基础研究 DOI：10.13406/j.cnki.cyxb.003745

醋柴胡多糖联用奥沙利铂增效活性及机制研究

韩明慧[1]，王小双[2]，赵　亚[2]，吴亚运[3]，刘丽娟[1]，赵瑞芝[1]
（1.广州中医药大学第二附属医院省部共建中医湿证重点实验室，广州　510006；
2.广州中医药大学第二临床医学院，广州　510006；3.广东省中医证候临床研究重点实验室，广州　510006）

【摘　要】目的：探讨醋柴胡多糖联用奥沙利铂（oxaliplatin，OXA）增效活性及机制，为临床治疗原发肝细胞癌提供新的思路。**方法：**噻唑蓝（methyl thiazolyl tetrazolium，MTT）法检测醋制柴胡多糖 3-4（vinegar baked radix bupleurum polysaccharides 3-4，VBCP 3-4）、醋制柴胡多糖 3-3（vinegar baked radix bupleurum polysaccharides 3-3，VBCP 3-3）联用 OXA 对 Huh7 细胞的细胞杀伤作用；电感耦合等离子体质谱（inductively coupled plasma mass spectrometry，ICP-MS）检测 Huh7 细胞对 OXA 的摄取率，评价醋柴胡多糖 VBCP 3-4 联用 OXA 的体外增效途径；蛋白印迹法测定 Huh7 相关转运蛋白的表达，探讨 VBCP 3-4 联用 OXA 的增效机制。**结果：**VBCP 3-4、VBCP 3-3 能够增加 OXA 对细胞的生长抑制作用。VBCP 3-4 能够促进 Huh7 细胞对 OXA 的摄取，摄取率在 4 h 达到峰值，高、低剂量联用组增加摄取率为：分别 43.43%（P=0.000）和 29.02%（P=0.000）。OXA 低、高剂量组单独作用 Huh7 细胞，能够促进细胞多药耐药相关蛋白（multidrug resistance-associated protein，MRP）2 和 MRP1 蛋白表达，MRP2 蛋白的上调幅度为 18.11%、25.00%（P=0.008、P=0.001），MRP1 蛋白的上调幅度为 28.51%（P>0.05）、39.70%（P=0.015）。VBCP 3-4 联用 OXA 后，MRP2、MRP1 及乳腺癌耐药蛋白（breast cancer resistance protein，BCRP）蛋白表达受到抑制，联用高、低剂量组 MRP2 降低幅度分别为 47.38%、15.18%（P=0.000、P=0.049），MRP1 蛋白降低幅度分别为 64.96%、34.63%（P=0.000、P=0.000），联用高剂量组 BCRP 蛋白表达降低幅度为 29.00%（P=0.020）；VBCP 3-4 单独作用 Huh7 细胞后，能够明显降低 MRP2、MRP1 及 BCRP 蛋白表达，VBCP 3-4 高剂量组下调 MRP2、MRP1 幅度为 24.91%、20.79%（P=0.004、P=0.005）。VBCP3-4 下调 BCRP 蛋白的表达，高、中剂量下调幅度分别为 15.02%、13.92%（P=0.003、P=0.030）。**结论：**醋柴胡多糖 VBCP3-4 通过抑制外排型转运蛋白 MRP1、MRP2、BCRP 表达，促进 Huh7 细胞摄入 OXA，提高胞内有效浓度实现增效作用。

【关键词】醋柴胡多糖；奥沙利铂；联用增效；抗肿瘤
【中图分类号】R285　　**【文献标志码】**A　　**【收稿日期】**2024-04-17

Synergistic activity and mechanism of vinegar baked radix bupleurum polysaccharides in combination with oxaliplatin

Han Minghui[1]，Wang Xiaoshuang[2]，Zhao Ya[2]，Wu Yayun[3]，Liu Lijuan[1]，Zhao Ruizhi[1]
（*1. State Key Laboratory of Dampness Syndrome of Chinese Medicine，The Second Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine；2. The Second Clinical Medical College of Guangzhou University of Chinese Medicine；3.Guangdong Provincial Key Laboratory of Clinical Research on Traditional Chinese Medicine Syndrome*）

【Abstract】*Objective*： To investigate the synergistic activity and mechanism of vinegar baked radix bupleurum polysaccharides（VBCP）in combination with oxaliplatin（OXA），and to provide new ideas for the clinical treatment of primary hepatocellular carcinoma. ***Methods*：** MTT assay was used to detect the cytotoxic effect of VBCP 3-4 and VBCP 3-3 in combination with OXA on Huh7 cells；ICP-MS was used to measure the uptake rate of OXA by Huh7 cells and evaluate the *in vitro* synergistic pathway of VBCP 3-4 in combination with OXA；Western blotting was used to measure the expression levels of related transporter proteins in Huh7 cells and explore the synergistic mechanism of VBCP 3-4 in combination with OXA. ***Results*：** VBCP 3-4 and VBCP 3-3 enhanced the inhibitory effect of OXA on the growth of cells. VBCP 3-4 promoted the uptake of OXA by Huh7 cells，with the peak uptake rate at 4 hours，and the uptake rate was increased to 43.43% in the high-dose combination group（P=0.000）and 29.02% in the low-dose combination group（P=0.000）. Acting on Huh7 cells，the low- and high-dose OXA alone could promote the protein expression levels of MRP2

