

桦木酸的药理作用研究进展

易金娥, 邬 静, 文利新, 夏 伟, 朱若岑, 蒋维维, 谭柱良*

湖南农业大学动物医学院, 湖南 长沙 410128

摘 要: 桦木酸 (betulinic acid, BA) 属于羽扇豆烷型五环三萜类物质, 广泛分布于多种植物中, 具有抗肿瘤、抗艾滋病、免疫调节、抗氧化应激、抗菌、抗炎以及抗寄生虫等广泛的药理作用。由于 BA 具有优越的抗肿瘤和抗艾滋病活性, 在恶性肿瘤和艾滋病等威胁人类健康的疾病防治方面具有广阔的应用前景。BA 还能提高机体的抗氧化能力、增强免疫力, 在机体的抗氧化损伤和免疫调节过程中发挥着重要作用。就 BA 的药理作用进行详细综述, 为 BA 的研究和开发利用提供参考。

关键词: 桦木酸; 抗肿瘤; 抗艾滋病病毒; 免疫调节; 抗氧化

中图分类号: R285 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2014)14-2118-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.14.029

Research progress on pharmacological activities of betulinic acid

YI Jin-e, WU Jing, WEN Li-xin, XIA Wei, ZHU Ruo-cen, JIANG Wei-wei, TAN Zhu-liang

College of Veterinary Medicine, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China

Abstract: Betulinic acid (BA) is a naturally occurring pentacyclic triterpene that is widely distributed throughout the plant kingdom. A variety of pharmacological activities have been ascribed to BA, including antitumor, anti-HIV, immunomodulatory, anti-oxidative, antimicrobial, anti-inflammatory, and antihelminthic activities. BA is a very promising new chemotherapeutic agent for the treatment of HIV infection and cancer due to the greater potencies and better therapeutic indices than some clinically used drugs. Notably, BA may play an increasingly important role in immune regulation and against oxidative damage as an immunomodulator and anti-oxidant. The pharmacological activities of BA are reviewed which provide a reference for the future research and utilization of BA.

Key words: betulinic acid; antitumor; anti-HIV; immunomodulation; anti-oxidation

随着高效分离和提取技术的发展, 从植物中提取生物活性物质作为药物使用越来越受到重视。桦木酸 (betulinic acid, BA) 属于羽扇豆烷型五环三萜类物质, 广泛分布于如鼠李科、桃金娘科和桦木科等多种植物中, 其量普遍很低, 以白桦树皮量较高。《本草纲目》中记载桦树皮可用于黄疸、乳痈、疥疮等疾病的治疗^[1]。早在 19 世纪, 人们就开始对白桦树进行研究, 白桦树皮常被美国人放在茶和其他饮料中用来治疗胃肠道疾病腹泻和痢疾; 白桦树汁对人体健康大有益处, 有抗疲劳、止咳等药理作用, 被欧洲人称为“天然啤酒”和“森林饮料”。俄罗斯自 1843 年以来一直对白桦树进行研究, 树皮可提取烤胶、桦皮油, 还可用于防腐膏等^[2]。

20 世纪 90 年代, Kim 等^[3]首先采用 2 步法从白桦树皮中提取到了 BA, 结构式见图 1。1995 年发现 BA 对黑素瘤细胞具有极强的选择性细胞毒性^[4], 能

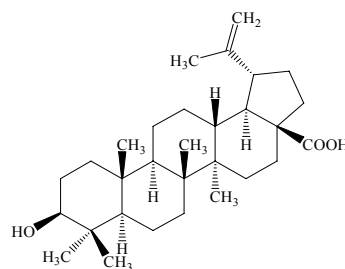


图 1 BA 的化学结构式

Fig. 1 Chemical structure of BA

收稿日期: 2013-11-08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31201964); 教育部高校博士学科点专项基金新教师类资助项目 (20124320120011); 湖南省教育厅科学研究项目 (12A066)

作者简介: 易金娥 (1976—), 女, 博士, 副教授, 硕士生导师, 研究方向为药理学与毒理学。

Tel: (0731)84673712 Fax: (0731)84673618 E-mail: yijine@gmail.com

***通信作者** 谭柱良 Tel: (0731)84673712 Fax: (0731)84673618 E-mail: zhuliangtan@yahoo.cn

抑制 H9 淋巴细胞中 HIV 的复制,其作用范围几乎影响病毒生命周期的每个环节^[5]。由于 BA 具有优越的抗肿瘤和抗 HIV 活性,引起了人们对 BA 的广泛研究与关注。随后研究发现,BA 具有免疫调节、抗氧化应激、抗菌、抗炎、抗寄生虫、抗溃疡及抗疟疾等多种较强的生物活性^[2-5],因而受到国内外学者的广泛重视。本文就 BA 的药理作用进行详细阐述,旨在为 BA 的深入研究和开发利用提供参考。

