

DOI: 10.13210/j.cnki.jhmu.20250107.002
网络出版地址: https://link.cnki.net/urlid/46.1049.R.20250107.1705.004

鱼腥草总黄酮对肝癌细胞耐药性的逆转作用及机制研究

司维群¹, 刘静¹, 吴佳龙¹, 张琳¹, 蔡晓菁¹, 徐静^{1,2}✉

(1. 贵州中医药大学第二临床医学院, 贵州 贵阳 550002; 2. 贵州中医药大学第二附属医院, 贵州 贵阳 550003)

[摘要] **目的:** 通过观察鱼腥草总黄酮对人肝癌多药耐药(multidrug resistance, MDR)细胞 Bel-7402/ADM 及 P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)表达的影响, 探讨鱼腥草总黄酮对 Bel-7402/ADM 细胞的作用及可能逆转肝癌 MDR 的作用机制。 **方法:** CCK-8 法检测肝癌细胞耐药情况和抑制率; 将实验分为亲本组(Bel-7402)、亲本阿霉素(adriamycin, ADM)组(Bel-7402+ADM)、耐药组(Bel-7402/ADM)、耐药阿霉素组(Bel-7402/ADM+ADM)、鱼腥草总黄酮组(Bel-7402/ADM+ADM+EAT)、阳性对照组(Bel-7402/ADM+ADM+VRP), 通过流式细胞术和荧光观察检测处理后各组细胞内的 ADM 蓄积量; 将实验分为亲本组(Bel-7402)、耐药组(Bel-7402/ADM)、鱼腥草总黄酮组(Bel-7402/ADM+EAT)、阳性对照组(Bel-7402/ADM+VRP), 通过流式细胞术和免疫组化检测各组细胞中 P-gp 蛋白的表达情况。 **结果:** ADM 对 Bel-7402 细胞及 Bel-7402/ADM 细胞的增殖有抑制作用, 但对 Bel-7402 细胞增殖的影响更大; 荧光结果显示, 亲本组无荧光表现, 耐药组有少量荧光; 亲本阿霉素组及耐药阿霉素组荧光强度增加且耐药阿霉素组强于亲本阿霉素组; 鱼腥草总黄酮组及阳性对照组荧光强度较亲本组、耐药组及亲本阿霉素组明显增强, 较耐药阿霉素组稍减弱; 流式细胞术结果显示各组 ADM 的荧光强度为耐药阿霉素组 > 阳性对照组 > 亲本阿霉素组 > 鱼腥草总黄酮组 > 耐药组 > 亲本组 ($P < 0.05$); 流式细胞术结果显示, 亲本组与耐药组中 P-gp 的平均荧光强度(mean fluorescence intensity, MFI) 差异无统计学意义 ($P = 0.671$), 鱼腥草总黄酮组及阳性对照组明显低于亲本组及耐药组 ($P < 0.001$), 鱼腥草总黄酮组与阳性对照组相比差异无统计学意义 ($P = 0.367$); 免疫组化结果显示亲本组 P-gp 蛋白的阳性率为 $(15.34 \pm 2.15)\%$, 与耐药组 $(99.94 \pm 0.02)\%$ 、鱼腥草总黄酮组 $(10.45 \pm 0.73)\%$ 及阳性对照组 $(1.08 \pm 0.13)\%$ 相比, 差异具有统计学意义 ($P < 0.001$)。 **结论:** 鱼腥草总黄酮可抑制 Bel-7402/ADM 细胞的增殖并增加细胞内 ADM 的蓄积, 从而增强 ADM 的抗肿瘤作用并逆转肝癌的 MDR, 其机制可能与下调 P-gp 的表达有关。

[关键词] 鱼腥草总黄酮; 肝细胞癌; 多药耐药; P-gp 耐药蛋白; 阿霉素

[中图分类号] R285 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2097-5953(2026)04-0281-08

Reversal effect and mechanism of drug resistance on hepatocellular carcinoma cells by total flavonoids of *Houttuynia cordata*

SI Weiqun¹, LIU Jing¹, WU Jialong¹, ZHANG Lin¹, CAI Xiaojing¹, XU Jing^{1,2}✉

(1. The Second School of Clinical Medicine, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, China; 2. The Second Affiliated Hospital of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550003, China)

[Funded projects]: This study was supported by the Guizhou Provincial Science and Technology Fund Project [Qiankehe J Zi (2015) No. 2018]; Guizhou Provincial Administration of Traditional Chinese Medicine Scientific and Technological Research Project of Traditional Chinese Medicine and Ethnic Medicine (QZYY-2015-2019); Guizhou Provincial Health Commission Science and Technology Fund Project (gzwkj2024-288)

[Author]: SI Weiqun, E-mail: weiqunsi@163.com.

[Correspondence to]: XU Jing, Associate Professor, E-mail: honorxu@163.com.

Received: 2024-09-12 **Revised:** 2024-12-25

JHMu, 2026;32(4):281-288

[基金项目] 贵州省科学技术基金项目[黔科合 J 字(2015)2018 号]; 贵州省中医药管理局中医药、民族医药科学技术研究项目(QZYY-2015-2019); 贵州省卫生健康委科学技术基金项目(gzwkj2024-288)

[作者简介] 司维群, E-mail: weiqunsi@163.com。

[通讯作者] 徐静, 副教授, E-mail: honorxu@163.com。

[收稿日期] 2024-09-12 **[修回日期]** 2024-12-25 **网络出版时间:** 2025-01-08 09:07:57

View from specialist: It is creative, and of certain scientific and educational value.

