

· 论 文 ·

NO供体型大黄酸衍生物的合成及抗肿瘤活性

柏志伟[#], 尚飞扬[#], 戴卫国, 何黎琴^{*}

(安徽中医药大学药学院, 合肥 230031)

摘 要 以大黄酸为原料, 利用其羧基通过不同的连接臂与呋喃氮氧化合物偶联, 得到7个NO供体型大黄酸衍生物, 其结构经红外光谱、核磁共振氢谱和质谱确证。采用MTT法测试了目标化合物对人肝癌细胞HepG2、Bel-7402, 人结肠癌细胞HCT116, 人骨肉瘤细胞U2OS, 耐药细胞Bel-7402/5-FU及正常肝细胞LO2的体外抗细胞增殖活性。结果显示, 所有目标化合物对受试的肿瘤细胞和耐药细胞均具有较强的增殖抑制活性, 其中化合物**4g**对人肝癌细胞HepG2、Bel-7402, 人骨肉瘤细胞U2OS及耐药细胞Bel-7402/5-FU具有强的增殖抑制活性, 而且对正常细胞影响很小, 表现出较好的选择性。采用Griess法测定了目标化合物**4g**在肿瘤细胞HepG2中对NO释放的影响。结果表明, 化合物**4g**在细胞中能释放高浓度的NO, 其抗肿瘤作用可能与NO的释放相关。NO清除剂验证实验表明, 化合物**4g**的抗肿瘤活性部分来自于NO的释放。

关键词 大黄酸; 衍生物; 呋喃氮氧化合物; 合成; 抗肿瘤活性

中图分类号 R914.5; R965 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2021)01-0038-06

doi: 10.11665/j.issn.1000-5048.20210105

引用本文 柏志伟, 尚飞扬, 戴卫国, 等. NO供体型大黄酸衍生物的合成及抗肿瘤活性[J]. 中国药科大学学报, 2021, 52(1): 38-43.

Cite this article as: BAI Zhiwei, SHANG Feiyang, DAI Weiguo, *et al.* Synthesis and antitumor activities of NO-donating rhein derivatives[J]. *J China Pharm Univ*, 2021, 52(1): 38-43.

Synthesis and antitumor activities of NO-donating rhein derivatives

BAI Zhiwei[#], SHANG Feiyang[#], DAI Weiguo, HE Liqin^{*}

College of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230031, China

Abstract Seven target compounds coupled by rhein and furoxan were synthesized and their chemical structures were confirmed by ¹H NMR, IR, and MS. All target compounds were evaluated for anti-proliferative activity against human hepatoma cells HepG2 and Bel-7402, human colon cancer cells HCT116, human osteosarcoma cells U2OS, drug-resistant cells Bel-7402/5-FU and normal hepatocytes cells LO2 *in vitro* by thiazolyl blue(MTT) colorimetry. The results indicated that all target compounds had more potent anti-proliferative activity than their parent compound rhein. Additionally, compound **4g** had stronger proliferation inhibitory activity on HepG2, Bel-7402, U2OS and Bel-7402/5-FU, with little effect on the proliferation of normal cells, exhibiting selective inhibitory activity. Griess assay was used to measure the release of nitric oxide *in vitro*. Results showed that compound **4g** could increase the releases NO in HepG2 cells, which may be associated with its antitumor effects. Furthermore, the antitumor activity of compound **4g** was attenuated by NO scavenger (hemoglobin), which indicates that the antitumor activity of compound **4g** may be partly related to the release of NO.

