

# 白屈菜-元胡药对逆转乳腺癌阿霉素耐药药效物质研究

邹翔<sup>1</sup>, 张雪瑞<sup>2</sup>, 于佳慧<sup>2</sup>, 孙雨恒<sup>2</sup>, 张宇航<sup>2</sup>, 舒淇<sup>2</sup>, 曲中原<sup>2\*</sup>

1. 哈尔滨商业大学 药物工程技术研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150076

2. 哈尔滨商业大学药学院, 黑龙江 哈尔滨 150076

**摘要:** 目的 基于体外耐药细胞模型, 研究白屈菜-元胡药对 (*Chelidonii Herba-Corydalis Rhizoma* drug pair, CMCR) 逆转乳腺癌阿霉素 (adriamycin, ADR) 耐药药效物质。方法 运用超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱联用技术 (UPLC-Q-TOF-MS) 对 CMCR 不同配伍比例 (1:1、2:1) 95%、80%、70%、60%、50%乙醇提取部位的化学成分进行表征, 确定共有成分; 以人乳腺癌阿霉素耐药细胞 (MCF-7/ADR) 为研究对象, 采用 CCK-8 法检测 ADR 联合 CMCR 各提取部位对 MCF-7/ADR 细胞增殖的影响, 计算耐药倍数; 利用灰色关联度、Pearson 相关性分析和偏最小二乘回归分析建立表征图谱中共有成分峰面积与逆转耐药倍数的相关性, 筛选出 CMCR 最佳逆转耐药活性部位及相关药效物质。采用荧光显微镜观察白屈菜碱联合延胡索乙素作用细胞后罗丹明 123 累积量的影响; Western blotting 和 qRT-PCR 法检测 P-糖蛋白 (P-glycoprotein, P-gp)、乳腺癌耐药蛋白 (breast cancer resistant protein, BCRP)、肺耐药蛋白 (lung resistance protein, LRP) 蛋白和基因表达。

**结果** CMCR 10 个提取部位分析得到 30 个共有成分。CMCR (1:1) 95%乙醇提取部位对 ADR 的逆转耐药活性最强, 其逆转耐药倍数为 11.08。根据相关性分析结果初步确定白屈菜碱、延胡索乙素、小檗碱、二氢血根碱和白屈菜红碱为 CMCR 逆转乳腺癌 ADR 耐药的潜在药效物质。选择药效相关性最高的白屈菜碱和延胡索乙素联合进行实验验证, 发现白屈菜碱-延胡索乙素能够增加细胞内罗丹明 123 累积, 显著下调 MCF-7/ADR 细胞 P-gp、BCRP 和 LRP 蛋白和基因表达 ( $P < 0.01$ 、 $0.001$ )。

**结论** 阐明了 CMCR 逆转乳腺癌阿霉素耐药的药效物质, 为其临床应用及后续抗肿瘤辅助用药开发奠定了基础。

**关键词:** 白屈菜; 元胡; 乳腺癌; 阿霉素耐药; 药效物质; 白屈菜碱; 延胡索乙素; 小檗碱; 二氢血根碱; 白屈菜红碱

**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2024)07-2259-12

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.07.013

## Pharmacodynamic ingredients of *Chelidonii Herba-Corydalis Rhizoma* drug pair in reversing adriamycin resistance in breast cancer

ZOU Xiang<sup>1</sup>, ZHANG Xuerui<sup>2</sup>, YU Jiahui<sup>2</sup>, SUN Yuheng<sup>2</sup>, ZHANG Yuhang<sup>2</sup>, SHU Qi<sup>2</sup>, QU Zhongyuan<sup>2</sup>

1. Pharmaceutical Engineering Technology Research Center, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China

2. College of Pharmacy, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China

**Abstract: Objective** To study the pharmacological substances of Baiqucai (*Chelidonii Herba*)-Yuanhu (*Corydalis Rhizoma*) drug pair (CMCR) in reversing breast cancer resistance to adriamycin (ADR) based on the drug-resistant cell model *in vitro*. **Methods** UPLC-Q-TOF-MS technology was used to characterize the chemical components of 95%, 80%, 70%, 60% and 50% ethanol-extracted parts of CMCR (compatibility proportion 1:1, 2:1) and determine the common components; CCK-8 was applied to detect the effect of ADR combined with CMCR on the proliferation of MCF-7/ADR cells to calculate the drug resistance multiples; Grey correlation analysis method, Pearson bivariate correlation analysis and partial least squares regression analysis were used to establish the correlation between the peak area of common peak and the multiple of reversal resistance in the characterization map to select the best active site of reverse resistance and related medicinal substances of CMCR. Fluorescence microscope was employed to investigate the influence of the combination of chelidone (CHE) and tetrahydropalmatine (THP) on the intracellular accumulation of rhodamine 123 (Rh123). Western blotting and qRT-PCR were used to detect P-glycoprotein (P-gp), breast cancer resistance protein (BCRP), lung resistance protein (LRP) protein and gene expressions. **Results** A total of 30 common components were analyzed from 10 extracted

收稿日期: 2023-10-19

基金项目: 黑龙江省自然科学基金资助项目 (LH2022H001)

作者简介: 邹翔, 研究员, 博士生导师, 从事中药抗肿瘤药效物质基础及作用机制研究。E-mail: zouxiang@hrbcu.edu.cn

\*通信作者: 曲中原, 教授, 博士生导师, 从事中药药效物质基础及中药炮制研究。E-mail: qiuququ@163.com

parts of CMCR. The CMCR (1 : 1) 95% ethanol extracted part exhibited the most potent reversing ADR resistance activity, with a reversal drug resistance multiple of 11.08. According to the initial findings of the correlation analysis results, chelidone, tetrahydropalmatine, berberine, dihydrosanguinarine and chelerythrine were preliminarily determined as pharmacodynamic substances for CMCR to reverse ADR resistance in BC. Since CHE and THP had the highest correlation in pharmacodynamic efficacy, they were paired to conduct a verification experiment, which revealed that CHE-THP could increase the intracellular accumulation of Rh123 and significantly down-regulate P-gp, BCRP, LRP protein and gene expressions in MCF-7/ADR cells ( $P < 0.01, 0.001$ ). **Conclusion** This study elucidated the effective substances of CMCR reversing ADR resistance in BC and laid the foundation for its clinical application and subsequent development of anti-tumor adjuvant drugs.

**Key words:** *Chelidonii Herba*; *Corydalis Rhizoma*; breast cancer; adriamycin resistance; pharmacodynamic ingredient; chelidone; tetrahydropalmatine; berberine; dihydrosanguinarine; chelerythrine

据美国癌症协会最新统计, 乳腺癌在女性癌症发生率中居于首位<sup>[1]</sup>。临床上, 乳腺癌的治疗常以手术为主, 同时结合新辅助化疗、内分泌治疗和靶向治疗<sup>[2]</sup>。蒽环类药物如阿霉素通常与环磷酰胺和氟尿嘧啶等药物联合应用于新辅助化疗方案, 该方案对于 III 期乳腺癌患者是一个有潜力的治疗方案<sup>[3]</sup>。然而, 部分肿瘤患者会对阿霉素产生耐药性, 极大地制约了癌症治疗效果, 而其耐药的主要机制包括 P-糖蛋白 (P-glycoprotein, P-gp) 等跨膜蛋白介导的耐药、药物代谢酶的异常表达、DNA 损伤修复机制以及发生上皮细胞间充质细胞转化等<sup>[4]</sup>。因此, 新型耐药逆转剂的筛选与研发仍是解决乳腺癌新辅助化疗耐药的主要问题。

白屈菜-元胡药对 (*Chelidonii Herba-Corydalis Rhizoma* drug pair, CMCR) 是中医临床用于治疗肿瘤的药对之一<sup>[5-6]</sup>。白屈菜是罂粟科植物白屈菜 *Chelidonium majus* L. 的干燥全草, 具有抗炎、镇痛、止咳平喘的功效<sup>[7]</sup>。元胡又称延胡索, 为罂粟科植物延胡索 *Corydalis yanhusuo* W. T. Wang 的干燥块茎, 主要有活血化瘀、行气止痛之功效<sup>[8]</sup>。近年来研究表明, 白屈菜生物碱对多种癌细胞 (如人非小细胞肺癌 A549 细胞、人结肠癌 HCT116、SW480 细胞、人乳腺癌 MDA-MB-231、MCF-7 细胞) 表现出细胞毒作用<sup>[9]</sup>, 并能通过抑制磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) /蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 和丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号通路来促使人乳腺癌阿霉素耐药细胞 (MCF-7/ADR) 恢复对阿霉素的敏感性<sup>[10]</sup>。而元胡中生物碱可抑制人肝癌 HepG2 细胞、HCT116 细胞、A549 细胞和人白血病 HL60 细胞体外增殖<sup>[11]</sup>, 并具有抑制乳腺癌细胞中 P-gp 活性的能力, 逆转 MCF-7/ADR 细胞对阿霉素的抗性<sup>[12]</sup>。此外, 课题组前期研究也发现,

