

血红蛋白 β -链片段合成及生物活性

李晓晖¹, 王 帅¹, 惠欢庆¹, 胡建恩², 修志龙^{1*}

(1. 大连理工大学生命科学与技术学院, 辽宁 大连 116024; 2. 大连水产学院, 辽宁 大连 116023)

摘要: 为探讨血红蛋白 β -链片段的血管紧张素 I 转换酶 (angiotensin I-converting enzyme, ACE) 抑制活性, 采用微波固相合成法以 Wang 树脂或 2-氯三苯甲基氯树脂为固相载体, 以 9-芴甲氧羰基 (9-fluorenylmethoxycarbonyl, Fmoc) 为 *N*-端氨基酸保护基, 以 *O*-苯并三氮唑-*N,N,N',N'*-四甲脒六氟磷酸酯 (*O*-benzotriazole-*N,N,N',N'*-tetramethyl-uronium-hexafluorophosphate, HBTU) 和 1-羟基-苯并三氮唑 (*N*-hydroxybenzotriazole, HOBt) 为缩合试剂, 合成了 17 个血红蛋白 β -链片段。生物活性研究结果表明: 片段 Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr 的 ACE 抑制活性最高, IC_{50} 达 $7.42 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, Val-Val-与-Gln-Arg-Phe 为 Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln-Arg-Phe 的两个活性中心, 当 *N*-端含支链的疏水性氨基酸如 Val、*C*-末端三位氨基酸含有 Phe、Trp、Arg 时活性较强; 高浓度条件下表现有一定的体外降血糖活性, 但合成片段的体外抑菌活性与抗肿瘤活性不十分明显。

关键词: 微波固相合成; 血红蛋白 β -链; 血管紧张素 I 转换酶; α -葡萄糖苷酶

中图分类号: R916

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2010) 10-1270-05

Synthesis and biological activities of β -chain fragments of hemoglobin

LI Xiao-hui¹, WANG Shuai¹, HUI Huan-ying¹, HU Jian-en², XIU Zhi-long^{1*}

(1. School of Life Science and Biotechnology, Dalian University of Technology, Dalian 116024;

2. Dalian Fisheries University, Dalian 116023, China)

Abstract: To investigate the angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity of β -chain hemoglobin fragments, 17 fragments were synthesized by microwave-assisted solid-phase synthesis method. Wang resin or Trt(2-Cl) resin, Fmoc and HBTU-HOBt were used as solid carrier, *N*-terminal amino acid protecting groups and coupling reagents, respectively. The ACE inhibitory, α -glucosidase inhibitory, antibacterial and antitumor activities of the synthesized fragments were assayed. *In vitro*, Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr showed high ACE inhibitory activity ($IC_{50} = 7.42 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). The results indicate that there are two active sites in Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln-Arg-Phe, one consists of Val-Val-, and the other -Gln-Arg-Phe. Peptides showed high ACE inhibitory activity when the *N*-terminal was hydrophobic amino acid such as Val and *C*-terminal tripeptide contained Phe, Trp or Arg. Some of the fragments showed low α -glucosidase inhibitory activity. No antibacterial activity or antitumor activity was detected *in vitro*. The results indicate that these peptides have a potential antihypertensive effect and possible application in the treatment of hypertension.

Key words: microwave solid-phase synthesis; β -chain hemoglobin; angiotensin I-converting enzyme; α -glucosidase

收稿日期: 2010-04-21.

基金项目: 国家“863”计划资助项目 (2006AA10Z331).

