大环多胺-咪唑鎓盐阳离子脂质的设计合成及作为基因载体的性质研究

付云 王海蛟 张骥 余孝其*

(四川大学化学学院 绿色化学与技术教育部重点实验室 成都 610064)

摘要 设计合成了 4 个含大环多胺 cyclen 亲水基团和十二酸疏水基团的两亲小分子化合物 **8a**~**8d**, 其结构经核磁共振谱和高分辨质谱确证. 凝胶电泳实验结果表明, 此类化合物与 Sn-甘油-1,2-二油酰-3-磷酸乙醇胺(DOPE)形成的阳离子脂质体对 DNA 有很强的包裹能力. 4 种脂质体中, **8a** 在 N/P 为 4 时可完全包裹 DNA, **8b**~**8d** 在 N/P 为 6 时即可完全包裹 DNA. 荧光实验也表明这四种脂质体可以有效减弱溴乙锭(EB)的荧光. 另外, 此类脂质体的粒径在 80~120 nm 之间, zeta 电位在 +25~55 mV 之间, 且在长达 7 d 的测量时间内没有明显的变化. 此外, 我们还将该类脂质体在 A549 细胞中进行了绿色荧光蛋白的转染实验, **8a** 有中等强度的荧光表达, **8b**~**8d** 则无荧光表达. 结果表明, 此类脂质体具备了作为非病毒基因载体的潜在性.

关键词 大环多胺; 阳离子脂质; 连接基团; 基因载体

Design, Synthesis and Gene Transfection Activity of Macrocyclic Polyamine-Imidazolium Based Cationic Lipids

Fu, Yun Wang, Haijiao Zhang, Ji Yu, Xiaoqi*

(Key Laboratory of Green Chemistry and Technology-Ministry of Education, College of Chemistry, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

Abstract A major challenge in gene therapy is the development of effective gene delivery vectors with low toxicity. In this study, four cyclen-based amphiphilic molecules including lauric acid moieties were designed and synthesized, and their molecular structures were confirmed by NMR and ESI-MS. These molecules have a hydrophilic cyclen headgroup and a hydrophobic long chain linking by alkyl or glycol chain, leading to different hydrophobic properties. Cationic liposomes were prepared by mixing the molecules with DOPE at various mole ratios. Agarose gel electrophoresis demonstrated that the liposomes **8a** could condense plasmid DNA at N/P molar ratio of 4, and the ratios was 6 for **8b**~**8d**. Fluorescence quenching assay also suggested that lipids **8** have good DNA binding ability. The sizes of the formed lipoplexes were measured to be around 80~120 nm, while zeta-potentials of the liposomes were found to be +25~55 mV, and both of these values could remain with little change within 7 d. Among the four lipids, **8a** showed moderate *in vitro* gene transfection efficiency toward A549 cells, and the best transfection could be observed at N/P of 4 with **8a**/DOPE ratio of 1:2.

Keywords cyclen; cationic lipid; spacer; gene vector

1 引言

人类基因治疗逐渐成为现代医学发展的主要方向之一. 基因治疗通过添加、修复或替换人体内有缺陷的基因, 从而达到治疗疾病的目的^[1]. 基因治疗为癌症、糖尿病、艾滋病、心血管疾病等众多疾病的治疗带来了希望^[2,3]. 基因治疗需要将外源基因导入细胞里面并使其高效表达, 由于体内核酸酶的存在, 在将外源基因导入细胞的过程中, DNA 会被其所降解, 进而无法达到基因修复的目的. 为了使外源基因能够安全地进入细胞, 一般是将外源基因与基因载体结合, 由基因载体保护基因免受体内体外环境所破坏. 因此, 基因载体的开发对基

因治疗的发展尤为重要.

常见的基因载体可以分为病毒载体与非病毒载体两类^[4]. 病毒载体由于其高效的转染效率而被人们所关注, 但是病毒载体也有许多内在的缺陷, 例如免疫原性, 潜在的变异性以及所运载的 DNA 尺寸过小, 这些缺陷都阻碍了病毒载体在临床上的使用^[5]. 近年来, 非病毒载体吸引了人们的极大关注. 与病毒载体相比, 非病毒载体具有低毒、低免疫原性、对所运载的基因没有尺寸上的限制及使用简单、制备方便、保存容易等优点. 常见的非病毒载体主要有阳离子脂质体^[6,7]和阳离子聚合物^[8,9]. 阳离子脂质体是最早使用的非病毒载体, 自

* E-mail: xqyu@scu.edu.cn; Fax: 0086-028-85415886

Received December 8, 2012; published February 6, 2013.

Supporting information for this article is available free of charge via the Internet at <http://sioc-journal.cn>.

Project supported by the National Program on Key Basic Research Project of China (973 Program, 2012CB720603, 2013CB328900) and the National Natural Science Foundation of China (No. 21232005).

项目受 973 计划(Nos. 2012CB720603, 2013CB328900)和国家自然科学基金(No. 21232005)资助.

1987年 Felgner 等^[10]首次将脂质体用作基因转染载体以来, 科学家已经针对阳离子脂质体的头部基团、连接基团和疏水的尾部进行了许多改造, 希望通过结构活性关系的研究, 为新型阳离子脂质体的设计提供依据。

我们实验室近年来也一直从事含大环多胺的阳离子基因载体的研究^[11~16], 设计的含大环多胺的咪唑鎓盐阳离子脂质体在体外有很好的转染效果, 尤其是在 A549 细胞中, 转染效率是商业化试剂 Lipofectamine 2000 的 5~6 倍^[15]。也有文献报道连接基团对转染效率有很大影响, 而且延伸的分子内空间, 高的细胞弹性和增强的流动性有助于提高转染活性^[17]。

在实验室前期工作的基础上, 我们设计合成了 4 种阳离子脂质 **8a~8d**。在头部 cyclen 亲水基团与疏水长链之间插入了不同长度的亲水或疏水的连接基团, 并通过凝胶电泳试验研究了它们与中性脂质 Sn-甘油-1,2-二油酰-3-磷酸乙醇胺(DOPE)形成的脂质体对 DNA 的包裹能力, 测定了其粒径和电位以及荧光溴乙锭取代实验, 并在 A549 细胞中进行了体外转染, 发现其已具备作为基因载体的潜在能力。

