

## 胃泌素类似物的人工合成和泌酸活性研究\*

陈钧辉 张春妮 罗喜牛 王新昌 胡世全\*\*

(南京大学生物化学系)

**摘要** 本文采用液相合成法合成了九种胃泌素类似物,并用大白鼠胃灌流技术测定其泌酸活性。若以五肽胃泌素 ( $\text{Boc-}\beta\text{-Ala-Trp-Met-Asp-phe-NH}_2$ , Boc-五肽) 的泌酸活性为100%,则胃泌其它类似物的活性分别为: Boc-四肽 ( $\text{Boc-Trp-Met-Asp-Phe-NH}_2$ ) 30.32%, Boc-三肽 ( $\text{Boc-Met-Asp-phe-NH}_2$ ) 0.13%; Fmoc-五肽 ( $\text{Fmoc-}\beta\text{-Ala-Trp-Met-ASP-Phe-NH}_2$ ) 171%, Fmoc-四肽 ( $\text{Fmoc-Trp-Met-Asp-Phe-NH}_2$ ) 32.88%, Fmoc-三肽 ( $\text{Fmoc-Met-Asp-Phe-NH}_2$ ) 0.17%; 五肽·TFA ( $\beta\text{-Ala-Trp-Met-Asp-Phe-NH}_2 \cdot \text{TFA}$ ) 17.45%, 四肽·TFA ( $\text{Trp-Met-Asp-ph e-NH}_2 \cdot \text{TFA}$ ) 5.58%。

实验结果显示四肽胃泌素类似物的活性这比三肽的高,表明胃泌素C-端片段中色氨酸残基对泌酸活性十分重要。在胃泌素类似物的N-端导入保护基同样提高它们的生物学活性,而Fmoc-保护基的作用还强于Boc-保护性。推测其主要原因是在N-式加上一个疏水性强的基团后有利于形成一个与受体相结合的活性构象。

**关键词:** 胃泌素类似物 液相合成 胃灌流 泌酸活性

Gregory等于1964年确定了胃泌素的一级结构并人工合成<sup>[1]</sup>,其C-端四肽 ( $\text{Trp-Met-Asp-phe-NH}_2$ ) 是它的活性部位<sup>[2]</sup>,具有泌酸活性的最小结构单位的构象要求是在分子的C-端区与N-端区之间形成疏水作用,这种疏水作用可使分子形成一个稳定的 $\gamma$ -转角<sup>[3]</sup>。至今已合成了许多胃泌素类似物<sup>[4,5,6]</sup>,其中人工合成的五肽胃泌素具有很强的泌酸活性<sup>[7]</sup>,已作为诊断试剂广泛应用于临床。

考虑苄氧羰基 (Fmoc-) 是一种疏水性强的基团,可以与胃泌素C-端的  $\text{Phe-NH}_2$  形成一个稳定的 $\gamma$ -转角。我们合成了三种以Fmoc-为N-端的胃泌素类似物,同间也合成了相应的Boc-系列及N-端未加保护基的胃泌素类似物。用大白鼠胃灌流法<sup>[8]</sup>测定泌酸活性,从而对胃泌素的结构与泌酸功能的关系作了探讨。

1987年7月21日收到初稿,1988年11月收到修改稿。

\* 胃泌素及其类似物的研究之I

\*\* 中国科学院上海生物化学研究所

缩写: Boc, 叔丁氧羰基; Fmoc-, 苄氧羰基; Z-, 苄氧羰基; OBzl-, 苄酯; DCCI, 二环己基碳二亚胺; HOSuN-羧基琥珀酰亚胺; HONP, 对硝基苯酚; HOBt, 1-羟苯并三氮唑; DMF, 二甲基甲酰胺; THF, 四氢呋喃; TFA, 三氟乙酸。

