

# 甘草黄酮类化合物对 CDK1 的抑制活性及 体内外抗肝癌活性

张敏<sup>1\*</sup>, 李晶晶<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>长江职业学院, 武汉 430074; <sup>2</sup>湖北中医药大学基础医学院, 武汉 430065)

**摘要** 探讨甘草黄酮类化合物对细胞周期依赖性蛋白激酶(CDK1)的抑制活性及抑制肝肿瘤细胞 Bel-7402 活性。采用 CDK1 和 CCK-8 试剂盒分别测试甘草黄酮类化合物对 CDK1 的抑制活性和对肝癌 Bel-7402 细胞的体外增殖抑制活性。构建肝癌 Bel-7402 裸鼠皮下肿瘤模型, 并将小鼠随机分为 3 组: 灌胃给药组、阳性药物组和空白对照组, 连续灌胃给药 18 d, 每隔 1 天记录实验小鼠的体重、肿瘤大小变化。结果表明, 甘草黄酮类化合物对 CDK1/cyclin B 均展现出了抑制活性, 尤其是异甘草素对 CDK1/cyclinB 的抑制活性( $IC_{50} = 0.05 \pm 0.005 \mu\text{mol/L}$ )是阳性药物夫拉平度( $IC_{50} = 0.29 \pm 0.230 \mu\text{mol/L}$ )的近 6 倍; 通过分子对接研究发现, 异甘草素在 CDK1 中能够与氨基酸残基 K33、E81、L83、S84、D86、D149 形成 6 个氢键, 而阳性药物夫拉平度仅与氨基酸残基 E81、L83、S84、Q132、D149 形成 5 个氢键; 体外抗肿瘤活性研究表明, 甘草黄酮类化合物对 Bel-7402 有较强的抑制作用, 其中异甘草素对 Bel-7402 ( $IC_{50} = 0.7 \pm 0.11 \text{ mol/L}$ )展现出了最强的抑制活性, 是阳性药物夫拉平度( $2.4 \pm 0.34 \text{ mol/L}$ )的 3 倍。动物体内研究表明, 异甘草素的  $LD_{50}$  为  $4.38 \text{ mg/kg}$ , 并能够有效抑制肝癌 Bel-7402 细胞的生长。

**关键词** 甘草黄酮类化合物; CDK1 抑制剂; 分子对接; 抗肿瘤活性

**中图分类号** R914 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2018)01-0072-07

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20180110

**引用本文** 张敏, 李晶晶. 甘草黄酮类化合物对 CDK1 的抑制活性及体内外抗肝癌活性[J]. 中国药科大学学报, 2018, 49(1): 72-78.

**Cite this article as:** ZHANG Min, LI Jingjing. Effect of licorice flavonoids as CDK1 inhibitors against liver cancer *in vitro* and *in vivo*[J]. *J China Pharm Univ*, 2018, 49(1): 72-78.

## Effect of licorice flavonoids as CDK1 inhibitors against liver cancer *in vitro* and *in vivo*

ZHANG Min<sup>1\*</sup>, LI Jingjing<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Changjiang Polytechnic, Wuhan 430074;

<sup>2</sup> School of Basic Medical Sciences, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China

**Abstract** This study aimed to study the inhibitory activities of flavonoids on cell cycle-dependent protein kinase (CDK1) and hepatoma cells BEL-7402. The CDK1 inhibitory activity of licorice flavonoids was evaluated by CDK1 reagent kit, and antiproliferat activity *in vitro* was investigated by CCK-8 assay. Subcutaneous tumor model of liver cancer Bel-7402 was established in nude mice, which were then randomly divided into drug group, positive drug group and blank control group. The mice in drug group were orally administrated with licorice flavonoids for continuous 18 days. The body weight and tumor size of mice were recorded every other day. The results demonstrated that these licorice flavonoids displayed potent efficacy against CDK1, specifically, isoliquiritigenin exhibited the most potent CDK1 inhibitory activity ( $IC_{50} = 0.05 \pm 0.005 \mu\text{mol/L}$ ), which was about 6-fold more potent than positive control flavopiridol ( $IC_{50} = 0.29 \pm 0.230 \mu\text{mol/L}$ ). Molecular docking studies revealed that isoliquiritigenin engaged in six hydrogen bonds with K33, E81, L83, S84, D86, D149 in CDK1, while flavopiridol

only engaged in five hydrogen bonds with E81, L83, S84, Q132, D149. *In vitro* biological evaluation indicated that these licorice flavonoids displayed significant antiproliferative effects on Bel-7402 cancer cells. Among them, isoliquiritigenin showed the greatest potency against Bel-7402 ( $IC_{50} = 0.7 \pm 0.11$  mol/L), which was 3-fold more potent than flavopiridol ( $2.4 \pm 0.34$  mol/L). *In vivo* biological evaluation showed that the  $LD_{50}$  of isoliquiritigenin was 4.38 mg/kg, and could effectively inhibit the cell growth of liver cancer Bel-7402 in mice.