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of total flavonoids of *Houttuynia cordata* on Bel-7402/ADM cells and the mechanism of possible reversal action of multidrug resistance (MDR) in hepatocellular carcinoma by observing the effects of total flavonoids of *Houttuynia cordata* on the expression of MDR cells of human hepatocellular carcinoma, Bel-7402/ADM, and P-glycoprotein (P-gp). **Methods:** CCK-8 assay was used to detect drug resistance and inhibition rate of hepatocellular carcinoma cells; The experiment was divided into the parental group (Bel-7402), the parental adriamycin (ADM) group (Bel-7402+ADM), the drug-resistant group (Bel-7402/ADM), the drug-resistant ADM group (Bel-7402/ADM+ADM), the total flavonoids of *Houttuynia cordata* group (Bel-7402/ADM+ADM+EAT), and the positive control group (Bel-7402/ADM+ADM+VRP), and the amount of ADM accumulation in the cells of each group after the treatment was detected by flow cytometry and fluorescence observation; and the experiments were divided into the parental group (Bel-7402), the drug resistant group (Bel-7402/ADM), the total flavonoid of *Houttuynia cordata* group (Bel-7402/ADM+EAT), and the positive control group (Bel-7402/ADM+VRP), and the expression of P-gp protein in the cells of each group was detected by flow cytometry and immunohistochemistry. **Results:** ADM inhibited the proliferation of both Bel-7402 cells and Bel-7402/ADM cells, but the effect on the proliferation of Bel-7402 cells was larger; The fluorescence results showed that there was no fluorescence in the parental group and a small amount of fluorescence in the drug-resistant group; the fluorescence intensity of the parental ADM group and the drug-resistant ADM group increased and the drug-resistant ADM group was stronger than the parental ADM group; The fluorescence intensity of the total flavonoids of *Houttuynia cordata* group and the positive control group was significantly enhanced compared to that of the parental, the drug-resistant, and the parental ADM groups, and slightly weakened compared to the drug-resistant ADM group; The flow cytometry results showed that the fluorescence intensity of ADM in each group was drug-resistant ADM group > positive control group > parental ADM group > total flavonoids of *Houttuynia cordata* group > drug-resistant group > parental group ($P < 0.05$); The flow cytometry results showed that there was no statistically significant difference in the mean fluorescence intensity (MFI) of P-gp between the parental group and the drug-resistant group ($P = 0.671$), the total flavonoid of *Houttuynia cordata* group and the positive control group were significantly lower than that of the parental group and the drug-resistant group ($P < 0.001$), and there was no statistically significant difference between the total flavonoid of *Houttuynia cordata* group and the positive control group ($P = 0.367$); The immunohistochemistry results showed that the positivity rate of the P-gp protein in the parental group was $(15.34 \pm 2.15)\%$, compared to that of the drug-resistant group $(99.94 \pm 0.02)\%$, the total flavonoid of *Houttuynia cordata* group $(10.45 \pm 0.73)\%$, and the positive control group $(1.08 \pm 0.13)\%$, the differences were all statistically significant ($P < 0.001$). **Conclusion:** The total flavonoids of *Houttuynia cordata* can inhibit the proliferation of Bel-7402/ADM cells and increase intracellular ADM accumulation, thus may enhance the antitumor effect of ADM and reverse the MDR of hepatocellular carcinoma, and the mechanism may be related to the down-regulation of the expression of P-gp.

[Key words] Total flavonoids of *Houttuynia cordata*; Hepatocellular carcinoma; Multidrug resistance; P-gp resistance protein; Adriamycin

原发性肝癌是我国常见的恶性肿瘤之一,根据2022年中国国家癌症中心统计的数据,原发性肝癌在我国的发病率及致死率居于前列^[1],其中肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是最常见的类型。HCC的治疗是多学科参与、多种治疗手段共存的治疗模式,包括肝脏切除及移植、肝脏消融、血管内介入、放疗及化疗、系统性抗肿瘤治疗、中医药治疗等多种手段^[2]。尽管治疗方案有所进展,但肿瘤的复发转移及化疗耐药导致临床疗效欠佳成为中晚期HCC患者的治疗困境。多药耐药(multidrug resistance, MDR)是一个多因素、多向细胞信号共同参与的过程,通过改变MDR基因及其他相关蛋白、降低药物作用浓度、改变药物代谢酶使药物失活、增强DNA修复等机制使肝癌细胞产生MDR,从而导致HCC患者对吉西他滨、奥沙利铂、顺铂、阿霉素(adriamycin, ADM)和5-氟尿嘧啶等化疗药物的应

答失败^[3-5]。P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)是被深入研究的耐药蛋白之一,在肿瘤细胞的耐药机制中扮演重要角色。目前已被证实在临床上常用的抗肿瘤药物包括阿霉素、紫杉醇和长春新碱等药物的耐药机制均与P-gp过表达相关^[6]。现有的逆转MDR的抑制剂缺乏足够的特异性,具有严重不良反应和全身毒性,亟待开发出特异性高、生物利用度高和毒副作用小的新型P-gp抑制剂。

中药的黄酮类成分具有多方面、多途径的抗肿瘤作用,并能通过抑制转运蛋白、诱导凋亡、调节细胞周期、调节肿瘤细胞内氧化应激等机制逆转肿瘤细胞的MDR^[7,8]。鱼腥草(*Houttuynia cordata*)是一种多用途的传统中药材,具有清热解毒、消痈排脓、利尿通淋的功效,现代药理研究表明鱼腥草在乳腺癌、前列腺癌、肝癌中都体现出良好的抗肿瘤作用^[9]。鱼腥草中富含多种黄酮类化合物,因此本研