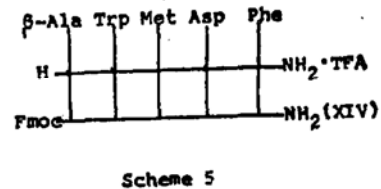
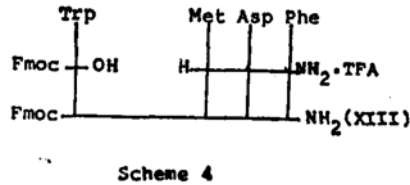
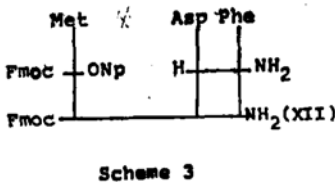
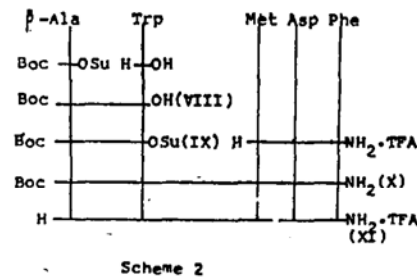
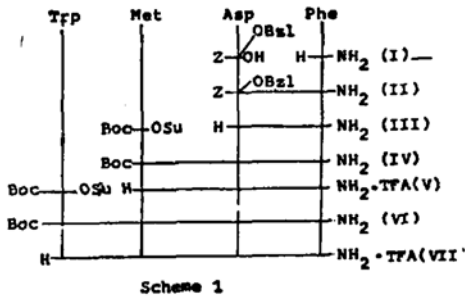
# 材 料 和 方 法

## 一、材料

氨基酸 ( $\beta$ -Ala、L-Trp、L-Asp、L-Phe) 为上海东风生化试剂厂产品。Boc-N<sup>3</sup>、HoSu、HOBt和氨基酸衍生物均由本实验室合成。硅胶 (Kieselgel 60G) 和三氟醋酸为西德 Merck 公司产品, 氯甲酸异丁酯为西德产品, N-甲基吗啉为瑞士产品, 其它试剂均为国产 A.R. 级或 C.P. 级。实验动物体重250—400克的雄性Wistar大白鼠。

## 二、方法

1. 胃泌素类似物的人工合成: Scheme 1--5为九种胃泌素类似物的合成路线。



Phe-NH<sub>2</sub> (I): Phe 经 Phe-OCH<sub>3</sub> 再通干燥氨总产率为 60%。m.p. 91—92°C, S<sub>1</sub>R<sub>F</sub> 0.24。

Z-Asp(OBzl)-Phe-NH<sub>2</sub> (II): Z-Asp(OBzl)-OH 和 Phe-NH<sub>2</sub> 在 DMF 中冰浴下加 DCCI 反应过夜。抽滤, 滤液中加大量水, 立即析出白色沉淀, 沉淀依次用 0.5mol/L HCl、1mol/L KHCO<sub>3</sub> 和 5% NaCl 研磨, 抽滤, 干燥, 产率 82%。m.p. 162—164°C, S<sub>1</sub>R<sub>F</sub> 0.86  
 Asp-Phe-NH<sub>2</sub> (III): 用催化氢化法脱去化合物 II 的保护基即得 III, 产率 90%, m.p. 187—188°C, S<sub>1</sub>R<sub>F</sub> 0.09。

Boc-Met-Asp-Phe-NH<sub>2</sub> (IV): Asp-Phe-NH<sub>2</sub> 和 Boc-Met-OSu 在 THF 与 KHCO<sub>3</sub> 水溶液中, 20°C 反应 2 天, 反应过程中以 KHCO<sub>3</sub> 维持 PH8。抽去 THF 得固体, 0.5mo 冰醋酸研磨, 抽滤, 水洗至中性。白色固体用甲醇-水重结晶, 抽滤, 干燥, 产率 74%。m.p. 209—210°C, S<sub>1</sub>R<sub>F</sub> 0.64。

