

太子参环肽 B(Heterophyllin B, HB)的酶环化反应

贾爱群 李 湘 谭宁华 刘小烛 沈月毛 周 俊 *

(中国科学院昆明植物研究所 植物化学与西部植物资源持续利用国家重点实验室, 昆明 650204; 中国科学院研究生院, 北京 100039; 杭州中肽有限公司, 杭州 310018; 西南林学院, 昆明 650204)

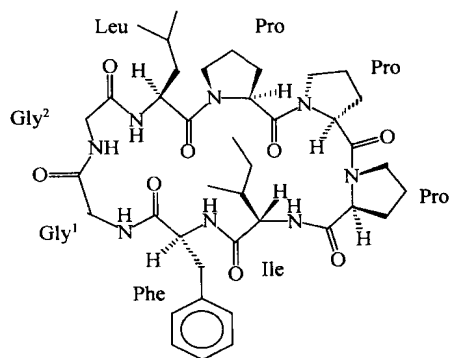
摘要 利用从 *Pseudostellaria heterophylla* 提取分离的粗酶 PH-1, 以链八肽 NH₂-Gly¹-Gly²-Leu-Pro-Pro-Pro-Ile-Phe-COOH (4)为底物成功地进行了太子参环肽 B(heterophyllin B (HB))的环化反应, 并利用 TLC, HPLC, MS, NMR 以及同位素标记等手段对反应产物进行了分析和确证.

关键词 太子参 环肽 太子参环肽 B 酶环化 同位素标记

环肽(cyclopeptides, cyclic peptides)是一类重要的天然产物, 按照其来源的不同可分为植物环肽、动物环肽和微生物环肽. 在过去的十多年中, 我们课题组从植物里共分离鉴定了约 100 个环肽^[1]. 随着环肽从自然界的不断发现, 其独特新颖的结构引起了诸多学科的关注, 最近已经有关于微生物环肽的报道, 如 tyrocidine A^[2-4]. 但植物环肽, 尤其是高等植物环肽的生物合成途径一直困扰着我们.

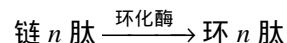
太子参是石竹科植物异叶假繁缕(*Pseudostellaria heterophylla* (Mig.) Pax ex Pax et Hoffm)的块茎, 是一种著名的传统中药^[5]. 因为太子参环肽 B 较其它植物环肽在植物体中含量大、结构明确, 组成氨基酸全为 *l* 型, 且原植物易得^[6], 因此本文以太子参为研究对象, 以太子参环肽 B(heterophyllin B, HB)为目标产物(TC)(结构如式 1)进行了植物环肽酶环化的初步探讨.

关于 HB 的酶环化反应, 我们遵循从简单入手的原则(*ab initio*), 并结合微生物环肽的合成途径, 认为



式 1 太子参环肽 B (HB)

植物环肽有可能是在某一或某些环化酶的作用下, 利用体内已有的链肽一步形成相应的植物环肽, 即:



在此假说下, 要合成 HB, 理论上需要合成 8 个链八肽, 但由于环肽中存在 3 个位阻很大的脯氨酸

(Pro), 因此在与 3 个脯氨酸相连接的 4 个位点形成环肽的可能性很小, 故利用肽的固相合成方法(SPPS)只需要合成 4 个链八肽作为底物即可. 即:

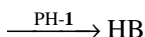
- 1: $\text{NH}_2\text{-Phe-Gly}^1\text{-Gly}^2\text{-Leu-Pro-Pro-Pro-Ile-COOH}$
- 2: $\text{NH}_2\text{-Gly}^2\text{-Leu-Pro-Pro-Pro-Ile-Phe-Gly}^1\text{-COOH}$
- 3: $\text{NH}_2\text{-Leu-Pro-Pro-Pro-Ile-Phe-Gly}^1\text{-Gly}^2\text{-COOH}$
- 4: $\text{NH}_2\text{-Gly}^1\text{-Gly}^2\text{-Leu-Pro-Pro-Pro-Ile-Phe-COOH}$

上述链八肽的所有氨基酸残基均是 *l* 构型.

