

3-*O*-(3-甲氧基肉桂酰)-甘草次酸酯对 HepG2 细胞体外抑制作用研究

闫萌萌^{1#}, 郭文博^{1#}, 褚福浩¹, 徐冰¹, 王伟¹, 贾晓慧¹, 韩耀天¹, 张宇忠², 王鹏龙^{1*}, 雷海民^{1*}

1. 北京中医药大学 中药学院, 北京 100102

2. 北京中医药大学 基础医学院, 北京 100029

摘要: **目的** 探讨 3-*O*-(3-甲氧基肉桂酰)-甘草次酸酯对 HepG2 细胞体外抑制作用及其作用机制。**方法** 采用 MTT 法考察药物对肝癌细胞 HepG2、宫颈癌细胞 HeLa、结肠癌细胞 HT-29、心肌细胞 H9C2、犬肾上皮细胞 MDCK 和血管内皮细胞 HY926 的细胞毒性, 利用细胞染色法观察不同浓度 3-*O*-(3-甲氧基肉桂酰)-甘草次酸酯对 HepG2 细胞形态的影响, 流式细胞术评价该化合物诱导 HepG2 细胞的凋亡。**结果** 3-*O*-(3-甲氧基肉桂酰)-甘草次酸酯具有较好的抑制 HepG2 细胞增殖活性作用, 其半数有效抑制浓度 (IC₅₀) 为 8.28 μmol/L, 明显强于甘草次酸的活性 (IC₅₀ > 50 μmol/L)。3-*O*-(3-甲氧基肉桂酰)-甘草次酸酯及其合成原料甘草次酸、3-甲氧基肉桂酸对非肿瘤细胞 MDCK、HY926、H9C2 细胞毒性较弱 (IC₅₀ > 24 μmol/L)。3-*O*-(3-甲氧基肉桂酰)-甘草次酸酯浓度在 12.5 μmol/L 时, 对 MDCK、HY926、H9C2 细胞抑制率分别为 17.05%、16.08%、4.66%, 与对 HepG2 细胞的抑制效果相比差异明显。不同浓度 3-*O*-(3-甲氧基肉桂酰)-甘草次酸酯对 HepG2 细胞 Giemsa 染色、H33342 染色的细胞形态有明显差异。随着 3-*O*-(3-甲氧基肉桂酰)-甘草次酸酯浓度的升高, 早期凋亡率逐渐增加, 而晚期凋亡率无明显变化, 提示 3-*O*-(3-甲氧基肉桂酰)-甘草次酸酯可以有效地诱导细胞早期凋亡, 并呈现一定的量效关系。**结论** 3-*O*-(3-甲氧基肉桂酰)-甘草次酸酯具有良好的抗肿瘤作用, 对 HepG2 细胞抑制效果最好, 对非癌细胞 MDCK、HY926、H9C2 没有明显抑制效果, 该作用主要通过诱导 HepG2 细胞凋亡, 且呈现一定的量效关系。

关键词: 3-*O*-(3-甲氧基肉桂酰)-甘草次酸酯; 甘草次酸; 3-甲氧基肉桂酸; HepG2 细胞; 抑制作用; 细胞凋亡

中图分类号: R966 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2016)11-1692-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2016.11.002

Inhibition of 3-*O*-(3-methoxy cinnamoyl)-glycyrrhetic acid ester against HepG2 cells *in vitro*

YAN Meng-meng¹, GUO Wen-bo¹, CHU Fu-hao¹, XU Bing¹, WANG Wei¹, JIAO Xiao-hui¹, HAN Yao-tian¹, ZHANG Yu-zhong², WANG Peng-long¹, LEI Hai-min¹

