

文章编号:1001-6880(2016)6-0978-08

白桦脂酸制备方法和药理活性研究进展

周亚敏,林丽美,夏伯候*

湖南中医药大学湖南省中药不良成分快速检测及脱除工程技术研究中心

中药有毒物质防控技术湖南省工程实验室,长沙 410208

摘要:天然产物已被用来防治人类疾病数千年,并在药物发现和发展中发挥越来越大的作用。白桦脂酸(betulinic acid, BA)又称白桦酸、桦木酸,是一种五环三萜酸,存在于多种植物中。近年来的研究表明,BA 具有多种多样的生物活性,如抗肿瘤、抗病毒、抗炎、抗菌、抗疟疾等,尤其是在抗肿瘤和抗 HIV 方面,特别是针对黑色素肿瘤细胞具有专一的杀死作用,因此得到了广泛关注。更重要的是 BA 衍生物抗 HIV II 期临床实验已经取得成功,所以 BA 目前被认为是最具潜力的药物先导化合物之一。因此,本综述从 BA 的制备合成以及药理活性等方面对近年来的相关研究进行概括总结,以期为 BA 的研究和开发利用提供参考。

关键词:白桦脂酸;抗肿瘤;制备;药理活性**中图分类号:**R737.33**文献标识码:**A**DOI:**10.16333/j.1001-6880.2016.6.027

Review on Preparation Technology and Pharmacological Activity of Betulinic Acid

ZHOU Ya-min, LIN Li-mei, XIA Bo-hou *

Hunan University of Chinese Medicine, School of Pharmacy; Hunan Engineering Center for Rapid Test and Removal of Toxic and Harmful Substances in Chinese Medicine; Hunan Engineering Laboratory for Prevention and Control Technology of Toxic Substances in Chinese Medicine, Changsha 410208, China

Abstract: Natural products have been used to combat human diseases for thousands of years and play an increasing role in drug discovery and development. Betulinic acid (BA) is a naturally pentacyclic triterpenoid which has demonstrated selective cytotoxicity against a number of specific tumor types, particularly melanoma tumor, and a variety of infectious agents such as HIV, bacteria and malaria. Many studies established a favorable safety margin for betulinic acid, as systemic side effects were not observed at any dose. More importantly, BA successfully passed anti-HIV phase II clinical trial recently, hence BA has been considered as one of the most promising drug lead compounds. This paper reviewed the research progress about the preparation technologies and pharmacological activities of BA in recent years, in order to provide reference for the research and development of BA.

Key words: betulinic acid; anticancer; preparation; pharmacological activity

白桦脂酸(分子结构见图 1)是一种五环三萜类化合物,在自然界中广泛存在,最早分离于生长在非洲东部的鼠李科常绿植物(*Ziziphus mauritiana* Lam.)的树皮^[1],但主要来源是从白桦树皮中提取纯化。近年科学发现,BA 是非常有价值的天然产物。BA 及其衍生物作为生物制剂在抗癌和 HIV

治疗等方面表现出了巨大的潜能,在机体的抗氧化损伤和免疫调节过程中发挥着重要作用,是一类很有潜力的药物先导化合物,对于新药的研发具有重要价值^[2-4],美国癌症研究所 NCI 已将其列入快速研发规划项目(RAID)。但该化合物在白桦树皮中

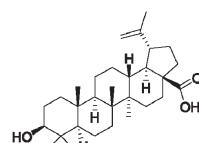


图 1 白桦脂酸的化学结构

Fig. 1 Chemical structure of BA

收稿日期:2015-12-25 接受日期:2016-03-07

基金项目:科技部“重大新药创制”(2013ZX09201019);教育部高等学校博士学科点专项科研基金(20124323120004);湖南省自然科学基金(13JJ4089);长沙市重点科技计划(k1406039-31);湖湘青年创新创业平台人才项目(2013);湖南省十二五重点学科药学学科资助

* 通讯作者 Tel:86-731-88458230; E-mail: xiabohou@163.com

的含量很低,大约只含有0.025%,长期采伐已导致白桦树资源的严重短缺,更是严重影响着BA的开发利用。因此研究BA的合成制备与药理活性对于我国资源的合理开发利用、天然药物的研究都具有非常重要的意义。

1 白桦脂酸的制备方法

1.1 天然提取法

BA不仅存在于白桦树皮中,也存在于蒲桃树、酸枣仁、悬铃木、大枣等多种植物中。天然提取法即不经过化学合成的过程,采用不同的溶剂将BA从不同的植物中提取出来。Liu等优化选择绿色环保高产的亚临界水萃取(SWE)提取方法,得到了产率

为2.803 mg/g的BA^[5]。天然提取法虽然方法简单,但是BA在植物中的含量很少,因此对原料的消耗极大,杂质较多,产率低下。直接从植物中提取BA还没有潜在的工业化价值,往往只是作为提取桦木醇的一种副产物。

1.2 一步合成法

一步合成法是将桦木醇的提取和BA的制备同步进行,采用二氯甲烷、氯仿、丙酮、四氢呋喃、DMF等有机溶剂浸提植物,提取含量较高的桦木醇,同时将硝酸锌、硝酸铬等氧化剂附着在硅胶、氧化铝、胶岭石等固相载体上,将提取的桦木醇氧化,得到BA。这种方法由于提取到的桦木醇没有进行分离纯化就直接进行氧化,得到的产物成分复杂,杂质多,因此

