DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.14.016

论著

文章编号:1000-5404(2003)14-1258-04

卟啉锰-TFO-吖啶的合成

光丽霞[1],袁发焕[2],姜中兴[3],王升启[4],赵聪敏[1],刘立[1],温恩懿[1],奚 敏[1],艾友萍[1],管 伟[4] (第三军医大学附属新桥医院:[1]儿科;[2]肾内科,重庆 400037;[3]武汉大学化学系,武汉 430072;[4]军事医学科学院放射医学研究所,北京 100039)

提 要:目的 合成卟啉锰-TFO-吖啶化合物。方法 合成含7-去氮-2-脱氧黄嘌呤的TFO;以吖啶修饰TFO的3′末端,以6碳氨基连接臂修饰TFO的5′末端;四苯基卟啉四羧酸经金属化、酯化后,与TFO的5′末端偶联;薄层层析纯化,质谱、紫外光光谱分析鉴定。结果 薄层层析结果显示在对照寡核苷酸带前方有一条淡黄色的吖啶-TFO带;紫外光光谱分析显示卟啉锰-TFO-吖啶化合物同时具有260 nm处寡核苷酸的特征吸收峰和468 nm处卟啉锰的特征吸收峰。质谱分析结果证实,卟啉锰-TFO-吖啶化合物分子量实测值与理论值一致。结论 合成了卟啉锰-TFO-吖啶化合物。

关键词:卟啉锰;吖啶;TFO
中图法分类号:Q524; R914.5 文献标识码:A

Synthesis of manganese porphyrin-TFO-acridine

GUANG Li-xia, YUAN Fa-huan, JIANG Zhong-xing, WANG Sheng-qi, ZHAO Cong-min, LIU Li, WEN En-yi, XI Min, AI You-ping, GUAN Wei (Department of Pediatrics, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To synthesize manganese porphyrin-triple-helix-forming oligonucleotide-acridine compound. Methods TFO containing 7-deaza-2′-deoxyxanthosine was synthesized with special oxidizing agent. Acridine and amino-modifier C6 were bound to the 3′ end and the 5′ end of the oligonucleotide, respectively. After metallation and esterification of meso-tetrakis(4-carbocyphenyl), it was bound to the 5′ end of the previously described oligonucleotide. The reaction product was separated and purified by thin layer chromatography (TLC), and then identified by mass spectrography and ultraviolet absorption spectrometry. Results Thin layer chromatography showed that there was a yellow acridine oligonucleotide band before the control oligonucleotide. Ultraviolet absorption spectrum analysis revealed that the manganese porphyrin-triple-helix-forming oligonucleotide-acridine compound possessed both characteristic absorption peaks of oligonucleotide at wavelength 260 nm and manganese porphyrin at wavelength 468 nm. Mass spectrogram confirmed that the practically detected molecular weight of the observed mass of TFO derivative was the same as the theoretical value. Conclusion Manganese porphyrin-triple-helix-forming oligonucleotide-acridine compound is synthesized successfully.

Key words: manganese-porphyrin; acridine; TFO

近来,一种能与双股螺旋结构DNA多嘌呤区结合成三股螺旋结构的寡核苷酸——三股螺旋形成寡核苷酸(Triple helix-forming oligodeoxyribonucleotides, TFO)引起了人们的关注。这种TFO不仅能与线状、松弛环状DNA结合,而且还能与超螺旋状质粒DNA或染色体DNA结合成三股螺旋结构,并有序列特异性[1]。TFO与靶DNA结合后,可阻止靶DNA与调节蛋白结合,从而抑制靶基因的复制和表达,在病毒感染、肿瘤、遗传性疾病的检查和治疗等方面具有潜在的应用前景。由于生理浓度的钾离子可抑制TFO与靶DNA结合,细胞内的核酸酶可降解TFO,故限制了TFO在体内的应用。文献报道以7-去氮-2-脱氧黄嘌呤替换TFO某些碱基,可抵抗钾离子的抑制效应,以吖啶、卟啉锰修饰TFO末端,可增强TFO的耐酶性,并使TFO具有切割双链DNA的能力[2~4]。本研究用7-去氮-2-脱氧黄嘌呤、吖啶、卟啉锰对TFO进行相应改造和修饰,合成了卟啉锰-TFO-吖啶化合物,使之能在生理环境中应用,为TFO用于基因治疗作准备。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