1. College of Traditional Chinese, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China

2. The School of Preclinical Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Abstract: Objective To study the inhibitory effect of 3-*O*-(3-methoxy cinnamoyl)-glycyrrhetic acid ester against HepG2 cells *in vitro* and explore its mechanism. **Methods** Cytotoxicities of 3-*O*-(3-methoxy cinnamoyl)-glycyrrhetic acid ester against three tumour cells lines (HepG2, HeLa, HT-29) and three normal cell lines (H9C2, MDCK, and HY926) were detected by MTT assay. Effects of various concentration of 3-*O*-(3-methoxy cinnamoyl)-glycyrrhetic acid ester on morphological changes of HepG2 cells were investigated by Giemsa staining and H33342 staining. Apoptosis of HepG2 cells induced by the compound was evaluated by flow cytometry. **Results** 3-*O*-(3-Methoxy cinnamoyl)-glycyrrhetic acid ester had better inhibition of HepG2 cell proliferation activity with IC₅₀ of 8.28 μmol/L than that (IC₅₀ > 50 μmol/L) of glycyrrhetic acid. 3-*O*-(3-Methoxy cinnamoyl)-glycyrrhetic acid ester and its precursor drugs glycyrrhetic acid and (3-methoxy) cinnamoyl acid had weak cytotoxicities against MDCK, HY926,

收稿日期: 2016-07-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81173519); 北京市与中央在京高校共建项目 (BJGJ1528); 北京中医药大学创新团队资助项目 (2011-CXTD-15)

作者简介: 闫萌萌, 女, 在读研究生。Tel: 18810689330 E-mail: yanmengmeng@bucm.edu.cn

郭文博, 男, 本科生。Tel: 13001046968 E-mail: wb_guo@126.com

***通信作者** 雷海民 (1968—), 男, 陕西渭南人, 研究员, 博士生导师, 从事中药先导化合物发现与开发。Tel: (010)84738641 E-mail: hm_lei@126.com

王鹏龙 (1985—), 男, 河北唐山山人, 讲师, 博士, 研究方向为中药功效成分修饰及活性筛选。Tel: (010)84738641 E-mail: wpl581@126.com

[#]闫萌萌和郭文博为共同第一作者

and H9C2 cells. The inhibitory rates of 3-*O*-(3-methoxy cinnamoyl)-glycyrrhetic acid ester at concentration of 12.5 $\mu\text{mol/L}$ against MDCK, HY926, and H9C2 cells were 17.05%, 16.08%, and 4.66%, which had significant differences compared with the inhibitory effects on HepG2 cells. There were obvious differences on morphological changes of HepG2 cells at various concentration of 3-*O*-(3-methoxy cinnamoyl)-glycyrrhetic acid ester stained by Giemsa staining and H3334 staining methods. With 3-*O*-(3-methoxy cinnamoyl)-glycyrrhetic acid ester concentration increased, the early apoptosis rate increased gradually, but had no obvious change rate of late apoptosis, and the results showed that the drug effectively induced HepG2 cell apoptosis, with dose-dependent relationship.

Conclusion 3-*O*-(3-Methoxy cinnamoyl)-glycyrrhetic acid ester displays good anti-tumor effect, which has a considerable inhibition against HepG2 but low toxicity effect on normal cells MDCK, HY926, and H9C2. Its mechanism may be related to apoptosis of HepG2 cells, and has a dose-response relationship.

Key word: 3-*O*-(3-methoxy cinnamoyl)-glycyrrhetic acid ester; glycyrrhetic acid; (3-methoxy) cinnamoyl acid; HepG2 cell; inhibitory effect; cell apoptosis

从中医经典方药中发现先导化合物的研究思路,引起越来越多学者的关注^[1-4]。当前大量研究表明中医经典方药“桂枝甘草汤”中活性成分甘草次酸、肉桂酸及其类似物可以作为抗癌先导化合物发现的母体结构加以修饰^[5-7]。已有研究发现,在甘草次酸的 3-OH 进行酯化反应,可以有效地提高其抗癌活性^[8-9]。另外,肉桂酸及其类似物也因其具有良好的抗肿瘤活性被人们广泛研究^[10-11]。其中有研究表明,化合物中接入肉桂酸分子可以增强药物的选择性^[12]。因此,将甘草次酸与肉桂酸结合进行研究具有重要意义。本课题组前期基于“桂枝甘草汤”方中活性成分,借鉴中药的配伍法则和药物设计的结构拼合原理,设计、合成系列甘草次酸-肉桂酸衍生物,通过多种体外细胞模型筛选,发现该类结构具有良好的抗癌活性。但前期研究中并没有对 3-*O*-(3-甲氧基肉桂酰)-甘草次酸酯(图 1)深入研究其细胞毒选择性及其抗癌作用的机制,故本实验在前期工作基础上,分别利用 HepG2、Hela、HT-29、H9C2、MDCK 和 HY926 细胞模型探讨该样品细胞毒性的选择性,并结合细胞染色法、流式细胞术探讨其作用机制。

