

文章编号: 1004-0374(2011)05-0503-08

白桦脂酸的研究进展

徐 军, 王晋萍, 钱辰旭, 仇文卫*, 杨 帆, 汤 杰

(华东师范大学化学系药物化学研究所, 上海 200062)

摘 要: 白桦脂酸是一种五环三萜酸, 存在于多种天然植物, 特别是白桦树皮中, 毒性低, 安全指数高。近年来发现白桦脂酸具有抗肿瘤、抗 HIV、抗炎、抗菌、抗疟疾等多种生物活性, 特别是在抗黑色素瘤与抗 HIV 方面具有突出的表现, 从而引起了人们极大的研究兴趣。对白桦脂酸的来源和生物活性进行了简要综述。

关键词: 白桦脂酸; 白桦脂酸制备; 生物活性; 肿瘤; 抗 HIV

中图分类号: R915; R979.13; TQ460.6 **文献标志码:** A

Progress of study on betulinic acid

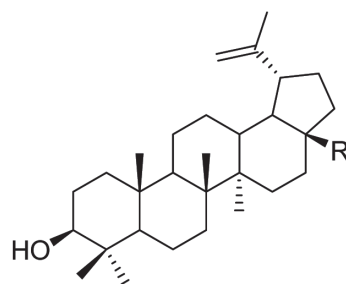
XU Jun, WANG Jin-Ping, QIAN Chen-Xu, QIU Wen-Wei*, YANG Fan, TANG Jie

(Institute of Medicinal Chemistry, Department of Chemistry, East China Normal University, Shanghai 200062, China)

Abstract: The betulinic acid (BA), a type of pentacyclic triterpene acid, which is found in the bark of several species of plants, principally the white birch. It has a variety of biological activities, such as anti-tumor, anti-HIV, anti-inflammatory, antimicrobial, and antimalarial activity, especially in anti-melanoma and anti-HIV show great promise. In this paper, the preparation and bioactivities of betulinic acid are reviewed.

Key words: betulinic acid; preparation of betulinic acid; biological activity; tumor; anti-HIV

白桦脂酸 (betulinic acid, BA) 是一种五环三萜酸 (分子结构见图 1), 存在于白桦树 (*Betula pubescens*)、滇刺枣 (*Ziziphus mauritiana*)、夏枯草 (*Prunella vulgaris*)、木瓜 (*Chaenomeles sinensis*)、迷迭香 (*rosemary*)、第伦桃 (*Dillenia indica*)、夹竹桃 (*Apocynaceae*)、毛茛科植物白头翁 (*Pulsatilla chinensis*)、桃金娘科赤楠 (*Syzygium formosanum*) 等多种植物中, 主要是从白桦树皮中提取。近年来的研究表明, BA 具有诸多生物活性, 如抗肿瘤、抗 HIV、抗炎、抗菌、抗疟疾等, 尤其是在抗肿瘤方面, 特别是针对黑色素瘤, 有突出的表现。美国癌症研究所 NCI(National Cancer Institute) 已将其列入快速研发规划项目 (Rapid Access to Intervention in Development, RAID), 使得 BA 更具开发前景。BA 具有如此众多的药理活性, 加之其较高的安全性引起了人们广泛的研究兴趣。然而, 到目前为止 BA 还没有实现商品化供应。



Betulinic Acid R = COOH

Betulin R = CH₂OH

图1 白桦脂酸及白桦脂醇的分子结构

收稿日期: 2011-01-09; 修回日期: 2011-02-17

基金项目: 国家自然科学基金项目(20802020)

*通信作者: E-mail: wwqiu@chem.ecnu.edu.cn

1 BA的来源

BA 的来源主要有三个：(1) 从植物中提取，目前主要从白桦树皮中提取；(2) 以商品化供应、价格相对低廉的白桦脂醇为原料，经半合成路线制备；(3) 以白桦脂醇为原料，通过微生物发酵制备。

1.1 从植物中提取BA

人们每年会砍伐大量的白桦树木，大约会产生 23 万吨白桦树皮，目前 BA 植物提取的主要原料是白桦树皮。白桦树主要分布在北半球，其干燥树皮中富含 BA 的类似物白桦脂醇 (betulin, 图 1)，其含量高达 22%~30%^[1-3]，而其中 BA 的含量则很低，仅为 0.025%~2%^[4-5]。Zhao 等^[6]对 BA 提取过程中的提取溶剂 (二氯甲烷、乙酸乙酯、丙酮、氯仿、甲醇、95% 乙醇) 及所用白桦树皮的产地 (黑龙江、辽宁、吉林、内蒙古) 进行了研究，发现使用不同的提取溶剂对 BA 的产率有很大影响，其中 95% 乙醇最好，产率可达 1.86%，而甲醇最差，提取产率仅为 1.07%；同时还发现产于黑龙江的白桦树皮中 BA 含量最高，为 1.86%，而产于辽宁的含量仅为 1.22%。为了避免溶剂提取带来的环境问题，有人提出了以更环保、经济的超临界 CO₂ 从白桦树皮中提取 BA^[5,7]。

