

· 实验研究 ·

小檗碱衍生物的合成及其抗血管生成活性研究

黄雪梅, 张宏桂, 田学浩, 贾晓慧, 曹寅秋, 周菲, 张文曦, 郭文博, 蔡德生, 杨玉琴, 张昊, 王鹏龙*, 雷海民*

北京中医药大学 中药学院, 北京 102488

摘要: 目的 结构拼合是获得先导化合物的有效途径, 以此为指导合成一系列新型小檗碱衍生物, 并用IV型胶原酶和鸡胚尿囊膜(CAM)模型评价其活性和安全性。方法 以小檗碱为母核, 结合中药常见活性成分, 运用“拼合原理”, 设计、合成小檗碱系列衍生物, 并采用课题组前期建立的IV型胶原酶和CAM模型, 快速评价小檗碱衍生物对IV型胶原酶的抑制作用和对新生胚胎血管生成的影响。结果 设计并合成了4个新化合物, 结构经¹H-NMR、¹³C-NMR和HRMS确认, 其中化合物CYQ-44、CYQ-48、CYQ-50对IV型胶原酶有剂量相关性抑制作用, 且均高于阳性药盐酸四环素; 与此同时, 化合物CYQ-48、CYQ-对新生胚胎血管生成有一定抑制作用。结论 成功合成了4个新型小檗碱衍生物, 它们不仅对IV型胶原酶和新生血管具有抑制作用, 而且安全指数高, 进一步表明以结构拼合为指导可高效、简便获得具有中医药特点的先导化合物。

关键词: 小檗碱衍生物; 拼合原理; IV型胶原酶; 鸡胚尿囊膜

中图分类号: R914; R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2019)10-2881-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2019.10.001

Synthesis and antiangiogenic activity of berberine derivatives

HUANG Xue-mei, ZHANG Hong-gui, TIAN Xue-hao, JIA Xiao-hui, CAO Yin-qiu, ZHOU Fei, ZHANG Wen-xi, GUO Wen-bo, CAI De-sheng, YANG Yu-qin, ZHANG Hao, WANG Peng-long, LEI Hai-min

School of Chinese Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

Abstract: Objective Structural combination is an effective way to obtain leading compounds. Under the guidance of this, a series of new berberine derivatives were synthesized, and their activity and safety were evaluated by type IV collagenase and chick chorioallantoic membrane (CAM) model. **Methods** Using berberine as the mother nucleus, combined with the common active components of traditional Chinese medicine, a series of berberine derivatives were designed and synthesized by using "combination principle", and the models of type IV collagenase and CAM established by preliminary research were used. The inhibitory effect of berberine derivatives on type IV collagenase and the effect of berberine derivatives on angiogenesis of newborn embryos were evaluated rapidly. **Results** Four compounds were synthesized in the article, and their chemical structures were confirmed by ¹H-NMR, ¹³C-NMR, and HRMS, in which compounds CYQ-44, CYQ-48, and CYQ-50 had a dose-dependent inhibitory effect on type IV collagenase, which was higher than that of tetracycline hydrochloride. Meanwhile, compounds CYQ-48 and CYQ-50 had certain inhibitory effects on neovascularization of newborn embryos. **Conclusion** Four new berberine derivatives have been successfully synthesized, which not only inhibit type IV collagenase and neovascularization, but also have high safety index. It is further shown that the lead compounds with the characteristics of traditional Chinese medicine can be obtained efficiently and easily under the guidance of structural combination.

Key words: berberine derivatives; combination principle; type IV collagenase; chick chorioallantoic membrane

收稿日期: 2019-06-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81603256); 中华中医药学会青年人才托举工程项目(CACM-2018-QNRC2-B08); 中央高校基金科研业务项目(杰出青年 BUCM-2019-JCRC002、BUCM-2018-2020 和岐黄团队 2019-JYB-TD005); 中央高校基金科研业务项目(2019-JYB-XS-078)