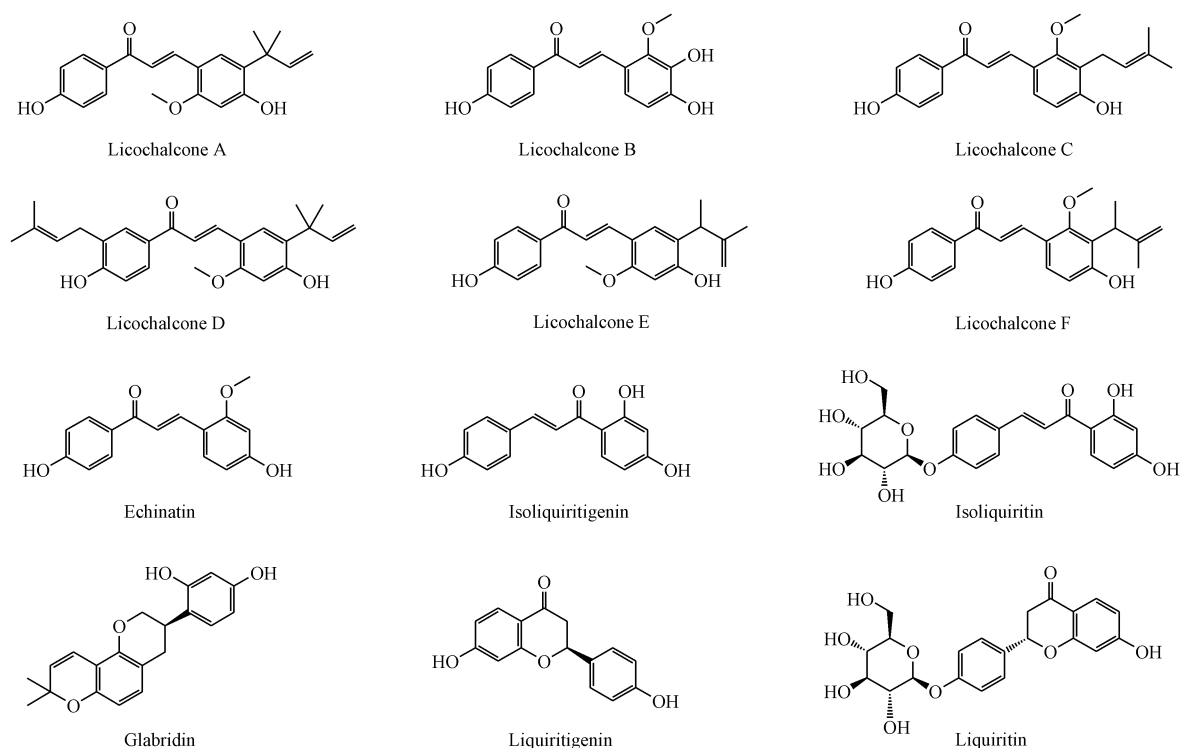
**Key words** licorice flavonoids; CDK1 inhibitor; molecular docking; antitumor activity

This work was supported by Hubei Skilled Talent Cultivation Research Foundation (No. 2016JB016)

甘草来源于豆科植物乌拉尔甘草、胀果甘草或光果甘草的干燥根和根茎,具有清热解毒、补脾益气、润肺、祛痰止咳、调和诸药等功效,是临床上应用最广泛的传统中草药,其主要成分为三萜类和黄酮类化合物<sup>[1]</sup>。长期以来,对于甘草的有效成分和药理作用研究主要集中在三萜类化合物甘草酸和甘草次酸<sup>[2-3]</sup>。近年来,现代药理学研究发现甘草中黄酮类化合物也是一类非常有效的活性成分,具有多种药理活性,如抗菌、抗炎、抗溃疡、抗氧化、抗糖尿病、抗肿瘤、抗抑郁等作用<sup>[4-5]</sup>,且毒性低、不良反应少,具有良好的临床开发潜力。最近研究表明,甘草黄酮类化合物对肝癌 Bel-7402 细胞展现出了较强的抑制活性<sup>[6]</sup>。因此,本研究继续探

