DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.04.018
第25卷第4期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 4
2003年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2003

文章编号:1000-5404(2003)04-0319-03

论著

新型细胞转染素—N^4-精胺胆固醇羰酰氨的合成

雷 撼[1],吴国明[1],周向东[2],黄桂君[1],钱桂生[1],徐长荣[2],蒋 文[2],郑 辉[2] (第三军医大学:[1]附属新桥医院全军呼吸内科研究所,重庆 400037;[2]基础医学部药学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 合成新型阳离子脂质体-细胞转染素 N^4-精氨胆固醇羰酰氨,作为基因载体,用于肺部疾病的基因治疗。方法 用胆固醇羰酰氯为原料,与苄氧羰酰基保护的精氨选择性缩合,去保护,柱层析分离纯化。结果 以25.46%收率获得目标化合物,由波谱分析证实其结构。结论 建立选择性缩合和分离纯化方法,获得高纯度目标化合物,为基因转染和基因治疗打下基础。

关键词:N^4-精氨胆固醇羰酰氨;阳离子脂质体;细胞转染素;基因载体
中图法分类号:O621.3;R914.5 文献标识码:A

Synthesis of new cytofectin-N^4-spermine cholesteryl carbamate

LEI Han, WU Guo-ming, ZHOU Xiang-dong, HUANG Gui-jun, QIAN Gui-sheng, XU Chang-rong, JIANG Wen, ZHENG Hui (Institue of Respiratory Diseases of PLA, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To synthesize new cationic liposome-cytofectin N^4-spermine cholesteryl carbamate as a gene delivery vehicle for gene therapy of lung diseases. Methods Selective coupling, deprotection, isolation and purification by column chromatograph were performed. Results The target compound was synthesized in a total yield of 25.46 % and its structure was determined by spectroscopy. Conclusion The obtainment of the target compound with high purity by the establishment of the method for selective coupling, isolation and purification provides a basis for gene transfection and gene therapy.

Key words: N4-spermine cholesteryl carbamate; cationic liposomes; cytofectin; gene delivery vehicle

阳离子脂质体是一种辅助基因和核酸转运的强效手段,在未来的基因治疗领域,它将作为一种核心技术而起主要作用,目前已有将阳离子脂质体用于基因治疗的临床报道[1]。阳离子脂质体通常由一个单一的阳离子两亲化合物和一个中性脂质组成,而前者又称为细胞转染素(Cytofectin)。细胞转染素介导核酸转运的机制是带正电荷的阳离子脂质体与带负电荷的核酸序列通过静电作用形成缀合物,利用其亲脂性进入细胞后,核酸序列慢慢释放出来并在细胞核表达或控制基因表达[2]。

多胺与胆固醇的缀合物是新型的细胞转染素[3~6]。在生理条件(pH 7.4)下,多胺基团间隔3~4个碳原子,呈多阳离子状态,其3~4个碳原子正电荷的间隔尺度,大小恰好与核酸螺旋小沟中碱基尺度相配,因而与核酸的结合较为紧密,并具亲水性;而胆固醇扁平的骨架和良好的亲脂性,使其与多胺的缀合物成为多阳离子的两亲化合物,易与核酸形成静电复合物并自由通过亲脂性膜,因此多胺胆固醇缀合物是细胞转染素中效果较好的核酸运载载体[3,4]。研究表明,在此类细胞转染素中,支链多胺胆固醇缀合物的多阳离子电荷分布较直链多胺胆固醇更为集中,是更好的核酸运载载体[1,5,6]。

本实验报道了新型细胞转染素支链多胺胆固醇缀合物—N^4-精氨胆固醇羰酰氨的化学合成,目的是通过N^4-精氨胆固醇羰酰氨的获得,为提高基因转染效率和进行肺部疾病的基因治疗打下基础。