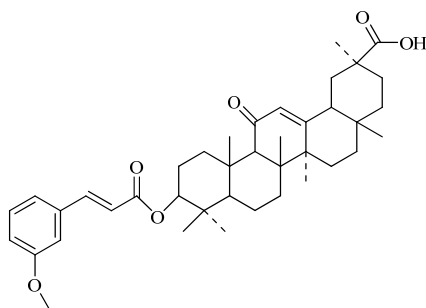


图 1 3-*O*-(3-甲氧基肉桂酰)-甘草次酸酯结构

Fig. 1 Structure of 3-*O*-(3-methoxy cinnamoyl)-glycyrrhetic acid ester

1 材料

人肝癌细胞系 HepG2、人宫颈癌细胞 HeLa 由中国科学院纳米科研中心提供,人结肠癌细胞系 HT-29、犬肾上皮细胞系 MDCK、血管内皮细胞系 HY926、心肌细胞系 H9C2 购于北京协和医院细胞资源中心。

RPMI-1640 培养基、DMEM 培养基、0.25%胰蛋白酶溶液、磷酸盐缓冲盐(PBS)、Gibco 胎牛血清(FBS)、Giemsa 染料、H33342 染料均购自北京拜尔迪生物科技有限公司;无水乙醇(北京化工厂);Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡试剂盒(北京凯基生物有限公司);噻唑蓝(MTT,阿拉丁);二甲基亚砜(DMSO,北京化工厂);青链霉素混合液(100x, Solarbio, 100 mL);3-*O*-(3-甲氧基肉桂酰)-甘草次酸酯(自制,质量分数 $\geq 95\%$)、甘草次酸(批号 110408,质量分数 $\geq 98\%$)购自南京泽朗医药科技有限公司,3-甲氧基肉桂酸(批号 10123347,质量分数 $\geq 98\%$)购自阿法埃莎(天津)化学有限公司,注射用顺铂(批号 301001CF,规格 10 mg/支,齐鲁制药有限公司)。

Thermo 3111 型 CO₂ 培养箱、Multiskan GO 酶标仪、Olympus 倒置荧光显微镜、流式细胞仪、细胞计数器、25 cm² 细胞培养瓶、96 孔板(北京拜尔迪生物科技有限公司),其他耗材均为国产耗材。

2 方法

2.1 细胞培养

冻存 HepG2、HeLa、HT-29、HY926、MDCK、H9C2 细胞复苏,培养在 RPMI-1640 或 DMEM 培养液(含 10% FBS, 1% 双抗)中,放置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。细胞均贴壁状态生长,在倒置显微镜下观察生长状况,待细胞数量适量,生长状态良好(对数生长)时传代培养或铺板。

2.2 对细胞增殖的抑制试验 (MTT 试验)

取对数生长期的细胞, 0.25%胰酶消化, 培养液制备细胞悬液至密度约 $3 \times 10^4/\text{mL}$, 以每孔 3 000 个细胞 (100 μL) 接种于 96 孔板中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养 24 h, 空白对照组每孔加入 100 μL 培养液, 给药组加入 3-*O*-(3-甲氧基肉桂酰)-甘草次酸酯, 对照组加入甘草次酸、3-甲氧基肉桂酸, 每孔均加入 100 μL 不同浓度的化合物溶液, 使终浓度分别为 100、50、25、12.5、6.25、3.125 $\mu\text{mol/L}$, 阳性对照组每孔加入 100 μL 不同浓度的顺铂稀释液, 使终浓度分别为 20、10、5、2.5、1.25、0.625 $\mu\text{mol/L}$, 每一个浓度设 3 个平行孔。37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下继续培养 72 h 后, 每孔加 MTT 20 μL , 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下继续培养 4 h, 弃去孔内液体, 每孔加入二甲基亚砷 150 μL , 用酶标仪于 490 nm 下测吸光度 (A) 值。实验重复 3 次, 计算对细胞生长的抑制率。采用 Graphpad Prism 5.0 软件计算半数有效抑制浓度 (IC_{50}) 值。