表1 BA 体外抗癌作用

Table 1 The *in vitro* anticancer effect of BA

抗肿瘤作用 Anticancer effect	作用机制 Mechanism	细胞系 Cell	参考文献 Reference
黑素瘤 Melanoma	抑制内在NGAL产生,进而抑制上皮细胞间质转型(EMT)	MEL-1; -2; -3; -4	12
胰腺癌 Pancreatic cancer	显著下调核纤层蛋白B1,减少胰腺癌细胞生长、迁移和侵袭	AsPC-1; CaPan-1; 2	13
	抑制Sp1和VEGF转录及SP1和VEGF蛋白表达的下调	BxPC-3; PANC-1	14
宫颈癌 Cervical cancer	bcl-2基因下调而bax基因上调;引发内质网途径和ROS介导的线粒体途径	HeLa	15
结肠癌 Colon cancer	下调Sp1, Sp3和Sp4转录因子	RKO; SW480	16
肝癌 Liver cancer	增加P53, p66shc和miR-21,抑制Sod2表达	SMMC-7721; Huh-7	2
乳腺癌 Breast cancer	抑制雌激素受体(ER)转录合成及介导信号	MCF7	17
	抑制雌激素受体(ER)转录合成及介导信号	MDA-MB-453; BT474	18
	抑制细胞生长,下调Sp转录因子Sp1、Sp3、Sp4及ErbB2的表达	MCF-7; T47D	19
	增加ZBTB10表达,下调Sp1, Sp3, Sp4,诱导细胞周期阻滞在G2/M期,增加Myt-1 mRNA, cdc2磷酸化	MDA-MB-231; 435; 468; 453; BT474; HS-578T	20
前列腺癌 Prostatic cancer	抑制STAT3和HIF-1α介导抗血管生成	DU145	21
多发性骨髓瘤 Genepal lymphadenomatosis of bones	降低自噬通量和激活caspase-3,诱导细胞凋亡	KM3	22
白血病 LeucocytHEMA	上调Bax和caspase-3蛋白的表达	K-562	23
恶性胶质瘤 Spongiocytoma	减少细胞迁移、PARP裂解和降低生存素表达水平,减少HIF-1a蛋白	U251MG; U343MG	24
鼻咽癌 Nasopharyngeal cancer	诱导Bax和Bak因子,半胱天冬酶激活、释放细胞色素c	CNE2	25
肺癌 Lung cancer	抑制Sp1,下调周期蛋白A2,诱导细胞凋亡阻滞在G2/M期	A549; H1299	26

实际应用价值不大^[6]。

1.3 半合成法

半合成法是从植物中先提取出桦木醇,然后由桦木醇经过一系列化学反应制得 BA。桦木醇在植物中的含量相对较高,目前其获得途径主要通过直接提取,且提取成本相对较低,因此以其为原料合成 BA 能降低成本,具有良好的工业化前景。Melnikova N 等通过以氧化铝为载体在水丙酮(15~25℃)溶液中 Cr(VI)化合物的催化,桦木醇能够选择性的氧化为 BA^[7],不仅得到了 93%~98% 的收益率,也通过氧化铝吸附去除了毒性的反应混合物,提供了一个简单和友好环境的反应。

1.4 微生物转化法

微生物转化法是利用生物在代谢过程中产生的酶对底物催化反应得到目标产物。与化学合成方法相比,微生物转化具有高立体选择性、反应条件温和、污染小、费用低,这种方法具有工业化的潜力。Feng 等通过培养 *Armillaria luteovirens* ZJUQH100-6、*Cunninghamella blakesleean* 细胞催化桦木醇直接微生物转化产生 BA^[8]。另外,有研究首次利用 *Ocimum* 物种愈伤组织诱导生产 BA 的生物技术,提高了 BA 的产率^[9],该研究为 BA 以及其他抗癌三萜烯等的制备提供了新的方法。近来,有研究报道将植物中 BA 的整个代谢通路代入酵母细胞,成功地利用微生物合成了 BA。研究发现脂肪酸和萜类前

体合成途径的代谢流平衡对 BA 合成影响显著,并通过协同表达这两个代谢通路中的关键调控基因(HFA1、HMG1 和 ERG9)显著提高 BA 产量,该工程菌每升培养基能合成毫克级的 BA^[10],由此,BA 的制备合成上升到了一个新的高度。

2 白桦脂酸的药理活性

2.1 抗肿瘤活性

最早的研究报道是 BA 对黑色素瘤细胞具有极强的选择性细胞毒性^[1],IC₅₀ 值为 0.5~4.8 mg/mL,更重要的是,这项研究也显示 BA 的体内疗效,对裸鼠皮下注射黑色素瘤细胞株 MEL-2,腹腔注射 50、250 或 500 mg/kg BA 产生高效的肿瘤生长抑制,宿主细胞没有任何毒性的迹象^[1]。Leopoldo C 等对 BA 对肿瘤细胞的选择性进行了研究,发现其对肿瘤细胞的选择性毒性很高,约是正常细胞的 5~7 倍^[11]。近年来发现 BA 对其它肿瘤细胞也有较为广谱的活性作用,如对胶质母细胞瘤,神经母细胞瘤,成神经管细胞瘤,尤因肿瘤以及其他恶性肿瘤,结肠癌、乳腺癌、肺癌、肝癌、前列腺癌、肾细胞、卵巢或子宫颈癌和白血病等均有较强的抑制作用,列表如下(表 1)。