Key words rhein; derivatives; furoxan; synthesis; antitumor activity

This study was supported by the Natural Science Foundation of Anhui Province (No. KJ2017A292)

收稿日期 2020-09-08 * 通信作者 Tel: 13956022936 E-mail: hlq661125@126.com

基金项目 安徽省自然科学基金资助项目(No. KJ2017A292)

[#]柏志伟和尚飞扬为共同第一作者

*BAI Zhiwei and SHANG Feiyang contributed equally to this work

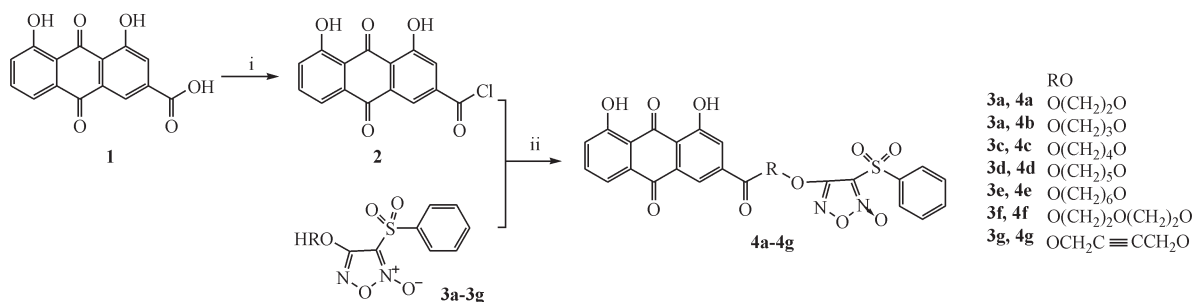
大黄在我国具有悠久的药用历史,大黄酸(rhein, RH)是其有效活性成分之一。研究发现,大黄酸具有广泛的药理活性,尤其在抗炎、抗肿瘤等方面表现突出^[1-3]。研究表明,大黄酸可用于多种肿瘤性疾病的治疗,具有广谱的抗肿瘤作用,且作用机制多样:大黄酸的蒽醌三环共平面结构可以嵌入到DNA的碱基对中,与DNA双螺旋结构可逆性的结合,从而导致DNA裂解和影响DNA的转录、合成,达到抗肿瘤的作用;能抑制大鼠肝细胞的能量代谢,影响肝细胞的呼吸链,造成肝细胞内过氧化物积累,最后造成肝细胞死亡;抑制人表皮生长因子的双靶点受体蛋白酪氨酸激酶的活性,达到抗乳腺癌的目的;能与细胞内的转录激活因子(AP-1)结合,通过AP-1来调节结肠细胞对细胞毒剂的敏感性,达到抗肿瘤的作用;通过下调多药耐药相关蛋白1的表达,逆转肿瘤细胞多药耐药性^[4-8]。此外,大黄酸具有毒性低、安全性高等优势,为研发高效、低毒、多靶点的大黄酸类抗肿瘤药物提供了良好的先导化合物。由于大黄酸抗肿瘤活性不够强,溶解性能差,既不溶于水和醇,又不溶于绝大多数有机溶剂,生物利用度较低,使大黄酸的临床使用受到了很大限制。鉴于大黄酸的众多药理作用和明显的缺点,加之结构简单、可修饰位点较多,通过对其结构进行修饰和改造来改善大黄酸的溶解性能,增加其水溶性或脂溶性,提高其生物利用度和抗肿瘤活性,已成为当前的研究热点。多个课题组对其进行了结构修饰,取得了很好的效果,得到的系列大黄酸衍生物在抗肿瘤活性、溶解性能和生物利用度方面均具有较大

的改善,为其进一步研发打下良好的基础^[9-14]。

NO作为重要的信使物质或效应分子,参与体内多种生理和病理反应。大量研究表明,体内高浓度的NO可产生细胞毒性,诱导肿瘤细胞凋亡,阻止肿瘤细胞的扩散和转移,促进巨噬细胞杀死肿瘤细胞。研究发现,NO供体型衍生物在药效或安全性方面较先导化合物有明显的改善^[15-17]。受此启发,本课题组前期设计合成了系列NO供体型苦参碱和香豆素的衍生物^[18-21],体外抗肿瘤活性强于母体化合物,部分化合物活性优于阳性对照药氟尿嘧啶。在此基础上,利用药物化学的拼合原理,本课题组通过大黄酸的2位羧基与硝酸酯类NO供体偶联,设计合成了5个硝酸酯类NO供体型大黄酸衍生物,其抗肿瘤活性显著高于先导化合物大黄酸,部分化合物的抗细胞增殖作用强于氟尿嘧啶^[22]。受此鼓舞,为获取更多的具有抗肿瘤活性的大黄酸衍生物,本研究拟选用另一类重要的NO供体——呋咱氮氧化合物,通过不同的连接臂,将其与大黄酸-2-位羧基偶联,设计合成了7个目标化合物。期望得到的化合物能改善大黄酸的溶解性,提高生物利用度,并能够在体内通过协同效应增强其抗肿瘤活性。

