莽草酸衍生物的合成及其对紫杉醇耐药人乳腺癌细胞的逆转作用研究Δ

张　璐[1*]，陈思颖[1]，王　谦[2]，张　锦[1]，黄丽英[1]，任　乐[1]，田会萍[1]，王　楠[1]，董亚琳[1#]（1.西安交通大学第一附属医院药学部，西安　710061；2.陕西科技大学食品与生物工程学院，西安　710021）

中图分类号　R914.5　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2020）08-0945-08
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2020.08.09

摘　要　目的：对莽草酸进行结构修饰，并探讨其衍生物对紫杉醇耐药人乳腺癌细胞MCF-7/PTX的逆转作用。方法：以莽草酸为先导结构，通过酯化、酰胺化、氢化、还原等方法对其1位羧基进行结构修饰，合成一系列莽草酸衍生物；以非耐药细胞MCF-7为参照，采用MTT法筛选具有抑制活性的衍生物，并同法考察活性衍生物对MCF-7/PTX细胞的半数抑制浓度（IC_{50}）和逆转倍数（RI）；以耐药相关蛋白转胶蛋白2为靶点，采用Glide 1.0计算机辅助设计软件将活性衍生物与转胶蛋白2进行分子对接。结果：共合成得到15个衍生物（T_1～T_{15}），其中T_4～T_{15}为首次合成所得。MTT试验结果显示，（3*R*，4*S*，5*R*）-*N*-苄基-3，4，5-三羟基-1-环己烯-1-甲酰胺（T_7）、（3*R*，4*S*，5*R*）-*N*-（3，4，5-三羟基-1-环己烯甲基）-苄胺（T_{14}）、（3*R*，4*S*，5*R*）-3，4-*O*-异亚丙基-5-*O*-乙酰基-1-环己烯-1-甲酸甲酯（T_{15}）对MCF-7和MCF-7/PTX细胞均具有一定的抑制作用，且各剂量T_7、T_{14}、T_{15}+紫杉醇联用组对MCF-7/PTX细胞的IC_{50}值均显著低于阴性对照（紫杉醇单用）组（$P<0.05$）；T_{14}、T_{15}的RI较高，其最高剂量的RI已达8.8、9.3，与阳性对照药物维拉帕米（10.8）相当。分子对接结果显示，T_7 3、4位上的羟基可与转胶蛋白2催化区域的Arg625、Asp627形成多个氢键；T_{14}除上述氢键外，其1位上的二级胺侧链还可与转胶蛋白2的Glu657形成氢键；T_{15}母核上的羟基被供电基团衍生化后，其与转胶蛋白2的结合更为紧密，抑制作用有所增强。结论：衍生物T_7、T_{14}、T_{15}对紫杉醇耐药人乳腺癌细胞均具有一定的逆转活性。母核上的多羟基结构是莽草酸及其衍生物与转胶蛋白2形成氢键的主要结构区域，对其进行供电基团衍生化或在莽草酸1位羧基引入二级胺、疏水基团等均可有利于增强衍生物的耐药逆转活性。

关键词　莽草酸衍生物；转胶蛋白2；乳腺癌；紫杉醇耐药；逆转作用

Study on the Synthesis of Shikimic Acid Derivatives and Their Reversal Effects on Paclitaxel-resistant Human Breast Cancer Cells

ZHANG Lu[1], CHEN Siying[1], WANG Qian[2], ZHANG Jin[1], HUANG Liying[1], REN Le[1], TIAN Huiping[1], WANG Nan[1], DONG Yalin[1]（1. Dept. of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China; 2. School of Food and Biological Engineering, Shaanxi University of Science & Technology, Xi'an 710021, China）

ABSTRACT　OBJECTIVE: To structurally modify shikimic acid, and to investigate the reversal effects of its derivatives on paclitaxel-resistant human breast cancer cells MCF-7/PTX. METHODS: Using shikimic acid as the lead structure, 1-position carboxyl group was structurally modified to synthesize a series of shikimic acid derivatives through esterification, amidation, hydrogenation and reduction, etc. Using non-drug resistant cells MCF-7 as reference, MTT assay was used to screen derivatives with inhibitory activity as well as half-inhibitory concentration (IC_{50}) and reversal index (RI) of derivatives to MCF-7/PTX. With the drug resistance-related transgelin 2 as the target, the molecular docking of the active derivatives with the drug resistance-related protein was carried out by using Glide 1.0 computer-aided design software. RESULTS: Totally 15 derivatives were obtained (T_1-T_{15}), of which T_4-T_{15} were obtained for the first time. MTT assay showed that (3*R*, 4*S*, 5*R*)-*N*-benzyl-3, 4, 5-trihydroxy-1-cyclohexene-1-formamide (T_7), (3*R*, 4*S*, 5*R*)-*N*-(3, 4, 5-trihydroxy-1-cyclohexenylmethyl)-benzylamine (T_{14}), (3*R*, 4*S*, 5*R*)-3, 4-*O*-isopropyl-5-*O*-acetyl-1-cyclohexene-1-methyl formate (T_{15}) inhibited MCF-7 and MCF-7/PTX cells to a certain extent; IC_{50} values of T_7, T_{14} and T_{15} combined with pacliaxel to MCF-7/PTX cells were significantly lower than that in negative control (Paclitaxel alone) group ($P<0.05$). RIs of T_{14} and T_{15} were higher, and RIs of the highest dose were 8.8 and 9.3, which were equivalent to positive control verapamil (10.8). The results of molecular docking showed that the hydroxyl groups at positions 3, 4 of T_7 could form multiple hydrogen bonds with Arg625 and Asp627 in the catalytic region of transgelin 2. In addition to the hydrogen bond mentioned above at T_7, the secondary amine side chain at position 1 of T_{14} could also form hydrogen bond with Glu657 of transgelin 2. When the hydroxyl group on the T_{15} mother nucleus was derived from

Δ 基金项目：陕西省自然科学基础研究计划（No.2017JM8013）；陕西省中医药管理局项目（No.ZYMS017）

* 主管药师。研究方向：临床药学。电话：029-85323244。E-mail：batistuta28@126.com

通信作者：主任药师，教授，博士生导师，博士。研究方向：临床药学。电话：029-85323243。E-mail：dongyalin@ mail.xjtu.edu.cn

the donor group, the binding of the hydroxyl group to transgelin 2 was closer and the inhibition was enhanced. CONCLUSIONS: The derivatives T_7, T_{14} and T_{15} have certain reverse activity to paclitaxel-resistant human breast cancer cells. The polyhydroxy structure of the mother nucleus is the main structural region of the hydrogen bond between shikimic acid and its derivatives and transgelin 2. The derivation of its power supply group or the introduction of secondary amines and hydrophobic groups into the 1-carboxyl group of shikimic acid is benifit for enhancing the drug resistance reversal effect of derivative.