作者介绍：韩明慧，Email：h13544555760@163.com，研究方向：中药多糖药理活性研究。
通信作者：赵瑞芝，Email：13610241754@163.com。
基金项目：国家自然科学基金资助项目（编号：82173981，82074086）；广东省科技计划资助项目（编号：2023B1212060063，2021A1515110846）。
优先出版：https://link.cnki.net/urlid/50.1046.R.20250122.0910.004（2025-01-22）

and MRP1 in Huh7 cells, and the protein expression level of multidrug resistance-associated protein (MRP) 2 was upregulated to 18.11% and 25.00%, respectively (P=0.008, P=0.001), while that of MRP1 was upregulated to 28.51% (P>0.05) and 39.70% (P=0.015), respectively. After the combination of VBCP 3-4 and OXA, the protein expression of MRP2, MRP1, and breast cancer resistance protein (BCRP) was inhibited; MRP2 was reduced by 47.38% in the high-dose combination group (P=0.000) and 15.18% in the low-dose combination group (P=0.049); MRP1 was reduced by 64.96% in the high-dose combination group (P=0.000) and 34.63% in the low-dose combination group (P=0.000); BCRP was reduced by 29.00% (P=0.020) in the high-dose combination group. Acting on Huh7 cells alone, VBCP 3-4 significantly reduced the protein expression levels of MRP2, MRP1, and BCRP, and in the high-dose VBCP 3-4 group, MRP2 and MRP1 were reduced by 24.91% and 20.79%, respectively (P=0.004, P=0.005). VBCP 3-4 downregulated the protein expression level of BCRP by 15.02% in the high-dose group (P=0.003) and 13.92% in the middle-dose group (P=0.030). ***Conclusion***: VBCP 3-4 exerts a synergistic effect by inhibiting the expression of the efflux transporter proteins MRP1, MRP2, and BCRP, promoting the intake of OXA by Huh7 cells, and increasing the intracellular effective concentration.

【Key words】vinegar-processed *Bupleurum chinense* polysaccharides; OXA; synergistic effect; antitumor effect

肝癌为全球第六大癌症，其中肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)在原发性肝癌的占比高达75%，严重威胁人类生命健康[1]。由于HCC潜伏期长，导致患者常被发现于中晚期，失去手术介入治疗的机会，因此化疗仍是治疗HCC的重要手段之一[2]。然而，化学药物作用缺乏靶向性，巨大毒副作用常导致患者不能耐受而放弃治疗，因此提高药物对癌细胞靶向选择对癌症的治疗至关重要[3-4]。奥沙利铂(oxaliplatin, OXA)是晚期HCC的一线治疗药物，被广泛应用于晚期HCC患者的治疗中，但多耐药性和毒副作用限制了其在HCC治疗作用[5]。

醋柴胡为肝经引经药，其引经作用被历代医家验证[6]。现代研究认为醋柴胡引经作用与影响药物在肝脏内蓄积有关。研究表明[7]醋柴胡可促进索拉非尼在小鼠肝脏中的积累。本课题组研究发现，醋柴胡能够促进大黄酸、氧化苦参碱、龙胆苦苷等药物在肝组织分布，同时能够降低其他组织药物含量，促进药物肝靶向性[8-9]。醋柴胡多糖部位可能是发挥肝靶向增效的主要活性物质，其对细胞膜转运功能的影响可能是靶向增效的关键机制之一[10-11]。因此，本文从转运蛋白角度探讨醋柴胡多糖与OXA联合用药增效机制，以期为临床治疗HCC提供基础。

1 材料与方法

1.1 细胞与试剂

Huh7细胞株由国家典藏中心提供（武汉大学）、DMEM完全培养基（Gibco，6123209）、胎牛血清（赛尔博克斯生物制品（香港）贸易有限公司，AUS-01S-02）、奥沙利铂注射液（恒瑞医药有限公司，220923BA）、多药耐药相关蛋白-2(multidrug resistance-associated protein 2, MRP2)抗体（Cohesion，CPA1247）、乳腺癌耐药蛋白(breast cancer resistance protein, BCRP)抗体（abcam，GR3229567-8）、Anti-Rabbit IgG H&L（abcam，GR3299244-6）、重组多药耐药相关蛋白-1(multidrug resistance-associated protein 1, MRP1)抗体（abcam，GR3296069-1）、有机阳离子转运蛋白2(organic cation transporter 2, OCT2)抗体（Cohesion，CPA1913）、β-肌动蛋白(beta-actin, β-Actin)抗体（Proteintech，81115-1-RR）、牛血清蛋白（广州威佳科技有限公司，180728）、Western及IP细胞裂解液（碧云天生物，032123230418）

1.2 主要仪器

通用高电流电泳仪（BIO-RAD，美国）、微型离心机（6K，珠海黑马医学仪器有限公司）、高灵敏度化学发光成像仪（BIO-RAD，美国）、酶标仪（Infinite M1000Pro，瑞士）、电感耦合等离子体质谱(inductively coupled plasma mass spectrometry, ICP-MS)8800ICP-MS，美国Agilent公司）、生物安全柜（HR40-ⅡA2，青岛海尔特种电器有限公司）、CO_2培养箱（WCI-180，维根技术有限公司）

1.3 醋柴胡多提取分离及纯化

醋柴胡药材粉碎，经醇提、水提醇沉、真空冷冻干燥、有机试剂冲洗除杂、Sevag法除蛋白及膜分离系统截流后，得到不同分子量段的醋柴胡多糖，使用DEAE-52纤维素阴离子交换层析柱进行分离纯化，最终得到不同类型的醋柴胡均一多糖，VBCP 3-4为10-100 kDa部位，0.4 M氯化钠洗脱获取的多糖；VBCP 3-3为10-100 kDa部位，0.2 M氯化钠洗脱获取的多糖。

1.4 OXA、VBCP 3-4及VBCP 3-3对Huh7细胞细增殖抑制作用

Huh7细胞以5×10^3 cells/孔种于96孔板，设置空白组、给药组，孵育48 h，每孔加20 μL MTT溶液(5 mg/mL)，避光孵育4 h。弃孔内上清，每孔加入150 μL的DMSO，振荡1 min，490 nm波长处测定吸光度值(absorbance, A)，计算各组抑制率。OXA给药组：OXA浓度设置为0、0.19、0.39、0.78、1.56、

3.12、6.25、12.50、25、50 μg/mL。VBCP 3-4、VBCP 3-3 多糖给药组：多糖浓度设置为 0、0.98、1.95、3.91、7.81、15.62、31.25、62.50、125、250 μg/mL。

1.5 噻唑蓝（methyl thiazolyl tetrazolium，MTT）法检 VBCP 3-4、VBCP 3-3 联合 OXA 对 Huh7 细胞的抑制作用