1 合成路线

以大黄酸(**1**)为原料,经二氯亚砷卤代得到大黄酰氯(**2**),中间体**2**再与不同的羟烷基取代的呋咱(**3a~3g**)反应得到目标化合物(**4a~4g**)。合成路线见路线1。



Scheme 1 Synthetic routes of compounds **4a-4g**

Reagents and conditions:(i) SOCl₂, DMF, reflux;(ii) DCM, pyridine, 0 °C- r. t. , 2 h

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

LCQ ADVANTAGE MAX 液质联用质谱仪(美国 Finnigan 公司); Nicolet Acotar 370 DTGS 型红外光谱仪(美国 Thermo Electron 公司); AV 400 型核磁共振仪(德国 Bruker 公司, 溶剂为氘代二甲基亚砜); 薄层硅胶 G 板(100 mm × 100 mm, 合肥森瑞有限公司); 大黄酸(含量大于 98%, 西安小草植物科技有限责任公司); 一氧化氮检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司); 血红蛋白(上海碧云天生物技术有限公司)。其他试剂均为市售分析纯。

2.2 化学合成

2.2.1 中间体(2)的合成 在干燥的 100 mL 圆底烧瓶中, 加入大黄酸(1 g, 3.5 mmol)和二氯亚砷(30 mL), DMF 0.5 mL, 70 °C 回流搅拌 6 h, 减压蒸去氯化亚砷, 得橘红色固体 1.1 g(不经纯化, 直接用于下步反应)。

2.2.2 中间体 3a~3g 的合成 参照文献[21]将苯硫酚(12.1 g, 0.11 mol), 氢氧化钠(4.4 g, 0.11 mol)溶于 95% 乙醇 50 mL 中, 加入由氯乙酸(11.4 g, 0.12 mol)和碳酸钠(6.35 g, 0.06 mol)配成的水溶液 100 mL, 室温搅拌 3 h, 回流 1 h。冷却至室温后加入 6 mol/L 盐酸调至 pH 2, 减压蒸去乙醇, 有白色沉淀生成, 过滤, 得白色棒状晶体 2-苯硫基乙酸 16.4 g, 收率 89%, mp: 60.1 ~ 62.0 °C。

将 2-苯硫基乙酸(16.0 g, 0.1 mol)溶于冰醋酸 65 mL 中, 加入 30% 过氧化氢(20 mL, 0.2 mol), 室温搅拌 2.5 h, 得无色澄清溶液, 滴加 95% 发烟硝酸(40 mL, 0.9 mol)升温至 90 °C 反应 30 min, 冷却至室温, 有白色针状晶体 3,4-二苯磺酰基-1,2,

5-噁二唑-2-氧化物析出, 过滤干燥得 14 g, 两步收率 76%, mp: 154.2 ~ 156.0 °C。

将相应的二醇(10 mmol)和 3,4-二苯磺酰基-1,2,5-噁二唑-2-氧化物(1 g, 2.7 mmol)溶于 THF 10 mL 中, 滴入 25% 氢氧化钠溶液(0.5 mL, 3 mmol), 2 h 后, 反应液从淡黄色变为橙黄色。将反应液倾入水 20 mL 中, 用乙酸乙酯(20 mL × 3)萃取, 有机层合并后加饱和氯化钠溶液水洗一次, 用无水硫酸钠干燥。过滤后将滤液浓缩, 柱色谱[乙酸乙酯-石油醚(60~90 °C), 1:4], 得白色粉末状固体 3a~3g。