该环化反应中所需要的酶是经过下列分离步骤得到的: (i) 快速洗去新鲜太子参上的泥土后, 利用细胞粉碎的方法在 4 °C 下, 提取总蛋白; (ii) 利用 Sephadex G-50 和阳离子交换树脂 CM-52 进行分离纯化, 得到粗环化酶 PH-1.

接着在下列反应条件下, 进行 HB 的环化反应:

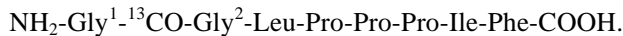
- (1) $\text{NH}_2\text{-Phe-Gly}^1\text{-Gly}^2\text{-Leu-Pro-Pro-Pro-Ile-COOH}$
- (2) $\text{NH}_2\text{-Gly}^2\text{-Leu-Pro-Pro-Pro-Ile-Phe-Gly}^1\text{-COOH}$
- (3) $\text{NH}_2\text{-Leu-Pro-Pro-Pro-Ile-Phe-Gly}^1\text{-Gly}^2\text{-COOH}$
- (4) $\text{NH}_2\text{-Gly}^1\text{-Gly}^2\text{-Leu-Pro-Pro-Pro-Ile-Phe-COOH}$



缓冲液: Tris : pH=8.0; 温度: 24 °C; 时间: 3 h; 底物 1~4 : 环化酶 = 1 : 8; 反应(4)得率: 27.28%.

在相同条件下, 分别以链八肽 1~4 为底物进行环化反应, 发现仅链八肽 4 在粗酶 PH-1 作用下呈阳性反应, 而链八肽 1~3 则没发生反应. 为证明反应是否呈阳性或阴性反应, 在严格的相同条件下, 反复进行了底物 1~4 的平行反应, 进一步证明了仅底物 4 呈阳性反应, 平均得率为 27.28%.

为了进一步验证反应 4 是否假阳性反应, 我们利用 SPPS 方法对底物 4 上与苯丙氨酸相连的甘氨酸上的羰基进行了 ^{13}C 同位素标记, 即:



在相同反应条件下, 证明了反应 4 是阳性反应. 接着, 我们利用半制备 HPLC 技术分离纯化了反应产物, 并利用诸多分析手段如 TLC, HPLC, MS 和 NMR 对反应液或反应产物进行了分析.

利用环肽的 TLC 检测方法^[1], 发现反应 4 的产物呈现环肽的特征显色, 说明在反应条件下, 链八肽 4 进行了环化反应(图 1).

接着我们对反应 1~4 各反应液进行了 HPLC 分析(图 2), 发现底物 1~4 的保留时间分别为 7.196, 12.533,

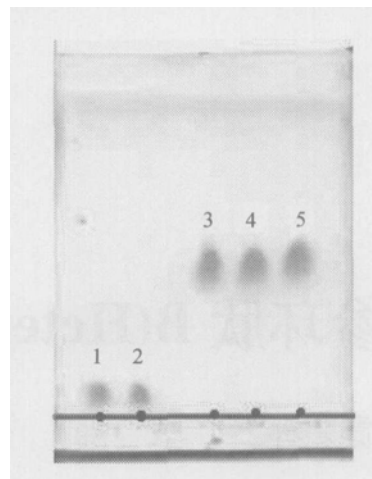


图 1 TLC 检测图

硅胶 G 板; 流动相: $\text{CHCl}_3 : \text{CH}_3\text{OH} = 9 : 1$; 1, 4; 2, ^{13}C 标记 4; 3, ^{13}C 标记 HB(酶合成产物); 4, HB(酶合成产物); 5, HB(标准品)