2 结果与讨论

2.1 两亲性小分子化合物的合成

采用 Scheme 1 所示路线合成了带有月桂酸疏水基团的两亲性化合物 **8a~8d**, 各中间体均经 NMR 表征确认结构, 最终化合物经过 NMR 和高分辨质谱确认结构。

首先, 十二酸和不同长链的甘醇发生酯化反应得到化合物 **1**, 将其羟基对甲苯磺酰化后的化合物 **2** 和咪唑反应, 可得到含有不同亲水性多乙二醇结构链长的中间体 **5a** 和 **5b**。对于长碳链桥联的化合物 **5c** 和 **5d**, 则需通过月桂酰氯和不同链长的 ω -溴代脂肪醇酯化后得到的溴代产物 **4** 与咪唑在 KI 和 K_2CO_3 存在下反应得到。与前期研究^[15]的方法类似, 将化合物 **5** 与 Boc 保护的大环多胺 cyclen 中间体 **6** 在碱存在下发生咪唑的季铵化反应可得到咪唑鎓盐 **7**, 将其脱保护后, 得到目标产物三氟乙酸盐 **8**。最终产物均经核磁共振氢谱、碳谱和高分辨质谱确认结构。

2.2 阳离子脂质体的电泳阻滞实验

阳离子脂质体作为基因载体, 其最基本的一个目的就是保护 DNA 免受细胞内核酸酶的降解。因此, 在将阳离子脂质制备成脂质体后, 进行了质粒 DNA 电泳阻滞实验, 以找出有效保护浓缩 DNA 的 N/P 比(表示脂质体可质子化的 N 原子与 DNA 磷酸基团的数量比值), 设计阳离子脂质体/DNA 复合物的实验 N/P 摩尔比为 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10。由图 1 可知, **8a** 在 N/P 比为 4 时就能完全阻滞 DNA, 也就是说在 N/P 为 4 时即可完全包裹 DNA, 这与我们之前得到的脂质体类似^[15]。而脂质体 **8b~8d** 则在 N/P 为 6 时才能对 DNA 完全包裹。初步表明阳离子脂质 **8a** 对 DNA 的包裹浓缩能力比阳离子脂质 **8b~8d** 高。

图式 1 目标化合物 **8a~8d** 的合成路线

Scheme 1 Synthetic routes of target compounds **8a~8d**

图1 脂质体/DNA 复合物的凝胶电泳图. **8**/DOPE 摩尔比为 1 : 2
Figure 1 Electrophoretic mobility assay of liposomes/DNA complexes (lipoplexes) to determine the DNA condensation. The molar ratios of **8**/DOPE were 1 : 2.

2.3 荧光溴乙锭置换实验

我们还利用溴乙锭荧光减弱实验对阳离子脂质体对 DNA 的结合能力进行了表征. 溴乙锭单独使用时, 其荧光强度较弱, 但是当它与 DNA 结合之后, 荧光强度会大大增强. 因此, 我们逐渐向溴乙锭与 DNA 的混合液中加入阳离子脂质体, 由于阳离子脂质体会优先与 DNA 结合, 导致溴乙锭与 DNA 的分离, 进而导致荧光强度的降低. 通过观察荧光强与所加入脂质体的关系, 可以判断出阳离子脂质体对 DNA 的包裹情况. 如图 2 所示, 我们对四个阳离子脂质体进行的荧光减弱实验发现, 随着 N/P 的增加, 荧光强度迅速下降, 但是在 N/P 为 1.5 左右, 荧光强度则不再下降. **8d** 可使荧光降到最低, 意味着其能置换出最多的溴乙锭.

图2 溴乙锭荧光减弱曲线
Figure 2 Change of relative fluorescence of EB bound to DNA by the addition of Liposomes prepared by **8** at different N/P ratios

2.4 粒径及 Zeta 电位测定

由于阳离子脂质体与 DNA 所形成的复合物要通过内吞作用进入细胞, 所以就要求阳离子脂质体的粒径不能过大. 而且由于细胞表面带有负电荷, 这就要求脂质体的表面要有一定的正电荷, 这样就可以通过静电作用相结合, 进而通过内吞作用进入细胞. 为了测定阳离子脂质体的稳定性, 我们对未复合 DNA 的阳离子脂质体的粒径和电位进行了一周的测定, 在测定的前五天, **8a**~**8d** 的粒径均比较稳定, 在 80~120 nm 之间, 显示了较好的稳定性. 对阳离子脂质体/DNA 复合物的粒径及 zeta 电位的测定结果如图 3 所示. 我们在 PBS 溶液中

图3 脂质体/DNA 复合物的平均粒径和表面电位
Figure 3 Mean particle sizes (A) and surface charge (B) of the **8**/DNA lipoplex aggregates under various N/P ratios

测定了阳离子脂质体/DNA 复合物在不同氮磷比(N/P=2~10)时的粒径和电位. 在 N/P 为 2 时, 复合物的粒径比较大, 但是随着 N/P 的增大, 其粒径逐渐减小, 在 N/P 大于 4 后, 其粒径稳定在 200~300 nm, 显示 DNA 被完全包裹. 其中 **8a**/DNA 复合物在 N/P 为 4 时粒径即达到稳定值, 显示出了比 **8b**~**8d** 更好的 DNA 包裹能力, 这与凝胶电泳实验结果一致. 另外, 对于所考察的四种复合物, 其 zeta 电位均随着 N/P 的增加而增加. N/P 比增加到 4 以后, 电位转变为正值, 显示阳离子脂质体所带正电荷已完全中和 DNA 的负电荷并占主导. 连接基团比较长的 **8b** 和 **8d** 所形成脂质体的电位要小于连接基团较短的 **8a** 和 **8c**, 这应该是连接基团长度增加导致电荷密度降低所致.