吖啶-CPG柱(Acridine CPG)、7-去氮-2-脱氧黄嘌呤核苷亚磷酰胺(7-deaza-dX-CE phosphoramidite)、6碳氨基连接臂(5′-amino-

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39800128)
作者简介:光丽霞(1956—),女,湖北省仙桃市人,副主任医师,副教授,主要从事病毒感染性疾病防治方面的研究,发表论文22篇。电话:(023)68755023
收稿日期:2002-05-24;修回日期:2002-11-29

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

modifier C6 TFA)购自 Glen 公司(美国)。(1s)-(+)-(10-camphorsulfonyl)oxaziridine(CSO)、四苯基卟啉四羧酸[meso-tetrakis(4-carboxyphenyl) porphyrin, TCPP]、1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbo-diimide hydrochloride(EDC)、1-羟基苯并三氮唑(1-hydroxybenzotriazole, HoBt)均购自 Aldrich 公司。高效薄层色谱板(硅胶 GF254)购自 E Merck 公司(德国), 展开液: 异丙醇∶水∶氨水(70∶20∶10)。PE API 2000 质谱仪(美国 PE 公司), 质谱分析条件: 扫描范围: 500-1 800, 扫描模式: Centroid, 分析软件: Analyst version 1.1。Lambda Bio 20 紫外/可见分光光度计(美国 PE 公司)。

1.2　TFO 合成

在 ABI 391 自动 DNA 合成仪上, 以固相亚磷酰胺法合成图 1 所示 TFO。以碘-水-吡啶-四氢呋喃为氧化剂, 按合成普通寡核苷酸的标准程序合成 TFO1; 以(1s)-(+)-(10-camphorsulfonyl)oxaziridine(CSO)为氧化剂, 按类似于合成硫代寡核苷酸的程序合成 TFO2, 每步氧化时间延长至 3 min。合成时均用吖啶-CPG 柱, 以吖啶修饰 TFO 的 3′末端, 并以 6 碳氨基连接臂修饰 TFO 的 5′末端。合成后均以温和法切割和脱保护, 用 0.4 mol/L 氢氧化钠-甲醇溶液处理 17 h, 冷冻真空干燥。脱保护冻干产物加超纯水 200 μl 溶解, 用寡核苷酸纯化柱(OPC 柱)去盐。

TFO0　5′-AGA GGA GGG GGC CGA GGA GGG-3′
TFO1　5′-Amino C6-AGA GGA GGG GGC CGA GGA GGG-Acridine-3′
TFO2　5′-Amino C6-XGX GGX GGG GGC CGX GGX GGG-Acridine-3′
TFO3　5′-Mn-porphyrin- C6-AGA GGA GGG GGC CGA GGA GGG-Acridine-3′
TFO4　5′-Mn-porphyrin- C6-XGX GGX GGG GGC CGX GGX GGG-Acridine-3′

X: 7-deaza-2-deoxyxanthylate; Amino C6: 5′-amino-modifier C6; Mn-porphyrin: manganese porphyrin; Acridine: acridine

图 1　TFO 序列

Fig 1　The sequence of TFO

以薄层色谱法分析合成终产物, 并计算样品的比移值(Rf)。部分终产物以薄层层析纯化, 部分终产物直接进行偶联反应。

1.3　卟啉锰活性酯制备

参考文献[5]方法, 作部分修改。

卟啉金属化: 将四苯基卟啉四羧酸(TCPP)250 mg, 醋酸锰 1 g, 二甲基甲酰胺 40 ml 装入烧瓶中混合, 加热搅拌, 回流过夜, 减压蒸干。加浓盐酸少许, 溶解产物, 再加双蒸水析出紫红色产物, 过滤去盐, 烤干, 得咖啡色产物。以硅胶为吸附剂, 甲醇/氯仿为淋洗剂, 进行柱层析分离纯化, 收集中间棕色带, 减压蒸干, 得卟啉锰(212 mg)。卟啉金属化反应过程及纯化过程, 均以薄层层析监测。终产物用质谱、紫外光光谱分析鉴定。

卟啉锰酯化: 将卟啉锰 200 mg, EDC 80 mg, HoBt 60 mg, 干燥二甲基甲酰胺 30 ml 装入烧瓶中, 加热搅拌, 回流过夜, 减压蒸干, 得卟啉锰活性酯混合物。用硅胶柱分离纯化 3 次, 得卟啉锰活性单酯。酯化反应过程及纯化过程均用薄层层析监测。