KEYWORDS Shikimic acid derivative; Transgelin 2; Breast cancer; Paclitaxel resistance; Reversal effect

乳腺癌是女性常见的恶性肿瘤之一，发病率占恶性肿瘤总数的23%，病死率可达14%[1]。紫杉醇（Paclitaxel，PTX）是治疗乳腺癌的一线化疗药物，在临床上通常与铂类和/或蒽环类药物联用。但是乳腺癌细胞容易对PTX产生耐药性，使得患者疗效欠佳，从而导致该药的临床应用受到严重限制[2]。因此，寻找新的PTX耐药逆转药物是目前乳腺癌治疗药物研发的热点之一。

转胶蛋白2是一种重要的细胞骨架蛋白，可通过与肌动蛋白相互作用而参与平滑肌细胞的骨架重构和表型调节[3]。近年来有研究报道，高表达的转胶蛋白2可促进乳腺癌细胞侵袭、转移，并诱导细胞对PTX产生耐药性，该蛋白的过量表达是乳腺癌发生、发展和PTX耐药的关键因素[4]。此外有研究指出，转胶蛋白2在PTX耐药乳腺癌细胞生存和转移通路中具有重要作用，已成为逆转乳腺癌PTX耐药的重要靶点[5]。由此可见，抑制转胶蛋白2的过量表达可能成为逆转PTX耐药的新策略之一。本课题前期已成功建立了PTX诱导的乳腺癌多药耐药（MDR）细胞模型MCF-7/PTX，并发现该细胞模型中转胶蛋白2的表达较野生型细胞株明显上调，且其基因与蛋白表达特征一致；同时，发现该蛋白对多种常用化疗药物均具有交叉耐药性，并可参与乳腺癌细胞PTX耐药的发生，使细胞表现出MDR表型；此外，本课题组前期还通过蛋白质组学技术分析了该耐药细胞与亲本细胞之间的差异表达蛋白，挖掘了乳腺癌治疗及预后的潜在分子靶标，初步证实了转胶蛋白2可作为乳腺癌耐药机制研究的新靶点[6-7]。

莽草酸（Shikimic acid，SA，化学结构见图1）是从木兰科植物八角茴香（*Illicium verum* Hook. f.）中提取的多羟基环己烯甲酸化合物。研究表明，SA及其衍生物具有抗凝血、抗炎、抗病毒等作用[8-9]。此外，SA能有效抑制L1210白血病模型小鼠肿瘤细胞的增殖，并延长小鼠的存活时间[10]，且其衍生物亦具有良好的抗肿瘤活性[11]。鉴于SA的抗肿瘤活性及其良好的成药性，本研究拟以转胶蛋白2为靶点、SA为先导化合物，于1位羧基合成一系列衍生物；在筛选具有乳腺癌细胞耐药逆转活性衍生物的基础上，进行分子对接，以期为MDR逆转剂的筛选提供候选化合物，为乳腺癌治疗效果的提高和个体化治疗的开展提供参考。

1 材料

1.1 仪器与软件

X-5型显微熔点测定仪（北京泰克仪器有限公司）；

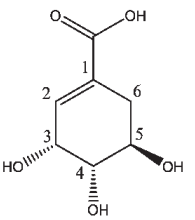


图1 SA的化学结构

Fig 1 Chemical structure of SA

AVANCE Ⅱ 300型核磁共振（NMR）仪（德国Bruker公司）；API-QTRAP 3200型液相色谱-质谱联用仪（美国Thermo Fisher Scientific公司）；Erocell 240型细胞培养箱（上海润度生物科技有限公司）；ELx 808型全自动酶标仪（美国BioTek公司）；Glide 1.0计算机药物辅助设计软件（美国Schrödinger公司）。

1.2 药品与试剂

SA对照品（上海宝曼生物科技有限公司，批号：SH201707331，纯度：99.99%）；PTX对照品（南京思科药业有限公司，批号：C1080101，纯度：99.99%）；盐酸维拉帕米对照品（中国食品药品检定研究院，批号：100223-200102，纯度：供含量测定用）；胰蛋白酶（北京华美生物工程有限公司，批号：90090620）；MTT试剂（美国Sigma公司，批号：SS6A7401）；胎牛血清（FBS，中美合资兰州民海生物工程有限公司）；RPMI 1640培养基（美国Gibco公司，批号：7540713）；合成用试剂*O*-苯并三氮唑-*N*，*N*，*N*′，*N*′-四甲基脲四氟硼酸（TBTU）、*N*，*N*-二异丙基乙胺（DIPEA）、*N*，*N*-二甲基甲酰胺、氢化铝锂（$LiAlH_4$）、对甲苯胺、对三氟甲基苯胺、对氟苯胺、2-氨基噻唑、2-氨基吡啶、对甲苯磺酸、苄氯、正丙胺、正丁胺、苯胺、苄胺、正丁醇等试剂均为市售分析纯或化学纯，水为蒸馏水。

1.3 细胞

细胞株MCF-7细胞由中国科学院上海细胞库提供；MCF-7/PTX细胞为本实验室自制。

2 方法与结果

2.1 目标化合物的合成及其结构鉴定

以SA为原料，分别采用酯化、酰胺化、氢化、还原等方法合成SA衍生物，并根据其理化性质和波谱数据（质谱、氢谱、碳谱等）对其结构进行鉴定。

2.1.1 目标化合物T_1～T_3 合成方法参考已有文献[12-15]：以SA为起始原料，在对甲苯磺酸催化和加热回流条件下分别与甲醇、正丁醇进行酯化反应得目标化合物T_1和T_2（见图2A）；以SA为起始原料，以浓硫酸溶液

为脱水剂，与过量丙酮于室温下搅拌制得(3*R*,4*S*,5*R*)-3,4-*O*-异亚丙基莽草酸(中间体b)；以乙腈为溶剂，在三乙胺催化下，中间体b与苄氯于80 ℃回流下反应得到(3*R*,4*S*,5*R*)-3,4-*O*-异亚丙基-5-羟基-1-环己烯-1-甲酸苄酯(中间体p)；将中间体p溶于甲醇，加入10%盐酸溶液，于室温下搅拌，停止反应后用碳酸氢钠溶液将pH调至7，于50 ℃下蒸干后，即得目标化合物T_3(见图2B)。目标化合物T_1～T_3的理化性质及波谱数据如下。

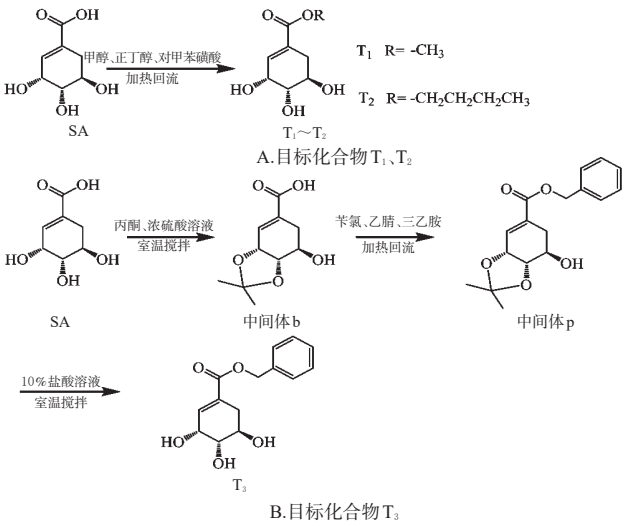


图2　目标化合物T_1～T_3的合成路线

Fig 2　The synthetic route to the target compounds T_1-T_3

目标化合物T_1——白色固体，熔点(mp)：110～111 ℃，电喷雾(ESI)-MS：*m/z* 189.06[M+H]$^+$。^{1}H-NMR(300 MHz,D_2O)δ：2.19(dd,1H,*J*=18.0,7.0 Hz,H-6ax)，2.67(dd,1H,*J*=18.0,6.9 Hz,H-6eq)，3.68(m,1H,H-5)，3.73(s,3H,-CO_2CH_3)，3.97(m,1H,H-4)，4.36(m,1H,H-3)，6.77(d,1H,*J*=6.0 Hz,H-2)；^{13}C-NMR(100 MHz,D_2O)δ：31.2(C-6)，52.0(C-2′)，68.3(C-4)，68.5(C-5)，69.8(C-3)，130.1(C-1)，136.2(C-2)，167.2(C-1′)。根据上述波谱数据确定T_1为(3*R*,4*S*,5*R*)-3,4,5-三羟基-1-环己烯-1-甲酸甲酯。