除白桦树皮外，从其他植物中提取 BA 也有较多报道，Galgon 等^[8]从悬铃木 (*Platanus acerifolia*) 树皮的软木层中用甲醇提取，通过 GC 定量分析，发现其中 BA 含量为 3.3%；Hass 等^[9]从蜡烛树 (*Vochysia divergens*) 皮中用 95% 甲醇提取 BA，发现 4 kg 干燥树皮可提取 300 mg；Nyasse 和 Monache^[10]从非洲大戟科 (*Euphorbiaceae*) 植物的树皮中以乙酸乙酯提取 BA，发现每 1 kg 干燥树皮中最多可提取 19 g；Kwon 等^[11]从使君子科植物的种子中以甲醇提取 BA，发现每 1 kg 干燥果实可以提取 100 mg；Chandramu 等^[12]用甲醇从黄荆 (*Vitex negundo*) 叶中提取；Li 等^[13]用乙醇从翻白叶树 (*Pterospermum heterophyllum* Hance) 根中提取；Ramadan 等^[14]从琴叶榕 (*Ficus pandurata* Hance) 树皮中提取。迄今为止，由于 BA 在这些植物中含量很低，提取工艺复杂，纯化又困难。因此，从植物中提取 BA 目前还没有潜在的工业化价值，其往往作为提取白桦脂醇的一种副产。

1.2 半合成方法制备BA

由于 BA 的类似物——白桦脂醇在白桦树皮中含量很高，提取成本相对较低，且已商品化供应，

如其为原料通过半合成的方法制备 BA 则具有良好的工业化前景。Kim 等^[15]报道了以白桦脂醇为原料经 Jones 氧化生成白桦酮酸，然后用 NaBH₄ 还原得 BA，不足之处在于还原过程中会产生 5% 的 3 α -羟基异构体 (图 2)。因此，他们又报道了另一条合成路线^[16]，即白桦脂醇的 C-28 羟基选择性保护生成 THP 醚得到化合物 1，然后用乙酰基保护 C-3 位羟基得到化合物 2，PPTS 选择性脱除 C-28 位保护基得到化合物 3，Jones 氧化得到化合物 4，最后脱除 C-3 位保护基得到 BA。这条路线虽然不产生异构体，但路线较长，操作繁琐，总收率不高 (仅为 55%)。Flekhter 等^[17-18]则报道了一种改进型的以 NABH₄ 为还原剂，将白桦酮酸还原为 BA 的方法；在优化条件下，采用异丙醇作溶剂，使得副产物 3 α -羟基异构体仅为 3%。

Csuk 等^[19]则报道了使用 TEMPO/NaCl₂O/NaClO 氧化体系将白桦脂醇氧化成白桦脂醛，然后分别尝试了 NaMnO₄、MnSO₄/AgNO₃ 及 MnO₂ 氧化体系将白桦脂醛氧化成目标产物 BA。同时他们还报道了使用 4-乙酰氨基-TEMPO/NaCl₂O/NaClO 氧化体系将白桦脂醇直接选择性氧化成 BA^[20] (图 3)，此路线虽只需一步或两步反应就可得到所需产物，但是，氧化体系较复杂、成本高，不适合规模化制备。

最近本课题组报道了以白桦脂醇为原料，利用 IBX 选择性氧化制备白桦酮醛，进而利用四丁基高锰酸铵 (可高效、方便地由 n-Bu₄NBr 与 KMnO₄ 反应制备^[21]) 氧化制备白桦酮酸的简便、高效、环境友好的新方法^[22] (图 4)，白桦酮酸可以很方便地以 NaBH₄ 还原得到 BA，该合成路线极具产业化前景。

1.3 通过微生物发酵制备BA

与化学合成方法相比，微生物转化具有高立体选择性与区域选择性、反应条件温和、费用低、污染小，有时还具有化学方法很难完成的转化等优点，使得这种方法具有工业化的潜力。Chen 等^[23]首次报道了通过微生物发酵的方法将白桦脂醇转化成白桦酯酸。他们选择了米曲霉菌 AS 3.498 (*Aspergillus oryzae* AS 3.498)、曲霉菌 WZ (*Aspergillus* sp. WZ)、臭曲霉菌 ZU-G1 (*Aspergillus foetidus* ZU-G1)、康氏木霉菌 ZJ4 (*Trichoderma koningii* ZJ4) 等 4 个菌株，筛选了 7 种转化条件，最后发现使用臭曲霉菌 ZU-G1 的收率最高，达到 8.73%。显然以白桦脂醇为原料通过微生物发酵大量制备 BA，还需要生物化学

