

• 实验研究 •

美法仑衍生物的合成及其抗肿瘤活性研究

张娜¹, 崔晓燕², 赵秀梅¹, 李冬冬¹, 陶遵威^{1*}

1. 天津市医药科学研究所, 天津 300020

2. 天津医科大学 研究生院, 天津 300070

摘要: 目的 以苦参碱和 18 α -甘草次酸作为载体对美法仑进行结构拼合, 并对其体内外抗肿瘤活性进行研究。方法 以槐果碱和美法仑为原料, 经过加成、酰化反应合成了美法仑衍生物 **2**; 以 18 α -甘草次酸和美法仑为原料, 经酯化和酰化反应合成了美法仑衍生物 **5**, 目标化合物的结构经元素分析、MS、¹H-NMR 确证, 并采用 MTT 法对其进行体外抗肿瘤活性研究, 对体外活性较为显著的化合物 **2** 进行小鼠体内试验。结果 目标化合物 **2** 和 **5** 的合成总收率分别为 21.3%、18.1%。目标化合物 **2** 的体外抗肿瘤活性明显高于化合物 **5**、18 α -甘草次酸、苦参碱和美法仑。体内活性试验中, 目标化合物 **2** 给药剂量为 6、9 μ mol/kg 时对 HepA 肿瘤的抑瘤率分别为 52.00%、62.12%, 而 6 μ mol/kg 美法仑的抑制率为 39.93%, 化合物 **2** 的抑瘤效果优于美法仑, 尤以高剂量效果最为明显。结论 化合物 **2** 表现出体外、体内较高的抗肿瘤活性, 值得进一步研究。

关键词: 美法仑; 苦参碱; 18 α -甘草次酸; 抗肿瘤活性

中图分类号: R914; R979.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2015)02-0115-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2015.02.001

Synthesis of melphalan derivatives and their antitumor activities

ZHANG Na¹, CUI Xiao-yan², ZHAO Xiu-mei¹, LI Dong-dong¹, TAO Zun-wei¹

1. Tianjin Institute of Medical and Pharmaceutical Sciences, Tianjin 300020, China

2. School of Graduate, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

Abstract: Objective To design and synthesize melphalan derivatives by combining the matrine and 18 α -Glycyrrhetic acid to melphalan, and to evaluate their antitumor activities *in vitro* and *in vivo*. **Methods** Sophocarpine and melphalan were used as starting materials to synthesize the melphalan derivative **2** by addition and acylation reaction; 18 α -Glycyrrhetic acid and melphalan were used as starting materials to synthesize the melphalan derivative **5** by esterification and acylation reaction. The target compounds were characterized by elemental analyses, MS and ¹H-NMR. The antitumor activities *in vitro* were evaluated by MTT method. Anti-tumor experiments *in vivo* were also done for the compound **2** displaying high activities *in vitro*. **Results** The total yield of target compound **2** and **5** were 21.3% and 18.1%. The *in vitro* antitumor activity experiments showed that the antitumor activity of target compound **2** was higher than those of compound **5**, 18 α -glycyrrhetic acid, matrine and melphalan. The inhibition rates of tumor growth of compound **2** with 6 and 9 μ mol/kg were 52.00% and 62.12%, while the inhibition rate of tumor growth of melphalan with 6 μ mol/kg was 39.93%. The inhibition effect of tumor growth of compound **2** is better than that of melphalan, especially in high dose. **Conclusion** The compound **2** exhibits high antitumor activity *in vitro* and *in vivo*, which could be valuable for further development.

Key words: melphalan; matrine; 18 α -glycyrrhetic acid; antitumor activity

美法仑为左旋苯丙氨酸氮芥, 对多种恶性肿瘤均有疗效^[1], 但作为氮芥类中的经典药物, 存在毒副作用大、选择性差等缺点。氮芥类化合物无结构专一性^[2], 主要针对载体部分进行修饰^[3-4]。中药抗

收稿日期: 2014-12-02

基金项目: 天津市卫生局科技基金资助项目 (2012KZ058)

作者简介: 张娜 (1982—), 女, 天津人, 助理研究员, 硕士, 主要从事新药研究工作。Tel: 13502039035 E-mail: mailofzhangna@sina.com