目标化合物T_2——白色固体，mp：64～65 ℃，ESI-MS：*m/z* 231.11[M+H]+。^{1}H-NMR(300 MHz,DMSO-d_6)δ：0.87～0.93(t,3H,*J*=9.0 Hz,H-5′)，1.31～1.40(m,2H,H-4′)，1.54～1.61(m,2H,H-3′)，2.03～2.09(dd,1H,*J*=18.0,7.0 Hz,H-6ax)，2.40～2.46(dd,1H,*J*=18.0,7.1 Hz,H-6eq)，3.56～3.58(m,1H,H-5)，3.84～3.86(m,1H,H-4)，4.06～4.10(t,2H,*J*=6.4 Hz,H-2′)，4.23(m,1H,H-3)，4.60～4.62(d,1H,*J*=7.2 Hz,5-OH)，4.80～4.83(m,2H,3-OH,4-OH)，6.61(d,1H,*J*=6.0 Hz,H-2)；^{13}C-NMR(100 MHz,$CDCl_3$)δ：128.3(C-1)，137.7(C-2)，69.8(C-3)，68.3(C-4)，68.5(C-5)，31.2(C-6)，167.2(C-1′)，65.3(C-2′)，31.2(C-3′)，18.9(C-4′)，13.8(C-5′)。根据上述波谱数据确定T_2为(3*R*,4*S*,5*R*)-3,4,5-三羟基-1-环己烯-1-甲酸正丁酯。

目标化合物T_3——白色固体，mp：98～100 ℃，ESI-MS：*m/z* 265.09[M+H]$^+$。^{1}H-NMR(300 MHz,DMSO-d_6)δ：2.01～2.07(dd,1H,*J*=18.0,7.1 Hz,H-6ax)，2.50～2.56(dd,1H,*J*=18.0,7.0 Hz,H-6eq)，3.52(m,1H,H-5)，3.85(m,1H,H-4)，4.21(m,1H,H-3)，4.32(s,2H,-O-CH_2-)，4.52(d,1H,*J*=7.3 Hz,5-OH)，4.67～4.70(d,1H,*J*=7.2 Hz,4-OH)，4.78(d,1H,*J*=7.2 Hz,3-OH)，6.36(d,1H,*J*=6.0 Hz,H-2)，7.23～7.30(m,5H,Ar-H)；^{13}C-NMR(100 MHz,$CDCl_3$)δ：130.1(C-1)，136.2(C-2)，69.8(C-3)，68.3(C-4)，68.5(C-5)，31.2(C-6)，167.2(C-1′)，66.2(C-2′)，136.1(C-3′)，127.1(C-4′,8′)，128.9(C-5′,7′)，127.6(C-6′)。根据上述波谱数据确定T_3为(3*R*,4*S*,5*R*)-3,4,5-三羟基-1-环己烯-1-甲酸苄酯。

2.1.2　目标化合物T_4～T_{12}　以SA为原料，按“2.1.1”项下方法制得中间体b，然后以TBTU为缩合剂、二氯甲烷和*N*,*N*-二甲基甲酰胺为溶剂，分别与正丙胺、正丁胺、苯胺、苄胺、对甲苯胺、对氟苯胺、对三氟甲基苯胺和2-氨基噻唑反应后，得(3*R*,4*S*,5*R*)-3,4-*O*-异亚丙基-5-羟基-*N*-正丙基-1-环己烯-1-甲酰胺(中间体c_4)、(3*R*,4*S*,5*R*)-3,4-*O*-异亚丙基-5-羟基-*N*-正丁基-1-环己烯-1-甲酰胺(中间体c_5)、(3*R*,4*S*,5*R*)-3,4-*O*-异亚丙基-5-羟基-*N*-苯基-1-环己烯-1-甲酰胺(中间体c_6)、(3*R*,4*S*,5*R*)-3,4-*O*-异亚丙基-5-羟基-*N*-苄基-1-环己烯-1-甲酰胺(中间体c_7)、(3*R*,4*S*,5*R*)-3,4-*O*-异亚丙基-5-羟基-*N*-对甲苯基-1-环己烯-1-甲酰胺(中间体c_8)、(3*R*,4*S*,5*R*)-3,4-*O*-异亚丙基-5-羟基-*N*-对氟苯基-1-环己烯-1-甲酰胺(中间体c_9)、(3*R*,4*S*,5*R*)-3,4-*O*-异亚丙基-5-羟基-*N*-对三氟甲基苯基-1-环己烯-1-甲酰胺(中间体c_{10})和(3*R*,4*S*,5*R*)-3,4-*O*-异亚丙基-5-羟基-*N*-(2′-噻唑基)-1-环己烯-1-甲酰胺(中间体c_{11})；上述中间体与冰醋酸、水于90℃下加热回流反应，分别得到目标化合物化合物T_4～T_{11}(见图3A)。以SA为起始原料，与醋酐、吡啶于室温下搅拌反应得到三乙酰化莽草酸(中间体h)，中间体h于冰浴条件下滴加氯化亚砜，滴加完毕后加热回流，抽滤得到酰氯粗品；将此粗品用二氯甲烷溶解，在冰浴下逐滴加入2-氨基吡啶、二氯甲烷、吡啶的混合溶液，搅拌反应，得到(3*R*,4*S*,5*R*)-*N*-(2′-吡啶基)-3,4,5-*O*-三乙酰基-1-环己烯-1-甲酰胺(中间体i)；将中间体i溶于甲醇后，加入甲醇钠，于室温下搅拌得目标化合物T_{12}(见图3B)。目标化合物T_4～T_{12}的理化性质及波谱数据如下。

目标化合物T_4——白色固体，mp：90～92 ℃，ESI-MS：*m/z* 216.11[M+H]$^+$。^{1}H-NMR(400 MHz,DMSO-d_6)δ：0.80～0.84(t,3H,*J*=8.0 Hz,H-4′)，1.39～1.45(m,2H,H-3′)，1.95～2.00(dd,1H,*J*=16.0,7.0 Hz,H-6ax)，2.46～2.50(dd,1H,*J*=16.0,7.0 Hz,H-6eq)，3.01～3.07