2.3 细胞染色试验

2.3.1 Giemsa 染色试验 取对数生长期的 HepG2 细胞, 以 $5 \times 10^4/\text{孔}$ (1 mL) 接种于 12 孔培养板中, 在含 5% CO_2 的湿化培养箱中 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h, 空白对照组加入 1 mL 培养液, 给药组每孔分别加入 1 mL 不同浓度 3-*O*-(3-甲氧基肉桂酰)-甘草次酸酯, 使最终浓度分别为 5、10、20 $\mu\text{mol/L}$, 每个浓度重复 3 孔。培养箱中继续培养 72 h 后, 弃去细胞培养液, 用 PBS 清洗 2 次, 用 PBS - 乙醇 (1:1) 浸润 2 min, 弃去, 用乙醇固定 10 min, 弃去, Giemsa 染料染色 2 min, 清水洗去染料, 在倒置显微镜 200 倍下观察细胞形态。

2.3.2 H33342 染色试验 取对数生长期的 HepG2 细胞, 以 $5 \times 10^4/\text{孔}$ (1 mL) 接种于 12 孔培养板中,

在含 5% CO_2 的湿化培养箱中 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h, 空白对照组加入 1 mL 的培养液, 每孔分别加入 1 mL 不同浓度 3-*O*-(3-甲氧基肉桂酰)-甘草次酸酯, 使最终浓度分别为 5、10、20 $\mu\text{mol/L}$, 每个浓度重复 3 孔。培养箱中继续培养 72 h 后, 弃去细胞培养液, PBS 清洗 2 次, PBS - 乙醇 (1:1) 浸润 2 min, 弃去, 乙醇固定 10 min, 弃去, H33342 染料染色 2 min, 清水洗去染料, 倒置显微镜 200 倍下观察细胞形态。

2.4 流式细胞术检测药物诱导 HepG2 细胞凋亡

收集对数生长期的 HepG2 细胞, 计数, 以 5×10^4 个/孔 (1 mL) 的细胞数接种在 12 孔培养板中, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱中培养 24 h 后弃去上层培养液, 分别加入 5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ 3-*O*-(3-甲氧基肉桂酰)-甘草次酸酯的细胞培养液各 2 mL, 每个浓度重复 3 个复孔, 空白对照组加入相同体积的空白细胞培养液。继续培养 72 h 后, 分别用适量的 0.25%胰蛋白酶溶液 (不含 EDTA) 消化, 收集细胞, 1 000 r/min、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min 后, 弃上清, 用 PBS 清洗 2 遍后, 将细胞重悬于 200 μL Binding Buffer 液中, 分别加入 10 μL AnnexinV-FITC 液, 轻轻混匀, 避光反应 15 min 后, 加入 5 μL PI 液, 用流式细胞仪分析, 收集 10 000 个细胞荧光信号

2.5 统计方法

实验数据采用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析, 各组实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间差异采用单因素方差分析 (One-way ANOVA), 组间两两比较采用 LSD 法进行。

3 结果

3.1 肿瘤细胞增殖抑制作用和细胞毒性

3-*O*-(3-甲氧基肉桂酰)-甘草次酸酯具有较好的抑制 HepG2 细胞增殖活性, 其 IC_{50} 为 8.28 $\mu\text{mol/L}$, 明显强于甘草次酸的活性 ($\text{IC}_{50} > 50 \mu\text{mol/L}$), 见表 1。

表 1 3-*O*-(3-甲氧基肉桂酰)-甘草次酸酯对 6 种细胞模型的抑制效果

Table 1 Inhibition of 3-*O*-(3-methoxy cinnamoyl)-glycyrrhetic acid ester on six types of cell models

化合物	$\text{IC}_{50}/(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$					
	HeLa	HepG2	HT-29	MDCK	HY926	H9C2
3- <i>O</i> -(3-甲氧基肉桂酰)-甘草次酸酯	14.38 ± 1.52	8.28 ± 1.10	14.8 ± 1.80	24.68 ± 2.56	29.34 ± 1.87	> 100
甘草次酸	> 50	> 50	> 50	> 100	> 100	> 100
3-甲氧基肉桂酸	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50
顺铂	3.76 ± 0.38	4.57 ± 0.85	5.28 ± 0.74	9.97 ± 1.12	5.12 ± 0.71	5.31 ± 0.26