1 抗肿瘤

BA 及其衍生物能选择性地作用于多种肿瘤细胞,而对正常细胞没有影响。最初研究认为:BA 仅能选择性地诱导黑色素瘤细胞凋亡产生细胞毒性,而对乳腺癌(BC-1)、结肠癌(COL-2)、鳞状上皮癌(KB)、前列腺癌(LNCaP)和肺癌(LU-1)等细胞系没有活性^[4]。随后研究证实 BA 具有广泛的抗癌活性,对神经母细胞瘤 9 个细胞系(SKNSH、IMR-5、NBL-S、NBAS5、LAN-5 等)都有细胞毒性^[6],还能诱导人恶性胶质瘤(LN-229, U87MG 和 T98G)细胞凋亡^[7]。BA 能抑制增生性细胞系的生长,如卵巢癌(A2780、OVCAR-5 和 IGROV-1)、肺癌(H460、POGB)、宫颈癌(A431)^[8]等,还能诱导初级神经管细胞瘤(D283Med、MHH1MEB1)和胶质母细胞瘤(A172、U138MG、U373 和 SK14)细胞凋亡^[9]。体外研究发现,BA 诱导初级胶质母细胞瘤细胞凋亡率远远高于临床常用的抗肿瘤药长春新碱和亚硝基脲^[10];BA 的抗白血病活性(急性普通淋巴白血病、急性 T 淋巴细胞白血病、急性 B 淋巴细胞白血病、急性骨髓白血病)强于 90% 标准治疗方法,对于肿瘤的复发尤为有效,且不与任何细胞毒药物产生交叉耐药性^[11],这可能与环境的 pH 值有关,BA 在 pH 值较低(≤ 6.8)的环境下细胞毒性更强,因为肿瘤组织的 pH 值通常低于正常组织^[12]。

Fulda 等^[13]报道,BA 和抗肿瘤药联合使用,能协同诱导线粒体膜电位的降低以及细胞色素 C 和 Smac 基因从线粒体中的释放,从而激活半胱天冬酶(caspase),引起细胞凋亡。BA 具有与抗肿瘤药物协同诱导细胞凋亡、抑制幸存肿瘤细胞群落的作用。当 BA 与长春新碱联合用药时,抑制黑色素瘤细胞的生长与转移;当 BA 与肿瘤坏死因子凋亡配体(tumor necrosis factor-related apoptosis ligand, TRAIL)合用时,能诱导成神经瘤细胞凋亡,但对人体正常的成纤维细胞没有影响^[14]。BA 对阿霉素处理的成神经

管细胞瘤、成胶质细胞瘤以及黑色素瘤细胞(Mel-Juso)仍然敏感,而且对辐射处理的癌细胞,BA 能进一步抑制其生长,降低肿瘤细胞生存率^[15]。值得注意的是,BA 与许多细胞毒性化合物如多柔比星、紫杉醇、依托泊苷、放线菌素 D 联合用药,并表现协同作用,这可能与它们作用于不同的细胞周期有关。而且,对于不同的肿瘤细胞,BA 和抗肿瘤药物也能协同诱导其凋亡,包括 p53 突变细胞、原发性肿瘤细胞。但对头颈癌细胞系,BA 与顺铂没有协同作用^[16]。由此可见,BA 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。

细胞凋亡具有典型的形态学变化,如染色质浓缩、核质致密凝集、DNA 断裂、核固缩、细胞膜发泡以及 caspase 激活等。研究发现,BA 是通过线粒体介导途径来诱导肿瘤细胞凋亡的,其诱导线粒体膜电位变化,产生活性氧分子,开启通透性孔道,从而引起线粒体凋亡因子的释放,caspases 的激活,以及 DNA 片断的产生。BA 诱导细胞凋亡,但并不依赖 p53,也不依赖 CD95/CD95L 死亡受体^[4,8,17]。BA 使黑色素瘤细胞(MEL-1-4)缩小,细胞膜发泡以及 DNA 断裂,还能使成神经细胞瘤、成神经管细胞瘤、成胶质细胞瘤以及尤文氏肉瘤细胞系核断裂,激活胶质瘤细胞 caspase 的活性,特别是 caspase-3、8 的活性。Zanon 等^[18]报道,BA 使黑色素瘤细胞(SK-Mel-5) caspase-2、3、8、9 的活性增强,但 Tan 等^[19]报道,BA 并不引起黑色素瘤细胞(UISO-Mel-1) caspase-3、8、9 活性的变化。BA 能非细胞特异性地抑制核转录因子(nuclear factor-kappa B, NF- κ B)和核转录因子抑制蛋白(inhibitory protein of NF- κ B, I κ B)的活性,从而阻滞 I κ B 的磷酸化和降解,也能抑制 NF- κ B 依赖性受体基因的表达和 NF- κ B 调节基因产物的产生^[20]。而 Kasperczyk 等^[21]报道,BA 激活成神经细胞瘤(SHEP、SH-SY5Y)、成胶质细胞瘤(LN229、U373)和黑色素瘤细胞(Mewo) NF- κ B 的活性,但这种诱导作用能被不同的化合物(蛋白酶抑制剂、抗氧化剂)所阻断,某些特异性的 NF- κ B 抑制剂,特别是短暂或稳定表达 I κ B α 超阻遏物的抑制剂,可选择性地使 BA 对某些成神经细胞瘤凋亡产生抑制作用,而对 BA 诱导的其他细胞凋亡没有影响。这说明 BA 对 NF- κ B 的活性调控具有细胞特异性,因此, NF- κ B 抑制剂与 BA 联合用药时,不一定会产生好的治疗效果,对某些