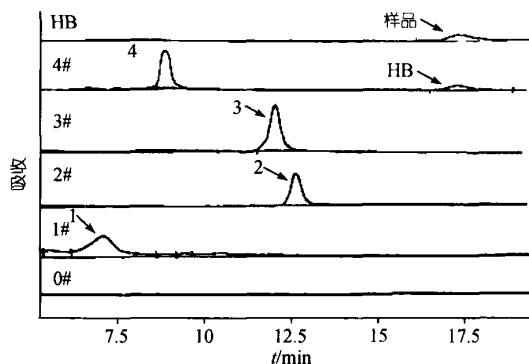


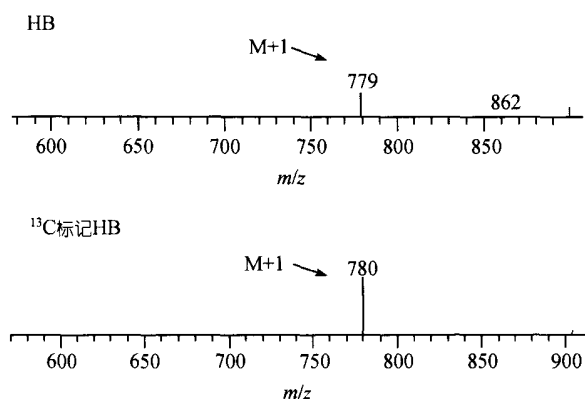
图 2 HPLC 检测图

仪器: Agilent 1100 (Agilent Technologies, Wilmington, USA); 层析柱: Accurasil C-18 (5 μm , 250 mm \times 4.6 mm); 流动相: 70% H_2O 和 30% CH_3CN ; 检测波长: 192 nm; 流速: 1 mL/min; 4# (3#, 2#, 1#): 粗酶+4 (3, 2, 1); 0#: 酶

11.904 和 8.831 min, 并发现反应 4 有产物峰出现, 其保留时间 17.318 min, 通过与对照品 HB 的保留时间 (17.340 min) 比较, 证明反应 4 的产物有可能是 HB.

对纯化的反应产物进行了 $\text{FAB}^+\text{-MS}$ 分析, 分别得到 2 个分子离子峰: 779 ($[\text{M}+1]^+$) 和 780 ($[\text{M}+1]^+$), 可能是反应产物 HB 和 ^{13}C 标记 HB 的分子离子峰(图 3).

为了进一步证明环化反应的成功与否, 我们利用 $\text{FAB}^+\text{-MS}$ 对反应产物 ^{13}C 标记 HB 进行了同位素峰组分析, 发现产物中的同位素组成为: $[\text{}^{13}\text{C HB}]/\text{HB}$

图3 HB和 ^{13}C 标记HB的FAB⁺-MS谱

= 8 : 1. 通过反应产物 ^{13}C 标记HB和反应底物 ^{13}C 4比较发现: 前者的 ^{13}C 丰度为89.13%, 后者的为92.46%, 即在反应过程中发生了部分 ^{13}C 衰变(表1).

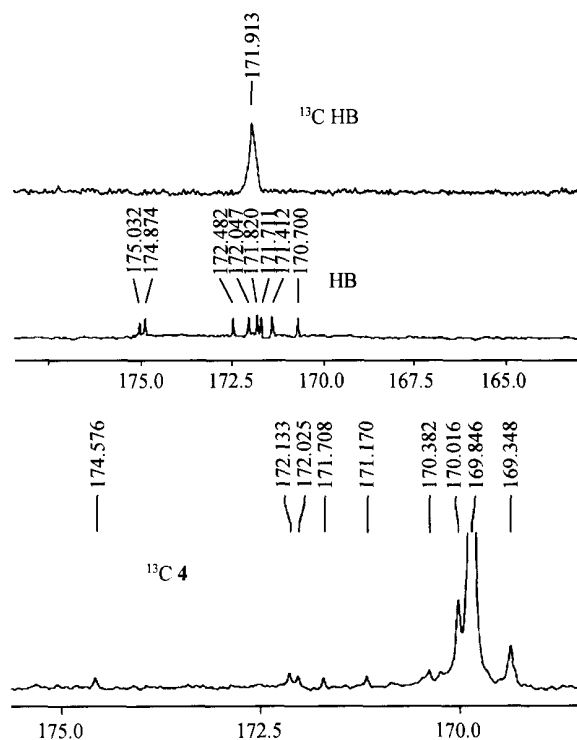
表1 ^{13}C 标记4和 ^{13}C 标记HB的FAB⁺-MS丰度

	M	M+1	M+2	M+3	M+4
^{13}C 4	8.16	100.00	83.33	37.38	13.24
	(797)	(798)	(799)	(800)	(801)
^{13}C HB	12.19	100.00	83.11	14.36	7.13
	(779)	(780)	(781)	(782)	(783)