讨甘草黄酮单体化合物甘草查耳酮 A-F、刺甘草查耳酮、异甘草素、异甘草苷、光甘草定、甘草素、甘草苷的抗肝癌活性,以期得到高效、低毒的抗肝癌先导化合物。

尽管目前对甘草黄酮的抗肿瘤作用靶点研究较少,但是参考黄酮类化合物抗肿瘤作用靶点发现,黄酮类化合物对细胞周期依赖性蛋白激酶(CDK)有较强的亲和力<sup>[7]</sup>,而 CDK 是控制细胞周期与增殖过程的重要激酶,已成为新型抗肿瘤药物设计的重要靶点,尤其是 CDK1/cyclin B 在多种肿瘤中过表达<sup>[8]</sup>。因此,本研究首先测试了 12 个甘草黄酮(图 1)对 CDK1/cyclin B 的抑制活性,以判断甘草黄酮类化合物的靶向性。



**Figure 1** Structures of licorice flavonoids

1 材 料

1.1 试 剂

甘草查耳酮 A-F、刺甘草查耳酮、异甘草苷购自北京伊诺凯科技有限公司(质量分数≥95%);甘草素、异甘草素、甘草苷购自百灵威科技有限公司(质量分数≥95%);光甘草定、夫拉平度(flavopiridol)购自阿拉丁试剂有限公司(质量分数≥95%);Kinase-Glo® Luminescent Kinase Assay 试剂盒购自上海浩然生物技术有限公司;CCK-8 试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司;CDK1/cyclin B 购自英国 SignalChem 公司;其他试剂购自国药集团化学试剂有限公司(质量分数≥95%);DMEM、MEM 培养基、胎牛血清购自美国 Hyclone 公司。

1.2 仪 器

ELx808 吸收光酶标仪(美国 BioTek 公司);C6 流式细胞仪(美国 BD 公司);FA1004B 分析天平(上海越平科学仪器有限公司);数显游标卡尺(美国耐美特公司公司)。

1.3 动物与细胞

BALB/c 裸小鼠,体重 14~17 g,雌雄各半,由武汉大学动物实验中心提供,动物使用许可证:SCXK(鄂)2008-0004;动物级别:SPF 级。细胞株:人正常肝细胞 HHL-5、人肝癌细胞 Bel-7402 细胞购自武汉大学细胞典藏中心;人正常肝细胞 LO2 购自中国协和医科大学基础医学研究所基础医学细胞中心;非洲绿猴肾细胞 Vero 购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。

2 方法与结果

2.1 CDK1 活性测试

使用 Kinase-Glo® Luminescent Kinase Assay 试剂盒测试甘草黄酮类化合物对 CDK 的抑制活性,以夫拉平度为阳性对照,按照操作说明书在测试板中每孔加入激酶 CDK1/cyclinB、ATP-荧光底物 and 不同浓度的待测物,将测试板在 30℃ 下反应 1 h 后,每孔再加入 Kinasw Glo Plus 并继续在 30℃ 下放置 20 min。使用酶标仪读取发光强度,分析实验结果,并计算出 IC<sub>50</sub>,以此判断甘草黄酮类化合物对细胞周期依赖性蛋白激酶的抑制活性,结果见表 1。

Table 1 CDK1/cyclin B inhibitory activities of licorice flavonoids ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Compd.	IC <sub>50</sub> /(μmol/L)
Licochalcone A	0.57 ± 0.015
Licochalcone B	0.06 ± 0.002
Licochalcone C	0.08 ± 0.101
Licochalcone D	0.34 ± 0.006
Licochalcone E	0.48 ± 0.005
Licochalcone F	0.69 ± 0.165
Echinatin	0.10 ± 0.005
Isoliquiritigenin	0.05 ± 0.005
Isoliquiritin	1.19 ± 0.355
Glabridin	0.13 ± 0.005
Liquiritigenin	0.11 ± 0.005
Liquiritin	2.80 ± 1.53
Flavopiridol	0.29 ± 0.230

总的来说,这些甘草黄酮化合物对 CDK1/cyclin B 均有较强的抑制活性。但是,两个黄酮苷化合物(异甘草苷和甘草苷)的活性低于其他黄酮类化合物。事实上,异甘草苷和甘草苷抑制 CDK1/cyclin B 的 IC<sub>50</sub> 均在微摩尔水平,而其他甘草黄酮抑制 CDK1/cyclin B 的 IC<sub>50</sub> 均在纳摩尔水平。尤其是异甘草素(IC<sub>50</sub> = 0.05 ± 0.005 μmol/L)对 CDK1/cyclin B 的抑制活性是阳性药物夫拉平度(IC<sub>50</sub> = 0.29 ± 0.230 μmol/L)的近 6 倍。