作者简介: 黄雪梅(1993—), 女, 硕士在读, 研究方向为中药先导化合物发现与开发。E-mail: hxm3928@163.com

*通信作者 王鹏龙, 男, 副教授。Tel: (010)84738641 E-mail: wpl581@126.com

雷海民, 男, 教授, 博士生导师。Tel: (010)84738641 E-mail: hm_lei@126.com

小檗碱又叫黄连素, 是广泛存在于小檗科、毛茛科、罂粟科、芸香科和防己科等植物中的季铵型异喹啉类生物碱^[1]。药理研究发现小檗碱的作用广泛, 具有抗癌^[2-4]、抗菌^[5-6]、降血糖^[7-8]、调节血脂^[9-10]等多种药理活性, 小檗碱作为明星分子, 引起了国内外学者的广泛关注。同时, 课题组前期研究发现小檗碱和其他多种中药活性成分具有影响IV型胶原酶活性的作用^[11]。鸡胚尿囊膜 (CAM) 模型作为半整体动物模型, 通过观察给药后对胚胎和新生血管生成的影响, 已广泛用于药物活性和安全性评价^[12-13]。

此外, 本课题组长期从事在“结构拼合”原理指导下的先导化合物的发现研究工作^[14-16]。通过将具有某种相似药理作用的中药活性成分, 以一定的化学键拼接在一起, 所得到的新型化学实体, 不仅可以继承拼合前体的药理活性, 达到1+1>2的作用效果; 修饰的分子还具备中药活性成分生物相容性好的特点。因此, 本研究运用“拼合原理”, 选用具有IV型胶原酶活性的中药活性成分小檗碱、水杨酸、香草酸、阿魏酸、川芎嗪, 设计、合成系列小檗碱衍生物。并应用本课题组前期建立的IV型胶原酶和CAM模型对衍生物进行评价和筛选^[11, 17-19]。

1 仪器与材料

1.1 仪器

SH-3A 双显恒温加热磁力搅拌器 (北京金紫光科技发展有限公司); RE-52A 型旋转蒸发器 (上海亚荣生化仪器厂); sartorius BS124S 电子天平 (德国赛多利斯股份有限公司); KQ-500DE 型数控超声波清洗仪 (北京医疗设备二厂); ZF-I 型三用紫外分析仪 (上海顾村电光仪器厂); Avance 500 型核磁共振仪; Agilent 1100 Series 高效液相色谱仪; X-5 显微熔点测定仪 (北京泰克仪器有限公司); TU-1810 紫外可见分光光度计 (北京普析通用仪器有限责任公司); 电热恒温水浴箱 DK-600 (上海精宏实验设备有限公司); 酶标仪 spectra Max190 (美国 Molecular Devices 公司); 孵化箱 (北京方通孵化器厂); CJT 型超净工作台 (北京昌平长城空气净化工程公司); 320040 型解剖显微镜 (日本 Olympus 公司)。

1.2 材料

盐酸小檗碱 (质量分数 95%)、香草酸 (质量分数 98%)、川芎嗪 (质量分数 98%) 均购自南京泽朗医药科技有限公司; 水杨酸 (质量分数 99%)、阿魏酸 (质量分数 98%) 均购自阿拉丁试剂 (上海)

有限公司; 乙酸酐、吡啶均购自北京试剂有限公司; 盐酸四环素, I113003, 分析纯, 购自阿拉丁试剂 (上海) 有限公司; IV型胶原酶购自北京拜尔迪生物医药有限公司; 二甲基亚砷、石油醚、乙酸乙酯、丙酮、无水乙醇等化学试剂均为分析纯, 购自北京化工厂。

