

熊果酸与白藜芦醇缀合物的合成及其抗肿瘤活性评价

李彦魁, 安荣, 吕娟(陕西中医药大学医学技术学院, 西安 712046)

摘要: 目的 设计、合成熊果酸与白藜芦醇缀合物, 并对其抗肿瘤活性进行研究。方法 以熊果酸为原料, 通过酯化反应合成了熊果酸-白藜芦醇缀合物, 并采用 MTT 法评价缀合物的体外抗肿瘤活性。结果 合成了 12 个熊果酸-白藜芦醇缀合物, 其结构经 $^1\text{H-NMR}$ 和 MS 进行确证。初步的生物活性结果表明, 目标缀合物对乳腺癌细胞 MCF-7 和 MDA-MB-231 均有抑制活性, 其中缀合物 13b-c 和 15b-c 对 MCF-7 的抑制活性强于熊果酸、白藜芦醇及阳性药物他莫昔芬。此外, 目标缀合物对正常的 MCF-10A 细胞没有毒性。结论 熊果酸结构中引入白藜芦醇结构单元可提高其抗肿瘤活性。

关键词: 熊果酸-白藜芦醇缀合物; 合成; 抗肿瘤活性

中图分类号: R284.3

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2021)07-0790-09

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2021.07.004

引用本文: 李彦魁, 安荣, 吕娟. 熊果酸与白藜芦醇缀合物的合成及其抗肿瘤活性评价[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(7): 790-798.

Synthesis and Preliminary Anti-tumor Activity Evaluation of Ursolic Acid-resveratrol Conjugates

LI Yankui, AN Rong, LYU Juan(School of Medical Technology, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xi'an 712046, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To design and synthesize ursolic acid-resveratrol conjugates and investigate their anti-cancer activities. **METHODS** Ursolic acid-resveratrol conjugates were synthesized from ursolic acid by esterification reaction, and the *in vitro* antitumor activity of target conjugates was assessed by MTT assay. **RESULTS** Twelve ursolic acid-resveratrol conjugates were synthesized, and structures were characterized by $^1\text{H-NMR}$ and MS analysis. The preliminary biological results showed that these conjugates displayed inhibitory activity on both MCF-7 and MDA-MB-231. Specifically, the inhibitory activity of conjugate 13b-c and 15b-c on MCF-7 was stronger than that of ursolic acid, resveratrol and the positive drug of tamoxifen. Additionally, all conjugates were nontoxic to normal MCF-10A cells. **CONCLUSION** The introduction of resveratrol unit into the structure of ursolic acid can enhance its anti-tumor activity.

KEYWORDS: ursolic acid-resveratrol conjugates; synthesis; anti-tumor activity

熊果酸又名乌苏酸(乌索酸), 结构式见图 1, 属于乌苏烷型五环三萜类化合物, 常以游离和糖苷的形式存在于山楂、熊果等植物中^[1]。研究表明, 熊果酸具有抗炎^[2]、降血糖^[3]、保肝^[4]、抗肿瘤^[5]、抗菌^[6]等多种生物活性。特别是其抗肿瘤活性已有广泛的研究报道^[7-9], 并被认为是具有多种抗肿瘤机制: ①诱导肿瘤细胞凋亡, 如 Chuang 等^[10]报道熊果酸能通过阻断 PI3K/Akt 与 p38MAPK 信号通路来诱导肿瘤细胞凋亡; ②抑制肿瘤细胞的侵袭与转移, 如 Tang 等^[11]报道熊果酸可通过降低 CD44 表达来抑制乳腺癌的侵袭、迁移、转移; ③抑制炎症反应, 如 Luo 等^[12]报道熊果酸可抑制乳腺癌细胞的炎症反应, 下调 NF- κ B 的表达水平, 从而抑制炎症发生, 进而抑制乳腺癌进展; ④阻滞细胞周期, 如 Harmand 等^[13]报道熊果酸可通过上调 p53 的表达,

使永生表皮 HaCat 细胞周期阻滞于 G1 期; ⑤诱导细胞自噬, 如 Leng 等^[14]报道熊果酸可通过激活自噬相关因子 5 使肿瘤细胞发生自噬, 进而促进肿瘤细胞凋亡; ⑥抑制肿瘤血管生成, 如 Saraswati 等^[15]报道熊果酸可通过抑制血管内皮生长因子表达来抑制肿瘤血管生成; ⑦增强免疫功能, 如李艳红等^[16]报道熊果酸可通过免疫调节活性来抑制肝肿瘤的生长; ⑧其他作用机制, 例如通过抑制上皮细胞向间质细胞转化, 逆转化疗药物的耐药性等机制来发挥抗肿瘤作用^[17]。然而, 由于熊果酸水溶性较差、生物利用度低、自身抗肿瘤效果较弱等缺点, 限制了其在临床上的广泛应用。因此, 近年来人们通过各个方面对熊果酸进行改造, 以改善其理化性质或提高其抗肿瘤活性^[18]。例如, 将天然产物查尔酮或含氮的碱性基团引入到熊果酸中均明显地提

基金项目: 陕西省教育厅专项科研项目(17JK0197)

作者简介: 李彦魁, 男, 硕士, 讲师 Tel: (029)38185202 E-mail: liyk208@163.com

高了其抗乳腺癌 MCF-7 活性^[19-20]。

白藜芦醇是一种二苯乙烯类天然产物, 结构式见图 1, 近年来发现其具有良好的抗肿瘤活性, 作用机制包括以下几点: ①诱导肿瘤细胞凋亡, 如 Ray 等^[21]报道白藜芦醇能通过激活 caspase-3 和蛋白酶降解途径来诱导 Hela 细胞凋亡; ②抑制肿瘤细胞的侵袭与转移, 如 Zhao 等^[22]报道熊果酸可通过抑制 Akt 和 ERK1/2 信号通路来抑制肾癌的侵袭、迁移、转移; ③抑制炎症反应, 如 Rasheduzzaman 等^[23]报道白藜芦醇可通过抑制 Akt/NF- κ B 信号通路, 从而抑制炎症发生, 进而抑制肺癌生长; ④阻滞细胞周期, 如 Heo 等^[24]报道白藜芦醇可通过上调 p21 和 p27 的表达, 使黑色素瘤细胞周期阻滞于 G2/M 期; ⑤诱导细胞自噬, 如 Fan 等^[25]报道白藜芦醇可通过激活自噬依赖于 LKB1-AMPK-mTOR 途径使肿瘤细胞发生自噬, 进而抑制肿瘤细胞增殖; ⑥抑制肿瘤血管生成, 如 Garvin 等^[26]报道白藜芦醇可通过抑制血管内皮生长因子表达, 减少肿瘤血管生成, 从而抑制肿瘤的生长; ⑦调节肿瘤细胞的氧化还原反应, 如 Juan 等^[27]报道白藜芦醇可使肿瘤细胞产生超氧自由基进而激活 caspase-3 信号途径来诱导肿瘤细胞凋