显微镜下观察发现化合物 3-*O*-(3-甲氧基肉桂酰)-甘草次酸酯作用 HepG2 细胞后, 癌细胞质中颗粒、空泡增多, 部分细胞漂浮、死亡, 细胞数明显减少; 与顺铂对 HepG2 细胞的抑制效果 ($IC_{50}=4.57 \mu\text{mol/L}$) 接近。为了能够获得更好的观察效果, 在直接镜下观察基础上, 针对药物干预前后细胞进行了 Giemsa 染色。

此外, 通过对非肿瘤细胞 MDCK、HY926、H9C2 细胞的毒性测试表明, 3-*O*-(3-甲氧基肉桂酰)-甘草次酸酯及其合成原料甘草次酸、3-甲氧基肉桂酸毒性较弱 ($IC_{50}>24 \mu\text{mol/L}$); 但顺铂对 3 种非肿瘤细胞具有较强的细胞毒性, 其 IC_{50} 分别为 9.97、5.12、5.31 $\mu\text{mol/L}$ 。

3.2 对 HepG2 细胞、3 种正常细胞的毒性选择性

3-*O*-(3-甲氧基肉桂酰)-甘草次酸酯浓度在 12.5 $\mu\text{mol/L}$ 时, 对 MDCK、HY926、H9C2 细胞抑制率分别为 17.05%、16.08%、4.66%, 与对 HepG2 细胞的抑制效果相比差异明显, 其中对心肌细胞 H9C2 的选择指数[selectivity index, $SI=IC_{50}(\text{H9C2})/IC_{50}(\text{HepG2})$]大于 12, 具有高效、低毒、抗癌选择性的先导化合物的特点, 见图 2。

3.3 细胞染色

3.3.1 Giemsa 染色 3-*O*-(3-甲氧基肉桂酰)-甘草次酸酯诱导细胞形态的改变见图 3。不同浓度 3-*O*-(3-甲氧基肉桂酰)-甘草次酸酯对 HepG2 细胞形态有明显差异, 空白对照组细胞形态完整, 胞间联系紧密。随着药物浓度的增加, 细胞间的联系丧失、核着色变浅、核溶解、细胞碎片增多; 药物浓度为 10、20 $\mu\text{mol/L}$ 时, 没有完整形态的细胞存在, 量效关系非常明显。

3.3.2 H33342 染色 3-*O*-(3-甲氧基肉桂酰)-甘草次酸酯诱导细胞形态的改变见图 4。不同浓度 3-*O*-(3-甲氧基肉桂酰)-甘草次酸酯对 HepG2 细胞形态有明显差异, 空白对照组细胞形态完整, 胞间联系紧密。随着药物浓度的增加, 细胞间的联系丧失、核着色变浅、核溶解、细胞碎片增多; 药物浓度为 10、20 $\mu\text{mol/L}$ 时, 没有完整形态的细胞存在, 量效关系非常明显。

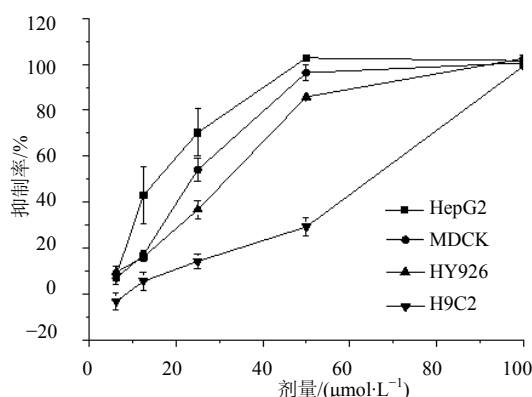


图 2 3-*O*-(3-甲氧基肉桂酰)-甘草次酸酯对 HepG2 细胞和 3 种正常细胞增殖的抑制作用

Fig. 2 Inhibition of 3-*O*-(3-methoxy cinnamoyl)-glycyrrhetic acid ester on HepG2 and three normal cells

(3-甲氧基肉桂酰)-甘草次酸酯对 HepG2 细胞形态有明显差异, 空白对照组细胞形态完整, 胞间联系紧密。随着药物浓度的增加, 核着色变浅、核溶解破碎、细胞碎片增多、细胞质固缩; 药物浓度为 10、20 $\mu\text{mol/L}$ 时, 没有完整的细胞核存在。