除了其在各种癌症细胞系强大的抗肿瘤活性,也有研究表明 BA 能抑制动物体内肿瘤生长(表 2)。

表 2 BA 体内抗癌作用

Table 2 The *in vivo* anticancer effect of BA

抗肿瘤作用 Anticancer effect	动物模型 Animal model	作用机制 Mechanism	参考文献 Reference
黑素瘤 Melanoma	C57BL/6J f 雌性老鼠,腹腔注射	改善肝脏线粒体的呼吸功能	27
宫颈癌 Cervical cancer	荷瘤裸鼠,灌胃	抑制 Bcl-2、ki-67 蛋白表达,调节 caspase-8 蛋白的表达	28
大肠癌 Colon cancer	雄性无胸腺 BALB/c 裸鼠,灌胃	抑制 VEGF 的表达	29
乳腺癌 Breast cancer	雌性无胸腺 BALB/c 裸小鼠,灌胃	增加 ZBTB10 表达,下调 Sp1,Sp3,Sp4,诱导细胞周期阻滞在 G2 / M 期,增加 Myt-1 mRNA,cdc2 磷酸化	19
	雌性无胸腺 BALB/c 裸小鼠,灌胃	与 MicroRNA-27a-ZBTB10 表达有关,减慢 ER(-) 乳腺癌细胞生长,抑制血管新生	30
前列腺癌 Prostatic cancer	雄性无胸腺 BALB/c 裸鼠,灌胃	抑制特异性蛋白质转录因子	31
肝癌 Liver cancer	C57 小鼠,注射	增加线粒体 ROS 生成和线粒体功能障碍,激活细胞凋亡	2

BA 还具有与抗肿瘤药物合用协同诱导细胞凋亡、抑制幸存肿瘤细胞群落的作用,各种化疗药物包

括依托泊苷、顺铂、紫杉醇、阿霉素和放线菌素 D 等^[32]。当 BA 与长春新碱联合用药时,抑制黑素瘤

细胞的生长与转移;此外,BA 配合抗癌药物阿霉素和依托泊苷在 SHEP 神经母细胞瘤细胞诱导细胞凋亡和抑制其单独生存^[32];BA 之类的三萜化合物与 5-氟尿嘧啶联合治疗体外卵巢癌,细胞生长抑制率显著增加^[33]。另外, α -Mangostin 与 BA 合用增强 BA 作用于直肠癌 HCT 116 的细胞毒性,减少肿瘤体积和抑制血管生成,防止复发,并且抑制顺铂副作用^[34]。体外实验结果显示,BA 与加载其药物的纳米复合材料 CS-MNP 合用,对乳腺癌 MCF-7 细胞表现出强大的的细胞毒性,其 ID₅₀ 为 3.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ^[35]。同时,Liu 等以 BA 为先导物,将 BA 的-28 位-COOH 通过不同的连接基团与硝酸酯或呋咱氮氧化物等 NO 供体偶联,合成了 13 个新型目标化合物,结果表明,多数呋咱氮氧化物类 BA 衍生物对肝癌和 HepG2 细胞及鼠黑色素瘤 B16 细胞具有较强的抑制作用,活性值得进一步深入研究^[36]。Hung 等设计合成 10 个 3,4-开环 BA 衍生物,在体外 EBV-EA 试验表明,其中 9 个衍生物显著增强了肿瘤化学预防能力^[37]。Cui 等合成了一系列杂环修饰的 BA 衍生物,其中具有氮杂环的 17 化合物对 MCF-7/ADR 细胞株具有较强抑制作用,其 IC₅₀ 为 3.6 μM ^[38]。另外,肼、羟胺、硫脲等杂环类 BA 衍生物都表现出对血液系统恶性肿瘤明显的选择性细胞毒性^[39]。

总体上,这些研究发现,BA 及其衍生物在细胞系具有广泛的抗肿瘤活性,且具有很好的选择性,能否由细胞系中的研究结果推断出在动物模型以及临幊上也具有同样防癌效果的结论还不清楚。因此 BA 的联合治疗及其衍生物的改进是未来研究的主要方向。

2.2 抗病毒活性

2.2.1 抗 HIV 活性

BA 最突出的生物活性之一就是具有抗病毒活性,尤其是具有抗艾滋病毒(HIV)活性。由于 HIV 耐药株出现以及长期药物治疗所带来的副作用,使得治疗 AIDS 更加困难。目前,从天然产物中寻找和发现活性成分,并将其作为先导物,进行结构修饰改造,是新型抗 HIV 药物研究与开发的重要策略。

对 BA 进行衍生化研究优化抗艾滋病活性,第一个被报道表现出极大抗艾滋病活性的 BA 衍生品为 RPR103611^[40],被认为是融合抑制剂的第一个低分子量化合物,该化合物在对抗 HIV-1 的体外实验中发现 IC₅₀ 值介于 40 至 100 nmol/L 之间,能防止 HIV-1 感染的细胞和未感染的 CD4 细胞之间合胞体