Huh7 细胞以 5×10^3 cells/孔种于 96 孔板，设置空白组、OXA 单用组、联用组，孵育 48 h，每孔加 20 μL MTT 溶液（5 mg/mL），避光孵育 4 h。弃孔内上清，每孔加入 150 μL 的 DMSO，振荡 1 min，490 nm 波长处测定 A 值，计算各组抑制率，使用 CompuSyn 软件计算联用指数（combination index，CI）。CI 指数<1 为协同增效作用，CI 指数≥1 则无协同增效作用[12]。联用组：OXA 与 VBCP 3-4 联用比例为 1∶5，OXA 终浓度为：0.78、1.56、3.12、6.25、12.50 μg/mL，相应 VBCP 3-4 终浓度为：3.90、7.81、15.62、31.2、62.50 μg/mL；OXA 与 VBCP 3-3 联用比例为 1∶5，OXA 终浓度为：0.20、1.56、3.12、6.25、12.50 μg/mL，相应 VBCP 3-4 终浓度为：0.98、7.81、15.62、31.2、62.50 μg/mL。单用组：OXA、VBCP 3-4、VBCP 3-3 浓度设置分别为联用组别中相应浓度。

1.6 VBCP 3-4 对 OXA 细胞摄取影响

1.6.1 ICP-MS 方法学考察 收取空白细胞，加入 OXA 标准溶液置于消解管中，制备低（0.97 ng/mL）、中（3.90 ng/mL）、高（15.81 ng/mL）浓度质控样品，加入 5 mL 浓硝酸室温静置 1 h，盖上密封盖，置于微波消解仪中消解，后续进行除酸，使用 2% 硝酸定容至 10 mL，混匀，上机进行准确度、精密度、精密度、回收率、专属性及稳定性方法学考察。

ICP-MS 具体参数如下：ICP-MS 载气氩气（纯度为 99.99%），八极杆 RF：160 V，氦气流速：5 mL/min，Q1 偏转电压：-4 V，Q1 预过滤偏转电压：-38 V，偏转电压：-38 V，蠕动泵转速：0.5 rps，提取透镜 2：-200 V，Omega 偏转电压：-100 V，Omega 透镜电压：9.8 V，能量歧视：5 V[13]。

1.6.2 细胞给药及 OXA 含量检测 Huh7 细胞以 5×10^6 个/孔种于皿中，待细胞长至 80%~90% 进行给药，设置 OXA 单用高剂量组（6.25 μg/mL）、OXA 单用低剂量组（3.12 μg/mL）、联用高剂量组（多糖与 OXA 浓度分别为 31.25、6.25 μg/mL）、联用低剂量组（多糖与 OXA 浓度分别为 15.62、3.12 μg/mL），分别在 2、4、6、8 h 收取细胞，按照“1.6.1”方法处理样品，检测 Pt 元素的含量。

1.7 免疫印迹实验检测 VBCP 3-4 联用 OXA 对 Huh7 细胞转运蛋白的影响

Huh7 细胞以 3×10^6 个/孔种于 6 孔板，分为空白组、OXA 单用高剂量组（6.25 μg/mL）、OXA 单用低剂量组（3.12 μg/mL）、联用高剂量组（多糖与 OXA 浓度分别为 31.25、6.25 μg/mL）、联用低剂量组（多糖与 OXA 浓度分别为 15.62、3.12 μg/mL），给药 4 h 后，弃去各组孔中上清液，PBS 清洗 2 遍，加入 WB 及 IP 细胞裂解液裂解细胞，蛋白变性后进行免疫印记实验。

1.8 免疫印迹实验检测 VBCP 3-4 对 Huh7 细胞转运蛋白的影响

Huh7 细胞以 3×10^6 个/孔种于 6 孔板，24 h 后给药，设置空白组、VBCP 3-4 高剂量组（40 μg/mL）、中剂量组（20 μg/mL）、低剂量组（10 μg/mL），给药 24 h 后，弃去各组孔中上清液，PBS 清洗 2 遍，加入 WB 及 IP 细胞裂解液裂解细胞，蛋白变性后进行免疫印记实验。

1.9 统计学方法

实验数据用 GraphPad Prism 2021 软件进行，符合正态分布的计量资料用均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示。数据采用单因素方差分析，满足方差齐性采用 LSD 法进行多重比较，方差不齐则用 Dunnett T3 法进行多重比较。非正态分布的计量资料使用四分位数[M_d（P_{25}，P_{75}）]表示。检验水准 α=0.05，以 P<0.05 认为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 VBCP 3-4、VBCP 3-3 基本结构信息

VBCP 3-4、VBCP 3-3 是前期课题组从水提取醋柴胡多糖中分离纯化得到的均一多糖。VBCP 3-4 分子量为 2 105 kDa，由甘露糖、鼠李糖、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖组成，其摩尔百比为 1.26∶5.74∶72.80∶1.88∶3.88∶8.43；VBCP 3-3 分子量为 3 565 kDa 的杂多糖，由甘露糖、鼠李糖、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖和阿拉伯糖组成，其摩尔百分比为 6.21∶6.52∶4.13∶4.06∶23.44∶55.65。

2.2 OXA、VBCP 3-4、VBCP 3-3 对 Huh7 细胞的增殖抑制作用

考察 OXA、VBCP 3-4、VBCP 3-3 单独给药对 Huh7 细胞的增殖抑制作用的影响，以确定合适的联用剂量区间及剂量配比。如图 1A 所示，系列浓度 OXA 作用于 Huh7 细胞后，随着 OXA 浓度的增加，抑制率逐渐增强，OXA 在 50.00 μg/mL 的浓度范围内抑制率在 0.00%~69.04% 之间，其浓度高于 25.00 μg/mL 时，对细胞生长的抑制作用明显增强，因此后续实验选择 12.5 μg/mL 为最高浓度。如图 1B、C 所示，随着浓度的增大，VBCP 3-4、VBCP 3-3 对 Huh7 细胞抑制率逐渐增强，抑制率为 0.00%~25.00%，VBCP 3-4 对 Huh7 细胞的抑制作用稍强于 VBCP 3-3，后续选择最高浓度为 62.5 μg/mL 进行实验。

