

## 基于细胞药动学的斑蝥素/黄芩苷配伍抗肝癌增效机制研究

黄莉<sup>1,2</sup>, 金凯<sup>3</sup>, 王晨阳<sup>1</sup>, 肖望重<sup>1</sup>, 王滔<sup>1</sup>, 郑飘<sup>4</sup>, 王璐<sup>1</sup>, 马杰<sup>5</sup>, 刘平安<sup>2\*</sup>

1. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南 长沙 410007

2. 湖南省中医药研究院, 湖南 长沙 410013

3. 湖南省教育科学研究院, 湖南 长沙 410005

4. 湖南中医药大学第二附属医院, 湖南 长沙 410005

5. 湖南省药品检验检测研究院, 湖南 长沙 410001

**摘要:** **目的** 基于细胞药动学探究斑蝥素与黄芩苷配伍在亚细胞水平的分布规律, 阐明其抗肝癌的增效机制。 **方法** 以人肝癌 HepG2 细胞为模型, 采用超高效液相色谱-串联质谱 (ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS) 定量分析单药 (斑蝥素 6  $\mu\text{g/mL}$ 、黄芩苷 30  $\mu\text{g/mL}$ ) 及配伍组 (斑蝥素 6  $\mu\text{g/mL}$  + 黄芩苷 30  $\mu\text{g/mL}$ ) 给药后 12 h 内, 整体细胞及细胞核、线粒体、内质网和溶酶体各细胞器中药物浓度的动态变化, 并应用 Phoenix WinNonlin 软件非房室模型计算药动学参数。 **结果** 在整体细胞水平, 配伍使斑蝥素的胞内药时曲线下面积 (area under the curve,  $\text{AUC}_{0-12\text{h}}$ ) 增加 48.9%, 清除率降低 ( $P < 0.05$ ), 但未显著影响黄芩苷的药动学行为。在亚细胞层面, 配伍使斑蝥素与黄芩苷在细胞核、溶酶体、线粒体、内质网内的  $\text{AUC}_{0-12\text{h}}$  分别增加了 93.5%、46.4%、38.3%、52.3% 和 68.4%、40.0%、41.0%、46.7% ( $P < 0.05$ 、0.01)。此外, 配伍后 2 种药物在线粒体内达峰时间 ( $t_{\text{max}}$ ) 提前, 且斑蝥素在内质网中的平均驻留时间 (mean residence time,  $\text{MRT}_{0-12\text{h}}$ ) 显著延长 ( $P < 0.01$ ), 表明两者配伍实现了时空协同的药物递送。 **结论** 斑蝥素/黄芩苷配伍可通过协同优化药物在细胞核、线粒体、内质网及溶酶体等关键亚细胞结构的分布, 进而可能通过诱导 DNA 损伤、加速线粒体介导细胞凋亡及促进内质网应激等途径, 增强抗肝癌效果, 为基于细胞器靶向的中药配伍设计提供了理论依据。

**关键词:** 斑蝥素; 黄芩苷; 中药配伍; 抗肝癌; 细胞药动学; 亚细胞分布

中图分类号: R285.61 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2026)01-0185-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.01.018

## Synergistic anti-hepatocarcinoma mechanism of cantharidin/baicalin compatibility based on cellular pharmacokinetics

HUANG Li<sup>1,2</sup>, JIN Kai<sup>3</sup>, WANG Chenyang<sup>1</sup>, XIAO Wangzhong<sup>1</sup>, WANG Tao<sup>1</sup>, ZHENG Piao<sup>4</sup>, WANG Lu<sup>1</sup>, MA Jie<sup>5</sup>, LIU Ping'an<sup>2</sup>

1. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, China

2. Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha 410013, China

3. Hunan Academy of Education Sciences, Changsha 410005, China

4. The Second Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410005, China

5. Hunan Institute for Drug Control, Changsha 410001, China

**Abstract: Objective** To investigate the subcellular distribution patterns of the combination of cantharidin (CTD) and baicalin (BA) based on cell pharmacokinetics and elucidate the synergistic mechanism against hepatocellular carcinoma. **Methods** Using human hepatoma HepG2 cells as the model, the dynamic concentrations of the drugs in whole cells and organelles (nucleus, mitochondria, endoplasmic reticulum, and lysosomes) over 12 h after administration of single drugs (CTD 6  $\mu\text{g/mL}$ , BA 30  $\mu\text{g/mL}$ ) and their combination (CTD 6  $\mu\text{g/mL}$  + BA 30  $\mu\text{g/mL}$ ) were quantitatively analyzed by ultra-high performance liquid chromatography-tandem