*通信作者 陶遵威, 男, 研究员, 主要从事化学药物的合成工作。Tel: (022)27236182 E-mail: taozunwei@126.com

肿瘤药物以多靶点、多效应、安全有效等优点应用于临床^[5]。其中苦参碱具有广谱抗肿瘤作用,不破坏正常细胞,同时还能保护肝脏,在肝癌治疗方面备受关注^[6-7]。另外甘草次酸有较强的肝分布特征和肝靶向性^[8-11],研究证明其两个光学异构体中18 α -甘草次酸的肝靶向性更强^[12]。为提高美法仑的选择性和降低毒性,本文利用苦参碱和18 α -甘草次酸作为载体对美法仑进行衍生化改造。

课题组在前期研究^[13]的基础上,利用拼合原理将苦参碱和甘草次酸与美法仑连接。本实验以槐果碱为原料,通过C₁₃、C₁₄位双键加成制备得苦参碱衍生物**1**,再与美法仑通过酰化反应制得目标化合物**2**;另外将18 α -甘草次酸的C₃位羟基进行乙酸酯化保护制备化合物**4**,再与美法仑乙酯(**3**)通过酰化制得目标化合物**5**,该合成路线简单,收率稳定。利用元素分析、MS、¹H-NMR确证了目标化合物的结构,并采用MTT法对其进行体外抗肿瘤活性研究,对体外活性较为显著的化合物**2**进行小鼠体内试验。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

AC-P400型核磁共振仪(瑞士Bruker公司);VGZAB-HS型质谱仪;Vanio-EL型元素分析仪(德国贺利氏公司);超净工作台(北京半导体设备一厂);BB16/BB5060仪器CO₂培养箱(上海力创科学仪器有限公司);Infinite M200酶联免疫检测仪(Tecan公司);CK40型倒置显微镜(奥林巴斯公司)。

1.2 试剂

美法仑(质量分数 $\geq 95\%$,苏州市立德化学有限公司);槐果碱(质量分数 $\geq 95\%$)、苦参碱(质量分数 $\geq 98\%$)均购自盐池县都顺生物化工有限公司;18 α -甘草次酸(质量分数 $\geq 98\%$,大连美仑生物技术有限公司);聚乙二醇400(PEG400,南京威尔化工有限公司);四甲基偶氮唑盐(MTT, Sigma公司);RPMI-1640培养基(Hyclone公司);新生牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司);二甲基亚砜(DMSO)等其余试剂均为国产分析纯。

人肝癌SMMC-7721细胞株、小鼠肝癌HepA细胞株均由天津市医药科学研究所细胞室提供。昆明种小鼠,SPF级,5~8周龄,体质量18~22 g,雌雄各半,由中国人民解放军军事医学科学院卫生学环境医学研究所动物实验中心提供,动物许可证号SCXK(军)2009-003。

2 方法与结果

2.1 合成部分

2.1.1 13-(2-氨基)乙氧基苦参碱(**1**)的合成

向100 mL干燥的三口烧瓶中加入干燥乙醇胺60 mL,在N₂保护下加入钠丝0.20 g,加热到50℃反应。钠丝反应完全后降至室温。将槐果碱(4.92 g, 0.02 mol)溶于10 mL乙醇胺,缓慢滴加到上述反应液中,升温至60℃,反应23 h。反应液中加入20 mL水终止反应,用氯仿萃取(25 mL $\times$ 3),合并萃取液,无水Na₂SO₄干燥过夜,减压浓缩得黄色油状物粗品。柱色谱分离,醋酸乙酯-乙醇(70:1)洗脱得淡黄色固体3.44 g,收率为68.8%。分子式为C₁₇H₂₉N₃O₂,元素分析(%):C(66.40),H(9.52),O(10.43),N(13.67);ESI-MS m/z : 308.2 [M+H]⁺。¹H-NMR(400 MHz, CDCl₃) δ : 3.57~3.48(2H, m, CH₂-18), 3.35~3.30(3H, m, CH₂-19, He-17), 3.13~3.02(2H, m, H-11, Ha-17), 2.89~2.77(3H, m, H-6、13, He-14), 2.68(2H, dd, $J=10.6$ 、5.2 Hz, He-2、10), 2.39(2H, dd, $J=14.0$ Hz, Ha-2、10), 2.26~2.25(1H, m, Ha-14), 1.70~1.41(12H, m, H-5、7, CH₂ $\times$ 5)。