亡; ⑧其他作用机制, 例如通过抗氧化作用和体内活性氧清除机制来发挥抗肿瘤作用^[28]。

基于熊果酸和白藜芦醇展现出的优秀抗肿瘤活性, 根据活性亚结构拼接的方法, 本研究通过酯键将熊果酸与白藜芦醇进行拼接, 希望得到结构新颖、抗肿瘤活性良好的熊果酸与白藜芦醇杂化物。参考白藜芦醇结构改造的经验发现, 其结构中二苯乙烯基是抗肿瘤的活性骨架^[29], 在对白藜芦醇的结构修饰中常保留了该基团, 主要是对其苯环上的酚羟基进行修饰。例如, Ning 等^[30]将雌激素配体引入到白藜芦醇酚羟基上, 得到了抑制乳腺癌 MCF-7 活性更强的新配体。因此, 在合成熊果酸与白藜芦醇缀合物中, 也保留了白藜芦醇结构中的二苯乙烯单元; 此外, 为了探讨目标缀合物中白藜芦醇结构单元的羟基对活性的影响, 本研究合成了白藜芦醇衍生物 4 和 8, 见图 2, 并将其也拼接到熊果酸及其衍生物上。

目前对熊果酸的结构修饰主要集中在 A 环、C3 位羟基和 C28 位羧基上^[31-33]。研究表明, 在 C28 位引入活性结构单元成酯修饰能使熊果酸的抗肿瘤活性有不同程度的提高, 因此在本研究中白藜芦醇活性结构单元均拼接到熊果酸的 C28

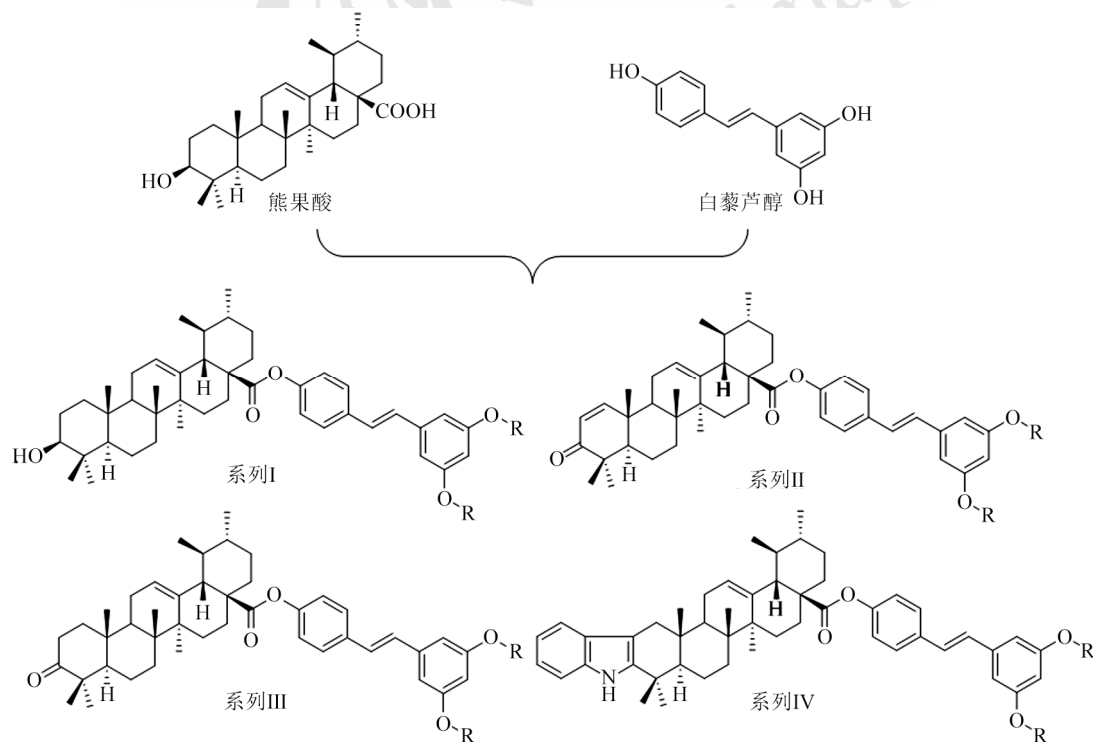


图 1 熊果酸与白藜芦醇缀合物
Fig. 1 Ursolic acid-resveratrol conjugates

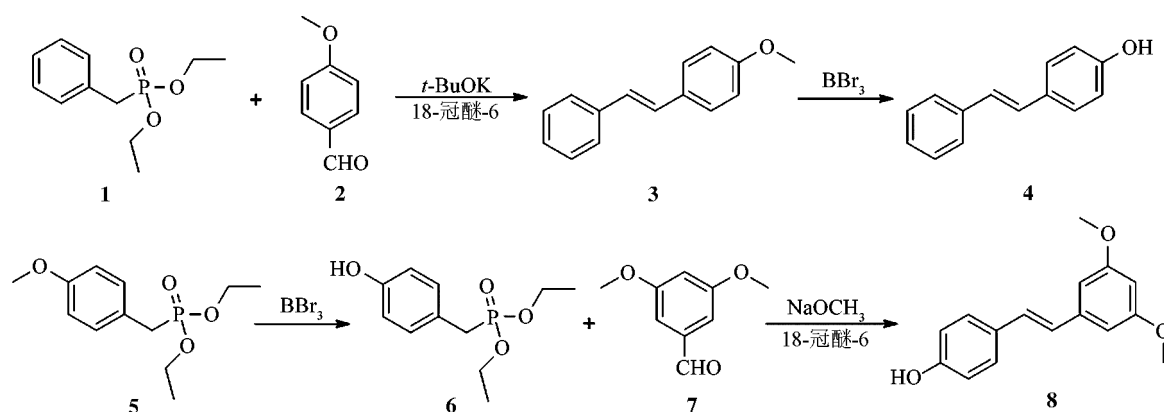


图2 白藜芦醇衍生物 4 和 8 的合成路线

Fig. 2 Synthetic routes of resveratrol derivatives 4 and 8

位。首先,直接将熊果酸与白藜芦醇进行拼接得到了系列 I 缀合物(**12a-c**);随后,参考五环三萜类化合物结构改造的经验发现,将其 A 环修饰成 1-烯-3-酮结构也能提高抗肿瘤活性^[34-35],由此合成系列 II 1-烯-3-氧代熊果酸-白藜芦醇缀合物(**13a-c**);同时,为了进一步确证 1-烯-3-酮对抗肿瘤活性的影响,合成了系列 III 3-氧代熊果酸-白藜芦醇缀合物(**14a-c**);此外,最近文献报道在熊果酸 A 环引入杂环能增加抗肿瘤活性^[36],为此本研究还合成了[3,2-b]-吡啶熊果酸-白藜芦醇缀合物 **15a-c**。合成路线见图 3。由于熊果酸和白藜芦

醇均展现出了抗乳腺癌活性,故在体外活性测试中选取荷尔蒙依赖型乳腺癌 MCF-7 和三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞株为测试细胞株以及正常的乳腺上皮细胞 MCF-10A 为对照细胞株来评价目标缀合物的体外抗乳腺癌活性。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

AM-400MHz 核磁共振仪(TMS 内标,瑞士 Bruker); X-6 型显微熔点测定仪(北京中仪博腾科技有限公司,温度未校正); IKA C-MAG HS4 型磁力搅拌器(德国艾卡公司)。