收稿日期: 2025-09-07

基金项目: 湖南省卫生健康委员会项目 (202213014042); 湖南省教育厅优秀青年项目 (22B0375); 湖南省自然科学基金项目 (2022JJ80023); 国家中医药管理局全国老药工传承工作室建设项目 (国中医药人教函[2024]255 号)

作者简介: 黄莉, 副主任药师, 硕士生导师, 研究方向为中药质量控制与新药研发。E-mail: Huanglily0101@hnuem.edu.cn

\*通信作者: 刘平安, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药复方物质基础和质量控制研究。E-mail: 723679086@qq.com

mass spectrometry (UPLC-MS/MS). Pharmacokinetic parameters were calculated using a non-compartmental model with Phoenix WinNonlin software. **Results** At the whole-cell level, the combination increased the intracellular area under the curve ( $AUC_{0-t}$ ) of CTD by 48.9% and decreased its clearance ( $P < 0.05$ ), but did not significantly affect the pharmacokinetics of BA. At the subcellular level, the combination significantly increased the  $AUC_{0-t}$  of CTD and BA in nucleus, lysosome, mitochondria and endoplasmic reticulum by 93.5%, 46.4%, 38.3%, 52.3%, and 68.4%, 40.0%, 41.0%, and 46.7%, respectively ( $P < 0.05, 0.01$ ). Furthermore, the time to reach peak concentration ( $t_{max}$ ) for both drugs in mitochondria was earlier in the combination group, and the mean residence time ( $MRT_{0-t}$ ) of CTD in the endoplasmic reticulum was significantly prolonged ( $P < 0.01$ ), indicating a spatiotemporally synergistic drug delivery optimization. **Conclusions** The combination of CTD and BA could synergistically optimize the distribution of drugs in key subcellular structures such as nucleus, mitochondria, endoplasmic reticulum and lysosomes, and may enhance the anti-hepatocellular carcinoma effect by inducing DNA damage, accelerating mitochondria-mediated apoptosis and promoting endoplasmic reticulum stress, which provides a theoretical basis for the design of traditional Chinese medicine combinations based on organelle targeting.

**Key words:** cantharidin; baicalin; traditional Chinese medicine combination; anti-hepatocellular carcinoma; cellular pharmacokinetics; subcellular distribution

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 作为一种全球发病率与致死率均高的恶性肿瘤, 其临床治疗长期面临化疗耐药性强和系统毒性难以耐受等关键瓶颈<sup>[1]</sup>。在此背景下, 具备多靶点协同作用 and 低耐药性潜力的传统中药活性成分逐渐成为肿瘤治疗研究的前沿方向<sup>[2-3]</sup>。斑蝥素是斑蝥属中药的代表性活性成分, 研究已证实斑蝥素能通过诱导细胞周期阻滞和线粒体依赖性凋亡来抑制 HCC 进展, 但其严重的肾毒性和狭窄的治疗窗口极大地限制了其临床转化<sup>[4]</sup>。黄芩苷作为黄芩的主要药效物质, 不仅具有抗炎、抗氧化活性, 还可通过调控肿瘤微环境增强化疗敏感性<sup>[5-6]</sup>。在中医理论中, 斑蝥性猛有毒, 功擅破血逐瘀、攻毒蚀疮; 而黄芩性寒, 长于清热燥湿、泻火解毒; 二者配伍, 正合相使为用之法, 以黄芩之寒性制约斑蝥之峻烈毒性, 并协同增强其清热攻癌之效。这一配伍思想的现代应用可见于临床实践, 如斑蝥酸钠维生素 B<sub>6</sub> 注射液常与以黄芩为君药的痰热清注射液联用, 对治疗肺癌、肝癌等引起的癌性发热有良好疗效, 为斑蝥素与黄芩苷的现代配伍研究提供了重要参考<sup>[7]</sup>。课题组前期通过体内外研究初步证实, 黄芩苷与斑蝥素配伍不仅能显著降低斑蝥素单药毒性, 还能改变其体内药动学行为, 从而协同增强抗肿瘤效应<sup>[8-9]</sup>。

为了更深层次揭示斑蝥素与黄芩苷配伍的增效减毒机制, 有必要在细胞乃至亚细胞水平上探究药物的作用规律。细胞药动学是将细胞看作一个微观有机体, 定量研究药物在细胞内吸收、转运、分布、代谢和外排的动力学过程, 并通过建立数学模型阐明药物在细胞内的处置规律, 预测、评价药物