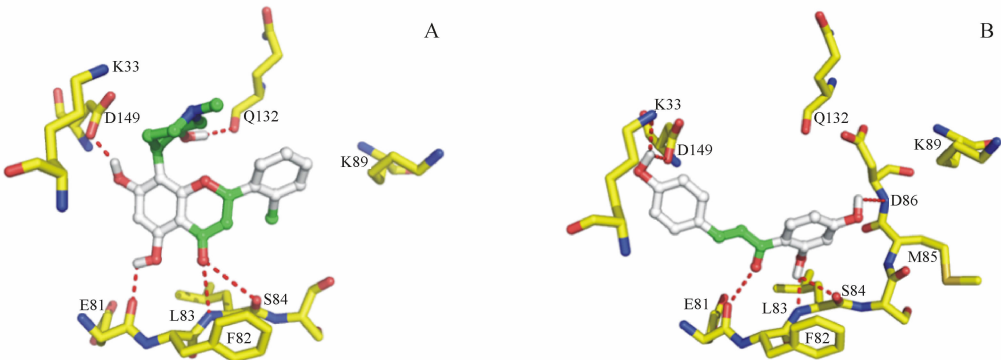
2.2 分子对接

CDK1 的晶体结构目前还未解析出来,按照参考文献以 CDK2 晶体结构(PDB code:1YKR)为模板对 CDK1 进行同源建模<sup>[9-11]</sup>。通过 ChemBio 3D ultra 14.0 和 Autodock 4.2D 中的 Ligand 模块进行小分子结构的预处理。对接软件使用 Autodock4.2D,利用晶体结构中的配体定义口袋盒子,对接盒子边长设置为 30 Å,使用半经验自由能进行评价,拉马克遗传算法循环 100 次,其余参数保持默认,结果见图 2。

在 CDK1 的活性口袋中,阳性药物夫拉平度能够与氨基酸残基 E81、L82、S84、Q132 和 D149 相互作用形成 5 个氢键(图 2-A),其中夫拉平度与 E81、L82 和 D149 的氢键作用是抑制 CDK1 的关键作用力<sup>[10]</sup>;而异甘草素在 CDK1 的活性口袋中也能够与氨基酸残基 E81、L82 和 D149 形成氢键(图 2-B),因此异甘草素对 CDK1 也有较强的抑制活性。此外,异甘草素还能与 K33、S84 和 D86 相互作用形成氢键,总共与 CDK1 的活性口袋氨基酸残基形成了 6 个氢键。显然,异甘草素

在 CDK1 的活性口袋较夫拉平度与更多的氨基酸相互作用,因此异甘草素对 CDK1 的抑制活性强

于阳性药物夫拉平度。



**Figure 2** Predicted binding modes of flavopiridol-CDK1 and isoliquiritigenin-CDK1  
A: Docking poses of flavopiridol-CDK1, which can form hydrogen bonds with residues E81, L83, S84, Q132, D149; B: Docking poses of isoliquiritigenin-CDK1, which can form hydrogen bonds with residues K33, E81, L83, S84, D86, D149

2.3 体外抗增殖活性

选取人肝癌细胞 Bel-7402 为测试细胞株,正常的肝细胞 LO2、HHL-5 以及非洲绿猴肾细胞 Vero 为对照细胞。以 CDK1 抑制剂夫拉平度为阳性对照药,采用 CCK-8 试剂盒对甘草黄酮进行抗肿瘤活性评价。取对数生长期的测试细胞株悬浮于含 10% 胎牛血清的培养基中,铺至 96 孔培养板中。待细胞完全贴壁后,弃去原培养液,加入含有测试药物的培养液 100 μL 培养 48 h,弃去原培养液,每孔加入 CCK-8 溶液 10 μL,在培养箱中继续孵育 4 h,用酶标仪在 490 nm 测定每孔的吸收度,分析实验结果,并计算出 IC<sub>50</sub>,结果见表 2。

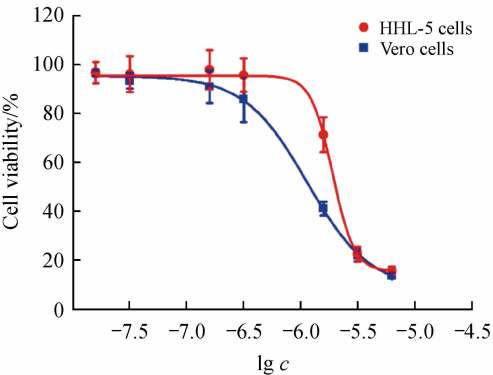
**Table 2** Antiproliferative activity and therapeutic index (IVTI) of licorice flavonoids and flavopiridol ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Compd.	IC <sub>50</sub> (μmol/L)		IVTI <sup>a</sup>
	Bel-7402	LO2	
Licochalcone A	4.1 ± 0.12	> 100	> 24.3
Licochalcone B	1.1 ± 0.07	> 100	> 90.9
Licochalcone C	2.3 ± 0.65	> 100	> 43.4
Licochalcone D	3.6 ± 0.41	> 100	> 27.7
Licochalcone E	6.1 ± 0.98	> 100	> 16.3
Licochalcone F	5.9 ± 0.49	> 100	> 12.9
Echinatin	2.5 ± 0.72	> 100	> 188.6
Isoliquiritigenin	0.7 ± 0.11	> 100	> 138.8
Isoliquiritin	7.7 ± 0.54	> 100	> 37.0
Glabridin	1.6 ± 0.24	> 100	> 52.6
Liquiritigenin	2.2 ± 0.15	> 100	> 16.1
Liquiritin	8.5 ± 0.67	> 100	> 11.7
Flavopiridol	2.4 ± 0.34	> 100	> 41.6