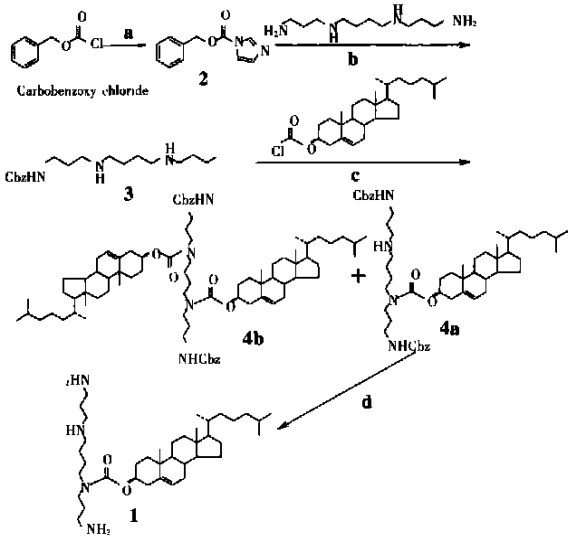
1 实验步骤

所有反应均以薄层层析跟踪,使用烟台化工研究所生产的高效薄层层析硅胶GF_{254}板;快速柱层析用青岛海洋化工厂生产的层析硅胶(10~40 μm);红外光谱由重庆一品化工厂中心实验室的MAGNA 550 FT-IR型(美国 Nicolet 公司)红外光谱仪测定,KBr压片;^{1}HNMR由华西医科大学的400M Brucker 型核磁共振仪测定,TMS作内标,$CDCl_3$作溶剂,δ值为PPM;质谱由第三军医大学全军免疫学研究所API2000型质谱仪测定;胆固醇羰酰氯(mp:114-116℃,95.5%)和氯甲酸苄酯(97.3%),由重庆长

基金项目:重庆市科委基金资助项目(1999)
作者简介:雷 撼(1965-),男,重庆市人,博士研究生,主治医师,讲师,主要从事基因转染方面的研究。电话:(023)68755320
收稿日期:2002-11-06;修回日期:2003-01-05

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

风化工厂制备，使用时无水条件下重蒸。精胺为美国 Sigma 公司产品。合成路线见图 1。



Reaction conditions: a: imidazole, CH_2Cl_2, 0 ~ 5 ℃, 98%; b: DMAP, CH_2Cl_2, 51%, 0 ℃; c: $CHCl_3$—MeOH—H_2O (65∶25∶4), rt, 4h, 40.9%; d: 10%Pd-C, H_2, HOAc, rt, 62.3%

图 1 N^4-精胺胆固醇羰酰氨合成路线图

Fig 1 Synthetic route of N^4-spermine cholesteryl carbamate

1.1 苄氧酰咪唑 2 的制备

500 ml 三颈瓶中，氮气保护下加入氯甲酸苄酯(10 ml, 134.8 mmol)和 80 ml 二氯甲烷，冰水浴冷至 0℃，缓慢滴加含 9.450 g (134.8 mmol)咪唑的二氯甲烷 200 ml，40 min 内加完。0 ~ 5 ℃下搅拌 1 h 后，室温搅拌过夜。用 2× 250 ml 10% 柠檬酸，3× 250 ml 饱和食盐水洗至中性，无水 Na_2SO_4 干燥，除去溶剂，于 40 ℃下真空干燥 5 h，置于冰箱中，得 **2**(白色固体，13.824 g，收率 98%)。

1.2 N^1, N^{12}-二甲基苄氧羰酰精胺二盐酸盐 3 的合成

500 ml 三颈瓶中加入 DMAP(370 mg, 3.074 mmol)，40ml 二氯甲烷溶解。加入 **2**(13.799 g, 68.28 mmol)和 100 ml 二氯甲烷，室温搅拌，溶解后冷至 0℃，滴加含精胺(6.907 g, 34.14 mmol)的二氯甲烷溶液 500 ml，80 min 加完。室温搅拌过夜，除去溶剂得油状物。加入 100 ml 乙酸乙酯溶解，滤去不溶物得无色液体，除去溶剂得油状物。加入 253 ml 甲醇和 45 ml 1 mol/L HCl，于冰箱中冷至 0 ℃。2 d 后，有大量白色晶体析出，抽滤，用少量冰冷的甲醇洗涤，干燥后得 **3**(白色晶体，9.423 g，收率 51%)。

1.3 N^1, N^{12}-二苄氧羰酰-N^4-精胺胆固醇羰酰氨 4a 的合成

500 ml 三颈瓶中加入 3 (3.886 g, 7.17 mmol)，用 273 ml 氯仿∶甲醇∶水(65∶25∶4)混合溶剂溶解后，加入胆固醇苄氧羰酰氯(3.541 g, 7.89 mol)，室温搅拌 4 h，先后用 49 ml 1 mol/L NaOH、150 ml 去离子水和 200 ml 饱和食盐水洗涤。无水 Na_2SO_4 干燥，除去溶剂得油状物 5.320 g，快速柱层析($CHCl_3$∶MeOH∶Et_3N/100∶1∶1)得 **4a**(2.842 g，收率 40.86%)。MS-ESI(m/e)($C_{54}H_{82}O_6N_4$)：计算值 883.3，实测值 883.8。同时得 N^1, N^{12}-二苄氧羰酰-N^4, N^8-精胺-二胆固醇羰酰氨 **4b**(1.932 g，收率 18.93%)。MS-ESI(m/e)($C_{82}H_{126}O_8N_4$)：计算值 1 295.9，实测值 1 296.2。