CMCR 可通过下调雌激素受体  $\alpha$  (estrogen receptor  $\alpha$ , ER $\alpha$ )、p-PI3K、p-Akt 蛋白的表达水平和雌激素受体 1 (estrogen receptor 1, *ESR1*) mRNA 的表达水平, 有效抑制 ER 阳性乳腺癌细胞的增殖<sup>[5]</sup>。提示 CMCR 具有良好的抗肿瘤作用和潜在的逆转肿瘤细胞耐药的作用, 但其逆转肿瘤化疗耐药的药效尚需研究验证, 相应的药效物质基础研究也尚未系统开展。因此, 本研究采用体外耐药细胞模型对 CMCR 各提取部位逆转耐药的药效进行评价。同时, 采用 UPLC-Q-TOF-MS 技术分析不同配伍比例和不同提取部位下 CMCR 的共有成分, 筛选 CMCR 逆转耐药作用的药效物质, 进一步对 CMCR 主要药效物质组逆转乳腺癌阿霉素耐药的机制进行探究, 为其在肿瘤化疗耐药方面的临床应用提供指导, 同时也为相关化疗耐药逆转剂的研发提供科学依据。

## 1 材料

### 1.1 细胞

MCF-7/ADR 细胞由哈尔滨商业大学药物工程技术研究中心提供。

### 1.2 药材

白屈菜、元胡 (醋) 饮片均购自哈尔滨市汇仁药材站, 经哈尔滨商业大学药学院曲中原教授分别鉴定为罂粟科植物白屈菜 *C. majus* L. 的干燥全草和罂粟科植物延胡索 *C. yanhusuo* W. T. Wang 的干燥块茎。

### 1.3 药品与试剂

对照品白屈菜碱、延胡索乙素、二氢血根碱、白屈菜红碱 (批号分别为 DST220428-079、DSTDY010101、DST220726-042、DST201109-040, 质量分数  $\geq 98\%$ ) 均购自成都德思特生物技术有限公司; 阿霉素 (批号 N1111B, 质量分数  $\geq 98\%$ )、RPMI 1640 培养液购自大连美仑生物技术有限公司; 罗丹明 123 (批号 052621221101)、BCA 试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司; 胎牛血清购

自美国 Gibco 公司; CCK-8 试剂盒 (批号 K101828133EF5E) 购自美国 APEX BIO 公司; 兔抗乳腺癌耐药蛋白 (breast cancer resistant protein, BCRP)、肺耐药蛋白 (lung resistance protein, LRP)、P-gp 多克隆抗体 (批号分别为 M05253192、G07143520、M05262395) 均购自沈阳万类生物科技有限公司; HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗 (批号 BJ08079044) 购自北京博奥森生物技术有限公司; 兔抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 多克隆抗体 (批号 3507442021) 购自武汉 ABclonal 生物公司; PrimeScript™ RT reagent kit with gDNA eraser 试剂盒 (批号 RR047A)、TB Green™ Premix Ex Taq™ 试剂盒 (批号 RR420A) 均购自宝日医生生物技术 (北京) 有限公司; 甲醇、乙腈、甲酸等其他试剂均为分析纯, 水为蒸馏水。

#### 1.4 仪器

超高效液相色谱-G6500 系列四极杆-飞行时间质谱联用仪 (美国 Agilent 公司); CO-150 型二氧化碳培养箱 (美国 NBS 公司); iMark 型酶标仪 [伯乐生命医学产品 (上海) 有限公司]; DY CZ-24DN 型电泳仪 (北京六一生物科技有限公司); ImageQuant LAS500 型分子生物成像仪 (GE 通用电器医疗集团生命科学部); Easy Cycler 96 型 PCR 仪 (德国 Biometra 公司); QuantStudio™ 1 型实时荧光定量 PCR 仪 [英潍捷基 (上海) 贸易有限公司]。

## 2 方法

### 2.1 CMCR 各提取部位化学成分表征

**2.1.1 对照品溶液的制备** 精密称取白屈菜碱、延胡索乙素、二氢血根碱、白屈菜红碱对照品各 1.0 mg, 分别加入甲醇进行超声溶解, 定容至 5 mL 量瓶中, 制成质量浓度均为 0.2 mg/mL 的对照品溶液, 经 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 备用。

**2.1.2 供试品溶液的制备** 按 1:1 比例称取白屈菜、元胡粉末 6、6 g, 按 2:1 比例称取白屈菜、元胡粉末 8、4 g, 分别加 10 倍量 95%、80%、70%、60%、50% 乙醇超声提取 2 次, 每次 1 h; 合并滤液, 浓缩, 得浸膏。加甲醇复溶, 制成质量浓度为 0.08 g/mL (以浸膏量计) 的供试品溶液, 经 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 备用。

**2.1.3 色谱条件** Acquity UPLC HSS T3 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm); 流动相为 0.1% 甲酸水溶液 (A)-乙腈 (B), 梯度洗脱: 0~4 min, 20%

B; 4~17 min, 20%~22% B; 17~19 min, 22%~100% B; 19~24 min, 100%~15% B; 体积流量为 0.3 mL/min; 柱温为 30 °C; 进样量为 0.2 μL; 检测波长为 269 nm<sup>[13]</sup>。

**2.1.4 质谱条件** 电喷雾离子源 (electron spray ionization, ESI), 正离子模式下的离子源电压为 4 500 V, 离子源温度为 550 °C。正离子模式下的碰撞能量为 35 eV; 雾化气 (gas1) 压力为 379.225 kPa, 辅助气 (gas2) 压力为 34.475 kPa, 气帘气 (curtain gas) 压力为 241.325 kPa。一级质谱母离子扫描范围为  $m/z$  80~1 500; 对信息依赖响应值超过 100 cps 的 8 个最高峰进行二级质谱扫描, 子离子扫描范围为  $m/z$  50~1 500<sup>[14]</sup>。

**2.1.5 样品检测与数据处理** 收集中国知网 (CNKI)、PubMed 和 ChemSpider 等数据库中白屈菜和元胡的化学成分信息, 建立数据库。运用 Agilent MassHunter Workstation 工作站软件, 以峰强度、保留时间 ( $t_R$ ) 和质谱数据对色谱峰进行识别, 计算测定化合物相对分子质量与理论值之间的误差, 筛选误差小于  $1 \times 10^{-5}$  的化合物。根据化合物结构特征分析化合物裂解规律, 与二级质谱图进行对照, 确定各化合物结构。关键化合物采用对照品或对照品谱图对比进行进一步验证。

### 2.2 CMCR 逆转 MCF-7/ADR 的耐药作用

将对数生长期的 MCF-7/ADR 细胞以  $3.5 \times 10^4$  个/mL 接种至 96 孔板, 每孔 100 μL, 培养箱中过夜。设置对照组, 不同浓度 (2.5、5.0、10.0、20.0、40.0、80.0 μmol/L) 阿霉素组, 不同质量浓度 (0.0625、0.125 0、0.250 0、0.500 0、1.000 0、2.000 0 mg/mL) 的 CMCR 组, 阿霉素 (2.5、5.0、10.0、20.0、40.0、80.0 μmol/L) 联合 CMCR 各提取部位组 [各提取部位的 20% 抑制浓度 (20% inhibitory concentration, IC<sub>20</sub>)], 每孔加入 100 μL 药液, 对照组加入不含药物的培养基, 另设置不接种细胞的空白孔, 每组设置 6 个复孔。给药 72 h 后, 每孔加入 10 μL CCK-8 工作液, 微量振荡器上混匀 3~5 min, 采用酶标仪测定 490 nm 处的吸光度 ( $A$ ) 值, 计算细胞增殖抑制率和耐药逆转倍数。

$$\text{细胞增殖抑制率} = (A_{\text{对照}} - A_{\text{给药}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

$$\text{耐药逆转倍数} = \text{药物 IC}_{50} (\text{不含逆转剂}) / \text{药物 IC}_{50} (\text{含逆转剂})$$

### 2.3 共有成分峰面积与药效指标相关性分析

#### 2.3.1 Pearson 相关系数 (Pearson correlation

coefficient, PCC) 将均值化后的药效物质的峰面积和药效实验中的逆转耐药倍数设为“变量”,采用 SPSS 21.0 软件中的双变量相关分析法,计算 PCC,各变量之间的系数绝对值越大,表明其线性相关性越强。据此,寻找与逆转耐药作用相关性较大的药效物质。

**2.3.2 灰色关联度分析 (grey relational analysis, GRA)** 以共有峰(峰面积)为子序列,以药效实验中的逆转耐药倍数为母序列,原始数据采用均值化法处理,利用 DPS 数据分析系统进行分析,将子序列与相同母序列的关联度,按从大小排序作为关联序,可直接反映各子序列对母序列的“贡献”程度,从而寻找与逆转耐药作用联系较大的药效物质。

**2.3.3 偏最小二乘回归 (partial least squares, PLS) 分析** 将 CMCR 不同提取部位共有成分峰面积和逆转耐药倍数的实验结果导入 SIMCA-P 14.1 软件,将峰面积设为  $X$  变量,药效指标设为  $Y$  变量,进行 PLS 分析。