3.4 流式细胞术检测 3-*O*-(3-甲氧基肉桂酰)-甘草次酸酯诱导 HepG2 细胞凋亡

以 FITC 荧光为横坐标, PI 荧光为纵坐标作双参数点图, 细胞分为 Q1、Q2、Q3、Q4 4 个区域, 分别代表机械损伤细胞区、晚期凋亡细胞区、正常细胞区、早期凋亡区, 见图 5。

根据流式细胞术测试结果可以发现, 随着 3-*O*-(3-甲氧基肉桂酰)-甘草次酸酯浓度的升高, 早期凋亡率逐渐增加, 而晚期凋亡率无明显变化, 见表 2。结果提示 3-*O*-(3-甲氧基肉桂酰)-甘草次酸酯可以有效地诱导细胞早期凋亡, 并呈现一定的量效关系。

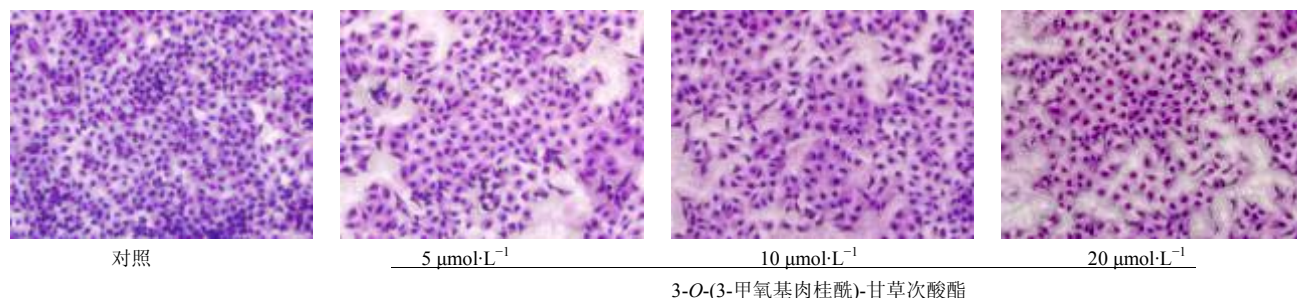


图 3 HepG2 细胞形态 (Giemsa 法染色)

Fig. 3 Morphological changes of HepG2 cells (Giemsa staining)

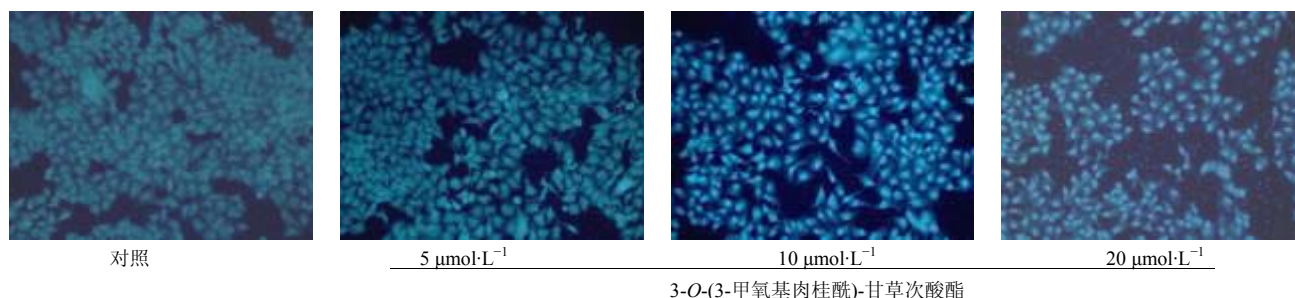


图 4 HepG2 细胞形态 (H33342 法染色)

Fig. 4 Morphological changes of HepG2 cells (Giemsa staining)