1.4 N^4-精胺胆固醇羰酰氨 1 的合成

250 ml 蛋形瓶中，加入 **4a**(2.85 g, 3.24 mmol)，用 67 ml 醋酸溶解，加入 0.56 g 10% Pd-C，装上氢化装置，用氢气洗涤 3 次。于室温常压下氢化 5 h，硅藻土过滤，滤饼用 100 ml 10% HOAc-EtOAc 洗涤，除去溶剂。用少量 $CHCl_3$ 除去残余醋酸。真空干燥 3 h，得黄色油状物 1.99 g。快速柱层析($CHCl_3$∶MeOH/1∶1-$CHCl_3$∶MeOH∶$NH_3\cdot H_2O$/20∶10∶2—$CHCl_3$∶MeOH∶$NH_3\cdot H_2O$/20∶10∶2)得无色油状物，加入 20 ml 甲醇，除去甲醇，于室温下真空干燥 2 h 得 **1**(无色半固体，1.236 g，收率 62.3%)。MS-ESI (m/e)($C_{38}H_{70}O_2N_4$)：计算值 615.0，实测值 615.8。IR(KBr 片) cm^{-1}：3359, 3293, 2935, 2867, 1693; ^{1}HNMR(400 M, $CDCl_3$) δ: 0.656(3H, s, 18-H_3), 0.837(3H, d, J= 2Hz, 26-H_3), 0.853(3H, d, J= 2Hz, 27-H_3), 0.894(3H, d, J= 6.4Hz, 19-H_3), 0.999(6H, s), 2.602(2H, t, J= 7.2Hz), 2.654(3H, t, J= 7.2Hz), 3.187 and 3.298(6H, br), 4.477(1H, br, -NH), 5.358 (1H, s, Δ^6-H)

2 结果与讨论

细胞转染素—支链多胺胆固醇缀合物是目前研究较新的一个领域。1996 年，Lee 首先报道了 N^4-精胺胆固醇羰酰氨的合成，并发现其转染效率较传统脂质体高 100 倍，与腺病毒载体相当，应用前景十分乐观。其合成的难度在于位置选择性缩合和进一步的分离纯化，因此合成的关键步骤在于双苄氧羰酰精胺与胆固醇羰酰氯选择性缩合。

精胺分子呈对称结构，有两个仲胺和两个伯胺。要在 N^4-或 N^8 位仲胺上引入一个胆固醇羰酰氧基，需先对 N^1-和 N^{12}-位的伯胺进行封闭保护，使 N^4-或 N^8-位仲胺裸露，便于缩合。但由于氯甲酸苄酯的活性太强，直接保护精胺分子中的伯胺和仲胺几无选择性，因此，首先合成苄氧酰咪唑 **2**，使其活性钝化，以选择性保护伯胺。将 **1** 当量氯甲酸苄酯与 **2** 当量的咪唑在无水条件下作用，以 98%收率获得钝化保护试剂 **2**。在无水条件下，用 4, 4-二甲基氨基吡啶(DMAP)作催化剂，精胺与化合物 **2** 作用，然后用盐酸酸化，即得选择性保护伯胺的化合物 **3**(收率，51%)，收率低的原因，是有部分仲胺保护产物生成。获得 **3** 以后，合成目标分子的关键是它与胆固醇羰酰氯的选择性缩合。用等当量的化合物 **3** 与等当量的胆固醇羰酰氯在氯仿∶甲醇∶水的混合溶剂中于反应 5 h，经柱层析分离得一极性较大的化合物(2.842 g)(TLC, Rf= 0.50, $CHCl_3$∶MeOH/10∶1)和一极性较小的化合物(1.932 g)(TLC, Rf= 0.75, $CHCl_3$∶MeOH/10∶1)。极性较大的化合物作质谱分析，

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

MS-ESI(m/e)实测值为 883.8, 以分子式($C_{54}H_{82}O_6N_4$)为准, 其计算值为 883.3, 因此, 极性较大的化合物为单胆固醇缩合的预期化合物 **4a**, 收率为 40.86%(大于文献所得)。极性小的化合物, 质谱 MS-ESI(m/e)实测值为 1296.2, 以分子式($C_{82}H_{126}O_8N^4$)为准, 其计算值为 1295.9, 为双胆固醇缩合的非预期化合物 **4b**, 收率为 18.93%, 说明单胆固醇和双胆固醇缩合同时进行, 其选择性缩合的比率为 2.16∶1。在获得化合物 **4a** 后, 用 10% Pd-C 催化氢化 5 h, TLC 表明为单纯物质, 柱层析分离难以纯化, 经多次探索柱层析条件, 最后找出最佳洗脱液化比率为 $CHCl_3$∶MeOH∶$NH_3 \cdot H_2O$/20∶10∶2, 按以上条件分离, 以 62.3%的收率得目标化合物, MS-ESI(m/e)($C_{38}H_{70}O_2N^4$): 计算值 615.0, 实测值 615.8。经 ^{1}HNMR 和 IR 证实其结构。至此, 以总收率 25.46%合成了目标分子, 高于文献报道。

目标化合物与中性脂质混合制备的微囊悬液, 电镜下显示大小为 100~500 nm, 其用于基因转染的研究将另行报道, 用于基因治疗的研究正在进行之中。

(致谢: 感谢吴玉章教授、周伟先生在质谱测试中给予的帮助!)