2.1.2 13-(2-(2-氨基-3-(4-(双2-氯乙基)氨基-苯基)-丙酰胺基)-乙氧基)苦参碱(**2**)的合成

在250 mL三口烧瓶中依次加入美法仑(3.07 g, 0.01 mol)和100 mL二氯甲烷,冰浴条件下滴加4 mL草酰氯,滴加完毕后室温搅拌0.5 h,继续加热到50℃,回流反应2 h,减压蒸出二氯甲烷及多余的草酰氯,溶解到30 mL三氯甲烷中备用。

在250 mL三口烧瓶中依次加入化合物**1**(3.05 g, 0.01 mol)、1.38 g碳酸钾和100 mL三氯甲烷,冰浴条件下滴加上一步的酰氯溶液,滴加完毕后室温搅拌16 h。将反应液抽滤后,用蒸馏水洗3次,合并氯仿溶液,无水Na₂SO₄干燥过夜,减压浓缩得黄色油状物粗品。柱色谱分离,石油醚-醋酸乙酯(1:5)洗脱得淡黄色固体1.84 g,收率为31%。分子式为C₃₀H₄₅Cl₂N₅O₃,元素分析(%):C(60.58),H(7.64),O(8.08),N(11.77);ESI-MS m/z : 594.3 [M+H]⁺。¹H-NMR(400 MHz, CDCl₃) δ : 7.14(2H, d, $J=8.6$ Hz, ArH), 6.64(2H, d, $J=8.7$ Hz, ArH), 4.31~4.24(1H, m, H-21), 3.76~3.61(10H, m, CH₂Cl $\times$ 2, NCH₂ $\times$ 2, CH₂-18), 3.59~3.49(4H, m, He-17, CH₂-22, H-19), 3.14~3.03(3H, m, H-11、22, Ha-17), 2.88~2.78(3H, m, H-6、13,

He-14), 2.68 (2H, dd, $J=10.6$ 、 5.2 Hz, He-2、10), 2.40 (2H, dd, $J=14.0$ Hz, Ha-2、10), 2.27~2.25 (1H, m, Ha-14), 1.71~1.42 (12H, m, H-5、