<sup>a</sup>IVTI; *in vitro* therapeutic index, ratio of IC<sub>50</sub> (LO2) to IC<sub>50</sub> (Bel-7402)

结果(表 2)表明,12 个甘草黄酮化合物对肝癌 Bel-7402 细胞均有较强的抑制作用,其 IC<sub>50</sub> 均小于 10.0 mol/L,其中甘草查耳酮 B、异甘草素和光甘草定对 Bel-7402 的抑制活性强于阳性药物夫拉平度,特别是异甘草素抑制 Bel-7402 的 IC<sub>50</sub> 达到了纳摩尔水平,是阳性药物夫拉平度的 3 倍以上。

为了进一步评价甘草黄酮化合物的毒性,用正常的肝细胞 LO2 作为测试细胞株来检测其毒性,并计算出选择性指数 (*in vitro* therapeutic index, IVTI),化合物的 IVTI 越高,安全性越高<sup>[12]</sup>。从表 2 中可以发现,这类甘草黄酮基本没有毒性 (IC<sub>50</sub> > 100 mol/L),并有较高的 IVTI,其中异甘草素的治疗指数 (IVTI > 138) 显著高于其他甘草黄酮化合物和阳性药物夫拉平度。但是,异甘草素对另外一种正常的肝细胞 HHL-5 (IC<sub>50</sub> = 6.0 ± 0.18 μmol/L) 和非洲绿猴肾细胞 Vero (IC<sub>50</sub> = 3.6 ± 0.58 μmol/L) 均有较强的毒性作用(图 3)。

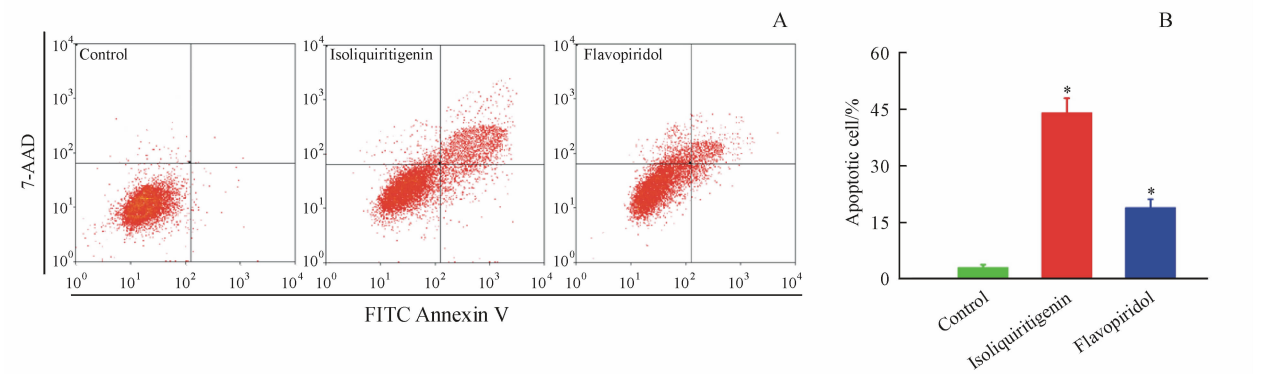


**Figure 3** Illustrative dose-response curves for antiproliferative effects on normal HHL-5 and Vero cells of isoliquiritigenin ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

2.4 异甘草素对 Bel-7402 细胞凋亡的影响

取对数生长期的 Bel-7402 细胞株悬浮于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中,铺至 12 孔培养板中,置 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。分为测试组、阳性药物对照组和空白对照组。待细胞完全贴壁后,弃去原培养液,测试组和阳性药物分别加入含 0.7 μmol/L 异甘草素和夫拉平度的

培养液 1 mL,继续培养 24 h。按照 FITC Annexin V/7-AAD 试剂盒的说明书收集细胞,冰的 PBS 洗涤 3 次,离心弃去上清液,加入 1 × 结合缓冲液 100 μL,分别加入 FITC Annexin V 5 μL 和 7-AAD 5 μL,混匀后室温避光 15 min,上流式细胞检测仪进行检测,分析 Bel-7402 细胞凋亡率,结果见图 4。