参考文献:

[1] Lee E R, Marshall J, Siegel C S, *et al*. Detailed analysis of structures and formulations of cationic lipids for efficient gene transfer to the lung[J]. Hum Gene Ther, 1996, 7(14): 1701—1717.
[2] Miller A D. Cationic liposomes gene therapy[J]. Angew Chem Int Ed, 1998, 37: 1768—1785.
[3] Cooper R Q, Etheridge C J, Stewart L, *et al*. Polyamine Analogues of 3-[N-(N, N-Dimethylaminoethane) carbamoyl] cholesterol (DC-Chol) as Agents for Gene Delivery[J]. Chem Eur J, 1998, 4: 137—151.
[4] Guy-Caffey J K, Bodepudi V, Bishop J S, *et al*. Novel polyaminolipids enhance the cellular uptake of oligonucleotides[J]. J Biol Chem, 1995, 270(52): 31391—31396.
[5] Moradpour D, Schauer J I, Zurawski V R Jr, *et al*. Efficient gene transfer into mammalian cells with cholesteryl-s permidine[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1996, 221(1): 82—88.
[6] Vigneron J P, Oudrhiri N, Fauquet M, *et al*. Guanidinium-cholesterol cationic lipids: efficient vectors for the transfection of eukaryotic cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(18): 9682—9686.

(编辑 薛国文)

文章编号: 1000-5404(2003)04-0321-01

个案与短篇

十二指肠溃疡合并食管癌 8 例分析

An analysis of duodenal ulcer disease complicated with esophagus cancer in 8 cases

谢 颖, 赵长城, 李向红, 王振华 (第三军医大学附属西南医院全军消化专科中心, 重庆 400038)

传统观念认为: 十二指肠溃疡并不存在合并上消化道恶性肿瘤(尤其是胃癌)的可能性, 因为十二指肠溃疡发生时迷走神经张力高、泌酸能力强, 可抑制亚硝酸盐的形成, 减少致癌物质的产生, 从而减少了肿瘤的发生, 但近年来对十二指肠溃疡合并胃癌的报道逐渐增多, 因而引起了临床的重视。在临床工作中, 我们发现十二指肠溃疡也能合并食管癌, Moses 等[1]认为十二指肠溃疡可合并食管癌, 只是几率较低, 他们报道 4 年中 46 例食管鳞癌仅有 3 例合并十二指肠溃疡。虽然这两种截然不同的疾病合并发生的机制尚不清楚, 但为了引起临床适当的重视, 特对我院 8 例病例做了综合分析, 现报告如下。

1 一般资料

我院自 1973 年 6 月至 2000 年 6 月共做胃镜检查 50 252 例, 诊断食管鳞状细胞癌 1 423 例, 占 2.83%, 其中合并十二指肠溃疡 8 例, 占同期食管鳞癌的 0.56%。发现十二指肠溃疡 6 294 例, 占 12.52%, 合并食管鳞癌 8 例, 占同期十二指肠溃疡的 0.13%。所有食管鳞癌均经外科手术或/及组织活检病理学检查证实。8 例合并十二指肠溃疡患者, 年龄 44~79 岁, 平均年龄 63 岁, 其中男性 5 例, 女性 3 例。临床表现有进行性吞咽困难, 胸骨后灼痛, 咽下疼痛, 呕吐, 声音嘶哑, 纳差, 消瘦等。4 例有饥饿痛、嗳气、反酸、黑便、贫血等十二指肠溃疡典型表现。

2 内镜检查

8 例食管鳞癌病灶, 3 例次位于食管下段, 6 例次位于食管中段, 有 1 例为食管多发性鳞癌。6 例次为粘膜肿块隆起, 中央溃烂表面有污苔, 边缘唇样隆起。3 例次粘膜增厚, 扁平隆起, 表面粗糙, 有浅表糜烂坏死。十二指肠溃疡 1 例位于十二指肠降部, 余 7 例位于球部前壁 2 例, 后壁 2 例, 大弯侧 3 例。溃疡直径 0.4~1.0 cm。5 例周围粘膜充血肿胀, 3 例处于愈合期。

(下转 326 页)

作者简介: 谢 颖(1971—), 女, 重庆市永川人, 医师, 主要从事消化内科和肿瘤方面的研究, 现在肿瘤科工作。电话: (023)65459990

收稿日期: 2002-03-05; 修回日期: 2002-07-10

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