

# 精氨酸白桦脂酸的制备及其对三阴性人乳腺癌细胞MDA-MB-231增殖的影响<sup>Δ</sup>

张丽娟<sup>1\*</sup>, 刘永红<sup>1</sup>, 古同男<sup>1</sup>, 钟家亮<sup>2#</sup> (1.首都医科大学燕京医学院基础医学学系, 北京 101300; 2.中国医药工业研究总院上海医药工业研究院, 上海 201203)

中图分类号 R943;R361<sup>+.3</sup> 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)07-0906-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.07.10

**摘要** 目的:制备精氨酸白桦脂酸,并考察其对三阴性人乳腺癌细胞MDA-MB-231增殖的影响。方法:以精氨酸为增溶载体,采用共研磨法将等摩尔比的白桦脂酸与精氨酸制成精氨酸白桦脂酸。采用粉末X射线衍射法、红外光谱法、差示扫描量热法对精氨酸白桦脂酸进行表征;比较白桦脂酸和精氨酸白桦脂酸的溶解度;采用MTT法检测15、30、60、120 μg/mL的白桦脂酸、精氨酸白桦脂酸和5-氟尿嘧啶(5-FU)对MDA-MB-231细胞增殖的影响。结果:所制精氨酸白桦脂酸为不同于精氨酸与白桦脂酸物理叠加的新的物相,其中白桦脂酸的羧基与精氨酸中氨基进行了成盐反应,其未见明显的熔点峰。白桦脂酸几乎不溶于水,精氨酸白桦脂酸水溶液中白桦脂酸的溶解度为50.72 μg/mL。与白桦脂酸比较,精氨酸白桦脂酸对MDA-MB-231细胞的增殖抑制率明显升高( $P < 0.05$ ),且与5-FU比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。结论:成功制得溶解度较好的精氨酸白桦脂酸,其对MDA-MB-231细胞的增殖具有抑制作用。**关键词** 精氨酸白桦脂酸;表征;增溶;三阴性人乳腺癌细胞MDA-MB-231;增殖抑制

## Preparation of Arginate Betulinic Acid and Its Effect of the Proliferation of Triple-negative Human Breast Cancer Cell MDA-MB-231

ZHANG Lijuan<sup>1</sup>, LIU Yonghong<sup>1</sup>, GU Tongnan<sup>1</sup>, ZHONG Jiali<sup>2</sup> (1. Dept. of Basic Medicine, Yanjing Medical College, Capital Medical University, Beijing 101300, China; 2. Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry, China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 201203, China)

- somes-novel vesicular carriers for enhanced delivery: characterization and skin penetration properties[J]. *J Control Release*, 2000, 65(3): 403-418.
- [6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2015年版. 北京:中国医药科技出版社, 2015: 59-60.
- [7] 肖麟, 黄小兰, 阳文武, 等. 气相色谱法测定新雪片中冰片含量[J]. 亚太传统医药, 2016, 12(5): 39-40.
- [8] 李艳婷, 吴雯, 安原初, 等. 吡啶美辛醇质体的研制与质量评价[J]. 中国医药工业杂志, 2013, 44(10): 1005-1009.
- [9] 罗丽萍, 王军, 何文. 酮洛芬醇质体体外经皮渗透研究[J]. 中国药师, 2012, 15(9): 1225-1227.
- [10] 安珂瑶, 孙勇. 醇质体的研究进展[J]. 中国药房, 2011, 22(5): 463-465.
- [11] 王森, 欧水平, 朱卫丰, 等. 柔性脂质体在中药经皮给药制剂中的应用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(1): 30-34.
- [12] ZHANG Y, NG W, FENG X, et al. Lipid vesicular nano-carrier: quick encapsulation efficiency determination and transcutaneous application[J]. *Int J Pharm*, 2017, 516(1/2): 225-230.
- [13] 杨飞, 李芳, 焦海胜, 等. 秋水仙碱醇质体凝胶的制备及质量控制[J]. 中国药房, 2009, 20(1): 50-52.
- [14] 何一鸣, 何卓儒, 朱秀城, 等. 盐酸特比萘芬二元醇质体的制备及体外评价[J]. 广东药学院学报, 2015, 31(2): 139-144.
- [15] 吕青志, 刘德胜, 李洪娟. 醋酸泼尼松龙醇质体的制备及经皮渗透性研究[J]. 中国药房, 2013, 24(21): 1947-1949.
- [16] 傅秀娟, 王芳, 刘艳. 注入-超声法制备吡啶美辛醇质体的方法研究[J]. 泸州医学院学报, 2012, 35(6): 583-586.
- [17] 朱希聪, 张为, 林兰英, 等. 雷公藤甲素醇质体体外透皮性能和在体抗炎活性的研究[J]. 中国麻风皮肤病杂志, 2012, 28(4): 277-279.
- [18] 吴红兵, 王绍宁, 石莉, 等. 冰片对齐多夫定棕榈酸酯脂质体在小鼠体内分布的影响[J]. 中国药理学杂志, 2009, 44(8): 590-593.