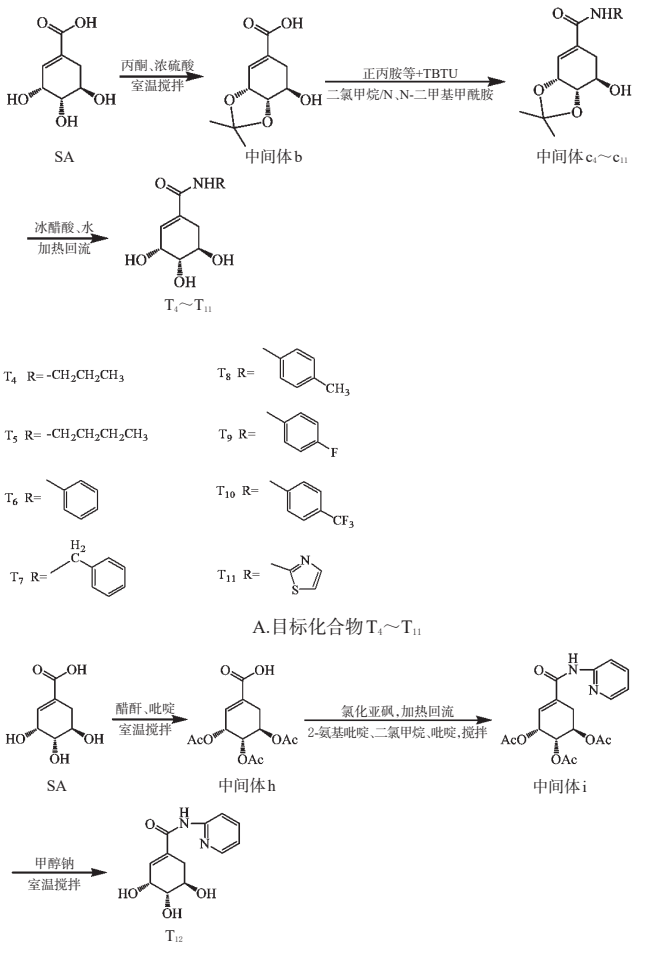


图3　目标化合物T_4～T_{12}的合成路线

Fig 3　The synthetic route to the target compounds T_4-T_{12}

(m, 2H, H-2′), 3.48～3.50(m, 1H, H-5), 3.80(m, 1H, H-4), 4.17(m, 1H, H-3), 4.54～4.56(d, 1H, J=7.0 Hz, 5-OH), 4.68～4.70(d, 1H, J=7.3 Hz, 4-OH), 4.77～4.78(d, 1H, J=7.2 Hz, 3-OH), 6.27(d, 1H, J=6.3 Hz, H-2), 7.81～7.84(t, 1H, J=6.0 Hz, -NH-); ^{13}C-NMR(100 MHz, $CDCl_3$) δ: 139.9(C-1), 136.5(C-2), 69.4(C-3), 67.9(C-4), 68.1(C-5), 30.0(C-6), 168.2(C-1′), 40.9(C-2′), 23.1(C-3′), 11.2(C-4′)。根据上述波谱数据确定T_4为(3*R*, 4*S*, 5*R*)-*N*-正丙基-3, 4, 5-三羟基-1-环己烯-1-甲酰胺。

目标化合物T_5——白色固体，mp: 103～104 ℃，ESI-MS: *m/z* 230.13[M+H]$^+$。^{1}H-NMR(400 MHz, DMSO-d_6) δ: 0.84～0.89(t, 3H, J=7.5 Hz, H-5′), 1.24～1.32(m, 2H, H-4′), 1.35～1.43(m, 2H, H-3′), 1.93～2.00(dd, 1H, J=18.0, 7.0 Hz, H-6ax), 2.46～2.48(dd, 1H, J=18.0, 7.0 Hz, H-6eq), 3.05～3.10(t, 2H, J=7.5 Hz, H-2′), 3.46～3.50(m, 1H, H-5), 3.79～3.82(m, 1H, H-4), 4.16(m, 1H, H-3), 4.64～4.69(m, 2H, 4-OH, 5-OH), 6.26(d, 1H, J=6.0 Hz, H-2), 7.76(s, 1H, -NH-); ^{13}C-NMR(100 MHz, $CDCl_3$) δ: 139.9(C-1), 136.5(C-2), 69.4(C-3), 67.9(C-4), 68.1(C-5), 30.0(C-6), 168.2(C-1′), 40.3(C-2′), 32.2(C-3′), 19.8(C-4′), 13.8(C-5′)。根据上述波谱数据确定T_5为(3*R*, 4*S*, 5*R*)-*N*-正丁基-3, 4, 5-三羟基-1-环己烯-1-甲酰胺。

目标化合物T_6——白色固体，mp: 136～138 ℃，ESI-MS: *m/z* 250.10[M+H]$^+$。^{1}H-NMR(400 MHz, DMSO-d_6) δ: 2.06～2.13(dd, 1H, J=18.0, 7.0 Hz, H-6ax), 2.58～2.64(dd, 1H, J=18.0, 7.2 Hz, H-6eq), 3.56～3.58(m, 1H, H-5), 3.87～3.80(m, 1H, H-4), 4.27(m, 1H, H-3), 4.59～4.60(d, 1H, J=7.0 Hz, 5-OH), 4.74～4.76(d, 1H, J=7.0 Hz, 4-OH), 4.81～4.83(d, 1H, J=7.0 Hz, 3-OH), 6.45(d, 1H, J=6.0 Hz, H-2), 7.01～7.07(d, 1H, J=8.0 Hz, H-5′), 7.26～7.32(t, 2H, J=8.1 Hz, H-4′, 6′), 7.65～7.69(d, 2H, J=8.0 Hz, H-3′, 7′), 9.67(s, 1H, -NH-); ^{13}C-NMR(100 MHz, $CDCl_3$) δ: 139.9(C-1), 136.5(C-2), 69.4(C-3), 67.9(C-4), 68.1(C-5), 30.0(C-6), 163.1(C-1′), 137.6(C-2′), 121.6(C-3′, 7′), 128.9(C-4′, 6′), 128.0(C-5′)。根据上述波谱数据确定T_6为(3*R*, 4*S*, 5*R*)-*N*-苯基-3, 4, 5-三羟基-1-环己烯-1-甲酰胺。

目标化合物T_7——白色固体，mp: 86～88 ℃，ESI-MS: *m/z* 264.11[M+H]$^+$。^{1}H-NMR(300 MHz, DMSO-d_6) δ: 2.01～2.07(dd, 1H, J=18.0, 7.0 Hz, H-6ax), 2.50～2.56(dd, 1H, J=18.0, 7.0 Hz, H-6eq), 3.53(m, 1H, H-5), 3.84(m, 1H, H-4), 4.20(m, 1H, H-3), 4.31(s, 2H, 2′-CH_2), 4.53(d, 1H, J=7.0 Hz, 5-OH), 4.68～4.70(d, 1H, J=7.0 Hz, 4-OH), 4.77(s, 1H, J=7.0 Hz, 3-OH), 6.37(d, 1H, J=6.0 Hz, H-2), 7.23～7.30(m, 5H, Ar-H), 8.40(s, 1H, -NH-); ^{13}C-NMR(100 MHz, $CDCl_3$) δ: 139.9(C-1), 136.5(C-2), 69.4(C-3), 67.9(C-4), 68.1(C-5), 30.0(C-6), 168.5(C-1′), 43.9(C-2′), 137.9(C-3′), 126.9(C-4′, 8′), 128.5(C-5′, 7′), 126.7(C-6′)。根据上述波谱数据确定T_7为(3*R*, 4*S*, 5*R*)-*N*-苄基-3, 4, 5-三羟基-1-环己烯-1-甲酰胺。

目标化合物T_8——白色晶体，mp: 179～180 ℃，ESI-MS: *m/z* 264.11[M+H]$^+$。^{1}H-NMR(400 MHz, DMSO-d_6) δ: 2.05～2.10(dd, 1H, J=16.0, 7.0 Hz, H-6ax), 2.25(s, 3H, -CH_3), 2.58～2.62(dd, 1H, J=18.0, 7.0 Hz, H-6eq), 3.53～3.57(m, 1H, H-5), 3.86～3.88(m, 1H, H-4), 4.26(m, 1H, H-3), 4.65～4.66(d, 1H, J=7.0 Hz, 5-OH), 4.78～4.80(d, 1H, J=7.0 Hz, 4-OH), 4.85～4.86(d, 1H, J=7.0 Hz, 3-OH), 6.43(d, 1H, J=6.0 Hz, H-2), 7.08～7.10(d, 2H, J=8.0 Hz, H-3′, 7′), 7.54～7.56(d, 2H, J=8.0 Hz, H-4′, 6′), 9.63(s, 1H, -NH-); ^{13}C-NMR(100 MHz, $CDCl_3$) δ: 39.9(C-1), 136.5(C-2), 69.4(C-3), 67.9(C-4), 68.1(C-5), 30.0(C-6), 163.1(C-1′), 134.6(C-2′), 121.5(C-3′, 7′), 129.2(C-4′, 6′), 136.8(C-5′),