2.5 阳离子脂质体体外细胞转染性能

在荧光蛋白表达实验中, 由于实验室前期在实验中所采用的阳离子脂质与中性脂质 DOPE 的摩尔比例为 1 : 2, 我们也采用相同的比例. 以 pEGFP-N1 质粒为报告基因在 A549 细胞中研究了四个阳离子脂质体在不同氮磷比(N/P=4, 6, 8, 10)时的基因传递和表达情况. 在所考察的四种阳离子脂质体中, 只有 **8a** 有中等强度的荧光表达, **8b**, **8c** 和 **8d** 介导的荧光表达均较弱(图未列

出). 如图 4 所示, **8a** 的转染效果在 N/P 比为 4 时最好(图 4A), 而电泳实验亦显示 **8a** 对 DNA 的完全包裹发生在 N/P 比为 4 时. 另外, 有文献报道^[18], 中性脂质的用量与种类也会对转染效率产生影响. 所以, 在 N/P 比为 4 的情况下, 我们考察了 **8a** 单独使用以及不同 **8a**/DOPE 比例介导的绿色荧光蛋白表达基因转染, 结果如图 5 所示. 从图中转染的结果来看, 阳离子脂质与中性脂质 DOPE 的摩尔比例对转染效果影响不大, 在 DOPE 比为 2, 3, 4 时绿色荧光蛋白的表达情况没有明显的区别, 但是有无 DOPE 却对实验有很显著的影响. 如图 5A 所示, 不加 DOPE 的转染效率要比加入 DOPE 差很多, 这表明 DOPE 的加入可以很显著的提高阳离子脂质 **8a** 的转染效率.

3 结论

合成了 4 个新的含大环多胺的两亲性小分子化合物, 它们具有不同亲疏水性及不同长度的连接基团. 将其与中性脂质 DOPE 混合制备了阳离子脂质体 **8a**~**8d**. 凝胶电泳阻滞实验结果表明, 该阳离子脂质体对 DNA 具有很强的包裹能力, 可有效保护 DNA 免受核酸酶的降解, 其中 **8a** 在 N/P 摩尔比为 4:1 时即可有效包裹 DNA. 另外, 对这类脂质体的粒径和 Zeta 电位进行了考察, 所得数据满足作为基因转染材料的条件. 在 A549 细胞中的体外绿色荧光蛋白表达基因转染实验结果显示, 含有较短亲水连接基团的化合物 **8a** 可介导目标基因有效转染细胞. 以上结果显示了此类脂质体作为非病毒基因载体的潜在性.

4 实验部分

4.1 仪器和试剂

仪器: Bruker AV II-400 MHz 核磁共振波谱仪, 四甲基硅烷(TMS)为内标; Bruker Daltonics Bio TOF 型质谱仪测定; 新芝 Scientz-IID 超声仪; Olympia 公司的 GDS 凝胶成像系统; Malvern ZEN 3600 纳米粒度及电位分析仪; 美国 Corning 细胞培养板; 法国 JOUAN 生物安全柜; 法国 JOUAN CO₂ 培养箱; Bio-RAD model 550 酶标仪.

试剂: 柱层析硅胶 H(青岛海洋化工厂, 200~300 目); 琼脂糖(美国 Amor); TAE 缓冲液、PBS 缓冲液由国产分析纯试剂配制; 染料 Goldview(上海赛百盛基因技术有限公司); 葡萄糖溶液(太极集团西南药业股份有限公司); 溶剂 DMSO(美国 Sigma); 1640 培养基、DMEM 培养基(美国 Gibco); pGL-3 质粒和 pEGFP-N1 质粒(美国 Clontech); Lipofectamine 2000(美国 invitrogen); EndoFree Plasmid Kit (TIANGEN); A549 细胞株(美国 ATCC).

化合物 **3** 和中间体 **6** 的合成参考文献^[19].

4.2 目标化合物的制备

4.2.1 化合物 **1** 的合成

将十二酸(0.023 mol, 4.56 g), 二甘醇(**1a**, 0.2 mol, 21.2 g)或四甘醇(**1b**, 0.2 mol, 38.8 g)和 4-二甲氨基吡啶(DMAP, 0.003 mol, 0.366 g)溶于 150 mL 二氯甲烷中, 再将二环己基碳二亚胺(DCC, 0.02 mol, 4.12 g)用 50 mL 二氯甲烷溶解, 在冰浴下滴加到上述溶液中, 反应过夜. 将所得溶液用水洗 3 次, 合并水层, 用二氯甲烷反萃取

图 4 不同 N/P 比的脂质体 **8a** 转染绿色荧光蛋白基因到 A549 细胞的荧光表达(A~D 图 N/P 比分别为 4, 6, 8 和 10, **8a**/DOPE 摩尔比为 1:2)
Figure 4 Fluorescent microscope images of A 549 cells transfected by the lipoplexes formed from **8a** (A~D) at different N/P ratios (A: N/P=4, B: N/P=6, C: N/P=8, D: N/P=10), **8a**/DOPE mole ratio in all experiments was 1:2

图 5 不同 **8a**/DOPE 摩尔比下 **8a** 转染绿色荧光蛋白基因到 A549 细胞的荧光表达(A~D 图 **8a**/DOPE 摩尔比分别为 1:0, 1:1, 1:2 和 1:3, N/P 为 4)
Figure 5 Fluorescent microscope images of A 549 cells transfected by the lipoplexes formed from **8a** at different **8a**/DOPE mole ratios (A: 1:0, B: 1:1, C: 1:2, D: 1:3), N/P ratio in all experiments was 4

2 次, 合并有机相, 无水硫酸钠干燥. 将有机相浓缩, 粗产品经硅胶柱层析分离 [$V(\text{石油醚}) : V(\text{乙酸乙酯}) = 2 : 1$] 得无色液体.

1a: 产率 76%. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 0.88 (t, $J = 6.8$ Hz, 3H, CH_3), 1.26~1.30 (m, 16H, CH_2), 1.61~1.64 (m, 2H, CH_2), 2.34 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H, COCH_2), 3.61~3.62 (m, 2H, HOCH_2), 3.71 (t, $J = 4.0$ Hz, 2H, $\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.76 (t, $J = 4.9$ Hz, 2H, $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 4.25 (t, $J = 4.0$ Hz, 2H, COOCH_2); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 173.9, 77.1, 72.3, 71.1, 61.5, 42.9, 34.1, 31.8, 29.5, 29.4, 29.3, 29.2, 29.1, 24.9, 22.6, 14.1.