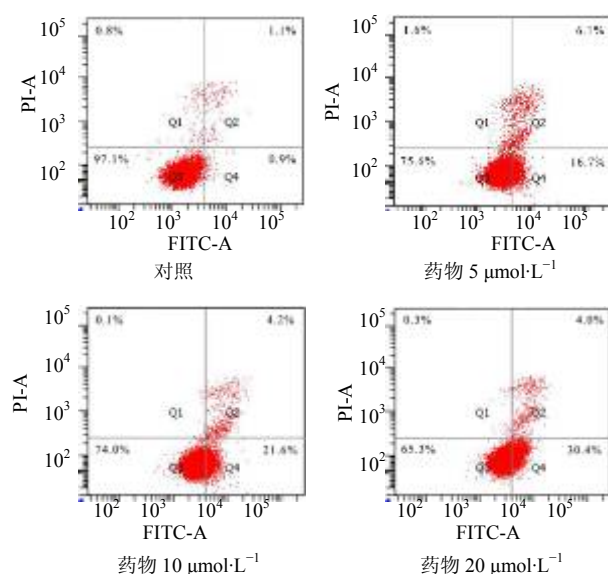


图 5 3-O-(3-甲氧基肉桂酰)-甘草次酸酯对 HepG2 细胞凋亡的影响

Fig. 5 Effects of 3-O-(3-methoxy cinnamoyl)-glycyrrhetic acid ester on apoptosis of HepG2 cells

表 2 3-O-(3-甲氧基肉桂酰)-甘草次酸酯诱导 HepG2 细胞凋亡结果

Table 2 Apoptosis results of HepG2 induced by 3-O-(3-methoxy cinnamoyl)-glycyrrhetic acid ester

凋亡时期	凋亡率/%			
	0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
早期凋亡	0.90	16.70	21.60	30.40
晚期凋亡	1.10	6.10	4.20	4.00

4 讨论

甘草是我国传统中药材, 在 2 000 多种中草药中甘草的用量是最大的, 中药配方中素有“十方九草, 无草不成方”之说。国内外对甘草中所含的甘草酸、甘草次酸的药理活性进行了深入系统的研究。

结果表明, 甘草酸及其甘草次酸具有保肝解毒、抗肿瘤活性, 并能促进癌细胞的凋亡^[13-14]。近年来国内外相关研究证实细胞表面的确存在大量甘草次酸的特异性结合位点。本实验依据甘草次酸的肝靶向性活性特点, 选择以甘草次酸及其衍生物作为靶向载体, 设计合成靶向性抗癌药物^[15-16]。

同时, 苯丙烯酸类是在植物中广泛存在的酚酸类成分, 也是很重要的简单苯丙素类化合物。苯丙烯酸类具有抗肿瘤、抗炎、抗血小板聚集的作用, 近几年的国内外研究表明, 它具有广泛的抗实体瘤活性, 包括难治性前列腺癌、肺癌、胶质细胞瘤、肝癌等, 对肿瘤细胞具有抑制其生长增殖、诱导其分化的作用, 而且其衍生物抗肿瘤活性呈现一定选择性^[7, 10, 17]。

单一中药有效成分并不具备中药的药效及协同起效的优势。本课题组在前期实验中设计拼合 3-O-(3-甲氧基肉桂酰)-甘草次酸酯, 本实验利用 6 种细胞筛选模型进行活性筛选, 发现 3-O-(3-甲氧基肉桂酰)-甘草次酸酯具有良好的抗肿瘤作用, 对癌细胞模型 HeLa、HepG2、HT-29 细胞的抑制效果 ($\text{IC}_{50} < 15 \mu\text{mol/L}$) 明显强于拼合前体甘草次酸和 3-甲氧基肉桂酸 ($\text{IC}_{50} > 50 \mu\text{mol/L}$), 其中对 HepG2 细胞抑制效果最好 ($\text{IC}_{50} = 8.28 \mu\text{mol/L}$)。而当 3-O-(3-甲氧基肉桂酰)-甘草次酸酯给药剂量小于 20 $\mu\text{mol/L}$ 时, 对 3 种非癌细胞 MDCK、HY926、H9C2 没有明显抑制效果, 尤其对 H9C2 细胞的影响最弱 ($\text{SI} > 12$), 远远低于阳性对照药顺铂对 3 种非癌细胞毒性 ($\text{IC}_{50} < 10 \mu\text{mol/L}$); 另外, 通过 Giemsa 染色、H33342 染色和流式细胞术等方法进一步验证了 3-O-(3-甲氧基肉桂酰)-甘草次酸酯能够诱导 HepG2 细胞凋亡, 且呈现一定的量效关系。