形成,通过抑制依赖外壳粘合的病毒感染达到抗 HIV-1 作用。BA 衍生物 PA-457,Bevirimat(BVM),它是抑制成熟的 HIV 病毒首创药物,作用于病毒复制的后期,通过阻断 Gag 蛋白加工,从而阻止衣壳的释放,使病毒存在缺陷,难以扩散,并且该药物已取得Ⅱ期临床试验成功^[41]。由于 HIV-1 变异和药物结合位点多态性下容易耐药,为了克服 PA-457 在临床治疗中的耐药性,Dang 等对 PA-457 的 C-28 位修饰改造,设计合成了一系列 PA-457 的衍生物,在 MT-4 细胞中进行的活性测试显示,其中化合物编号 67 对 PA-457 耐药的 NL4-3 病毒株具有明显的抑制活性(IC₅₀ = 0.01 $\mu\text{mol}/\text{L}$)^[42]。

目前公认的抗艾滋病的作用机制是抑制 HIV-1 逆转录酶或抑制蛋白酶的活性,由于 BA 衍生物的结构与已知抗逆转录药物的结构完全没有联系,其作用机理也不同于临床现有的酶抑制剂。基于多位点修饰改造及构效关系研究,发现大量 BA 高活性衍生品比一些当前临床抗艾滋病药物表现出更好的治疗指数,更强大的抗 HIV 作用,可认为它是一类很有前途的抗 HIV-1 候选化合物,但其作用机制尚未完全确定^[42-45]。

2.2.2 其他抗病毒作用

除了抗 HIV,近来发现 BA 也有其他抗病毒作用。研究表明 BA 通过抑制 COX-2 介导的 NF- κ B 和 ERK1/2 通路抑制丙肝病毒复制,可作为一种治疗 HCV 感染患者潜在的药物开发先导化合物^[46]。据相关研究表明 BA 也有抗单纯疱疹病毒-1(HSV-1)^[47]、抗艾柯病毒(ECHO-6)^[48]、抗流感病毒(A/PR/8)的作用^[49]。BA 被修改成离子衍生物来改善其水溶性和生物活性,对 HSV-2 有重大抑制作用^[50]。

2.3 抗氧化应激活性

BA 对正常细胞和机体具有保护作用,该作用与抗氧化应激有一定的关系。BA 通过抗氧化应激、抗氮化应激和增加血流量,对小鼠缺血再灌注脑损伤具有保护作用^[51]。而对甲醇致肝星状细胞损伤是通过抗氧化损伤、抑制细胞因子的分泌等发挥保护作用^[52]。此外,BA 激活 eNOS-NO 通路和保持心血管系统 NO 的生物利用度,可降低一氧化氮合酶抑制剂诱导的高血压大鼠血压和改善 ACh 诱导的内皮血管舒张^[53,54]。BA 清除超氧化物和一氧化氮自由基,增加抗氧化性从而减少 CLP 小鼠氧化应激,因此 BA 是治疗脓毒症肺损伤、肾损伤的有效手

段之一^[55,56]。体内实验表明,建立 LPS 诱导的急性肺损伤雄性大鼠模型,给药 BA(25 mg/kg·d)6 周,NO_x 的产生和脂质过氧化明显降低,GSH 和 SOD 的释放增加,TNF-α、TGF-β1,iNOS 的表达下调^[57]。试验表明,BA 对地塞米松诱导的淋巴细胞凋亡具有干预作用,能够减轻氧化应激,对氧化损伤修复免疫系统发挥重要作用的,这与 BA 抑制氧化酶活性、自由基和脂质过氧化物产生,降低 Bcl-2,抑制 caspase-9、caspase-3 活化,提高抗氧化能力有关^[58],但保护作用机制还有待于深入研究与探讨。

2.4 抗炎活性

BA 及衍生物为五环三萜类化合物,具有较好的、稳定的抗炎作用。化合物 BA 的抗炎性已在大量的体外和体内模型体系中得到验证。Viji 等建立了 LPS 刺激的 hPBMCs 细胞模型,结果表明 BA 抑制 COX-2 蛋白表达和 PGE2 产生,减轻炎症反应,其机制可能为抑制 ERK 和 Akt 磷酸化;体内实验表明,BA 有效抑制 PGE2 产生和髓过氧化物酶 MPO 的活性,延长内毒素休克小鼠的寿命^[59]。BA 作用于 LPS 处理的 THP-1 巨噬细胞,通过抑制 NF-κB 信号通路和 miR-33 表达,调节 ABCA1 表达促进巨噬细胞中胆固醇流出,降低炎症水平;且体内实验表明,灌胃 BA(50 mg/kg·d)8 周治疗 LPS 处理的 apoE^{-/-} 小鼠,可调节血管炎症,有效减少动脉粥样硬化病变更^[60]。Wang 等以 6、12、24 μM 浓度的 BA 处理人类骨关节炎软骨细胞,12 h 后观察 IL-1β 诱导的炎症反应的影响,结果发现,BA 明显抑制 IL-1β 诱导 NO、PGE2、MMP-1、MMP-3、MMP-13 的产生,其机制可能与激活 PPAR-γ 有关^[61]。BA 抑制小鼠脾细胞分泌细胞因子,同时抑制 IL-2 和 IL-10,表明 BA 通过抑制 T 细胞免疫应答发挥其抗炎作用^[62]。Jose 等建立内毒素休克小鼠模型,注射 BA(67 mg/kg),观察结果表明,LPS 诱导产生的 TNF-α 显著降低,其机制可能取决于 IL-10 的作用^[63]。BA 可影响与炎症相关的多种细胞、因子和信号,具有多途径的抗炎作用,而炎症与肿瘤、心血管疾病等关系密切,因此,通过 BA 抗炎便是一条有效治疗途径。