1b: 产率 80%. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 0.88 (t, $J = 6.8$ Hz, 3H, CH_3), 1.26~1.31 (m, 16H, CH_2), 1.61~1.64 (m, 2H, CH_2), 2.33 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H, COCH_2), 3.61~3.62 (m, 2H, HOCH_2), 3.70~3.71 (m, 12H, CH_2), 4.23 (t, $J = 4.0$ Hz, 2H, COOCH_2); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 173.8, 70.6, 70.5, 70.3, 69.2, 63.3, 61.6, 29.5, 29.4, 29.3, 29.2, 29.1, 24.8, 22.6, 14.1.

4.2.2 化合物 2 的合成

将对甲苯磺酰氯 (2.98 g, 16 mmol) 和三乙胺 (1.62 g, 16 mmol) 用无水二氯甲烷溶解, 再将化合物 **1** (13 mmol) 用无水二氯甲烷溶解, 冰浴下将化合物 **1** 滴加到上述溶液中, 反应过夜. 将所得溶液用水洗 3 次, 合并水层, 用二氯甲烷反萃取 2 次, 合并有机相, 用无水硫酸钠干燥. 将有机相浓缩, 粗产品经硅胶柱层析分离 [$V(\text{石油醚}) : V(\text{乙酸乙酯}) = 1 : 1$] 得无色液体.

2a: 产率 36%. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 0.88 (t, $J = 6.8$ Hz, 3H, CH_3), 1.23~1.25 (m, 16H, CH_2), 1.57~1.59 (m, 2H, CH_2), 2.28 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H, COCH_2), 2.45 (s, 3H, ArCH_3), 3.65~4.15 (m, 8H, OCH_2), 7.32~7.80 (m, 4H, Ar); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 173.8, 144.9, 132.9, 129.8, 128.0, 69.1, 68.6, 63.1, 58.4, 31.9, 34.2, 29.6, 29.5, 29.3, 29.1, 24.9, 22.7, 21.6, 14.2.

2b: 产率 38%. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 0.88 (t, $J = 6.8$ Hz, 3H, CH_3), 1.25~1.28 (m, 16H, CH_2), 1.59~1.63 (m, 2H, CH_2), 2.32 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H, COCH_2), 2.45 (s, 3H, ArCH_3), 3.59~3.68 (m, 12H, OCH_2), 4.16 (t, $J = 4.4$ Hz, 2H, SO_2OCH_2), 4.22 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H, COOCH_2), 7.34 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H, m-Ts), 7.80 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H, O-Ts); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 173.8, 144.8, 133.0, 130.0, 128.0, 70.7, 70.6, 70.5, 69.2, 68.7, 63.3, 34.2, 31.9, 29.6, 29.5, 29.3, 29.1, 24.9, 22.7, 21.6, 14.1.

4.2.3 化合物 4 的合成

将化合物 **3** (20 mmol) 用二氯甲烷溶解, 冰浴滴加到溴代醇 (20 mmol) 和三乙胺 (4.04 g, 40 mmol) 的二氯甲烷溶液中, 反应过夜. 将所得反应液用水洗涤 3 次, 再用饱和碳酸氢钠溶液洗涤 3 次. 合并水层, 用二氯甲烷

反萃取 2 次, 合并有机相, 加入无水硫酸钠干燥. 将有机相浓缩, 粗产品经硅胶柱层析分离 (石油醚) 得白色固体.

4a: 产率 46%. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 0.86 (t, $J = 6.8$ Hz, 3H, CH_3), 1.26~1.28 (m, 28H, CH_2), 1.40~1.42 (m, 2H, BrCH_2CH_2), 1.57~1.66 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_2\text{CH}_2$), 2.27 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H, COCH_2), 3.64 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H, $\text{Br-CH}_2\text{CH}_2$), 4.06 (t, $J = 4.0$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 174.0, 64.1, 34.2, 32.1, 31.8, 29.5, 29.3, 29.2, 29.1, 29.0, 28.3, 24.9, 22.5, 22.1, 13.9.

4b: 产率 42%. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 0.88 (t, $J = 6.8$ Hz, 3H, CH_3), 1.26~1.28 (m, 28H, CH_2), 1.40~1.42 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1.58~1.61 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_2\text{CH}_2$), 1.81~1.89 (m, 2H, BrCH_2CH_2), 2.29 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H, COCH_2), 3.40 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H, BrCH_2CH_2), 4.05 (t, $J = 4.0$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 174.0, 64.3, 34.4, 33.9, 32.8, 31.9, 29.6, 29.5, 29.4, 29.3, 29.2, 28.8, 28.7, 28.2, 25.9, 25.0, 22.7, 14.1.

4.2.4 含多乙二醇连接基团的两亲性化合物中间体 **5a** 和 **5b** 的合成

将化合物 **2a** 或 **2b** (10.7 mmol) 和咪唑 (7.28 g, 107 mmol) 用 100 mL DMF 溶解, 再向其中加入氢化钠 (0.39 g, 16.1 mmol), 90 $^\circ\text{C}$ 加热反应 12 h. 将所得反应液用饱和碳酸氢钠溶液洗涤 3 次, 合并水相, 用二氯甲烷反萃取 2 次, 合并有机相, 加无水硫酸钠干燥. 将有机相浓缩, 粗产品经硅胶柱层析分离 [$V(\text{石油醚}) : V(\text{乙酸乙酯}) = 1 : 1$] 得白色固体.

5a: 产率 88%. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 0.87 (t, $J = 6.8$ Hz, 3H, CH_3), 1.26~1.29 (m, 16H, CH_2), 1.60~1.63 (m, 2H, CH_2), 2.28 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H, COCH_2), 3.62~3.71 (m, 4H, OCH_2), 4.12 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H, COOCH_2), 4.17 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H, Imidazole- CH_2), 6.99 (s, 1H, Imidazole-H), 7.04 (s, 1H, Imidazole-H), 7.52 (s, 1H, Imidazole-H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 173.8, 137.5, 129.3, 119.4, 70.4, 69.3, 62.9, 47.0, 34.2, 31.9, 29.6, 29.5, 29.3, 29.1, 24.9, 22.7, 14.1.