2 方法与结果

2.1 小檗碱系列衍生物的合成

2.1.1 小檗碱 - 香草酸 (CYQ-40) 衍生物的合成 将香草酸 (1 g, 5.95 mmol) 置于 50 mL 圆底烧瓶中, 加入 30 mL 二氯甲烷后, 加入 18 mmol 乙酸酐、少量吡啶, 80 °C 回流搅拌 3 h, 石油醚 - 醋酸乙酯 (10 : 7) 为展开剂, TLC 监测反应原料基本消失, 停止反应, 反应液加入 1% HCl 溶液, 洗涤 3 次, 去离子水洗至溶液呈中性, 无水 Na₂SO₄ 除水, 得到乙酰香草酸中间体 (1); 将中间体 1 加入二氯亚砷 10 mmol、二氯甲烷 10 mL, 70 °C 回流搅拌 2 h, 回收溶剂至干, 乙酰香草酸酰氯中间体 (2); 所得的中间体 2 取 0.62 mmol 与小檗红碱 0.62 mmol 置于 50 mL 圆底烧瓶中, 加入少量吡啶, 室温搅拌 1 h, 抽滤并以石油醚、乙醋酸乙酯、丙酮、氯仿洗涤沉淀, 得到黄色粉末 CYQ-40, 产率 92.15%, mp 139.2~140.2 °C。¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 7.89 (s, 1H), 6.19 (s, 2H, O-CH₂-O), 7.10 (s, 1H), 3.21 (brs, 2H), 2.51 (brs, 2H), 10.05 (s, 1H), 8.29 (d, 1H, *J*=9.0 Hz), 8.36 (d, 1H, *J*=9.0 Hz), 9.12 (s, 1H), 4.01 (s, 3H, OCH₃), 7.45 (dd, 1H, *J*=8.5、2.0 Hz), 7.94 (d, 1H, *J*=8.5 Hz), 7.85 (d, 1H, *J*=2.0 Hz), 3.93 (s, 3H, OCH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 异喹啉环: 111.1, 148.6, 151.2, 111.3, 130.7, 26.6, 59.0, 143.6, 115.3, 133.8, 115.9, 112.2, 126.2, 135.8, 132.0, 151.0, 120.7, 102.3, 56.467, 161.7, 芳环: 139.0, 151.4, 113.9, 127.0, 125.6, 123.9, 56.0, 170.1, 19.6。HR-ESI-MS *m/z*: 514.949 3 [M]⁺。合成路线见图 1。

2.1.2 小檗碱 - 水杨酸 (CYQ-44) 衍生物的合成 将水杨酸 (1 g, 7.25 mmol) 置于 50 mL 圆底烧瓶中, 加入 30 mL 二氯甲烷后, 加入 22 mmol 乙酸酐、少量吡啶, 80 °C 回流搅拌 3 h, 石油醚 - 醋酸乙酯 (10 : 7) 为展开剂, TLC 监测反应原料基本消失, 停止反应, 反应液加入 1% HCl 溶液, 洗涤 3 次, 去离子水洗至溶液呈中性, 无水 Na₂SO₄ 除水, 得到水

杨酸中间体 (3); 将中间体 3 加入二氯亚砷 10 mmol、二氯甲烷 10 mL, 70 °C 回流搅拌 2 h, 回收溶剂至干, 乙酰水杨酸酰氯中间体 (4); 所得的中间体 4 取 0.62 mmol 与小檗红碱 0.62 mmol 置于 50 mL 圆底烧瓶中, 加入少量吡啶, 室温搅拌 1 h, 抽滤并以石油醚、醋酸乙酯、丙酮、氯仿洗涤沉淀, 得到浅黄色粉末 CYQ-44, 产率 90.08%, mp 151.1 ~ 151.9 °C. ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 7.10 (s, 1H), 6.99 (s, 1H), 3.26 (d, 2H), 1.89 (d, 2H), 9.66 (s, 1H), 7.15 (d, 1H), 7.24 (d, 1H),

8.88 (s, 1H), 6.19 (s, 2H, O-CH₂-O), 4.06 (s, 3H, OCH₃), 8.44 (dd, 1H), 7.57 (m, 1H), 7.85 (m, 1H), 7.36 (dd, 1H), 2.266 (s, 3H, COCH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 异喹啉环: 105.2, 148.6, 151.0, 108.0, 127.0, 26.6, 56.4, 143.6, 120.3, 135.3, 155.3, 111.9, 126.2, 139.0, 130.7, 149.2, 120.7, 102.3, 56.0, 162.2, 芳环: 151.2, 121.8, 132.0, 125.6, 133.8, 123., 170.1, 19.6. HR-ESI-MS *m/z*: 485.000 1 [M+H]⁺. 合成路线见图 2。