<sup>Δ</sup> 基金项目: 国家新药创制重大专项基金(No.2012ZX09102101-011); 首都医科大学燕京医学院科研启动基金(No.2015)

\* 副教授, 硕士。研究方向: 天然产物作用机制、分子生物学。电话: 010-81487904。E-mail: zhanglijuan@ccmu.edu.cn

# 通信作者: 副研究员, 博士。研究方向: 新药研发、药物质量分析。电话: 021-62793151。E-mail: 13482599366@163.com

(收稿日期: 2017-08-23 修回日期: 2018-01-25)

(编辑: 刘明伟)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To prepare arginate betulinic acid, and to investigate the effect of the proliferation of triple-negative human breast cancer cell MDA-MB-231. METHODS: By using arginate as the solubilization carrier, arginate betulinic acid was prepared by co-grinding equal molar ratio of betulinic acid and arginate. The arginate betulinic acid was characterized with powder X-ray diffractometry, infrared spectroscopy and differential scanning calorimetry. The solubility of betulinic acid and arginate betulinic acid were compared. MTT method was used to assay the effects of 15, 30, 60, 120  $\mu\text{g/mL}$  betulinic acid, arginate betulinic acid and 5-FU on the proliferation of MDA-MB-231 cell. RESULTS: Prepared arginate betulinic acid was a new phase which was different from the physical mixing of arginate and betulinic acid, among which carboxyl group of betulinic acid and amino group of arginate formed as a salt, and the salt had no obvious melting peak. Betulinic acid was almost insoluble in water. The solubility of betulinic acid in arginate betulinic acid aqueous solution was 50.72  $\mu\text{g/mL}$ . Compared with betulinic acid, the inhibitory rate of arginate betulinic acid on the growth of MDA-MB-231 cell was increased significantly ( $P < 0.05$ ), there was no statistical significance between its effect and 5-FU ( $P > 0.05$ ). CONCLUSIONS: Arginate betulinic acid with good solubility is prepared successfully, and can inhibit the proliferation of MDA-MB-231 cell.

**KEYWORDS** Arginate betulinic acid; Characterization; Solubilization; Triple-negative human breast cancer cell MDA-MB-231; Proliferation inhibition

天然药物分子多数存在相对分子质量大、溶解性差等问题,在胃肠道溶解速率较慢,导致其口服吸收差、生物利用度低,阻碍了难溶性天然药物的临床应用。有多种方法<sup>[1-4]</sup>可用于解决药物的水难溶性和低溶解速率等问题,其中成盐是增加难溶性弱酸、弱碱药物溶解度最常用的方法<sup>[5-6]</sup>。成盐可改善药物的部分理化性质,包括熔点、溶解度、溶出速率、稳定性、吸湿性以及生物利用度等。

全球乳腺癌发病率自20世纪70年代末开始一直是上升趋势。近年我国乳腺癌发病率的增长速度高出高发国家1~2个百分点,并且趋于年轻化,严重危害妇女健康,其中以三阴性乳腺癌最为显著<sup>[7]</sup>,已成为当前社会的重大公共卫生问题,因此寻找新型抗肿瘤药物意义重大。据不完全统计,来源于天然药物的抗癌制剂约占抗癌药物的三分之一<sup>[8]</sup>,因此从天然药物中寻找新型抗肿瘤药物具有广阔的前景。白桦脂酸(Betulinic acid)为自然界常见的羽扇烷型五环三萜类(PCTT)化合物<sup>[9]</sup>,广泛分布于白桦树、夏枯草、木瓜、迷迭香、夹竹桃、白头翁、赤楠等多种植物中,主要从白桦树皮中提取获得。白桦脂酸具有抗炎、抗菌、抗病毒、抗血小板聚集、抗脑缺血、保肝等活性<sup>[10-11]</sup>,尤其是近年来发现的白桦脂酸具有抗肿瘤和抗人类免疫缺陷病毒(HIV)活性引起了广泛关注<sup>[12-14]</sup>。白桦脂酸可溶于甲醇、乙醇等有机溶剂,但难溶于水,限制了其临床应用。