2.3 VBCP 3-4 联用 OXA 对 Huh7 细胞的增殖抑制作用

由图 2A 可见，空白组 Huh7 细胞增殖正常，而进行 OXA 单独及联合给药后 Huh7 细胞增殖受到抑制，联合给药组抑制效果优于单用组；与 OXA 单用组相比联用组对 Huh7 细胞的抑制率增加，12.500、6.250、3.125 μg/mL 浓度下，OXA 联用组对 Huh7 细胞增殖抑制作用明显高于 OXA 单用组（P=0.000，P=0.000，P=0.000），抑制率增加百分比分别为 45.90%、25.62%、11.79%，见图 2B；由图 2C 可见，系列浓度联用指数 CI<1，提示具有协同增效作用，CI 曲线呈现出剂量依赖性，具体数值见表 1。

2.4 VBCP 3-3 联用 OXA 对 Huh7 细胞的增殖抑制作用

由图 3A 可见，与 OXA 单用组相比联用组对 Huh7 细胞的抑制率增加，12.500、6.250、3.125、1.563 μg/mL 浓度下，

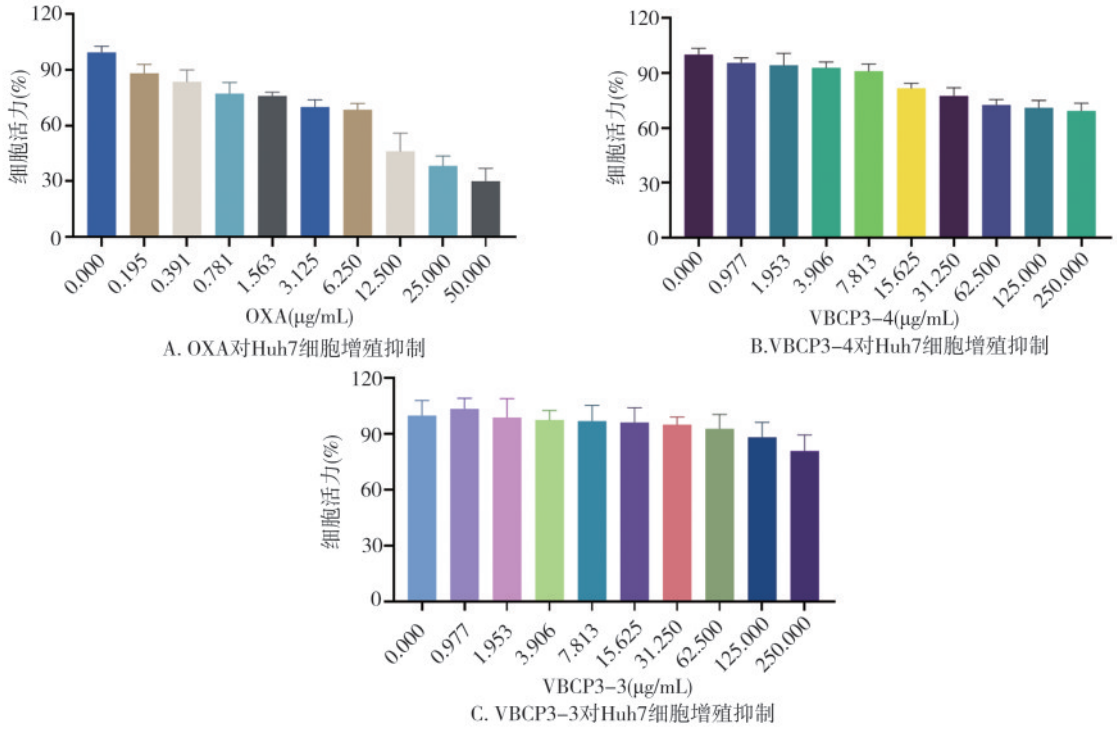


图1　OXA及多糖对Huh7细胞体外增殖的抑制作用（n=6）

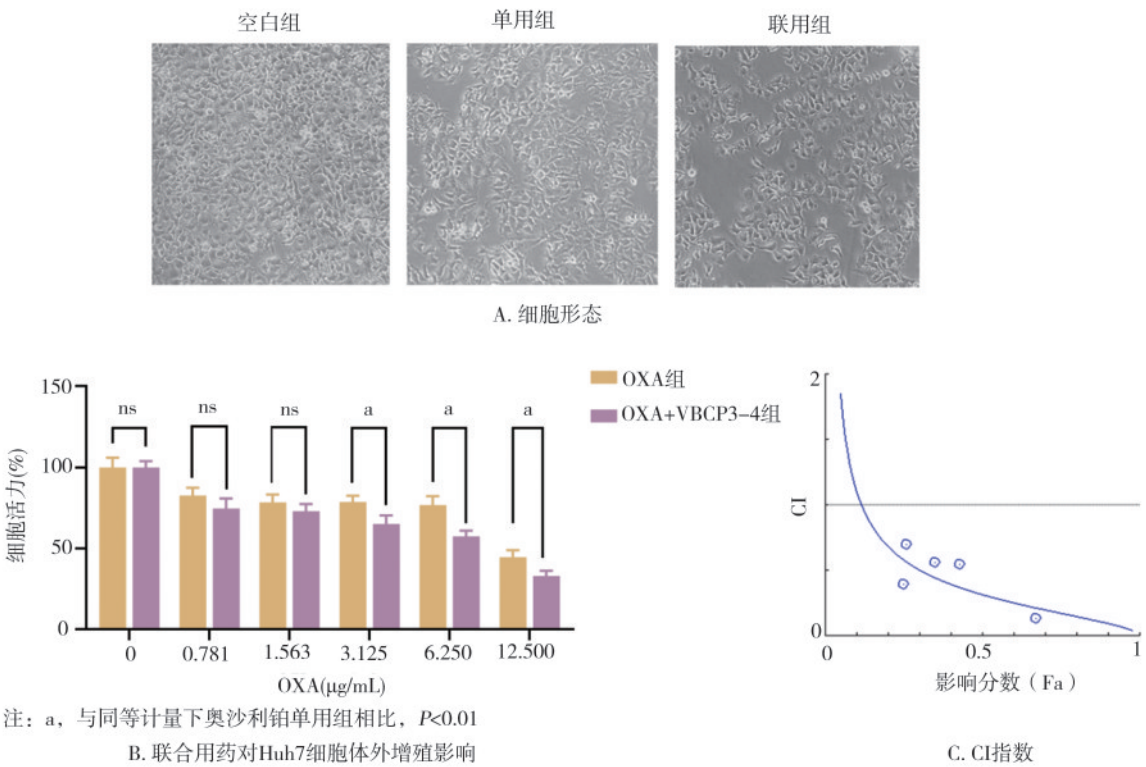


图2　VBCP3-4联用OXA对Huh7细胞体外增值的抑制作用（n=6）

OXA联用组对Huh7细胞增殖抑制作用显著高于OXA单用组（P=0.000、P=0.000、P=0.000、P=0.000），抑制率增加百分比分别为27.90%、58.57%、56.37%、45.09%；由图3B可见，系列浓度联用指数CI<1，提示具有协同增效作用，CI曲线呈现出剂量依赖性，具体数值见表2。