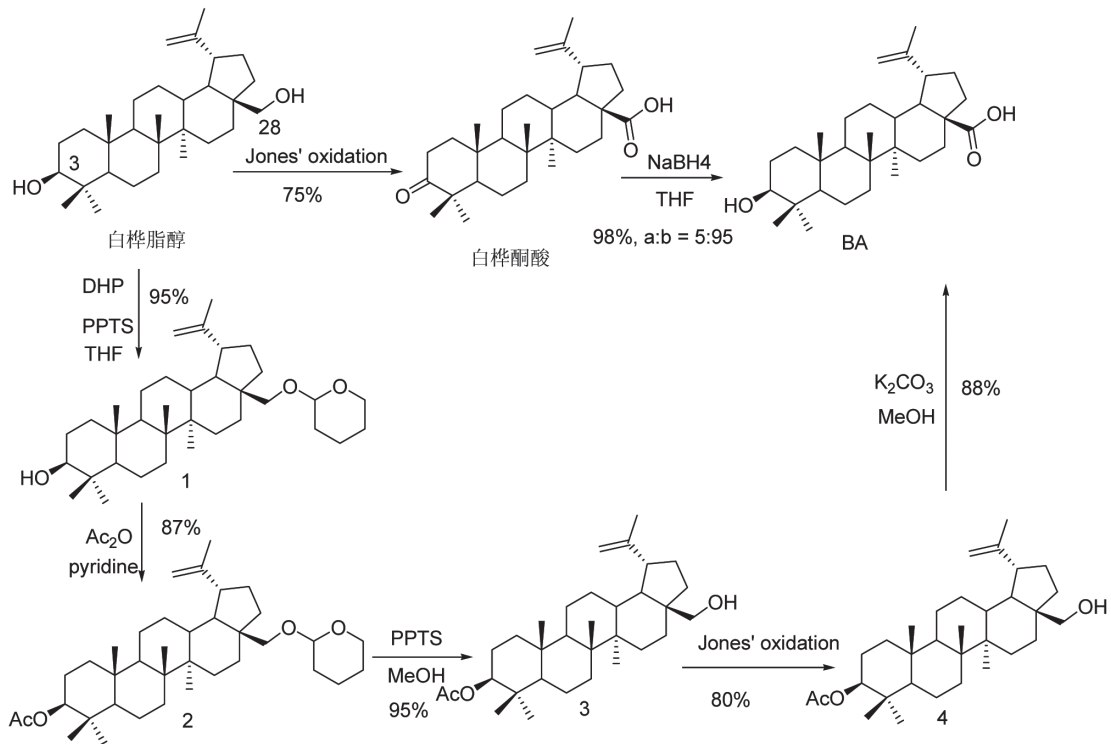


图2 半合成方法制备BA之一

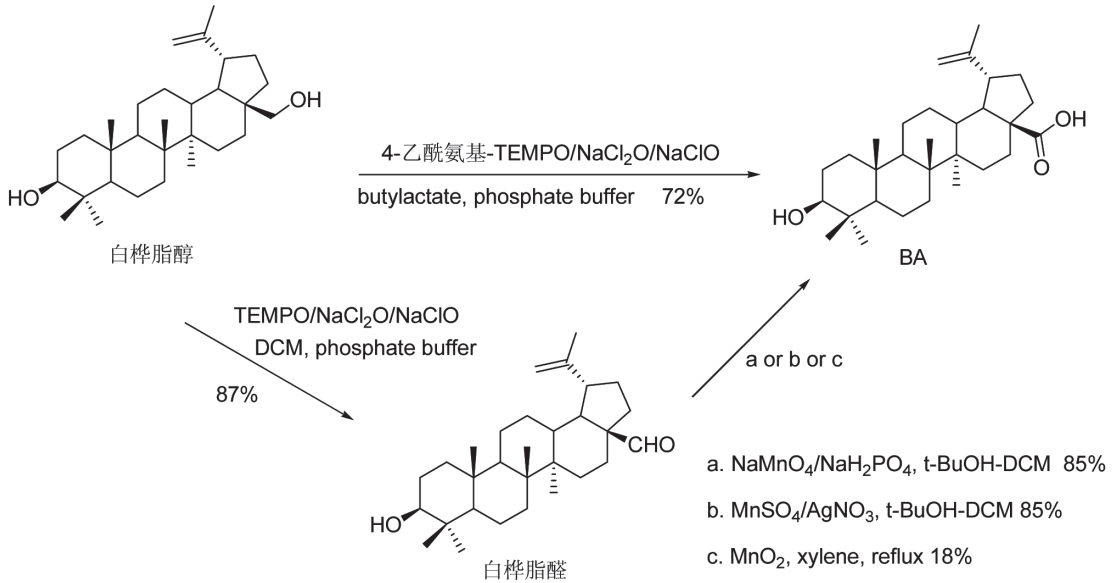


图3 半合成方法制备BA之二

家们不懈的努力。

2 BA的生物活性

2.1 抗肿瘤

对于 BA 抗肿瘤活性研究较早的是美国伊利诺伊大学的 Pisha 等^[24], 他们报道了 BA 作为特异性

的黑色素瘤细胞毒试剂, 通过诱导凋亡, 可以完全抑制移植在裸鼠身上的人黑色素瘤生长。人们还发现 BA 对于一些儿童最常见的神经外胚层肿瘤如神经母细胞瘤 (neuroblastoma)^[25]、好发于儿童颅内的恶性脑瘤——髓母细胞瘤 (medulloblastoma)^[26] 及儿童期最常见的实体瘤尤文氏肉瘤 (Ewing's sarcoma)^[25]