通常,水溶性较大的药物在胃肠液中的溶出速率较快。氨基酸作为药物载体,被广泛用于药物的增溶研究,Jeong HJ等<sup>[15]</sup>通过制备白桦脂酸的甘氨酸甲酯复合物,再水解生成白桦脂酸/甘氨酸结合物,增加了白桦脂酸的溶解度,促进了其对黑色素瘤细胞MEL-2的细胞毒作用。本研究则利用精氨酸的碱性氨基与白桦脂酸的羧酸成盐的特性,采用机械化学法制备获得精氨酸白桦脂酸,并考察其对三阴性人乳腺癌细胞MDA-MB-231增殖的影响。

## 1 材料

### 1.1 仪器

MM400型球磨机(德国Retch公司);TU1901型双光束紫外分光光度计(北京普析通用仪器有限公司);D8 Advance型粉末衍射仪(德国Bruker公司);5700型傅里叶变换红外光谱仪(美国Nicolet公司);DSC1型差示扫描量热仪(瑞士Mettler Toledo公司);1200型高效液相色谱仪(美国Agilent公司);WD-2102A型酶标仪(北京六一仪器厂);HERAcell 240i型CO<sub>2</sub>培养箱[赛默飞世尔(上海)仪器有限公司];CKX41SF型倒置相差显微镜(日本Olympus公司)。

### 1.2 药品与试剂

白桦脂酸原料药(武汉远城科技发展有限公司,批号:BEA201504211,纯度:≥98.5%);白桦脂酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号:111802-201402,纯度:≥98.5%);精氨酸(北京欣经科生物技术有限公司,批号:151205,纯度:>99.8%,进口分装);5-氟尿嘧啶(5-FU,美国Sigma-Aldrich公司,批号:151018,纯度:≥99.0%);胎牛血清、青霉素、链霉素和RPMI-1640培养基均购自上海博耀生物科技有限公司;甲醇为色谱纯,水为纯净水,其他试剂均为分析纯。

### 1.3 细胞

三阴性人乳腺癌细胞株MDA-MB-231(中国医学科学院肿瘤医院)。

## 2 方法与结果

### 2.1 精氨酸白桦脂酸的制备

按等摩尔比精密称取白桦脂酸原料药2 283.50 mg、精氨酸871.00 mg,混合均匀,置于球磨机中研磨12 h,即可获得精氨酸白桦脂酸。

### 2.2 白桦脂酸/精氨酸物理混合物的制备

精密称取白桦脂酸原料药913.40 mg、精氨酸348.40 mg,混合均匀,置于研钵中研磨30 s,混匀,即得白桦脂酸/精氨酸物理混合物。

## 2.3 精氨白桦脂酸的表征

2.3.1 粉末X射线衍射 测定条件:铜靶,电压40 kV,电流40 mA,在 $3^{\circ}\sim 40^{\circ}$ 范围内记录样品白桦脂酸原料药、精氨酸、白桦脂酸/精氨酸物理混合物和精氨白桦脂酸的粉末X射线衍射图谱见图1。

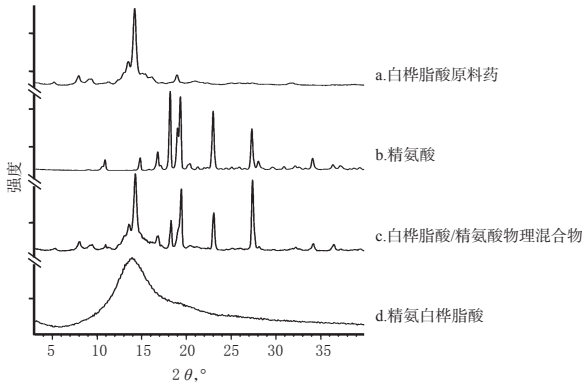


图1 粉末X射线衍射图

Fig 1 Powder X-ray diffracton pattern

由图1可见,白桦脂酸原料药是晶态化合物,有尖锐的特征衍射峰;精氨酸也属晶态化合物;白桦脂酸/精氨酸物理混合物的主要衍射峰包含有精氨酸和白桦脂酸的衍射峰,为2种成分衍射峰的物理叠加;精氨白桦脂酸为非晶态化合物,因而无明显尖锐衍射峰,表现为弥散衍射峰,由此表明通过制备过程精氨酸与白桦脂酸形成了新的物相。