5b: 产率 74%. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 0.83 (t, $J = 6.8$ Hz, 3H, CH_3), 1.21~1.23 (m, 16H, CH_2), 1.53~1.56 (m, 2H, CH_2), 2.32 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H, COCH_2), 3.57~3.69 (m, 12H, OCH_2), 4.06 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H, COOCH_2), 4.17 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H, Imidazole- CH_2), 6.99 (d, $J = 6.7$ Hz, 2H, Imidazole-H), 7.52 (s, 1H, Imidazole-H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 173.9, 72.4, 71.1, 69.1, 63.2, 61.5, 42.9, 34.1, 31.8, 29.5, 29.4, 29.3, 29.2, 29.1, 24.9, 22.6, 14.1.

4.2.5 含长碳链连接基团的两亲性化合物中间体 **5c** 和 **5d** 的合成

取 100 mL 圆底烧瓶, 分别向其中加入化合物 **4a** 或 **4b** (8 mmol), 咪唑(80 mmol), 碘化钾(0.1 g)和碳酸钠(1.2 g). 再加入 20 mL DMSO, 30 mL 无水氯仿, 90 °C 反应 8 h. 抽滤去除固体杂质, 将所得滤液用饱和碳酸氢钠溶液洗涤 3 次, 饱和食盐水洗涤 3 次, 合并水相, 用二氯甲烷反萃取 2 次, 合并有机相, 用无水硫酸钠干燥. 将有机相浓缩, 粗产品经硅胶柱层析分离 [*V*(石油醚): *V*(乙酸乙酯)=2:1] 得白色固体.

5c: 产率 55%. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 0.88 (t, *J*=6.8 Hz, 3H, CH₃), 1.26~1.28 (m, 18H, CH₂), 1.62~1.80 (m, 6H, CH₂), 2.31 (t, *J*=7.6 Hz, 2H, COCH₂), 3.94 (t, *J*=6.8 Hz, 2H, COOCH₂), 4.05 (t, *J*=6.7 Hz, 2H, imidazole-CH₂), 6.90 (s, 1H, imidazole-H), 7.04 (s, 1H, imidazole-H), 7.46 (s, 1H, imidazole-H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 173.9, 137.0, 129.4, 118.7, 63.7, 46.8, 34.3, 31.9, 30.7, 29.6, 29.4, 29.3, 29.2, 29.1, 28.1, 24.9, 23.0, 22.6, 14.1.

5d: 产率 51%. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 0.88 (t, *J*=6.8 Hz, 3H, CH₃), 1.21~1.26 (m, 30H, CH₂), 1.59~1.77 (m, 6H, CH₂), 2.27 (t, *J*=7.6 Hz, 2H, COCH₂), 3.92 (t, *J*=6.8 Hz, 2H, COOCH₂), 4.05 (t, *J*=6.7 Hz, 2H, imidazole-CH₂), 6.90 (s, 1H, imidazole-H), 7.04 (s, 1H, imidazole-H), 7.45 (s, 1H, imidazole-H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 173.8, 136.9, 129.1, 118.6, 64.2, 46.9, 34.3, 31.8, 30.9, 29.5, 29.3, 29.2, 29.1, 29.0, 28.9, 28.5, 26.4, 25.8, 24.9, 22.5, 14.0.

4.2.6 化合物 **7** 的合成

将中间体 **5** (6 mmol) 与化合物 **6** (9 mmol) 溶解于 30 mL 无水乙腈中, 回流反应, 用薄层层析监测反应的情况, 反应 48~96 h 后, 旋蒸除去乙腈, 柱层析分离 [*V*(二氯甲烷): *V*(甲醇)=20:1] 得到泡沫状黄色油状物质 **7**.

7a: 产率 40%. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 0.87 (t, *J*=6.8 Hz, 3H, CH₃), 1.11~1.33 (m, 16H, CH₂), 1.43~1.51 (m, 27H, (N-Boc)₃), 1.62~1.64 (m, 2H, COOCH₂CH₂), 2.33 (t, *J*=6.8 Hz, 2H, COOCH₂CH₂), 2.62~2.64 (m, 4H, cyclen-H), 3.30~3.69 (m, 12H, cyclen-H), 3.76 (s, 2H, ArCH₂-cyclen), 3.77~3.81 (m, 4H, OCH₂CH₂), 4.51 (t, *J*=7.6 Hz, 2H, CH₂OCO), 4.76 (t, *J*=7.6 Hz, 2H, NCH₂CH₂OCO), 7.31 (d, *J*=9.2 Hz, 2H, Ar-H), 7.41 (d, *J*=11.9 Hz, 1H, imidazole-H), 7.48 (d, *J*=9.2 Hz, 2H, Ar-H), 7.70 (s, 1H, imidazole-H), 10.44 (s, 1H, imidazole-H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 173.7, 137.4, 131.5, 130.9, 130.6, 129.7, 128.9, 123.5, 120.8, 77.3, 77.1, 76.8, 69.4, 68.0, 68.8, 68.1, 65.8, 62.8, 58.3, 53.2, 50.0, 34.2, 31.9, 29.6, 29.5, 29.3, 29.1, 28.7, 28.5,

28.0, 24.9, 22.7, 14.1.

7b: 产率 62%. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 0.86 (t, *J*=6.8 Hz, 3H, CH₃), 1.22~1.33 (m, 16H, CH₂), 1.42~1.58 (m, 27H, (N-Boc)₃), 1.70~1.72 (m, 2H, COOCH₂CH₂), 2.25 (t, *J*=6.8 Hz, 2H, COOCH₂CH₂), 2.58~2.64 (m, 4H, cyclen-H), 3.33~3.72 (m, 12H, cyclen-H), 3.76 (s, 2H, ArCH₂-cyclen), 3.8 (s, 12H, OCH₂CH₂), 4.51 (t, *J*=6.8 Hz, 2H, CH₂OCO), 4.78 (t, *J*=7.6 Hz, 2H, NCH₂CH₂OCO), 7.35 (d, *J*=9.2 Hz, 2H, Ar-H), 7.41~7.77 (m, 3H, imidazole-H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 172.8, 155.1, 154.8, 154.4, 136.0, 131.0, 130.2, 129.5, 127.9, 122.7, 120.3, 76.6, 76.3, 76.0, 69.5, 69.4, 69.3, 68.1, 67.9, 62.2, 56.9, 54.9, 52.6, 52.0, 48.8, 28.7, 28.6, 28.4, 28.3, 28.1, 27.7, 27.5, 27.0, 23.9, 21.7, 13.1.