Met-Asp-Phe-NH<sub>2</sub> · TFA(T): 50% TFA 脱去化合物 IV 的 Boc-基即得 V。产率 82%, m.p. 195—197°C, S<sub>1</sub>R<sub>F</sub> 0.10。Boc-Trp-Met-Asp-Phe-NH<sub>2</sub> (VI): Met-Asp-Phe-NH<sub>2</sub> · TF

A和Boc-Trp-OSu在THF与 $\text{KHCO}_3$ 水溶液中, 室温反应2天。抽去THF得固体, 加冰醋酸-水(1:3.3)研磨, 抽滤, 水洗, 乙醇重结晶, 产率61%, m.p.214—216°C,  $S_1R_F$ 0.64。

Trp-Met-Asp-Phe-NH<sub>2</sub>·TFA (V I I): 用50%TFA(含少量苯甲醚和 $\beta$ -巯基乙醇)脱去化合物V I的保护基即得V I I, 产率64%, m.p.203—205°C,  $S_1F$ 0.22。

Boc- $\beta$ -Ala-Trp-OH (V I I I): Trp和Boc- $\beta$ -Ala-OSu在THF与 $\text{KHCO}_3$ 水溶液中, 35°C反应2天。抽去THF得油状物, 用4mol/L冰醋酸中和 $\text{KHCO}_3$ , 乙酸乙酯抽提, 常规操作。产率55%。m.p.138—140°C,  $S_1R_F$ 0.63。元素分析:  $\text{C}_{19}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_5$  (375.41) 理论值: C 60.78%, H 6.71%, N 11.19%, 实测值: C 61.58%, H 6.49%, N 10.94%。

Boc- $\beta$ -Ala-Trp-OSu (I X): Boc- $\beta$ -Ala-Trp-OH与HOSu在THF中用DCCI作缩合剂, 冰浴反应6小时后室温过夜。抽滤, 滤液浓缩至干得油状物。加异丙醇热溶, 冷后析出白色固体, 干燥, 产率50%, m.p.160—162°C,  $S_2R_F$ 0.90。元素分析:  $\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{O}_7$  (472.41) 理论值: C 58.47%, H 5.97%, N 11.86%, 实测值: C 58.37%, H 5.91, N 11.28%。

Boc- $\beta$ -Ala-Trp-Met-Asp-Phe-HN<sub>2</sub>(X): Met-Asp-Phe-NH<sub>2</sub>·TFA和Boc- $\beta$ -Ala-Trp-OSu在THF与 $\text{KHCO}_3$ 水溶液中室温反应3天, 反应过程中加少量DMF。减压抽去THF, 将反应液倒入水中, 加几滴冰醋酸, 冰箱过夜。抽滤, 水洗, 干燥。固体加甲醇回流至全溶, 冷后抽去部分甲醇, 冰箱过夜。抽滤, 干燥, 产率65%, m.p.228—230°C,  $S_1R_F$ 0.60。

$\beta$ -Ala-Trp-Met-Asp-Phe-NH<sub>2</sub>·TFA (X I): 用类似于制备化合物V I I的方法。产率79%, m.p.192—194°C,  $S_1R_F$ 0.08。

Fmoc-Met-Asp-Phe-NH<sub>2</sub> (X I I): Asp-Phe-NH<sub>2</sub>判等当量HOBt及Fmoc-Met-ONp在DMF中室温反应24小时, 减压除去DMF, 无水乙醚研磨, 干燥, 产率47%, m.p.223—225°C,  $S_1R_F$ 0.71。元素分析 $\text{C}_{33}\text{H}_{35}\text{N}_4\text{O}_7\text{S}$  (631.67) 理论值: C 62.69%, H 5.58%, N 8.86%, 实测值: C 62.55%, H 5.42%, N 8.58%。