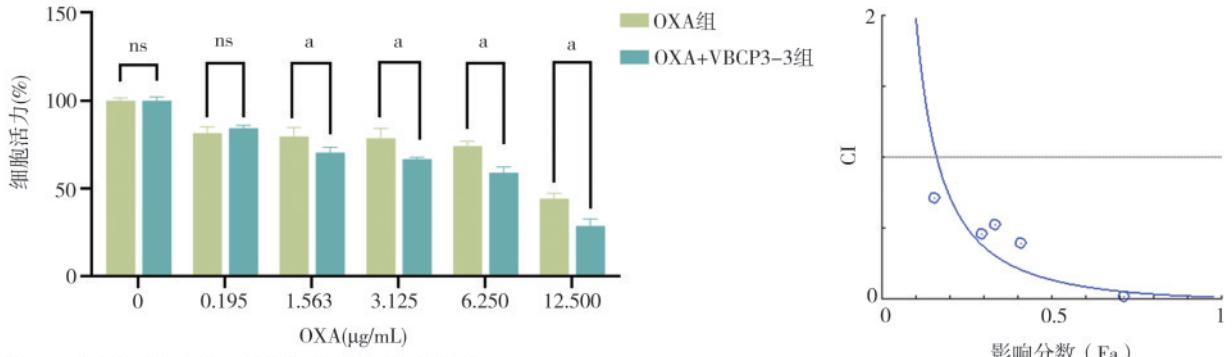
2.5　VBCP 3-4对OXA细胞摄取影响

方法学考察结果显示：Pt元素的回收率为97.89%~109.59%，准确度为1.54%~6.45%，日内精密度为2.45%~

表1　VBCP 3-4联用OXA对Huh7体外增殖抑制作用及CI数值（$\bar{x}\pm s$，n=6）

OXA剂量（μg/mL）	单用抑制率48 h（%）	联用抑制率48 h（%）	F值	P值	影响分数	CI值
12.500	55.401 ± 4.417	66.977 ± 3.236[a]	1.343	<0.001	0.67	0.13
6.250	25.768 ± 5.299	42.584 ± 3.599[a]	0.994	<0.001	0.43	0.55
3.125	23.924 ± 3.759	34.895 ± 5.299[a]	0.958	0.002	0.35	0.56
1.563	24.081 ± 4.583	26.923 ± 4.515	0.052	0.304	0.26	0.70
0.781	20.099 ± 4.693	25.249 ± 6.218	0.009	0.136	0.25	0.39
0.000	0.000 ± 6.092	0.000 ± 3.908	0.800	1.000		

注：a，与同等剂量下奥沙利铂单用组相比，P<0.01



注：a，与同等计量下奥沙利铂单用组相比，P<0.01

A. 联合用药对Huh7细胞体外增殖影响　　B. CI指数

图3　VBCP 3-3联用OXA对Huh7细胞体外增值的抑制作用（n=6）

表2　VBCP 3-3联用OXA对Huh7体外增殖抑制作用及CI数值（$\bar{x}\pm s$，n=6）

OXA剂量（μg/mL）	单用抑制率48 h（%）	联用抑制率48 h（%）	F值	P值	影响分数	CI值
12.500	55.716 ± 2.987	71.263 ± 4.027[a]	0.070	<0.001	0.71	0.02
6.250	25.889 ± 2.859	41.051 ± 3.341[a]	1.077	<0.001	0.41	0.34
3.125	21.287 ± 5.570	33.286 ± 1.055[a]	6.895	0.003	0.34	0.53
1.563	20.355 ± 5.203	29.533 ± 2.955[a]	1.429	0.004	0.30	0.48
0.195	18.360 ± 3.564	15.543 ± 1.616	2.507	0.109	0.16	0.71
0.000	0.000 ± 1.688	0.000 ± 2.124	0.006	1.000	–	–