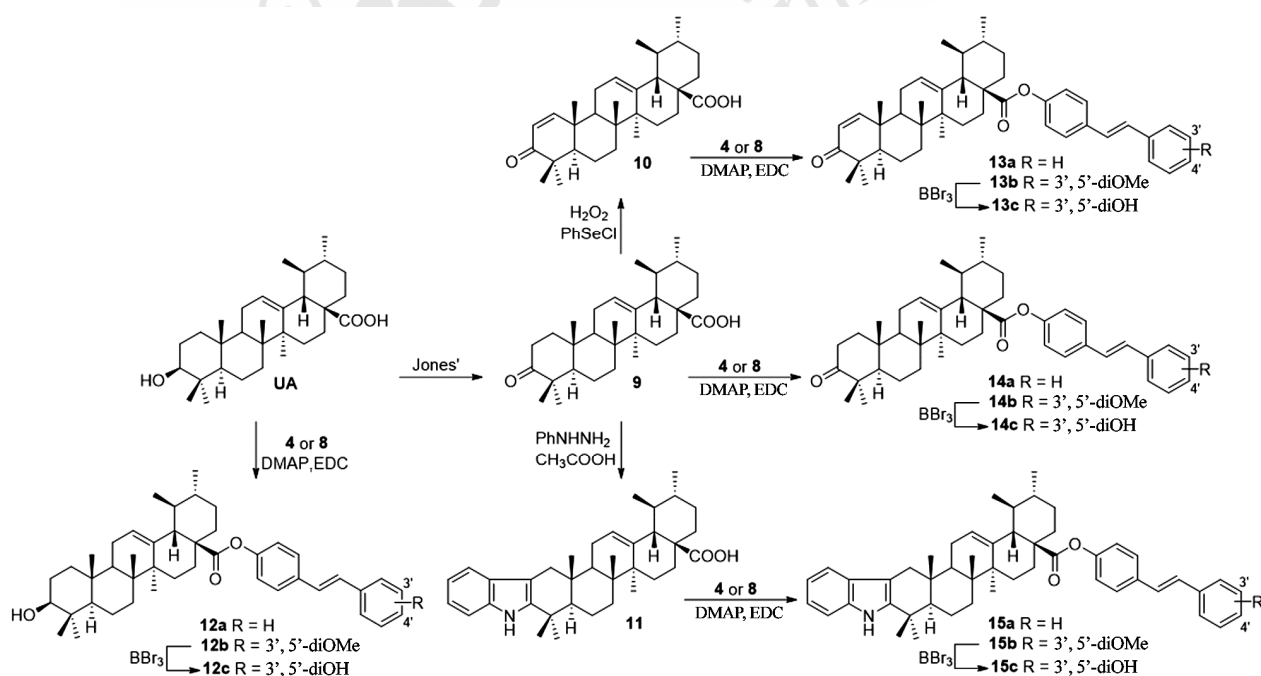


图3 熊果酸-白藜芦醇缀合物 12~15 的合成路线

Fig. 3 Synthetic routes of ursolic acid-resveratrol conjugates 12-15

1.2 试剂

熊果酸(货号: A65105)、苄基膦酸二乙酯(货号: 114170250)、(4-甲氧苄基)膦酸二乙酯(货号: L05226)、Jones 试剂(货号: 2669673)、苯基氯化硒(货号: 179510100)、*N,N*-二甲基甲酰胺(*N,N*-dimethylformamide, DMF, 货号: A81475)、四氢呋喃(tetrahydrofuran, THF, 货号: T2805), 分析纯, 质量分数 $\geq 95\%$, 均购自北京伊诺凯科技有限公司; 4-二甲氨基吡啶(4-dimethylaminopyridine, DMAP, 货号: D109207)、1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐 [1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride, EDC, 货号: E106172]、苯肼(货号: P108563)、4-甲氧基苯甲醛(货号: A108955)、3,5-二甲氧基苯甲醛(货号: D123418)、三溴化硼(boron tribromide, BBr_3 , 货号: B104686)、叔丁醇钾(货号: P111076)、18-冠醚-6(货号: C105797)、甲醇钠(货号: S108356, 分析纯, 质量分数 $\geq 95\%$)均购自阿拉丁试剂有限公司; 其他有机溶剂均为分析纯, 质量分数 $\geq 95\%$, 均购自国药集团化学试剂有限公司; 乳腺癌 MCF-7、MDA-MB-231 细胞株和正常乳腺上皮细胞 MCF-10A 购于中科院上海细胞典藏中心, 本实验室冻存保留使用; DMEM 培养基(货号: 10565-018)、胎牛血清(货号: 16000-044)均购自美国 Gibco 公司。

2 合成方法

2.1 (*E*)-1-甲氧基-4-苯乙烯基苯(3)的合成

氩气保护下, 将苄基膦酸二乙酯(1.027 g, 4.5 mmol)、叔丁醇钾(1.11 g, 9.9 mmol)、18-冠醚-6(0.476 g, 1.8 mmol)加入无水 DMF(10 mL)中, 将反应液加热至 70 °C 反应 1.5 h 后冷却至室温, 加入 4-甲氧基苯甲醛(0.613 g, 4.5 mmol), 继续将反应液加热至 120 °C 反应 5 h, 待反应液冷却至室温后将其倒入 200 mL 冰水中, 用乙酸乙酯(3 $\times$ 20 mL)萃取, 有机层用 Na_2SO_4 进行干燥, 减压脱溶, 粗产物用硅胶柱纯化得到 584 mg 白色固体, 产率 61.7%, 熔点 80~82 °C; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 7.49~7.57(m, 4H), 7.37~7.43(m, 2H), 7.29~7.35(m, 1H), 7.14(d, $J=16.8$ Hz, 1H), 7.06(d, $J=16.4$ Hz, 1H), 6.93~6.98(d, $J=8.4$ Hz, 2H), 3.88(s, 3H)。

2.2 (*E*)-4-苯乙烯基苯酚(4)的合成

氩气保护下, 将化合物 3(841 mg, 4.0 mmol)

溶解到无水 CH_2Cl_2 (20 mL)中, -20 °C 下滴加 BBr_3 (1.1 mL, 12.0 mmol), 加毕继续反应 12 h, 向反应液中加入 1 mL 水淬灭反应, 用乙酸乙酯(3 $\times$ 15 mL)萃取, 有机层用 Na_2SO_4 进行干燥, 减压脱溶, 粗产物用硅胶柱纯化得到 648 mg 白色固体, 产率 82.6%, 熔点 86~88 °C; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 8.58(s, 1H), 7.54(d, $J=8.0$ Hz, 2H), 7.44(d, $J=8.8$ Hz, 2H), 7.33(t, $J=7.6$ Hz, 2H), 7.21(d, $J=7.6$ Hz, 1H), 7.15(d, $J=16.8$ Hz, 1H), 7.03(d, $J=16.4$ Hz, 1H), 6.84(d, $J=8.4$ Hz, 2H)。

2.3 (4-羟苄基)膦酸二乙酯(6)的合成

按照(*E*)-4-苯乙烯基苯酚(4)的合成方法合成(4-羟苄基)膦酸二乙酯(6)。白色油状物, 产率 91.5%。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, 丙酮- d_6): δ 8.87(s, 1H), 7.10(d, $J=8.0$ Hz, 2H), 6.72(d, $J=7.6$ Hz, 2H), 3.94~4.20(m, 4H), 3.14(d, $J=7.2$ Hz, 2H), 1.24(t, $J=7.2$ Hz, 6H)。

