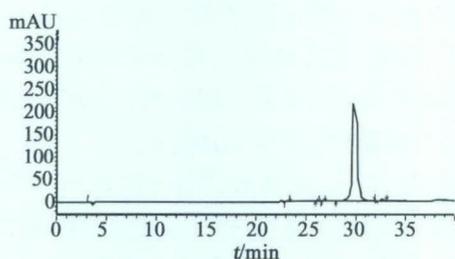


图 1 蜂毒素 RP-HPLC 纯度检测

3 结果与讨论

3.1 树脂的选择

固相合成主要基于: 所要合成肽链的末端氨基酸的羟基以共价键的结构同一个不溶性的高分子树脂相连, 然后以此结合在固相载体上氨基酸作为氨基组分, 经过脱去氨基保护基, 并同过量的活化羟基组分反应接长肽链。重复操作(缩合 → 洗涤 → 去保护 → 中和、洗涤 → 下一轮缩合), 达到所要合成的肽链长度; 最后将肽链从树脂上裂解下来, 经过纯化等处理, 即得所要的多肽。将固相合成与其他技术分开来的唯一特征是固相载体。固相载体并不是万能的, 需根据实

际情况选择使用。本实验在蜂毒素的合成中采用了 Wang 树脂。该树脂满足了以下条件: 首先, 肽链和树脂的反应位点最终可以形成蜂毒素中的酰胺结构; 其次, Wang 树脂对合成过程中的物理和化学条件稳定, 而且可以在不断增长的肽链和试剂之间快速、不受阻碍地接触。

3.2 缩合剂的使用

常用的氨基酸缩合体系有 DCC-HOBt、DIC-HOBt、HATU-DIPEA、HBTU-DIPEA、PyBOP-DIPEA 等。本实验中, 笔者选择 DCC-HOBt 体系进行氨基酸缩合, 主要基于以下两点理由: 首先, DCC 是一种廉价的缩合剂, 易溶于有机溶剂, 可使氨基酸在短时间内完成缩合; 其次, DCC 缩合的副产物 DCU 不溶于反应溶剂, 易通过过滤除去。

3.3 侧链保护基的除去

本研究选择了不同比例的 TFA-DCM 溶液(25%、50%、75% 和 90%) 对树脂上的蜂毒素进行游离和保护基的脱除, 最终确定了 90% TFA-DCM 溶液的树脂游离和保护基脱除体系。在此条件下, 不仅能将多肽直接从树脂上切下, 并将侧链保护基完全脱除。

4 结论

研究蜂毒素固相合成方法, 它以 Wang 树脂为固相载体; HOBt/DCC 为缩合剂; NMP/DCM 为反应溶剂; 肽链从树脂上切下后采用 90% TFA 除去侧链保护基。该条件下合成的蜂毒素, 收率达 32%, 通过 RP-HPLC 分析其纯度 >97%, 能够满足药理学实验研究所需。本合成方法具有可行性, 操作简便、总收率高等特点, 适用于各种长链多肽的合成。

【参考文献】

- [1] Huh JE, Kang JW, Nam D, *et al.* Melittin suppresses VEGF-A-induced tumor growth by blocking VEGFR-2 and the COX-2-mediated MAPK signaling pathway[J]. *J Nat Prod*, 2012, 75(11), 1922-1929.
- [2] 高启龙, 李寒冰, 姚亚民, 等. 蜂毒素(Mel)对裸鼠骨肉瘤的抑制作用与影响肿瘤血管生成、细胞增殖和凋亡的关系[J]. *复旦学报: 医学版*, 2012, 39(03): 283-288.
- [3] Jo M, Park MH, Kollipara PS, *et al.* Anti-cancer effect of bee venom toxin and melittin in ovarian cancer cells through induction of death receptors and inhibition of JAK2/STAT3 pathway[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2012, 258(1), 72-81.
- [4] Liu S, Yu M, He Y, *et al.* Melittin prevents liver cancer cell metastasis through inhibition of the Rac1-dependent pathway[J]. *Hepatology*, 2008, 47(6), 1964-1973.

【收稿日期】 2012-12-16 【修回日期】 2013-08-31

【本文编辑】 李睿旻