1.4　TFO 与卟啉锰活性酯偶联

按文献[5]方法略作修改。

用二甲基甲酰胺溶解 4 mg 卟啉锰活性单酯, 分装在两支 1.5 ml 离心管中, 分别加 TFO1 和 TFO2(约 200 μg), 加 2 mol/L 硼酸缓冲液, 混匀, 避光, 37 ℃水浴 1 h, 置 4 ℃过夜。用薄层层析分离偶联反应产物。回收含目的带的硅胶, 用超纯水洗脱偶联产物, 以寡核苷酸纯化柱去盐, 得 TFO3 和 TFO4。用质谱、紫外光光谱分析鉴定并确定 TFO 浓度。

1.5　TFO 与 HBVDNA 片段结合

TFO 与 HBVDNA 片段结合实验, 按文献[6]方法略作修改。并用凝胶滞留试验观察两者结合的效率。

2　结果

2.1　卟啉及卟啉锰的紫外光光谱分析图

TCPP 具有卟啉的 5 个特征吸收峰: UV λ_{max} = 414, 512, 544, 592, 642 nm, 其中 λ_{max} = 414 nm 为 Soret 谱带, 是卟啉最特征和吸收最强的谱带。卟啉锰仅 3 个吸收峰: UV λ_{max} = 468, 566, 592 nm, 其中 λ_{max} = 468 nm 为 Soret 谱带, 与卟啉的 Soret 谱带相比较, 有明显红移, 结果与文献[7]报道一致。

2.2　薄层层析结果

卟啉、卟啉锰、卟啉锰活性酯以及卟啉锰与寡核苷酸偶联产物的薄层层析结果显示在紫外光下对照寡核苷酸(TFO0)呈线状阴影带, Rf = 0.48; TFO1 呈黄色荧光带, Rf = 0.60; 卟啉迁移较慢, 可见光下卟啉呈紫红色带, 紫外光下卟啉为红色荧光带; 卟啉锰迁移稍增快, 可见光下呈深绿色带, 紫外光下无荧光; 卟啉锰活性酯迁移最快, 并分离出数条带, 其中最后一条带为卟啉锰活性单酯, 其前方为卟啉锰活性多酯; TFO3、TFO4 均位于卟啉锰活性单酯水平之后, TFO1 水平之前, 可见光下呈绿色月牙形带。

2.3　卟啉锰-寡核苷酸-吖啶化合物(TFO3)的紫外光光谱分析图

紫外光光谱分析图显示样品(TFO3)同时具有 260 nm 处寡核苷酸的特征吸收峰和 468 nm 处卟啉锰的特征吸收峰, 与文献[4]报道结果一致。

2.4　质谱分析结果

卟啉锰分子量计算值: 843.99, 实测值: 843.6; TFO3 分子量计算值: 8 421.78, 实测值: 8 421.1, 见图 2; TFO4 分子量计算值: 8 486.68, 实测值: 8 486, 见图 3。

