

α -促黑激素的固相合成研究

于烽 谢云 陈五岭[△]

(西北大学生命科学学院 陕西 西安 710069)

摘要 目的 探索 α -促黑激素的合成工艺。方法 采用多肽固相合成法制备 α -促黑激素。以 Rink amide-MBHA 树脂为载体、使用 Fmoc 保护策略、TBTU、HOBt、DIEA 为缩合剂体系,最后用 TFA、苯甲硫醚、水、苯酚、乙二硫醇混合液将多肽从树脂上切割下来。结果 合成后的目标多肽产率达 64.9% 经过 RP-HPLC 纯化纯度可达 98% 质谱鉴定显示纯化产物与目标多肽理论相对分子质量一致。结论 该方法操作方便,反应结果稳定,为固相合成生产 α -促黑激素提供了一种可行的工艺方案。

关键词 固相合成法 α -促黑激素 多肽 Fmoc 保护策略

中图分类号 Q575.5 文献标识码 B 文章编号 1673-6273(2012)11-2173-04

Research on Solid-phase Synthesis of α -MSH

YU Feng, XIE Yun, CHEN Wu-ling[△]

(College of life science, NorthWest university, Xi'an 710069 China)

ABSTRACT Objective: To investigate a way to prepare the peptide via solid-phase synthesis methods. **Methods:** α -MSH was synthesized starting from a Rink amide resin with the Fmoc strategy on solid phase. The peptide was coupled in solution of TBTU, Hobt and DIEA, then cleaved by TFA, benzyl sulfide, water, phenol are ethanedithiol from resin. **Result:** The yield of synthesized peptide obtained was 64.9%. The purity of peptide reached 98% after RP-HPLC purification. MS identification proved the peptide prepared was the target tridecapeptide. **Conclusion:** This method provides a feasible process of synthesizing α -MSH.

Key words: Solid-phase synthesis; α -MSH; Peptide; Fmoc protection strategy

Chinese Library Classification(CLC): Q575.5 **Document code:** B

Article ID:1673-6273(2012)11-2173-04

前言

多肽是在生物体内具有特殊功能的活性肽,这些含量极低的活性肽在生物的正常活动中起着重要的调节作用。随着人们对多肽生物功能研究的不断深入,多肽的人工合成方法也得到了广泛的关注。自从 1963 年 Merrifield 创立了固相多肽合成(SPPS)方法以来,其表现出液相合成法无法比拟的优点,经过不断的改进和研究,到现在已成为多肽和蛋白质合成中的常用手段。这种方法几乎可以高收率地制备各种多肽^[1]。 α -促黑激素(α -MSH)是脑垂体中间部产生的一种 13 个氨基酸的信号多肽,通过刺激皮肤、毛发中分布的黑色素细胞释放黑色素^[2],促进皮肤黑色素的沉着,从而能够避免光照引起的 DNA 损伤^[3],因此目前人工合成的 MSH 主要用于治疗和预防皮肤色素缺失及皮肤癌等疾病^[4]。研究发现,促黑激素还会影响生物体内的能量代谢、胰岛素分泌量及血糖水平^[5],也有研究表明促黑激素与记忆^[6]、镇痛^[7]、抗炎作用^[8]、免疫^[9,10]等生理现象有关。本实验采用 Fmoc(9-芴甲氧羰基)固相合成法,根据促黑激素的多肽序列,选择了适合的氨基酸侧链保护策略,以 TBTU、HOBt、DIEA 为缩合试剂,以 TFA、苯甲硫醚、水、苯酚、乙二硫醇混合液作为切割试剂将多肽从树脂上切割下来,使用反相高效液相色谱进行纯化,通过质谱检测,成功的合成了目标多肽,为促黑激素的

固相合成提供了一种可行的参考方法。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂

1.1.1 仪器 台式冷冻干燥机(四环仪器厂);台式离心机(北京仪器六厂);Waters Delta 600 型制备液相色谱仪(美国 Waters 公司);Waters 2487 型双通道紫外检测器(美国 Waters 公司);基质辅助激光解吸电离质谱仪 AXIMA CFR(日本岛津公司);