## 2.4 荧光显微镜检测 MCF-7/ADR 细胞内罗丹明 123 的含量

取对数生长期的 MCF-7/ADR 细胞,以  $2.5 \times 10^5$  个/mL 接种于 6 孔板中,2 mL/孔,于培养箱中培养 24 h。设置对照组、阿霉素 ( $6 \mu\text{mol/L}$ ) 组、低剂量白屈菜碱 ( $3 \mu\text{mol/L}$ ) -延胡索乙素 ( $5 \mu\text{mol/L}$ ) 组、高剂量白屈菜碱 ( $6 \mu\text{mol/L}$ ) -延胡索乙素 ( $10 \mu\text{mol/L}$ ) 组、低剂量白屈菜碱 ( $3 \mu\text{mol/L}$ ) -延胡索乙素 ( $5 \mu\text{mol/L}$ ) 联合阿霉素 ( $6 \mu\text{mol/L}$ ) 组和高剂量白屈菜碱 ( $6 \mu\text{mol/L}$ ) -延胡索乙素 ( $10 \mu\text{mol/L}$ ) 联合阿霉素 ( $6 \mu\text{mol/L}$ ) 组,给予相应药物后,继续培养 48 h,弃去上清液,PBS 清洗细胞 2 次,加入  $5 \mu\text{g/mL}$  罗丹明 123,室温避光孵育 30 min。弃去上清液,用预冷的 PBS 洗涤细胞 2 次,荧光显微镜下观察细胞内罗丹明 123 含量(激发波长 488 nm,发射波长 525 nm)。使用 Image J 软件对荧光强度进行定量分析。

## 2.5 CCK-8 法确定白屈菜碱和延胡索乙素配伍比例及二者联合用药分析

将对数生长期的 MCF-7/ADR 细胞以  $3.5 \times 10^4$  个/mL 接种至 96 孔板,每孔 100  $\mu\text{L}$ ,于培养箱中培养 24 h。白屈菜碱给药组浓度为 2.5、5、10、20、40、80  $\mu\text{mol/L}$ ,延胡索乙素给药组浓度为 2.5、5、10、20、40、80  $\mu\text{mol/L}$ ,按“2.2”项下方法检测。将白屈菜碱和延胡索乙素的各组细胞增殖抑制率数

据输入 Synergy Finder 网站进行联合用药分析,利用 ZIP (零相互作用效力模型) 系统地评估 2 药联合应用引发的平均过量反应,预测可能出现的各种形式,ZIP 评分若  $>10$ ,说明 2 药联合发生的反应超出了单药作用时预期反应的 10%,表明 2 种药物可能存在协同相互作用;ZIP 评分若为  $-10 \sim 10$ ,表明 2 种药物的反应是加和相互作用;ZIP 评分若  $<-10$ ,表明 2 种药物可能存在拮抗相互作用<sup>[15]</sup>。

## 2.6 分子对接技术

从 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 下载白屈菜碱和延胡索乙素的 2D 结构,利用 Chemdraw 3D 转为 .mol2 格式。从 RCSB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 获得靶蛋白的晶体结构,使用 AutoDockTools 1.5.6 将配体和受体文件转换为 pdbqt 格式,并通过去水及加氢处理来改进其结构。最后,在 Discovery Studio 软件 (4.5.0 版本) 中进行分子对接模拟。

## 2.7 Western blotting 测定 MCF-7/ADR 细胞内耐药相关蛋白的表达

取对数生长期的 MCF-7/ADR 细胞,以  $2.5 \times 10^5$  个/mL 接种于 6 孔板中,2 mL/孔,于培养箱中培养 24 h。按“2.4”项下方法进行分组和给药,继续培养 48 h 后收集各组细胞,用 RIPA 裂解缓冲液冰浴裂解,离心后收集蛋白。BCA 法进行蛋白定量,蛋白高温变性。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转至 PVDF 膜,于 5% 脱脂牛奶中室温封闭 2 h,分别加入 BCRP、LRP、P-gp、GAPDH 一抗(稀释比例均为 1:1 000),4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜;1% TBST 洗膜后,加入 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗(稀释比例为 1:1 500),室温孵育 2 h。利用 ECL 发光液显色,采用凝胶成像仪曝光成像,应用 Image J 软件分析条带灰度值。

## 2.8 qRT-PCR 检测 MCF-7/ADR 细胞内耐药相关基因的表达

取对数生长期的 MCF-7/ADR 细胞,以  $2.5 \times 10^5$  个/mL 接种于 6 孔板中,2 mL/孔,于培养箱中培养 24 h。按“2.4”项下方法进行分组和给药,培养 48 h 后,收集各组细胞,Trizol 法提取细胞总 RNA,测定 RNA 浓度及纯度后按照试剂盒说明书进行逆转录反应得到 cDNA。以 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增。扩增条件为 95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 30 s; 95  $^{\circ}\text{C}$  变性 5 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s,共 40 个循环。以 GAPDH 为内参,采用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  法计算多药耐药蛋白 1 (multidrug

resistance 1, *MDR1*)、乳腺癌耐药蛋白 (breast cancer resistant protein, *ABCG2*)、*LRP* mRNA 的相对表达量。引物序列：*MDR1* 上游引物 5'-TTGCTGCTTACATTCAGGTTTCA-3'，下游引物 5'-AGCCTATCTCCTGTTCGCATTA-3'；*ABCG2* 上游引物 5'-ACGAACGGATTAACAGGGTCA-3'，下游引物 5'-CTCCAGACACACCACGGAT-3'；*LRP* 上游引物 5'-AGCCAGCTATGCACCAACAC-3'，下游引物 5'-CCTTGCAGGAGCGGTTATC-3'；*GAPDH* 上游引物 5'-AGAAGGCTGGGGCTCATTG-3'，下游引物 5'-AGGGGCCATCCACAGTCTTC-3'。

### 2.9 统计学分析

采用 SPSS 27.0 软件对数据进行统计分析，数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。多组间比较采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA)，组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。

## 3 结果

### 3.1 CMCR 不同提取部位化学成分鉴定结果

对 CMCR 不同配伍比例 (1:1、2:1) 的不同提取部位 (95%、80%、70%、60%、50%乙醇) 化学成分进行解析鉴定，共获得 30 个共有成分 (表 1)，包括异喹啉类生物碱、其他类生物碱、有机胺类等。

表 1 UPLC-Q-TOF-MS 正离子模式下 CMCR 不同配伍比例及提取部位的共有成分

Table 1 Common components of CMCR in different compatibility ratio and extraction parts under positive ion mode of UPLC-Q-TOF-MS