7c: 产率 57%. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 0.90 (t, *J*=6.8 Hz, 3H, CH₃), 1.22~1.26 (m, 18H, CH₂), 1.45~1.48 (m, 27H, (N-Boc)₃), 2.02~2.27 (m, 6H, CH₂), 2.30 (t, *J*=6.8 Hz, 2H, CH₂COOCH₂), 2.62~2.64 (m, 4H, cyclen-H), 3.06~3.10 (m, 4H, OCH₂CH₂), 3.35~3.56 (m, 12H, cyclen-H), 4.34 (t, *J*=6.7 Hz, 2H, CH₂OCO), 4.71 (s, 2H, ArCH₂-Cyclen), 5.59 (t, *J*=7.6 Hz, 2H, ArCH₂N(CH)(CH)), 7.14~7.22 (m, 4H, Ar-H), 7.34 (s, 1H, imidazole-H), 10.80 (s, 1H, imidazole-H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 173.8, 137.8, 131.5, 131.3, 129.0, 121.6, 121.4, 77.3, 77.0, 76.7, 63.4, 58.4, 56.3, 53.3, 50.0, 47.9, 47.5, 34.3, 31.9, 29.8, 29.6, 29.5, 29.3, 29.2, 28.7, 28.5, 28.0, 25.0, 22.8, 22.7, 18.4, 14.1.

7d: 产率 44%. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 0.87 (t, *J*=6.8 Hz, 3H, CH₃), 1.26~1.28 (m, 30H, CH₂), 1.33 (m, 27H, (N-Boc)₃), 1.58~1.62 (m, 2H, COOCH₂CH₂), 2.33 (t, *J*=6.8 Hz, 2H, COOCH₂CH₂), 2.62~2.68 (m, 4H, cyclen-H), 3.30~3.49 (m, 12H, cyclen-H), 3.54~3.60 (m, 4H, OCH₂CH₂), 3.74 (s, 2H, ArCH₂-Cyclen), 4.05 (t, *J*=7.6 Hz, 2H, CH₂OCO), 4.30 (t, *J*=7.6 Hz, 2H, NCH₂CH₂OCO), 7.18~7.30 (m, 4H, Ar-H), 7.42~10.79 (m, 3H, imidazole-H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 173.0, 136.1, 130.1, 129.5, 128.9, 128.0, 120.9, 78.5, 76.4, 76.2, 75.9, 63.3, 57.1, 52.0, 49.2, 33.4, 30.9, 29.3, 28.6, 28.4, 28.3, 28.2, 28.1, 28.0, 27.7, 27.6, 27.5, 25.3, 24.9, 24.0, 21.7, 13.1.

4.2.7 目标化合物 **8** 的合成

将 2.5 mmol 前体化合物 **7** 溶解在 10 mL 无水二氯甲烷溶液中, 在冰水浴冷却条件下 5 mL 三氟醋酸溶解于 5 mL 无水二氯甲烷的溶液, 滴加完毕后, 撤去冰水浴室温下反应 12 h, 旋蒸除去二氯甲烷后干燥得到浅黄色液体产物.

8a: 产率 86%. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ:

0.85 (t, $J=6.8$ Hz, 3H, CH₃), 1.23~1.49 (m, 16H, CH₂), 1.35~1.41 (m, 2H, COOCH₂CH₂), 2.25 (t, $J=6.8$ Hz, 2H, OCOCH₂CH₂), 2.48~2.52 (m, 4H, PhN(CH₂)₂), 2.78~2.82 (m, 4H, N(CH₂CH₂)₂), 2.99~3.18 (m, 8H, N(CH₂CH₂)₂), 3.62 (s, 2H, ArCH₂N), 3.62~3.74 (m, 4H, OCH₂CH₂), 4.10 (t, $J=7.6$ Hz, 2H, CH₂OCO), 4.38 (t, $J=7.6$ Hz, 2H, NCH₂CH₂O), 5.44 (s, 2H, ArCH₂N(CH)(CH)), 7.30~7.36 (m, 4H, CH₂ArCH₂), 7.77 (s, 1H, imidazole-H), 9.36 (s, 1H, imidazole-H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 173.0, 131.1, 128.8, 123.7, 122.7, 68.6, 68.4, 63.3, 49.3, 47.4, 44.9, 42.5, 40.6, 40.4, 40.2, 40.0, 39.7, 39.5, 39.3, 33.8, 31.7, 29.4, 29.2, 29.3, 28.9, 24.9, 22.6, 14.4. HRMS C₄₈H₇₃N₆O₄ calcd 613.4805; found 613.4760.

8b: 产率 77%. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400MHz) δ : 0.85 (t, $J=6.8$ Hz, 3H, CH₃), 1.23~1.49 (m, 16H, CH₂), 1.36~1.40 (m, 2H, COOCH₂CH₂), 2.25 (t, $J=6.8$ Hz, 2H, OCOCH₂CH₂), 2.48~2.52 (m, 4H, PhN(CH₂)₂), 2.78~2.82 (m, 4H, N(CH₂CH₂)₂), 2.99~3.18 (m, 8H, N(CH₂CH₂)₂), 3.62 (s, 2H, ArCH₂N(CH₂CH₂)₂), 3.74~3.80 (m, 4H, OCH₂CH₂), 4.10 (t, $J=7.6$ Hz, 2H, CH₂OCO), 4.38 (t, $J=7.6$ Hz, 2H, NCH₂CH₂O), 5.44 (s, 2H, ArCH₂N(CH)(CH)), 7.30~7.36 (m, 4H, CH₂ArCH₂), 7.77 (s, 1H, imidazole-H), 9.36 (s, 1H, imidazole-H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 173.0, 136.4, 135.6, 133.9, 130.6, 129.7, 128.3, 123.2, 122.2, 69.6, 69.5, 69.4, 68.2, 68.0, 63.0, 55.0, 51.2, 48.9, 46.9, 44.6, 41.9, 39.9, 39.7, 39.4, 39.2, 39.0, 38.8, 38.6, 33.3, 31.2, 28.9, 28.8, 28.6, 28.3, 24.4, 22.0, 13.9. HRMS C₃₉H₆₉N₆O₅ calcd 701.5329; found 701.5247.