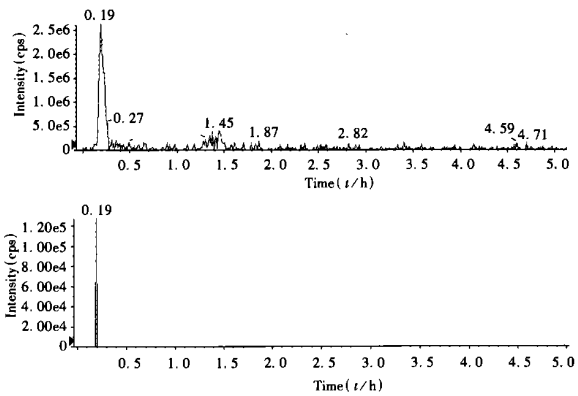


图 2　TFO3 质谱图

Fig 2　The mass spectrogram of TFO3

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

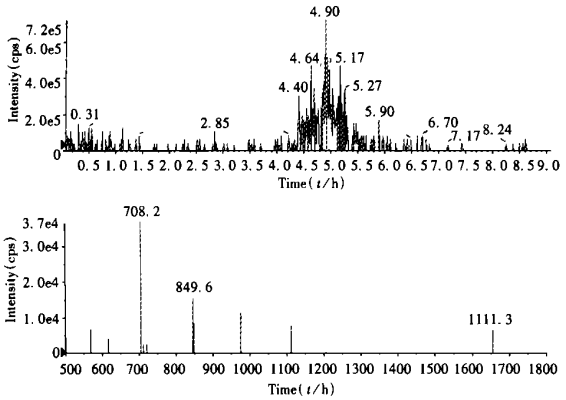


图3 TFO4质谱图

Fig 3 The mass spectrogram of TFO4

2.5 凝胶滞留试验结果

图4为TFO与HBVDNA片段结合反应的凝胶滞留试验结果。此图显示在37 ℃、pH 7.4环境中，当结合反应体系中，TFO0浓度达到7×10^{-10} mol/L、TFO3浓度达到7×10^{-8} mol/L时，双链靶DNA带(duplex)后方，出现三链DNA带(triplex)。



1: ^{32}P-labeled target sequence(112 bp) without TFO; 2—5: ^{32}P-labeled target sequence incubated with TFO0 at degressive concentrations (7×10^{-7}, 7×10^{-8}, 7×10^{-9}, 7×10^{-10} mol/L); 6: ^{32}P-labeled control target sequence(126 bp) without TFO; 7—10: ^{32}P-labeled target incubated with TFO3 at degressive concentrations (7×10^{-7}, 7×10^{-8}, 7×10^{-9}, 7×10^{-10} mol/L)

图4 凝胶滞留试验结果

Fig 4 The results of gel mobility shift assay

3 讨论

我们以前曾证实含AG或GT的TFO在体外可与HBV C启动子区类同聚嘌呤链逆平行方向以序列特异方式结合成三股螺旋DNA，并筛选出21 nt AG-TFO与靶序列结合的亲和力最高，反应最完全[6]。为了使TFO在生理环境中仍具有活性，我们对其进行了一些修饰。

生理浓度的钾离子可抑制含AG的TFO与靶DNA结合，降低三股螺旋结构的稳定性，其原因是钾离子能促进富含G的TFO形成自身相关结构(如G四聚体)。用7-去氮-2-脱氧黄嘌呤替代TFO中的A，能减少G四聚体形成，不仅在体外模拟生理钾离子浓度条件下可增加三股螺旋的形成，也促进细胞内三股螺旋的形成[2]。故本研究试用7-去氮-2-脱氧黄嘌呤核苷酸替代AG-TFO中的腺苷酸，以抵抗钾离子的抑制效应。合成含7-去氮-2-脱氧黄嘌呤的寡核苷酸(国内尚未见报道)，需用特殊氧化剂：CSO。如果合成过程中氧化反应不完全，将产生少一碱基的短寡核苷酸，用常规二甲氧基三苯甲基(DMT)阳离子测定方法不能检查出这类问题。因此我们在使用特殊氧化剂时，将每步氧化反应时间延长至3 min，以避免氧化反应不全。合成后，用未经纯化的产物直接与卟啉锰活性酯偶联，偶联产物进行薄层层析，可见卟啉锰-寡核苷酸-吖啶化合物带呈细线状，提示合成产物的长短基本一致，氧化反应完全。

TFO末端连接吖啶，一则可阻止核酸外切酶对TFO的切割和降解，二则由于吖啶属疏水基团，具脂溶性，易于穿透生物膜的脂质双分子层，使TFO的透膜性增强，三则，吖啶属DNA嵌入剂，可使三股螺旋DNA的稳定性增强[3]。故我们试用吖啶修饰TFO的3′端。这种修饰要求用温和方法进行切割和脱保护。我们以0.4 mol/L氢氧化钠-甲醇溶液处理合成的寡核苷酸产物17 h，得到淡黄色液体。薄层层析结果显示在对照寡核苷酸带前方有一条淡黄色的寡核苷酸带，提示吖啶与寡核苷酸相连(具有脂溶性的吖啶修饰寡核苷酸，可使寡核苷酸迁移加速)，切割和脱保护过程未破坏吖啶。