究拟初步探究鱼腥草总黄酮在逆转肝癌MDR方面的影响及其机制,为鱼腥草的临床应用提供基础理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

人肝癌细胞株 Bel-7402、人肝癌耐药细胞株 Bel-7402/ADM(购于中国科学院上海细胞库)。鱼腥草采自贵阳市百宜乡和遵义市的新浦区鱼腥草种植基地,经贵州中医药大学药学院鉴定为三白草科蕺菜属植物蕺菜的新鲜全草,采用醇提法得到鱼腥草总黄酮提取物(EAT);维拉帕米(verapamil, VRP)(北京索莱宝科技有限公司,批号:SV8440);阿霉素(adriamycin, ADM)(Aladdin,批号:D107159);胰蛋白酶-EDTA消化液(北京索莱宝科技有限公司,批号:T1300);CCK-8法细胞增殖检测试剂盒(江苏凯基生物技术公司,批号:KGA317-1);P-gp抗体(Abcam,ab170904);苏木素染液(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号:ZLI-9610);辣根酶标记山羊抗兔IgG(H+L)(北京中杉金桥,ZB-2301);二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)显色试剂盒(江苏康为世纪生物公司,批号:CW0125)。

恒温水浴锅(上海亚荣生化仪器厂,批号:OSB-2200);旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂,批号:RE-5203);CO₂培养箱(上海一恒科学仪器有限公司,批号:BPN-80CW);倒置荧光显微镜(广州明美光电技术公司,批号:MF53);显微镜(日本OLYMPUS, CX41);全自动酶标仪(北京六一生物有限公司,批号:WD-2102B);热恒温培养箱(山东博科生物有限公司,批号:DHP-9054);洁净工作台(苏州净化设备,批号:SW-CJ-IFD);电热鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司, DHG-9070A);低温高速离心机(常州中捷实验仪器制造公司,批号:TGL-16D);NovoCyte™流式细胞仪(艾森生物有限公司,NovoCyte 2060R)。

1.2 方法

1.2.1 配制黄酮提取物样品溶液 对EAT进行称量,将适量的EAT放入无血清RPMI 1640培养基中溶解,配制浓度为6.4 g/L的母液,使用规格为0.22 μm的滤膜进行过滤,然后将其封存放置于温度为4℃的环境中留存备用。

1.2.2 细胞培养 将Bel-7402及Bel-7402/ADM细胞放置于10 mL含有1%双抗、10%胎牛血清的RPMI 1640培养基中进行培养,其中Bel-7402/ADM细胞培养基中加入1 000 ng/mL ADM维持细胞的耐

药性,在实验前2周将Bel-7402/ADM细胞更换在无ADM的RPMI 1640培养液中进行培养。

1.2.3 ADM对Bel-7402及Bel-7402/ADM细胞增殖的影响 取对数生长期的Bel-7402及Bel-7402/ADM细胞,按每孔 5×10^3 个细胞接种于96孔板中,于37℃、5% CO₂的细胞培养箱中培养。12 h后Bel-7402细胞更换培养液为含0、10、50、100、500、1 000 ng/mL ADM的培养基,Bel-7402/ADM细胞更换培养液为含0、50、100、1000、5 000 ng/mL ADM的培养基后置于培养箱中继续培养,每组设5个复孔。24 h后每孔加入10 μL CCK-8试剂,孵育2 h后,酶标仪于450 nm波长处检测吸光度(OD值)。

1.2.4 CCK-8检测鱼腥草总黄酮对Bel-7402/ADM细胞活力的影响 取对数生长期的Bel-7402/ADM细胞,按每孔 5×10^3 个细胞接种于96孔板中,于37℃、5% CO₂的细胞培养箱中培养,12 h后更换培养液为含0、0.8、1.6、3.2、6.4 g/L鱼腥草总黄酮的培养基,每组设5个复孔。24 h后每孔加入10 μL CCK-8试剂,孵育2 h后,酶标仪于450 nm波长处检测吸光值(A)。计算细胞存活率,细胞存活率= $(A_{\text{实验组}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}}) \times 100\%$ 。

1.2.5 荧光显微镜下观察细胞内ADM的蓄积 确定ADM及鱼腥草总黄酮浓度后,取对数生长期的Bel-7402/ADM细胞按每孔 2×10^6 个细胞接种于培养皿中,待细胞贴壁后分为亲本组(Bel-7402)、耐药组(Bel-7402/ADM)、亲本阿霉素组(Bel-7402+10 ng/mL ADM)、耐药阿霉素组(Bel-7402/ADM+1 000 ng/mL ADM)、鱼腥草总黄酮组(Bel-7402/ADM+1 000 ng/mL ADM+0.8 g/L EAT)、阳性对照组(Bel-7402/ADM+1 000 ng/mL ADM+10 μg/mL VRP)加药处理,作用24 h后加入ADM孵育2 h,在荧光显微镜下观察各组细胞内ADM的荧光强度并拍照。

1.2.6 流式细胞术检测Bel-7402细胞ADM的浓度 按“1.2.5”项细胞分组进行给药,培养24 h后收集细胞,采用流式细胞仪检测上述各组细胞内ADM的平均荧光强度(mean fluorescence intensity, MFI)。