21.3（C-8′）。根据上述波谱数据确定T_8为（3*R*，4*S*，5*R*）-*N*-对甲苯基-3，4，5-三羟基-1-环己烯-1-甲酰胺。

目标化合物T_9——白色固体，mp：132～133 ℃。ESI-MS：*m/z* 268.09[M+H]$^+$。^{1}H-NMR（400 MHz，DMSO-d_6）δ：2.06～2.11（dd，1H，*J*=16.0，6.0 Hz，H-6ax），2.58～2.62（dd，1H，*J*=16.0，6.0 Hz，H-6eq），3.56～3.59（m，1H，H-5），3.88～3.90（m，1H，H-4），4.27（m，1H，H-3），4.67～4.68（d，1H，*J*=7.0 Hz，5-OH），4.81～4.83（d，1H，*J*=7.0 Hz，4-OH），4.87～4.88（d，1H，*J*=7.0 Hz，3-OH），6.45（d，1H，*J*=6.0 Hz，H-2），7.12～7.16（d，2H，*J*=8.0 Hz，H-4′，6′），7.67～7.71（d，2H，*J*=8.0 Hz，H-3′，7′），9.78（s，1H，-NH-）；^{13}C-NMR（100 MHz，$CDCl_3$）δ：139.9（C-1），136.5（C-2），69.4（C-3），67.9（C-4），68.1（C-5），30.0（C-6），163.1（C-1′），133.2（C-2′），126.1（C-3′，7′），115.7（C-4′，6′），162.9（C-5′）。根据上述波谱数据确定T_9为（3*R*，4*S*，5*R*）-*N*-对氟苯基-3，4，5-三羟基-1-环己烯-1-甲酰胺。

目标化合物T_{10}——黄色固体，mp：68～70 ℃，ESI-MS：*m/z* 318.09[M+H]$^+$。^{1}H-NMR（400 MHz，DMSO-d_6）δ：2.09～2.13（dd，1H，*J*=16.0，7.0 Hz，H-6ax），2.58～2.62（dd，1H，*J*=16.0，7.0 Hz，H-6eq），3.59（m，1H，H-5），3.89（m，1H，H-4），4.29（m，1H，H-3），4.70～4.72（d，1H，*J*=7.0 Hz，5-OH），4.85～4.87（d，1H，*J*=7.0 Hz，4-OH），4.90～4.91（d，1H，*J*=7.0 Hz，3-OH），6.51（d，1H，*J*=6.0 Hz，H-2），7.56～7.58（d，2H，*J*=8.0 Hz，H-4′，6′），7.91～7.93（d，2H，*J*=8.0 Hz，H-3′，7′），10.1（s，1H，-NH-）；^{13}C-NMR（100 MHz，$CDCl_3$）δ：139.9（C-1），136.5（C-2），69.4（C-3），67.9（C-4），68.1（C-5），30.0（C-6），163.1（C-1′），140.9（C-2′），121.9（C-3′，7′），125.3（C-4′，6′），132.1（C-5′），124.1（C-8′）。根据上述波谱数据确定T_{10}为（3*R*，4*S*，5*R*）-*N*-对三氟甲基苯基-3，4，5-三羟基-1-环己烯-1-甲酰胺。

目标化合物T_{11}——白色固体，mp：218～220 ℃，ESI-MS：*m/z* 257.05[M+H]$^+$。^{1}H-NMR（400 MHz，DMSO-d_6）δ：2.09～2.14（dd，1H，*J*=16.0，7.0 Hz，H-6ax），2.60～2.64（dd，1H，*J*=16.0，7.0 Hz，H-6eq），3.58～3.59（m，1H，H-5），3.88～3.90（m，1H，H-4），4.26（m，1H，H-3），4.71～4.72（d，1H，*J*=7.0 Hz，5-OH），4.84～4.86（d，1H，*J*=7.0 Hz，4-OH），4.90～4.91（d，1H，*J*=7.0 Hz，3-OH），6.70（d，1H，*J*=6.0 Hz，H-2），7.21～7.22（d，1H，*J*=7.5 Hz，H-4′），7.50～7.51（d，1H，*J*=7.5 Hz，H-3′），12.1（s，1H，-NH-）；^{13}C-NMR（100 MHz，$CDCl_3$）δ：139.9（C-1），136.5（C-2），69.4（C-3），67.9（C-4），68.1（C-5），30.0（C-6），163.1（C-1′），165.0（C-2′），132.6（C-3′），112.1（C-4′）。根据上述波谱数据确定T_{11}为（3*R*，4*S*，5*R*）-*N*-（2′-噻唑基）-3，4，5-三羟基-1-环己烯-1-甲酰胺。

目标化合物T_{12}——白色固体，mp：231～232 ℃，ESI-MS：*m/z* 251.09[M+H]$^+$。^{1}H-NMR（400 MHz，DMSO-d_6）δ：2.06～2.11（dd，1H，*J*=16.0，7.0 Hz，H-6ax），2.61～2.65（dd，1H，*J*=16.0，7.0 Hz，H-6eq），3.55～3.57（m，1H，H-5），3.87～3.88（m，1H，H-4），4.24（m，1H，H-3），4.67（d，1H，*J*=7.0 Hz，5-OH），4.78（d，1H，*J*=7.0 Hz，4-OH），4.86（d，1H，*J*=7.0 Hz，3-OH），6.56（d，1H，*J*=6.0 Hz，H-2），7.10～7.13（t，1H，*J*=6.0 Hz，H-6′），7.76～7.80（dd，1H，*J*=8.0，5.0 Hz，H-4′），8.02～8.04（dd，1H，*J*=8.0，6.0 Hz，H-5′），8.33～8.34（d，1H，*J*=5.0 Hz，H-3′），10.1（s，1H，-NH-）；^{13}C-NMR（100 MHz，$CDCl_3$）δ：139.9（C-1），136.5（C-2），69.4（C-3），67.9（C-4），68.1（C-5），30.0（C-6），163.1（C-1′），149.9（C-2′），148.1（C-3′），117.9（C-4′），138.3（C-5′），114.2（C-6′）。根据上述波谱数据确定T_{12}为（3*R*，4*S*，5*R*）-*N*-（2′-吡啶基）-3，4，5-三羟基-1-环己烯-1-甲酰胺。

2.1.3　目标化合物T_{13}　将目标化合物T_1溶于四氢呋喃，于冰浴条件下缓慢加入$LiAlH_4$，加完后缓慢升至室温，然后在氮气保护下加热回流，冷却至室温后，即得目标化合物T_{13}，详见图4。其理化性质和波谱数据如下。