细胞而言,可能会产生相反的作用,这也为 BA 的联合用药提供一定的理论指导。当有致癌物或炎性物刺激时,BA 干扰 NF- κ B 的活性和基因表达调控^[11,21],这可能是 BA 的抗炎作用和免疫调节作用的分子机制。

其他相关的研究如活性氧的产生、拓扑异构酶 I 的抑制、血管生成的抑制以及氨肽酶 N 活性的调节等^[22],这些都在 BA 诱导肿瘤细胞凋亡过程中扮演着一定的角色。所有这些潜在的作用机制使得 BA 有望用来治疗耐药的肿瘤。

2 抗艾滋病

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,而 BA 及其衍生物的作用机制是抑制病毒的穿入,阻止病毒吸附或抑制细胞膜的融合或阻止前体分裂为成熟的 HIV 蛋白,从而削弱病毒颗粒的感染性^[5]。

BA 抑制 H9 淋巴细胞中 HIV 复制的半数有效浓度 (EC_{50}) 为 1.4 μ mol/L,是 HIV 与细胞膜的融合抑制剂。对 BA 进行结构修饰得到的双酯类化合物抗 HIV-1 的治疗指数分别为 21 515 和 42 400, EC_{50} 分别为 0.66 和 0.87 nmol/L^[23],而临床上常用的一种抗艾滋病药,齐多夫定的治疗指数为 33 333~41 622, EC_{50} 为 15~45 nmol/L,这说明对 BA 进行结构修饰与改造,有望获得活性高、毒性更低的抗 HIV 药物。

3 免疫调节作用

免疫调节是三萜类物质最重要和最主要的生物活性,BA 具有调节细胞免疫、体液免疫和非特异性免疫的功能。BA 通过与 T 细胞相互作用提高人单核细胞来源的树突细胞的免疫力^[24];激活巨噬细胞和调节 Th-1 细胞,从而提高小鼠的免疫力^[25];抑制促炎酶和促炎因子的活性,显示很好的免疫调节作用^[26];抑制 IL-6 的分泌,显示免疫调节作用^[27]。体外研究发现,BA 具有抗氧化和护肝作用^[28]。Yi 等^[29]研究发现,BA 能协同促进刀豆蛋白 A (Con A) 或脂多糖 (LPS) 诱导的小鼠脾脏 T 淋巴细胞或 B 淋巴细胞的增殖活性,能提高小鼠的免疫器官指数,提高胸腺淋巴细胞 $CD4^+$ 百分率,脾淋巴细胞的 $CD19^+$ 百分率以及 $CD4^+/CD8^+$ 的百分比,表明 BA 从增强淋巴细胞活性和改变 T、B 淋巴细胞的数目或亚群,来提高机体的细胞免疫。BA 增加绵羊红细胞 (SRBC) 免疫小鼠溶血空斑数,降低血清免疫球蛋白 IgG 和 IgM 的抗体滴度,提高血清溶菌酶量,表

明 BA 作为抗原刺激物,活化的 B 细胞数量增多,功能增强,从而提高机体的体液免疫功能^[30]。BA 降低小鼠血清白细胞介素-2 (IL-2) 和 IL-6 的分泌量,略提高血清 IL-10 的水平,说明 BA 调控 Th1/Th2 类细胞因子。BA 显著性地促进小鼠腹腔巨噬细胞增殖,显著增强腹腔巨噬细胞吞噬中性红的能力,提高腹腔巨噬细胞肿瘤坏死因子 (TNF- α) 水平,这表明 BA 能够刺激巨噬细胞,增强巨噬细胞的吞噬能力,提高非特异性免疫功能^[31]。