2.2.3 目标化合物 4a~4g 的合成 将中间体 3(1.0 mmol)、吡啶(0.24 mL, 3.0 mmol)溶于二氯甲烷(DCM)20 mL 中, 在冰盐浴中缓慢滴加大黄酸酐氯(453 mg, 1.5 mmol)的二氯甲烷溶液, 滴加完毕, 升至室温搅拌, TLC 检测反应进程。反应完毕, 加水 100 mL, DCM 萃取(20 mL × 3), 有机相合并后用饱和氯化钠溶液洗涤 1 次, 无水硫酸钠干燥。过滤, 滤液浓缩, 柱色谱(流动相为 DCM)得黄色固体化合物 4a~4g。

合成的 7 个目标化合物的理化常数和波谱数据分别见表 1 和表 2。

Table 1 Yield and physical properties of compounds 4a~4g

Compd.	Character	Yield/%	mp/°C
4a	Yellow powder	68.2	192.4–193.7
4b	Yellow powder	72.1	189.4–191.1
4c	Yellow powder	74.0	184.4–184.9
4d	Yellow powder	78.1	171.2–172.5
4e	Yellow powder	76.5	163.4–165.3
4f	Yellow powder	70.9	173.3–174.8
4g	Yellow powder	75.2	183.5–184.2

Table 2 IR, ¹H NMR and MS datas of compounds 4a~4g

Compd.	ESI-HRMS m/z[M+H] ⁺	IR(KBr) ν/cm	¹ H NMR(600 MHz, DMSO-d) δ
4a	553.4	3 421, 3 085, 2 925, 1 720, 1 630, 1 551, 1 267, 1 160	11.92(s, 1H), 11.89(s, 1H), 7.99(d, J = 7.2 Hz, 4H), 7.86(t, J = 7.7 Hz, 2H), 7.71(t, J = 7.6 Hz, 4H), 4.63(t, J = 7.4 Hz, 2H), 4.45(t, J = 7.3 Hz, 2H)
4b	567.1	3 436, 3 082, 2 919, 1 718, 1 632, 1 552, 1 265, 1 161	11.91(s, 1H), 11.88(s, 1H), 8.01(s, 1H), 7.97(d, J = 7.7 Hz, 2H), 7.84–7.80(m, 3H), 7.70(t, J = 7.6 Hz, 3H), 7.41(d, J = 8.0 Hz, 1H), 4.57(t, J = 7.2 Hz, 2H), 4.45(t, J = 7.1 Hz, 2H), 2.75(t, J = 6.7, 2H)
4c	581.2	3 432, 3 078, 2 923, 1 716; 1 620, 1 542; 1 252, 1 168	11.91(s, 1H), 11.89(s, 1H), 8.11(s, 1H), 7.97(d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.84(d, J = 8.1 Hz, 2H), 7.78(s, 1H), 7.75–7.67(m, 3H), 7.41(d, J = 8.5 Hz, 1H), 4.37(d, J = 19.7 Hz, 4H), 1.77(s, 4H)

(Continued)