在细胞水平药效的一门学科<sup>[10]</sup>。研究表明, 药物在细胞内的时空分布特征及其与特定细胞器的相互作用模式, 是决定药效强度与毒性谱的关键因素<sup>[11]</sup>。值得关注的是, 斑蝥素与黄芩苷能分别通过抑制线粒体膜电位和激活内质网应激, 从而触发凋亡级联反应与增强肿瘤细胞对凋亡信号的敏感性<sup>[12-13]</sup>。此外, 溶酶体作为药物胞内蓄积的重要场所, 其膜稳定性可能通过调控药物释放动力学影响药效持续时间; 细胞核内药物浓度的动态变化则直接关联 DNA 损伤修复通路的激活效率<sup>[14]</sup>。

尽管现有研究已初步证实斑蝥素/黄芩苷配伍对肿瘤细胞整体增殖与凋亡的调控作用, 但两者抗肿瘤增效机制是否与通过优化药物在亚细胞结构 (如溶酶体、细胞核、线粒体及内质网) 中的动态分布有关, 目前尚不明确。本研究以人肝癌 HepG2 细胞为模型, 采用超高效液相色谱-串联质谱 (ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS) 定量分析方法, 系统解析斑蝥素与黄芩苷单用及联用后, 在细胞整体及细胞核、溶酶体、线粒体和内质网中的含量动态变化, 以期从亚细胞药动学视角揭示斑蝥素/黄芩苷配伍的增效机制, 为基于细胞器靶向递送的中药联合用药方案设计提供创新性理论依据。

## 1 材料

### 1.1 细胞

HepG2 细胞购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

### 1.2 药品与试剂

斑蝥素原料药 (批号 TZ180408, 质量分数 99.4%) 购自西安通泽生物科技有限公司; 黄芩苷原

料药(批号 B20570, 质量分数 $\geq 98.0\%$ )、卡马西平对照品(批号 J25GB152056, 质量分数 $\geq 98.0\%$ )均购自上海源叶生物科技有限公司;斑蝥素对照品(批号 110783-202206, 质量分数 96.4%)、黄芩苷对照品(批号 110715-202122, 质量分数 94.2%)均购自中国食品药品检定研究院;质谱级甲酸、甲醇、乙腈,均购自德国默克医药生物科技有限公司;色谱用超纯水由 Pureload Classic UVF 超纯水仪制备;其余试剂为分析纯,均购自国药集团化学试剂有限公司;特级胎牛血清(fetal bovine serum, FBS, 批号 SA230818)、DMEM 培养基(批号 WHB825N071)、PBS 缓冲液(批号 WHB824N031)均购自武汉普诺赛生命科技有限公司;0.25%胰蛋白酶-EDTA 消化液(批号 01100017)、无血清细胞冻存液(批号 01100194)均购自北京兰杰柯科技有限公司;青霉素-链霉素混合液(批号 P1400)购自北京索莱宝科技有限公司;BCA 蛋白浓度测定试剂盒(批号 P0012)、细胞线粒体分离试剂盒(批号 C3601)均购自碧云天生物技术有限公司;细胞核分离试剂盒(批号 52009-10)购自上海伯豪生物技术有限公司;内质网分离试剂盒(批号 ER0100)购自美国 Sigma-Aldrich 公司;溶酶体分离试剂盒(批号 LY-034)购自英文特生物技术(北京)有限公司;二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO, 批号 P24000013804)购自赛国生物科技有限公司;其余耗材均购自美国 Corning 公司。

### 1.3 仪器

Pureload Classic UVF 型超纯水仪制备(法国威立雅公司);W-CJ-2FD 型超净工作台(苏州净化设备有限公司);Galaxy170R 型二氧化碳培养箱(德国 Eppendorf 公司);DW-86L388J 型超低温冰箱(海尔集团);SCIENTZ-II D 型超声波细胞粉碎机、SCIENTA-10N 型真空冷冻干燥机(宁波新芝生物科技股份有限公司);Z32HK 型高速冷冻离心机(德国贺默仪器科技有限公司);LC-DCY-24GP 型 48 孔干式氮吹仪(力辰科技有限公司);SynergyH1 型多功能酶标仪(美国 Biotek 公司);Allegra X-22R 型多功能台式冷冻离心机(美国 Beckman Coulter 公司);MIKRO20 型台式微量离心机(德国 Hettich 公司);SR205DU/A 型十万分之一分析天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司);Agilent 1290 Infinity 型超高效液相色谱、Agilent 6470A 型三重四级杆串联质谱仪(美国安捷伦科技公司)。