编号	<i>t<sub>R</sub></i> /min	相对分子质量 ( <i>m/z</i> )		误差 ( $\times 10^{-6}$ )	二级碎片 ( <i>m/z</i> )	化合物	分子式
		理论值	检测值				
G1	8.005	354.133 6	354.134 0	1.13	336.123 4, 323.091 4	白屈菜碱*	C <sub>20</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>5</sub> <sup>[16]</sup>
G2	7.378	356.185 6	356.186 3	1.97	308.128 4, 340.159 9	延胡索乙素*	C <sub>21</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>4</sub> <sup>[17]</sup>
G3	16.503	336.123 0	336.123 7	2.08	323.105 6, 321.093 3	小檗碱	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> NO <sub>4</sub> <sup>[16]</sup>
G4	11.562	370.164 9	370.165 3	1.08	352.153 8, 339.123 7	高白屈菜碱	C <sub>21</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>5</sub> <sup>[18]</sup>
G5	10.966	338.138 7	338.139 3	1.77	294.112 8, 265.986 8	<i>N</i> -甲基金罂粟碱	C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> NO <sub>4</sub> <sup>[19]</sup>
G6	14.248	334.107 4	334.107 9	1.50	319.085 0, 306.110 7	二氢血根碱	C <sub>20</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>4</sub> <sup>[20]</sup>
G7	11.992	340.154 3	340.155 1	2.35	325.132 5, 308.100 8	四氢小檗碱	C <sub>20</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>4</sub> <sup>[20]</sup>
G8	10.050	324.123 0	324.123 3	0.93	307.096 6, 295.097 6	四氢黄连碱	C <sub>19</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>4</sub> <sup>[18]</sup>
G9	10.332	324.123 0	324.123 3	0.93	307.096 3, 249.090 8	金罂粟碱	C <sub>19</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>4</sub> <sup>[21]</sup>
G10	21.297	348.123 0	348.123 3	0.86	333.099 6, 318.099 6	白屈菜红碱*	C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> NO <sub>4</sub> <sup>[16]</sup>
G11	9.525	370.164 9	370.165 3	1.08	352.154 7, 321.112 6	别隐品碱	C <sub>21</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>5</sub> <sup>[18]</sup>
G12	9.235	340.117 9	340.118 4	1.47	323.091 5, 305.081 3	去甲基白屈菜碱	C <sub>19</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>5</sub> <sup>[19]</sup>
G13	8.554	354.133 6	354.134 0	1.13	341.163 3, 326.163 3	原阿片碱*	C <sub>20</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>5</sub> <sup>[16]</sup>
G14	7.207	322.107 4	322.108 0	1.86	307.083 8, 279.087 6	13,14-二氢黄连碱	C <sub>19</sub> H <sub>16</sub> NO <sub>4</sub> <sup>[22]</sup>
G15	16.825	368.112 9	368.113 4	1.36	350.102 3, 338.141 5	氧化白屈菜碱	C <sub>20</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>6</sub> <sup>[19]</sup>
G16	13.895	314.138 7	314.139 2	1.59	253.953 5, 194.081 5	阿魏酸酐对羟基苯乙胺	C <sub>18</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>4</sub> <sup>[23]</sup>
G17	14.521	334.107 4	334.107 9	1.50	331.847 3, 319.082 2	去甲基白屈菜红碱	C <sub>20</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>4</sub> <sup>[19]</sup>
G18	9.337	370.164 9	370.165 3	1.08	352.154 9, 321.112 4	隐品碱	C <sub>21</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>5</sub> <sup>[21]</sup>
G19	11.764	340.154 3	340.155 1	2.35	338.139 8, 323.126 7	<i>D</i> -南天竹啡碱	C <sub>20</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>4</sub> <sup>[24]</sup>
G20	10.214	338.138 7	338.139 3	1.77	325.121 9, 323.115 4	去氢南天宁碱	C <sub>20</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>4</sub> <sup>[25]</sup>
G21	4.638	328.154 3	328.154 8	1.52	314.175 7, 265.080 9	金黄紫堇碱	C <sub>19</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>4</sub> <sup>[21]</sup>
G22	10.716	338.138 7	338.139 3	1.77	323.115 4, 308.092 4	四氢刻叶紫堇明碱	C <sub>20</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>4</sub> <sup>[26]</sup>
G23	7.865	370.128 5	370.128 9	1.08	352.118 9, 305.081 2	10-羟基白屈菜碱	C <sub>20</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>6</sub> <sup>[19]</sup>
G24	9.791	354.133 6	354.134 0	1.13	336.123 3, 323.091 8	异白屈菜碱	C <sub>20</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>5</sub> <sup>[19]</sup>
G25	5.452	326.138 7	326.139 2	1.53	277.085 2, 233.114 2	华紫堇碱	C <sub>19</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>4</sub> <sup>[19]</sup>
G26	9.571	354.133 6	354.134 0	1.13	336.123 5, 323.092 1	8-羟基二氢白屈菜红碱	C <sub>20</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>5</sub> <sup>[27]</sup>
G27	5.498	336.086 6	336.086 9	0.89	318.075 6, 290.080 4	8-氧代黄连碱	C <sub>19</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>5</sub> <sup>[28]</sup>
G28	3.627	370.128 5	370.128 9	1.08	352.118 5, 321.076 1	白屈菜明碱	C <sub>20</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>6</sub> <sup>[18]</sup>
G29	13.308	352.154 3	352.154 9	1.70	337.130 8, 308.128 7	去氢紫堇鳞茎碱	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> NO <sub>4</sub> <sup>[21]</sup>
G30	6.142	192.065 5	192.065 7	1.04	192.066 1, 174.053 5	降氧化北美黄连次碱	C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>3</sub> <sup>[28]</sup>

\*与对照品比对的化合物。

\* Compounds compared to standard.

### 3.2 CMCR 对 MCF-7/ADR 细胞耐药性的影响

CCK-8 实验结果表明,阿霉素对 MCF-7/ADR 细胞的 IC<sub>50</sub> 为 (23.58±1.03) μmol/L。如图 1 所示,CMCR 不同配伍比例 (1:1、2:1) 的不同提取部位作用于 MCF/ADR 细胞 72 h 后,抑制率最大的为 CMCR (1:1) 95%乙醇提取部位组,其 IC<sub>50</sub> 为 (450.57±24.18) μg/mL。如图 2 和表 2 所示,CMCR

不同配伍比例 (1:1、2:1) 的不同提取部位联合阿霉素给药后,阿霉素对 MCF-7/ADR 细胞的 IC<sub>50</sub> 均有明显下降,其中逆转耐药倍数最大的为阿霉素联合 CMCR (1:1) 95%乙醇提取部位组,逆转耐药倍数为 11.08。结果表明,CMCR 能有效逆转 MCF-7/ADR 细胞对阿霉素的耐药性,且在一定质量浓度范围内,CMCR 的质量浓度与逆转效果呈正相关。

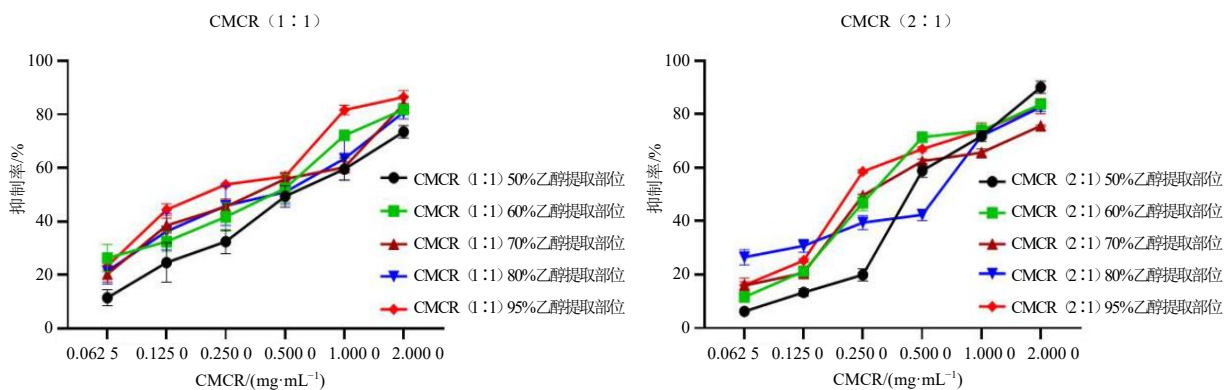


图 1 CMCR 对 MCF-7/ADR 细胞的增殖抑制作用 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 1 Inhibitory effect of CMCR on proliferation of MCF-7/ADR cells ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

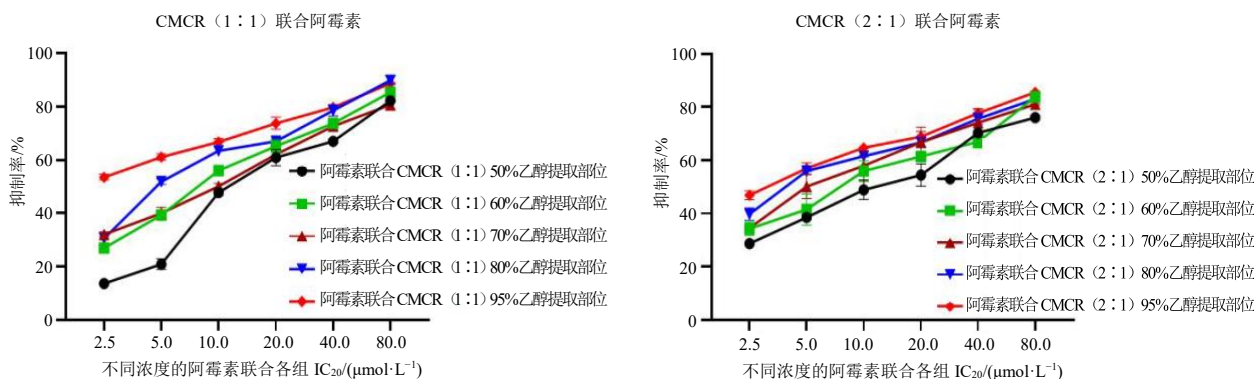


图 2 CMCR 联合阿霉素对 MCF-7/ADR 细胞的增殖抑制作用 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 2 Inhibitory effect of CMCR combined with adriamycin on proliferation of MCF-7/ADR cells ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

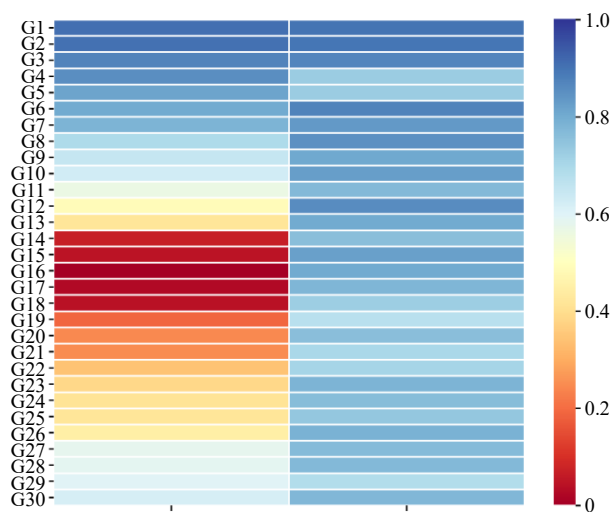
表 2 CMCR 逆转 MCF-7/ADR 细胞对阿霉素耐药的作用

Table 2 Reversing effect of CMCR on MCF-7/ADR cells to adriamycin

组别	逆转耐药倍数
阿霉素	—
阿霉素联合 CMCR (1:1) 95%乙醇提取部位	11.08
阿霉素联合 CMCR (1:1) 80%乙醇提取部位	4.01
阿霉素联合 CMCR (1:1) 70%乙醇提取部位	2.61
阿霉素联合 CMCR (1:1) 60%乙醇提取部位	3.46
阿霉素联合 CMCR (1:1) 50%乙醇提取部位	1.56
阿霉素联合 CMCR (2:1) 95%乙醇提取部位	7.37
阿霉素联合 CMCR (2:1) 80%乙醇提取部位	5.35
阿霉素联合 CMCR (2:1) 70%乙醇提取部位	3.72
阿霉素联合 CMCR (2:1) 60%乙醇提取部位	2.92
阿霉素联合 CMCR (2:1) 50%乙醇提取部位	2.06