Compd.	ESI-HRMS $m/z[M+H]^+$	IR(KBr) ν/cm	1H NMR(600 MHz, DMSO- d_6) δ
4d	595.0	3 346, 2 974, 2 835, 1 716, 1 629, 1 505, 1 255, 1 167	11.91(s, 1H), 11.89(s, 1H), 8.09(s, 1H), 7.95(d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.84–7.79(m, 2H), 7.77(s, 1H), 7.71–7.65(m, 3H), 7.40(d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 4.41(t, $J = 6.2$ Hz, 2H), 4.36(t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 1.92(t, $J = 6.7$ Hz, 2H), 1.86(t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 1.32 – 1.26(m, 2H)
4e	609.2	3 346, 2 914, 1 714; 1 614, 1 552, 1 252, 1 168	11.90(s, 1H), 11.89(s, 1H), 8.11(s, 1H), 7.96(d, $J = 7.6$ Hz, 2H), 7.86–7.80(m, 2H), 7.78(s, 1H), 7.74–7.67(m, 2H), 7.41(d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 4.38(t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 4.35(t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 1.80–1.73(m, 4H), 1.48 – 1.40(m, 4H)
4f	597.1	3 428, 3 103, 2 958, 2 842, 1 718, 1 621, 1 269, 1 158	11.85(d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 8.03(s, 1H), 7.96(d, $J = 7.5$ Hz, 2H), 7.82–7.75(m, 3H), 7.68(t, $J = 7.0$ Hz, 1H), 7.62(t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 7.39(d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 4.57(s, 2H), 4.47(s, 2H), 3.88(s, 4H)
4g	577.3	3 432, 2 928, 2 260, 1 719, 1 631, 1 520, 1 264, 1 163	12.05(s, 1H), 11.97(s, 1H), 8.08(s, 1H), 8.00(d, $J = 7.2$ Hz, 2H), 7.87(t, $J = 7.1$ Hz, 1H), 7.81(t, $J = 7.1$ Hz, 1H), 7.76–7.70(m, 4H), 7.38(d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 5.29(s, 2H), 5.16(s, 2H)

2.3 细胞毒活性测试

以先导化合物大黄酸和临床常用抗肿瘤药物氟尿嘧啶(5-FU)为阳性对照,采用MTT法测试目标化合物对人肝癌细胞 HepG2、Bel-7402,人结肠癌细胞 HCT116,人骨肉瘤细胞 U2OS,耐药细胞 Bel-7402/5-FU 及正常肝细胞 LO2 的体外抗细胞增殖活性。细胞在 37 ℃、5% CO₂饱和湿度的培养箱中常规培养。取处于对数生长期状态良好的细胞,加入消化液(0.125%胰蛋白酶+0.01% EDTA)消化,制成每毫升 $2 \times 10^4 \sim 4 \times 10^4$ 个细胞的细胞悬液,接种于 96 孔板上,每孔加 180 μ L,置恒温 CO₂培养箱中培养 24 h。更换培养液,加入受试药物(0.16~25 μ mol/L,5 个浓度),每孔 20 μ L,培养 48 h。将 MTT 加入 96 孔板中,每个孔 20 μ L,培养箱中孵育 4 h。吸去上清液,加 DMSO,每孔 150 μ L,平板摇床上振摇 10 min,用酶联免疫检测仪测定每孔在波长为 570 nm 处的吸收度,计算 IC₅₀。

2.4 NO 释放量的测定

将 1×10^6 个 HepG2 细胞置于 6 孔板中孵育过夜。向每孔中分别加入 100 μ mol/L 化合物 **4g** 孵育 150 min。收集细胞并将其裂解,在 96 孔板中加入裂解液 50 μ L,再分别加入一氧化氮检测试剂盒 Griess 试剂 I 和 II 50 μ L,于 37 ℃孵育 10 min,测定在 540 nm 处的吸收度。只用 DMSO 给药处理的细胞作为亚硝酸盐产物的背景的阴性对照,以不同浓度的亚硝酸钠作标准曲线,根据标准曲线计算 NO 的浓度。

2.5 NO 清除剂对化合物 **4g** 活性的影响

用 NO 清除剂血红蛋白检验 NO 释放对化合物

4g 活性的影响。方法参照“2.3”项,取人肝癌细胞 HepG2 细胞,将血红蛋白(终浓度 10 μ mol/L,未见显著的细胞毒性)先于受试药物 1 h 加入培养基,再用受试药物 **4g**(终浓度 12.5 μ mol/L)处理 72 h,采用 MTT 法检测细胞抑制率。