*通讯作者 Tel: 86-411-84706326, Fax: 86-411-84706369, E-mail: lxhxd@dlut.edu.cn; zhlxiu@dlut.edu.cn

动物血液是一种宝贵的蛋白质来源, 其蛋白质含量达到 17%~18%, 且氨基酸组成平衡, 其中 60%~70% 存在于血红蛋白^[1]。国内外研究发现, 血红蛋白酶解产物中的一些小分子肽不仅能够提供人体生长发育所需的营养物质, 同时还具有重要的生物活性, 如阿片样活性^[2, 3]、ACE 抑制活性^[4, 5]、增强血管舒缓激肽活性^[6]、镇痛活性^[7]、抗菌活性^[8]及抗氧化活性^[9]等。

近年来有很多血红蛋白 β -链片段活性的研究, Brantl^[2]首次利用酶解牛血红蛋白分离得到 L-VV-血啡肽 (牛血红蛋白 β -链 31-40, LVYPWTQRF) 与 VV-血啡肽 (牛血红蛋白 β -链 32-40, VVYPWTQRF)。Lantz 等^[10]研究表明 YPWTQR (牛血红蛋白 β -链 34-39) 具有抑制 ACE 的活性。1997 年 Zhao^[11]证实 LVYPWTQ 与 VVYPWTQ 具有很高的 ACE 抑制活性 (5.6 和 11.8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。此外 Kagawa 等^[12]研究发现猪和牛的珠蛋白酶水解产物中得到的 VVYP 片段可抑制血清中甘油三酯水平的提高, 能够有效的延缓血管疾病发生和抑制肥胖症。本实验室近几年来利用多种蛋白酶水解猪血红蛋白, 获得 VVYPWT (猪血红蛋白 β -链 34-39) 片段^[4], 体外 ACE 抑制活性实验结果表明 IC_{50} 为 6.02 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

对于合成的多肽药物, 肽链越长, 成本越高, 因此在保证高活性的前提下, 应尽量去除非活性中心的氨基酸残基, 本文所选用的肽模板尽管表现出较高 ACE 抑制活性, 但目前其与 ACE 直接作用的氨基酸残基或者片段仍不清楚, 因此, 本文采用从 C-端和 N-端逐步减少氨基酸残基的办法, 设计了包括 VVYPWTQRF 在内的 17 个多肽片段。一方面根据其活性变化确定必需氨基酸残基或活性中心, 另一方面也为设计肽链更短、靶标性更强的抗高血压药物提供依据。

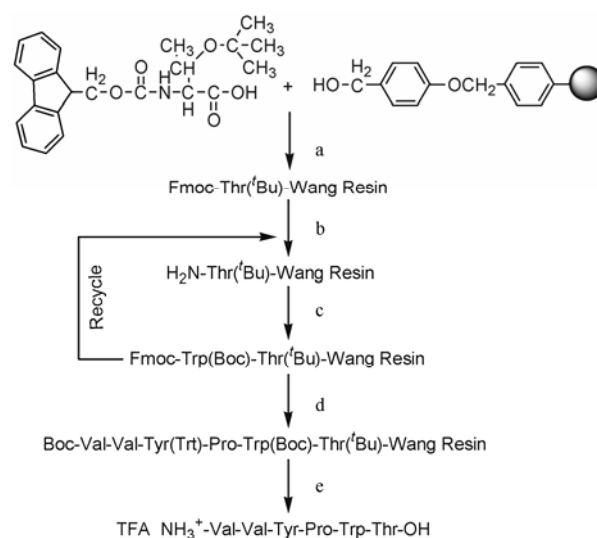
采用微波固相合成法^[13-16], 高效快速地合成所设计的 17 个多肽片段, 用以研究 VVYPWTQRF 活性位点及制备更高活性的多肽片段; 进行了 ACE 抑制活性、 α -葡萄糖苷酶抑制活性、抗菌活性及抗肿瘤活性的筛选并做出初步讨论。合成路线 1 是以 VVYPWT 为例的多肽合成路线。