2.5 其他活性

文献报道,BA 还具有抗焦虑^[64]、抗抑郁作用^[65]。同时,BA 具有良好的免疫调节作用,药物服用最低剂量仅 0.5 mg/kg^[66]。LO 等研究发现 BA 激活 BMP/Smad/Runx2 与 13-catenin 信号通路及上调 OPG/RANKL 比例而促进成骨细胞 MC3T3-E1 的

分化成熟,具有治疗骨质疏松方面疾病的发展潜力^[67],并且能抑制乳腺癌导致的骨转移^[68]。也有研究表明,BA 调节 CAMKK -AMPK -CREB 信号通道、抑制肝糖异生,有效改善高血糖^[69]。近来研究发现,BA 味嗪衍生物在体外抗疟原虫表现出较强的活性,是一种新的有效的抗疟原化合物,干扰疟原虫钙稳态^[70]。BA 还具有调节改善急性酒精性脂肪肝、非酒精脂肪肝疾病^[71]、抗血小板^[72,73]、治疗甲状腺疾病^[74]等作用。

3 结语

目前,对 BA 的制备,一些新型的提取方法也有所尝试,如超声波辅助、超临界萃取等,提取效果较好,但直接提取法生产 BA 的含量极低、提取难度大等原因,很难满足广大市场需求。在多种化学合成方法中,半合成法以桦木醇为原料合成 BA,是目前普遍的工业化方法。在原料方面,我国北方地区分布着大面积的白桦资源,以桦树皮为原料进行深加工与药物合成,有着得天独厚的自然优势,但存在着操作复杂、成本高、污染大等问题。微生物转化法条件温和、安全性高,目前的酵母细胞微生物转化合成 BA 产率高,其研究成果革新了 BA 的合成方式,且避免对植物资源的严重依赖,是目前最有前景的工业化方法。

BA 作为一种非常有利用价值的天然产物,具有显著的抗肿瘤和抗 HIV 活性,特别是抗黑色素瘤,展现出良好的开发前景。BA 发挥抗肿瘤作用是激活肿瘤细胞线粒体途径凋亡,还是直接杀伤肿瘤细胞,还是通过提高机体的抗氧化应激的能力,增强机体的免疫功能达到杀伤肿瘤细胞,其作用机制复杂多样,值得深入研究与探讨。BA 也有望作为增效剂,用于肿瘤化学联合疗法,避免多药耐药性的产生,增强抗肿瘤药的治疗效果。BA 作为新型抗 HIV 药物研究与开发的重要先导化合物之一,目前已在其衍生物抗 HIV 病毒活性取得了Ⅱ期临床试验成功,有望开发成为预防 HIV 的新药。但是许多高活性 BA 衍生物并没有良好的药动学特性,这也往往是一些高活性 BA 衍生物的临床试验被中止以及至今仍未见到有此类药物成功开发上市的重要原因之一。因此,未来的研究需要通过结构修饰,进一步改善其药动学特性,改善其药理方面的吸收和生物利用度,主要对其结构改造主要集中在 C-3、C-28、C-30 等 3 个位点上,以达到一个最佳的临床效果,这

也将成为未来研究的热点。

与传统药物相比,BA 及其衍生物具有活性强、毒性小、抑制性强等优势,是在治疗人类疾病包括病毒感染、癌症和炎症方面的新药潜力候选者,也是作为深入研究许多生物活性的优秀先导化合物及中间体。追求低成本、高环保性的 BA 合成与开发研究也将会具有广阔的发展前景,必将带来良好的社会效益与经济效益。可以相信,随着对 BA 衍生物全面和深入的研究,必将会不断开发出药动学特性良好的高活性的衍生物,并应用于临床,有力推动新型药物的研发。