4 抗氧化应激

BA 对正常细胞或机体具有保护作用,该保护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^[32],而对缺血再灌注肾损伤是通过抗氧化作用、抑制白细胞凋亡和改善肾功能发挥保护作用^[33];还能调控细胞周期的调节蛋白,通过降低活性氧 (ROS) 的生成和 NF- κ B 的活性,明显抑制高糖诱导的人主动脉平滑肌细胞和人脐静脉内皮细胞的增殖,对血管具有保护作用,能有效预防动脉粥样硬化^[34]。BA 通过抗氧化作用、抑制细胞因子的分泌等途径对甲醇致肝星状细胞损伤具有保护作用^[35]。BA 具有内皮依赖性舒张血管作用,该作用可能与激活一氧化氮合酶-一氧化氮 (NOS-NO) 通路有关,BA 可以减轻过氧化氢诱导的大鼠胸主动脉内皮依赖性舒张功能降低,这可能与降低血管内皮氧化应激,维持血管内皮 NO 活性有关^[36]。BA 抑制 NF- κ B p65 核转位,使 LPS 致外周血单核细胞 IL-6 的分泌量减少,这种抑制作用可能与丝裂原激活的蛋白激酶 (MAPK) 和 NF- κ B 通路间的关联物 p38 和细胞外信号调控激酶 (ERK) 有关^[37]。同时研究发现,BA 能抑制 ERK 通路和调控 IkB α 磷酸化,降低 LPS 致人外周血单核细胞环氧合酶-2 (COX-2) 表达和前列腺素 E_2 的生成、ROS 产生与乳酸脱氢酶的活性^[38-39]。前期试验发现,BA 具有促进淋巴细胞增殖,提高脾、胸腺以及腹腔巨噬细胞谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px)、超氧化物歧化酶 (SOD) 的活性,降低丙二醛 (MDA) 的量,增强淋巴细胞的抗氧化能力^[31];进一步研究发现,BA 对地塞米松诱导的淋巴细胞凋亡具有干预作用,在一定程度上起到了预防性的保护作用。这可能与 BA 抑制氧化酶活性、自由基和脂质过氧化物产生,提高抗氧化能力有关,但保护作用机制还有待于深入研究探讨。

5 抗炎、抗菌

许多五环三萜类化合物都具有抗炎活性, BA 对十四烷酰佛波醇乙酸酯 (TPA) 引起的小鼠皮炎和耳廓肿胀具有明显的抑制作用, 对血清素 (5-羟

色胺) 和角叉菜胶致大鼠足底肿胀也具有明显抑制作用 (表 1)。研究发现, BA 还能抑制 COX-2 的活性, 其抑制率为 40%。BA 在较高浓度时, 具有稳定的抗炎活性, 其作用机制是抑制非神经原性途径。

表 1 BA 的抗炎作用

Table 1 Anti-inflammatory properties of BA

方法	结果	文献
TPA 诱导小鼠耳缘肿胀度 (厚度)	注射 TPA 前 30 min, BA 按 2 mg/mL 给药, 其抑制率为 94%	40
TPA 诱导小鼠耳缘肿胀度 (质量)	BA 按 0.5 mg/耳给药, 其抑制率为 86.2%; 若按 100 mg/kg 给药, BA 的抑制率为 45.6%	40
体外对前列腺素合成酶的抑制作用	200 μ g/mL BA 对该酶的抑制作用可达 52%, 但 IC ₅₀ (101 μ mol/L) 的效果却很弱	41
用 ELISA 检测 LPS 诱导大鼠腹腔巨噬细胞 CINC-1 (一种致炎细胞因子) 水平	1 μ mol/L BA 对 CINC-1 抑制率为 (34 $\pm$ 3) %	42
用 ELISA 检测 IL-1 β 诱导大鼠纤维原细胞 CINC-1 水平	1 μ mol/L BA 对 CINC-1 抑制率为 (15 $\pm$ 4) %	43
血清素和角叉菜胶诱导的大鼠足趾肿胀	50、100 mg/kg BA 对血清素和角叉菜胶所引起的大鼠足趾肿胀有明显的抑制作用	44
TPA 诱导小鼠耳缘嗜中性白细胞的聚集程度	BA 能显著降低耳缘嗜中性白细胞的数目, 其降低率为 29%	45
缓激肽诱导小鼠足趾肿胀程度	注射缓激肽前 1 h, ip BA, 对小鼠足趾肿胀达到 54% 的抑制作用	46
用趋化肽 (FMLP) 诱导大鼠嗜中性白细胞, 检测溶菌酶和 β -葡萄糖苷酸酶的活性	1 μ g/mL BA 对溶菌酶和 β -葡萄糖苷酸酶的活性没有明显的抑制作用	47
醋酸引起小鼠腹部痉挛	ip 10 mg/kg BA 对腹部痉挛有抑制作用, 有效率为 88.1%	48
小鼠足底注射福尔马林引起神经性疼痛和炎性疼痛	提前 30 min ip 10 mg/kg BA, 对福尔马林引起的神经性疼痛无作用, 但对炎性疼痛具有明显的抑制作用, 其抑制率为 50%	48
LPS 诱导小鼠 RAW264.7 巨噬细胞, 检测 NO 的生成量	100 μ mol/L BA 能适当地抑制 NO 水平, 其抑制率为 20%	49
对中性粒细胞中超氧化物或磷酸酪氨酸的变化	50 μ mol/L BA 对超氧化物或磷酸酪氨酸无抑制作用	50