2.3.2 傅里叶变换红外光谱分析 利用傅里叶变换红外光谱仪测定,光谱范围 $4\ 000\sim 650\text{ cm}^{-1}$ ,分辨率 $4.0\text{ cm}^{-1}$ ,扫描次数8次,测定白桦脂酸原料药、精氨酸、白桦脂酸/精氨酸物理混合物及精氨白桦脂酸的红外光谱,光谱图见图2。

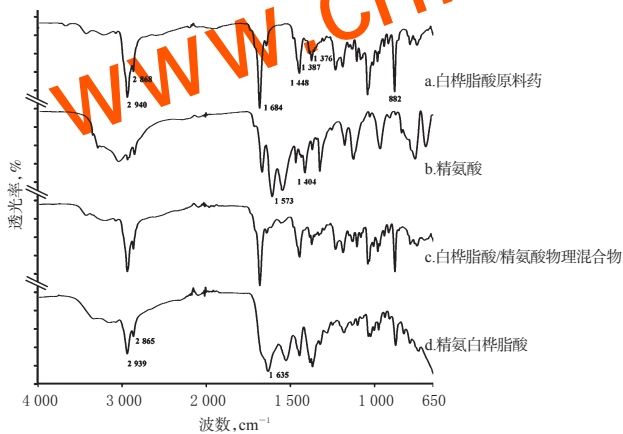


图2 傅里叶变换红外光谱图

Fig 2 Fourier transform infrared spectrum

白桦脂酸具有羽扇豆烷型骨架,分子中存在特征的偕二甲基、C=C双键及羧基,这些结构在其红外谱图上均可得到确认。由图2可见, $1\ 387\text{ cm}^{-1}$ 和 $1\ 376\text{ cm}^{-1}$ 处的特征双峰为C-4连接的偕二甲基的C—H面内弯曲振动; $2\ 940$ 、 $2\ 868$ 、 $1\ 684\text{ cm}^{-1}$ 为C=O伸缩振动; $1\ 448$ 、

$882\text{ cm}^{-1}$ 为C=C双键的伸缩振动吸收和面外弯曲振动。精氨酸在红外光谱图上可见—NH<sub>2</sub>的弯曲振动( $1\ 573\text{ cm}^{-1}$ )和—COO—的对称伸缩振动( $1\ 404\text{ cm}^{-1}$ ),和白桦脂酸原料药相比,白桦脂酸/精氨酸物理混合物的红外光谱差别不大。精氨白桦脂酸的红外光谱图中C=O伸缩振动明显减弱并向低波数移动。红外光谱分析结果提示,成盐反应是通过白桦脂酸的羧基与精氨酸中氨基进行的。

2.3.3 差示扫描量热分析 分别精密称取白桦脂酸原料药、精氨酸、白桦脂酸/精氨酸物理混合物及精氨白桦脂酸各5 mg,进行差示扫描量热分析,扫描温度范围为 $30\sim 330^{\circ}\text{C}$ ,升温速率为 $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ,差示扫描量热分析图见图3。