7, $\text{CH}_2 \times 5$)。

目标化合物 **2** 的总收率为 21.3%, 其合成路线见图 1。

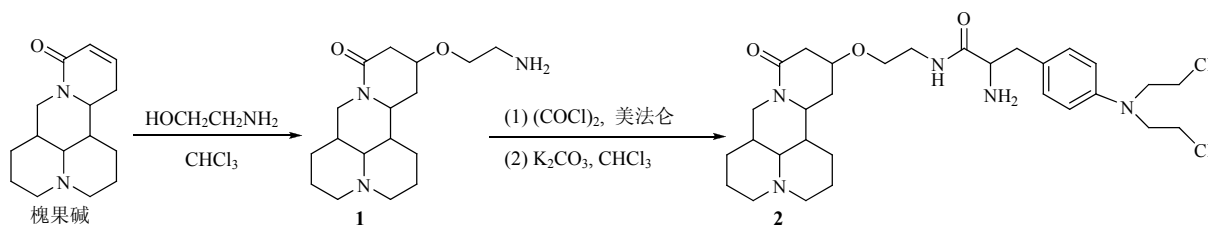


图1 目标化合物 **2** 的合成路线

Fig. 1 Synthetic route of target compound **2**

2.1.3 2-氨基-3-(4-(双 2-氯乙基)氨基-苯基)-丙酸乙酯 (**3**) 的合成

在 250 mL 三口烧瓶中依次加入美法仑 (3.07 g, 0.01 mol) 和 150 mL 无水乙醇, 冰浴条件下滴加 6 mL 二氯亚砷, 滴加完毕后冰浴搅拌 1 h, 升温至 55℃ 回流反应 4 h, 减压蒸出乙醇及多余的二氯亚砷, 剩余物中加入 20 mL 水, 饱和碳酸氢钠溶液调 pH 值至 8.0, 用氯仿萃取 (60 mL $\times$ 3), 合并萃取液, 无水 Na_2SO_4 干燥过夜, 减压浓缩得淡黄色固体 2.40 g, 收率为 72.0%。分子式为 $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_2$, 元素分析 (%): C (54.06), H (6.65), O (9.60), N (8.41); ESI-MS m/z : 333.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.08 (2H, d, $J=8.4$ Hz, Ar-H), 6.63 (2H, d, $J=8.5$ Hz, Ar-H), 4.18 (2H, q, $J=7.1$ Hz, CH_2 -3), 3.73~3.60 (9H, m, $\text{CH}_2\text{Cl} \times 2$, $\text{NCH}_2 \times 2$, H-2), 3.00 (1H, dd, $J=13.7$ 、 5.1 Hz, He-1), 2.78 (1H, dd, $J=13.7$ 、 7.8 Hz, Ha-1), 1.66 (2H, s, NH_2), 1.27 (3H, t, $J=7.1$ Hz, CH_3)。

2.1.4 3-乙酸酯基-18 α -甘草次酸 (**4**) 的合成

在 250 mL 三口烧瓶中依次加入 18 α -甘草次酸 (4.70 g, 0.01 mol)、150 mL 四氢呋喃、10 mL 三乙胺、少量 DMAP 和 5 mL 乙酸酐, 室温搅拌 16 h, 减压浓缩得淡黄色固体粗品。用石油醚-醋酸乙酯 (7:1) 混合液进行洗脱, 色谱柱分离得白色固体 3.51 g, 收率为 69.2%。分子式为 $\text{C}_{32}\text{H}_{48}\text{O}_5$, 元素分析 (%): C (74.96), H (9.45), O (15.61); ESI-MS m/z : 511.4 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 5.65 (1H, s, H-12), 4.52 (1H, dd, $J=11.6$ 、 4.8 Hz, H-3), 2.36 (1H, s, H-9), 2.24 (3H, s, COCH_3), 2.18 (1H, t, $J=10.4$ Hz, H-18), 2.03~1.97 (2H, m, CH_2 -21), 1.70~1.57 (8H, m, He-1、

6、7、22, $\text{CH}_2 \times 2$), 1.47~1.39 (7H, m, H-5, Ha-1、6、7、22, He-15、16), 1.36 (3H, s, CH_3 -29), 1.24 (3H, s, CH_3 -27), 1.16 (3H, s, CH_3 -25), 1.13 (3H, s, CH_3 -26), 1.07~1.01 (2H, m, Ha-15、16), 0.88 (6H, s, CH_3 -23、24), 0.84 (3H, s, CH_3 -28)。

2.1.5 2-(3-乙酸酯基-18 α -甘草次酸-30-甲酰胺基)-3-(4-(双 2-氯乙基)氨基-苯基)-丙酸乙酯 (**5**) 的合成

在 250 mL 三口烧瓶中依次加入化合物 **4** (2.06 g, 0.005 mol) 和 100 mL 二氯甲烷, 冰浴条件下滴加 4 mL 草酰氯, 滴加完毕后室温搅拌 0.5 h, 继续加热到 50℃, 回流反应 2 h, 减压蒸出二氯甲烷及多余的草酰氯, 溶解到 30 mL 三氯甲烷中备用。