1.1.2 试剂 Fmoc-Rink amide-MBHA 树脂(0.6 mmol/g, 1% DVB),TBTU(O-苯并三氮唑-N,N,N,N'-四甲脒四氟硼酸酯),HOBt(1-羟基苯并三氮唑),DIEA(N,N'-二异丙基乙胺),DMF(N,N'-二甲基甲酰胺),DCM(二氯甲烷),异丙醇,Fmoc 保护氨基酸,均来自吉尔生化有限公司。TFA(三氟乙酸)、乙腈来自美国 Fisher 公司。其余试剂均为市售分析纯试剂。

1.2 实验方法

1.2.1 树脂的溶胀 称取 Fmoc-Rink amide-MBHA 树脂 1 g 放入反应装置中,加入 15 ml DCM 溶液,使树脂浸没,浸泡反应柱 2-3 h。

1.2.2 树脂 Fmoc 保护基的脱去 减压抽去溶胀使用的 DCM 溶液,加入 25% 的哌啶溶液(哌啶:DMF=1:3),通入氮气吹沸反应 5 min 脱去 Fmoc 保护基,排出溶液,重复 5 次。然后用异丙醇溶液、DMF 溶液清洗树脂 5 遍,每次 2 min。

1.2.3 第一个氨基酸的连接 称取 Fmoc-L-Val-OH 0.61 g, TBTU 0.59 g, HOBt 0.26 g,溶解于 15 ml DMF 溶液中,加入 DIEA 0.6 ml,振荡混匀 1 min,转移溶液到反应装置中,通入氮气于室

作者简介:于烽(1987-),男,硕士研究生,主要研究方向:生物工程。电话:135728443968 E-mail: yufeng_029@163.com

[△]通讯作者 陈五岭 电话:02988303700,

E-mail: wuling.chen@263.net

(收稿日期 2011-09-28 接受日期 2011-10-25)

温下(25℃)吹沸反应 1.5 h,取少量树脂进行茚三酮反应^[11]以检测缩合是否完成。连接反应完成后减压抽出缩合溶液,使用 DMF 溶液清洗树脂 3 遍。再用 15 ml 醋酐-吡啶(v/v=1:1)溶液于室温下,氮气吹沸处理树脂 30 min 以封闭树脂上的活性基团,完成后依次使用 DMF 和 NMP(N-甲基吡咯烷酮)溶液洗涤树脂 3 遍,并取少量树脂进行茚三酮反应检测是否封闭完全。

1.2.4 其余氨基酸的连接 按照目标多肽的序列自 C 端向 N 端依次连接氨基酸,使用于树脂量 3 倍的保护氨基酸参加反应,按照第一个氨基酸的连接方法依次经过 Fmoc 脱保护、TBTU、HOBT、DIEA 缩合,反应时间为 1.5 h。反应结束后取少量树脂进行茚三酮反应检测,检测结果为阴性则进行下一个氨基酸的连接,为阳性时延长缩合时间,更进一步可用 DMF 清洗树脂,重新加入原氨基酸组分进行缩合反应。

1.2.5 氨基末端乙酰化 所有氨基酸连接后,脱除多肽链最末端 Fmoc 保护基,向反应容器中加入 15 ml 乙酸酐-吡啶(v/v=1:1)溶液于室温下处理 30 min,处理后依次使用异丙醇溶液,DMF 溶液洗涤树脂 3 遍、氮气吹干,使多肽氨基末端乙酰化。

1.2.6 树脂切割及氨基侧链脱保护 多肽缩合结束后将树脂转移到烧杯中,加入 50 ml 按 TFA:苯甲磺酰:水:苯酚:EDT(1,2-乙二硫醇)=85:5:5:2.5:2.5(v/v/v/v/v)比例配制的切割试剂,室温下磁力搅拌 2 h,过滤。收集滤液加入到无水乙醚中析出白色沉淀,离心、收集沉淀,并用乙醚洗涤,抽干乙醚后用蒸馏水溶解沉淀,再转移到冻干机中冻干称量。

1.2.7 粗肽的纯化 将冻干的粗肽用少量纯水溶解,使用反相高效色谱纯化。纯化条件为:采用 C18 反相柱(4.6 mm×250 mm,

5 μm)。流动相:A液 0.1% TFA/水(v/v),B液 0.1% TFA/乙腈(v/v)。洗脱梯度:30 min 内,流动相比从 A:B=85:15 变为 A:B=35:65,最后 5 min 使用 B 液全部洗脱。流速:1 ml/min。检测波长 214 nm。

1.2.8 纯化产物的鉴定 使用基质辅助激光解吸附质谱(MALDI-MS)进行产物鉴定。采用氮气激光源,波长为 337 nm 相对分子质量检测范围 0~2000 m/z,正离子检测,用 CHCA(氰基-4-羟基肉桂酸)做内标校正。