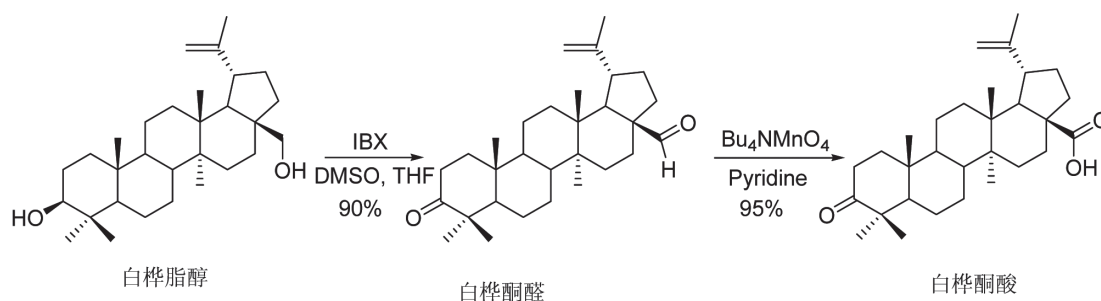


图4 半合成方法制备B之三

有很好的诱导凋亡作用。Zuco 等^[27]报道了 BA 对于多种卵巢癌细胞株 A2780、OVCAR-5、IGROV-1 的抗增殖活性，其 IC_{50} 分别为 1.8、3.3、4.5 $\mu\text{g/mL}$ ；对于宫颈癌细胞株 A431 的 IC_{50} 为 1.8 $\mu\text{g/mL}$ ，以及对于非小细胞肺癌细胞株 H460 和小细胞肺癌细胞株 POGB 的 IC_{50} 分别为 1.5 和 4.2 $\mu\text{g/mL}$ 。Kumar 等^[28]从五桠果的果实中提取 BA，并测试了其抗白血病活性，发现 BA 对白血病细胞株 U937、HL60、K562 显示了较好的抑制活性，其 IC_{50} 分别为 13.73、12.84、15.27 $\mu\text{g/mL}$ 。全世界每年大约会有 50 万例头颈鳞癌新患者，Thurnher 等^[29]首次报道了 BA 对于两种不同的恶性头颈鳞癌细胞株 SCC25 与 SCC9 都具有较好的诱导凋亡作用。Chintharlapalli 等^[30]报道了 BA 对于前列腺癌细胞株 LNCaP 具有较好的抑制活性，其 IC_{50} 为 1~5 $\mu\text{mol/L}$ 。此外，BA 对于乳腺癌、结肠癌、肝细胞癌、成胶质细胞瘤、骨肉瘤及横纹肌肉瘤等均有抑制活性^[31]。

BA 具有如此广泛的抗肿瘤活性，且具有很好的选择性，对正常细胞几乎不显示毒性^[27]。一些科学工作者对其作用机制进行了初步的研究，研究表明 BA 可以直接作用于细胞线粒体，导致线粒体膜的去极化及通透性改变，从而将细胞色素 C 及凋亡诱导因子 AIF 释放到细胞质中，调节下游凋亡相关蛋白 caspase 的活性，激活 caspase-2、-3、-8、-9，促进肿瘤细胞凋亡^[32-33]。细胞凋亡有两种途径。一种是 CD95(又称 Fas)途径：CD95 被称为死亡受体，分布于细胞表面，一旦与其配体 CD95L 结合，细胞即启动程序性凋亡，因此是传统抗肿瘤药物诱导肿瘤细胞凋亡的一个关键途径。另一种是线粒体途径^[34]：线粒体是细胞生命活动控制中心，它不仅是细胞呼吸链和氧化磷酸化的中心，而且也是细胞凋亡调控中心。细胞色素 C 及凋亡诱导因子，如 AIF 从线粒体释放，从而激活 caspase-9 是细胞凋亡的

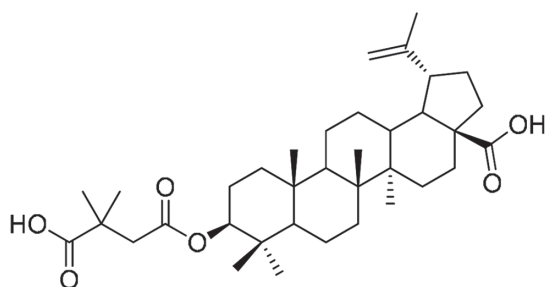
关键步骤。阿霉素 (doxorubicin) 是一种广谱抗肿瘤药，其诱导细胞凋亡是通过 CD95 途径。研究表明，BA 对于具有阿霉素耐药性的神经母细胞瘤有很好的抑制活性^[35]，这也从另一方面说明 BA 的抗肿瘤途径是线粒体途径，而非 CD95 途径，有望成为克服肿瘤治疗过程中凋亡耐受的新试剂。拓朴异构酶 I 是抗癌药物的重要靶标，Chowdhury 等^[36]的研究表明，BA 是该酶的强抑制剂，能够阻止拓朴异构酶 I 与 DNA 的结合，从而发挥抗肿瘤作用。p53 是一种抗癌基因，BA 在抗肿瘤过程中是否与 p53 信号通路有关，目前还有争议。Fulda 等^[35]发现 BA 对于神经母细胞瘤 SH-EP 中野生型的 p53 蛋白表达量没有影响，而阿霉素则会使 SH-EP 中野生型的 p53 蛋白表达量大大增加。Raisova 等^[37]的研究也证实了这一点。而 Rieber 和 Strasberg Rieber^[38]的研究则表明 BA 在抑制人恶性黑色素瘤细胞株 C8161 过程中，其抗肿瘤活性至少部分与 p53 蛋白的表达量增加有关。

BA 具有如此新颖的抗肿瘤机制，因此科学工作者对其与其他抗肿瘤药物或手段的联合使用进行了研究。肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体 (TRAIL) 能够选择性诱导肿瘤细胞凋亡，其凋亡途径属于死亡受体通路 (TRAIL 途径)，而 BA 诱导肿瘤细胞凋亡则属于线粒体通路。Fulda 等^[39]的研究表明，BA 与 TRAIL 联用可大大促进 caspase-8 的激活，诱导肿瘤细胞凋亡，且对正常的人成纤维细胞不显示毒性。此外，人们还报道了 BA 与一些抗肿瘤药物，如阿霉素、鬼臼乙叉甙 (VP16)、紫杉醇、放射菌素 -D 等的联用对诱导神经母细胞瘤 SH-EP 凋亡具有增效作用^[40]。Sawada 等^[41]考察了联合使用 BA 及长春新碱对黑色素瘤细胞株 B16F10 的抗肿瘤效果，发现这两种化合物作用于不同的细胞周期，BA 作用于 G_1 期，长春新碱则作用于 G_2/M 期，联合使用对于体外及体内的抗肿瘤效果都要好于单独使用长春