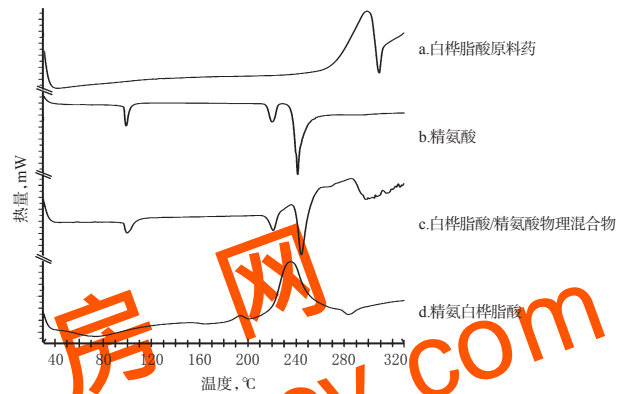


图3 差示扫描量热分析图

Fig 3 DSC analysis spectrum

由图3可知,白桦脂酸熔点为 $309.4^{\circ}\text{C}$ ,精氨酸的熔点为 $219.0^{\circ}\text{C}$ ,白桦脂酸/精氨酸物理混合物中可见精氨酸的熔点峰,而精氨白桦脂酸未见明显的熔点峰,与上述物质均存在明显差异,由此证实了新物相的生成。

2.3.4 紫外光谱分析 采用双光束紫外分光光度仪,将白桦脂酸原料药、精氨酸及精氨白桦脂酸样品分别用甲醇稀释制成 $20\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ 的溶液,在 $190\sim 400\text{ nm}$ 波长范围内进行扫描。结果显示,白桦脂酸原料药、精氨白桦脂酸在 $210\text{ nm}$ 波长处有最大吸收峰,据此确定检测波长 $210\text{ nm}$ 。

## 2.4 增溶作用分析

2.4.1 色谱条件 色谱柱:Agilent Eclipse XDB C<sub>18</sub>( $250\text{ mm}\times 4.6\text{ mm}, 5\text{ }\mu\text{m}$ );流动相:甲醇-水(93:7, V/V);流速: $1.0\text{ mL}/\text{min}$ ;进样量: $20\text{ }\mu\text{L}$ ;检测波长: $210\text{ nm}$ ;柱温: $30^{\circ}\text{C}$ 。该色谱条件下,白桦脂酸的出峰时间约为 $8.3\text{ min}$ ,白桦脂酸对照品甲醇溶液色谱图见图4。

2.4.2 线性关系考察 精密称取白桦脂酸对照品 $25\text{ mg}$ ,置于 $25\text{ mL}$ 量瓶中,用甲醇定容,制备成质量浓度为 $1.0\text{ mg}/\text{mL}$ 的贮备液。进一步稀释贮备液制成质量浓度为 $0.005$ 、 $0.01$ 、 $0.05$ 、 $0.1$ 、 $0.2$ 、 $0.5$ 、 $1.0\text{ mg}/\text{mL}$ 的系列溶液,按“2.4.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以质量浓度为横坐标(c)、峰面积为纵坐标(A)进行回归分析,

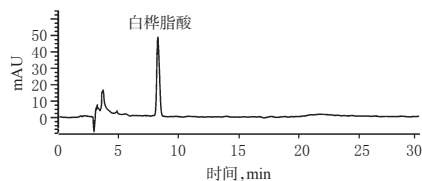


图4 白桦脂酸对照品甲醇溶液的高效液相色谱图

Fig 4 HPLC chromatogram of betulinic acid control methanol solution

得回归方程为  $A=6.0198c+1.1938$  ( $r^2=0.9996$ ), 白桦脂酸检测质量浓度在  $0.005\sim 1.0\text{ mg/mL}$  范围内与峰面积线性关系良好。

2.4.3 精密度试验 取质量浓度为  $0.5\text{ mg/mL}$  的白桦脂酸对照品溶液, 重复进样6次, 考察仪器精密度, 结果显示, 峰面积的RSD为  $0.23\%$  ( $n=6$ )。另精密称取白桦脂酸对照品  $12.50\text{ mg}$ , 各6份, 置于  $25\text{ mL}$  量瓶中, 甲醇定容, 制成  $0.5\text{ mg/mL}$  溶液, 分别进样测定, 考察批间精密度。结果显示, 峰面积的RSD为  $0.43\%$  ( $n=6$ )。

2.4.4 准确度试验 精密称取精氨酸白桦脂酸, 分别加入适量白桦脂酸对照品, 加甲醇溶解, 制成低、中、高质量浓度 ( $0.05, 0.4, 0.8\text{ mg/mL}$ ) 的质控样品, 进样测定峰面积, 计算方法回收率。结果显示, 平均回收率为  $99.2\%$  (RSD为  $1.34\%$ ,  $n=9$ )。