**Figure 4** Isoliquiritigenin induce Bel-7402 cell apoptosis *in vitro*  
A:Flow cytometric analysis;B:Percentages of apoptotic cells in each group ( $\bar{x} \pm s, n=3$ ). \*  $P<0.01$  vs control group

图 4-A 中右下象限和右上象限分别代表早期凋亡和晚期凋亡,而将两象限的百分率相加即为发生凋亡的细胞比率。结果显示,与空白对照组相比,异甘草素和夫拉平度均能显著地诱导 Bel-7402 细胞凋亡,但异甘草素诱导 Bel-7402 细胞的凋亡作用强于夫拉平度,其凋亡率分别为 44.1% 和 19.2% (图 4-B)。

2.5 急性毒性实验

在表 2 中,异甘草素对正常的肝细胞 HHL-5

和非洲绿猴肾细胞 Vero 有毒性。因此,为了进一步探讨异甘草素在动物体内是否有毒性,按照参考文献的方法<sup>[13]</sup>,选取 4~5 周龄的裸鼠 48 只,随机将其分为 6 组不同的给药剂量组,给药剂量分别为 2.17,2.80,3.61,4.65,5.99,7.72 mg/kg,每组 8 只,雌雄各半,在灌胃给药后 1 h、5 h、3 d、4~18 d 观察记录实验小鼠的存活状态,并用寇氏法计算出异甘草素的 LD<sub>50</sub> 及 LD<sub>50</sub> 的 95% 可信限,结果如表 3 所示。

**Table 3** Acute toxicity of isoliquiritigenin in mice

Dose/ (mg/kg)	n	Mouse mortality				Total mortality	Survival/% on day 18	LD <sub>50</sub> <sup>a</sup> /(mg/kg)
		1 h	5 h	3 d	4-18 d			
2.17	8	0	0	0	0	0	100	4.38
2.80	8	0	0	1	0	1	88	
3.61	8	0	0	3	0	3	63	
4.65	8	0	0	4	0	4	50	
5.99	8	0	0	6	0	6	25	
7.72	8	1	2	5	0	8	0	

<sup>a</sup> 95% Confidence limits:3.78-5.07 mg/kg

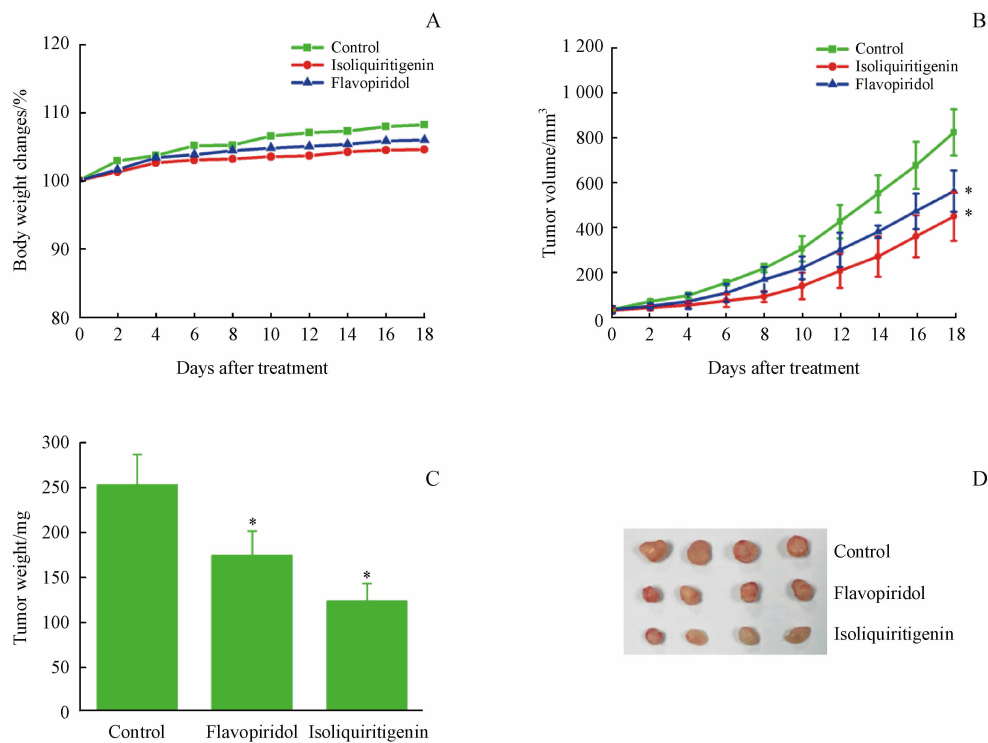
当给予小鼠 2.17 mg/kg 剂量时,小鼠在 18 d 内存活率为 100%;而给予大剂量 7.72 mg/kg 剂量时,3 d 内全部死亡。根据不同剂量组的小鼠死亡率,计算出了异甘草素的 LD<sub>50</sub> 为 4.38 mg/kg,其 95% 的可信限为 3.78~5.07 mg/kg。