在 250 mL 三口烧瓶中依次加入化合物 **3** (1.66 g, 0.005 mol)、0.69 g 碳酸钾和 80 mL 三氯甲烷, 冰浴条件下滴加上一步的酰氯溶液, 滴加完毕后室温搅拌 24 h。将反应液抽滤后, 用蒸馏水洗涤数次, 合并氯仿溶液, 无水 Na_2SO_4 干燥过夜, 减压浓缩得黄色油状物粗品。用石油醚-醋酸乙酯 (4:1) 混合液进行洗脱, 色谱柱分离得白色固体 1.07 g, 收率为 26.1%。分子式为 $\text{C}_{47}\text{H}_{68}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_6$, 元素分析 (%): C (68.18), H (8.28), O (11.59), N (3.38); ESI-MS m/z : 827.5 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.01 (2H, d, $J=8.4$ Hz, Ar-H), 6.67 (2H, d, $J=8.3$ Hz, Ar-H), 5.63 (1H, s, H-12), 4.87~4.83 (1H, m, H-31), 4.51 (1H, dd, $J=11.3$ 、 4.6 Hz, H-3), 4.23 (2H, q, $J=7.2$ Hz, OCH_2), 3.69 (4H, t, $J=6.5$ Hz, $\text{CH}_2\text{Cl} \times 2$), 3.61 (4H, t, $J=6.7$ Hz, $\text{NCH}_2 \times 2$), 3.11 (1H, dd, $J=14.2$ 、 5.1 Hz, Ha-32), 3.01 (1H, dd, $J=14.1$ 、 6.5 Hz, He-32), 2.33 (1H, s, H-9), 2.05 (3H, s, OCH_3),

2.02~1.90 (3H, m, H-18, CH₂-21), 1.70~1.59 (14H, m, He-6、15、16, H-5, CH₂×5), 1.34 (3H, s, CH₃-29), 1.26 (3H, s, CH₃), 1.15 (3H, s, CH₃-27), 1.11 (3H, s, CH₃-25), 1.08 (3H, s,

CH₃-26), 1.05~1.00 (2H, m, Ha-6、15), 0.88~0.87 (7H, m, Ha-16, CH₃-23、24), 0.76 (3H, s, CH₃-28)。

目标化合物 **5** 的总反应收率为 18.1%，其合成路线见图 2。

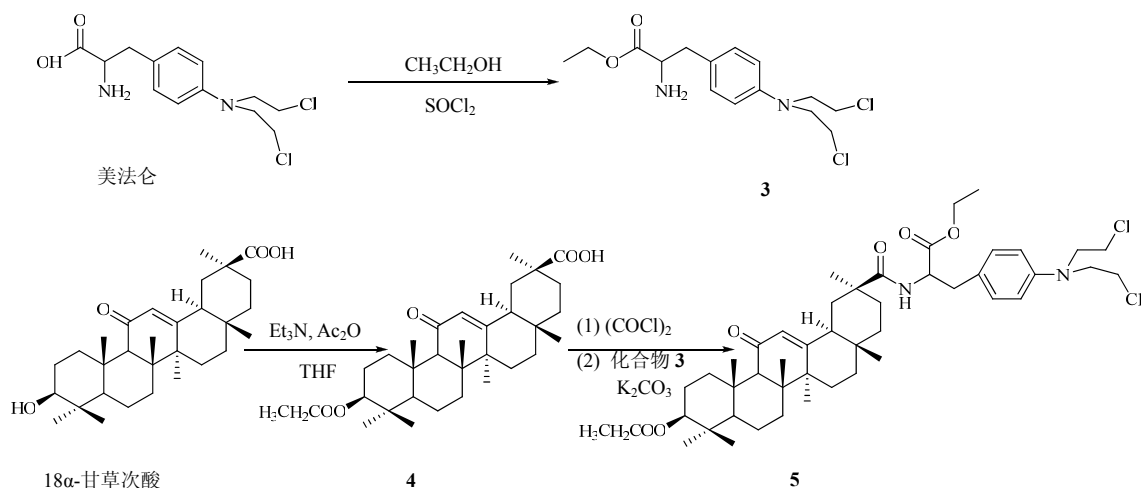


图2 目标化合物 **5** 的合成路线

Fig. 2 Synthetic route of target compound **5**

2.2 体外活性实验

采用 MTT 法测试 2 个目标化合物对人体肝癌 SMMC-7721 细胞的体外抗肿瘤作用, 以美法仑、18α-甘草次酸和苦参碱进行对照。取处于对数生长期的 SMMC-7721 细胞接种于 96 孔板中, 置恒温 CO₂ 培养箱中培养 24 h, 换液, 每孔加入 8.0、16.0、31.0、63.0、125.0、250.0、500.0、1 000.0、2 000.0 μmol/L 目标产物。每孔 100 μL, 培养 48 h 后加入 MTT 溶液 10 μL, 反应 4 h 后弃去上清液, 每孔加入 DMSO 150 μL, 振荡 5 min, 用酶联免疫检测仪在 570 nm 波长处测定每孔的吸光度 (*A*) 值, 计算目标物对肿瘤细胞生长的抑制率和半数抑制浓度 (IC₅₀)。见表 1。