2.4.5 溶解度测定 取适量白桦脂酸对照品和精氨酸白桦脂酸, 分别制备水饱和溶液, 用滤纸过滤, 再经  $0.45\text{ }\mu\text{m}$  微孔滤膜滤过, 备用。分别取白桦脂酸对照品、精氨酸白桦脂酸饱和水溶液进样, 以峰面积计算白桦脂酸含量。结果表明, 白桦脂酸对照品水溶液在保留时间  $8.3\text{ min}$  附近的峰面积为零, 表明白桦脂酸几乎不溶于水, 精氨酸白桦脂酸可溶于水, 且其中白桦脂酸的溶解度为  $50.72\text{ }\mu\text{g/mL}$  ( $n=3$ ), 白桦脂酸、精氨酸白桦脂酸水溶液的高效液相色谱图见图5。

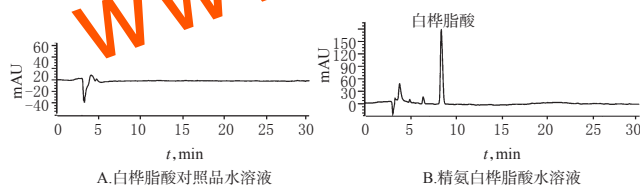


图5 白桦脂酸、精氨酸白桦脂酸水溶液的高效液相色谱图

Fig 5 HPLC chromatograms of betulinic acid and arginine betulinic acid aqueous solution

## 2.5 精氨酸白桦脂酸对MDA-MB-231细胞的影响

2.5.1 细胞培养 将MDA-MB-231细胞置于含10%胎牛血清、 $100\text{ u/mL}$ 青霉素、 $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ 链霉素的RPMI-1640培养液中, 于  $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $5\%\text{ CO}_2$  的湿润无菌环境下培养。

2.5.2 溶液的制备 取白桦脂酸原料药、精氨酸白桦脂酸、5-FU, 分别用少量二甲基亚砜(DMSO)溶解, 再经RPMI-1640培养液稀释制成终质量浓度分别为  $15, 30, 60, 120\text{ }\mu\text{g/mL}$  的系列溶液。

2.5.3 形态学观察 取指数生长期MDA-MB-231细胞, 加入精氨酸白桦脂酸终质量浓度为  $0$  (空白对照)、 $60, 120\text{ }\mu\text{g/mL}$  的含药培养液培养  $48\text{ h}$ , 以倒置相差显微镜观察MDA-MB-231细胞的形态学变化。正常情况下(空白对照), MDA-MB-231细胞呈长梭形, 贴壁生长。在  $60, 120\text{ }\mu\text{g/mL}$  精氨酸白桦脂酸作用  $48\text{ h}$  后, 细胞数目明显减少, 且细胞变圆、缩小、老化, 核质发散, 并随浓度的升高, 凋亡明显, 不同质量浓度精氨酸白桦脂酸对MDA-MB-231细胞形态学的影响见图6。

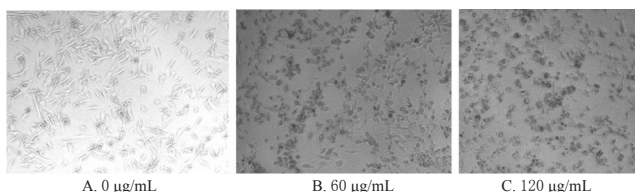


图6 不同质量浓度精氨酸白桦脂酸对MDA-MB-231细胞形态学的影响( $\times 100$ )

Fig 6 Effects of different concentration of arginine betulinic acid on the morphology of MDA-MB-231 cells( $\times 100$ )