8c: 产率 82%. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ : 0.85 (t, $J=6.8$ Hz, 3H, CH₃), 1.05~1.28 (m, 16H, (CH₂)₈CH₃), 1.47~1.82 (m, 6H, CH₂), 2.25 (t, $J=6.8$ Hz, 2H, OCOCH₂CH₂), 2.66~2.73 (m, 4H, PhN(CH₂)₂), 2.81~2.84 (m, 4H, N(CH₂CH₂)₂), 3.04~3.12 (m, 8H, N(CH₂CH₂)₂), 3.74 (s, 2H, ArCH₂N(CH₂CH₂)₂), 3.99 (t, $J=7.6$ Hz, 2H, CH₂OCO), 4.18 (t, $J=7.9$ Hz, 2H, NCH₂CH₂), 5.42 (s, 2H, ArCH₂N(CH)(CH)), 7.39~7.40 (m, 4H, CH₂ArCH₂), 7.81 (s, 1H, imidazole-H), 9.34 (s, 1H, imidazole-H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 172.9, 136.1, 135.8, 133.9, 130.6, 128.3, 122.8, 122.5, 118.6, 115.5, 63.3, 56.0, 54.9, 51.6, 48.7, 47.0, 44.6, 42.0, 41.9, 40.0, 39.8, 39.6, 39.4, 39.2, 39.0, 38.8, 33.4, 31.2, 28.9, 28.8, 28.7, 28.6, 28.4, 27.4, 24.4, 22.1, 13.9. HRMS (C₃₆H₆₃N₆O₂): calcd 611.5007; found 611.4948.

8d: 产率 80%. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400MHz) δ : 0.84 (t, $J=6.8$ Hz, 3H, CH₃), 1.19~1.23 (m, 30H, CH₂), 1.51~1.78 (m, 6H, CH₂), 2.25 (t, $J=6.8$ Hz, 2H, OCOCH₂CH₂), 2.70~2.71 (m, 4H, PhN(CH₂)₂), 2.86~2.88 (m, 4H, N(CH₂CH₂)₂), 3.09~3.13 (m, 8H,

N(CH₂CH₂)₂), 3.71 (s, 2H, ArCH₂N(CH₂CH₂)₂), 4.10 (t, $J=7.6$ Hz, 2H, CH₂OCO), 4.17 (t, $J=7.9$ Hz, 2H, NCH₂CH₂), 5.42 (s, 2H, ArCH₂N(CH)(CH)), 7.37~7.42 (m, 4H, CH₂ArCH₂), 7.80 (s, 1H, imidazole-H), 9.35 (s, 1H, imidazole-H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 173.0, 136.1, 135.8, 133.9, 130.6, 128.3, 122.8, 122.5, 118.6, 115.7, 63.6, 56.0, 54.9, 51.6, 48.9, 47.0, 44.6, 42.0, 40.0, 39.8, 39.6, 39.4, 39.2, 39.0, 38.8, 33.5, 31.2, 29.3, 28.9, 28.9, 28.8, 28.7, 28.6, 28.3, 28.1, 24.5, 22.1, 13.9. HRMS C₄₂H₇₅N₆O₂ calcd 695.5962; found 695.5897.

4.3 阳离子脂质体的制备

在室温下, 在一个灭菌的 25 mL 圆底烧瓶中, 将 0.0025 mmol 阳离子脂质 **8** 与不同摩尔比例的 DOPE 混合、溶解于无水氯仿中, 完全溶解后, 用旋转蒸发仪 (转速为 60 r/min) 室温下缓慢蒸除氯仿得到脂质体膜, 该脂质体膜经真空干燥 (真空度 0.095 MPa, 时间 12 h, 温度 25 °C) 去除残留氯仿得到干燥脂质体膜, 将干燥脂质体膜和要使用的 Tris-HCl 缓冲溶液 (pH 值 7.4, 浓度 10 mmol/L) 升温至 70 °C, 然后将 2.5 mL Tris-HCl 缓冲溶液加入到脂质膜反应瓶, 摇动或涡旋振荡是反应瓶上的脂质体膜脱落并溶解, 再在 60 °C 水浴中超声 20 min 就得到 1 mmol/L 的脂质体溶液, 将此脂质体溶液放置于 4 °C 冰箱内保存备用.

4.4 阳离子脂质体/DNA 复合物的制备

将不同量的阳离子脂质体溶液 (1 mmol/L) 与固定量 (电泳时 5 μ g, 转染时 2 μ g) 的 DNA (电泳时用 pGL-3, 转染时用 pEGFP-N1) 混合, 室温下放置 30 min 就得到不同氮磷比 (N/P) 的阳离子脂质体/DNA 复合物. 这里的氮磷比是指阳离子脂质上的氮原子的摩尔量与 DNA 上的磷原子的摩尔量之比, DNA 的平均分子量为 350.

4.5 凝胶电泳实验

按照不同的氮磷比, 取适当体积的上述脂质体溶液 (1 mmol/L), 用 0.36 mmol/L 的葡萄糖溶液稀释至 50 μ L, 将此溶液滴加到含 5 μ g pEGFP-N1 DNA 的 Tris-HCl (40 mmol/L, pH=7.4) 缓冲液中, 混匀后于室温孵化 30 min 得到不同氮磷比 (0, 2, 4, 6, 8, 10) 的脂质体/DNA 复合物. 将得到的脂质体/DNA 复合物用 0.8% (质量分数) 的琼脂糖凝胶于 110 V 下电泳 30 min, EB 染色, 采用 Olymnia 公司的 GDS 凝胶成像系统观测电泳结果.