Fmoc-Trp-Met-Asp-Phe-NH<sub>2</sub> (X I I I) 0.2毫摩尔Fmoc-Trp-OH溶于2毫升THF中, 加0.11毫升N-甲基吗啉和0.13毫升氯甲酸异丁酯, -15°C搅20分钟, 滴入下列溶液: 含0.5毫摩尔Met-Asp-Phe-NH<sub>2</sub>·TFA的0.11毫升N-甲基吗啉与1毫升THF。-15°C反应45分钟, 0°C反应4小时, 自然升温, 次日抽去THF, 加少量水, 用1mol/L HCl酸化至PH4, 加乙酸乙酯, 不溶的固体用水洗至中性, 干燥得0.18克, 产率40%, m.p.224—226°C,  $S_1R_F$ 0.71。元素分析:  $\text{C}_{44}\text{H}_{45}\text{N}_6\text{O}_8\text{S}$  (817.88) 理论值: C 64.55%, H 5.55%, N 10.27%, 实测值: C 64.17%, H 5.41%, N 9.75%。

Fmoc- $\beta$ -Ala-Trp-Met-Asp-Phe-NH<sub>2</sub> (X I V) 76.8微摩尔 $\beta$ -Ala-Trp-Met-Asp-Phe-NH<sub>2</sub>·TFA加0.29毫升10% $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 溶液, 冰浴下滴加含0.024克Fmoc-Cl的二氧六环溶液, 反应6小时后自然升温过夜。加大量水, 乙醚洗, 水相于冰浴中用2mol/L HCl调PH至3, 有白色沉淀生成, 冰箱过夜。抽滤, 用0.1mol/L HCl及水洗, 干燥得0.03克, 产率44%, m.p.206—207°C,  $S_1R_F$ 0.65。元素分析:  $\text{C}_{47}\text{H}_{50}\text{N}_7\text{O}_9\text{S}$  (888.96) 理论值: C 93.50%, H 5.67%, N 11.02%, 实测值: C 62.78%, H 5.60%, N 10.85%。

2. 胃泌素类似物生物活性的测定: 主要按pissidis和Clark的鼠胃灌注法<sup>[8]</sup>, 并作了适当改进。未注射样液前10分钟胃酸排出量为基础胃酸, 每隔10分钟测定一次胃酸排出量, 并算出1小时的胃酸总排出量。

## 结 果

### 一、人工合成胃泌素类似物的纯度鉴定

1. 薄板层析鉴定: 九种胃泌素类似物层析斑点均为一点。层析溶剂为  $S_1$  或  $S_2$ ,  $S_1$ : 醋酸丁酯: 异丙醇 (10:4), 吡啶: 醋酸: 水 (4:1:1), 前者七份与后者三份相混;  $S_2$ : 正丁醇: 醋酸: 水 (4:1:1)。

2. 氨基酸组成分析: 九种胃泌素类似物氨基酸组成分析表明, 它们的组成比与理论值接近 (Table 1)。

**Table 1.** Amino acid composition of the gastrin analogs

Gastrin analogs	Amino acid				
	$\beta$ -Ala	Trp*	Met	Asp	phe
Boc-Met-Asp-Phe-NH <sub>2</sub>			0.62(1)	1.00(1)	1.20(1)
Boc-Trp-Met-Asp-Phe-NH <sub>2</sub>		- (1)	1.10(1)	0.97(1)	1.00(1)
Boc- $\beta$ -Ala-Trp-Met-Asp-Phe-NH <sub>2</sub>	0.96(1)	- (1)	0.85(1)	1.15(1)	1.00(1)
Fmoc-Met-Asp-Phe-NH <sub>2</sub>			0.85(1)	1.15(1)	1.00(1)
Fmoc-Trp-Met-Asp-Phe-NH <sub>2</sub>		- (1)	0.79(1)	1.01(1)	1.00(1)
Fmoc- $\beta$ -Ala-Trp-Met-Asp-Phe-NH <sub>2</sub>	0.92(1)	- (1)	1.00(1)	1.03(1)	1.05(1)
Met-Asp-Phe-NH <sub>2</sub> ·TFA			1.08(1)	0.96(1)	1.00(1)
Trp-Met-Asp-Phe-NH <sub>2</sub> ·TFA		- (1)	0.99(1)	1.00(1)	1.03(1)
$\beta$ -Ala-Trp-Met-Asp-Phe-NH <sub>2</sub> ·TFA	1.27(1)	- (1)	1.20(1)	0.92(1)	1.00(1)

\*Trp is not detected due to destruction during hydrolysis in 5.7 mol/L HCl.