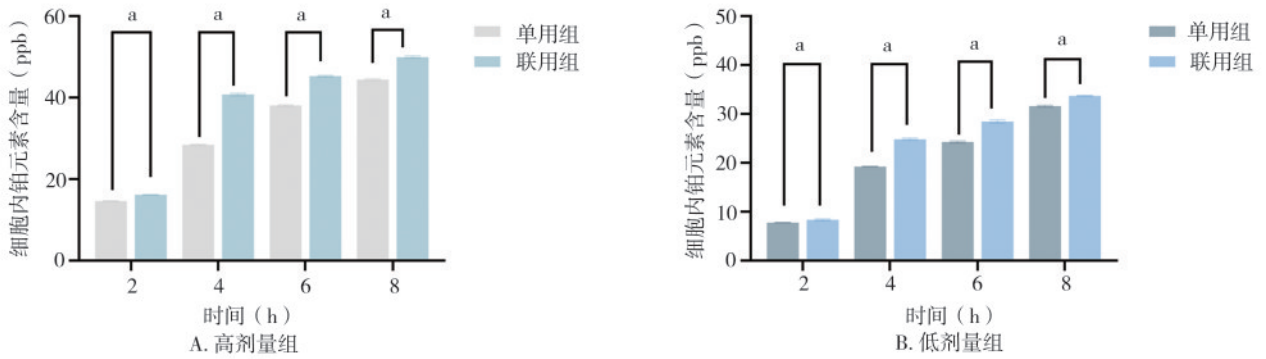
注：a，与同等剂量下奥沙利铂单用组相比，P<0.01

4.86%，日间密度为2.73%~4.60%，反复冻融稳定性为1.45%~4.38%，符合体内分析要求。

对VBCP 3-4联用增效机制进行研究，结果如图4所示，随着时间的增加OXA在Huh7细胞内的含量逐渐增加，与单用低剂量组相比联用低剂量组在2 h、4 h、6 h、8 h摄取率分别为：6.93%、29.02%、17.19%、6.83%，与单用高剂量组相比联用高剂量组在2 h、4 h、6 h、8 h摄取率分别为：10.42%、43.43%、19.02%、12.33%，单用组与联用组相比具与统计学差异（F=8141.028，P=0.000）；细胞对OXA的相对摄取率在4 h达到最高，高剂量联用组与低剂量联用组在4 h的摄取具有显著性差异（F=11 610.718，P=0.000），具有浓度依赖性。实验表明VBCP 3-4可以促进OXA的摄入，并在4 h达到相对摄取峰值。

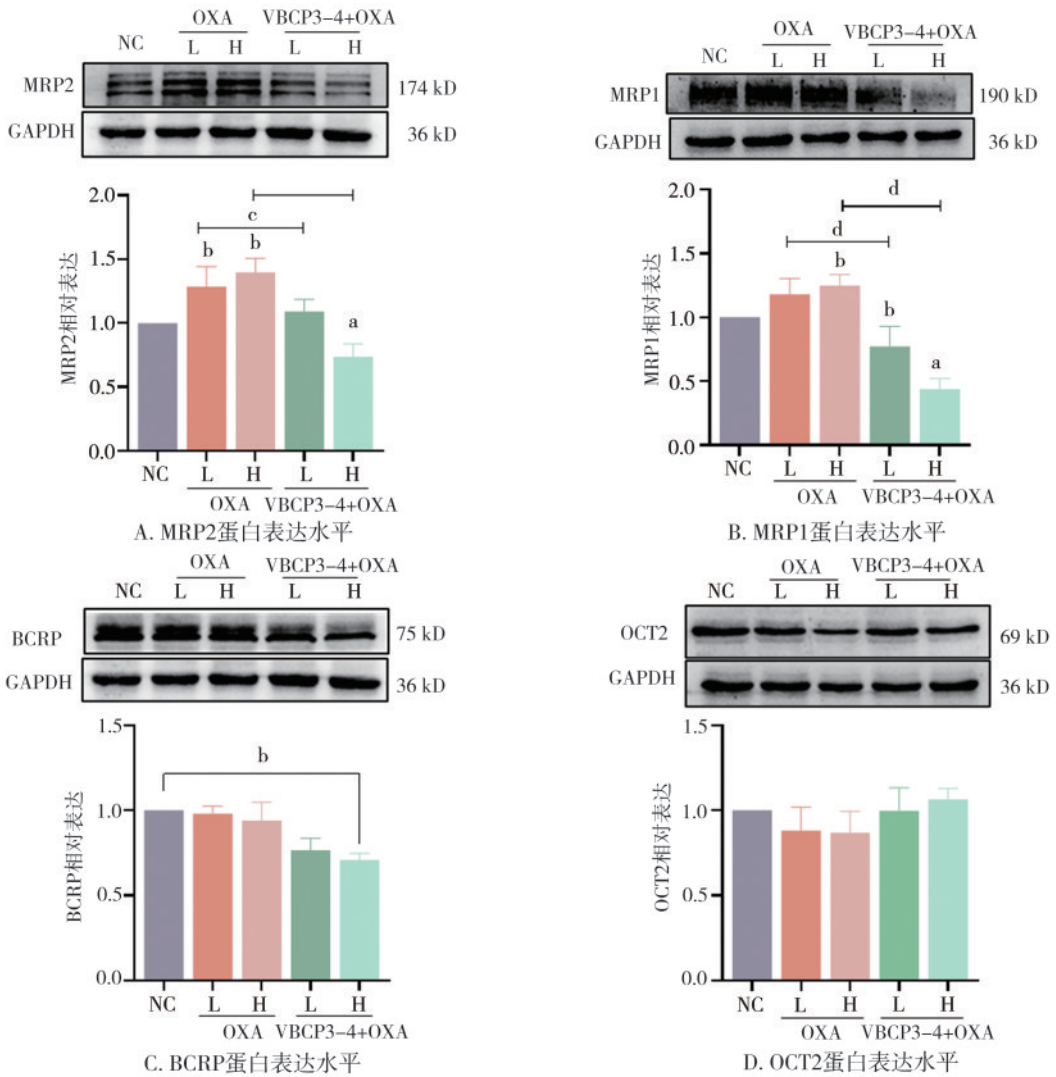
2.6　VBCP 3-4联用OXA对Huh7细胞转运蛋白的影响

如图5所示，相比空白对照组，高、低剂量OXA都能够明显上调Huh7细胞中MRP2蛋白的表达量（F=17.473，P=0.001，P=0.008），上调幅度为18.11%、25.00%，VBCP 3-4高、低剂量联用OXA明显降低MRP2蛋白表达（P=0.000，P=0.049），降低幅度分别为47.38%、15.18%；OXA高、低剂量组能够上调MRP1蛋白的表达量，上调幅度28.51%、39.70%（F=30.390，P>0.05、P=0.015），VBCP 3-4高、低剂量联用OXA明显降低MRP1蛋白表达（P=0.000，P=0.000），降低幅度分别为64.96%、34.63%；OXA对BCRP的表达差异无统计学意义，VBCP 3-4高、低剂量联用OXA明显降低了BCRP蛋白表达，高剂量差异有统计学意义（F=13.364，P=0.020），降低幅度为29.00%；OXA能够一定程度上抑制OCT2蛋白的表达，VBCP 3-4高、低剂量联用OXA对OCT2蛋白表达差异无统计学意义。