2.5.4 细胞增殖试验 采用MTT比色法<sup>[16]</sup>, 取指数生长期细胞, 弃去培养基, 加  $0.25\%$  胰酶  $1\text{ mL}$  消化, 用磷酸盐缓冲液 ( $\text{pH } 7.4$ ) 洗涤1次, 然后加新制的含  $10\%$  胎牛血清、 $100\text{ u/mL}$ 青霉素、 $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ 链霉素的RPMI-1640培养基。按  $3\text{ }000\sim 6\text{ }000$  个/孔将细胞接种于96孔培养板中, 每孔加入  $0.2\text{ mL}$  培养基, 每个浓度设3个复孔, 空白对照只加  $0.2\text{ mL}$  无细胞培养基传代培养  $24\text{ h}$ 。吸弃原培养液, 各孔依次加入“2.5.2”项下系列浓度的溶液  $200\text{ }\mu\text{L}$ 。干预  $48\text{ h}$  后, 用MTT法经酶标仪在  $490\text{ nm}$  波长处测定光密度(OD), 取平均值。计算细胞增殖抑制率, 增殖抑制率( $\%$ ) =  $(1 - \text{OD}_{\text{加药}} / \text{OD}_{\text{空白对照}}) \times 100\%$ 。t检验结果表明, 与白桦脂酸原料药比较, 精氨酸白桦脂酸和5-FU对MDA-MB-231细胞的增殖抑制率明显升高 ( $P < 0.05$ ), 且精氨酸白桦脂酸  $30\text{ }\mu\text{g/mL}$  以上其作用与5-FU比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。白桦脂酸原料药、精氨酸白桦脂酸和5-FU对MDA-MB-231细胞增殖的影响见表1。

表1 白桦脂酸原料药、精氨酸白桦脂酸和5-FU对MDA-MB-231细胞增殖的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Tab 1 Effects of betulinic acid crude drug, arginine betulinic acid and 5-FU on the proliferation of MDA-MB-231 cell ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

样品	增殖抑制率, %			
	$15\text{ }\mu\text{g/mL}$	$30\text{ }\mu\text{g/mL}$	$60\text{ }\mu\text{g/mL}$	$120\text{ }\mu\text{g/mL}$
白桦脂酸原料药	$0.95 \pm 0.6$	$9.7 \pm 2.1$	$41.4 \pm 4.6$	$50.3 \pm 5.8$
精氨酸白桦脂酸	$31.2 \pm 1.9^{**}$	$68.1 \pm 5.5^*$	$76.3 \pm 5.8^*$	$93.5 \pm 7.3^*$
5-FU	$53.5 \pm 4.5^*$	$72.0 \pm 6.2^*$	$88.6 \pm 6.4^*$	$95.7 \pm 7.7^*$

注: 与白桦脂酸原料药比较,  $^*P < 0.05$ ; 与5-FU比较,  $^{**}P < 0.05$

Note: vs. betulinic acid crude drug,  $^*P < 0.05$ ; vs. 5-FU,  $^{**}P < 0.05$

### 3 讨论

机械化学是通过机械外力进行的固态反应,属于绿色化学中的一种。与传统溶液法相比,机械化学法不引入溶剂(或者微量),且具有省时节能、选择性好、产率高、条件温和等特点。

白桦脂酸对正常组织具有低毒性的特点,由于其能克服肿瘤细胞一些特定形式的抵抗,与传统的化疗药物相比,长期治疗不易出现耐药性,具有广阔的开发前景,但是白桦脂酸的水溶性差,限制了其进一步的开发和利用,白桦脂酸不溶于水,通过考察其结构特点发现,白桦脂酸在分子结构中含有性质活泼的酸性基团羧基,而精氨酸属于碱性氨基酸,分子结构中含有活泼的碱性氨基,利用机械化学的方法,可以利用酸碱反应制备精氨酸白桦脂酸的盐,借助精氨酸易溶于水的特性,作为载体,提高白桦脂酸的水溶性。笔者前期研究采用研磨法制备了精氨酸白桦脂酸,考察了不同时间点的制备效果,结果表明,当研磨时间为12 h时制备得精氨酸白桦脂酸,白桦脂酸通过与精氨酸成盐,精氨酸白桦脂酸的溶解度达到50.72  $\mu\text{g/mL}$ ,由此拓宽了白桦脂酸进一步开发利用的领域。

白桦脂酸的最初报道主要是对黑素瘤具有专一的细胞毒性<sup>[17]</sup>,但最近研究<sup>[12-14]</sup>发现,白桦脂酸对许多其他癌细胞都具有较为广谱的生物活性。乳腺癌为女性常见的恶性肿瘤,具有高发病率和高死亡率的特点。有研究<sup>[13]</sup>发现白桦脂酸对乳腺癌细胞MCF-7具有抑制作用,但其对MDA-MB-231细胞的抑制作用尚未见报道,MDA-MB-231细胞属于高转移性恶性乳腺癌细胞系,容易成瘤,常用于肿瘤转移研究,而大多数乳腺癌患者死于转移癌,因此笔者考察了白桦脂酸与精氨酸白桦脂酸对MDA-MB-231细胞的增殖抑制作用。结果表明,白桦脂酸通过与精氨酸成盐生成精氨酸白桦脂酸,其对MDA-MB-231细胞的增殖抑制作用比白桦脂酸明显提高,本试验结果为白桦脂酸的进一步开发成为高效低毒的抗癌新药提供了参考。