$$\text{抑制率} = (A_{\text{对照}} - A_{\text{治疗}}) / A_{\text{对照}}$$

表1 目标化合物对 SMMC-7721 的细胞毒活性

Fig. 1 Cytotoxic effect of target compounds on SMMC-7721

化合物	IC ₅₀ /(μmol·L ⁻¹)
化合物 2	54.7
化合物 5	311.2
18α-甘草次酸	211.2
苦参碱	1 270.0
美法仑	199.0

MTT 结果显示目标化合物 **2** 对人肝癌 SMMC-7721 细胞株的体外抗肿瘤活性明显高于化合物 **5**、18α-甘草次酸、苦参碱和美法仑, 然后将化合物 **2** 进一步进行小鼠体内的抗肿瘤活性研究。

2.3 体内活性试验

取接种肿瘤细胞 6~8 d 的 HepA 荷瘤小鼠, 无菌条件下抽取腹水, 3 倍生理盐水稀释, 配制成肿瘤细胞混悬液, 然后将其接种于小鼠的腋窝皮下, 0.2 mL/只。接种次日, 将小鼠随机分为 5 组, 每组 10~14 只, 雌雄各半, 即对照组、美法仑组和化合物 **2** 低、中、高剂量组 (3、6、9 μmol/kg), 各组均采用 20% PEG400 的水溶液配制。对照组均给予相同对应量的 20% PEG400 的水溶液, 其他各组给予相应浓度的药物, 药物现用现配。按照 0.2 mL/20 g ip 给药。给药 7 d 后, 颈椎脱臼处死, 剥离瘤体, 称量质量, 计算肿瘤抑制率^[14-15]。见表 2。

$$\text{肿瘤抑制率} = 1 - \text{试验组平均瘤质量} / \text{对照组平均瘤质量}$$

由表 2 可知, 化合物 **2** 在中剂量 (6 μmol/kg) 和高剂量 (9 μmol/kg) 对小鼠 HepA 的抑制率分别为 52.00%、61.12%, 6 μmol/kg 美法仑的抑制率为 39.93%, 化合物 **2** 的抑瘤效果优于美法仑, 尤以高剂量效果最为明显, 对于 HepA 的抑瘤效果则超过美法仑近 20% ($P < 0.05$)。

表 2 化合物 2 对 HepA 瘤的抑制作用

Fig. 2 Antitumor activity of compound 2 against HepA

组别	剂量/($\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$)	动物数/只		动物体质量/g		瘤质量/g	抑瘤率/%
		开始	结束	开始	结束		
对照	—	12	12	21.3 $\pm$ 1.4	30.6 $\pm$ 1.7	3.873 $\pm$ 0.507	—
美法仑	6	10	10	21.2 $\pm$ 1.6	29.5 $\pm$ 3.4	2.327 $\pm$ 0.654**	39.93
化合物 2	3	12	12	21.4 $\pm$ 1.3	30.7 $\pm$ 2.6	2.851 $\pm$ 0.634**	26.38
	6	12	12	21.0 $\pm$ 1.1	28.6 $\pm$ 2.8	1.859 $\pm$ 0.836**	52.00
	9	12	12	21.1 $\pm$ 1.3	28.0 $\pm$ 1.9	1.506 $\pm$ 0.901***	61.12

与对照组比较: ** $P<0.01$; 与美法仑组比较: # $P<0.05$

** $P<0.01$ vs control group; # $P<0.05$ vs melphalan group

3 讨论

本文对设计合成的目标化合物进行抗肿瘤活性的体内外筛选, 采用 MTT 法测试 2 个目标化合物对人肝癌 SMMC-7721 细胞的体外抗肿瘤作用, 得到活性较为显著的化合物 2, 并进一步进行小鼠体内实验。体内实验结果表明, 与对照组比较, 化合物 2 各剂量对小鼠 HepA 肿瘤的生长抑制作用比较显著, 抑制作用呈现剂量相关性; 与美法仑比较, 化合物 2 对小鼠 HepA 的抑瘤效果优于美法仑, 其中高剂量组的抑瘤效果更加显著。