参考文献

- Pisha E, et al. Discovery of betulinic acid as a selective inhibitor of human melanoma that functions by induction of apoptosis. *Nat Med*, 1995, 10:1046-1051.
- Yang J, et al. p53-p66 shc/miR-21-Sod2 signaling is critical for the inhibitory effect of betulinic acid on hepatocellular carcinoma. *Toxicol Lett*, 2015, 238(3):1-10.
- Lingaraju MC, et al. Betulinic acid attenuates renal oxidative stress and inflammation in experimental model of murine polymicrobial sepsis. *Eur J Pharm Sci*, 2015, 70:12-21.
- Dang Z, et al. New betulinic acid derivatives for bevirimut-resistant human immunodeficiency virus type-1. *J Med Chem*, 2013, 56:2029-2037.
- Liu J, et al. Subcritical water extraction of betulinic acid from birch bark. *Ind Crops Prod*, 2015, 74:557-565.
- Gaudet, et al. Process for preparing natural product derivatives from plants in a single step. US2250481, 1998-11-02.
- Melnikova N, et al. A practical synthesis of betulonic acid using selective oxidation of betulin on aluminium solid support. *Molecules*, 2012, 17:11849-11863.
- Feng Y, et al. A novel one-step microbial transformation of betulin to betulinic acid catalysed by *Cunninghamella blakesleeana*. *Food Chem*, 2013, 136:73-79.
- Pandey H, et al. Production of anti-cancer triterpene (betulinic acid) from callus cultures of different *Ocimum* species and its elicitation. *Protoplasma*, 2015, 252:647-655.
- Li J, et al. Increase of betulinic acid production in *Saccharomyces cerevisiae* by balancing fatty acids and betulinic acid forming pathways. *Appl Microbiol Biot*, 2014, 98:3081-3089.
- Leopold C, et al. Preparation of betulinic acid derivatives by chemical and biotransformation methods and determination of cytotoxicity against selected cancer cell lines. *Eur J Med Chem*, 2013, 68:121-131.
- Gheorgheosu D, et al. Betulinic acid suppresses NGAL-induced epithelial-to-mesenchymal transition in melanoma. *Biol chem*, 2013, 394:773-781.
- Li L, et al. Lamin B1 is a novel therapeutic target of betulinic acid in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res*, 2013, 19:4651-4661.
- Gao Y, et al. Combining betulinic acid and mithramycin effectively suppresses pancreatic cancer by inhibiting proliferation, invasion, and angiogenesis. *Cancer Res*, 2011, 71:5182-5193.
- Tao X, et al. Proteomic investigation into betulinic acid-induced apoptosis of human cervical cancer HeLa cells. *PLoS One*, 2014, 9(8):e105768.
- Chintharlapalli S, et al. Betulinic acid inhibits colon cancer cell and tumor growth and induces proteasome dependent and independent downregulation of specificity proteins (Sp) transcription factors. *BMC Cancer*, 2011, 11:371-379.
- Kim HI, et al. Inhibition of estrogen signaling through depletion of estrogen receptor alpha by ursolic acid and betulinic acid from *Prunella vulgaris* var. *lilacina*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 451:282-287.
- Liu X, et al. Betulinic acid targets YY1 and ErbB2 through cannabinoid receptor-dependent disruption of microRNA-27a:ZBTB10 in breast cancer. *Mol Cancer Ther*, 2012, 11:1421-1431.
- Tiwari R, et al. Betulinic acid-induced cytotoxicity in human breast tumor cell lines MCF-7 and T47D and its modification by tocopherol. *Cancer Invest*, 2014, 32:402-408.
- Mertens-Talcott SU, et al. Betulinic acid decreases ER-negative breast cancer cell growth in vitro and in vivo: role of Sp transcription factors and microRNA-27a:ZBTB10. *Mol Carcinog*, 2013, 52:591-602.
- Shin J, et al. Suppression of STAT3 and HIF-1 alpha mediates anti-angiogenic activity of betulinic acid in hypoxic PC-3 prostate cancer cells. *PLoS One*, 2011, 6(6):e21492.
- Yang L, et al. Betulinic acid inhibits autophagic flux and induces apoptosis in human multiple myeloma cells *in vitro*. *Acta Pharmacol Sin*, 2012, 33:1542-1548.
- Wu Q, et al. Antitumor effect of betulinic acid on human acute leukemia K562 cells *in vitro*. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2010, 30:453-457.
- Bache M, et al. Increased betulinic acid induced cytotoxicity and radiosensitivity in glioma cells under hypoxic conditions. *Radiat Oncol*, 2011, 9:111.
- Liu Y, et al. Betulinic acid induces Bax/Bak-independent cytochrome c release in human nasopharyngeal carcinoma cells. *Mol Cells*, 2012, 33:517-524.
- Hsu TI, et al. Betulinic acid decreases specificity protein 1