1.2.7 流式细胞术检测细胞表面P-gp的表达 按“1.2.5”项进行铺板,细胞贴壁后分为亲本组(Bel-7402)、耐药组(Bel-7402/ADM)、鱼腥草总黄酮组(Bel-7402/ADM+0.8 g/L EAT)、阳性对照组(Bel-7402/ADM+10 μg/mL VRP)加药处理,作用24 h后收集细胞,采用流式细胞仪检测上述各组细胞内P-gp的MFI。

1.2.8 免疫组化检测鱼腥草总黄酮对 Bel-7402/ADM 细胞表面 P-gp 表达的影响 取对数生长期的 Bel-7402/ADM 细胞按每孔 2×10^6 个细胞接种于培养皿中,待细胞贴壁后分为亲本组(Bel-7402)、耐药组(Bel-7402/ADM)、鱼腥草总黄酮组(Bel-7402/ADM+1 000 ng/mL ADM+0.8 g/L EAT)、阳性对照组(Bel-7402/ADM+1 000 ng/mL ADM+10 μ g/mL VRP)加药处理 24 h。采用 SP 法进行细胞固定、封闭、一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,二抗室温孵育、DAB 显色、苏木素复染拍照。使用 ImageJ 软件处理拍摄的照片,得到每个视野内阳性表达的抗体在视野中所占的阳性率,每个样本最少选取 3 个视野进行统计,计算得到每个样本的平均阳性率。

1.3 统计学处理

实验数据采用 SPSS 26.0 及 Graphpad prism 9.0 软件进行数据统计及图像处理,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组之间定量数值比较采用独立样本 *t* 检验,多组之间定量数值比较采用单因素方差分析,不满足正态分布时采用非参数检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 ADM 对 Bel-7402 及 Bel-7402/ADM 细胞活力的影响

CCK-8 结果显示,10、50、100、500、1 000 ng/mL 的 ADM 对 Bel-7402 细胞有抑制作用,抑制率与药物浓度呈剂量依赖,差异具有统计学意义($P < 0.05$);当 ADM 浓度为 50、100、500、1 000 ng/mL 时,Bel-7402/ADM 细胞活力无明显抑制,差异无统计学意义($P > 0.05$),当 ADM 浓度为 5 000 ng/mL 时,Bel-7402/ADM 细胞活力被明显抑制;结果显示,与 Bel-7402/ADM 细胞相比,ADM 对 Bel-7402 细胞的存活率影响较大,二者差异具有统计学意义($P < 0.001$),见图 1。

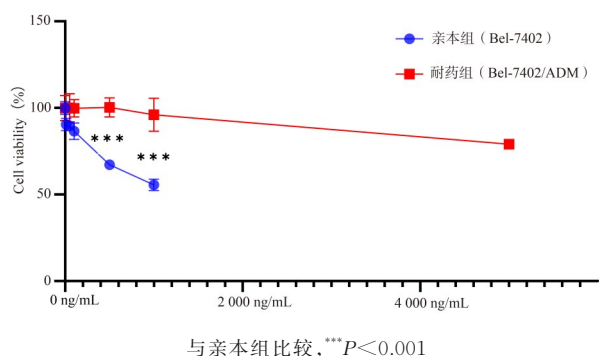


图 1 ADM 对 Bel-7402 及 Bel-7402/ADM 细胞活力的影响

Fig 1 Effects of ADM on Bel-7402 and Bel-7402/ADM cell viability

2.2 鱼腥草总黄酮对 Bel-7402/ADM 细胞活力的影响

CCK-8 结果显示,0.8、1.6、3.2、6.4 g/L 的鱼腥草总黄酮对 Bel-7402/ADM 细胞活力有明显抑制作用,且抑制率与药物浓度成剂量依赖关系,差异具有统计学意义($P < 0.001$),后续实验选择 0.8 g/L 的浓度进行,见表 1。

表 1 鱼腥草总黄酮对 Bel-7402/ADM 细胞活力的影响 ($n=5, \bar{x} \pm s$)

Tab1 Effect of total flavonoids of *Houttuynia cordata* on the viability of Bel-7402/ADM cells ($n=5, \bar{x} \pm s$)

鱼腥草总黄酮浓度(g/L)	细胞存活率(%)
0.0	100.00 \pm 1.51
0.8	90.69 \pm 2.02***
1.6	84.24 \pm 2.62***
3.2	76.23 \pm 2.80***
6.4	67.93 \pm 1.20***

注:与 0 g/L 比较,*** $P < 0.001$ 。

2.3 鱼腥草总黄酮对 Bel-7402/ADM 细胞内 ADM 蓄积的影响

在亲本组中,未观察到发 ADM 的荧光;在耐药组中,可见极少量发 ADM 的荧光;在亲本阿霉素组及耐药阿霉素组中,可见细胞内 ADM 的荧光强度升高,耐药阿霉素组 ADM 的荧光强度明显高于亲本阿霉素组;鱼腥草总黄酮组及阳性对照组中 ADM 的荧光强度较亲本组、耐药组、亲本阿霉素组增强,较耐药阿霉素组减弱,见图 2。