综上所述 3-O-(3-甲氧基肉桂酰)-甘草次酸酯具有高效、低毒、选择性好的特点, 具有深入研究和

开发的價值。本實驗選擇性抗癌先導化合物的發現過程在一定程度上體現了中藥源頭的创新思維，同時也證明了在中医經典方藥中探尋具有良好生物活性的先導化合物是發現研究创新藥物的有效途徑，進一步說明了借鑒中藥的配伍法則和藥物設計的结构拼合原理設計合成藥物具有重要意義。

参考文献

- [1] Liang D, Zhou Q, Zhang J, *et al.* A novel chenodeoxycholic acid-verticinone ester induces apoptosis and cell cycle arrest in HepG2 cells [J]. *Steroids*, 2012, 77(13): 1381-1390.
- [2] Zhang C, Yan W, Li B, *et al.* A New ligustrazine derivative-selective cytotoxicity by suppression of NF- κ B/p65 and COX-2 expression on human hepatoma cells. Part 3 [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(7): 16401-16413.
- [3] Xu B, Chu F, Zhang Y, *et al.* A series of new ligustrazine-triterpenes derivatives as anti-Tumor agents: design, synthesis, and biological evaluation [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(9): 21035-21055.
- [4] 吳吉洋, 高方圓, 叶曉嵐, 等. 创新藥物川阿格雷及其拼合分子阿魏酸和川芎嗪的質譜裂解規律 [J]. 第二軍醫大學學報, 2012, 33(7): 755-758.
- [5] 孟艷秋, 劉立偉, 劉冬瑩, 等. 甘草次酸 C₃、C₃₀ 衍生物的合成及其体外抗肿瘤活性研究 [J]. 現代藥物與臨床, 2015, 30(6): 610-615.
- [6] 康蕾, 李學強, 王鳳榮. 18 β -甘草次酸結構修飾及生物活性研究進展 [J]. 中藥藥, 2012, 43(7): 1430-1442.
- [7] Su P, Shi Y, Wang J, *et al.* Anticancer agents derived from natural cinnamic acids [J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2015, 15(8): 980-987.
- [8] Csuk R. Recent developments in the synthesis of antitumor-active glycyrrhetic acid derivatives [J]. *Mini Re Org Chem*, 2014, 11(3): 253-261.
- [9] Sharma R, Guru S K, Jain S K, *et al.* 3-(2, 6-Dichlorobenzyloxy)-11-oxo-olean-12-ene-29-oic acid, a semisynthetic derivative of glycyrrhetic acid: synthesis, antiproliferative, apoptotic and anti-angiogenesis activity [J]. *Med Chem Comm*, 2014, 6(4): 564-575.
- [10] De P, Baltas M, Bedos-Belval F. Cinnamic acid derivatives as anticancer agents-a review [J]. *Curr Med Chem*, 2011, 18(11): 1672-1703.
- [11] Zhang W M, Xing M, Zhao T T, *et al.* Synthesis, molecular modeling and biological evaluation of cinnamic acid derivatives with pyrazole moieties as novel anticancer agents [J]. *RSC Advances*, 2014, 4(70): 37197-37207.
- [12] Xu C C, Deng T, Fan M L, *et al.* Synthesis and *in vitro* antitumor evaluation of dihydroartemisinin-cinnamic acid ester derivatives [J]. *Eur J Med Chem*, 2016, 107: 192-203.
- [13] 黃敏, 李坤, 靳書語, 等. 18 β -甘草次酸類衍生物的設計, 合成及抑制腫瘤細胞增殖活性 [J]. 藥學學報, 2015, 50(10): 1263-1271.
- [14] 高振北, 胡君, 康瀟, 等. 18 β -甘草次酸 A 環官能團化衍生物的合成及抗肿瘤活性 [J]. 高等學校化學學報, 2012, 33(4): 750-754.
- [15] 米雪, 趙岩, 楊慧. 甘草次酸及其衍生物在肝靶向藥物中的應用 [J]. 天津藥學, 2014, 26(1): 41-45.
- [16] 周金幸, 臧新龍, 李季, 等. 甘草次酸介導 pH 敏感主動靶向長循環阿霉素脂質體的製備及其藥物動力學 [J]. 沈陽藥科大學學報, 2015, 32(8): 587-592.
- [17] 陳麗君, 李遠, 李磊. 肉桂酸衍生物抗乳腺癌作用分子機制研究進展 [J]. 醫學綜述, 2014, 20(24): 4461-4463.