### 3.3 CMCR 化学成分与逆转乳腺癌耐药作用的相关性分析

CMCR 共有峰与逆转耐药倍数的 PCC 见图 3-A, 共有 6 种有效成分的|PCC|>0.80, 影响值由大到小排序为 G1>G2>G3>G4>G5>G6。CMCR 共有峰与逆转耐药药效的 GRA 结果如图 3-B 所示, 有 12 种有效成分灰色关联度系数>0.80, 影响值由大到小排序为 G1>G2>G6>G3>G12>G8>G7>G10>G15>G9>G16>G13。对 2 种分析方法的结果进行综合分析可知,同时满足|PCC|>0.80 以及灰色关联度系数>0.80 的有效成分有 5 种, 分别为白屈菜碱 (G1)、延胡索乙素 (G2)、小檗碱 (G3)、



A-Pearson 双变量相关性分析结果; B-GRA 结果。

A-Pearson bivariate correlation analysis results; B-GRA results.

图3 CMCR 不同提取部位共有成分峰面积与逆转耐药作用相关性分析结果

Fig. 3 Correlation analysis between common component peak areas and resistance reversal efficacy of different extraction parts of CMCR

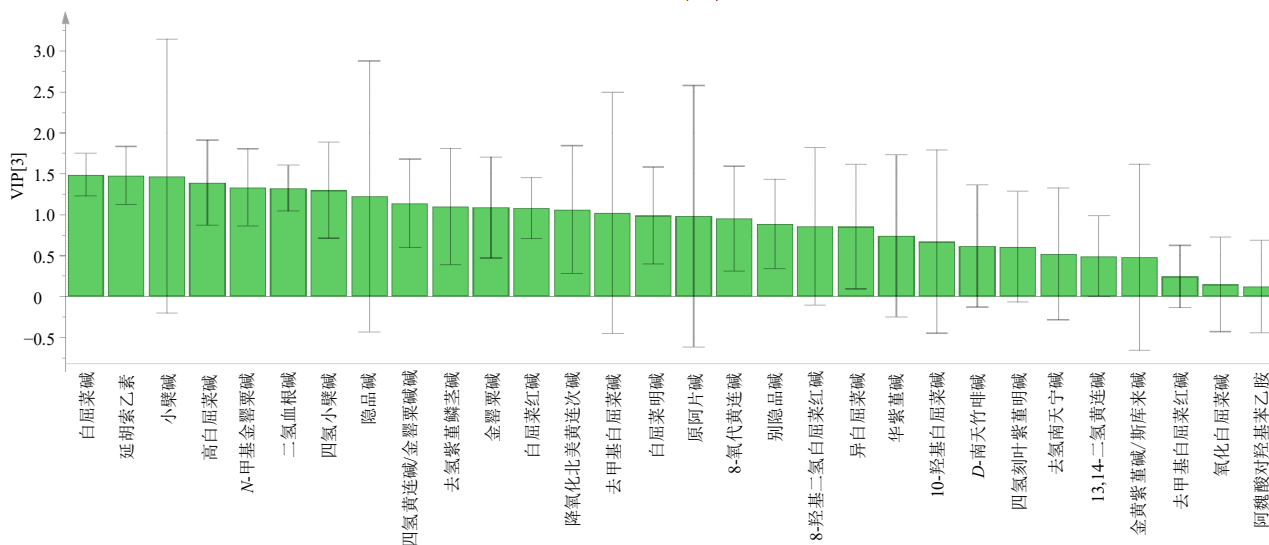


图4 CMCR 不同提取部位共有成分峰面积与逆转耐药作用 PLS 分析的 VIP 图

Fig. 4 VIP map of PLS analysis between common component peak areas and resistance reversal efficacy of different extraction parts of CMCR

增殖抑制作用，以确定二者最佳配伍比例。如图 5 所示，白屈菜碱和延胡索乙素对 MCF-7/ADR 细胞的 IC<sub>20</sub> 分别为 (6.10±0.82)、(6.80±0.43) μmol/L，IC<sub>50</sub> 分别为 (17.80±0.86)、(38.95±1.38) μmol/L，表明白屈菜碱和延胡索乙素对 MCF-7/ADR 细胞具有明显的增殖抑制作用。由图 6 可知，白屈菜碱-延胡索乙素的 ZIP 评分为 5.158，表明 2 种药物的反

二氢血根碱 (G6)、白屈菜红碱 (G10)，初步确定该 5 种化合物为 CMCR 发挥逆转 MCF-7/ADR 细胞耐药作用的潜在药效物质。又由于白屈菜碱和延胡索乙素 2 种成分在 GRA 中关联度最大，分别为 0.900 和 0.897；同时，二者在 Pearson 相关分析中也获得了最大的相关系数，分别为 0.910 和 0.903，说明白屈菜碱和延胡索乙素与 CMCR 逆转耐药的相关性最大。采用 PLS 分析方法进行了再次验证，得到了变量投影重要性 (variable important projection, VIP) 值，见图 4。一般认为|VIP|>1 的 X 变量对于 Y 变量有显著的影响，具有统计学意义。结果显示，白屈菜碱和延胡索乙素的 VIP 值排在第 2 位，它们在逆转耐药药效方面发挥了较大的贡献。这个结论与前 2 种相关性分析结果相印证。因此，进一步选择白屈菜碱和延胡索乙素联合配比应用，进行后续验证实验和机制研究。

### 3.4 白屈菜碱和延胡索乙素配伍比例的确定

为了进一步验证潜在药效物质，采用 CCK-8 法测定白屈菜碱和延胡索乙素对 MCF-7/ADR 细胞的

应是加和相互作用。Synergy Finder 分析 2 种药物有效浓度范围均在 5~10 μmol/L，故延胡索乙素的低、高剂量设定为 5、10 μmol/L。考虑到课题组前期的白屈菜碱对 MCF-7/ADR 细胞耐药药效学研究结果<sup>[10]</sup>，选用 3、6 μmol/L 作为白屈菜碱的低、高剂量。综上，后续实验选用白屈菜碱和延胡索乙素 2 种成分继续探究 CMCR 逆转耐药的相关机制。

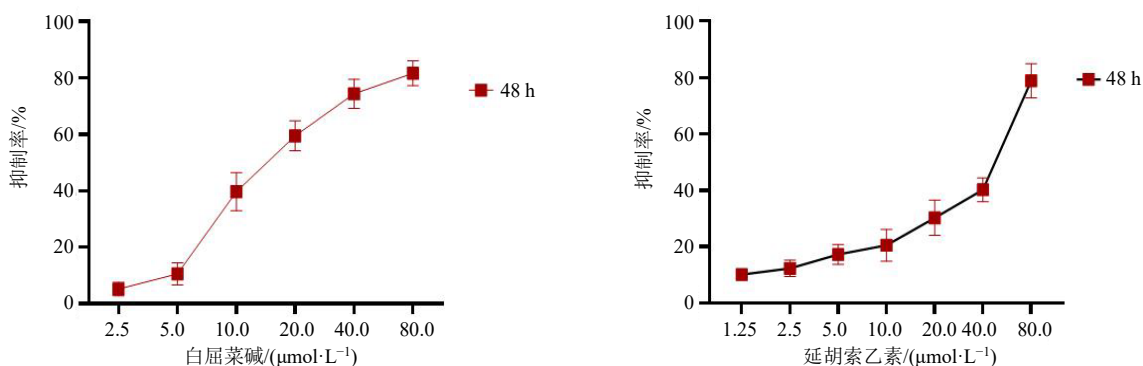


图 5 白屈菜碱和延胡索乙素对 MCF-7/ADR 细胞的增殖抑制作用 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 5 Inhibitory effects of chelidone and tetrahydropalmatine on proliferation of MCF-7/ADR cells ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