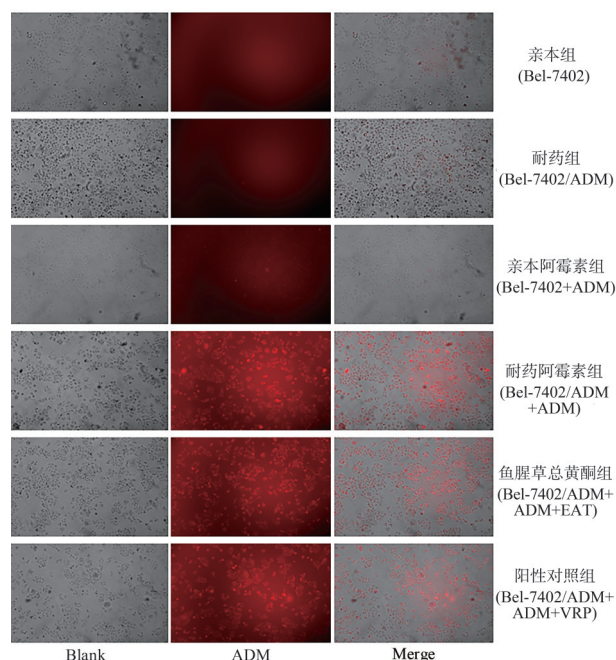


图 2 各组细胞内 ADM 的荧光强度(荧光显微镜,100 \times)

Fig 2 Fluorescence intensity of ADM in each group of cells (fluorescence microscopy, 100 \times)

2.4 流式细胞术检测各组细胞内 ADM 的 MFI

鱼腥草总黄酮组中 ADM 的 MFI 明显高于亲本组和耐药组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.001$), 但低于耐药阿霉素组、亲本阿霉素组及阳性对照组, 差

异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 2。各组中 ADM 的 MFI 为: 耐药阿霉素组 > 阳性对照组 > 亲本阿霉素组 > 鱼腥草总黄酮组 > 耐药组 > 亲本组。

表 2 细胞内 ADM 蓄积的 MFI ($n=3, \bar{x} \pm s$)
Tab 2 MFI for intracellular ADM accumulation ($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	浓度	ADM 平均荧光强度 (MFI)
亲本组 (Bel-7402)	0	3 710.33 ± 50.64 ^{cef}
耐药组 (Bel-7402/ADM)	0	3 756.67 ± 32.62 ^{cef}
亲本阿霉素组 (Bel-7402+ADM)	10 ng/mL ADM	9 069.67 ± 67.30 ^{abeg}
耐药阿霉素组 (Bel-7402/ADM+ADM)	1 000 ng/mL ADM	11 846.30 ± 49.80 ^{abef}
鱼腥草总黄酮组 (Bel-7402/ADM+ADM+EAT)	1 000 ng/mL ADM + 0.8 g/L EAT	8 893.33 ± 15.31 ^{abde}
阳性对照组 (Bel-7402/ADM+ADM+VRP)	1 000 ng/mL ADM + 10 μg/mL VRP	10 278.7 ± 62.30 ^{abcef}

注: 与亲本组比较, ^a $P < 0.001$; 与耐药组比较, ^b $P < 0.001$; 与亲本阿霉素组比较, ^c $P < 0.001$, ^d $P < 0.05$; 与耐药阿霉素组比较, ^e $P < 0.001$; 与鱼腥草总黄酮组相比, ^f $P < 0.001$, ^g $P < 0.05$ 。

2.5 流式细胞术检测细胞表面 P-gp 蛋白的 MFI

亲本组与耐药组中 P-gp 的 MFI 差异无统计学意义 ($P = 0.671$); 鱼腥草总黄酮组及阳性对照组中 P-gp 的 MFI 明显低于亲本组及耐药组, 差异具有统

计学意义 ($P < 0.001$), 但鱼腥草总黄酮组中 P-gp 的 MFI 与阳性对照组相比, 差异无统计学意义 ($P = 0.367$), 见表 3。

表 3 细胞表面 P-gp 蛋白的 MFI ($n=3, \bar{x} \pm s$)
Tab 3 MFI of cell surface P-gp proteins ($n=3, \bar{x} \pm s$)

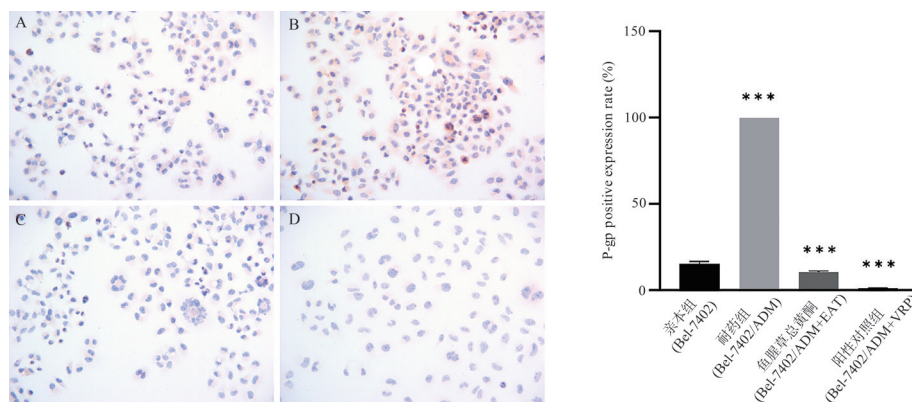
组别	浓度	P-gp 平均荧光强度 (MFI)
亲本组 (Bel-7402)	0	4 630.33 ± 334.82
耐药组 (Bel-7402/ADM)	0	4 746.67 ± 530.34
鱼腥草总黄酮 (Bel-7402/ADM+EAT)	0.8 g/L EAT	774.00 ± 11.36 ^{***###}
阳性对照组 (Bel-7402/ADM+VRP)	10 μg/mL VRP	522.33 ± 151.67 ^{***###}