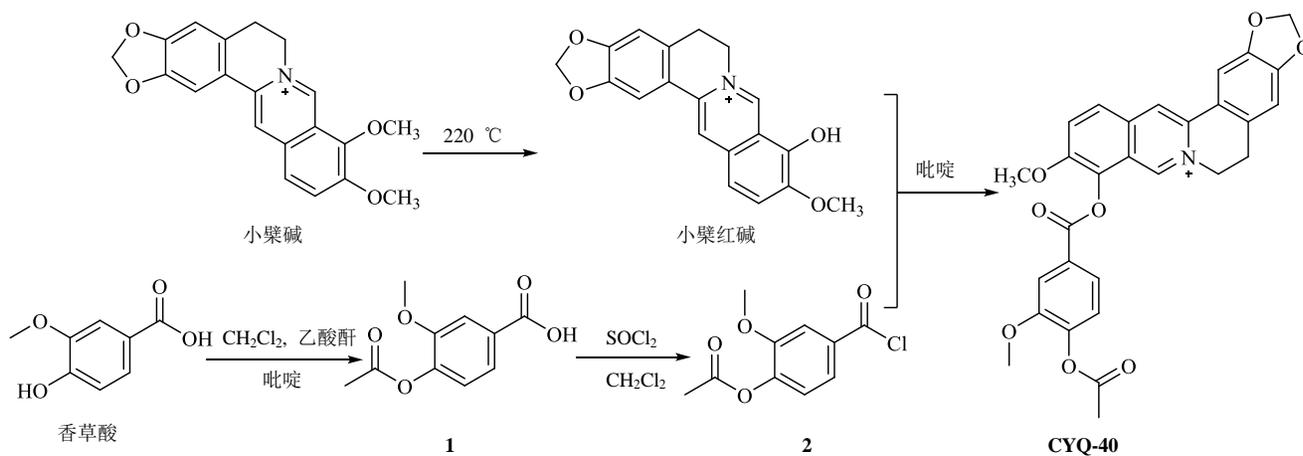


图 1 CYQ-40 的合成路线
Fig. 1 Synthetic route of CYQ-40

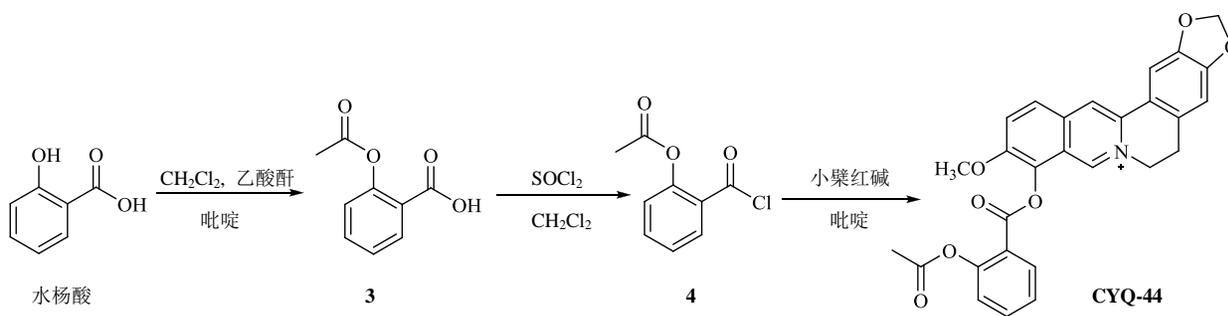


图 2 CYQ-44 的合成路线
Fig. 2 Synthetic route of CYQ-44

2.1.3 小檗碱 - 阿魏酸 (CYQ-48) 衍生物的合成 将阿魏酸 (1 g, 5.15 mmol) 置于 50 mL 圆底烧瓶中, 加入 30 mL 二氯甲烷后, 加入 16 mmol 乙酸酐、少量吡啶, 80 °C 回流搅拌 3 h, 石油醚 - 醋酸乙酯 (10 : 7) 为展开剂, TLC 监测反应原料基本消失, 停止反应, 反应液加入 1% HCl 溶液, 洗涤 3 次,

去离子水洗至溶液呈中性, 无水 Na₂SO₄ 除水, 得到阿魏酸中间体 (5); 将中间体 5 加入二氯亚砷 10 mmol、二氯甲烷 10 mL, 70 °C 回流搅拌 2 h, 回收溶剂至干, 乙酰阿魏酸酰氯中间体 (6); 所得的中间体 6 取 0.62 mmol 与檗红碱 0.62 mmol 置于 50 mL 圆底烧瓶中, 加入少量吡啶, 室温搅拌 1 h, 抽滤并以石