- (Sp1) level via increasing the sumoylation of sp1 to inhibit lung cancer growth. *Mol pharmacol*, 2012, 82:1115-1128.
- 27 Duicu O, et al. Analysis of a betulinic acid formulation on liver mitochondria isolated from mice with induced murine melanoma. *Revista de Chimie*, 2014, 65:956-959.
- 28 Wang P, et al. Betulinic acid exerts immunoregulation and anti-tumor effect on cervical carcinoma (U14) tumor-bearing mice. *Pharmazie*, 2012, 67:733-739.
- 29 Ren WJ, et al. Inhibition of betulinic acid to growth and angiogenesis of human colorectal cancer cell in nude mice. *The Chinese-German J Clin Oncol*, 2010, 9:153-157.
- 30 Damle AA, et al. Anticancer activity of betulinic acid on MCF-7 tumors in nude mice. *Indian J Exp Biol*, 2013, 51: 485-491.
- 31 Potze L, et al. Betulinic acid induces a novel cell death pathway that depends on cardiolipin modification. *Oncogene*, Accepted.
- 32 Fulda S. Targeting apoptosis for anticancer therapy. *Semin Cancer Biol*, 2015, 31:84-88.
- 33 Wang YJ, et al. Sequential treatment with betulinic acid followed by 5-fluorouracil shows synergistic cytotoxic activity in ovarian cancer cells. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8: 252-259.
- 34 Aisha FA, et al. α -Mangostin enhances betulinic acid cytotoxicity and inhibits cisplatin cytotoxicity on HCT 116 colorectal carcinoma cells. *Molecules*, 2012, 17:2939-2954.
- 35 Hussein-Al-Ali SH, et al. The *in vitro* therapeutic activity of betulinic acid nanocomposite on breast cancer cells (MCF-7) and normal fibroblast cell (3T3). *J Mater Sci*, 2014, 49: 8171-8182.
- 36 Liu JH, et al. Novel NO-releasing derivatives of betulinic acid with antitumor activity. *Chin Chem Lett*, 2015, 26:759-762.
- 37 Hung HY, et al. A-ring modified betulinic acid derivatives as potent cancer preventive agents. *Bioorg Med Chem Lett*, 2014, 24:1005-1008.
- 38 Cui HW, et al. Synthesis of heterocycle-modified betulinic acid derivatives as antitumor agents. *Eur J Med Chem*, 2015, 95:240-248.
- 39 Urban M, et al. Cytotoxic heterocyclic triterpenoids derived from betulin and betulinic acid. *Bioorg Med Chem*, 2012, 20: 3666-3674.
- 40 Mayaux JF, et al. Triterpene derivatives that block entry of human immunodeficiency virus type 1 into cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91:3564-3568.
- 41 Smith PF, et al. Phase I and II study of the safety, virologic effect, and pharmacokinetics/pharmacodynamics of single-dose 3-O-(3',3'-dimethylsuccinyl) betulinic acid (bevirimat) against human immunodeficiency virus infection. *Antimicrob Agents Ch*, 2007, 51:3574-3581.
- 42 Dang Z, et al. New betulinic acid derivatives for bevirimat-resistant human immunodeficiency virus type-1. *J Med Chem*, 2013, 56:2029-2037.
- 43 Liu JH, et al. Design, synthesis, and anti-tumor activity of novel betulinic acid derivatives. *J Asian Nat Prod Res*, 2014, 16:34-42.
- 44 Kashiwada Y, et al. 3,28-di-O-(dimethylsuccinyl)-betulin isomers as anti-HIV agents. *Bioorg Med Chem Lett*, 2001, 11: 183-185.
- 45 Moghaddam MG, et al. Biological activity of betulinic acid: a review. *Pharmacol Pharm*, 2012, 3:119-123.
- 46 Lin CK, et al. Betulinic acid exerts anti-hepatitis C virus activity via the suppression of NF- κ B-and MAPK-ERK1/2-mediated COX-2 expression. *Brit J Pharmacol*, 2015, 172: 4481-4492.
- 47 Navid MH, et al. Pentacyclic triterpenes in birch bark extract inhibit early step of herpes simplex virus type 1 replication. *Phytomedicine*, 2014, 21:1273-1280.
- 48 Freydottir J, et al. Ethanol extract from birch bark (*Betula pubescens*) suppresses human dendritic cell mediated Th1 responses and directs it towards a Th17 regulatory response *in vitro*. *Immunol Lett*, 2011, 136:90-96.
- 49 Hong EH, et al. Anti-influenza activity of betulinic acid from *Zizyphus jujuba* on influenza A/PR/8 Virus. *Biomol Ther*, 2015, 23:345-349.
- 50 Visalli RJ, et al. Ionic derivatives of betulinic acid exhibit antiviral activity against herpes simplex virus type-2 (HSV-2), but not HIV-1 reverse transcriptase. *Bioorg Med Chem Lett*, 2015, 25:3168-3171.
- 51 Lu Q, et al. Betulinic acid protects against cerebral ischemia-reperfusion injury in mice by reducing oxidative and nitrosative stress. *Nitric Oxide*, 2011, 24:132-138.
- 52 Szuster-Ciesielska A, et al. Betulin and betulinic acid attenuate ethanol-induced liver stellate cell activation by inhibiting reactive oxygen species (ROS), cytokine (TNF- α , TGF- β) production and by influencing intracellular signaling. *Toxicology*, 2011, 280:152-163.
- 53 Fu JY, et al. Betulinic acid ameliorates endothelium-dependent relaxation in L-NAME-induced hypertensive rats by reducing oxidative stress. *Eur J Pharm Sci*, 2011, 44:385-391.
- 54 Qian LB, et al. Betulinic acid inhibits superoxide anion-mediated impairment of endothelium-dependent relaxation in rat aortas. *Indian J Pharm*, 2012, 44:588-592.
- 55 Lingaraju MC, et al. Betulinic acid attenuates renal oxidative stress and inflammation in experimental model of murine