注: 与亲本组比较, ^{***} $P < 0.001$, 与耐药组比较, ^{###} $P < 0.001$ 。

2.6 免疫组化检测鱼腥草总黄酮对细胞表面 P-gp 蛋白的影响

亲本组 P-gp 蛋白的阳性率为 (15.34 ± 2.15)%, 明显低于耐药组 (99.94 ± 0.02)%, 差异具有统计学意义 ($P < 0.001$); 明显高于鱼腥草总黄酮组 (10.45 ± 0.73)% 及阳性对照组 (1.08 ± 0.13)%, 差

异具有统计学意义 ($P < 0.001$)。P-gp 在亲本组中可见少量的 P-gp 表达; 在耐药组中, 可见 P-gp 的表达明显增加; 鱼腥草总黄酮组中, 可见 P-gp 的表达较耐药组明显下降, 但较阳性对照组稍高, 各组 P-gp 阳性率: 耐药组 > 亲本组 > 鱼腥草总黄酮组 > 阳性对照组, 见图 3A~D。



A: 亲本组; B: 耐药组; C: 鱼腥草总黄酮组; D: 阳性对照组; 与亲本组比较, ^{***} $P < 0.001$

图 3 免疫组化检测细胞表面 P-gp 蛋白的表达及阳性率 (200×)

Fig 3 P-gp protein expression on the surface of cells and positivity rate detected by immunohistochemistry (200×)

3 讨论

HCC是全球范围内常见的消化系统恶性肿瘤之一,也是世界上第3大与癌症相关的死亡原因。近年来HCC在免疫及靶向治疗方面取得了重大进展,但化疗仍然是中晚期肝癌患者综合治疗的重要方式之一。肝癌细胞的分子异质性可促进化疗或靶向治疗的耐药性,甚至导致MDR,这是临床化疗的主要障碍。ADM是一种高效的蒽环类抗肿瘤抗生素,可抑制DNA复制和RNA转录过程,对各种生长周期的肿瘤细胞都有强烈杀伤作用,是临床常用的广谱化疗药^[10],早在20世纪70年代就有临床研究显示ADM可用于治疗晚期肝癌^[11],ADM因此一度成为肝癌的标准治疗方案,但ADM的耐药性和安全性限制了其在临床上的应用。MDR是肿瘤细胞抵抗化疗药物的防御机制,通过各种复杂机制降低癌细胞对化疗药物的敏感性,从而降低化疗疗效甚至导致化疗失败^[12-14],因此可通过抑制或逃避MDR的机制来提高化疗的疗效。为了评估ADM对肝癌亲本细胞及耐药细胞活力的影响,选用Bel-7402细胞经过ADM长期诱导建立的多药耐药细胞株Bel-7402/ADM进行研究。结果显示,与亲本细胞相比,ADM对于耐药细胞毒性较低,从而增强了Bel-7402/ADM细胞的活力。本研究从体外基础实验验证ADM在肝癌中存在明显耐药现象,长期应用ADM会导致肝癌细胞对药物产生抗性,通过抑制ADM耐药可以有效提高ADM类细胞毒性药物疗效。

天然产物在治疗肿瘤和逆转多药耐药方面具有巨大潜力,中药低毒、高效和多组分、多靶点、多阶段性作用的优势在肿瘤MDR逆转方法的研究中逐步受到重视,可以针对肿瘤MDR的多种机制进行有效的逆转,有望成为新型MDR逆转剂的来源,各类中药的提取物在逆转肝癌耐药机制方面已有大量研究^[15-18]。鱼腥草作为多年生草本植物在我国广泛分布,其生长环境具有多样性,具有重要的药用及食用价值,鱼腥草总黄酮是鱼腥草中的重要化合物,具有抑制肿瘤细胞增殖、迁移的抗肿瘤能力^[19,20],本课题组前期研究发现,鱼腥草总黄酮可抑制Bel-7402细胞的增殖并促进肝癌细胞凋亡^[21]。基于此本研究主要探究了鱼腥草总黄酮对于Bel-7402/ADM细胞耐药性的影响,研究结果显示,鱼腥草总黄酮对Bel-7402/ADM细胞的增殖表现出抑制作用。MDR产生后细胞内药物的浓度会相应降低,从而影响化疗疗效。为进一步探究鱼腥草总黄酮是否能影响耐药细胞内ADM的蓄积,本研究通过荧光显微镜观察及流式细胞术检测了各组细

胞内ADM的蓄积情况,结果显示,亲本阿霉素组细胞内中ADM蓄积较亲本组及耐药组增加,在给予一定浓度鱼腥草总黄酮处理后,ADM的发光强度明显升高,这与流式细胞术结果一致,在亲本组和耐药组细胞中ADM的MFI较低,鱼腥草总黄酮作用于耐药细胞后,细胞内ADM的MFI明显增加,但与耐药阿霉素组及阳性对照组比较偏低,其原因可能与耐药阿霉素组加入的ADM浓度偏高所致。该实验证实了鱼腥草总黄酮可增加ADM在肝癌细胞中的蓄积,但作用效果稍弱于VRP,这表明鱼腥草总黄酮可以增加ADM类细胞毒性药物在肝癌耐药细胞中的聚集克制ADM的耐药性,并有可能成为抑制肝癌细胞ADM耐药的有效药物。