### 参考文献

[1] CAVAZOS-GARDUÑO A, OCHOA FLORES AA, SER-RANO-NIÑO JC, et al. Preparation of betulinic acid nanoemulsions stabilized by  $\omega$ -3 enriched phosphatidylcholine[J]. *Ultrason Sonoche*, 2015. Doi: 10.1016/j.ultsonch.2014.12.007.

[2] LI B, HARICH K, WEGIEL L, et al. Stability and solubility enhancement of ellagic acid in cellulose ester solid dispersions[J]. *Carbohydr Polym*, 2013, 92(2): 1443-1450.

[3] RICHTER A, OLBRICH C, KRAUSE M, et al. Solubilization of sagopilone, a poorly water-soluble anticancer drug, using polymeric micelles for parenteral delivery[J]. *Int J Pharm*, 2010, 389(1/2): 244-253.

[4] MÉNARD N, TSAPIS N, POIRIER C, et al. Physico-

chemical characterization and toxicity evaluation of steroid-based surfactants designed for solubilization of poorly soluble drugs[J]. *Eur J Pharm Sci*, 2011, 44(5): 595-601.

[5] WIEDMANN TS, NAQWI A. Pharmaceutical salts: theory, use in solid dosage forms and in situ preparation in an aerosol[J]. *Asian J Pharm Sci*, 2016, 11(6): 722-734.

[6] SAVJANI KT, GAJJAR AK, SAVJANI JK. Drug solubility: importance and enhancement techniques[J]. *ISRN Pharm*, 2012. DOI: 10.5402/2012/195727.

[7] 路艳星. 中医情志疗法对肝郁型乳腺癌患者生存质量的影响[D]. 广州: 广州中医药大学, 2011.

[8] 汪红, 王强, 余国莫. 近十年抗肿瘤中药的研究进展[J]. *中国野生生物资源*, 2000, 19(2): 7-10.

[9] PARK SY, KIM HJ, KIM KR, et al. Betulinic acid, a bioactive pentacyclic triterpenoid, inhibits skeletal-related events induced by breast cancer bone metastases and treatment[J]. *Toxicol Appl Pharm*, 2014, 275(2): 152-162.

[10] ADESANWO JK, MAKINDE OO, OBAFEMI CA. Phytochemical analysis and antioxidant activity of methanol extract and betulinic acid isolated from the roots of *Tetradlea potatoria*[J]. *J Pharm Res*, 2013, 6(9): 903-907.

[11] KIMA HI, QUAN ES, KIM JE, et al. Inhibition of estrogen signaling through depletion of estrogen receptor alpha by ursolic acid and betulinic acid from *Prunella vulgaris* var. *lilacina*[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 451(2): 282-287.

[12] LIU YP, GAO DW, ZHANG XW, et al. Antitumor drug effect of betulinic acid mediated by polyethylene glycol modified liposomes[J]. *Mat Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2016. DOI: 10.1016/j.msec.2016.03.080.

[13] 时文波, 甘为, 黄雪莲. 白桦脂酸诱导乳腺癌细胞MCF-7凋亡的机制研究[J]. *中药药理与临床*, 2015. DOI: 10.13412/j.cnki.zyyj.2015.06.013.

[14] LI JZ, GOTO M, YANG XM, et al. Fluorinated betulinic acid derivatives and evaluation of their anti-HIV activity[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2016, 26(1): 68-71.

[15] JEONG HJ, CHAI HB, PARK SY, et al. Preparation of amino acid conjugates of betulinic acid with activity against human melanoma[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 1999, 9(8): 1201-1204.

[16] 陶小妹, 顾红燕, 李丽莉, 等. 共轭亚油酸-吉西他滨偶联物的体外抗肿瘤活性研究[J]. *中国药房*, 2016, 27(25): 3521-3524.

[17] PISHA E, CHAI H, LEE IS, 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.

(收稿日期: 2017-09-12 修回日期: 2017-10-31)

(编辑: 邹丽娟)