- polymicrobial sepsis. *Eur J Pharm Sci*, 2015, 70:12-21.
- 56 Lingaraju MC, et al. Betulinic acid negates oxidative lung injury in surgical sepsis model. *J Surg Res*, 2015, 193: 856-867.
- 57 Nader MA, et al. Effect of betulinic acid on neutrophil recruitment and inflammatory mediator expression in lipopolysaccharide-induced lung inflammation in rats. *Eur J Pharm Sci*, 2012, 46:106-113.
- 58 Yi J, et al. Ameliorative effect of betulinic acid on oxidative damage and apoptosis in the splenocytes of dexamethasone treated mice. *Int Immunopharmacol*, 2015, 27:85-94.
- 59 Viji V, et al. Betulinic acid inhibits endotoxin-stimulated phosphorylation cascade and proinflammatory prostaglandin E (2) production in human peripheral blood mononuclear cells. *Br J Pharmacol*, 2011, 162:1291-1303.
- 60 Zhao GJ, et al. Antagonism of betulinic acid on LPS-mediated inhibition of ABCA1 and cholesterol efflux through inhibiting nuclear factor-kappa B signaling pathway and miR-33 expression. *PLoS One*, 2013, 8(9):e74782.
- 61 Wang JB, et al. Betulinic acid inhibits IL-1 β induced inflammation by activating PPAR- γ in human osteoarthritis chondrocytes. *Int Immunopharmacol*, 2015, 29:687-692.
- 62 Ku CM, et al. Anti-inflammatory effects of 27 selected terpenoid compounds tested through modulating Th1/Th2 cytokine secretion profiles using murine primary splenocytes. *Food Chem*, 2013, 141:1104-1113.
- 63 Costa JFO, et al. Potent anti-inflammatory activity of betulinic acid treatment in a model of lethal endotoxemia. *Int Immunopharmacol*, 2014, 23:469-474.
- 64 Puniani E, et al. Ethnopharmacology of *Souroubea sympetala* and *Souroubea gilgii* (Marcgraviaceae) and identification of betulinic acid as an anxiolytic principle. *Phytochemistry*, 2015, 113:73-78.
- 65 Machado DG, et al. Antidepressant-like effects of fractions, essential oil, carnosol and betulinic acid isolated from *Rosmarinus officinalis* L. *Food Chem*, 2013, 136:999-1005.
- 66 Jine Y, et al. Influence of betulinic acid on lymphocyte subsets and humoral immune response in mice. *Pol J Vet Sci*, 2012, 15:305-313.
- 67 Lo YC, et al. Betulinic acid stimulates the differentiation and mineralization of osteoblastic MC3T3-E1 cells; involvement of BMP Runx2 and 13 catenin signals. *J Agric Food Chem*, 2010, 58:6643-6639.
- 68 Park SY, et al. Betulinic acid, a bioactive pentacyclic triterpenoid, inhibits skeletal-related events induced by breast cancer bone metastases and treatment. *Toxicol Appl Pharm*, 2014, 275:152-162.
- 69 Kim SJ, et al. Beneficial effect of betulinic acid on hyperglycemia via suppression of hepatic glucose production. *J Agric Food Chem*, 2014, 62:434-442.
- 70 Silva GNS, et al. Investigation of antimalarial activity, cytotoxicity and action mechanism of piperazine derivatives of betulinic acid. *Trop Med Int Health*, 2015, 20:29-39.
- 71 Quan HY, et al. Betulinic acid alleviates non-alcoholic fatty liver by inhibiting SREBP1 activity via the AMPK-Mtor-SREBP signaling pathway. *Biochem Pharmacol*, 2013, 85: 1330-1440.
- 72 Habil A J, et al. Inhibitory effect of betulinic acid and 3 β -acetoxybetulinic acid on rat platelet aggregation. *Afr J Pharm Pharmacol*, 2013, 43:2881-2886.
- 73 Andreas G, et al. Exploration of the antiplatelet activity profile of betulinic acid on human platelets. *J Agric Food Chem*, 2012, 60:6977-6983.
- 74 Afzal M, et al. Therapeutic exploration of betulinic acid in chemically induced hypothyroidism. *Mol Cell Biochem*, 2014, 386(1-2):27-34.

(上接第 948 页)

- 6 Qian J (钱俊), Li DC (李德川), Zhu Y (朱远), et al. Changes in treatment modality for colorectal cancer. *China Cancer* (中国肿瘤), 2013, 22:966-969.
- 7 Liu QH (刘清华), Wang LL (王璐璐). The pharmacological mechanism of allicin on liver disease. *Shandong Med J* (山东医药), 2013, 53(29):96-97.
- 8 Ma XQ (马晓强), Wang WJ (王伟杰), Li H (李海), et al. Screening the expression profiling of colorectal cancer in DMH-induced rat. *Chin J Cancer Prevent Treatment* (中华肿瘤防治杂志), 2014, 21:1499-1503.
- 9 Wu X (武欣), Li K (李坤), Zhang F (张凡), et al. Expression of CCR7, L-selectin, CD44v6 and MMP9 in colorectal cancer and their relationship with lymphatic metastasis. *Chin J Clin Exp Pathol* (临床与实验病理学杂志), 2013, 29:32-35.

- 10 Kong L (孔露), Liang P (梁品), Jia YJ (贾玉杰), et al. The expression of CCX-CKR, VEGF-A and VEGF-C in colorectal carcinoma and its relationship with metastasis. *Chin J Pathophysiol* (中国病理生理杂志), 2015, 31:1838.
- 11 Shao LN (邵乐宁), Yang XD (杨晓东), Xing CG (邢春根), et al. Effects of autophagy regulation of tumor-associated macrophages on apoptosis of colorectal cancer cells. *Chin J Exp Surgery* (中华实验外科杂志), 2014, 31:1504-1507.