新碱。放射治疗主要是利用射线照射损伤细胞的DNA 而达到杀死肿瘤细胞的目的, Selzer 等^[42]发现 BA 与放疗联合使用对于抑制黑色素瘤细胞株 A357、518A2、MES20 等具有明显的叠加效应。最近 Eder-Czembirek 等^[43]又报道了 BA 与放射治疗手段联用时对于头颈鳞癌细胞株 SCC9、SCC25 同样具有很好的抑制效果, 在此过程中 BA 相当于一种放射致敏剂。

2.2 抗HIV

艾滋病, 即获得性免疫缺陷综合征 (acquired immune deficiency syndrome, AIDS), 是人体感染了“人类免疫缺陷病毒”(human immunodeficiency virus, HIV) 所导致的传染病, HIV 分为两型: HIV-1 型和 HIV-2 型。AIDS 被称为“史后世纪的瘟疫”, 也被称为“超级癌症”和“世纪杀手”。截至 2008 年底, 全世界大约有 3 000 多万艾滋病患者, 每年大约有 270 万人感染艾滋病及 200 万患者死亡^[44]。Fujioka 等^[45]从棒花蒲桃 (*Syzygium claviflorum*) 叶中提取 BA 并测试了其抑制 HIV-1 在 H9 淋巴细胞中的复制活性, 结果显示 BA 能够很好地抑制其活性, 其 EC_{50} 为 1.4 $\mu\text{mol/L}$ 。非洲双翼豆树 (*Peltophorum africanum*) 的树皮常被人们用来治疗 AIDS, Theo 等^[46]发现其树皮提取物有很好的抗 HIV-1 活性, 从活性最高的组分中分离出 BA, 并测试了其对于 X4-HIV-1 和 R5-HIV-1 的抑制活性, 结果显示其 IC_{50} 分别为 0.04 $\mu\text{g/mL}$ 和 0.002 $\mu\text{g/mL}$ 。近年来 BA 的抗 HIV 活性受到广泛关注, 人们对其抗 HIV 活性进行了系统的构效关系研究^[47-48], 发现了一些高活性的衍生物, 其中美国 Panacos 公司开发的化合物 Bevirimat^[49](图 5) 作为具有口服活性的抗 HIV-1 衍生物, 目前 2 期临床已获得成功, 计划于 2011 年进入 3 期临床。



3-O-(3',3'-dimethylsuccinyl)-betulinic acid (Beverimat)

图5 美国Panacos公司开发的化合物Beverimat

2.3 抗炎

很多五环三萜类化合物, 特别是 BA 都具有较好的抗皮肤炎症及耳片肿胀活性, 如 Mukherjee 等^[50]从莲的根茎中提取 BA 并测试了其对于角叉胶与血清素诱导小鼠足部肿胀的抑制活性, 发现口服剂量为 50 mg/kg 和 100 mg/kg 时小鼠足部肿胀有明显的抑制作用; Yasukawa 等^[51]报道了 BA 对组织多肽抗原 TPA 引起的小鼠耳片肿胀有明显的抑制作用, 在注射 TPA 前, 以 2 mg/mL 的浓度给药, 其抑制率为 94%; Recio 等^[52]则报道了 BA 口服的抗炎活性, 口服给药 100 mg/kg, 可以有效抑制 TPA 引起的小鼠耳片肿胀, 其抑制率为 45.6%。中性粒细胞趋化因子 CNIC-1 是促炎细胞因子, Min 等^[53]发现 1 $\mu\text{mol/L}$ 的 BA 对大鼠腹腔巨噬细胞 CNIC-1 的抑制率为 $(34 \pm 3)\%$ 。嗜中性粒细胞可引起感染部位的炎症反应, Máñez 等^[54]以 TPA 诱导小鼠耳部慢性炎症, 然后注射 BA 0.5 mg/耳, 能够有效阻止嗜中性粒细胞渗入, 其抑制率为 29%。对于 BA 的抗炎机制, Huguet 等^[55]的研究表明, BA 抗炎活性是通过抑制蛋白激酶 C 实现的, 而与神经性炎症机制无关; Recio 等^[52]还认为 BA 抗炎活性的部分原因是它能与糖皮质激素受体作用, 同时还能促进合成内源性的抗炎蛋白。

2.4 其他

细菌耐药性的问题正在威胁着人们的健康, 由于细菌耐药性问题, 曾经能够控制的疾病, 如淋病、伤寒、肺结核等的治疗难度越来越大。研究发现 BA 具有广泛的抗菌活性, 但活性较差。Chandramu 等^[56]从黄荆 (*Vitex negundo* L) 叶中分离出 BA, 发现每个培养皿中加入 1 000 μg 的 BA 时对枯草杆菌 (*B. subtilis*) 的抑菌圈大小为 18.8 mm^2 , 而对大肠杆菌则没有抑制活性。Schuhly 等^[57]从巴西洋枣 (*Zizyphus joazeiro*) 树皮中分离出 BA, 发现其针对革兰氏阳性菌表皮葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermidis*) 有抑制活性, 其最小抑菌浓度 MIC 值为 128 $\mu\text{g/mL}$; 而 Nick 等^[58]从五亚果植物的茎、叶中分离得到 BA, 并测试了其对于枯草杆菌 (*B. subtilis*)、大肠杆菌 (*E. coli*)、藤黄微球菌 (*M. luteus*) 的抑菌活性, 发现 BA 对这些菌株的活性很差, 几乎没有抑制作用。虽然 BA 自身不是一个有前景的抗菌剂, 但却可以作为开发新颖的三萜类抗菌药的先导物。

疟疾是经按蚊叮咬而感染疟原虫所引起的虫媒传染病, 是一种致死性疾病, 每年有 300~500 万人感染此病。Steele 等^[59]从植物中提取 BA, 并测试