末端用截断因子(Cleaver，如乙二胺四乙酸-铁、啡咯啉-铜、卟啉锰)修饰的TFO可氧化损伤、截断靶DNA[4]。为了使TFO具有切割靶DNA的能力，我们将四苯基卟啉四羧酸金属化，酯化，得到卟啉锰活性酯，然后修饰TFO5′端。紫外光光谱分析结果显示，金属化反应后，卟啉的5个特征吸收峰减少至3个，而且发生了红移。提示锰与卟啉形成了配合物。质谱分析表明反应终产物为卟啉锰(卟啉锰分子量计算值：843.99，实测值：843.6)。薄层层析结果显示，酯化反应后，卟啉锰活性酯生成。我们用含卟啉锰单酯较多的产物，与TFO 5′末端氨基臂偶联。为了增加偶联成功率，反应过程使用高盐缓冲体系，以减少带负电荷的卟啉锰与带负电较多的寡核苷酸之间的排斥作用。偶联产物经薄层层析纯化，得TFO3、TFO4。薄层层析结果显示，在对照卟啉锰活性单酯带的后方出现一条深绿色带，从此带回收的终产物经紫外光光谱分析，结果显示同时具有260 nm处寡核苷酸的特征吸收峰和468 nm处卟啉锰的特征吸收峰，质谱分析结果也证实TFO3、TFO4分子量实测值与计算值一致，说明卟啉锰已与TFO相连。

本实验用凝胶滞留试验观察TFO与HBVDNA片段结合情况，其原理是：^{32}P标记的靶DNA片段与TFO结合成三股螺旋结构后，其分子量及电荷发生改变，在聚丙烯酰胺凝胶电泳体系中，其电泳迁移率随之发生

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

改变。通常由于三链 DNA 泳动速率比双链 DNA 慢，故电泳时形成一条较双链靶 DNA 滞后的带型。该结果显示，当结合反应体系中，TFO 浓度达到一定值时，在双链靶 DNA 带（duplex）后方，出现三链 DNA 带（triplex）。提示卟啉锰、吖啶修饰的 TFO 可与 HBV 靶序列结合成三链 DNA。

参考文献：

[1] Musso M, Dyke M W V. Torsionally-strainde DNA and intermolecular purine-purine-pyrimidine triple-helix formation[J]. Mol Cell Biochem, 1996, 154(1): 65－70.

[2] Faruqi AF, Krawczyk SH, Matteucci MD, *et al*. Potassium-resistant triple helix formation and improved intracellular gene targeting by oligodeoxyribonucleotides containing 7-deazaxanthine[J]. Nucleic Acids Res, 1997, 25(3): 633－640.

[3] Faucon B, Mergny J L, Helene C. Effect of third strand composition on triple helix formation: purine versus pyrimidine oligodeoxynucleotides[J]. Nucleic Acids Res, 1996, 24(10): 3181－3188.

[4] Bigey P, Pratviel G, Meunier B. Cleavage of double-stranded DNA by metalloporphyrin-linker-oligonucleotide molecules: influence of the linker[J]. Nucleic Acids Res, 1995, 23(19): 3894－3900.

[5] Mestre B, Pitie M, Loup C, *et al*. Influence of the nature of the porphyrin ligand on the nuclease activity of metalloporphyrin-oligonucleotide conjugates designed with cationic, hydrophobic or anionic metalloporphyrins[J]. Nucleic Acids Res, 1997, 25(5): 1022－1027.

[6] 光丽霞，李为明，顾长海，等. 能与 HBV－DNA C 启动子结合成三链结构的寡核苷酸的设计与筛选[J]. 第三军医大学学报，2000, 22(3): 220－223.

[7] Dolphin D. The porphyrins[M]. New York: Academic Press, 1978. 1533－1542.

（编辑　陈聪连）

（上接 1257 页）

性骨脓肿。给抗炎治疗。5 个后月发现脾明显肿大，血常规正常，骨髓检查：异常组织细胞占 84.5%，诊断为“恶性组织细胞增生症”。给予 VCDP 案化，症状有好转。7 个月后症状又加重到我院诊治。查体：体温 39.1 ℃，发育和营养中等。面色较红润。浅表淋巴结未及。双肺呼吸音清晰，心率 86 次/min，脾助下 4 cm。右大腿、膝关节及腰骶部有压痛。血常规：HGB 121 g/l，WBC 6.5×10^9/L，PLT 145×10^9/L；血沉 31 mm/h。肝、肾功、蛋白电泳、X 线胸片、骨髓涂片正常。X 线骨片：颅骨、双股骨颈虫蚀样改变，第 4 腰椎体楔形压缩。腹部 B 超：脾大。临床考虑淋巴瘤或 Langeyhan cell histiocytosis？给予抗感染和 2 次 CEOP 和 COP 方案化疗症状、体征有所缓解；但症状很快又加重，患者感胸闷，气促，心悸，左中、下肺呼吸音减弱至消失。胸片和胸腔 B 超提示左侧胸腔积液伴胸膜增厚。复查骨髓涂片组织细胞占 3%，片尾可见巨大多核组织细胞，形态不规则，核染色质细呈网状，核仁可见。胸水为渗出液，培养(－)；胸水细胞学：见大量的异常组织细胞，与骨髓内的细胞相似。3 次胸穿均注入博来霉素 15 mg，地塞米松 5 mg。病情逐渐恶化死亡。尸检病理所见：瘤细胞在淋巴结呈窦性浸润，弥漫浸润左胸膜脏、壁层，左胸壁，心包壁层，双肾和肾上腺周围组织及纵隔、胸腹动脉旁淋巴结组织片巢状生长明显，细胞体积大，异型性明显，CD30(＋)，CD15(－)，LCA(＋)，EMA(＋)，CD20(－)，CD45RO(－)，CD68(－)，CK(－)。病理诊断间变性大细胞性淋巴瘤。