结果与讨论

1 血红蛋白片段的合成

微波固相合成缩合的时间为 5 min, 脱 Fmoc 保护为 3 min, 与传统固相肽合成相比极大的缩短了合

成周期, 且提高产率。C-端起始氨基酸为 Pro 的序列, 采用 2-氯三苯甲基氯树脂, 其他序列采用 Wang 树脂, Fmoc 为氨基酸 N-端保护基, 多肽的 N-末端为 Boc-氨基酸, HBTU-HOBt 为缩合试剂, 肽链从 C-端到 N-端延长, 切除树脂和侧链保护基采用 TFA/TIS/ H_2O (体积比 95 : 2.5 : 2.5), 冰乙醚沉淀, 离心得到粗肽。用 Sephadex LH-20 精制粗肽, 产物经 RP-HPLC 和质谱检测与理论值一致 (表 1)。



Scheme 1 Synthesis of hemoglobin fragments. a: DMAP, DCC/DMF, 4 h; b: 20% piperidine/DMF, microwave 25 W, 50 $^{\circ}\text{C}$, 3 min; c: Fmoc-AA-OH, HBTU-HOBt /DMF, microwave 25 W, 50 $^{\circ}\text{C}$, 5 min; d: N-terminal amino acid, Boc-AA-OH, HBTU-HOBt/DMF, microwave 25 W, 50 $^{\circ}\text{C}$, 5 min; e: TFA/TIS/ H_2O (volume ratio 95 : 2.5 : 2.5), 2 h

2 血红蛋白片段生物活性

改进的 RP-HPLC 法与 Cushman 和 Cheung 的分光光度法相比, 具有可以准确分离出反应释放的 Hip 的特点, 避免未反应的 Hip-His-Leu 干扰, 具有高效、快速、准确等优点。本文利用此法检测 17 种多肽片段均具有一定的体外抑制活性, IC_{50} 结果见表 2。

多肽片段的 α -葡萄糖苷酶抑制活性检测在 0.2、2、20 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度下进行, 结果显示多肽在 20 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时对 α -葡萄糖苷酶有一定的抑制效果, 但在 2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时并未检测到其抑制效果 (表 2)。抗肿瘤实验与抗菌实验结果显示此系列多肽无明显效果。

3 讨论

采用微波辅助固相合成法, 能够快速、高效地合成以 Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln-Arg-Phe 为模板的 17 个序列。采用 2-氯三苯甲基氯树脂为固相载体合成 VVYP、VYP、YP 可有效地避免二酮哌嗪

Table 1 Sequence and molecular weight of hemoglobin fragments

No.	Sequence	(MW <i>m/z</i>)		RP-HPLC		Yield/%
		Calcd.	[M+H] ⁺	<i>R_f</i> /min	Purity/%	
1	Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln-Arg-Phe	1 195.37	1 196.7	11.031	92.2	64.2
2	Val-Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln-Arg-Phe	1 096.24	1 097.7	10.683	90.5	66.3
3	Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln-Arg-Phe	997.11	998.5	10.244	95.3	72.7
4	Trp-Thr-Gln-Arg-Phe	736.82	737.3	8.398	91.1	89.6
5	Gln-Arg-Phe	449.50	450.3	5.630	93.5	91.2
6	Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln-Arg	1 048.19	1 048.6	8.539	96.8	75.1
7	Val-Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln-Arg	949.06	950.3	8.079	98.3	83.9
8	Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln	892.01	893.5	9.006	94.7	81.6
9	Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr	763.88	764.5	9.665	95.6	83.8
10	Val-Tyr-Pro-Trp-Thr	664.75	665.3	9.857	99.0	89.6
11	Tyr-Pro-Trp-Thr	565.62	566.3	9.042	96.5	93.5
12	Val-Val-Tyr-Pro-Trp	662.78	663.3	10.104	97.0	87.9
13	Val-Tyr-Pro-Trp	563.64	564.3	9.470	96.1	93.6
14	Val-Val-Tyr-Pro	476.57	477.4	6.748	92.3	61.6
15	Val-Tyr-Pro	377.43	378.2	5.497	90.8	65.4
16	Tyr-Pro	278.30	279.1	4.621	94.2	73.9
17	Val-Val-Tyr	379.45	380.4	6.016	93.0	92.9