体外研究发现, BA 抗大肠杆菌、枯草杆菌、金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌等, 1 000 g/disc 浓度的 BA 抑制枯草杆菌的生长, 其抑菌圈为 18.8 mm²; 对结核分支杆菌的最低抑菌浓度 (MIC) 值为 32 μ mol/L, 对表皮葡萄球菌的 MIC 值为 8~16 μ g/mL。BA 抗主要霉菌的几丁质复合酶 II, 其 IC₅₀ 为 98.7 μ g/mL^[51]。研究发现, BA 抑制霉菌生长的 MIC 为 12~32 μ g/mL, BA 还具有抗大肠杆菌、肠球菌和金黄色葡萄球菌的作用^[52]。但 Stephane 等^[53]研究报道, BA 抑菌的 MIC $\geq$ 256 mg/L, 而且选择指数 (SI=IC₅₀/MIC) 非常低, 大约为 0.005; Alakurtti 等^[54]研究发现, BA 抑菌的 MIC $\geq$ 128 mg/L, 证实 BA 抗菌活性较弱。BA 属于羽扇烷五环三萜类物质, 结构与藿烷五环三萜类相似, 由于细菌膜上存在能生物合成藿烷五环三萜类的物质, 这可能是

BA 抗菌活性较弱的合理解释^[53]。基于以上研究说明, BA 不是一个很有潜力的抗菌药物。

6 抗寄生虫

Enwerem 等^[55]将蠕虫的悬液用 BA 处理, 共同培养 7 d, 结果发现用醋酸乙酯提取的 BA 具有最强的抗寄生虫作用, 其 EC₅₀ 为 1 $\times$ 10⁻⁴, 死亡率为 98%, 而常用抗蠕虫药哌嗪的死亡率为 95%。

BA 能作用于氯喹敏感菌株 (T9-96) 以及抗疟原虫 (K1), 在体外 BA 对 KI 和 T9-96 的 IC₅₀ 分别为 19.6 和 25.9 μ g/mL; 抗恶性疟原虫的 IC₅₀ 为 10.46 μ g/mL, 并对无性繁殖阶段 (红细胞期) 疟原虫作用更好。然而, 体内实验发现, 250 mg/kg BA 对疟原虫仍没有显现出任何活性。近来又研究发现, BA 的 C-3 和 C-28 衍生物在体外抗疟原虫的实验中显现出较强的活性^[56]。

7 其他

BA 具有抗生殖器单纯疱疹病毒-1 (HSV-1)^[57] 和抗艾柯病毒 (ECHO-6) 的作用^[58]。

有文献报道, BA 具有抗焦虑作用^[59], 而且有些抗焦虑药中含有 BA 组分, 这可能跟 BA 脂溶性较高, 能透过血脑屏障有关。

BA 能抑制由低血压、心动过缓和胆碱引起的支气管收缩, 这可能与 Ca^{2+} 浓度变化有一定关系^[60]。

研究发现, 口服 BA 1 h 后, 再用消炎痛和阿司匹林诱导胃黏膜损伤模型, 作用 24 h 后, 剖检发现 BA 能减轻胃黏膜损伤, 这说明 BA 对胃肠黏膜具有保护作用^[2]。

8 结语

一些具有免疫调节、抗氧化应激、清除自由基作用的生物活性分子可望有效地调控机体的氧化应激, 从而保障机体细胞内外环境的平衡和生理机能正常。BA 是一种植物源性免疫调节剂与抗氧化剂, 具有抗肿瘤、免疫调节、抗氧化应激、抗菌、抗炎、抗艾滋病等广泛的药理作用。综合 BA 的药理作用, BA 发挥抗肿瘤作用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, 目前此问题仍不清楚, 其作用机制尚不清楚, 值得深入研究与探讨。对 BA 的免疫调节和抗氧化应激机制进一步研究, 有望开发成新免疫调节剂和抗氧化剂, 为深入开展氧化应激的理论研究和科学应用提供理论依据和新的探索途径。