最后我们对反应产物 ^{13}C 标记HB和HB进行了 ^{13}C NMR分析并与文献对照知, 171.820是HB中Gly¹的羰基峰, 而171.913是 ^{13}C 标记HB中Gly¹的羰基峰, 较HB中的Gly¹羰基峰化学位移向低场位移0.093, 而底物4中Gly¹的羰基峰为169.846, 与171.913相比, 化学位移相差2.067, 显然171.913应该是反应产物 ^{13}C 标记HB中Gly¹的羰基峰, 进一步证明反应4是一阳性反应, 即在反应条件下, 成功地合成了目标产物HB(图4).

上述多种分析手段以及同位素标记方法的综合运用证明底物4在反应条件下可以成功地合成目标产物HB.

在进行该反应之前, 我们对植物环肽尤其石竹科环肽中的氨基酸残基和二肽残基进行了数学统计, 发现甘氨酸和苯丙氨酸残基在出现几率很大, 并且二者形成的二肽残基在环肽中出现的几率也较大,

图4 ^{13}C 标记4, HB和 ^{13}C 标记HB的 ^{13}C NMR谱

氘代溶剂: $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz

因此我们预测, 甘氨酸和苯丙氨酸可能是由链肽形成环肽的反应位点, 该反应的成功也证明了我们的预测.

在本文中我们只是进行了HB的酶环化反应研究, 至于由甘氨酸和苯丙氨酸形成的二肽残基是否是该类环肽环化的位点还需进一步证明.

另外我们只是对植物环肽进行了初步的酶环化反应, 其中所用的环化酶PH-1是一粗酶, 还有待进一步分离纯化, 是单一酶还是多酶共同作用尚不得而知, 根据微生物环肽的环化反应推测^[2-4], 植物环肽也可能是多酶作用的结果. 通过对粗酶PH-1的分离纯化也初步证明环肽HB的环化是多酶作用.

该研究是植物环肽环化反应的初步探讨, 目前还没发现关于植物环肽的环化反应文献报道. 为数不多的几篇文献则集中在微生物环肽的环化研究上^[2,3].

致谢 感谢中国科学院昆明植物研究所植物化学与西部植物资源国家重点实验室分析测试中心的分析

测试,感谢中国科学院昆明植物研究所植物化学与西部植物资源国家重点实验室胡忠研究员的有益帮助.

参 考 文 献

- 1 Zhou J, Tan N H. Application of a new TLC chemical method for detection of cyclopeptides in plants. *Chinese Science Bulletin* 2000, 45(20): 1825~1831
- 2 Kohli R M, Walsh C T, Burkart M D. Biomimetics synthesis and optimization of cyclic peptide antibiotics. *Nature*, 2002, 418(6898): 658~661
- 3 Kohli R M, Burke M D, Tao J H, Walsh C T. Chemoenzymatic route to macrocyclic hybrid peptide/polyketide-like molecules. *J Am Chem Soc*, 2003, 125(24): 7160~7161
- 4 Jackson D Y, Burnier J P, Wells J A. Enzymatic cyclization of linear peptides esters using subtiligase. *J Am Chem Soc*, 1995, 117(2): 819~820
- 5 中国医学科学院. 中药志, 第 2 卷. 北京: 人民卫生出版社, 1995. 266~268
- 6 Tan N H, Zhou J, Chen C X, Zhao S X. Cyclopeptides from the root of *Pseudostellaria heterophylla*. *Phytochemistry*, 1993, 32(5): 1327~1330