油醚、醋酸乙酯、丙酮、氯仿洗涤沉淀，得到浅黄色粉末 CYQ-48，产率 89.4%，mp 155.7~156.5 °C。¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 7.85 (s, 1H), 6.19 (s, 2H, O-CH₂-O), 7.23 (s, 1H), 3.23 (brs, 2H), 2.51 (brs, 2H), 10.01 (s, 1H), 8.34 (d, 1H), 8.26 (d, 1H), 9.11 (s, 1H), 4.06 (s, 3H, OCH₃), 7.17 (d, 1H, *J*=16.0 Hz), 8.01 (d, 1H, *J*=16.0 Hz), 7.72 (d, 1H, *J*=8.5 Hz), 7.48 (dd, 1H, *J*=8.5、2.0 Hz), 7.24 (d, 1H, *J*=*J*=2.0 Hz), 2.30 (s, 3H, COCH₃), 3.89 (s, 3H, OCH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 异喹啉环: 108.9, 148.1, 150.9, 112.8, 131.3, 26.6, 57.7, 147.4, 121.1, 138.6, 151.9, 117.0, 127.2, 144.8, 133.2, 148.2, 123.9, 102.6, 55.7, 164.1, 120.8, 150.4, 芳环: 142.0, 151.7, 106.0, 134.0, 121.7, 126.3, 55.4, 168.8, 20.9。HR-ESI-MS *m/z*: 540.035 2 [M]⁺。合成路线见图 3。

2.1.4 小檗碱-阿魏酸(CYQ-48) 衍生物的合成 将川芎嗪 10 g 溶于 CCl₄ (60 mL) 中，再将川芎嗪-NBS (1 : 0.7) 投入 NBS (9.17 g)，在白炽灯照射下，回流反应 10~12 h，冷却，浓缩，于 60~70 °C

水浴中减压情况下抽走过量的川芎嗪，残余物至冰箱中静置。所得淡红色半油状物 (7)，取中间体 7 (0.62 mmol) 与小檗碱 0.62 mmol 置于 50 mL 圆底烧瓶中，加入少量吡啶，室温搅拌 1 h，抽滤并以石油醚、醋酸乙酯、丙酮、氯仿洗涤沉淀，得到黄色粉末，加入硅胶 0.2 g 拌样，上硅胶柱，丙酮洗脱，得到深黄色固体粉末 CYQ-50，产率 68.2%，mp 137.6~138.3 °C。¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 7.83 (s, 1H), 6.18 (s, 2H, O-CH₂-O), 7.10 (s, 1H), 3.22 (t, 2H), 2.50 (t, 2H), 9.99 (s, 1H), 8.33 (d, 1H, *J*=9.5Hz), 8.25 (d, 1H, *J*=9.5Hz), 9.90 (s, 1H), 4.05 (s, 3H, OCH₃), 4.94 (s, 2H, OCH₂), 2.36 (s, 9H, 吡嗪环上甲基); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 异喹啉环: 108.9, 145.8, 149.3, 120.7, 131.1, 26.8, 57.5, 142.6, 122.1, 151.0, 151.5, 120.9, 127.0, 138.0, 133.5, 145.8, 124.3, 102.5, 55.9, 74.1, 吡嗪环: 150.3, 148.968, 148.1, 148.1, 21.4, 20.7, 21.7。HR-ESI-MS *m/z*: 456.122 3 [M]⁺。合成路线见图 4。