注：a，与同等计量下奥沙利铂单用组相比，$P<0.01$

图 4　VBCP 3-4 对 OXA 细胞摄取的影响（$n=3$）

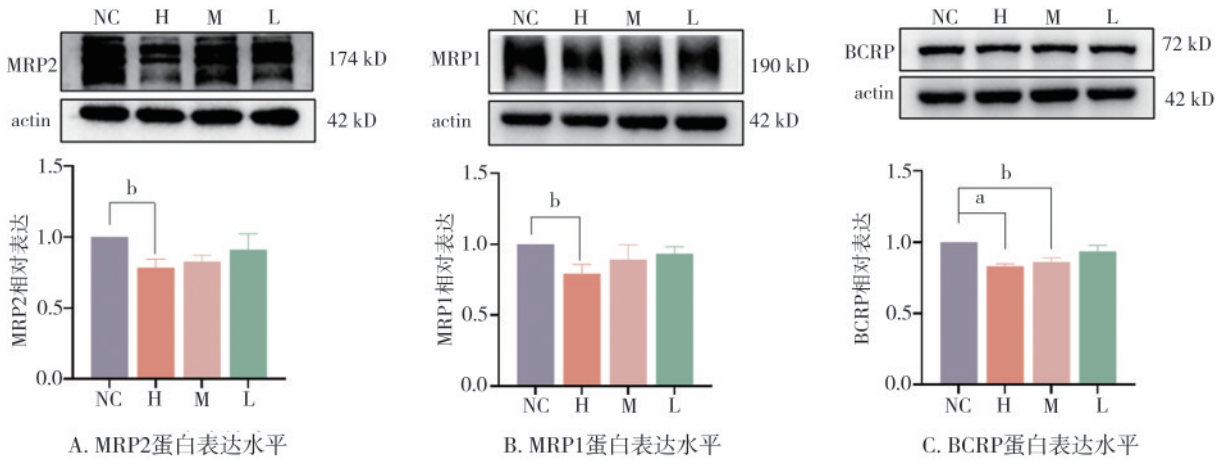


注：a，与 NC 组相比，$P<0.01$；b，与 NC 组相比，$P<0.05$；c，与同等计量下奥沙利铂单用组相比，$P<0.05$；d，与同等计量下奥沙利铂单用组相比，$P<0.01$

图 5　VBCP 3-4 联用 OXA 对 Huh7 细胞转运蛋白的影响（$n=3$）

2.7　VBCP 3-4 对 Huh7 细胞转运蛋白的影响

后续本研究进一步考察 VBCP 3-4 单独给药对转运蛋白表达的影响。如图 6 所示，与空白组相比高、中、低 VBCP 3-4 都可以下调 MRP2、MRP1 蛋白的表达，高剂量差异有统计学意义（$F=9.158$，$P=0.004$、$F=5.122$，$P=0.005$），下调幅度为 24.91% 和 20.79%；不同计量浓度 VBCP 3-4 也可以下调 BCRP 蛋白的表达，高、中剂量具有统计学差异（$H=10.116$，$P=0.003$，$P=0.030$），下调幅度分别为 15.02%、13.92%。



注：a，与NC组相比，$P<0.01$；b，与NC组相比，$P<0.05$

图6 VBCP3-4对Huh7细胞转运蛋白的影响（$n=3$）

3 讨 论

OXA是烷化剂类抗肿瘤药物，通过产生水化衍生物作用于DNA，形成链内和链间交联，从而抑制DNA的合成，产生细胞毒性作用[14]。只有足够的胞内蓄积量，OXA才能发挥细胞毒性，进而达到杀死肿瘤细胞的效果。然而，抗肿瘤药物的细胞毒性作用常常诱导细胞膜上外排型药物转运体的表达，促进药物外排，导致肿瘤细胞耐药性产生，影响治疗效果[15-16]。除此之外OXA靶向性差，临床使用损伤机体造血系统、肝肾、神经系统，神经毒性发生率高达90%[17]。因此，增加肿瘤内药物浓度，逆转耐药性，提高药物靶向性是提高药效的关键。

醋柴胡多糖具有增效拉米夫定抗乙肝病毒的作用[18]，可能增加OXA抗肝癌的效果，因此选择了分子量较小的4部位分离得到的多糖VBCP 3-4、VBCP 3-3。VBCP 3-4、VBCP 3-3多糖增效活性未显示出明显差异，且VBCP 3-4得率明显高于VBCP 3-3，因此后续进行VBCP 3-4增效活机制探索[19]。研究发现，VBCP 3-4可明显增加OXA抗细胞增殖活性，最高可增加至145.90%。那么这种增效作用是否与其增加肿瘤细胞内药物浓度有关呢？接着，本研究使用ICP-MS测定OXA胞内浓度，对VBCP3-4增效途径进行探索。结果显示醋柴胡多糖VBCP 3-4可以促进Huh7细胞对OXA的摄取，说明VBCP 3-4发挥协同增效途径可能是通过影响OXA在细胞内累积实现的。药物浓度受细胞表面存在的转运蛋白表达的影响。MRP1、MRP2、OCT2是OXA转运底物[20-21]，据报道MRP1、MRP2蛋白高表达导致OXA在细胞内的减少[22]，因此本研究考察了单用与联用情况下细胞膜表面上述转运蛋白表达。结果显示，OXA可以促进Huh7细胞中MRP1、MRP2蛋白表达，下调OCT2表达，与VBCP3-4联用能够明显抑制MRP1和MRP2蛋白表达，对OCT2蛋白的表达没有显著影响。据报道，无论化疗药物是否为BCRP底物，BCRP表达都是药物反应不良的生物标志物[21]。其他研究也同样证明，BCRP mRNA表达经常与预后不良相关[22]。OXA对Huh7细胞株BCRP蛋白的表达无影响，但OXA联用VBCP 3-4联用后，BCRP蛋白表达量明显下调。阻断BCRP介导的主动外排可能对癌症治疗有帮助，这提示VBCP 3-4增效机制也可能与影响转运蛋白BCRP表达有关。进一步探索VBCP 3-4单独作用Huh7细胞后发现，VBCP 3-4能够明显下调MRP1、MRP2、BCRP蛋白表达。以上实验结果提示醋柴胡多糖VBCP 3-4可能是通过抑制外排型转运蛋白MRP1、MRP2、BCRP表达，促进Huh7细胞摄入OXA，提高胞内有效浓度来实现增效作用。

本研究从细胞水平探讨了醋柴胡多糖VBCP 3-4联用OXA增效活性及增效机制，后续应开展动物实验进行验证。

参 考 文 献

[1] Brown ZJ，Tsilimigras DI，Ruff SM，et al. Management of hepatocellular carcinoma：a review[J]. JAMA Surg，2023，158(4)：410-420.