Table 2 Inhibitory activities of hemoglobin fragments. * n.d.: Not detected

No.	ACE IC ₅₀ /μmol·L ⁻¹		α-Glucosidase repellent rate/%	Inhibitory rate of HeLa cell/%
	Exp.	Ref.	20 mg·mL ⁻¹	100 μmol·L ⁻¹
Control	0	—	0	0
1	66.0	66 ^[17]	30.0	16.7
2	35.7	—	27.1	31.2
3	39.4	—	25.2	16.9
4	28.2	—	31.3	30.9
5	977.0	—	12.6	3.5
6	33.7	—	37.5	10.9
7	76.0	—	39.6	26.0
8	12.5	11.8 ^[10]	41.6	18.6
9	7.42	6.02 ^[4]	46.9	31.4
10	23.6	—	29.2	24.9
11	848.0	—	12.6	22.7
12	67.3	—	34.5	35.1
13	261.0	—	35.6	20.1
14	196.0	—	8.1	16.7
15	247.0	288 ^[18]	20.1	21.6
16	624.0	720 ^[18]	13.3	3.1
17	235.0	—	7.3	5.9

(diketopiperazine, DKP) 副产物的产生。各序列的体外活性实验结果表明该系列多肽均具有一定的 ACE 抑制效果, 其中 **1**、**8**、**9**、**16**、**17** 检测结果与酶解血红蛋白提取物活性一致, Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr 的

IC₅₀ 最高为 7.42 μmol·L⁻¹, 其次为 Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln 片段的 12.5 μmol·L⁻¹, 另外 **2**、**3**、**4**、**6**、**10** 均具有比 **1** 更高的体外 ACE 抑制活性且未有文献报道。

由 ACE 抑制活性结果可见, **9** 比 **11** 活性高 100 倍, **3** 比 **11** 活性高 20 倍, 说明 C-端 Val-Val-与 N-端-Gln-Arg-Phe 这两个片段在维持多肽的 ACE 抑制活性中起重要作用, C-端 Val-Val-与 N-端-Gln-Arg-Phe 为两个活性中心; **1** 在同时具有 Val-Val-与-Gln-Arg-Phe 结构时却体现中等活性, 且小于 **9** 和 **3** 活性, 表明 C-端 Val-Val-与 N-端-Gln-Arg-Phe 两个活性中心对 ACE 的抑制效果不是叠加的; 由 **5**、**17** 表现低活性得知, Val-Val-与-Gln-Arg-Phe 两个活性位点需要一定的结构基础即 Tyr-Pro-Trp-Thr 才能表现出较强活性。

总之, 当 N-端含支链的疏水性氨基酸如 Val, C-末端三位氨基酸含有 Phe、Trp、Arg 时表现较强活性。因为 C-端含 Phe、Trp、Arg 的多肽更容易接近 ACE 活性中心的疏水“口袋”, 且 Arg 侧链胍基上的正电荷对抑制活性起着重要作用。当 C-端第 3 个氨基酸为 Pro 时因具有较好的立体选择性而利于与 ACE 结合。α-葡萄糖苷酶抑制活性结果显示化合物浓度为 20 mg·mL⁻¹ 时有抑制活性, 其中 **8**、**9** 抑制率大于 40%; 低浓度下未有降血糖效果; 抗肿瘤与抗菌实验结果表明作用不明显。

实验部分

1 材料与方法

美国 CEM 公司 Discover 微波反应器; Agilent 1100 型反相高效液相色谱仪; 德国 Merck 色谱柱, Chromolith Performance RP-C18e (100 mm $\times$ 4.6 mm); 美国惠普公司 HP1100 LC/MSD 质谱仪。