了体外、体内抗疟原虫活性,发现其对氯喹耐药株 K1 和氯喹敏感株 T9-96 的 IC_{50} 分别为 19.6 和 25.9 $\mu\text{g/mL}$, 而腹腔注射即使剂量高达 250 mg/kg/day , 也没有表现出抗疟原虫活性。Duker-Eshun 等^[60] 从木豆 (*Cajanus cajan*) 中分离出 BA 并针对氯喹敏感株 3D7 测试了抑制活性, 发现其 IC_{50} 为 19 $\mu\text{g/mL}$ 。de Sa 等^[61] 从鼠李科植物洋枣 (*Zizyphus joazeiro*) 中分离出 BA, 并以此为先导物合成了一些衍生物, 对氯喹敏感株进行了体外抑制活性测试, 结果显示 BA 的 IC_{50} 为 9.89 $\mu\text{mol/L}$, 而其 3- 位羟基以乙酰基修饰的化合物 BAA 活性最高, IC_{50} 为 5.99 $\mu\text{mol/L}$; 选择 BAA 对感染疟原虫的小鼠进行体内试验, 结果表明, 腹腔注射 100 mg/kg 的剂量可以明显增加小鼠的存活率, 且呈剂量依赖关系。因此, 他们认为 BA 及其衍生物是开发抗疟药物的高质量先导物。

G 蛋白偶联胆汁酸受体 TGR5 的激动剂可增加胰高血糖素样肽 -1 (GLP-1) 的分泌和热量消耗, 有可能成为治疗 2 型糖尿病和肥胖症的新药, Genet 等^[62] 报道了 BA 能激活 TGR5 受体, 其 EC_{50} 为 1.04 $\mu\text{mol/L}$, 是开发此类药物的新颖先导化合物。

最近 Lo 等^[63] 还报道了 BA 可以通过激活 BMP/Smad/Runx2 与 β -catenin 信号通路及上调 OPG/RANKL 比例而促进成骨细胞 MC3T3-E1 的分化成熟, 显示了其在治疗骨质疏松方面的开发前景。

此外, BA 还具有镇痛^[64]、解痉^[65]、抗溃疡^[66]、驱蠕虫^[67] 等活性。

3 结语

BA 具有多种生物活性且毒性低、安全指数大, 引起了人们极大的研究兴趣。近年来的研究表明, BA 具有诸多生物活性, 如抗肿瘤、抗 HIV、抗炎、抗菌、抗疟疾等, 科学工作者也对某些生物活性进行了初步的作用机制研究, 在一定程度上探讨了其生物活性的作用机制。BA 新颖的抗肿瘤机制, 特别是在抗黑色素瘤方面, 正日益显示出其良好的单独或与传统抗肿瘤手段、药物联用的开发前景。BA 是一个非常具有研究价值的天然产物, 它可以作为深入研究诸多生物活性的工具化合物及先导化合物, 具有广阔的应用前景, 特别是以其为母核, 经过结构改造得到的化合物 Bevirimat 在抗 HIV 方面已获得 II 期临床成功, 更加激起了科研工作者的研究热情; 但是如果要对 BA 进行更为深入、有效的研究, 就要解决其供应方面问题。截至目前, BA 还没有形成商品化供应, 研究者还不能方便、廉价地从市

场上获得。因此, 我们认为以白桦脂醇为原料, 经半合成方法制备 BA 是目前最具工业化前景的方法。

[参 考 文 献]

- [1] O'Connel MM, Bently MD, Cambell CS. Betulin and lupeol in bark from four white-barked birches. *Phytochem*, 1998, 27(7): 2175-6
- [2] Ekman R. The suberin monomers and triterpenoids from the outer bark of *Betula verrucosa* ehrh. *Holzforsh*, 1983, 37(4): 205-11
- [3] Samib A, Tarua M. Pharmacological properties of the ubiquitous natural product betulin. *Eur J Pharm Sci*, 2006, 29: 1-13
- [4] Pezzuto JM. Methods of manufacturing betulinic acid: US, 5804575[P]. 1998
- [5] Krasutsky PA, Carlson RM, Nesterenko VV, et al. Birch bark processing and the isolation of natural products from birch bark: US, 7264184 [P]. 2005
- [6] Zhao GL, Yan WD, Cao D. Simultaneous determination of betulin and betulinic acid in white birch bark using RP-HPLC. *J Pharm Biomed Anal*, 2007, 43(3): 959-62
- [7] Zhang Y, Yu T, Wang Y. Extraction of betulin from bark of *Betula platyphylla* by supercritical carbon dioxide extraction. *J For Res*, 2003, 14(3): 202-4
- [8] Galgon T, Höke D, Drger B. Identification and quantification of betulinic acid. *Phytochem Anal*, 1999, 10(4): 187-90
- [9] Hess SC, Monache FD. Divergioic acid, a triterpene from *Vochysia divergens*. *J Braz Chem Soc*, 1999, 10(2): 104-6
- [10] Nyasse B, Nono JJ, Nganso Y, et al. *Uapaca* genus (Euphorbiaceae), a good source of betulinic acid. *Fitoterapia*, 2009, 80(1): 32-4
- [11] Kwon HC, Min YD, Kim KR, et al. A new acylglycosyl sterol from *Quisqualis fructus*. *Arch Pharm Res*, 2003, 26(4): 275-8
- [12] Chandramu C, Manohar RD, Krupadanam DG, et al. Isolation, characterization and biological activity of betulinic acid and ursolic acid from *Vitex negundo* L. *Phytother Res*, 2003, 17(2): 129-34
- [13] Li S, Shi Y, Shang XY, et al. Triterpenoids from the roots of *Pterospermum heterophyllum* Hance. *J Asian Nat Prod Res*, 2009, 11(7): 652-7
- [14] Ramadan MA, Ahmad AS, Nafady AM, et al. Chemical composition of the stem bark and leaves of *Ficus pandurata* Hance. *Nat Prod Res*, 2009, 23(13): 1218-30
- [15] Kim DSHL, Pezzuto JM, Pisha E. Synthesis of betulinic acid derivatives with activity against human melanoma. *Bioorg Med Chem Lett*, 1998, 8(13): 1707-12
- [16] Pezzuto JM, Kim DSHL. Methods of manufacturing betulinic acid: US, 5804575[P]. 1998
- [17] Flekhter OB, Boreko EI, Nigmatullina LR. Synthesis and antiviral activity of hydrazide and substituted benzalhydrazides of betulinic acid and its derivatives. *Russ J Bioorg Med*, 2003, 29(3): 296-301
- [18] Flekhter OB, Nigmatullina LR, Baltina LA, et al. Synthesis of betulinic acid from betulin extract and study