参考文献

- [1] 李时珍. 本草纲目 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1978.
- [2] Flekhter O B, Nigmatullina L R, Baltina L A, *et al.* Synthesis of betulinic acid from betulin extract and study of the antiviral and antiulcer activity of some related terpenoids [J]. *Pharm Chem J*, 2002, 36(9): 484-487.
- [3] Kim D S H L, Chen Z, Nguyen V T, *et al.* A concise semi-synthetic approach to betulinic acid from betulin [J]. *Synth Commun*, 1997, 27(9): 1607-1612.
- [4] Pisha E, Chai H, Lee I S, *et al.* Discovery of betulinic acid as a selective inhibitor of human melanoma that functions by induction of apoptosis [J]. *Nat Med*, 1995, 1(10): 1046-1051.
- [5] Mayaux J F, Bousseau A, Pauwels R, *et al.* Triterpene derivatives that block entry of human immunodeficiency virus type 1 into cells [J]. *Proc Nat Acad Sci*, 1994, 91(9): 3564-3568.
- [6] Schmidt M L, Kuzmanoff K L, Ling-Indeck L, *et al.* Betulinic acid induces apoptosis in human neuroblastoma cell lines [J]. *Eur J Cancer*, 1997, 33(12): 2007-2010.
- [7] Wick W, Grimm C, Wagenknecht B, *et al.* Betulinic acid-induced apoptosis in glioma cells: a sequential requirement for new protein synthesis, formation of reactive oxygen species, and caspase processing [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1999, 289(3): 1306-1312.
- [8] Zuco V, Supino R, Righetti S C, *et al.* Selective cytotoxicity of betulinic acid on tumor cell lines, but not on normal cells [J]. *Cancer Lett*, 2002, 175(1): 17-25.
- [9] Fulda S, Jeremias I, Steiner H H, *et al.* Betulinic acid: a new cytotoxic agent against malignant brain-tumor cells [J]. *Int J Cancer*, 1999, 82(3): 435-441.
- [10] Jeremias I, Steiner H H, Benner A, *et al.* Cell death induction by betulinic acid, ceramide and TRAIL in primary glioblastoma multiforme cells [J]. *Acta Neurochir*, 2006, 146(7): 721-729.
- [11] Ehrhardt H, Fulda S, Fuhrer M, *et al.* Betulinic acid-induced apoptosis in leukemia cells [J]. *Leukemia*, 2004, 18(8): 1406-1412.
- [12] Noda Y, Kaiya T, Kohda K, *et al.* Enhanced cytotoxicity of some triterpenes toward leukemia L1210 cells cultured in low pH media: possibility of a new mode of cell killing [J]. *Chem Pharm Bull*, 1997, 45(10): 1665-1670.
- [13] Fulda S, Scaffidi C, Susin S A, *et al.* Activation of mitochondria and release of mitochondrial apoptogenic factors by betulinic acid [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(51): 33942-33948.
- [14] Sawada N, Kataoka K, Kondo K, *et al.* Betulinic acid augments the inhibitory effects of vincristine on growth and lung metastasis of B16F10 melanoma cells in mice [J]. *Br J Cancer*, 2004, 90(8): 1672-1678.
- [15] Fulda S, Debatin K. Sensitization for anticancer drug-induced apoptosis by betulinic acid [J]. *Neoplasia*, 2005, 7(2): 162-170.
- [16] Eder-Czembirek C, Czembirek C, Erovic B M, *et al.* Combination of betulinic acid with cisplatin-different cytotoxic effects in two head and neck cancer cell lines [J]. *Oncol Rep*, 2005, 14(3): 667-671.
- [17] Fulda S, Friesen C, Los M, *et al.* Betulinic acid triggers CD95 (APO-1/Fas)- and p53-independent apoptosis via activation of caspases in neuroectodermal tumors [J]. *Cancer Res*, 1997, 57(21): 4956-4964.
- [18] Zanon M, Piris A, Bersani I, *et al.* Apoptosis protease activator protein-1 expression is dispensable for response of human melanoma cells to distinct proapoptotic agents [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(20): 7386-7394.