2.2 小檗碱衍生物对IV型胶原酶的抑制活性研究
参照本实验室前期IV型胶原酶模型的建立方

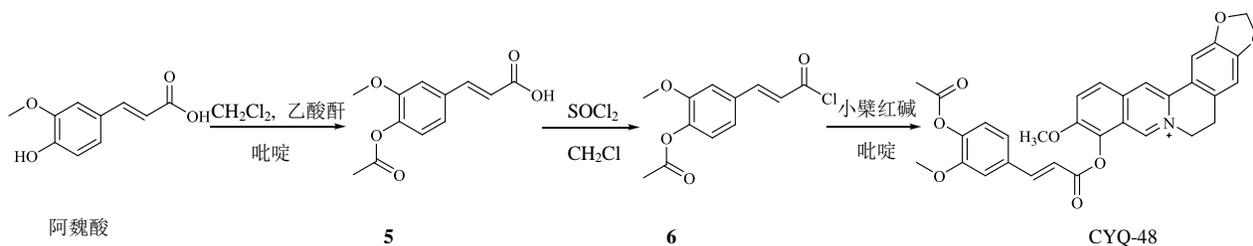


图 3 CYQ-48 的合成路线
Fig. 3 Synthetic route of CYQ-48

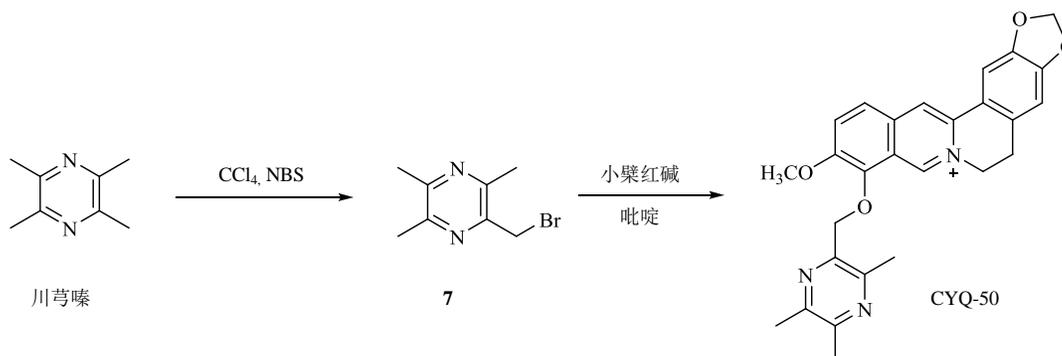


图 4 CYQ-50 的合成路线
Fig. 4 Synthetic route of CYQ-50

法^[11], 在96孔细胞板中, 每孔加入100 μL pH值7.4的50 mmol/L Tris缓冲液(含10 mmol/L CaCl_2 、10 $\mu\text{mol/L}$ ZnCl_2 、0.05%月桂醇聚氧乙烯醚), 再依次加入IV型胶原酶30 μL , 1、10、100、1 000 mg/mL CYQ-40, CYQ-44, CYQ-48, CYQ-50药液20 μL , 振摇混合均匀, 室温放置10 min, 再加入底物琥珀酰明胶20 μL , 振摇混合均匀, 37 $^\circ\text{C}$ 水浴中酶切30 min。对照组以加热处理失活的酶代替酶标准品, 并以等体积溶剂代替药物。然后每孔加入10 μL 0.2 mol/L HCl终止酶切反应, 再以10 μL 0.2 mol/L NaOH调节体系pH值至8.0, 加入过量0.01% TNBS显色剂30 μL , 振摇, 40 $^\circ\text{C}$ 水浴显色30 min使其显色充分进行, 冷却至室温后, 用酶标仪在360 nm处测定吸光度值。该酶的抑制剂盐酸四环素作为阳性对照。实验每次每一成分设复孔8个, 实验共重复3次。CYQ-44、CYQ-48、CYQ-50对IV型胶原酶有剂量相关性抑制作用, 且均高于阳性药盐酸四环素, 随着药物浓度的降低, 抑制率逐渐下降, CYQ-40对IV型胶原酶作用不明显, 见表1。

表1 CYQ-X对IV型胶原酶的抑制作用

Table 1 Effect of CYQ-X on type IV collagenase

组别	剂量/(mg·mL ⁻¹)	抑制率/%
对照	—	0
四环素	1 000	19.39
	100	14.24
	10	9.50
	1	6.21
CYQ-40	1 000	3.82
	100	0.59
	10	-2.12
	1	-1.76
CYQ-44	1 000	38.96
	100	23.13
	10	16.70
	1	9.53
CYQ-48	1 000	67.78
	100	52.63
	10	46.29
	1	40.86
CYQ-50	1 000	22.10
	100	17.61
	10	9.42
	1	6.22