3 结果与讨论

3.1 合成部分

在合成目标化合物的过程中,本研究曾参考前期类似化合物的合成方法,即以大黄酸和羟烃氧基取代的呋喃在脱水剂 EDCI/DMAP 作用下进一步反应成酯,实验发现产率低,且后处理操作繁琐。为此,改用酰氯成酯的方法,即大黄酸经二氯亚砷卤代得到大黄酰氯(**2**),再与不同的羟烃氧基取代的呋喃反应得到目标化合物(**4a**~**4g**)。考虑到所制备的大黄酰氯没有经过精制处理,在设计反应物配比时,加大了酰氯的用量。多次的实验表明,大黄酰氯与羟烃氧基呋喃物质的量比 1.5:1 为最佳,反应温度为先冰盐浴中滴加酰氯,后室温反应。实验结果表明,以此法制备目标化合物,反应能较好地进行,且后处理方便,反应收率较高,可达 68% 以上。

3.2 细胞毒活性

为了研究目标化合物的抗肿瘤活性,以先导化合物大黄酸和抗肿瘤药物 5-FU 为阳性对照,采用 MTT 法测试了目标化合物对人肝癌细胞 HepG2, Bel-7402,人结肠癌细胞 HCT116,人骨肉瘤细胞 U2OS,耐药细胞 Bel-7402/5-FU 及正常肝细胞 LO2 的体外抗细胞增殖活性。实验结果见表 3。

Table 3 Effects of target compounds against six human cancer cell lines

Compd.	<i>In vitro</i> cytotoxicity(IC ₅₀ , μmol/L)					
	Bel-7402	HepG2	HCT116	U2OS	Bel-7402/5-FU	HGC27
4a	1.731	2.436	3.904	2.333	2.404	3.126
4b	3.188	3.896	4.657	4.983	5.723	4.802
4c	1.980	2.431	4.293	2.323	4.652	5.078
4d	1.887	1.805	2.712	2.381	4.538	3.397
4e	1.697	3.619	5.831	4.776	3.525	6.538
4f	3.355	3.103	>12.5	3.027	4.334	>12.5
4g	1.331	2.324	>12.5	2.128	3.474	>12.5
5-FU	7.829	5.782	4.780	NT	212.1	12.28
Rhein	>100	>100	>100	>100	>100	>100

由表3可知,大黄酸呋喃偶联物对所测试的6种人类肿瘤细胞均表现出一定的增殖抑制活性,且全部目标化合物对肿瘤细胞的抑制活性远高于先导化合物大黄酸,绝大部分目标化合物的抗肿瘤活性与阳性对照药5-FU相当或更强。不同的化合物对不同肿瘤细胞的抑制作用有所不同,比如:所有受试化合物对Bel-7402, HepG2, U2OS, Bel-7402/5-FU等细胞株的增殖抑制作用明显,其IC₅₀均为较低的个位微摩尔浓度,抗细胞增殖效果均明显优于阳性对照5-FU,其中,化合物**4g**对Bel-7402细胞的抑制活性最强,其抑制活性是5-FU的6倍;对人结肠癌细胞HCT116和人胃癌细胞HGC27,不同的化合物所呈现的抑制作用差异较大,化合物**4f**和**4g**活性较弱,其IC₅₀大于12.5 μmol/L,而化合物**4a~4e**则表现出与阳性对照药5-FU相当或更强的抑制活性,说明当连接臂为饱和直链烷烃时,碳链长短对其活性影响较小;当连接臂为不饱和烃基(如化合物**4g**)或连接臂中含杂原子(如化合物**4f**)时,抗HCT116和HGC27的活性较差。值得注意的是,所合成的目标化合物对耐药细胞株Bel-7402/5-FU表现出较强的抑制活性,其抑制活性是5-FU的37~88倍,显示较好的抗耐药特性。为了探明目标化合物是否具有选择性抗肿瘤作用,本研究进一步考察了目标化合物对人正常肝细胞LO2的影响。研究发现,1 μmol/L的化合物**4a~4g**对LO2的增殖抑制活性差异较大:化合物**4g**和**4f**对LO2几乎没有影响,抑制率分别为3.80%和3.44%;化合物**4a**和**4c**对LO2的影响也很小,抑制率小于10%,分别为7.48%和7.12%;