- of the antiviral and antiulcer activity of some related terpenoids. *Pharm Chem J*, 2002, 36(9): 484-7
- [19] Csuk R, Schmuck K, Schafer R. A practical synthesis of betulinic acid. *Tetrahedron Lett*, 2006, 47(49): 8769-70
- [20] Barthel A, Stark S, Csuk R. Oxidative transformations of betulinol. *Tetrahedron*, 2008, 64(39): 9225-9
- [21] Sala T, Sargent MV. Tetrabutylammonium permanganate: an efficient oxidant for organic substrates. *J Chem Soc Chem Commun*, 1978, 14: 253
- [22] 汤杰, 仇文卫, 杨帆, 等. 一种桦木酮酸的制备方法: 中国, CN 101759759A[P]. 2010-1-26
- [23] Chen QH, Liu J, Zhang HF, et al. The betulinic acid production from betulin through biotransformation by fungi. *Enzyme Microb Technol*, 2009, 45: 175-80
- [24] 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. *Nat Med*, 1995, 1(10): 1046-51
- [25] Fulda S, Jeremias I, Pietsch T, et al. Betulinic acid: a new chemotherapeutic agent in the treatment of neuroectodermal tumors. *Klin Padiatr*, 1999, 211(4): 319-22
- [26] Fulda S, Jeremias I, Steiner HH, et al. Betulinic acid: a new cytotoxic agent against malignant brain-tumor cells. *Int J Cancer*, 1999, 82(3): 435-41
- [27] Zuco V, Supino R, Righetti SC, et al. Selective cytotoxicity of betulinic acid on tumor cell lines, but not on normal cells. *Cancer Lett*, 2002, 175 (1): 17-25
- [28] Kumar D, Mallick S, Vedasiromoni JR, et al. Anti-leukemic activity of *Dillenia indica* L. fruit extract and quantification of betulinic acid by HPLC. *Phytomedicine*, 2010, 17(6): 431-5
- [29] Thurnher D, Turhani D, Pelzmann M, et al. Betulinic acid: a new cytotoxic compound against malignant head and neck cancer cells. *Head Neck*, 2003, 25(9): 732-40
- [30] Chintharlapalli S, Papineni S, Ramaiah SK, et al. Betulinic acid inhibits prostate cancer growth through inhibition of specificity protein transcription factors. *Cancer Res*, 2007, 67(6): 2816-23
- [31] Sarek J, Klinot J, Dzubák P, et al. New lupane derived compounds with pro-apoptotic activity in cancer cells: synthesis and structure-activity relationships. *J Med Chem*, 2003, 46(25): 5402-15
- [32] Fulda S, Scaffidi C, Susin SA, et al. Activation of mitochondria and release of mitochondrial apoptogenic factors by betulinic acid. *J Biol Chem*, 1998, 273(51): 33942-8
- [33] 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. *Cancer Res*, 2004, 64(20): 7386-94
- [34] Wajant H. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science*, 2002, 296(5573): 1635-6
- [35] 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. *Cancer Res*, 1997, 57(21): 4956-64
- [36] Chowdhury AR, Mandal S, Mitra B, et al. Betulinic acid, a potent inhibitor of eukaryotic topoisomerase I: identification of the inhibitory step, the major functional group responsible and development of more potent derivatives. *Med Sci Monit*, 2002, 8(7): BR254-65
- [37] Raisova M, Hossini AM, Eberle J, et al. The Bax/Bcl-2 ratio determines the susceptibility of human melanoma cells to CD95/Fas-mediated apoptosis. *J Invest Dermatol*, 2001, 117(2): 333-40
- [38] Rieber M, Strasberg Rieber M. Induction of p53 without increase in p21WAF1 in betulinic acid-mediated cell death is preferential for human metastatic melanoma. *DNA Cell Biol*, 1998, 17(5): 399-406
- [39] Fulda S, Jeremias I, Debatin KM. Cooperation of betulinic acid and TRAIL to induce apoptosis in tumor cells. *Oncogene*, 2004, 23(46): 7611-20
- [40] Fulda S, Debatin KM. Sensitization for anticancer drug-induced apoptosis by betulinic acid. *Neoplasia*, 2005, 7(2): 162-70
- [41] 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. *Br J Cancer*, 2004, 90(8): 1672-8
- [42] Selzer E, Pimentel E, Wacheck V, et al. Effects of betulinic acid alone and in combination with irradiation in human melanoma cells. *J Invest Dermatol*, 2000, 114(5): 935-40
- [43] Eder-Czembirek C, Erovic BM, Czembirek C, et al. Betulinic acid a radiosensitizer in head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Strahlenther Onkol*, 2010, 186(3): 143-8
- [44] UNAIDS. AIDS epidemic update: December 2007[R]. UNAIDS/07.27E/JC1322E, 2007
- [45] Fujioka T, Kashiwada Y, Kilkuskie RE, et al. Anti-AIDS agents, 11. Betulinic acid and platanic acid as anti-HIV principles from *Syzygium claviflorum*, and the anti-HIV activity of structurally related triterpenoids. *J Nat Prod*, 1994, 57(2): 243-7
- [46] Theo A, Masebe T, Suzuki Y, et al. *Peltophorum africanum*, a traditional South African medicinal plant, contains an anti HIV-1 constituent, betulinic acid. *Tohoku J Exp Med*, 2009, 217(2): 93-9
- [47] Evers M, Poujade C, Soler F, et al. Betulinic acid derivatives: a new class of human immunodeficiency virus type 1 specific inhibitors with a new mode of action. *J Med Chem*, 1996, 39(5): 1056-68
- [48] Soler F, Poujade C, Evers M, et al. Betulinic acid derivatives: a new class of specific inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 entry. *J Med Chem*, 1996, 39(5): 1069-83
- [49] Kashiwada Y, Hashimoto F, Cosentino LM, et al. Betulinic acid and dihydrobetulinic acid derivatives as potent anti-HIV agents. *J Med Chem*, 1996, 39(5): 1016-7
- [50] Mukherjee PK, Saha K, Das J, et al. Studies on the anti-inflammatory activity of rhizomes of *Nelumbo nucifera*. *Planta Med*, 1997, 63(4): 367-9
- [51] Yasukawa K, Takido M, Matsumoto T, et al. Sterol and triterpene derivatives from plants inhibit the effects of a tumor promoter, and sitosterol and betulinic acid inhibit tumor formation in mouse skin two-stage carcinogenesis. *Oncology*, 1991, 48(1): 72-6
- [52] Recio MC, Giner RM, Manez S, et al. Investigations on