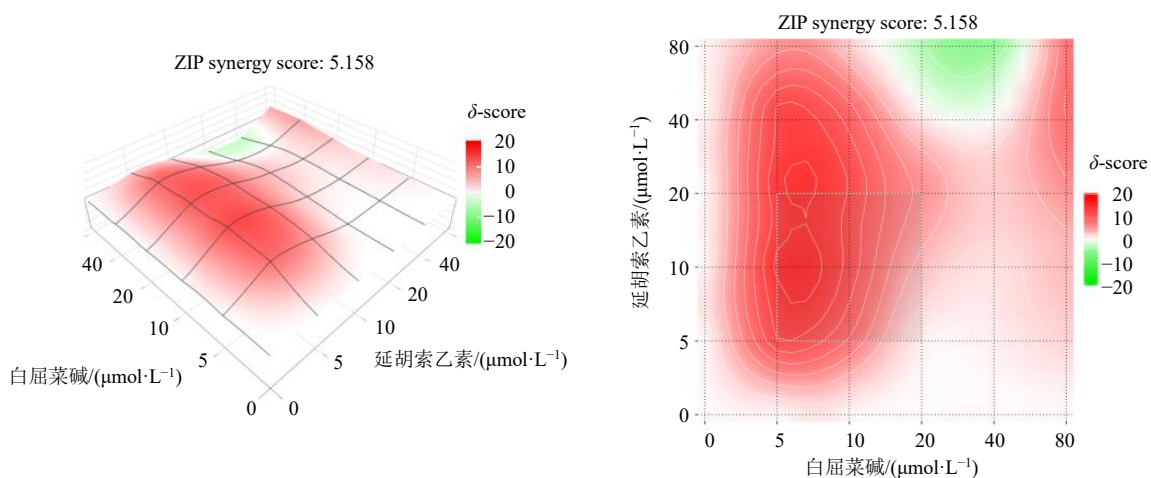


图 6 Synergy Finder 分析结果

Fig. 6 Synergy Finder analysis results

### 3.5 白屈菜碱-延胡索乙素对 MCF-7/ADR 细胞内罗丹明 123 含量的影响

罗丹明 123 作为 P-gp 的底物，通过 P-gp 转运而被排出细胞，易蓄积在 P-gp 低表达的细胞中。荧光显微镜观察白屈菜碱-延胡索乙素对 MCF-7/ADR 细胞内罗丹明 123 含量的影响，可反映白屈菜碱-延胡索乙素对 P-gp 表达的影响。如图 7 所示，对照组

细胞内荧光强度最低；经阿霉素或不同浓度的白屈菜碱-延胡索乙素处理后的耐药细胞，罗丹明 123 在细胞质内的蓄积程度不断增强，呈剂量相关性。与阿霉素组比较，白屈菜碱-延胡索乙素联合 ADR 组的荧光强度随着药物浓度的增加而显著增强，表明白屈菜碱-延胡索乙素降低了 P-gp 对底物的外排，促进 MCF-7/ADR 细胞内罗丹明 123 的蓄积。

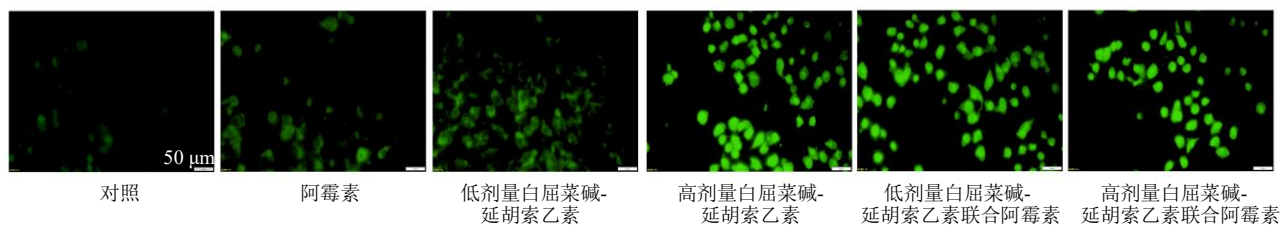


图 7 白屈菜碱-延胡索乙素联合阿霉素对 MCF-7/ADR 细胞内罗丹明 123 蓄积的影响 ( $\times 400$ )

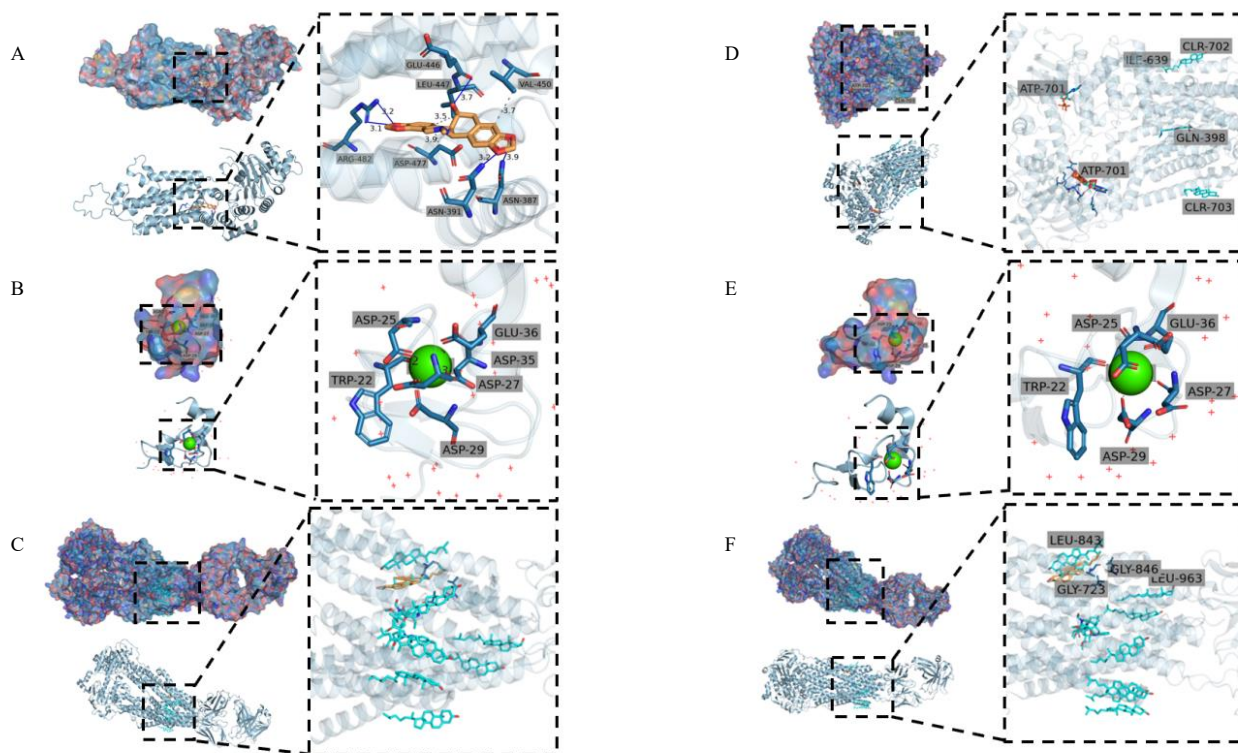
Fig. 7 Effect of chelidone-tetrahydropalmatine combined with adriamycin on accumulation intensity of rhodamine 123 ( $\times 400$ )



### 3.6 白屈菜碱和延胡索乙素单体与 BCRP、LRP、MDR1 蛋白分子对接结果分析

白屈菜碱与 BCRP、LRP、MDR1 耐药相关蛋白的对接得分分别为-35.56、-29.29、-30.96 kJ/mol，延胡索乙素与 BCRP、LRP、MDR1 耐药相关蛋白

的对接得分分别为-29.71、-24.27、-25.52 kJ/mol，结果均小于-16.74 kJ/mol<sup>[29]</sup>，说明其具有潜在的结合活性以及低结合能量的稳定性。选取对接结合能量最低的构象用于对接结合模式分析，并使用 Discovery Studio 4.5.0 软件绘制 3D 和 2D 图像（图 8）。



A~C-白屈菜碱分别与 BCRP、LRP、MDR1 对接示意图；D~F-延胡索乙素分别与 BCRP、LRP、MDR1 对接示意图。

A—C-schematic diagrams of docking of chelidonium with BCRP, LRP and MDR1, respectively; D—F-schematic diagrams of docking of tetrahydropalmatine with BCRP, LRP and MDR1, respectively.