而化合物**4b**, **4d**和**4e**对LO2的影响较大,抑制率分别为14.36%, 27.61%和22.09%。综上所述,化合物**4g**不仅对人肝癌细胞HepG2、Bel-7402,人骨肉瘤细胞U2OS及耐药细胞Bel-7402/5-FU表现出强的增殖抑制活性,而且对正常细胞影响很小,表现出较好的选择性,值得进一步研究。

3.3 化合物**4g**的溶解性及对肿瘤细胞中NO释放的影响

由于大黄酸在水中不溶,在乙醇、丙酮、乙酸乙酯、二氯甲烷等有机溶剂中极难溶解(<0.5 mg/mL),在一定程度上影响其药效的发挥。本研究通过对大黄酸的修饰,以期改善其溶解性能。经测定,体外抗肿瘤活性最好的目标化合物**4g**在水中的溶解度与大黄酸相似(<0.5 mg/mL),但在乙醇、丙酮、乙酸乙酯、二氯甲烷等有机溶剂中溶解度较大黄酸有了一定程度的改善:乙醇(>0.1 mg/mL)、丙酮(>1 mg/mL)、乙酸乙酯(>0.33 mg/mL)、二氯甲烷(>2 mg/mL)。

本研究设计的目标化合物是由NO供体与大黄酸通过连接臂偶联而成,期望得到的化合物能够在体内通过协同效应增强其抗肿瘤活性。为了证实目标化合物抗肿瘤作用是否与NO释放相关,本研究选取体外抗肿瘤活性最好的化合物**4g**进行体外NO释放检测,并用NO清除剂进行验证。参照文献,采用Griess法^[23]测定了活性目标物**4g**对肝癌细胞HepG2中NO释放量的影响。经受试药物**4g**(100 μmol/L)处理后, HepG2细胞中NO释放量达20.1 μmol/L。为证明NO与抗肿瘤活性之间的关系,本研究选用NO清除剂(血红蛋白)进行验

证。实验结果表明,血红蛋白可以显著抑制化合物 **4g** 的细胞毒性(其抑制率由未加清除剂时的 80.68% 降至 44.58%),这一试验结果证明了目标化合物 **4g** 的抗肿瘤活性部分来自于 NO 的释放。