2.4 (*E*)-4-(3,5-二甲氧基苯乙烯基)苯酚(8)的合成

氩气保护下, 将化合物 6(1.221 g, 5.0 mmol)、甲醇钠(810 mg, 15.0 mmol)、18-冠醚-6(529 mg, 2.0 mmol)加入无水 DMF(10 mL)中, 将反应液加热至 70 °C 反应 1.5 h 后冷却至室温, 加入 3,5-二甲氧基苯甲醛(997 mg, 6.0 mmol), 继续将反应液加热至 120 °C 反应 5 h, 待反应液冷却至室温后将其倒入 200 mL 冰水中, 用 2 mol $\cdot$ L $^{-1}$ HCl 调节溶液 pH=3, 用乙酸乙酯(3 $\times$ 20 mL)萃取, 有机层用 Na_2SO_4 进行干燥, 减压脱溶, 粗产物用硅胶柱纯化得到 920 mg 白色固体, 产率 71.8%, 熔点 91~93 °C(文献值^[37]: 92~95 °C); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 7.42(d, $J=8.4$ Hz, 2H), 7.07(d, $J=16.4$ Hz, 1H), 6.94(d, $J=16.4$ Hz, 1H), 6.86(d, $J=8.8$ Hz, 2H), 6.68(d, $J=7.2$ Hz, 2H), 6.41(t, $J=6.8$ Hz, 1H), 3.86(s, 6H)。

2.5 3-氧代-乌苏烷型-12-烯-28-羧酸(9)的合成

将熊果酸(10.002 g, 21.9 mmol)加入 THF(30 mL)中, 0 °C 下加入 Jones 试剂(8 mL), 继续反应 1 h, 减压脱溶, 粗产物用硅胶柱纯化得到 9.609 g 白色固体, 产率 96.5%, 熔点 277~279 °C(文献值^[38]: 278~280 °C); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 5.42(s, 1H, H-12), 2.88(dd, $J_1=4.0$ Hz, $J_2=13.6$ Hz, 1H, H-18), 1.25(s, 3H), 1.16(s, 3H), 1.10(s, 3H), 1.05(s, 3H), 0.96(s, 3H), 0.91(s, 3H), 0.84(s, 3H)。

2.6 3-氧代-乌苏烷型-1,12-二烯-28-羧酸(**10**)的合成

氩气保护下,将 3-羧基熊果酸(2.730 g, 6.0 mmol)和 PhSeCl(1.379 g, 7.2 mmol)加入无水乙酸乙酯(30 mL)中,室温反应 3 h,减压脱溶,残留物用 CH₂Cl₂(10 mL)溶解,加入吡啶(1 mL)和 H₂O₂(1.2 mL),室温继续反应 20 min 再回流反应 20 min,反应液冷却至室温后依次用饱和 NaCl 和 NaHCO₃ 溶液进行洗涤,有机层用 Na₂SO₄ 进行干燥,减压脱溶,粗产物用硅胶柱纯化得到 1.526 mg 白色固体,产率 56.2%,熔点 264~266 °C; ¹H-NMR(400 MHz, CDCl₃): δ 7.07(d, *J*=10.4 Hz, 1H, H-1), 5.83(d, *J*=9.6 Hz, 1H, H-2), 5.37(s, 1H, H-12), 2.89(dd, *J*₁=4.0 Hz, *J*₂=13.6 Hz, 1H, H-18), 1.27(s, 3H), 1.15(s, 3H), 1.09(s, 3H), 1.04(s, 3H), 0.94(s, 3H), 0.89(s, 3H), 0.86(s, 3H)。

2.7 [3,2-*b*]呋喃-乌苏烷型-12-烯-28-羧酸(**11**)的合成

氩气保护下,将 3-羧基熊果酸(2.730 g, 6.0 mmol)和苯肼加入冰醋酸(30 mL)中,加热回流反应 2 h,反应液冷却至室温后倒入冰水(30 mL)中,析出浅黄色固体,用乙醇结晶得到 1.840 g 浅黄色的固体,产率 58.1%,熔点 231~233 °C(文献值^[39]: 230~232 °C); ¹H-NMR(400 MHz, CDCl₃): δ 7.76(s, 1H, NH), 7.48(d, *J*=7.6 Hz, 1H), 7.28~7.32(m, 1H), 7.05~7.11(m, 2H), 5.42(s, 1H, H-12), 2.87(dd, *J*₁=3.6 Hz, *J*₂=13.6 Hz, 1H, H-18), 1.25(s, 3H), 1.17(s, 3H), 1.10(s, 3H), 1.05(s, 3H), 0.93(s, 3H), 0.89(s, 3H), 0.84(s, 3H)。

2.8 熊果酸-白藜芦醇衍生物 **12a-b**、**13a-b**、**14a-b**、**15a-b** 的合成

氩气保护下,将熊果酸及其衍生物 **9~11**(1 mmol)、白藜芦醇衍生物 **4** 或 **8**(1.1 mmol)、DMAP(24 mg, 0.2 mmol)和 EDC(383 mg, 2.0 mmol)加入无水 CH₂Cl₂(10 mL)中,室温反应 24 h,向反应液中加入 20 mL 水,用 CH₂Cl₂(3×25 mL)萃取,有机层用 Na₂SO₄ 进行干燥,减压脱溶,粗产物用硅胶柱纯化得到目标化合物。

2.8.1 3β-羟基-乌苏烷型-12-烯-28-酸-[(*E*)-4-苯乙炔基]苯甲酯(**12a**) 黄色固体,收率 63.5%,熔点 171~174 °C; ¹H-NMR(400 MHz, CDCl₃): δ 7.53(d,

J=8.8 Hz, 2H), 7.41(d, *J*=8.0 Hz, 2H), 7.24~7.36(m, 3H), 7.21(d, *J*=8.4 Hz, 2H), 7.13(d, *J*=16.4 Hz, 1H), 7.02(d, *J*=16.4 Hz, 1H), 5.29(s, 1H, H-12), 2.81(dd, *J*₁=3.6 Hz, *J*₂=13.6 Hz, 1H, H-18), 1.16(s, 3H), 1.14(s, 3H), 1.07(s, 3H), 0.92(s, 3H), 0.85(s, 3H), 0.83(s, 3H), 0.76(s, 3H)。MS(ESI): *m/z* 635.9[M+H]⁺。

2.8.2 3β-羟基-乌苏烷型-12-烯-28-酸-[(*E*)-4-(3,5-二甲氧基苯乙炔基)]苯甲酯(**12b**) 黄色固体,收率 70.2%,熔点 182~185 °C; ¹H-NMR(400 MHz, CDCl₃): δ 7.47(d, *J*=8.0 Hz, 2H), 7.29(d, *J*=8.4 Hz, 2H), 7.09(d, *J*=16.4 Hz, 1H), 6.92(d, *J*=16.4 Hz, 1H), 6.81(d, *J*=8.0 Hz, 2H), 6.47(t, *J*=7.2 Hz, 1H), 5.25(s, 1H, H-12), 3.81(s, 6H), 2.86(dd, *J*₁=4.0 Hz, *J*₂=13.6 Hz, 1H, H-18), 1.19(s, 3H), 1.10(s, 3H), 1.02(s, 3H), 0.97(s, 3H), 0.89(s, 3H), 0.87(s, 3H), 0.82(s, 3H)。MS(ESI): *m/z* 696.0[M+H]⁺。