### 二、胃泌素类似物泌酸活性比较

用每小时每毫摩尔类似物促使胃酸排出的毫克当量数代表类似物泌酸活性的大小。Table 2 列出了八种胃泌素类似物的测定结果。

**Table 2.** Acid stimulatory activity of the gastrin analogs

Gastrin analogs	Gastric acid output (mEq/m more, hr)					
	Number of determination					
	1	2	3	4	5	6
Boc- $\beta$ -Ala-Trp-Met-Asp-Phe-NH <sub>2</sub>	2900	1560	880	1960	2380	6820
Boc-Trp-Met-Asp-Phe-NH <sub>2</sub>	860	490	290	570	660	2120
Boc-Met-Asp-Phe-NH <sub>2</sub>	3.4	1.8	1.2	2.5	2.6	9.6

Boc-β-Ala-Trp-Met-Asp-Phe-NH <sub>2</sub>	5620	3640	1980	4340	4270	—
β-Ala-Trp-Met-Asp-Phe-NH <sub>2</sub> ·TFA	1160	740	340	760	700	—
Trp-Met-Asp-Phe-NH <sub>2</sub> ·TFA	300	190	110	240	190	—
Boc-β-Ala-Trp-Met-Asp-Phe-NH <sub>2</sub>	2120	1650	2770	1760	—	—
Fmoc-β-Ala-Trp-Met-Asp-Phe-NH <sub>2</sub>	3860	3780	3410	2640	—	—
Boc-β-Ala-Trp-Met-Asp-Phe-NH <sub>2</sub>	2120	3100	1650	2500	—	—
Fmoc-Trp-Met-Asp-Phe-NH <sub>2</sub>	460	1400	440	950	—	—
Boc-β-Ala-Trp-Met-Asp-Phe-NH <sub>2</sub>	2120	3100	5020	2520	—	—
Fmoc-Met-Asp-Phe-NH <sub>2</sub>	3.2	5.3	9.7	3.6	—	—

如以五肽胃泌素的泌酸活性为100%，则其它类似物的相对泌酸活性见Table3，并将Table3中各种胃泌素类似物与五肽胃泌素进行差异显著性检验。

Table 3. Relative acid stimulatory acid activity of the gastrin analogs

Gastrin analogs	Relative acid stimulatory activity%
Boc-β-Ala-Trp-Met-Asp-Phe-NH <sub>2</sub>	100
Fmoc-β-Ala-Trp-Met-Asp-Phe-NH <sub>2</sub>	171 ± 46*
β-Ala-Trp-Met-Asp-Phe-NH <sub>2</sub> ·TFA	17.45 ± 1.84**
Boc-Trp-Met-Asp-Phe-NH <sub>2</sub>	30.32 ± 1.86
Fmoc-Trp-Met-Asp-Phe-NH <sub>2</sub>	32.88 ± 10.65
Trp-Met-Asp-Phe-NH <sub>2</sub> ·TFA	5.58 ± 0.52**
Boc-Met-Asp-Phe-NH <sub>2</sub>	0.13 ± 0.012**
Fmoc-Met-Asp-Phe-NH <sub>2</sub>	0.17 ± 0.023**

\* < 0.05    \*\* P < 0.01

## 讨 论

在天然胃泌素分子C-端四肽氨基酸序列的基础上，我们合成了九种胃泌素类似物，这些类似物一级结构的差别在于肽链片段的长短不同和其N-端有无保护基或保护基种类不同。

Lin等报道<sup>[9]</sup>，天然胃泌素C-端三肽是泌酸的最小结构单位，而C-端四肽的泌酸活性则大大增加，它的泌酸活性比相同摩尔的三肽强4000倍而与五肽相当。我们的实验结果基本与Lin的一致。