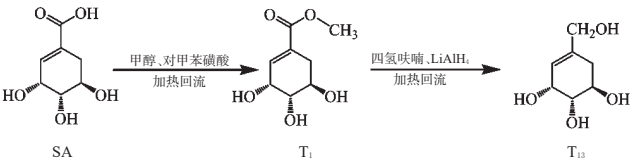


图4　目标化合物T_{13}的合成路线

Fig 4　The synthetic route to the target compound T_{13}

目标化合物T_{13}——白色固体，mp：32～33 ℃，ESI-MS：*m/z* 161.07[M+H]$^+$。^{1}H-NMR（400 MHz，DMSO-d_6）δ：2.04～2.08（dd，1H，*J*=16.0，7.0 Hz，H-6ax），2.40～2.44（dd，1H，*J*=16.0，7.0 Hz，H-6eq），3.57～3.59（m，1H，H-5），3.67（s，2H，1′-CH_2），3.85～3.87（m，1H，H-4），4.22（m，1H，H-3），4.67～4.69（d，1H，*J*=7.0 Hz，5-OH），4.86～4.87（d，1H，*J*=7.0 Hz，4-OH），4.88（d，1H，*J*=7.0 Hz，3-OH），6.62（d，1H，*J*=6.0 Hz，H-2）；^{13}C-NMR（100 MHz，$CDCl_3$）δ：137.1（C-1），122.1（C-2），68.0（C-3），68.6（C-4），67.6（C-5），30.8（C-6），67.3（C-1′）。根据上述波谱数据确定T_{13}为（3*R*，4*S*，5*R*）-1-羟甲基-1-环己烯-3，4，5-三醇。

2.1.4　目标化合物T_{14}　将中间体b与适量二氯甲烷、*N*，*N*-二甲基甲酰胺混合后，于冰浴条件下慢慢加入TBTU、DIPEA，搅拌反应后加入苄胺，室温搅拌反应过夜，得到中间体c_7；将中间体c_7溶于四氢呋喃，并且慢慢滴入到$LiAlH_4$中，冰浴搅拌后升温并回流，反应过夜得到（3*R*，4*S*，5*R*）-*N*-（3，4-*O*-异亚丙基-5-羟基-1-环己烯甲基）-苄胺（中间体e）；将中间体e溶于冰醋酸中，加热回流后降至室温，即得目标化合物T_{14}，详见图5。其理化性质及波谱数据如下。

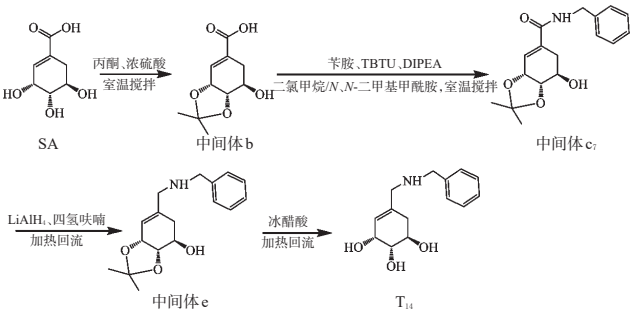


图5　目标化合物T_{14}的合成路线

Fig 5　The synthetic route to the target compound T_{14}

目标化合物T_{14}——白色固体，mp：72～73 ℃，ESI-MS：*m/z* 250.13[M+H]$^+$。^{1}H-NMR（400 MHz，DMSO-d_6）δ：2.01～2.07（dd，1H，*J*=18.0，7.0 Hz，H-6ax），2.35～2.37（s，2H，1′-CH_2），2.60～2.66（dd，1H，*J*=18.0，7.0 Hz，H-6eq），3.67～3.69（m，2H，H-4，5），3.74～3.76（m，1H，H-3），4.20～4.32（s，2H，2′-CH_2），4.64～4.65（d，1H，*J*=7.0 Hz，5-OH），5.42～5.46（d，1H，*J*=7.0 Hz，4-OH），5.56～5.59（d，1H，*J*=7.0 Hz，3-OH），6.61（d，1H，*J*=6.0 Hz，H-2），7.21（d，1H，*J*=7.8 Hz，H-6′），7.21～7.32（m，4H，H-4′，5′，7′，8′）；^{13}C-NMR（100 MHz，$CDCl_3$）δ：139.0（C-1），121.9（C-2），67.7（C-3），68.6（C-4），67.3（C-5），32.2（C-6），53.1（C-1′），54.8（C-2′），140.2（C-3′），127.9（C-4′，8′），128.5（C-5′，7′），127.0（C-6′）。根据上述波谱数据确定T_{14}为（3*R*，4*S*，5*R*）-*N*-（3，4，5-三羟基-1-环己烯甲基）-苄胺。

2.1.5　目标化合物T_{15}　将目标化合物T_1分散于丙酮后，逐滴加入浓硫酸溶液并于室温下搅拌过夜后，用碳酸氢钠溶液将pH调至7，得（3*R*，4*S*，5*R*）-3，4-*O*-异亚丙基-5-羟基-1-环己烯-1-甲酸甲酯（中间体j）；将中间体j与适量醋酐、吡啶混合，于室温下搅拌，用乙酸乙酯稀释，取有机层依次用10%盐酸溶液、水萃取后，再以无水硫酸钠干燥，得目标化合物T_{15}，详见图6。其理化性质及波谱数据如下。

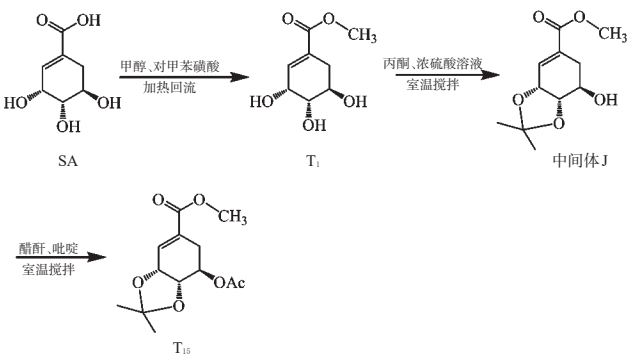


图6　目标化合物T_{15}的合成路线

Fig 6　The synthetic route to the target compound T_{15}

目标化合物T_{15}——白色晶体，mp：59～60 ℃，ESI-MS：*m/z* 229.09[M+H]$^+$。^{1}H-NMR（300 MHz，DMSO-d_6）δ：1.28～1.32（s，6H，8-CH_3，9-CH_3），1.98（s，3H，11-CH_3），2.24～2.32（dd，1H，*J*=18.0，7.0 Hz，H-6ax），2.59～2.66（dd，1H，*J*=18.0，7.8 Hz，H-6eq），3.71（s，3H，2-CH_3），4.23～4.27（m，1H，H-5），4.80（m，1H，H-4），4.87～4.91（m，1H，H-3），6.80（d，1H，*J*=6.0 Hz，H-2）；^{13}C-NMR（100 MHz，$CDCl_3$）δ：130.1（C-1），133.8（C-2），73.9（C-3），76.0（C-4），69.9（C-5），28.3（C-6），121.1（C-7），26.6（C-8，9），170.2（C-10），21.0（C-11），167.2（C-1′），52.3（C-2′）。根据上述波谱数据确定T_{15}为（3*R*，4*S*，5*R*）-3，4-*O*-异亚丙基-5-*O*-乙酰基-1-环己烯-1-甲酸甲酯。所得目标化合物中，T_4～T_{15}均未见文献报道，为首次通过上述合成方法获得的化合物。

2.2　SA衍生物耐药逆转活性的检测

本课题组前期采用MTT法检测了化合物T_1～T_{15}对MCF-7和MCF-7/PTX细胞的抑制作用。结果发现，化合物T_1～T_6、T_8～T_{13}均无明显的抑制作用，故选择化合物T_7、T_{14}、T_{15}进行后续研究。