图 8 耐药相关蛋白与活性化合物分子对接作用方式

Fig. 8 Docking mode of drug resistance related proteins and active compounds

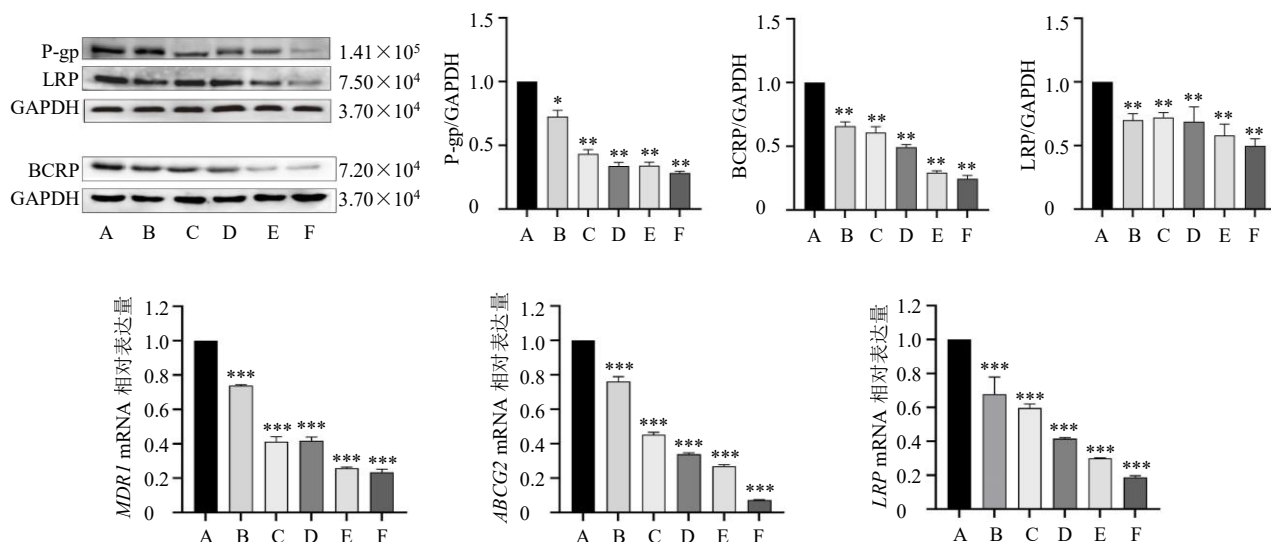
### 3.7 白屈菜碱-延胡索乙素对 MCF-7/ADR 细胞内耐药相关蛋白和基因表达的影响

如图 9 所示，与对照组比较，不同浓度的白屈菜碱-延胡索乙素处理 MCF-7/ADR 细胞后，P-gp、LRP、BCRP 蛋白表达水平平均显著降低 ( $P < 0.01$ )，MDR1、LRP 和 ABCG2 mRNA 表达水平平均显著下调 ( $P < 0.001$ )，且高剂量组联合阿霉素的作用最佳。表明白屈菜碱-延胡索乙素逆转乳腺癌细胞阿霉素耐药作用与下调 P-gp、LRP、BCRP 蛋白及 mRNA 表达有关。

## 4 讨论

新辅助化疗是乳腺癌的主要术前治疗方法。在乳腺癌主要分型中，Luminal A 亚型患者占总体乳腺癌患者的 70%，该亚型患者具有较低的病理分级

和复发风险。然而，对于 Luminal A 亚型患者进行新辅助化疗后，观察到病理完全缓解率低至 10%，即病理学上完全消除肿瘤的比例较低<sup>[30-31]</sup>。阿霉素是一种用于新辅助化疗的蒽环类药物，联合曲妥珠单抗、紫杉醇等药物能显著改善病理完全缓解率，但长期使用会使机体产生耐药性和血液毒性<sup>[32]</sup>。近年来，中药在乳腺癌治疗方面得到广泛应用，其既可以抑制乳腺癌的扩散和转移，还能缓解西医疗法带来的耐药性，是肿瘤化疗辅助治疗的重要手段<sup>[33]</sup>。白屈菜-元胡药对是中医临床治疗乳腺癌的常用药对之一，白屈菜苦辛、微温，入肝、肺、胃；延胡索辛苦而温，入肝、脾、心，二者联用既能治血瘀疼痛，又能治气滞疼痛，故而中医常将白屈菜和元胡合用于肝郁气滞型乳腺癌的早期治疗<sup>[6]</sup>。本课题组



A-对照组; B-阿霉素组; C-低剂量白屈菜碱-延胡索乙素组; D-高剂量白屈菜碱-延胡索乙素组; E-低剂量白屈菜碱-延胡索乙素联合阿霉素组; F-高剂量白屈菜碱-延胡索乙素联合阿霉素组; 与对照组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$ 。

A-control group; B-adriamycin group; C-low-dose chelidoneine-tetrahydropalmatine group; D-high-dose chelidoneine-tetrahydropalmatine group; E-low-dose chelidoneine-tetrahydropalmatine combined with adriamycin group; F-high-dose chelidoneine-tetrahydropalmatine combined with adriamycin group; \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$  vs control group.

图 9 白屈菜碱-延胡索乙素对 MCF-7/ADR 细胞耐药相关蛋白和基因表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 9 Effect of chelidoneine-tetrahydropalmatine on expressions of resistance-related proteins and genes in MCF-7/ADR cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

前期研究以及文献报道表明, 白屈菜和元胡中的有效成分可通过下调乳腺癌耐药细胞中 P-gp 等耐药相关蛋白的表达逆转 MCF-7/ADR 细胞对阿霉素的抗性<sup>[5,34-35]</sup>, 但是 CMCR 逆转乳腺癌阿霉素耐药的作用及药效物质尚未得到系统阐明。

为此, 本研究在采用 UPLC-Q-TOF-MS 阐明 CMCR 不同提取部位化学成分全貌及逆转耐药药效的基础上, 运用 2 种化学计量学方法考察 30 个共有峰峰面积与 CMCR 不同提取部位逆转耐药药效的相关性, 筛选确定白屈菜碱、延胡索乙素、小檗碱、二氢血根碱、白屈菜红碱为 CMCR 逆转乳腺癌阿霉素耐药作用的潜在药效物质。近些年文献研究表明, 白屈菜碱可逆转非小细胞肺癌吉非替尼耐药, 其机制为作用于表皮生长因子受体, 激活磷酸腺苷活化蛋白激酶 (AMP-dependent/activated protein kinase, AMPK) 信号通路, 进而抑制线粒体的氧化磷酸化, 诱导细胞凋亡<sup>[36]</sup>; 延胡索乙素可以通过在 ER $\alpha$  上积累泛素链来促进 ER $\alpha$  降解, 增强 ER $\alpha$  乳腺癌细胞对他莫昔芬的敏感性<sup>[37]</sup>; 小檗碱可激活 AMPK 并降低其下游蛋白缺氧诱导因子-1 $\alpha$  (hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ ) 的含量, 进而抑制 P-gp 表达, 增强阿霉素对乳腺癌耐药细胞的敏

感性<sup>[38]</sup>; 二氢血根碱通过下调 mut-p53 蛋白诱导 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期和 G<sub>2</sub>/M 期阻滞, 通过丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号通路诱导细胞凋亡, 进而抑制胰腺癌 PANC-1 和 SW1990 细胞增殖作用<sup>[39]</sup>; 白屈菜红碱可有效抑制蛋白激酶 Ca (protein kinase Ca, PKCa) 的磷酸化, 降低 MDR1 的转录水平, 抑制 P-gp 对化疗药物的转运功能, 进一步发挥逆转耐药作用<sup>[40]</sup>。以上研究结果提示 CMCR 具有潜在逆转乳腺癌阿霉素耐药的作用, 进一步采用 PLS 分析得出白屈菜碱和延胡索乙素对 MCF-7/ADR 细胞的逆转耐药作用的影响值最大, 且它们又分别归属于 2 种中药的有效成分之一, 故而将白屈菜碱联合延胡索乙素作为 CMCR 发挥逆转耐药作用的配伍成分进行了实验验证和机制探讨。抑制膜转运体的表达是中药逆转阿霉素耐药的机制之一<sup>[41-42]</sup>。本研究采用荧光显微镜观察发现, 白屈菜碱-延胡索乙素可显著增加 MCF-7/ADR 细胞中 P-gp 底物罗丹明 123 的蓄积量。而 Western blotting 和 qRT-PCR 结果也表明, 白屈菜碱-延胡索乙素可降低 P-gp 等耐药蛋白的表达, 说明白屈菜碱-延胡索乙素组分可能是通过下调 P-gp 的转录和表达进而减少阿霉素的外排, 增加细胞内阿霉素浓