[2] Zhou HY, Song TQ. Conversion therapy and maintenance therapy for primary hepatocellular carcinoma[J]. Biosci Trends, 2021, 15(3): 155-160.

[3] Zhang X, Ng HLH, Lu AP, et al. Drug delivery system targeting advanced hepatocellular carcinoma: current and future[J]. Nanomed-Nanotechnol Biol Med, 2016, 12(4): 853-869.

[4] Liao B, Liang HF, Chen J, et al. Suberoylanilide hydroxamic acid enhances chemosensitivity to 5-fluorouracil in hepatocellular carcinoma via inhibition of thymidylate synthase[J]. Tumour Biol, 2015, 36(12): 9347-9356.

[5] 张殷慈. PKI:587 增强奥沙利铂对肝细胞癌的化疗敏感性[D]. 淮南:安徽理工大学, 2020.

Zhang YC. PKI—587 enhances the chemotherapy sensitivity of oxaliplatin to hepatocellular carcinoma[D]. Huainan: Anhui University of Science & Technology, 2020.

[6] 赵圣轩, 夏庆梅. 柴胡引经作用现代研究进展[J]. 亚太传统医药, 2022, 18(3): 228-232.

Zhao SX, Xia QM. Advances in research on the pharmacological effects of *Bupleurum*[J]. Asia Pac Tradit Med, 2022, 18(3): 228-232.

[7] 何春晓, 张贝贝, 郑 蕾, 等. 引经药醋柴胡对索拉非尼在大鼠血液和肝脏中药物浓度的影响[J]. 医学研究杂志, 2014, 43(6): 62-66.

He CX, Zhang BB, Zheng L, et al. Effects of medicinal guide drug vinegar processing *Radix* bupleuri on sorafenib concentration in plasma and liver of rats[J]. J Med Res, 2014, 43(6): 62-66.

[8] Zhao RZ, Yuan D, Liu SJ, et al. Liver targeting effect of vinegar-baked *Radix* Bupleuri on Rhein in rats[J]. J Ethnopharmacol, 2010, 132(2): 421-428.

[9] 王锦秋. 基于 HNF1α/HNF4α 探讨醋柴胡增强大黄酸肝靶向作用[D]. 广州:广东药科大学, 2019.

Wang JQ. Exploring the Effect of Enhancing Liver-targeting of Rein by Vinegar-baked Radix Bupleuri Based on HNF1α/HNF4α[D]. Guangzhou: Guangdong Pharmaceutical University, 2019.

[10] Wu YY, Liu LJ, Zhao Y, et al. Polysaccharides of vinegar-baked radix bupleuri promote the hepatic targeting effect of oxymatrine by regulating the protein expression of HNF4α, Mrp2, and OCT1[J]. J Ethnopharmacol, 2021, 267: 113471.

[11] Chou TC. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method[J]. Cancer Res, 2010, 70(2): 440-446.

[12] 孙济民, 吴亚运, 梁敏杰, 等. 不同提取工艺桔梗多糖的理化性质分析及其对奥沙利铂体内分布的影响[J]. 食品工业科技, 2024.

Sun JM, Wu YY, Liang MJ, et al. Platycodon grandiflorum polysaccharides with different extraction processes and their effects on oxaliplatin distribution in vivo[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024.

[13] Zhou JB, Kang Y, Chen L, et al. The drug-resistance mechanisms of five platinum-based antitumor agents[J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 343.

[14] Kopecka J, Trouillas P, Gašparović AČ, et al. Phospholipids and cholesterol: Inducers of cancer multidrug resistance and therapeutic targets[J]. Drug Resist Updat, 2020, 49: 100670.

[15] Zhang CY, Xu C, Gao XY, et al. Platinum-based drugs for cancer therapy and anti-tumor strategies[J]. Theranostics, 2022, 12(5): 2115-2132.

[16] Zhou HH, Zhang L, Zhang HX, et al. Tat-HA-NR2B9c attenuate oxaliplatin-induced neuropathic pain[J]. Exp Neurol, 2019, 311: 80-87.

[17] 刘丽娟, 赵 亚, 吴亚运, 等. 醋柴胡多糖对拉米夫定体外抗乙型肝炎病毒的增效作用研究[J]. 世界中医药, 2023, 18(8): 1079-1084.

Liu LJ, Zhao Y, Wu YY, et al. Synergistic effect of polysaccharide from vinegar-baked *Radix* bupleuri with lamivudine against hepatitis B virus *in vitro*[J]. World Chin Med, 2023, 18(8): 1079-1084.

[18] 王小双. 醋柴胡多糖肝靶向作用及机理的初探[D]. 广州:广州中医药大学, 2022.

Wang XS, Study on liver targeting effect and mechanism of polysaccharides from Vinegar-baked Radix Bupleuri[D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine, 2022.

[19] Wang Y, Wang YY, Qin ZY, et al. The role of non-coding RNAs in ABC transporters regulation and their clinical implications of multidrug resistance in cancer[J]. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2021, 17(3): 291-306.

[20] Huang H, Chen J, Ding CM, et al. LncRNA NR2F1-AS1 regulates hepatocellular carcinoma oxaliplatin resistance by targeting ABCC1 via miR-363[J]. J Cell Mol Med, 2018, 22(6): 3238-3245.

[21] Wang ZY, Sun XT, Feng YY, et al. Dihydromyricetin reverses MRP2-mediated MDR and enhances anticancer activity induced by oxaliplatin in colorectal cancer cells[J]. Anticancer Drugs, 2017, 28(3): 281-288.

[22] Natarajan K, Xie Y, Baer MR, et al. Role of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in cancer drug resistance[J]. Biochem Pharmacol, 2012, 83(8): 1084-1103.

（责任编辑：周一青）

本文引用格式：

韩明慧, 王小双, 赵 亚, 等. 醋柴胡多糖联用奥沙利铂增效活性及机制研究[J]. 重庆医科大学学报, 2025, 50(3): 303-310.