Wang 树脂 (1.1 mmol·g⁻¹ 树脂)、2-氯三苯甲基氯树脂 (1.48 mmol·g⁻¹ 树脂)、Fmoc-氨基酸、HBTU、HOBt、*N,N'*-二环己基碳二亚胺 (*N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide, DCC)、4-二甲氨基吡啶 (4-dimethylaminopyridine, DMAP) 和二异丙基乙胺 (*N,N*-diisopropylethylamine, DIEA)、三异丙基硅烷 (triisopropylsilane, TIS) 购自吉尔生化 (上海); ACE、马尿酸组氨酰亮氨酸 (Hip-His-Leu)、 α -葡萄糖苷酶 (α -glucosidase)、4-硝基苯- α -D-吡喃葡萄糖苷 (4-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside, *p*-NPG)、3-(4, 5-二甲基噻唑-2)-2, 5-二苯基四氮唑溴盐 (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide, MTT) 购自 Sigma 公司; RPMI 1640 细胞培养基、小牛血清 (美国 Hyclone 公司); 其余试剂均为分析纯。

人乳腺癌细胞 (MCF-7)、人宫颈癌细胞 (HeLa) 购自中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所; 金葡萄菌、大肠杆菌由美国标准菌种收藏所惠赠。

2 血红蛋白片段合成与纯化

2.1 Fmoc-protected peptide 导入 Wang 树脂、Fmoc-Pro-OH 导入 2-氯三苯甲基氯树脂 将 1 mmol Wang 树脂或 2-氯三苯甲基氯树脂用二氯甲烷浸泡 30 min 后抽滤, 将 3 mmol Fmoc-protected peptide 溶于 15 mL 二氯甲烷中, 加入 3 mmol DCC 和 3 mmol DMAP, 常温下与上述树脂搅拌反应 4 h, 加入甲醇反应 10 min 后, 依次用 DMF、DCM、异丙醇、乙醚洗涤树脂, 避光减压干燥。

取 5~10 mg 树脂, 用 10 mL 含 20% 哌啶的 DMF 溶液脱除 Fmoc 保护基, 在 290 nm 紫外光下检测吸收值, 计算树脂导入率 (mmol·g⁻¹ 树脂)。

2.2 Fmoc 保护基的脱除 Fmoc-protected peptide-Wang 树脂用 DCM 溶胀 15 min, 加入 10 mL 20% 哌啶/DMF, 反应条件为 25 W、50 $^{\circ}$ C、3 min, Kaiser 法^[19]检测进度。

2.3 肽链的延长 以 HBTU-HOBt 为缩合试剂, 加

入 3 倍量 Fmoc-氨基酸于 DMF 中, 反应条件为 25 W、50 $^{\circ}$ C、5 min, Kaiser 法检测缩合结果。

2.4 *N*-端 Boc 保护基、侧链保护基及树脂的脱除 线性肽树脂在 10 mL TFA/TIS/H₂O (体积比 95:2.5:2.5) 中室温反应 2 h, 冰乙醚沉淀, 10 000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 取沉淀减压干燥, 得到多肽粗品。

2.5 Sephadex LH-20 精制 用 Sephadex LH-20 对粗肽进行纯化, 洗脱液为 10% (体积分数) 醋酸/水溶液, 流速 30 mL·h⁻¹, 上样质量浓度 150 mg·mL⁻¹, 产物冻干, 经质谱鉴定。

2.6 RP-HPLC 纯度分析 色谱柱为 Chromolith Performance RP-C18e (100 mm $\times$ 4.6 mm), 流动相 A: 0.1% TFA/水, B: 0.1% TFA/乙腈; 梯度洗脱: B: 0~15 min, 10%~100%; 检测波长 220 nm, 体积流量 2.0 mL·min⁻¹, 柱温为室温。