- [19] Tan Y, Yu R, Pezzuto J M. Betulinic acid-induced programmed cell death in human melanoma cells involves mitogen-activated protein kinase activation [J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9(7): 2866-2875.
- [20] Takada Y, Aggarwal B B. Betulinic acid suppresses carcinogen-induced NF-kappa B activation through inhibition of I kappa B alpha kinase and p65 phosphorylation: Abrogation of cyclooxygenase-2 and matrix metalloprotease-9 [J]. *J Immunol*, 2003, 171(6): 3278-3286.
- [21] Kasperczyk H, La Ferla-Bruehl K, Westhoff M A, *et al.* Betulinic acid as new activator of NF-kB: Molecular mechanisms and implications for cancer therapy [J]. *Oncogene*, 2005, 24(46): 6945-6956.
- [22] Flekhter O B, Karachurina L T, Nigmatullina L R, *et al.* Synthesis and pharmacological activity of betulin dinicotinate [J]. *Russ J Bioorg Chem*, 2002, 28(6): 494-500.
- [23] Kashiwada Y, Chiyo J, Ikeshiro Y, *et al.* 3, 28-di-O-(dimethylsuccinyl)-betulin isomers as anti-HIV agents [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2001, 11(2): 183-185.
- [24] Freydottir J, Sigurpalsson M B, Omarsdottir S, *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* [J]. *Immunol Lett*, 2011, 136(1): 90-96.
- [25] Mishra T, Bhatia A. Augmentation of expression of immunocytes' functions by seed extract of *Ziziphus mauritiana* (Lamk.) [J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 127(2): 341-345.
- [26] Beninca J P, Dalmarco J B, Pizzolatti M G, *et al.* Analysis of the anti-inflammatory properties of *Rosmarinus officinalis* L. in mice [J]. *Food Chem*, 2011, 124(2): 468-475.
- [27] Saaby L, Jager A K, Moesby L, *et al.* Isolation of immunomodulatory triterpene acids from a standardized rose hip powder (*Rosa canina* L.) [J]. *Phytother Res*, 2011, 25(2): 195-201.
- [28] Hubert D J, Dawe A, Florence N T, *et al.* *In vitro* hepatoprotective and antioxidant activities of crude extract and isolated compounds from *Ficus gnaphalocarpa* [J]. *Inflammopharmacology*, 2011, 19(1): 35-43.
- [29] Yi J E, Obminska-Mrukowicz B, Yuan L Y, *et al.* Immunomodulatory effects of betulinic acid from the bark of white birch on mice [J]. *J Vet Sci*, 2010, 11(4): 305-313.
- [30] 易金娥, 袁莉芸, 文利新, 等. 桦木酸对小鼠淋巴细胞及巨噬细胞的影响分析 [J]. 畜牧兽医学报, 2011, 42(1): 124-130.
- [31] 易金娥, Obminska-Mrukowicz B, 杜金艳, 等. 桦木酸对巨噬细胞免疫功能和抗氧化作用的研究 [J]. 营养学报, 2010, 32(3): 281-285.
- [32] Lu Q, Xia N, Xu H, *et al.* Betulinic acid protects against cerebral ischemia-reperfusion injury in mice by reducing oxidative and nitrosative stress [J]. *Nitric Oxide*, 2011, 24(3): 132-138.
- [33] Eksioglu-Demiralp E, Kardas E R, Ozgul S, *et al.* Betulinic acid protects against ischemia / reperfusion-induced renal damage and inhibits leukocyte apoptosis [J]. *Phytother Res*, 2010, 24(3): 325-332.
- [34] Yoon J J, Lee Y J, Kim J S, *et al.* Betulinic acid inhibits high glucose-induced vascular smooth muscle cells proliferation and migration [J]. *J Cell Biochem*, 2010, 111(6): 1501-1511.
- [35] Szuster-Ciesielska A, Plewka K, Daniluk J, *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 [J]. *Toxicology*, 2011, 280(3): 152-163.
- [36] 傅佳寅, 夏满莉, 陆建锋, 等. 白桦脂酸改善氧化应激损伤大鼠血管的内皮依赖性舒张功能 [J]. 浙江大学学报: 医学版, 2010, 39(5): 523-529.
- [37] Yoon J J, Lee Y J, Kim J S, *et al.* Protective role of betulinic acid on TNF-alpha-induced cell adhesion molecules in vascular endothelial cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 391(1): 96-101.
- [38] Viji V, Shobha B, Kavitha S K, *et al.* Betulinic acid isolated from *Bacopa monniera* (L.) Wettst suppresses lipopolysaccharide stimulated interleukin-6 production through modulation of nuclear factor-kappa B in peripheral blood mononuclear cells [J]. *Int Immunopharmacol*, 2010, 10(8): 843-849.
- [39] Viji V, Helen A, Luxmi V R. Betulinic acid inhibits endotoxin-stimulated phosphorylation cascade and pro-inflammatory prostaglandin E (2) production in human peripheral blood mononuclear cells [J]. *Br J Pharmacol*, 2011, 162(6): 1291-1303.
- [40] Higa M, Ogihara K, Yogi S. Bioactive naphthoquinone derivatives from *Diospyros maritime* Blume [J]. *Chem Pharm Bull*, 1998, 46(7): 1189-1193.
- [41] Dunstan C A, Liu B, Welch C J, *et al.* Alphitol, a phenolic substance from *Alphitonia zizyphoides* which inhibits prostaglandin biosynthesis *in vitro* [J]. *Phytochemistry*, 1998, 48(3): 495-497.