2.8.3 3-氧代-乌苏烷型-1,12-二烯-28-酸-[(*E*)-4-苯乙炔基]苯甲酯(**13a**) 黄色固体,收率 59.3%,熔点 170~172 °C; ¹H-NMR(400 MHz, CDCl₃): δ 7.54(d, *J*=8.0 Hz, 2H), 7.34(d, *J*=8.0 Hz, 2H), 7.27(d, *J*=8.0 Hz, 2H), 7.21~7.25(m, 1H), 7.17(d, *J*=8.0 Hz, 2H), 7.14(d, *J*=16.0 Hz, 1H), 7.04(d, *J*=10.0 Hz, 1H, H-1), 6.96(d, *J*=16.4 Hz, 1H), 5.82(d, *J*=10.0 Hz, 1H, H-2), 5.39(s, 1H, H-12), 2.99(dd, *J*₁=3.6 Hz, *J*₂=14.0 Hz, 1H, H-18), 1.21(s, 3H), 1.16(s, 3H), 1.14(s, 3H), 1.09(s, 3H), 0.99(s, 3H), 0.94(s, 3H), 0.89(s, 3H)。MS(ESI): *m/z* 631.9[M+H]⁺。

2.8.4 3-氧代-乌苏烷型-1,12-二烯-28-酸-[(*E*)-4-(3,5-二甲氧基苯乙炔基)]苯甲酯(**13b**) 黄色固体,收率 64.8%,熔点 186~189 °C; ¹H-NMR(400 MHz, CDCl₃): δ 7.57(d, *J*=8.0 Hz, 2H), 7.29(d, *J*=8.4 Hz, 2H), 7.01~7.06(m, 2H), 6.96(d, *J*=16.4 Hz, 1H), 6.84(d, *J*=7.6 Hz, 2H), 6.40(t, *J*=8.0 Hz, 1H), 5.81(d, *J*=10.0 Hz, 1H, H-2), 5.43(s, 1H, H-12), 3.84(s, 6H), 3.02(dd, *J*₁=3.6 Hz, *J*₂=14.0 Hz, 1H, H-18), 1.22(s, 3H), 1.17(s, 3H), 1.15(s, 3H), 1.00(s, 3H), 0.99(s, 3H), 0.95(s, 3H), 0.91(s, 3H)。MS(ESI): *m/z* 690.9[M+H]⁺。

2.8.5 3-氧代-乌苏烷型-12-烯-28-酸-[(*E*)-4-苯乙炔基]苯甲酯(**14a**) 黄色固体, 收率 64.7%, 熔点 182~185 °C; ¹H-NMR(400 MHz, CDCl₃): δ 7.57(d, *J*=8.0 Hz, 2H), 7.31(d, *J*=8.0 Hz, 2H), 7.23~7.32(m, 3H), 7.18(d, *J*=8.0 Hz, 2H), 7.11(d, *J*=16.0 Hz, 1H), 6.98(d, *J*=16.4 Hz, 1H), 5.38(s, 1H, H-12), 2.89(dd, *J*₁=4.0 Hz, *J*₂=13.6 Hz, 1H, H-18), 1.21(s, 3H), 1.14(s, 3H), 1.09(s, 3H), 1.07(s, 3H), 1.04(s, 3H), 0.97(s, 3H), 0.91(s, 3H). MS(ESI): *m/z* 632.9[M]⁺.

2.8.6 3-氧代-乌苏烷型-12-烯-28-酸-[(*E*)-4-(3,5-二甲氧基苯乙炔基)]苯甲酯(**14b**) 黄色固体, 收率 58.9%, 熔点 207~209 °C; ¹H-NMR(400 MHz, CDCl₃): δ 7.55(d, *J*=8.4 Hz, 2H), 7.32(d, *J*=8.0 Hz, 2H), 7.04(d, *J*=16.0 Hz, 1H), 6.95(d, *J*=16.4 Hz, 1H), 6.87(d, *J*=7.6 Hz, 2H), 6.42(t, *J*=7.6 Hz, 1H), 5.40(s, 1H, H-12), 3.85(s, 6H), 3.00(dd, *J*₁=4.4 Hz, *J*₂=13.6 Hz, 1H, H-18), 1.21(s, 3H), 1.09(s, 3H), 1.07(s, 3H), 1.05(s, 3H), 0.95(s, 3H), 0.90(s, 3H), 0.87(s, 3H). MS(ESI): *m/z* 692.9[M]⁺.

2.8.7 [3, 2-*b*]-吡啶-乌苏烷型-12-烯-28-酸-[(*E*)-4-苯乙炔基]苯甲酯(**15a**) 黄色固体, 收率 70.4%, 熔点 179~181 °C; ¹H-NMR(400 MHz, CDCl₃): δ 7.84(s, 1H, NH), 7.56(d, *J*=8.0 Hz, 2H), 7.47(d, *J*=7.2 Hz, 1H), 7.34(d, *J*=8.0 Hz, 2H), 7.22~7.30(m, 4H), 7.16(d, *J*=8.0 Hz, 2H), 7.07~7.14(m, 3H), 6.95(d, *J*=16.0 Hz, 1H), 5.50(s, 1H, H-12), 3.04(dd, *J*₁=3.6 Hz, *J*₂=13.6 Hz, 1H, H-18), 1.32(s, 3H), 1.26(s, 3H), 1.22(s, 3H), 1.02(s, 3H), 0.99(s, 3H), 0.97(s, 3H), 0.96(s, 3H). MS(ESI): *m/z* 707.0[M+H]⁺.

2.8.8 [3,2-*b*]-吡啶乌苏烷型-12-烯-28-酸-[(*E*)-4-(3,5-二甲氧基苯乙炔基)]苯甲酯(**15b**) 黄色固体, 收率 68.2%, 熔点 211~213 °C; ¹H-NMR(400 MHz, CDCl₃): δ 7.86(s, 1H, NH), 7.55(d, *J*=8.0 Hz, 2H), 7.42(d, *J*=7.6 Hz, 1H), 7.24~7.32(m, 3H), 7.11~7.16(m, 1H), 7.05~7.09(m, 1H), 7.03(d, *J*=16.0 Hz, 1H), 6.91(d, *J*=16.0 Hz, 1H), 6.89(d, *J*=8.0 Hz, 2H), 6.46(t, *J*=8.0 Hz, 1H), 5.50(s, 1H, H-12), 3.86(s, 6H), 3.03(dd,

*J*₁=3.6 Hz, *J*₂=13.6 Hz, 1H, H-18), 1.31(s, 3H), 1.26(s, 3H), 1.25(s, 3H), 1.22(s, 3H), 1.02(s, 3H), 0.97(s, 3H), 0.96(s, 3H). MS(ESI): *m/z* 767.1[M+H]⁺.