2.6 体内抗肿瘤活性

从表 2 和图 3 的体外抗肿瘤活性实验结果可以看出,异甘草素对肝癌 Bel-7402 细胞展现出了较强的抑制活性。因此,本研究建立了肝癌 Bel-7402 裸鼠皮下瘤模型,来进一步考察异甘草素的

动物体内抗肝癌活性。选取 4~5 周龄的裸鼠在其右侧肩部皮下接种 Bel-7402 的细胞混悬液,每只 100  $\mu\text{L}$ ( $4 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$  个细胞),接种 1 周后,随机对小鼠分为治疗组、阳性药物组和空白对照组,每组 4 只,雌雄各半,灌胃给药。通过急性毒性实验本研究发现异甘草素经口给药剂量为 2.80 mg/kg 在第 3 天将引起实验裸鼠死亡,而在剂量为 2.17 mg/kg 不

会造成实验裸鼠死亡。因此,为了保证在给药治疗期间实验裸鼠的存活率,治疗组异甘草素和阳性药物组夫拉平度的给药剂量均为 2.17 mg/(kg·d),其中空白对照组给予等体积的 PBS,连续给药 18 d。每隔 1 天称量裸鼠的体重,并测试肿瘤长宽,计算肿瘤体积。治疗结束后将裸鼠处死,取下肿瘤并称重,结果见图 5。



**Figure 5** Effect of isoliquiritigenin on the growth of Bel-7402 human liver tumor in nude mice treated with vehicle control, isoliquiritigenin and flavopiridol ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

A: body weight; B: tumor volume; C: tumor weight; D: tumor size

\*  $P < 0.01$  vs control group

异甘草素和阳性药物夫拉平度[2.17 mg/(kg·d)]经灌胃连续给药 18 d,给药期间实验裸鼠的体重在逐渐地增加(图 5-A)。从肿瘤体积随时间变化曲线(图 5-B)可以发现,与对照组相比,异甘草素和阳性药物夫拉平度在裸鼠体内均能够有效地减慢肿瘤的增长,其中异甘草素的效果更佳。实验结束后,取下的实验小鼠肿瘤也是异甘草素给药组小鼠的肿瘤重量(图 5-C)和肿瘤体积均小于阳性药物夫拉平度组(图 5-D)。

### 3 讨论

本研究结果显示,这些甘草黄酮对 CDK1 具有靶向性。但是,甘草黄酮化合物之间对酶的抑制活

性却有较大的差异。从结构上看,两个甘草黄酮苷(异甘草苷和甘草苷)对 CDK1 的抑制活性低于其相应的甘草黄酮,这说明甘草黄酮上与糖基相连的羟基是药效团。从分子对接的结果看,与糖基相连的羟基能够与酶形成氢键作用,而形成糖苷后不能形成氢键,因此甘草黄酮苷的 CDK1 酶抑制活性低于甘草黄酮。在甘草查耳酮 A-F、刺甘草查耳酮、异甘草素、光甘草定、甘草素中,甘草查耳酮 A-F、刺甘草查耳酮、异甘草素属于黄酮的另一个分支——查耳酮,这类 8 个化合物具有  $\alpha, \beta$ -不饱和酮结构,有较好的柔性,能够与多种受体结合,也是一个抗肿瘤的药效团,因此甘草查耳酮 A-F、刺甘草查耳酮、异甘草素的酶抑制活性要强于光甘草定

和甘草素。但是,其 $\alpha,\beta$ -不饱和酮的位置有变化,其中异甘草素的 $\alpha,\beta$ -不饱和酮的羰基与间苯二酚相连,而该羰基能够同间苯二酚的羟基一起与酶的氨基酸残基形成氢键,因此异甘草素的酶抑制活性强于其他类型甘草黄酮。

在体外抗肿瘤活性中,这类甘草黄酮对肝癌 Bel-7402 有较强的抑制活性,其抑制 Bel-7402 的趋势与酶抑制活性一致,也是甘草黄酮(甘草查耳酮 A-F、刺甘草查耳酮、异甘草素、光甘草定、甘草素)强于黄酮苷(异甘草苷和甘草苷),具有 $\alpha,\beta$ -不饱和酮的化合物甘草查耳酮 A-F、刺甘草查耳酮、异甘草素强于化合物光甘草定、甘草素。其中异甘草素( $IC_{50} = 0.7 \pm 0.11 \text{ mol/L}$ )对 Bel-7402 展现出了最强的抑制活性,是阳性药物夫拉平度( $IC_{50} = 2.4 \pm 0.34 \text{ mol/L}$ )的 3 倍。