2　讨论

ALCL 占 NHL 的 1.3%，是一种高度恶性的肿瘤。分为原发和继发两型[1]。原发型主要表现为全身浅表淋巴结肿大，尤以颈部居多，少数可累及纵隔、腹腔淋巴结和结外组织、器官，其中以皮肤最为多见。继发型 ALCL 好发于 50 岁人群，就诊时大部分病例已进入临床 III、IV 期。有血清乳酸脱氢酶升高，细胞遗传学检查常有 $t(2;5)(p23;q35)$ 易位[2]。ALCL 病理组织学特征为：淋巴结被膜常增厚，瘤细胞沿淋巴窦及滤泡间区浸润，淋巴结结构尚部分保存；结外受累组织瘤细胞有散在或镶嵌成片状浸润。瘤细胞异型性明显，由大细胞或巨细胞构成，并常有花冠状多核巨细胞、胚胎样巨细胞及 R-S 巨细胞出现[3]。常易被误诊为霍奇金病、恶性组织细胞增生症、转移性低分化癌和恶性黑色素瘤等。若考虑上述的疾病又有与临床不相符合，病理组织学的细胞体积大、形态多样时，应高度怀疑 ALCL，应作免疫组化 CD30、CD15、LCA、EMA 、CD45RO、CD20、CK、CD68 等加以鉴别，特别是 CD30 强阳性，CD15 阴性[3] 对明确诊断很有帮助。本组例 1 年龄大，有银屑病史，ALCL 的发生可能与银屑病有关系，淋巴结病理组织学和免疫组化改变是其典型的 ALCL 变化。诊断明确时已进入临床 IV 期 A 组，治疗效果不很好，终因肾衰及全身衰竭死亡，生存期仅 7 月。例 2 曾在当地误诊为腹膜炎，延误治疗时机。例 3 发病年龄小，以结外表现起病，曾考虑恶组、郎格罕细胞组织细胞增生症等诊断；生存 8 个月，死后尸检明确诊断。文献[4] 报道 ALCL 的原发型诊断时临床分期多在Ⅰ、Ⅱ期，对治疗反应较好，而例 3 虽然按恶性肿瘤治疗，仍出现胸水并在其内发现大量组织细胞；若将胸水沉淀涂片做免疫组化染色，也许对诊断有些帮助。对全身浅表淋巴结不肿大，高度怀疑淋巴瘤的，应争取做胸、腹部 CT，发现肿大的淋巴结或包块，应做手术，尽早明确诊断。

关键词：间变性大细胞淋巴瘤；病理组织学；免疫组化
中图法分类号：R733.4　　文献标识码：B

参考文献：

[1] 石　砚，刘卫平，李甘地. 大细胞间变性淋巴瘤[J]. 诊断病理学杂志，1996; 3(4): 229－230.

[2] Ott G, Bastian B C, Katzenberger T, *et al*. A lymphohistiocytic variant of anaplastic large cell lymphoma with demonstration of the t(2; 5)(p23; q35) chromosome translocation[J]. Br J Haemotol, 1998, 100(1): 187.

[3] 李金范，李甘地，刘卫平，等. 四川地区间变性大细胞淋巴瘤的临床病理与免疫组化研究[J]. 诊断病理学杂志，1999, 6(4): 197－200.

[4] 张忠德，奚政君，吴湘如，等. 小儿间变性大细胞淋巴瘤[J]. 临床与实验病理杂志，2000, 16(2): 104－106.

（编辑　陈聪连）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net