2 结果

2.1 收率计算

收集纯化后的多肽馏分,冷冻干燥后称重。按以下公式计算收率:理论产量=树脂替代度×树脂质量×多肽相对分子质量,粗肽收率=实际产量/理论产量,最终收率=纯化后多肽质量/理论产量。理论产量=0.6 mmol/g×1 g×1664.9 g/mol=0.99894 g;粗品多肽质量 0.648 g,RP-HPLC 纯化后多肽质量:0.531 g。粗肽收率=0.648 g/0.99894 g=64.9%;最终收率=0.531 g/0.99894 g=53.2%

2.2 色谱分析

使用 RP-HPLC 分析的结果如下,图 1 是粗肽的色谱图,图 2 是纯化后的色谱图。可以看出,图 1 虽然在 10.2 min 出现明显的主峰,但是存在杂质峰,可能是未完全合成的短肽链。收集图 1 的 9 min 到 12 min 间的物质,进行 RP-HPLC 纯化,可以得到较单一主峰,经面积归一法计算,纯化得到的多肽纯度可达到 98%。

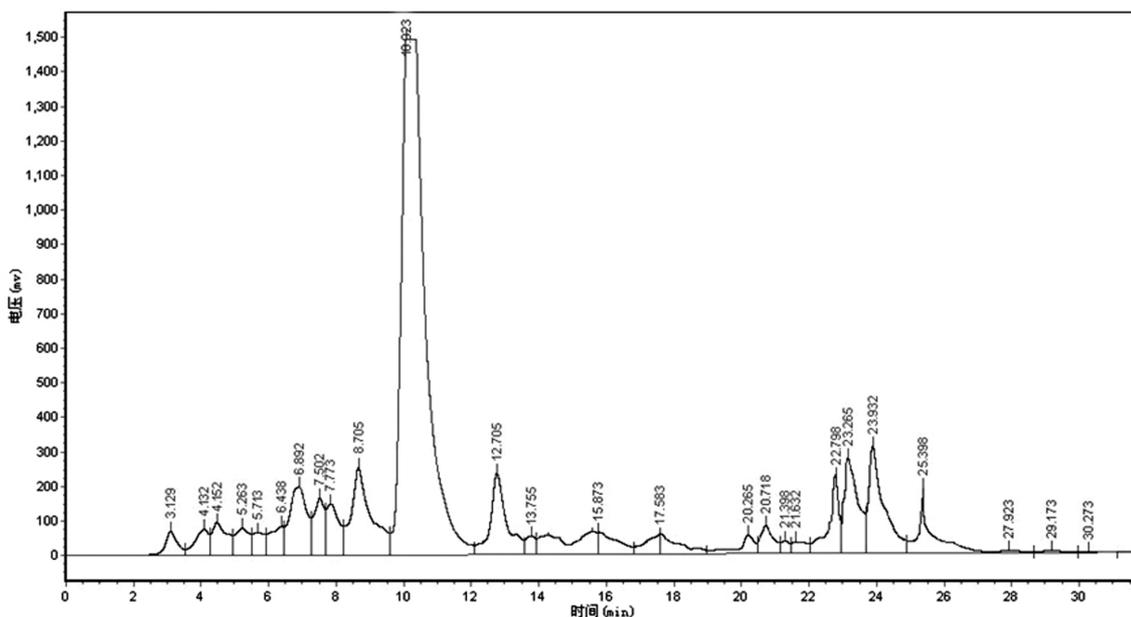


图 1 纯化前目标合成肽的色谱图

Fig.1 Chromatogram of the synthesized peptide before purified