利用苦参碱对美法仑进行衍生化改造可以在一定程度上提高对肝癌的抗肿瘤活性, 可能是由于苦参碱具有保肝护肝作用, 与美法仑产生协同作用。苦参碱和甘草次酸作为一种有前景的抗肝癌中药对美法仑进行拼合修饰, 有望发展成为很好的小分子肝靶向载体, 为肝靶向新药的研发提供新的思路。该化合物的体外及体内活性均较为显著, 有望发展成新的抗肿瘤候选化合物, 详细的作用机制目前正在进一步研究中。

参考文献

- [1] Li D, Lu B, Huang Z, *et al.* A novel melphalan polymeric prodrug: preparation and property study [J]. *Carbohydr Polym*, 2014, 111: 928-935.
- [2] Yang J, Wang J, Zhu S, *et al.* C-reactive protein augments hypoxia-induced apoptosis through mitochondrion-dependent pathway in cardiac myocytes [J]. *Mol Cell Biochem*, 2008, 310(1/2): 215-226.
- [3] 冉铁成, 刘瑞丽, 尹娟娟, 等. C₆₀ 吡咯烷苯氮芥的合成和放射性碘标记 [J]. *核技术*, 2006, 29(5): 349-353.
- [4] 吴金声, 冉铁成, 李晴暖, 等. C₆₀-氮芥对胃癌生长和

转移抑制作用的实验研究 [J]. *临床肿瘤学杂志*, 2007, 12(1): 44-47.

- [5] 刘 斐, 商 倩, 张士俊. 中药活性成分抗肝癌的研究进展 [J]. *现代药物与临床*, 2012, 27(6): 624-628.
- [6] 蔡怀阳, 殷 飞, 杜韶波, 等. 不同浓度苦参碱对肝癌细胞增殖及 JAK-STAT 信号通路的影响 [J]. *中药药理与临床*, 2010, 26(2): 21-24.
- [7] 石 鹏, 刘伟中, 梁 超, 等. 苦参碱对人肝癌细胞及正常肝细胞增殖和粘附功能影响的比较 [J]. *江西医药*, 2009, 44(10): 955-958.
- [8] 孟艳秋, 杨 哲, 张 萌, 等. 甘草次酸 C₃、C₁₁、C₃₀ 衍生物的合成及其体外抗肿瘤活性研究 [J]. *现代药物与临床*, 2014, 29(1): 6-10.
- [9] Luo H L, Huang W, Zhang Z L, *et al.* 18 β -glycyrrhetic acid-induced apoptosis and relation with intracellular Ca²⁺ release in human breast carcinoma cells [J]. *CJCO*, 2004, 3(3): 137-140.
- [10] 赵龙铨, 张晓翠, 赵春晖, 等. 甘草次酸衍生物的合成与表征 [J]. *大连大学学报*, 2011, 32(3): 40-43.
- [11] 靳如芳, 刘 静, 张金晓, 等. 甘草次酸及其衍生物 TY501 对小鼠巨噬细胞 RAW264.7 增殖的影响 [J]. *药物评价研究*, 2011, 34(4): 255-257.
- [12] 木合布力·阿布力孜, 闵 杰, 热娜卡·西莫夫. 18- α 甘草次酸及其甲酯的制备 [J]. *西北药学杂志*, 2009, 24(1): 58-59.
- [13] 张 娜, 崔晓燕, 赵秀梅, 等. 甘草次酸-苦参碱复合物的合成及其抗肿瘤活性研究 [J]. *现代药物与临床*, 2014, 29(11): 1199-1202.
- [14] 李传刚, 李墨林, 舒晓宏, 等. 单一剂量美法仑治愈肝癌 C57BL/6 小鼠动物模型的建立 [J]. *大连医科大学学报*, 2007(4): 329-331.
- [15] 魏 伟, 吴希美, 李元建. *药理实验方法学* [M]. 第 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2007.