分别取对数生长期的MCF-7、MCF-7/PTX细胞，经胰蛋白酶消化后计数，用完全培养基（即含5%FBS的RPMI 1640培养基，下同）调整细胞密度至1×10^{5}个/mL，按每孔100 μL接种于96孔板中，将其随机分为PTX组以及T_7、T_{14}、T_{15}不同剂量组，并设置不含细胞的空白对照组，每组设6个复孔。于37 ℃、5%CO_2条件下（下同）培养24 h，待细胞贴壁后，吸弃培养基，空白对照组加入完全培养基180 μL，各给药组加入含相应药物的完全培养基180 μL（其中，PTX的剂量为30 μmol/L，T_7的剂量分别为3、6、12、24、48、96、192、384 μmol/L，T_{14}的剂量分别为37、74、148、296、592、1 184、2 368、4 376 μmol/L，T_{15}的剂量分别为23.5、46.9、93.8、187.5、375.0、750.0、1 500.0、3 000.0 μmol/L，各药物剂量设置参考文献[6]）。培养72 h后，吸弃培养基，加入RPMI 1640培养基180 μL和5 mg/mL的MTT试剂20 μL，孵育4 h后，弃去上清液，加入二甲基亚砜150 μL，振摇15 min后，使用酶标仪于490 nm波长处检测吸光度（*A*）值，并计算细胞生长抑制率[生长抑制率（%）=（1－药物组*A*值/空白对照组*A*值）×100%]和5%抑制浓度（IC_5）。上述试验重复3次。3种SA衍生物对MCF-7、MCF-7/PTX细胞生长的抑制作用见图7。

结合图7，本研究设定T_7的逆转剂量分别为30、60、120 μmol/L，T_{14}的逆转剂量分别为15、30、60 μmol/L，T_{15}的逆转剂量分别为3、6、12 μmol/L。参照上述MTT法，以维拉帕米（10 μmol/L，剂量设置参考文献[16]）为阳性对照、以PTX单用为阴性对照，检测各化合物/阳性对照与PTX联用对MCF-7/PTX细胞的半数抑制浓度（IC_{50}），并计算逆转倍数（RI，RI=阴性对照组IC_{50}/联用组IC_{50}）。以RI作为评价指标，其值越大，表明相应化合物对耐药细胞的逆转活性越强[3]。上述试验重复3次。

采用SPSS 21.0软件对数据进行统计分析。数据以

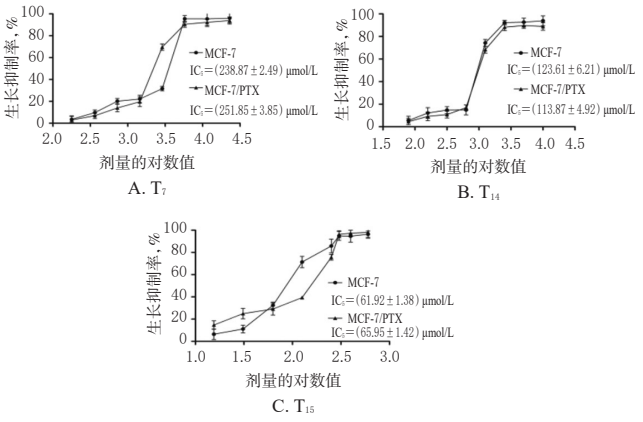


图7　3种SA衍生物对MCF-7、MCF-7/PTX细胞生长的抑制作用（n=3）

Fig 7　Inhibitory effect of 3 kinds of SA derivatives on the growth of MCF-7 and MCF-7/PTX cells (n=3)

$\bar{x}\pm s$表示，组间比较采用单因素方差分析或LSD检验。$P<0.05$为差异有统计学意义，结果见表1。由表1可见，各剂量T_7、T_{14}、T_{15}+PTX联用组对MCF-7/PTX细胞的IC_{50}值均显著低于阴性对照组（$P<0.05$）；其中，T_{14}、T_{15}的RI较高，其最高剂量的RI分别为8.8、9.3，与阳性对照药物（10.8）相当。

表1　3种SA衍生物的IC_{50}及RI值

Tab 1　RI and IC_{50} values of 3 kinds of SA derivatives

组别	剂量	$IC_{50}(\bar{x}\pm s)$，μmol/L	RI
阴性对照组	30 μmol/L	2 290.0±3.4	
T_7+PTX联用组	30 μmol/L+30 μmol/L	900.6±2.9*	2.5
	60 μmol/L+30 μmol/L	910.4±5.3*	2.6
	120 μmol/L+30 μmol/L	718.9±4.0*	3.7
T_{14}+PTX联用组	15 μmol/L+30 μmol/L	713.5±4.9*	3.1
	30 μmol/L+30 μmol/L	412.1±3.3*	6.0
	60 μmol/L+30 μmol/L	283.5±3.5*	8.8
T_{15}+PTX联用组	3 μmol/L+30 μmol/L	796.8±3.9*	2.4
	6 μmol/L+30 μmol/L	460.2±3.5*	6.8
	12 μmol/L+30 μmol/L	248.9±5.6*	9.3
阳性对照+PTX联用组	10 μmol/L+30 μmol/L	230.1±1.9*	10.8

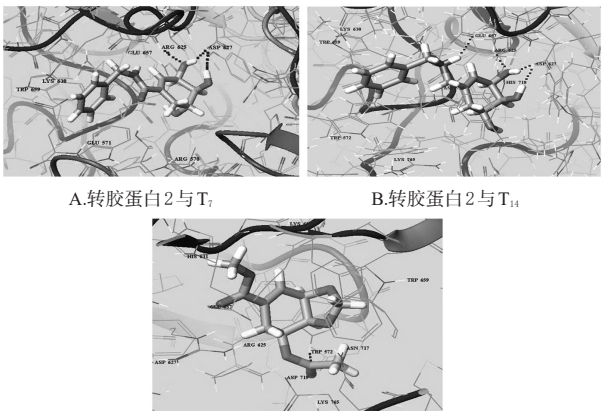
注：与阴性对照组比较，*$P<0.05$

Note：vs. negative control group，*$P<0.05$

2.3　分子对接

通过Glide 1.0计算机辅助药物设计软件将“2.2”项下的逆转活性成分与转胶蛋白2的催化区域进行分子对接分析，初步探讨SA衍生物对转胶蛋白2抑制作用的构效关系，结果见图8。

由图8A可见，SA衍生物T_7的3、4位上的羟基通过提供氢键受体（HBA）和氢键供体（HBD）与转胶蛋白2催化区域内的Arg625和Asp627形成氢键，可见母核上的多羟基结构是其与酶分子间形成氢键的主要结构区域。由图8B可见，当1位侧链引入二级胺时，除母核上的多个羟基能形成多个氢键外，侧链氨基也可与转胶蛋白2催化区域的酸性氨基酸残基Glu657形成氢键；但酰胺键和酯键取代基则无法形成类似氢键，可见二级胺结构对抑制转胶蛋白2较为有利；此外，若1位连有其他HBD取代基时，对转胶蛋白2的抑制活性会比无取代的羟甲基强，提示此区域取代基的疏水作用有利于增强衍生物对转胶蛋白2活性的抑制作用。由图8C可见，当SA母核上的羟基被供电基团衍生化后，衍生物对转胶蛋白2的抑制作用明显增强，提示对母核上的多羟基进行亲水性结构衍生化对增强分子的转胶蛋白2抑制活性至关重要。