2.3 质谱鉴定

对纯化后多肽的鉴定结果为:[M+H]⁺ m/z=1665.73, [M+3H]²⁺ m/z=835.23,合成的多肽相对分子质量为 1664.7,与

理论相对分子质量 1664.9 接近一致,说明合成产物为目标产物 α -MSH。

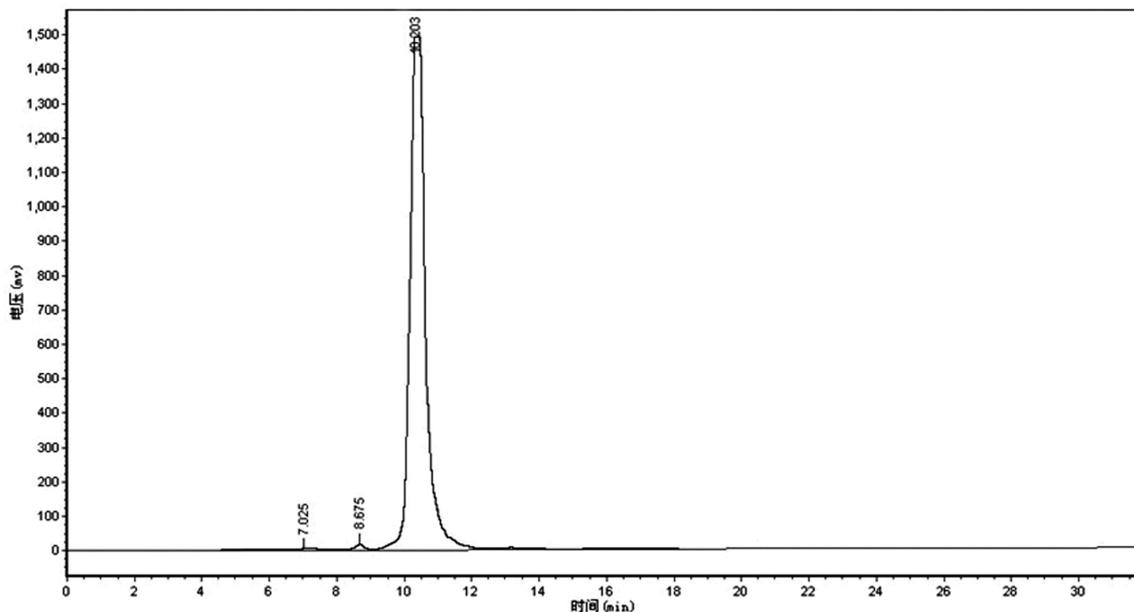


图2 纯化后目标合成肽的色谱图

Fig.2 Chromatogram of the synthesized peptide after purified

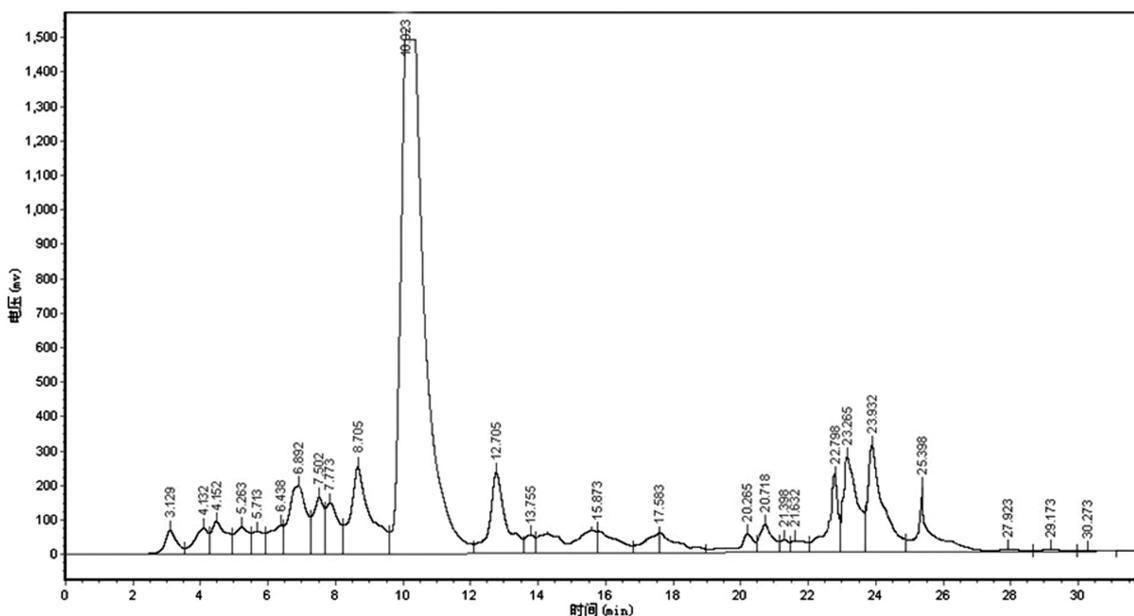


图3 使用 TFA 混合溶液切割多肽的色谱图

Fig.3 Chromatogram of the synthesized peptide cleaved by TFA mixture

3 讨论

3.1 树脂的选择

本研究中合成的 α -MSH 多肽,有研究表明其 C 端经氨基化后的活性要比天然产物高^[12],因此选用含有能使 C 端氨基化 Rink amide linker 的树脂。根据本合成研究的氨基酸性质和采用的氨基酸保护策略,最终选用了 Fmoc-Rink amide-MBHA 树脂作为合成树脂。