尽管这类甘草黄酮对正常的肝 LO2 细胞没有毒性,但是异甘草素对另一种正常的肝细胞 HHL-5 ( $IC_{50} = 6 \pm 0.18 \text{ } \mu\text{mol/L}$ )和非洲绿猴肾细胞 Vero ( $IC_{50} = 3.6 \pm 0.58 \text{ } \mu\text{mol/L}$ )均有较强的毒性作用(图 3)。进一步研究发现异甘草素对小鼠的  $LD_{50}$  为  $4.38 \text{ mg/kg}$ 。异甘草素对 LO2 细胞没有毒性,可能是由于 LO2 细胞系是在人正常肝细胞原代培养的基础上经过特殊处理而获得的细胞,该细胞株已经永生化,并不是正常的肝细胞,也不是原代细胞,只是其生长和死亡的规律和正常肝细胞较为接近,但已不具备很多正常细胞的特性,因此异甘草素对 LO2 没有毒性,而采用正常肝细胞 HHL-5 更能反映出异甘草素内在毒性,实验结果(表 3)表明异甘草素对 HHL-5 细胞有较强的毒性,在动物体内也显示毒性较大。在动物体内实验中,异甘草素也能够有效地抑制肿瘤的增长,其抑瘤率为 51.0%,是阳性药物夫拉平度(31.0%)的 1.6 倍。

总之,甘草黄酮是一类细胞周期依赖性蛋白激酶(CDKs)抑制剂,其中异甘草素可以作为先导物进行结构修饰和改造,以获得抗肝癌活性高、毒性较小的化合物,值得进一步深入研究。

## 参考文献

[1] He W, Ning J, Wu JJ, *et al.* Research progress in interaction

between chemical components of Glycyrrhizae Radix and cytochrome P450 enzyme[J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2016, **47**(11): 1974–1981.

[2] Han YD, Wang B, Wang ZY, *et al.* Recent research progress in pharmacological effects of glycyrrhizic acid[J]. *Chin New Drugs J* (中国新药杂志), 2012, **21**(21): 2499–2505.

[3] Jin SX, Jin SY, Li XY, *et al.* Preparation and in vivo evaluation of glycyrrhizin acid-sodium deoxycholate/phospholipid-mixed micelles[J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2013, **48**(4): 280–285.

[4] Cui YR, Li DF, Ju B, *et al.* Antitumor effects of four licoflavones in vitro[J]. *Food Sci Technol* (食品科技), 2010, **35**(7): 88–92.

[5] Mourboul A, Wang YB, Xu FY, *et al.* Anticancer activity of flavonoids from Xinjiang glycyrrhiza glabra in human Bel-7402 hepatocarcinoma cell line[J]. *J Xinjiang Med Univ* (新疆医科大学学报), 2013, **36**(12): 1744–1748.

[6] Xu FY. Anticancer activity and mechanism of actions of glycyrrhetic acid compounds and licorice chalcone derivatives in Human hepatocarcinoma Bel-7402 cells[D]. *Xinjiang: Xinjiang Med Univ* (新疆: 新疆医科大学), 2013.

[7] Huang W, Chen Q, Yang WC, *et al.* Efficient synthesis and antiproliferative activity of novel thioether-substituted flavonoids[J]. *Eur J Med Chem*, 2013, **66**: 161–170.

[8] Tsaur I, Makarevic J, Hudak L, *et al.* The cdk1-cyclin B complex is involved in everolimus triggered resistance in the PC3 prostate cancer cell line[J]. *Cancer Lett*, 2011, **313**(1): 84–90.

[9] Hamdouchli C, Zhou B, Mendoza J, *et al.* Structure-based design of a new class of highly selective aminoimidazo[1,2-a]pyridine-based inhibitors of cyclin dependent kinases[J]. *Bioorg Med Chem*, 2005, **15**(7): 1943–1947.

[10] Nguyeng B, Lozach O, Wang Q, *et al.* Synthesis, biological evaluation, and molecular modeling of natural and unnatural flavonoidal alkaloids, inhibitors of kinases[J]. *J Med Chem*, 2012, **55**(6): 2811–2819.

[11] Zhang QQ, Yao QZ, Zhang SP, *et al.* Homology modeling, molecular docking, and 3D-QSAR of indirubin analogues as CDK1 inhibitors[J]. *Acta Phys-Chim Sin* (物理化学学报), 2014, **30**(2): 371–381.

[12] Muller PK, Molton MN. The determination and interpretation of the therapeutic index in drug development[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2012, **11**(10): 751–761.

[13] Ai Y, Hu Y, Kang FH, *et al.* Synthesis and biological evaluation of novel olean-28, 13 $\beta$ -lactams as potential antiprstate cancer agents[J]. *J Med Chem*, 2015, **58**(11): 4506–4520.