- the steroidal anti-inflammatory activity of triterpenoids from *Diospyros leucomelas*. *Planta Med*, 1995, 61(1): 9-12
- [53] Min B, Lee GI, Ha JY, et al. Inhibitory effects of triterpenoids on interleukin-8/CINC-1 induction in LPS-stimulated rat peritoneal macrophages. *Nat Prod Sci*, 1996, 2: 48-55
- [54] Máñez S, Recio MC, Giner RM, et al. Effect of selected triterpenoids on chronic dermal inflammation. *Eur J Pharmacol*, 1997, 334(1): 103-5
- [55] Huguet A, del Carmen Recio M, Máñez S, et al. Effect of triterpenoids on the inflammation induced by protein kinase C activators, neuronally acting irritants and other agents. *Eur J Pharmacol*, 2000, 410(1): 69-81
- [56] Chandramu C, Manohar RD, Krupadanam DG, et al. Isolation, characterization and biological activity of betulinic acid and ursolic acid from *Vitex negundo* L. *Phytother Res*, 2003, 17(2): 129-34
- [57] Schuhly W, Heilmann J, Calis I, et al. New triterpenoids with antibacterial activity from *Zizyphus joazeiro*. *Planta Med*, 1999, 65(8): 740-3
- [58] Nick A, Wright AD, Rali T, et al. Antibacterial triterpenoids from *Dillenia papuana* and their structure-activity relationships. *Phytochemistry*, 1995, 40(6): 1691-5
- [59] Steele JC, Warhurst DC, Kirby GC, et al. *In vitro* and *in vivo* evaluation of betulinic acid as an antimalarial. *Phytother Res*, 1999, 13(2): 115-9
- [60] Duker-Eshun G, Jaroszewski JW, Asomaning WA, et al. Antiplasmodial constituents of *Cajanus cajan*. *Phytother Res*, 2004, 18(2): 128-30
- [61] de Sa MS, Costa JF, Krettli AU, et al. Antimalarial activity of betulinic acid and derivatives *in vitro* against *Plasmodium falciparum* and *in vivo* in *P. berghei*-infected mice. *Parasitol Res*, 2009, 105(1): 275-9
- [62] Genet C, Strehle A, Schmidt C, et al. Structure-activity relationship study of betulinic acid, a novel and selective TGR5 agonist, and its synthetic derivatives: potential impact in diabetes. *J Med Chem*, 2010, 53(1): 178-90
- [63] Lo YC, Chang YH, Wei BL, et al. Betulinic acid stimulates the differentiation and mineralization of osteoblastic MC3T3-E1 cells: involvement of BMP/Runx2 and β catenin signals. *J Agric Food Chem*, 2010, 58(11): 6643-9
- [64] Kinoshita K, Akiba M, Saitoh M, et al. Antinociceptive effect of triterpenes from cacti. *Pharm Biol*, 1998, 36: 50-7
- [65] Bejar E, Amarquaye A, Che C-T, et al. Constituents of *Byrsonima crassifolia* and their spasmogenic activity. *Int J Pharmacol*, 1995, 33: 25-32
- [66] Flekhter OB, Nigmatullina LR, Baltina LA, et al. Synthesis of betulinic acid from betulin extract and study of the antiviral and antiulcer activity of some related terpenoids. *Pharmaceut Chem J*, 2002, 36(9): 484-7
- [67] Enwerem NM, Okogun JI, Wambebe CO, et al. Anthelmintic activity of the stem bark extracts of *Berlinia grandiflora* and one of its active principles, betulinic acid. *Phytomedicine*, 2001, 8(2): 112-4