3.2 氨基酸侧链保护策略

本研究选用 Fmoc 进行氨基保护,鉴于 Fmoc 对酸稳定,所以选用的侧链保护基也都是对酸稳定的基团。侧链保护策略如下:使用 Boc(叔丁氧羰基)保护 Lys 的侧链氨基、Trp 的吲哚基

团;Trt(三苯甲基)保护 His 的咪唑环;使用 Pbf(2,2,4,6,7-五甲基二氢苯并咪喃-5-磺酰基)保护 Arg 的胍基;OtBu(叔丁基酯基)保护 Glu 的侧链羧基;使用 tBu(叔丁基)保护 Ser 和 Tyr 的羟基^[13]。这些侧链保护基都可以使用 95% TFA (v/v)进行脱保护,可在树脂切割的同时去除。合成后的粗肽的收率达到 64.9%,说明该保护策略在合成应用时可行。

3.3 缩合方法的选择

选用了目前常用的缩合剂组合 TBTU-HOBt-DIEA,这种缩合剂体系缩短了接肽反应的时间,反应过程比较温和,减少副反应发生,抑制消旋反应的产生^[14,15]。反应后缩合剂可通过 DMF 洗去,解决了 DCC、DIC 法在合成后缩合剂残留的问题。

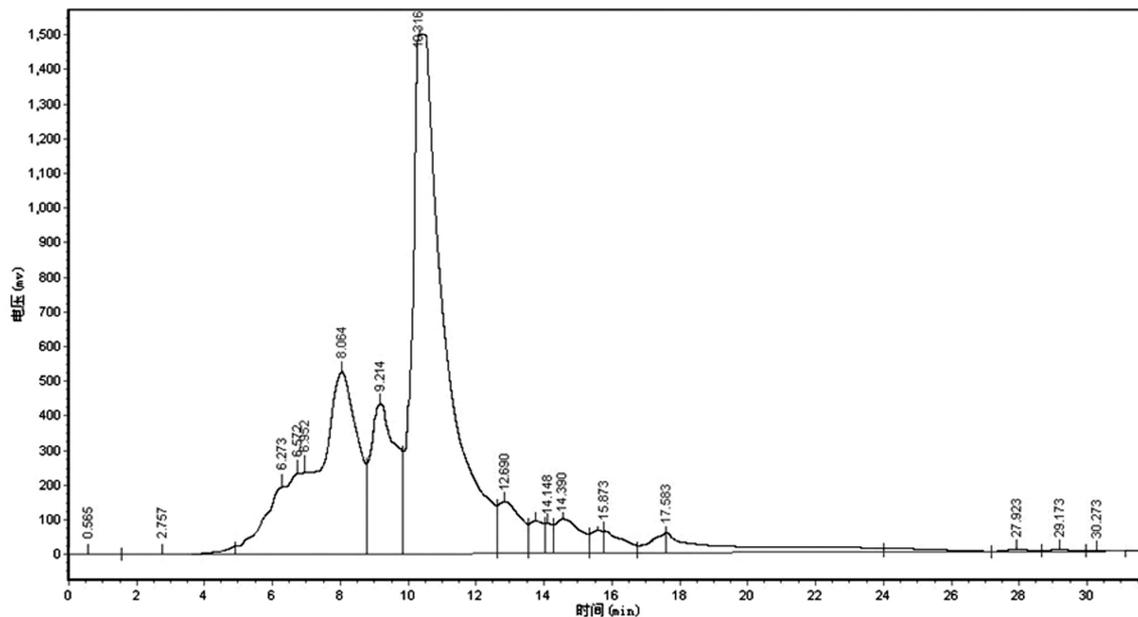


图4 使用 95% TFA 溶液切割多肽的色谱图

Fig.4 Chromatogram of the synthesized peptide cleaved by 95% TFA

3.4 缩合过程中的检测

每个氨基酸缩合后,都取少量树脂进行茚三酮检测,若树脂不再出现蓝紫色则说明缩合完成。有些氨基酸例如 Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH 缩合较难,树脂颜色长时间是蓝紫色,应延长缩合反应时间或重新缩合。由于 Pro 不对茚三酮产生明显的变色反应,缩合时应使用四氯苯醌(TNBS)法^[16]检测缩合情况。