3 血红蛋白片段活性

3.1 ACE 抑制活性测定 采用优化的 Cushman 和 Cheung 的方法测定 ACE 抑制活性^[20], 用含有 6.8 mmol·L⁻¹ NaCl 的 0.2 mol·L⁻¹ 硼酸盐缓冲液 (pH 8.3), 将 Hip-His-Leu 配制成 7.6 mmol·L⁻¹ 的溶液。在 0.5 mL 的 Eppendorf 管中分别加入 5 μ L 样品和 15 μ L ACE (60 mU·mL⁻¹) 于 37 $^{\circ}$ C 下保温 5 min, 加入 25 μ L 底物 37 $^{\circ}$ C 下反应 30 min, 最后加入 5 μ L 10% TFA 溶液终止反应, 冷却至室温。采用反相高效液相色谱定量 ACE 与底物反应生成马尿酸的量, 对 ACE 活性抑制率为 50% 时所需多肽浓度为 IC₅₀。计算公式如式 1。

3.2 α -葡萄糖苷酶抑制活性测定 α -葡萄糖苷酶抑制活性的检测采用优化的 Kim 方法^[21]。取 20 μ L、0.1 U·mL⁻¹ 的 α -葡萄糖苷酶溶液与 20 μ L 样品溶液 (0.2、2、20 mg·mL⁻¹) 预混 5 min, 加入 3 mmol·L⁻¹ 的 *p*-NPG 20 μ L, 在 37 $^{\circ}$ C 的恒温中反应 30 min, 最后加入 40 μ L 的 0.1 mol·L⁻¹ Na₂CO₃ 终止反应, 405 nm 处测定对硝基酚的量来判断样品对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性。

3.3 抗肿瘤活性测定 采用优化的 Mosmann 方法^[22] 取处于对数生长期, 状态良好的 MCF-7、HeLa 细胞, 以每孔 4 000 个细胞接种于 96 孔板。培养 24 h 后, 加入 200 μ L 不同浓度的系列多肽, 对照组加入相同体积的培养基, 5% CO₂、37 $^{\circ}$ C 温箱中培养 48 h。每孔加入 20 μ L (5 mg·mL⁻¹) MTT, 继续培养 3~4 h。弃去培养基, 每孔加入 200 μ L DMSO, 酶标仪检测 A₅₇₀ 值。

$$\text{ACE抑制率 (\%)} = \frac{\text{对照马尿酸峰面积} - \text{样品马尿酸峰面积}}{\text{对照马尿酸峰面积}} \times 100\% \quad (1)$$

3.4 抗菌活性测定^[23] 选取金葡菌与大肠杆菌作为供试菌株, 菌种复苏后, 接种于 LB 培养基生长至对数中期, 经过 LB 培养基逐级稀释到细菌浓度为 $2 \times 10^4 \sim 2 \times 10^5$ CFU·mL⁻¹, 按每孔 100 μ L 菌液接种于 96 孔板中, 将一定浓度的多肽溶液每孔加入 100 μ L, 空白对照为不加肽的培养基。将 96 孔板置于 37 $^{\circ}$ C 培养过夜, 酶标仪检测 A_{620} 值。