4.6 荧光溴乙锭置换实验

阳离子脂质体对结合了 DNA 的溴乙锭的荧光减弱用 Fluoromax-4 型荧光分光光度计测定 (激发波长为 497 nm, 激发波长和发射波长的狭缝都为 3 nm). 首先测定 5 μ mol/L 溴乙锭缓冲溶液 (10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4) 在发射波长 605 nm 处的荧光强度 (F_0), 然后在该溶液中加入 CT-DNA 溶液保证 CT-DNA 在该溶液中的浓度为大约 11 μ mol/L, 搅拌两分钟使溴乙锭完全插入

CT-DNA 形成复合物后, 再次测定该溶液在 605 nm 处的荧光强度($F_{\max}$). 接着逐次向该溶液中加入阳离子脂质体溶液, 使每次加入的脂质体浓度为 0.68 $\mu\text{mol/L}$, 每次加完后搅拌两分钟后都测定记录该混合溶液在 605 nm 处的荧光强度(F_x). 荧光减弱百分比按 $F\% = (F_x - F_0)/(F_{\max} - F_0) \times 100$ 计算.

4.7 粒径和电位的测定

阳离子脂质体和不同氮磷比的阳离子脂质体/DNA 复合物的粒径和电位同样用马氏粒径仪(Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments Ltd)测定. 首先按照不同的 N/P 量取所需阳离子脂质体与 DNA 的体积, 再用 0.1 mol/L 的 PBS 溶液稀释至 1 mL, 然后在室温 25 $^{\circ}\text{C}$ 下测定记录它们的粒径和电位.

4.8 细胞培养

A549 细胞(人肺癌细胞), 在含有 10% 的小牛血清和 1% 的抗生素(青霉素-链霉素, 10000 U/mL)的 RPMI 1640 培养基中培养. 培养时所有细胞都放在 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% 的二氧化碳条件下培养.

4.9 体外转染实验

在进行转染前 24 h, 在 24 孔板上种植细胞, 保证在转染时细胞长到 80%~90% 的细胞密度. 对于转染时复合物的制备, 首先将不同量的脂质体和 DNA 分别用无血清和无抗体的 RPMI1640 或 DMEM 培养基稀释控制总体积为 200 μL , 然后将 DNA 溶液缓慢滴加到脂质体溶液中, 室温下放置 30 min 后即得到用于转染的阳离子脂质体/DNA 复合物.

将细胞培养液中的培养基小心吸掉, 用无血清的 RPMI1640 或 DMEM 洗一次后, 将上述制备好放置了 30 min 的复合物加入相应的细胞孔中, 在 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% 的二氧化碳氛围下培养 4 h 后, 吸掉培养基并加入 500 μL 含有 10% 血清的 RPMI1640 或 DMEM 培养基. 继续在 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% 的二氧化碳氛围下培养 24 h 后进行下一步的基因表达情况测定.

对于荧光蛋白表达实验, 转染时使用 pEGFP-N1 做报告基因, 按上述方法转染 24 h 后在倒置荧光显微镜下观察荧光表达情况并拍照.

致谢

感谢四川大学分析测试中心在样品测试方面给予的帮助.

References

- [1] Zhang, X.-Q. *Nature* **2003**, *25*, 153.
- [2] Mintzer, M. A.; Simanek, E. E. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 259.
- [3] Pennisi, E. *Science* **1998**, *280*, 814.
- [4] Miller, A. D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 1768.
- [5] Verma, I. M.; Somia, N. *Nature* **1997**, *389*, 239.
- [6] Sheng, R.; Luo, T.; Zhu, Y.; Li, H.; Sun, J.; Chen, S.; Sun, W.; Cao, A. *Biomaterials* **2011**, *32*, 3507.
- [7] Mikhail, A. M.; Tatyana, O. K.; Ivan, A. P.; Nina, G. M.; Galina, A. S.; Valentine, V. V.; Marina, A. Z. *J. Controlled Release* **2012**, *160*, 182.
- [8] Shrinivas, V.; Yang, Y. Y. *Biomaterials* **2011**, *32*, 2369.
- [9] Dai, J.; Zou, S.; Pei, Y.; Cheng, D.; Ai, H.; Shuai, X. *Biomaterials* **2011**, *32*, 1694.
- [10] Felgner, P. L.; Gadek, T. R.; Holm, M.; Roman, R.; Chan, H. W.; Wenz, M.; Northrop, J. P.; Ringold, G. M.; Danielsen, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1987**, *84*, 7413.
- [11] Xiang, Y.-Z.; Liao, Y.-L.; Zhang, J.; Zhang, D.-W.; Chen, S.-H.; Lu, Q.-S.; Zhang, Y.; Lin, H.-H.; Yu, X.-Q. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 3458.
- [12] Li, S.; Wang, Y.; Zhang, J.; Yang, W.-H.; Dai, Z.-H.; Zhu, W.; Yu, X.-Q. *Mol. Biosyst.* **2011**, *7*, 1254.
- [13] Yi, W.-J.; Feng, Z.-H.; Zhang, Q.-F.; Zhang, J.; Li, L.-D.; Zhu, W.; Yu, X.-Q. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 2413.
- [14] Huang, Q.-D.; Ren, J.; Ou, W.-J.; Fu, Y.; Cai, M.-Q.; Zhang, J.; Zhu, W.; Yu, X.-Q. *Chem. Biol. Drug Des.* **2012**, *79*, 879.
- [15] Huang, Q.-D.; Zhong, G.-X.; Zhang, Y.; Ren, J.; Fu, Y.; Zhang, J.; Zhu, W.; Yu, X.-Q. *PLoS One* **2011**, *6*, e23134.
- [16] Huang, Q.-D.; Ou, W.-J.; Chen, H.; Feng, Z.-H.; Wang, J.-Y.; Zhang, J.; Zhu, W.; Yu, X.-Q. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2011**, *78*, 326.
- [17] Savva, M.; Chen, P.; Aljaberi, A.; Selvi, B.; Spelios, M. *Bioconjugate Chem.* **2005**, *16*, 1411.
- [18] Koiwai, K.; Tokuhisa, K.; Karinaga, R.; Kudo, Y.; Kusuki, S.; Takeda, Y.; Sakurai, K. *Bioconjugate Chem.* **2005**, *16*, 1349.
- [19] Huang, Q.-D. *Ph.D. Dissertation*, Sichuan University, Chengdu, **2011**. (黄清东, 博士论文, 四川大学, 成都, **2011**.)

(Zhao, X.)