A.转胶蛋白2与T_7　　B.转胶蛋白2与T_{14}

C.转胶蛋白2与T_{15}

图8　转胶蛋白2分子对接的示意图

Fig 8　Schematic diagrams of the docking of SA derivative and transgelin 2

3　讨论

PTX是临床乳腺癌标准化疗方案中最常用的化疗药之一，然而MDR的发生极大地限制了该药的治疗效果[2]。因此，设计、合成靶向耐药分子标志物（如转胶蛋白2）的先导化合物将有助于研究者们研发新的耐药逆转药物，从而提高乳腺癌的临床治疗效果，现已成为乳腺癌相关研究的热点之一。

本研究以SA为原料，通过酯化反应合成衍生物T_1～T_3；将SA与丙酮脱水合成缩酮中间体，再通过酰化和水解反应合成酰胺类衍生物T_4～T_{11}；将SA中间体三乙酰化，再通过胺酰化、水解反应获得目标化合物T_{12}；将莽草酸甲酯催化、还原，得到目标化合物T_{13}；将SA中间体酰胺化后，再进行还原、水解反应，获得目标化合物T_{14}；将莽草酸甲酯与丙酮脱水形成缩酮中间体，再通过乙酰化反应得到目标化合物T_{15}。其中，T_4～T_{15}为首次通过上述合成方法获得的化合物。

随后本研究在抑制活性初筛的基础上，通过MTT法对衍生物T_7、T_{14}、T_{15}的活性进行了初步评价，发现上述化合物对MCF-7和MCF-7/PTX细胞的生长均具有明显的抑制作用。在确定其逆转剂量的基础上，本研究以维拉帕米为阳性对照（该药可逆转肿瘤细胞的MDR[16]），同法考察了上述3种衍生物的IC_{50}和RI值。结果显示，各剂量T_7、T_{14}、T_{15}+PTX联用组对MCF-7/PTX细胞的IC_{50}

值均显著低于阴性对照组；其中，T_{14}、T_{15}的RI值较高，两者最高剂量的RI值已达8.8、9.3，与阳性对照药物相当。这提示，T_7、T_{14}、T_{15}可作为MDR逆转剂的候选化合物。

本研究进一步将上述活性衍生物与转胶蛋白2的催化区域进行分子对接分析。结果显示，SA母核上的羟基是SA及其衍生物与酶分子间形成氢键的主要结构区域，1位的取代基则可影响1位衍生物的耐药逆转活性。当1位侧链为亲酯性基团时，该类衍生物无法与细胞中的转胶蛋白2结合；而当1位侧链取代基为酰亚胺和亚胺基团时，衍生物（如T_{14}、T_{15}）则表现出良好的耐药逆转活性。笔者认为，在1位侧链引入二级胺结构或其他HBD取代基除有利于氢键的形成外，还可增强分子与酶催化区域的亲和性，从而使得衍生物分子更易进入到酶分子的空腔内，进一步有利于衍生物与酶的分子间相互作用。由此可见，碱性侧链和疏水基团的引入有利于增强衍生物对转胶蛋白2的抑制活性。分子对接结果还显示，当SA母核上的羟基被供电基团衍生化后，所得衍生物（T_{15}）对转胶蛋白2的抑制活性也有所增强，这提示以氢键为主的亲水性结构衍生化也是增强抑制活性的因素之一。笔者认为，这可能与空间构象较大的化合物更容易进入酶的空腔结构内，使得二者结合更紧密有关。在后续化合物设计中，本课题组将进一步考虑目标化合物HBA和HBD的位置、数量，并充分考虑化合物的空间构象。以上结果从分子水平为SA衍生物对转胶蛋白2的抑制作用研究提供了参考，也为此类化合物的进一步的结构优化奠定了基础。

综上所述，本研究以SA为先导化合物，通过酯化、乙酰化等反应合成了15个SA衍生物，其中12个为首次合成所得化合物。MTT筛选及分子对接结果均显示，化合物T_7、T_{14}、T_{15}对PTX耐药人乳腺癌细胞均具有一定的逆转活性，且在1位引入二级胺及疏水基团或对母核羟基进行供电基团衍生化等均可有助于提高衍生物的耐药逆转活性。本研究可为乳腺癌PTX耐药逆转剂的研发提供候选化合物，但关于上述衍生物的具体耐药逆转作用机制还有待进一步的研究。

参考文献

[1] JEMAL A, BRAY F, CENTER MM, et al. Global cancer statistics[J]. *CA Cancer J Clin*, 2011, 61(2): 69-90.

[2] 蔡江霞，陈思颖，张蔚鹏，等.中药单体逆转肿瘤多药耐药研究进展[J].中国药房，2013，24(35)：3342-3345.

[3] ZHANG Y, YE Y, SHEN D, et al. Identification of transgelin-2 as a biomarker of colorectal cancer by laser capture microdissection and quantitative proteome analysis[J]. *Cancer Sci*, 2010, 101(2): 523-529.

[4] YOSHINO H, CHIYOMARU T, ENOKIDA H, et al. The tumour-suppressive function of miR-1 and miR-133a targeting TAGLN2 in bladder cancer[J]. *Br J Cancer*, 2011, 104(5): 808-818.

[5] CAI J, CHEN S, ZHANG W, et al. Paeonol reverses paclitaxel resistance in human breast cancer cells by regulating the expression of transgelin 2[J]. *Phytomedicine*, 2014, 21(7): 984-991.

[6] CHEN S, DONG Q, HU S, et al. Proteomic analysis of the proteins that are associated with the resistance to paclitaxel in human breast cancer cells[J]. *Mol Biosyst*, 2014, 10(2): 294-303.

[7] CARBAIN B, HITCHCOCK PB, STREICHER H. New aspects of the Hunsdiecker-Barton halodecarboxylation-syntheses of phospha-shikimic acid and derivatives[J]. *Tetrahedron Letters*, 2010, 51(20): 2717-2719.

[8] 徐从立，黄山.紫杉烷衍生物制备方法及应用：中国，CN101386607A[P].2018-3-18.

[9] 孙快麟，李润荪，雷兴翰.若干莽草酸衍生物的合成和生物活性研究[J].药学学报，1990，25(1)：73-76.

[10] JUNG M. Conversion of shikimic acid into 2-crotonyloxymethyl-(4R, 5R, 6S)-4, 5, 6 -trihydroxy-cyclohex-2 gene analogous Ⅰ inhibitor[J]. *J Antibiot: Tokyo*, 1987, 40(5): 720-723 .

[11] HUANG FY. Anti-platelet and anti-thrombotic ffects of triacetylshikimic acid in rats[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2002, 39(2): 262-270.

[12] KOVALEV AA, TSVETAEVA DA, GRUDINSKAJA TV. Role of ABC-cassette transporters (MDR1, MRP1, BCRP) in the development of primary and acquired multiple drug resistance in patients with early and metastatic breast cancer[J]. *Exp Oncol*, 2013, 35(4): 287-290.

[13] BIANCO A, BRUFANI M, MANNA F, et al. Synthesis of a carbocyclic sialic acid analogue for the inhibition of influenza virus neuraminidase[J]. *Carbohydr Res*, 2001, 332(1): 23-31.

[14] 祝洪艳，孟祥颖，鲍永利，等.北五味子中一种新的莽草酸衍生物的分离纯化及其含量测定[J].高等学校化学学报，2010，31(4)：679-683.

[15] 王晓强，郭亚健，刘旭英，等. 3,4-O-异亚丙基莽草酸晶体结构分析[J].北京中医药大学学报，2001，24(2)：46-48.

[16] 陈晓飞，付良青，刘泽源.维拉帕米逆转肿瘤多药耐药性的研究进展[J].国外医学药学分册，2007，34(6)：190-193.

（收稿日期：2019-07-10　修回日期：2020-02-13）

（编辑：张元媛）