3.5 切割试剂的选择

由于合成的氨基中含有 Trp、Arg 等对酸不稳定的氨基酸,通常使用的 95% TFA 切割法有可能引起副反应,因此加入一定含量的苯酚、EDT 等溶液可在切割过程中对氨基酸起到保护作用。

使用两种不同的试剂对合成结束后的树脂进行切割,并对切割后的产物进行相同条件下的色谱分析。通过图 3、图 4 可以看出,使用 TFA 混合溶液切割的多肽主峰与杂峰分离,且杂质峰面积都较小,适合纯化分离。95% TFA 溶液切割的多肽产物虽然也有明显的主峰,但部分与杂质峰重合,不适宜分离。选择 TFA 混合溶液切割的效果较好。

4 结论

本研究以 Rink amide MBHA 树脂为载体,采用 Fmoc 固相合成法,选用带有侧链保护基的氨基酸,以 TBTU、HOBT、DIEA 为缩合试剂合成 α -促黑激素,反应条件温和,副反应少,合成收率为 64.9%。使用反相高效液相色谱纯化后纯度可达到 98%。通过质谱鉴定,确定合成多肽为目标多肽。该方法操作方便,反应结果稳定,为 α -促黑激素的固相合成生产提供了一种可行的工艺方案。

参考文献(References)

[1] 王莹,李文丽,马忠明.多肽的固相合成法研究进展[J].安徽农业科学,2006,34(22):5768-5770
Wang Ying, Li wen-li, Ma Zhong-ming. Progress in Research on Solid

Phase Synthesis Polypeptide [J]. Journal of An-hui Agricultural Sciences, 2006, 34(22): 5768-5770

- [2] 路秀英,杨贵贞. α -促黑激素抗炎作用研究进展(综述)[J].中国神经免疫学和神经病学杂志,2003,10(2):137-140
Lu Xiu-yin, Yang Gui-zhen. Progress in Research of α -Melanocyte-Stimulating Hormone in anti-inflammatory actions [J]. 2003, 10(2): 137-140
- [3] 刘永福,周定刚,谢建华,等.促黑激素皮质素对能量代谢以及黑色素沉积的影响[J].饲料博览,2007,(1):12-14
Liu Yong-fu, Zhou Ding-gang, Xie Jian-hua, et al. Effects of Melanocortins on Energy Metabolism and Melanin Pigmentation[J]. Feed review, 2007, (1):12-14
- [4] Abdel-Malek ZA, Ruwe A, Kavanagh-Starnier R, et al. Alpha-MSH tripeptide analogs activate the melanocortin 1 receptor and reduce UV-induced DNA damage in human melanocytes [J]. Pigment Cell Melanoma Res, 2009, 22(5):635-644
- [5] 赵慧茹,刘德敏.促黑细胞素的研究进展 [J].天津医科大学学报,2005,11(4):653-656
Zhao Hui-ru, Liu De-min. Progress in Research on Melanocyte-Stimulating Hormone [J]. Journal of Tianjin Medical University, 2005, 11(4): 653-656
- [6] Gonzalez PV, Schiöth HB, Lasaga M, et al. Memory impairment induced by IL-1beta is reversed by alpha-MSH through central melanocortin-4 receptors[J]. Brain Behav Immun, 2009, 23: 817-822
- [7] Helgi B. Schiöth, Ruta Muceniece, et al. Selectivity of Cyclic [D-Nal7] and [D-Phe7] Substituted MSH Analogues for the Melanocortin Receptor Subtypes[J].Peptides,1997,18(7):1009-1013
- [8] 张静,王海泉. α -促黑素细胞激素与皮肤炎症[J].国外医学:皮肤病学分册,2004,30(1):35-37
Zhang Jing, Wen Hai-quan. α -Melanocyte-Stimulating Hormone and Inflammation [J]. Foreign Medical Sciences: Section of Dermatology and Venereology, 2004, 30(1): 35-37
- [9] 肖调立,龙剑虹. α -促黑素细胞刺激素、白细胞介素-8与病理性瘢痕[J].医学综述,2007,13(3):175-177 (下转第 2190 页)