2.9 熊果酸-白藜芦醇缀合物 **12c**、**13c**、**14c**、**15c** 的合成

按照(*E*)-4-苯乙炔基苯酚(**4**)的合成方法对**12a-b**、**13a-b**、**14a-b**、**15a-b**进行脱甲基合成羟基化合物**12c**、**13c**、**14c**、**15c**。

2.9.1 3β-羟基-乌苏烷型-12-烯-28-酸-[(*E*)-4-(3,5-二羟基苯乙炔基)]苯甲酯(**12c**) 黄色固体, 收率 88.3%, 熔点 174~177 °C; ¹H-NMR(400 MHz, CDCl₃): δ 7.43(d, *J*=8.4 Hz, 2H), 7.33(d, *J*=8.0 Hz, 2H), 7.05(d, *J*=16.0 Hz, 1H), 6.88(d, *J*=16.0 Hz, 1H), 6.87(d, *J*=7.6 Hz, 2H), 6.39(t, *J*=8.0 Hz, 1H), 5.25(s, 1H, H-12), 2.86(dd, *J*₁=4.0 Hz, *J*₂=13.6 Hz, 1H, H-18), 1.17(s, 3H), 1.12(s, 3H), 1.01(s, 3H), 0.98(s, 3H), 0.88(s, 3H), 0.86(s, 3H), 0.83(s, 3H). MS(ESI): *m/z* 666.9[M]⁺.

2.9.2 3-氧代-乌苏烷型-1,12-二烯-28-酸-[(*E*)-4-(3,5-二羟基苯乙炔基)]苯甲酯(**13c**) 黄色固体, 收率 87.4%, 熔点 184~186 °C; ¹H-NMR(400 MHz, CDCl₃): δ 7.57(d, *J*=8.0 Hz, 2H), 7.35(d, *J*=8.0 Hz, 2H), 7.04(d, *J*=10.0 Hz, 1H, H-1), 7.01(d, *J*=16.4 Hz, 1H), 6.84(d, *J*=16.4 Hz, 1H), 6.81(d, *J*=8.0 Hz, 2H), 6.43(t, *J*=8.0 Hz, 1H), 5.81(d, *J*=10.0 Hz, 1H, H-2), 5.41(s, 1H, H-12), 3.01(dd, *J*₁=4.0 Hz, *J*₂=13.6 Hz, 1H, H-18), 1.22(s, 3H), 1.17(s, 3H), 1.15(s, 3H), 1.10(s, 3H), 0.99(s, 3H), 0.96(s, 3H), 0.94(s, 3H). MS(ESI): *m/z* 663.9[M+H]⁺.

2.9.3 3-氧代-乌苏烷型-12-烯-28-酸-[(*E*)-4-(3,5-二羟基苯乙炔基)]苯甲酯(**14c**) 黄色固体, 收率 82.5%, 熔点 191~193 °C; ¹H-NMR(400 MHz, CDCl₃): δ 7.51(d, *J*=8.0 Hz, 2H), 7.30(d, *J*=8.0 Hz, 2H), 6.99(d, *J*=16.4 Hz, 1H), 6.85(d, *J*=16.4 Hz, 1H), 6.85(d, *J*=8.0 Hz, 2H), 6.40(t, *J*=8.0 Hz, 1H), 5.41(s, 1H, H-12), 3.01(dd, *J*₁=4.0 Hz, *J*₂=13.6 Hz, 1H, H-18), 1.20(s, 3H), 1.09(s, 3H), 1.06(s, 3H), 1.05(s, 3H), 0.98(s, 3H), 0.95(s, 3H), 0.90(s, 3H). MS(ESI): *m/z* 665.9[M+H]⁺.

2.9.4 [3,2-b]-吡啶-乌苏烷型-12-烯-28-酸-[(E)-4-(3,5-二羟基苯乙烯基)]苯甲酯(**15c**) 黄色固体, 收率 86.2%, 熔点 199~201 °C; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.81(s, 1H, NH), 7.52(d, *J*=8.0 Hz, 2H), 7.42(d, *J*=7.6 Hz, 1H), 7.29-7.37(m, 3H), 7.12(m, 1H), 7.09(m, 1H), 7.05(d, *J*=16.0 Hz, 1H), 6.92(d, *J*=16.4 Hz, 1H), 6.87(d, *J*=8.0 Hz, 2H), 6.51(t, *J*=8.0 Hz, 1H), 5.47(s, 1H, H-12), 3.04(dd, *J*₁=4.0 Hz, *J*₂=14.0 Hz, 1H, H-18), 1.33(s, 3H), 1.27(s, 3H), 1.26(s, 3H), 1.24(s, 3H), 1.02(s, 3H), 0.98(s, 3H), 0.96(s, 3H)。MS(ESI): *m/z* 739.0[M+H]⁺。

3 抗肿瘤活性

选取乳腺癌 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞株为测试细胞株, 正常的乳腺上皮细胞 MCF-10A 为对照细胞株, 他莫昔芬为阳性对照药。取对数生长期的细胞接种于 96 孔板中, 细胞密度为每孔 8×10^3 个, 置于 5%CO₂、37 °C 的恒温培养箱中孵育 12 h, 弃去培养液, 加入 200 μL 不同浓度的待测化合物, 每个浓度重复 6 孔, 其中空白组加入等体积的培养基, 继续孵育 72 h, 弃去培养液, 加入 5 mg·mL⁻¹ MTT(每孔 20 μL)溶液, 继续孵育 4 h, 弃去培养液, 每孔加入 150 μL DMSO, 摇床摇动 15 min, 使结晶物溶解, 用酶标仪在 570 nm 波长处测定每孔吸光度(OD)值, 计算肿瘤细胞抑制率, 计算出各化合物的 IC₅₀ 值。

4 结果与讨论

4.1 目标化合物的合成

首先, 以苄基膦酸二乙酯与甲氧基苯甲醛为原料, 通过 Wittig-Horner 反应制得了白藜芦醇衍生物 **4** 和 **8**。接着, 参考五环三萜类化合物的结构改造方法合成熊果酸衍生物。以熊果酸为原料, 通过 Jones 试剂将其 C3 位羟基进行氧化, 得到了 3-羰基熊果酸 **9**, 再与苯基氯化硒和 H₂O₂ 发生亲核取代和消除反应, 得到了 1-烯-3-酮熊果酸(**10**); 同时, 通过高 Fischer 吡啶合成法将 3-羰基熊果酸(**9**)与苯肼反应制得吡啶熊果酸(**11**)。最后, 将熊果酸及其衍生物 **9**~**11** 与白藜芦醇衍生物 **4** 和 **8** 发生酯化反应得到了目标产物 **12**~**15**, 其中甲氧基缀合物(**12a-b**、**13a-b**、**14a-b**、**15a-b**)通过 BBr₃ 脱甲基得到了相应的羟基缀合物(**12c**、**13c**、**14c**、**15c**)。

4.2 体外抗乳腺癌活性

以他莫昔芬为阳性对照药, 采用 MTT 法测试了熊果酸-白藜芦醇缀合物的体外抗肿瘤活性, 活性数据见表 1。结果表明, 12 个目标缀合物对荷尔蒙依赖型[ER(+)]乳腺癌 MCF-7 和三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞株均展现出了不同的抑制活性, 其 IC₅₀ 值均 < 40 μmol·L⁻¹。总的来说, 缀合物对 MCF-7 细胞展现出了更强的抑制活性, 并明显强于先导化合物熊果酸以及熊果酸与白藜芦醇的物理混合, 其中缀合物 **13b-c**、**15b-c** 对 MCF-7 细胞抑制活性是熊果酸的 2 倍以上, 甚至强于阳性药物他莫昔芬。这些结果说明引入白藜芦醇结构单元能够增强熊果酸的抗肿瘤活性。