MDR发生的机制主要与ATP结合盒转运体的过度表达有关,P-gp是膜相关的ATP依赖性转运蛋白,具有将毒素和药物等外源性物质泵出细胞的能力,从而引发肿瘤细胞耐药现象^[22,23]。迄今为止已针对P-gp蛋白研发了三代P-gp抑制剂,由于其固有的毒性和药代动力学问题,这些P-gp抑制剂药物的特异性及安全性难以控制^[24],这也限制了P-gp抑制剂在临床中的应用,因此亟待开发出特异性高、生物利用度高和毒副作用小的新型P-gp抑制剂。目前研究发现多种中药成分可通过调节P-gp蛋白表达降低肿瘤细胞对化疗药物的耐药性^[25,26]。为了探究鱼腥草总黄酮是否也具有逆转MDR的作用及其逆转MDR的机制是否与P-gp蛋白相关,本研究通过流式细胞术及免疫组化法检测了P-gp蛋白在Bel-7402/ADM细胞中的表达情况。研究结果显示,P-gp在正常Bel-7402细胞中也有表达,但在Bel-7402/ADM细胞中高表达,鱼腥草总黄酮作用于Bel-7402/ADM细胞后,P-gp的表达下调,但作用效果弱于VRP,该研究结果证实Bel-7402/ADM细胞的耐药性与P-gp耐药蛋白过度表达相关,鱼腥草总黄酮逆转肝癌细胞MDR的机制可能通过下调P-gp的表达实现。

综上所述,鱼腥草总黄酮可抑制ADM耐药的肝癌细胞增殖并逆转肝癌MDR的过程,其机制可能与下调P-gp耐药蛋白的表达相关。但鱼腥草总黄酮调控P-gp蛋白的具体作用机制尚未明确,鱼腥草总黄酮对于其他耐药相关蛋白、酶、基因的调控是否具有相同作用也有待进一步研究,且肿瘤细胞在生物体内外其增殖特性存在较大差异,因此后续可继续开展体内外实验深入研究,全面揭示鱼腥草总黄酮逆转MDR的机制,为鱼腥草的临床应用提供更多理论依据,同时充分开发黔产中药资源的应用价值。

作者贡献度说明:

司维群: 实验数据采集、文献查阅、论文撰写修改; 刘静、吴佳龙: 数据整理分析、论文修改; 张琳、蔡晓菁: 协助实验数据采集并分析; 徐静: 实验研究指导、经费支持、论文修改。

所有作者声明不存在利益冲突关系。

参考文献

- 1 郑荣寿, 陈茹, 韩冰峰, 等. 2022年中国恶性肿瘤流行情况分析[J]. 中华肿瘤杂志, 2024, 46(3): 221-231.
Zheng RS, Chen R, Han BF, et al. Cancer incidence and mortality in China, 2022[J]. Chin J Oncol, 2024, 46(3): 221-231.
- 2 Vogel A, Meyer T, Sapisochin G, et al. Hepatocellular carcinoma[J]. Lancet, 2022, 400(10360): 1345-1362.
- 3 Tang Z, He J, Zou J, et al. Cisplatin-resistant HepG2 cell-derived exosomes transfer cisplatin resistance to cisplatin-sensitive cells in HCC [J]. PeerJ, 2021, 9: e11200.
- 4 Duan B, Huang C, Bai J, et al. Multidrug resistance in hepatocellular carcinoma [M]. Brisbane (AU): Codon Publications, 2019.
- 5 孙瑾瑜, 刘亨晶, 汪泳, 等. ABCB1与肝细胞癌多药耐药的研究进展[J]. 实用肿瘤杂志, 2020, 35(6): 574-578.
Sun JY, Liu HJ, Wang Y, et al. Progress of ABCB1 and multidrug resistance in hepatocellular carcinoma [J]. J Pract Oncol, 2020, 35(6): 574-578.
- 6 Dong J, Qin Z, Zhang WD, et al. Medicinal chemistry strategies to discover P-glycoprotein inhibitors: An update [J]. Drug Resist Updat, 2020, 49: 100681.
- 7 曹晓孚, 孟路华, 闫春章. 黄酮类化合物逆转肿瘤多药耐药的研究进展[J]. 中国医院药学杂志, 2018, 38(5): 570-574.
Cao XF, Meng LH, Yan CZ. Research progress on reversion of multidrug resistance in tumor by flavonoids [J]. Chin J Hospital Pharm, 2018, 38(5): 570-574.
- 8 张燕燕, 陈月桥, 裴浩, 等. 中药黄酮类成分抗肝癌作用机制的研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2025, 43(7): 121-125.
Zhang YY, Chen YQ, Pei H, et al. Research progress on anti liver cancer mechanism of flavonoids in traditional Chinese medicine [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2025, 43(7): 121-125.
- 9 王连睿, 东红阳, 苗明三. 鱼腥草的研究进展及其质量标志物的预测分析[J]. 中药新药与临床药理, 2024, 35(7): 1084-1092.
Wang LR, Dong HY, Miao MS. Research progress on *Houttuynia cordata* and predictive analysis of its quality markers [J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol, 2024, 35(7): 1084-1092.
- 10 Jin Y, Wang H, Zhu Y, et al. miR-199a-5p is involved in doxorubicin resistance of non-small cell lung cancer (NSCLC) cells [J]. Eur J Pharmacol, 2020, 878: 173105.
- 11 Falkson G, Moertel CG, Lavin P, et al. Chemotherapy studies in primary liver cancer: A prospective randomized clinical trial [J]. Cancer, 1978, 42(5): 2149-2156.
- 12 Dhanyamraju PK. Drug resistance mechanisms in cancers: Execution of pro-survival strategies [J]. J Biomed Res, 2024, 38(2): 95-121.
- 13 Haider T, Pandey V, Banjare N, et al. Drug resistance in cancer: Mechanisms and tackling strategies [J]. Pharmacol Rep, 2020, 72(5): 1125-1151.
- 14 Bukowski K, Kciuk M, Kontek R. Mechanisms of multi-drug resistance in cancer chemotherapy [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(9): 3233.
- 15 李海燕, 栗昭生, 赵龙, 等. 异钩藤碱调节EGFR/FAK信号通路对肝癌细胞增殖、迁移和5-FU耐药性的影响 [J]. 药物评价研究, 2024, 47(6): 1267-1274.
Li HY, Li ZS, Zhao L, et al. Effects of isorhynchophylline on proliferation, migration, and 5-FU resistance of liver cancer cells by regulating EGFR/FAK signaling pathway [J]. Drug Eval Res, 2024, 47(6): 1267-1274.
- 16 姜珊珊, 曹辰瑀, 唐菲燕, 等. 白花丹醌协同阿霉素克服肝癌耐药作用研究 [J]. 特产研究, 2025, 47(6): 86-91.
Jiang SS, Cao CY, Tang FY, et al. Synergistic effect of plumbagin and doxorubicin in overcoming drug resistance of hepatocellular carcinoma [J]. Spec Wild Econ Ani Plant Res, 2025, 47(6): 86-91.
- 17 陈永芳, 李艳珂, 张淑静. 茯苓多糖通过LncRNA HCG11/miR-539-3p调控肝癌细胞自噬、化疗耐药的机制 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(22): 322-330.
Chen YF, Li YK, Zhang SJ. Mechanism of *Poria cocos* polysaccharide regulating autophagy and chemotherapy resistance of hepatocellular carcinoma cells through LncRNA HCG11/miR-539-3p [J]. Sci Technol Food Indust, 2024, 45(22): 322-330.
- 18 Guo Q, Cao H, Qi X, et al. Research progress in reversal of tumor multi-drug resistance via natural products [J]. Anticancer Agents Med Chem, 2017, 17(11): 1466-1476.
- 19 武雪莹, 丁倩云, 刘静, 等. 鱼腥草化学成分、药理及质量控制研究进展 [J]. 药物分析杂志, 2022, 42(1): 108-120.
Wu YX, Ding QY, Liu J, et al. Research progress on chemical components, pharmacology and quality control of *Houttuyniae Herba* [J]. Chin J Pharm Anal, 2022, 42