2.3 小檗碱衍生物对鸡胚绒毛尿囊膜新生血管生长的影响

以无菌明胶海绵为样品载体, 无菌环境下加入事先配好的小檗碱系列化合物, 根据每个药物活性设置不同的剂量组, 包括10、40 μg /鸡胚, 对照组为溶解药物的溶剂, 在紫外灯下照射过夜消毒。1~2 d龄受精种蛋以70%酒精擦拭消毒, 气室向上放置于37 $^\circ\text{C}$ 孵化箱, 培养至第7天时取出, 用酒精消毒蛋壳表面, 在蛋胚顶端钻一小孔, 揭开周围部分蛋壳, 形成直径约为1.2 cm大小的圆形开口, 在血管较不丰富处上方的气室膜上, 用注射器滴加1~2滴生理盐水, 之后以注射针头挑破滴水部位的气室膜, 使气室膜与CAM膜分开, 然后用镊子撕去上层的气室膜, 形成直径为1.5~2.0 cm的空洞, 暴露出其下的CAM膜, 加入药膜, 使其处于中心位置, 但应做到尽量偏离直径较粗、较明显的血管, 然后用灭菌透明胶封口, 继续孵育72 h分别做好标记。孵育结束后, 除去鸡胚气室端堵塞的透明胶, 加入甲醇/丙酮等体积混合液1~2 mL, 室温固定15 min, 剥离连带药膜的CAM膜, 修剪成合适形状并置于载玻片上, 显微镜下观察。应用Image-Pro Plus5.0软件计数由载体辐射新生血管(直径<100 μm)的数目, 应用SAS 8.2统计软件进行one-way ANOVA方差分析, 组间比较采用t检验。

在解剖显微镜下观察给药组与对照组CAM新生血管的生长情况, 对照组新生毛细血管从载体边缘辐射状发出, 给药后部分化合物呈现一定的抑制作用, 但无统计学差异, CAM血管数量见表2。

表2 CAM血管数量($\bar{x} \pm s$)Table 2 Number of CAM vascular ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(μg ·鸡胚 ⁻¹)	鸡胚数	CAM血管数量
对照1	10	9	13.4 \pm 4.3
	40	8	13.4 \pm 4.3
CYQ-40	10	9	12.6 \pm 2.4
	40	8	11.8 \pm 3.3
CYQ-44	10	7	14.1 \pm 2.5
	40	7	13.6 \pm 3.3
对照2	10	6	11.7 \pm 3.7
	40	7	11.7 \pm 3.7
CYQ-48	10	6	9.7 \pm 4.7
	40	7	10.3 \pm 1.4
CYQ-50	10	7	11.6 \pm 5.4
	40	6	10.1 \pm 4.4

3 讨论

本课题组基于拼合原理,将明星分子小檗碱与其他一些中药常见的药效小分子进行拼合,得到新型小檗碱衍生物 4 个,结构均已通过 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 和 HR-MS 确证。活性筛选采用课题组前期建立的 IV 型胶原酶抑制剂的筛选模型,经方法学考察和阳性化合物验证,认为该模型具有一定的可靠性,可以作为一种药物活性初步筛选的模型方法。筛选结果表明小檗碱系列衍生物 CYQ-44、CYQ-48 和 CYQ-50 与阳性药盐酸四环素相比,对 IV 型胶原酶有明显的抑制作用,其中 CYQ-48 效果最好,并呈现出剂量相关性特点。构效关系表明分子内引入乙酰基和甲氧基,对 IV 型胶原酶作用活性可由促进逆转为抑制作用,如具有乙酰基的 CYQ-44、兼具乙酰基和甲氧基的 CYQ-40、48。研究结果表明小檗碱类衍生物 9-位酚羟基可以与苯甲酸衍生物拼合成新的化学实体,目前获得的衍生物数量偏少,但合成路线简便可行,希望以后能有更加广泛的系列化合物问世,对该类化合物的构效关系研究更加深入、透彻,以期更高效地获得治疗效果佳的候选药物。

同时,小檗碱系列化合物作用于 CAM 模型后,与对照组血管数目比较,给药组血管生成受到影响,虽然这种差异无统计学意义,但部分给药组血管有一定程度的减少。且前期有文献报道影响 IV 型胶原酶活性与新生血管生成有相关性^[20],进一步表明本课题组前期建立的酶学筛选模型可以高效、廉价评价中药活性成分及其修饰物。