进一步研究表 1 的活性数据发现, 这些目标缀合物的白藜芦醇结构单元和熊果酸对 MCF-7 抑制活性有较大的影响。对白藜芦醇结构单元研究发现, 缀合物的白藜芦醇结构单元保留羟基结构抗肿瘤活性强于对应的甲氧基或没有取代的缀合物(**12c** vs **12a-b**, **13c** vs **13a-b**, **14c** vs **14a-b**, **15c** vs **15a-b**), 这些结果表明白藜芦醇的羟基对抗乳腺癌活性具有重要作用, 将其羟基用甲氧基或氢原子进行取代将降低活性; 对熊果酸结构单元研究发现, 当熊果酸直接与白藜芦醇进行偶联得到的缀合物 **12a-c** 尽管对 MCF-7 展现出了有效的抑制活性, 但是其 IC₅₀ 值低于他莫昔芬。而在熊果酸 A 环引入 1-烯-3-酮得到的缀合物 **13a-c** 活性较缀合物 **12a-c** 有所提高, 尤其是缀合物 **13b-c** 对 MCF-7 的抑制活性明显地强于他莫昔芬; 但是, 当用 3-羰基熊果酸与白藜芦醇及衍生物进行拼接后, 缀合物 **14a-c** 对 MCF-7 仅展现出了中等的抑制活性, 其 IC₅₀ 值明显高于缀合物 **13a-c**, 这些结果再次证明了在熊果酸 A 环引入 1-烯-3-酮能够提高抗肿瘤活性。此外, 在熊果酸 A 环引入吡啶杂环得到的缀合物 **15a-c** 也能保留良好的抗肿瘤活性, 但其活性仍然低于相应的 1-烯-3-酮得到的缀合物 **13a-c**(**13a** vs **15a**, **13b** vs **15b**, **13c** vs **15c**)。

另外, 为了进一步探讨目标缀合物的毒性, 用正常的乳腺上皮细胞 MCF-10A 测试细胞株来检测其毒性。结果表明, 缀合物 **12**~**15** 对正常的 MCF-10A 没有抑制活性, 说明缀合物毒性较低, 而阳性药物他莫昔芬却表现出了一定的毒性。结果见表 1。

表 1 目标缀合物抑制 MCF-7、MDA-MB-231 和 MCF-10A 细胞的 IC_{50} 值($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Tab. 1 IC_{50} values of target conjugates inhibiting MCF-7, MDA-MB-231 and MCF-10A cells($\bar{x} \pm s$, $n=3$) $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

化合物	MCF-7	MDA-MB-231	MCF-10A
12a	17.4±2.28	26.8±3.07	>100
12b	20.3±1.99	15.9±1.82	>100
12c	15.7±1.85	19.3±2.46	>100
13a	16.6±1.42	15.5±1.18	>100
13b	11.3±0.97	22.7±2.39	>100
13c	8.7±1.56	19.2±2.08	>100
14a	25.4±3.28	38.9±3.48	>100
14b	29.6±5.73	18.8±1.53	>100
14c	20.8±2.66	32.2±3.61	>100
15a	19.0±1.28	25.6±2.69	>100
15b	13.9±1.57	21.8±2.36	>100
15c	9.2±0.93	17.4±2.05	>100
熊果酸	32.7±3.96	38.6±2.53	>100
白藜芦醇	24.1±2.42	44.5±4.79	>100
熊果酸+白藜芦醇	30.4±2.58	41.8±3.67	>100
他莫昔芬	15.5±1.96	17.0±1.28	38.3±3.05

5 结论

通过将活性白藜芦醇结构单元拼接到熊果酸中,得到了熊果酸-白藜芦醇, 3-氧代熊果酸-白藜芦醇, 1-烯-3-氧代熊果酸-白藜芦醇和[3,2-b]呋喃熊果酸-白藜芦醇 4 个系列缀合物。经过测试发现这些缀合物对荷尔蒙依赖型乳腺癌 MCF-7 和三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞株均有不同程度的抑制作用, 其中缀合物 **13b-c** 和 **15b-c** 对 MCF-7 的抑制活性强于先导化合物熊果酸和白藜芦醇以及阳性药物他莫昔芬。此外, 目标缀合物对正常的 MCF-10A 细胞没有毒性。这些结果表明, 将 2 个活性亚单元进行拼接能够得到活性更强的缀合物, 这对今后进一步开展熊果酸的结构修饰和抗肿瘤活性研究提供了一定的参考。

REFERENCES

- [1] SUN Y, GE F L, XUE C M, et al. Advances in determination method of pentacyclic triterpenoids in natural products[J]. Mod Chin Med(中国现代中药), 2019, 21(4): 552-558.
- [2] TAN J, HUANG W, CHEN S L, et al. Synthesis and anti-inflammatory activity of ursolic acid derivative-chalcone conjugates[J]. Acta Pharm Sin(药学学报), 2016, 51(6): 938-946.
- [3] GUO Y Y, ZHU D Z. Research progress on the action mechanism of ursolic acid improving insulin resistance[J]. Hebei Med J(河北医药), 2019, 41(11): 1732-1736.
- [4] 曾璐, 唐外姣, 殷锦锦, 等. 熊果酸改善肝细胞脂肪变性的实验研究[J]. 中药材, 2015, 38(5): 1049-1052.
- [5] SUN L, LI B, SU X H, et al. An ursolic acid derived small molecule triggers cancer cell death through hyperstimulation

of macropinocytosis[J]. J Med Chem, 2017, 60(15): 6638-6648.