- [42] Min B, Lee G I, Ha J Y, *et al.* Inhibitory effects of triterpenoids on interleukin-8/CINC-1 induction in LPS-stimulated rat peritoneal macrophages [J]. *Nat Prod Sci*, 1996, 2(1): 48-55.
- [43] Ha J Y, Min K R, Kang S H, *et al.* Suppressive effects of triterpenoids on CINC-1 induction in interleukin-1 β -stimulated rat fibroblast NRK-49F cells [J]. *Arch Pharm Res*, 1997, 20(3): 234-238.
- [44] Mukherjee P K, Saha K, Das J, *et al.* Studies on the anti-inflammatory activity of rhizomes of *Nelumbo nucifera* [J]. *Planta Med*, 1997, 63(4): 367-369.
- [45] Manez S, Recio M C, Giner R M, *et al.* Effect of selected triterpenoids on chronic dermal inflammation [J]. *Eur J Pharmacol*, 1997, 334(1): 103-105.
- [46] Huguet A I, Recio M C, Manez S, *et al.* Effect of triterpenoids on the inflammation induced by protein kinaseC activators, neuronally acting irritants and other agents [J]. *Eur J Pharmacol*, 2000, 410(1): 69-81.
- [47] Chang C W, Wang J P, Wu P P, *et al.* Terpenoids from *Ocimum basilicum* [J]. *Chin Pharm J*, 1999, 51(2): 181-189.
- [48] Krogh R, Kroth R, Berti C, *et al.* Isolation and identification of compounds with antinociceptive action from *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br [J]. *Pharmazie*, 1999, 54(6): 464-466.
- [49] Ryu S Y, Oak M H, Yoon S K, *et al.* Anti-allergic and anti-inflammatory triterpenes from the herb of *Prunella vulgaris* [J]. *Planta Med*, 2000, 66(4): 358-360.
- [50] Yamashita K, Lu H, Lu J, *et al.* Effects of three triterpenoids, lupeol, betulin, and betulinic acid on the stimulus-induced superoxide generation and tyrosyl phosphorylation of proteins in human neutrophils [J]. *Clin Chim Acta*, 2002, 325(1/2): 91-96.
- [51] Schuhly W, Heilmann J, Calis I, *et al.* New triterpenoids with antibacterial activity from *Zizyphus joazeiro* [J]. *Planta Med*, 1999, 65(8): 740-743.
- [52] Shai L, McGaw L J, Aderogba M, *et al.* Four pentacyclic triterpenoids with antifungal and antibacterial activity from *Curtisia dentata* (Burm. f) C. A. Sm. leaves [J]. *J Ethnopharma*, 2008, 119(2): 238-244.
- [53] Stephane F, Marion G, Josephine M, *et al.* Ursolic, oleanolic and betulinic acids: Antibacterial spectra and selectivity indexes [J]. *J Ethnopharma*, 2008, 120(2): 272-276.
- [54] Alakurtti S, Makela T, Koskimies S, *et al.* Pharmacological properties of the ubiquitous natural product betulin [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2006, 29(1): 1-13.
- [55] Enwerem N M, Okogun J I, Wambebe C O, *et al.* Antihelmintic activity of the stem bark extracts of *Berlinia grandiflora* and one of its active principles, betulinic acid [J]. *Phytomedicine*, 2001, 8(2): 112-114.
- [56] Steele J C P, Warhust D C, Kirby G C, *et al.* *In vitro* and *in vivo* evaluation of betulinic acid as an antimalarial [J]. *Phytother Res*, 1999, 13(2): 115-119.
- [57] Kanamoto T, Kashiwada Y, Kanbara K, *et al.* Anti-human immunodeficiency virus activity of YK-FH312 (a betulinic acid derivative), a novel compound blocking viral maturation [J]. *Antimicrob Agents Chemther*, 2001, 45(4): 1225-1230.
- [58] Hess S C, Brum R L, Honda N K, *et al.* Antibacterial activity and phytochemical analysis of *Vochysia divergens* (Vochysiaceae) [J]. *J Ethnopharmacol*, 1995, 47(2): 97-100.
- [59] Ruta M, Kristine S, Juris R, *et al.* Betulin binds to γ -aminobutyric acid receptors and exerts anticonvulsant action in mice [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2008, 90(4): 712-716.
- [60] Channa S, Dar A, Yaqoob M, *et al.* Broncho-vasodilatory activity of fractions and pure constituents isolated from *Bacopa monniera* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2003, 86(1): 27-33.