度, 最终发挥逆转耐药作用, 但其分子机制尚待进一步深入研究。

本研究基于液质联用技术, 采用体外耐药细胞模型阐明了 CMCR 逆转耐药作用药效物质, 且其药效物质组白屈菜碱-延胡索乙素能够通过下调 MCF-7/ADR 细胞 P-gp、BCRP 和 LRP 蛋白的转录和翻译, 抑制外排蛋白活性, 增加细胞内阿霉素含量蓄积, 进而发挥抗肿瘤作用。本研究为应对乳腺癌患者对阿霉素产生的耐药性问题提供了新的研究思路和方法, 并为进一步研究和开发 CMCR 奠定了基础。但 CMCR 逆转乳腺癌阿霉素耐药性的确切机制还需进一步开展研究加以阐释, 是否存在其他通路参与逆转耐药也是下一步实验开展的方向。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] Siegel R, Miller K, Wagle N S, *et al.* Cancer statistics, 2023 [J]. *CA A Cancer J Clin*, 2023, 73: 17-48.
- [2] Korde LA, Somerfield MR, Carey LA, *et al.* Neoadjuvant chemotherapy, endocrine therapy, and targeted therapy for breast cancer: ASCO guideline [J]. *J Clin Oncol*, 2021, 39(13): 1485-1505.
- [3] Le D T, Bui L T, Nguyen C V, *et al.* Neoadjuvant doxorubicin-paclitaxel combined chemotherapy in patients with inoperable stage III breast cancer: A retrospective cohort study with 10 years of follow-up in Vietnam [J]. *Oncol Ther*, 2023, 11(3): 327-341.
- [4] An J S, Peng C, Tang H L, *et al.* New advances in the research of resistance to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(17): 9644.
- [5] 邹翔, 舒淇, 吴双, 等. 白屈菜-元胡药对抗雌激素受体阳性乳腺癌药效物质及作用机制 [J]. *中国药房*, 2023, 34(8): 935-940.
- [6] 张青, 富琦, 郁仁存常用抗肿瘤药对 [M]. 北京: 科学出版社, 2017: 122-124.
- [7] 洪波, 孟琦, 江健梅, 等. 白屈菜生物碱研究进展 [J]. *人参研究*, 2022, 34(2): 58-62.
- [8] 陈可点, 崔鹤蓉, 成雪皓, 等. 延胡索的药性考证 [J]. *西北药学杂志*, 2023, 38(5): 1-9.
- [9] Deljanin M, Nikolic M, Baskic D, *et al.* *Chelidonium majus* crude extract inhibits migration and induces cell cycle arrest and apoptosis in tumor cell lines [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 190: 362-371.
- [10] 张月. 白屈菜碱逆转人乳腺癌 MCF-7/ADR 细胞耐药的机制研究 [D]. 哈尔滨: 哈尔滨商业大学, 2022.
- [11] 常生, 刘志惠, 韩娜, 等. 东北延胡索块茎中的生物碱及其抗肿瘤活性研究 [J]. *中成药*, 2022, 44(11): 3507-3513.
- [12] Lei Y, Tan J, Wink M, *et al.* An isoquinoline alkaloid from the Chinese herbal plant *Corydalis yanhusuo* W. T. Wang inhibits P-glycoprotein and multidrug resistance-associate protein 1 [J]. *Food Chem*, 2013, 136(3/4): 1117-1121.
- [13] Zhang X Y, Jiang Z Z, Zhang L, *et al.* Identification of prototype compounds and their metabolites in rats' serum from Xuefu Zhuyu Decoction by UPLC-Q-TOF/MS [J]. *Chin Herb Med*, 2023, 15(1): 139-150.
- [14] Su H N, Li X X, Li Y, *et al.* Chemical profiling and rapid discrimination of *Blumea riparia* and *Blumea megacephala* by UPLC-Q-Exactive-MS/MS and HPLC [J]. *Chin Herb Med*, 2023, 15(2): 317-328.
- [15] Zheng S Y, Wang W Y, Aldahdooh J, *et al.* SynergyFinder plus: Toward better interpretation and annotation of drug combination screening datasets [J]. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2022, 20(3): 587-596.
- [16] Wu C T, Wang X, Xu M, *et al.* Intracellular accumulation as an indicator of cytotoxicity to screen hepatotoxic components of *Chelidonium majus* L. by LC-MS/MS [J]. *Molecules*, 2019, 24(13): 2410.
- [17] 曲彤, 李宁, 任慧, 等. 基于 UPLC-Q-Exactive Focus-MS/MS 技术分析藤络宁胶囊中化学成分 [J]. *中国药师*, 2022, 25(12): 2158-2165.
- [18] 杨鹏, 卿志星, 左姿, 等. HPLC-Q-TOF/MS 鉴定白屈菜中异喹啉类生物碱 [J]. *中国现代中药*, 2017, 19(2): 174-182.
- [19] 赵田园. 中药白屈菜中生物碱的分离纯化制备与表征 [D]. 大连: 大连交通大学, 2021.
- [20] Yáñez-Barrientos E, Barragan-Galvez J C, Hidalgo-Figueroa S, *et al.* Neuropharmacological effects of the dichloromethane extract from the stems of *Argemone ochroleuca* Sweet (Papaveraceae) and its active compound dihydrosanguinarine [J]. *Pharmaceuticals*, 2023, 16(8): 1175.
- [21] 韩彦琪, 许浚, 龚苏晓, 等. HPLC-QTOF/MS 方法分析元胡止痛方的化学成分 [J]. *药学报*, 2017, 52(1): 132-138.
- [22] Paulsen J, Yahyazadeh M, Hänsel S, *et al.* 13,14-Dihydrocoptisine: The genuine alkaloid from *Chelidonium majus* [J]. *Phytochemistry*, 2015, 111: 149-153.
- [23] Yang L J, Yang Z D, Li Z J, *et al.* Steptetrandrine A-D, bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Stephania tetrandra* [J]. *Nat Prod Res*, 2023, 37(2): 204-215.
- [24] 张铁军, 许浚, 韩彦琪, 等. 中药质量标志物 (Q-marker) 研究: 延胡索质量评价及质量标准研究 [J]. *中草药*, 2016, 47(9): 1458-1467.
- [25] 陈斯. 延胡索化学成分和药理作用研究进展 [J]. *中医*

- 药信息, 2021, 38(7): 78-82.
- [26] 金书屹, 李红婷, 汪万利, 等. 紫堇属岩黄连的化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中成药, 2022, 44(5): 1545-1552.
- [27] Zuo G Y, Meng F Y, Han J, *et al.* *In vitro* activity of plant extracts and alkaloids against clinical isolates of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing strains [J]. *Molecules*, 2011, 16(7): 5453-5459.
- [28] Qian X C, Zhang L, Tao Y, *et al.* Simultaneous determination of ten alkaloids of crude and wine-processed *Rhizoma Coptidis* aqueous extracts in rat plasma by UHPLC-ESI-MS/MS and its application to a comparative pharmacokinetic study [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2015, 105: 64-73.
- [29] 李玲, 李佳蔚, 张月梅, 等. 基于分子对接预测靶点 ACE2 和 IL-6R 研究归芪白术方治疗新型冠状病毒肺炎的物质基础及其作用机制 [J]. 甘肃中医药大学学报, 2020, 37(2): 1-9.
- [30] Collins P M, Brennan M J, Elliott J A, *et al.* Neoadjuvant chemotherapy for luminal a breast cancer: Factors predictive of histopathologic response and oncologic outcome [J]. *Am J Surg*, 2021, 222(2): 368-376.
- [31] Zhu Z, Shen H Y, Xu J L, *et al.* GATA3 mediates doxorubicin resistance by inhibiting CYB5R2-catalyzed iron reduction in breast cancer cells [J]. *Drug Resist Updat*, 2023, 69: 100974.
- [32] Pathak M, Deo S V, Dwivedi S N, *et al.* Regimens of neoadjuvant chemotherapy in the treatment of breast cancer: A systematic review & network meta-analysis with PRISMA-NMA compliance [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2020, 153: 103015.
- [33] 黄月维, 刘燕, 农丽, 等. 中药在乳腺癌治疗中的作用及可能的机制 [J]. 广西医学, 2020, 42(9): 1131-1133.
- [34] Deljanin M, Nikolic M, Baskic D, *et al.* *Chelidonium majus* crude extract inhibits migration and induces cell cycle arrest and apoptosis in tumor cell lines [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 190: 362-371.
- [35] Gao J L, Shi J M, He K, *et al.* Yanhusuo extract inhibits metastasis of breast cancer cells by modulating mitogen-activated protein kinase signaling pathways [J]. *Oncol Rep*, 2008, 20(4): 819-824.
- [36] Xie Y J, Gao W N, Wu Q B, *et al.* Chelidonine selectively inhibits the growth of gefitinib-resistant non-small cell lung cancer cells through the EGFR-AMPK pathway [J]. *Pharmacol Res*, 2020, 159: 104934.
- [37] Xia X H, He J C, Liu B, *et al.* Targeting ER $\alpha$  degradation by *L*-tetrahydropalmatine provides a novel strategy for breast cancer treatment [J]. *Int J Biol Sci*, 2020, 16(12): 2192-2204.
- [38] Pan Y, Zhang F, Zhao Y W, *et al.* Berberine enhances chemosensitivity and induces apoptosis through dose-orchestrated AMPK signaling in breast cancer [J]. *J Cancer*, 2017, 8(9): 1679-1689.
- [39] Wu S Z, Xu H C, Wu X L, *et al.* Dihydranguinarine suppresses pancreatic cancer cells via regulation of mut-p53/WT-p53 and the Ras/Raf/Mek/Erk pathway [J]. *Phytomedicine*, 2019, 59: 152895.
- [40] 曹喆, 王丽娟, 吴明辉, 等. 白屈菜红碱逆转人乳腺癌多药耐药的机制 [J]. 中国医学科学院学报, 2011, 33(1): 45-50.
- [41] Chen Y L, Li X H, Shi L, *et al.* Combination of 7-*O*-geranylquercetin and microRNA-451 enhances antitumor effect of adriamycin by reserving P-gp-mediated drug resistance in breast cancer [J]. *Aging*, 2022, 14(17): 7156-7169.
- [42] 李雨璇, 刘春亮, 袁琴, 等. 追毒方调控 c-JUN 抑制糖基化异常逆转三阴性乳腺癌耐药的机制 [J]. 南京中医药大学学报, 2023, 39(5): 474-482.

[责任编辑 李亚楠]