- [6] MENG Y C, ZHAN J H, XIAO S P, et al. Synthesis and antibacterial evaluation of ursolic acid derivatives[J]. J Tradit Chin Med Univ Hunan(湖南中医药大学学报), 2017, 37(5): 493-498.
- [7] WANG J C, ZHAO H T, ZHI K K, et al. Exploration of the natural active small-molecule drug-loading process and highly efficient synergistic antitumor efficacy[J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2020, 12(6): 6827-6839.
- [8] HE M, ZHANG M, SUN Q, et al. Mechanism of ursolic acid in regulating colorectal cancer cell HCT116 autophagy through hedgehog signaling pathway[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2021, 46(5): 1217-1223.
- [9] WEN R, ZHOU C J, WANG C F, et al. Effects of ursolic acid on expression of AMPK and LPIN1 in HepG2 cells[J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2019, 28(2): 208-213.
- [10] CHUANG W L, LIN P Y, LIN H C, et al. The apoptotic effect of ursolic acid on SK-hep-1 cells is regulated by the PI3K/Akt, p38 and JNK MAPK signaling pathways[J]. Molecules, 2016, 21(4): 460.
- [11] TANG Q, LIU Y J, LI T, et al. A novel co-drug of aspirin and ursolic acid interrupts adhesion, invasion and migration of cancer cells to vascular endothelium via regulating EMT and EGFR-mediated signaling pathways: Multiple targets for cancer metastasis prevention and treatment[J]. Oncotarget, 2016, 7(45): 73114-73129.
- [12] LUO J, HU Y L, WANG H. Ursolic acid inhibits breast cancer growth by inhibiting proliferation, inducing autophagy and apoptosis, and suppressing inflammatory responses via the PI3K/AKT and NF- κ B signaling pathways *in vitro*[J]. Exp Ther Med, 2017, 14(4): 3623-3631.
- [13] HARMAND P O, DUVAL R, LIAGRE B, et al. Ursolic acid induces apoptosis through caspase-3 activation and cell cycle arrest in HaCat cells[J]. Int J Oncol, 2003, 23(1): 105-112.
- [14] LENG S L, HAO Y L, DU D B, et al. Ursolic acid promotes cancer cell death by inducing Atg5-dependent autophagy[J]. Int J Cancer, 2013, 133(12): 2781-2790.
- [15] SARASWATI S, AGRAWAL S S, ALHAIDER A A. Ursolic acid inhibits tumor angiogenesis and induces apoptosis through mitochondrial-dependent pathway in Ehrlich ascites carcinoma tumor[J]. Chem-Biol Interactions, 2013, 206(2): 153-165.
- [16] LI Y H, LI X B, LU X Y, et al. Antitumor effect and immune regulation activity of ursolic acid on hepatoma H22 in mice[J]. Lab Anim Sci(实验动物科学), 2013, 30(5): 1-5.
- [17] ZHANG Y, HUANG L C, SHI H Z, et al. Ursolic acid enhances the therapeutic effects of oxaliplatin in colorectal cancer by inhibition of drug resistance[J]. Cancer Sci, 2018, 109(1): 94-102.
- [18] HODON J, BORKOVA L, POKORNY J, et al. Design and synthesis of pentacyclic triterpene conjugates and their use in medicinal research[J]. Eur J Med Chem, 2019(182): 111653.
- [19] PEI T, WANG Y Y. Synthesis and preliminary anti-tumor activity of novel ursolic acid derivative-chalcone conjugates[J]. J Chin Pharm Univ(中国药科大学学报), 2017, 48(1): 31-41.
- [20] LIU X Y, GAO X Q, JIN X J, et al. Synthesis, characterization and cytotoxic activity of novel oleanolic acid and ursolic acid derivatives[J]. Chin J Org Chem(有机化学), 2018, 38(12):

- 3227-3235.
- [21] RAY M, RAI N, JANA K, et al. Beta catenin is degraded by both caspase-3 and proteasomal activity during resveratrol-induced apoptosis in HeLa cells in a GSK3 β -independent manner[J]. Indian J Biochem Biophys, 2015, 52(1): 7-13.
- [22] ZHAO Y W, TANG H C, ZENG X, et al. Resveratrol inhibits proliferation, migration and invasion via Akt and ERK1/2 signaling pathways in renal cell carcinoma cells[J]. Biomed Pharmacother, 2018, 98: 36-44.
- [23] RASHEDUZZAMAN M, JEONG J K, PARK S Y. Resveratrol sensitizes lung cancer cell to TRAIL by p53 independent and suppression of Akt/NF- κ B signaling[J]. Life Sci, 2018(208): 208-220.
- [24] HEO J R, KIM S M, HWANG K A, et al. Resveratrol induced reactive oxygen species and endoplasmic Reticulum stress-mediated apoptosis, and cell cycle arrest in the A375SM malignant melanoma cell line[J]. Int J Mol Med, 2018, 42(3): 1427-1435.
- [25] FAN Y Y, CHIU J F, LIU J, et al. Resveratrol induces autophagy-dependent apoptosis in HL-60 cells[J]. BMC Cancer, 2018, 18(1): 581.
- [26] GARVIN S, OLLINGER K, DABROSIN C. Resveratrol induces apoptosis and inhibits angiogenesis in human breast cancer xenografts *in vivo*[J]. Cancer Lett, 2006, 231(1): 113-122.
- [27] JUAN M E, WENZEL U, DANIEL H, et al. Resveratrol induces apoptosis through ROS-dependent mitochondria pathway in HT-29 human colorectal carcinoma cells[J]. J Agric Food Chem, 2008, 56(12): 4813-4818.
- [28] HE T, GUAN X, WANG S, et al. Resveratrol prevents high glucose-induced epithelial-mesenchymal transition in renal tubular epithelial cells by inhibiting NADPH oxidase/ROS/ERK pathway[J]. Mol Cell Endocrinol, 2015(402): 13-20.
- [29] LIU H C, DONG A J, GAO C M, et al. Structure modification of resveratrol and pharmacological activity[J]. Prog Chem(化学进展), 2009, 21(8): 1500-1506.
- [30] NING W T, HU Z Y, TANG C, et al. Novel hybrid conjugates with dual suppression of estrogenic and inflammatory activities display significantly improved potency against breast cancer[J]. J Med Chem, 2018, 61(18): 8155-8173.
- [31] YU T T, LI L, CUI H B, et al. Syntheses and antitumor activities of ursolic acid C-3, C-28 derivatives[J]. Chemistry(化学通报), 2017, 80(11): 1055-1060.
- [32] CHEN Y H, HOU X Y, ZHI D F, et al. Synthesis, characterization and antitumor activity of oleanolic acid and ursolic acid derivatives of ring[J]. Chin J Org Chem(有机化学), 2016, 36(4): 795-802.
- [33] LIU X H, LI B L, ZHANG Z, et al. Synthesis and discovery novel anti-cancer stem cells compounds derived from the natural triterpenoic acids[J]. J Med Chem, 2018, 61(23): 10814-10833.
- [34] CHENG Y S, GONG Y, QIAN S, et al. Identification of a novel hybridization from isosorbide 5-mononitrate and bardoxolone methyl with dual activities of pulmonary vasodilation and vascular remodeling inhibition on pulmonary arterial hypertension rats[J]. J Med Chem, 2018, 61(4): 1474-1482.
- [35] WONG M H, BRYAN H K, COPPLE I M, et al. Design and synthesis of irreversible analogues of bardoxolone methyl for the identification of pharmacologically relevant targets and interaction sites[J]. J Med Chem, 2016, 59(6): 2396-2409.
- [36] PAN H S, LI L, CUI H B, et al. Synthesis and anti-tumor activity of derivatives of ursolic acid *in vitro*[J]. Acta Pharm Sin(药学报), 2017, 52(12): 1890-1894.
- [37] LI X L, HE G D, HU Y Q, et al. Synthesis of pterostilbene[J]. Chin J Pharm(中国医药工业杂志), 2014, 45(9): 816-817, 839.
- [38] CHEN J, LIU J, GONG Y C, et al. Synthesis and biological evaluation of ursolic acid derivatives as novel inhibitors of glycogen phosphorylase[J]. J Chin Pharm Univ(中国药科大学学报), 2006, 37(5): 397-402.
- [39] WEN X A, ZHANG Y X, LIU J, et al. Synthesis and biological activity of heterocycle-fused derivatives of pentacyclic triterpenes as glycogen phosphorylase inhibitors[J]. J Chin Pharm Univ(中国药科大学学报), 2009, 40(6): 491-496.

收稿日期: 2020-02-24
(本文责编: 沈倩)