实验结果也同时表明，N-端有无保护基对类似物泌酸活性有明显影响。在其N-端加上Boc-或Fmoc-保护基的其泌酸活性均大于相应的N-端游离的胃泌素类似物。这种N-端加上保护基后引起泌酸活性的增加，推测其主要原因是N-端加上一个疏水保护基后可能导致小肽构象的变化，使它形成一种有利于与受体相结合的构象。考虑到Boc-和Fmoc-基团均是疏

水基团, 导入后可能与末端的Phe-NH<sub>2</sub>形成 $\gamma$ -转角, 因而有利于与受体结合。而Fmoc-五肽的泌酸活性高于Boc-五肽, 因前者的疏水性比后者更强, 很可能对形成活性构象更为有利。这有待于用圆二色性和核磁共振等方法加以证明。

### 参 考 文 献

- [1] Gregory, R. A. and Trady, H. J. , *Gut*, (1964) 5, 103.
- [2] Gregory, R. A. and Trady, H. J. , *Nature* (1964) , (London) , 204, 935.
- [3] Zaranpi, M. et al. , (Pub. 1983) *Pep. Proc. Eur. Pept. Sym.* 17th, (1982) , 577.
- [4] Davey, J. M. et al. , *J. Chem. Soc. (C)* , 555.
- [5] Schon, I. et al. , *Hopp-Seyler's Z. Physiol. Chem.* (1978) , 349, 897.
- [6] Penke, B. et al. , (Pub. 1983) *Pep. Proc. Eur. Pept. Sym.* 17th, 1982, 569.
- [7] Kisfaludy, L. et al. , *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* , 359, 887.
- [8] Pissidis, G. A. and Clark, C. G. , *Gut*, (1967) , 8, 196.
- [9] Lin, T-M, et al. , *Gastroenterology*, (1976) , 70, 733.

## The Synthesis of The Gastrin Analogs And Their Stimulation of Gastric Acid Secretion In The Rat

Chen, Jun-hui    Zhang, Chun-ni    Luo, Xi-niu    Wang, Xin-chang  
Hu, Shih-chuan

(Department of Biochemistry, Nanjing University)

**Abstract** Nine gastrin related peptides were synthesized by the liquid-phase synthesis method. An improved technique of perfusion of the stomach in the rat was used to determine the gastric secretion of these analogs. The potency of gastric secretion of pentagastrin was compared with these analogs in per molar basis. The results showed that the relative potency of pentagastrin, Boc-Trp-Met-Asp-Phe-NH<sub>2</sub>, Boc-Met-Asp-Phe-NH<sub>2</sub>, Fmoc- $\beta$ -Ala-Trp-Met-Asp-Phe-NH<sub>2</sub>, Fmoc-Trp-Met-Asp-Phe-NH<sub>2</sub>, Fmoc-Met-Asp-Phe-NH<sub>2</sub>,  $\beta$ -Ala-Trp-Met-Asp-Phe-NH<sub>2</sub> · TFA, and Trp-Met-Asp-Phe-NH<sub>2</sub> · TFA was 100%, 30.32%, 0.13%, 17%, 32.88%, 0.17%, 17.45%, 5.58%, respectively.

These data indicated that the potency of tetrapeptide was much more active than that of tripeptides. It suggests the tryptophanyl residue is very important for gastric secretion activity. The potency was also increased by introduction of a protecting group at the N-terminus of gastrin derivatives. In particular the Fmoc-protecting group was more effective than Boc-protecting group. It may be chiefly due to the conformation of these gastrin related peptides more suitable for their receptor, after being added a strong hydrophobic group.

**Key Words:** gastrin analogs    liquid-phase synthesis    perfusion of the stomach  
acid stimulatory activity.