References

- [1] Carney SL. Effect of diacetyl rhein on the development of experimental osteoarthritis. A biochemical investigation[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 1996, **4**(4):251-261.
- [2] Shi P, Huang ZW, Chen GC. Rhein induces apoptosis and cell cycle arrest in human hepatocellular carcinoma BEL-7402 cells[J]. *Am J Chin Med*, 2008, **36**(4): 805-813.
- [3] Fernand VE, Losso JN, Truax RE, et al. Rhein inhibits angiogenesis and the viability of hormone-dependent and -independent cancer cells under normoxic or hypoxic conditions in vitro[J]. *Chem Biol Interact*, 2011, **192**(3): 220-232.
- [4] Du Q, Bian XL, Xu XL, et al. Role of mitochondrial permeability transition in human hepatocellular carcinoma HepG2 cell death induced by rhein[J]. *Fitoterapia*, 2013, **91**: 68-73.
- [5] Huang YH, Zhen YS. Rhein induces apoptosis in cancer cells and shows synergy with mitomycin[J]. *Acta Pharm Sin*(药学学报), 2001, **36**(5):334-338.
- [6] Viayna E, Sola I, Bartolini M, et al. Synthesis and multitarget biological profiling of a novel family of rhein derivatives as disease-modifying anti-Alzheimer agents[J]. *J Med Chem*, 2014, **57**(6): 2549-2567.
- [7] van Gorkom BA, Timmer-Bosscha H, de Jong S, et al. Cytotoxicity of Rhein, the active metabolite of sennoside laxatives, is reduced by multidrug resistance-associated protein 1[J]. *Br J Cancer*, 2002, **86**(9): 1494-1500.
- [8] Chang CY, Chan HL, Lin HY, et al. Rhein induces apoptosis in human breast cancer cells[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2012, **2012**: 952504.
- [9] Miccadei S, Pulselli R, Floridi A. Effect of Isonidamide and Rhein on the phosphorylation potential generated by respiring rat liver mitochondria[J]. *Anticancer Res*, 1993, **13**(5A): 1507-1510.
- [10] Yao GY, Ye MY, Huang RZ, et al. Synthesis and antitumor activities of novel Rhein α -aminophosphonates conjugates[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2014, **24**(2): 501-507.
- [11] Huang JK, Zhang Z, Huang P, et al. Design, synthesis and biological evaluation of rhein derivatives as anticancer agents[J]. *Med Chem Comm*, 2016, **7**:1812-1818.
- [12] Lin YJ, Huang YH, Zhen YZ, et al. Rhein lysinate induces apoptosis in breast cancer SK-Br-3 cells by inhibiting HER-2 signal pathway[J]. *Acta Pharm Sin*(药学学报), 2008, **43**(11):1099-1105.
- [13] Wan ZM, Chen H, Xie WL, et al. Effect of rhein derivative RH-01 on the growth of osteosarcoma[J]. *Acta Acad Med CPAF*(武警医学院学报), 2008, **17**(6):469-472.
- [14] Zhang WW, Huang JK, He LQ, et al. Design, synthesis and antitumor activity of rhein derivatives[J]. *Chem World*(化学世界), 2017, **58**(6):346-352.
- [15] Wang XL, Li Y, Zhao Q, et al. Design, synthesis and evaluation of nitric oxide releasing derivatives of 3-*n*-butylphthalide as antiplatelet and antithrombotic agents[J]. *Org Biomol Chem*, 2011, **9**(16): 5670-5681.
- [16] Stewart GD, Nanda J, Brown DJ, et al. NO-sulindac inhibits the hypoxia response of PC-3 prostate cancer cells via the Akt signalling pathway[J]. *Int J Cancer*, 2009, **124**(1): 223-232.
- [17] Gu XK, Tang XB, Huang ZJ, et al. Synthesis and antitumor activity of NO-releasing alkoxybiphenyl derivatives[J]. *J China Pharm Univ*(中国药科大学学报), 2014, **45**(6): 657-661.
- [18] Wu YX, Huang JK, Gao LL, et al. Design, synthesis and evaluation of nitric oxide-releasing derivatives of *N*-(*n*-butyl) matrixic acid and *N*-(*n*-Butyl) matrixinol as anti-hepatocellular carcinoma agents[J]. *Heterocycles*, 2015, **91**(2):301-312.
- [19] He LQ, Yang Q, Wu YX, et al. Novel hybrids of (phenylsulfonyl) furoxan and *N*-benzyl matrixinol as anti-hepatocellular carcinoma agents[J]. *Acta Pharm Sin*(药学学报), 2015, **50**(5): 574-578.
- [20] He LQ, Liu J, Yin DK, et al. Synthesis and biological evaluation of nitric oxide-releasing matrixin derivatives as anticancer agents[J]. *Chin Chem Lett*, 2010, **21**(4): 381-384.
- [21] An R, Hou Z, Li JT, et al. Design, synthesis and biological evaluation of novel 4-substituted coumarin derivatives as antitumor agents[J]. *Molecules*, 2018, **23**(9): E2281.
- [22] Huang JK, He LQ, Zhang WW. Design, synthesis and evaluation of rhein-nitrate derivatives as anticancer agents[J]. *Chem World*(化学世界), 2018, **59**(11): 717-721.
- [23] Han C, Wu LT, Zhou CY, et al. Design, synthesis and anti-NSCLC activity of NO donating amLinopyrimidines[J]. *Chin J Med Chem*(中国药物化学杂志), 2016, **26**(3):175-181.