- [19] Wang, T. Glutathione S-transferase P1-1 (GSTP1-1) inhibits c-Jun N-terminal kinase (JNK1) signaling through interaction with the C terminus[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(24): 20999-21003
- [20] Elsby, R. Increased constitutive c-Jun N-terminal kinase signaling in mice lacking glutathione S-transferase Pi [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(25): 22243-22249
- [21] Kim, Y.J. Prx1 suppresses radiation-induced c-Jun NH2-terminal kinase signaling in lung cancer cells through interaction with the glutathione S-transferase Pi/c-Jun NH2-terminal kinase complex[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(14): 7136-7142
- [22] Ichijo, H. Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways [J]. *Science*, 1997, 275(5296): 90-94
- [23] Kim, S.Y., T.J. Kim and K.Y. Lee. A novel function of peroxiredoxin 1 (Prx-1) in apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1)-mediated signaling pathway[J]. *FEBS Lett*, 2008, 582(13): 1913-1918
- [24] Neumann, C.A. Essential role for the peroxiredoxin Prdx1 in erythrocyte antioxidant defence and tumour suppression[J]. *Nature*, 2003, 424(6948): 561-565
- [25] Du ZX. Suppression of MG132-mediated cell death by peroxiredoxin 1 through influence on ASK1 activation in human thyroid cancer cells [J]. *Endocr Relat Cancer*, 2010, 17(3): 553-560
- [26] Mohler, J.L. The androgen axis in recurrent prostate cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(2): 440-448
- [27] Jain, R.K. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy[J]. *Science*, 2005, 307(5706): 58-62
- [28] Chhipa, R.R. Prx1 enhances androgen receptor function in prostate cancer cells by increasing receptor affinity to dihydrotestosterone[J]. *Mol Cancer Res*, 2009, 7(9): 1543-1552
- [29] Leslie, N.R. Redox regulation of PI 3-kinase signalling via inactivation of PTEN. *EMBO J*, 2003, 22(20): 5501-5510
- [30] Lee, S.R. Reversible inactivation of the tumor suppressor PTEN by H₂O₂[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(23): 20336-20342
- [31] Cao, J. Prdx1 inhibits tumorigenesis via regulating PTEN/AKT activity[J]. *MBO J*, 2009, 28(10): 1505-1517

(上接第 2176 页)

- Xiao Tiao-li, Long Jian-hong. α -Melanocyte-Stimulating Hormone, Interleukin-8 and Pathological Scar [J]. *Medical Recapitulate*, 2007, 13(3): 175-177
- [10] 张春华, 毕新岭. α -促黑素对银屑病患者外周血单一核细胞产生 TNF- α 和 IL-10 的影响[J]. *中华皮肤科杂志*, 2009, 42(7): 477-480
- Zhang Chun-hua, Bi Xin-ling. Effects of α -melanocyte-stimulating hormone on the production of TNF- α and IL-10 by peripheral blood mononuclear cells from patients with psoriasis[J]. *Chinese Journal of Dermatology*, 2009, 42(7): 477-480
- [11] Kaiser E, Colescott RL, Bossinger CD, et al. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides [J]. *Analytical Biochemistry*, 1979, 34(2): 595-598
- [12] Mac EH, Robert TD. Melanocortin peptide therapeutics Historical milestones, clinical studies and commercialization[J]. *Peptides*, 2006, 27(4): 921-930
- [13] Isidro-Llobet A, Alvarez M, Albericio F. Amino acid-protecting groups[J]. *Chem rev.*, 2009, 109(6):2455-2504
- [14] 符友伟, 吴蕾. 多肽固相合成法中的 3 个关键点[J]. *化学工业与工程*, 2010, 27(4): 370-375
- Fu You-wei, Wu Lei. Three Key Steps in Solid Phase Peptide Synthesis[J]. *Chemical Industry and Engineering*, 2010, 27(4): 370-375
- [15] 欧阳嘉, 李鑫, 潘宗敏, 等. Fmoc(9- 芴甲氧羰基)法固相合成胸腺五肽[J]. *南京工业大学学报(自然科学版)*, 2005, 27(3): 61-64
- OuYang Jia, Li Xin, Pan Zong-min, et al. The solid-phase peptide synthesis(SPPS) of thymopentin(TP5) by Fmoc strategy[J]. *Journal of Nanjing University of Technology (Natural Science Edition)*, 2005, 27(3):61-64
- [16] Chan WC, White PD. Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach[M]. Oxford University Press, 2000: 61-62