综上所述,本研究成功合成了 4 个新型小檗碱衍生物,不仅对 IV 型胶原酶和新生血管具有抑制作用,而且安全指数高,进一步表明以结构拼合为指导可高效、简便获得具有中医药特点的先导化合物。

参考文献

- [1] 韩永萍,刘红梅,李可意,等.小檗碱衍生物的合成及其生物活性构效关系研究[J].化学世界,2018,59(12):785-794.
- [2] 郭江红,任刚,蒋建东.小檗碱通过改善代谢水平抗肝细胞癌的研究进展[J].现代药物与临床,2018,33(3):703-708.
- [3] Youn M J, So H S, Cho H J, et al. Berberine, a natural product, combined with cisplatin enhanced apoptosis through a mitochondria/caspase-mediated pathway in HeLa cells[J]. *Biol Pharm Bull*, 2008, 31(5): 789-795.
- [4] 周军挺,王丽,吴婷,等.小檗碱抗人结直肠腺癌的作用及其机制[J].中草药,2017,48(3):519-525.
- [5] 范田运,胡欣欣,汪燕翔,等.新型环化小檗碱衍生物的设计合成及抗 MRSA 活性研究[J].药学学报,2018,53(6):887-894.
- [6] 范田运.环化小檗碱衍生物合成及抗革兰氏阳性耐药球菌(MRSA/VISA)活性研究[C].2016年中国药学会大会暨第十六届中国药师周论文集.北京:中国药学会,2016:8.
- [7] Li Q, Wei W, Li M C, et al. Effects of berberine on diabetes induced by alloxan and a high-fat/high-cholesterol diet in rats[J]. *J Ethnopharmacol*, 2006, 108(1): 109-115.
- [8] 王灿,蒋建东,孔维佳.小檗碱治疗代谢性疾病抗炎作用的研究进展[J].药物评价研究,2018,41(4):692-696.
- [9] 吕医瑞,张玉平,曹荣辉,等.小檗碱改善血脂抗动脉粥样硬化机制进展[J].中国动脉硬化杂志,2015,23(4):427-432.
- [10] 姜甜,贾友宏,李一石.小檗碱调脂作用机制的研究进展[J].现代药物与临床,2016,31(5):727-730.
- [11] 薛南南,曹寅秋,房康,等.IV型胶原酶模型的建立及其在中药活性成分筛选中的应用[J].现代中药研究与实践,2019,33(1):20-23.
- [12] Tay S L, Heng P W, Chan L W. An investigation of the chick chorioallantoic membrane as an alternative model to various biological tissues for permeation studies[J]. *J Pharm Pharmacol*, 2011, 63(10): 1283-1289.
- [13] Spanel-Borowski K. The chick chorioallantoic membrane as test system for biocompatible materials[J]. *Res Exp Med (Berl)*, 1989, 189(1): 69-75.
- [14] 李碧,褚福浩,龚晏,等.“配伍法则·拼合原理”在中药新药研发中的应用[J].中国科学:生命科学,2016,46(8):1001-1007.
- [15] Xu B, Yan W Q, Xu X, et al. Combination of amino acid/dipeptide with ligustrazine-betulinic acid as antitumor agents[J]. *Eur J Med Chem*, 2017, 130: 26-38.
- [16] Wang P, Zhao R, Yan W, et al. Neuroprotection by new ligustrazine-cinnamom acid derivatives on CoCl₂-induced apoptosis in differentiated PC12 cells[J]. *Bioorg Chem*, 2018, 77: 360-369.
- [17] Wang P, She G, Yang Y, et al. Synthesis and biological evaluation of new ligustrazine derivatives as anti-tumor agents[J]. *Molecules*, 2012, 17(5): 4972-4985.
- [18] Li B, Yan W, Zhang C, et al. New synthesis method for sultone derivatives: synthesis, crystal structure and biological evaluation of S-CA[J]. *Molecules*, 2015, 20(3): 4307-4318.
- [19] 崔鹤蓉,李红艳,姜文艳,等.血管生成评价方法和模型研究进展[J].中国药学杂志,2019,54(9):677-681.
- [20] 张玉辉.基质金属蛋白酶-26在肿瘤血管新生中的作用研究[D].长春:吉林大学,2012.