References

- [1] Ockerman HW, Hansen CL. Animal By-Product Processing & Utilization [M]. Lancaster (PA): Technomic Publishing Co. Inc., 2000.
- [2] Brantl V, Gramsch C, Lottspeich F, et al. Novel opioid peptides derived from hemoglobin: hemorphins [J]. Eur J Pharmacol, 1986, 125: 309–310.
- [3] Dale CS, Pagano Rde L, Rioli V, et al. Antinociceptive action of hemopressin in experimental hyperalgesia [J]. Peptides, 2005, 26: 431–436.
- [4] Yu Y, Hu J, Miyaguchi Y, et al. Isolation and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from porcine hemoglobin [J]. Peptides, 2006, 27: 2950–2956.
- [5] Hu X, Luo Y. Preparation of angiotensin-I converting enzyme inhibition peptides from porcine hemoglobin [J]. Meat Res (肉类研究), 2009, 2: 21–24.
- [6] Piot JM, Zhao QY, Guillochon D, et al. Isolation and characterisation of a bradykinin potentiating peptide from bovine peptic hemoglobin hydrolysate [J]. FEBS Lett, 1992, 299: 75–79.
- [7] Zhao QY, Molina P, Piot JM. Peptic peptide mapping by HPLC, on line with photodiode array detection, of a hemoglobin hydrolysate produced at pilot-plant scale from ultrafiltration process [J]. J Liq Chromatogr Relat Technol, 1997, 20: 1717–1739.
- [8] Nedjar-Arroume N, Dubois-Delval V, Adje EY, et al. Bovine hemoglobin: an attractive source of antibacterial peptides [J]. Peptides, 2008, 29: 969–977.
- [9] Chang CY, Wu KC, Chiang SH. Antioxidant properties and protein compositions of porcine haemoglobin hydrolysates [J]. Food Chem, 2007, 100: 1537–1543.
- [10] Lantz I, Glamsta EL, Talback L, et al. Hemorphins derived from hemoglobin have an inhibitory action on angiotensin converting enzyme activity [J]. FEBS Lett, 1991, 287: 39–41.
- [11] Zhao QY, Piot JM. Investigation of inhibition angiotensin-converting enzyme (ACE) activity and opioid activity of two hemorphins, LVV-hemorphin-5 and VV-hemorphin-5, isolated from a defined peptic hydrolysate of bovine hemoglobin [J]. Neuropeptides, 1997, 31: 147–153.
- [12] Kagawa K, Matsutaka H, Fukuhma C, et al. Globin digest, acidic protease hydrolysate, inhibits dietary hypertriglyceridemia and Val-Val-Tyr-Pro, one of its constituents, possesses most superior effect [J]. Life Sci, 1996, 58: 1745–1755.
- [13] Matsushita T, Hinou H, Kurogochi M, et al. Rapid microwave-assisted solid-phase glycopeptide synthesis [J]. Org Lett, 2005, 7: 877–880.
- [14] Colacino E, Lamaty F, Martinez J, et al. Microwave-assisted solid-phase synthesis of hydantoin derivatives [J]. Tetrahedron Lett, 2007, 48: 5317–5320.
- [15] Leonetti F, Capaldi C, Carotti A. Microwave-assisted solid phase synthesis of imatinib, a blockbuster anticancer drug [J]. Tetrahedron Lett, 2007, 48: 3455–3458.
- [16] Taherpour AA. Microwave-assisted solid phase conversion study of Meldrum's acid to ethylenetetracarboxylic dianhydride (C₆O₆) [J]. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 2010, 75: 493–497.
- [17] Wang JP, Hu JE, Cui JZ, et al. Purification and identification of a ACE inhibitory peptide from oyster proteins hydrolysate and the antihypertensive effect of hydrolysate in spontaneously hypertensive rats [J]. Food Chem, 2008, 3: 1–29.
- [18] Fang H, Luo M, Sheng Y, et al. The antihypertensive effect of peptides: a novel alternative to drugs? [J]. Peptides, 2008, 29: 1062–1071.
- [19] 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]. Anal Biochem, 1970, 34: 595–598.
- [20] Cushman DW, Cheung HS. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung [J]. Biochem Pharmacol, 1971, 20: 1637–1648.
- [21] Xu HW, Dai GF, Liu GZ, et al. Synthesis of andrographolide derivatives: a new family of α -glucosidase inhibitors [J]. Bioorg Med Chem, 2007, 15: 4247–4255.
- [22] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays [J]. J Immunol Methods, 1983, 65: 55–63.
- [23] He J, Anderson MH, Shi WY, et al. Design and activity of a 'dual-targeted' antimicrobial peptide [J]. Int J Antimicrob Agents, 2009, 33: 532–537.