- (1): 108-120.
- 20 陈光华, 魏莹, 舒波. 鱼腥草总黄酮调控 PI3K/Akt 信号通路诱导人乳腺癌细胞株 MCF-7 凋亡的实验研究[J]. 中国医院药学杂志, 2020, 40(4): 391-396.
Chen GH, Wei Y, Shu B. Effect of total flavonoids of *Houttuynia* on apoptosis of human breast cancer cells MCF-7 induced by PI3K/Akt signaling pathway [J]. Chin J Hospital Pharm, 2020, 40(4): 391-396.
- 21 徐静, 朱国庆, 周义浪, 等. 鱼腥草总黄酮化合物对人肝癌细胞 BEL-7402 生长的影响分析[J]. 医药前沿, 2020, 10(3): 141-142.
Xu J, Zhu GQ, Zhou YL, et al. Effect of *Houttuynia cordata* total flavonoids on the growth of human hepatocellular carcinoma cells BEL-7402 [J]. Frontiers Med, 2020, 10(3): 141-142.
- 22 Skinner KT, Palkar AM, Hong AL. Genetics of *ABC1* in cancer [J]. Cancers (Basel), 2023, 15(17): 4236.
- 23 Wada M. Role of ABC transporters in cancer development and malignant alteration [J]. Yakugaku Zasshi, 2022, 142(11): 1201-1225.
- 24 Zhao X, Di J, Luo D, et al. Recent developments of P-glycoprotein inhibitors and its structure-activity relationship (SAR) studies [J]. Bioorg Chem, 2024, 143: 106997.
- 25 夏黄帅, 余卓伦, 张其海, 等. 没药甾酮下调 PXR/P-gp 通路逆转肝癌化疗耐药机制 [J]. 中国药理学通报, 2022, 38(5): 684-691.
Xia HS, Yu ZL, Zhang QH, et al. Z-guggulsterone reversed multi-drug resistance of hepatocarcinoma chemotherapy through down-regulating a PXR/P-gp pathway [J]. Chin Pharmacol Bull, 2022, 38(5): 684-691.
- 26 廖俊, 张彩灵, 黄赞松, 等. 苦参素及 Mir-181a 对人肝癌细胞耐药株 HepG2/ADM 裸鼠移植瘤中耐药蛋白 P-gp 的影响 [J]. 右江民族医学院学报, 2020, 42(1): 1-6.
Liao J, Zhang CL, Huang ZS, et al. Effects of oxymatrine and Mir-181a on drug-resistant protein P-gp in nude mice with xenografts of human hepatocellular carcinoma drug-resistant cell line HepG2/ADM [J]. J Youjiang Med Univ National, 2020, 42(1): 1-6.

[本文编辑] 陈思润