## 2 方法

### 2.1 溶液制备

**2.1.1 斑蝥素溶液的制备** 精密称取斑蝥素 3.0 mg 溶于 0.5 mL DMSO 中,超声使其完全溶解,得质量浓度为 6 mg/mL 的斑蝥素母液,置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存,备用。

**2.1.2 黄芩苷溶液的制备** 精密称取黄芩苷 15.0 mg 溶于 0.5 mL DMSO 中,超声使其完全溶解,得质量浓度为 30 mg/mL 的黄芩苷母液,置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存,备用。

**2.1.3 混合溶液的制备** 精密量取斑蝥素母液、黄芩苷母液各 10  $\mu\text{L}$ ,共同溶于 80  $\mu\text{L}$  DMSO 中,涡旋振荡 3 min 使其充分混匀,得斑蝥素质量浓度为 600  $\mu\text{g/mL}$ 、黄芩苷质量浓度为 3 mg/mL 的混合溶液,使用时以完全培养基稀释得斑蝥素质量浓度为 6  $\mu\text{g/mL}$ 、黄芩苷质量浓度为 30  $\mu\text{g/mL}$  的混合给药溶液,现配现用。

### 2.2 细胞给药与样品处理

**2.2.1 细胞给药与收集** 将对数期 HepG2 细胞接种于 T25 细胞培养瓶中,待细胞生长至 90%时,吸除培养基,给药前收集空白组细胞,其余组分别加入用完全培养基配制的 6  $\mu\text{g/mL}$  斑蝥素、30  $\mu\text{g/mL}$  黄芩苷与含 6  $\mu\text{g/mL}$  斑蝥素和 30  $\mu\text{g/mL}$  黄芩苷的混合溶液 4 mL,  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  孵育,分别于 0.5、1、2、4、6、8、10、12 h 吸除药液,并用 PBS 缓冲液洗涤细胞 3 次,将细胞刮出后超声裂解细胞, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存。每个时间点设置 3 组重复。

**2.2.2 样品处理** 取“2.2.1”项下细胞样品于冰浴解冻,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 30 min。按 BCA 蛋白浓度测定试剂盒说明测定蛋白含量。取 400  $\mu\text{L}$  细胞裂解液,加入内标卡马西平(0.22  $\mu\text{g/mL}$ ) 10  $\mu\text{L}$ ,混匀后加入 500  $\mu\text{L}$  甲醇,涡旋振荡 5 min,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 30 min,取上清液  $\text{N}_2$  吹干,残渣加入 100  $\mu\text{L}$  0.1%甲酸-甲醇溶液复溶,涡旋振荡 5 min,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 30 min,吸取上清液过 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜,进行 UPLC-MS/MS 分析。

**2.2.3 细胞器提取与处理** 取“2.2.1”项下细胞样品于冰浴解冻,分别按照细胞核、溶酶体、线粒体及内质网分离试剂盒操作说明,分离细胞核、溶酶体、线粒体及内质网, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存。样品处理方法同“2.2.2”项。

### 2.3 UPLC-MS/MS 测定斑蝥素与黄芩苷含量

**2.3.1 色谱条件** ZORBAX Eclipse Plus  $\text{C}_{18}$  色谱柱

(50 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: 0~0.3 min, 10% B; 0.3~3 min, 10%~20% B; 3~4 min, 20%~40% B; 4~5.5 min, 40%~98% B。柱温为 30 ℃; 体积流量为 0.4 mL/min; 进样量为 2 μL。每次进样前预平衡 5 min, 进样 2 min 后进行数据采集。

**2.3.2 质谱条件** 用电喷雾 AJS ESI 离子源, 采用动态多反应监测 (dynamic multiple reaction monitoring, dMRM) 模式进行正离子扫描, 干燥气温度为 325 ℃; 干燥气体积流量为 6 L/min; 喷嘴电压为 40 psi (1 psi=6.895 kPa); 鞘气温度为 350 ℃; 鞘气体积流量为 11 L/min; 毛细管电压为

3 500 V, 喷嘴电压为 500 V。斑蝥素、黄芩苷和卡马西平的质谱参数见表 1, 其相应色谱图见图 1。经方法学考察, 细胞内源性物质不会干扰斑蝥素、黄芩苷和卡马西平的测定, 且线性关系、定量下限、准确度、提取回收率等均符合生物样品药物浓度测定方法学要求。

## 2.4 数据处理与统计分析

结果以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 Phoenix WinNonlin 8.1.0 药动学软件和非房室模型计算得出药动学参数。用 GraphPad Prism 9 软件进行统计分析与作图, 当数据正态分布并且方差齐时, 两组间比较采用  $t$  检验, 多组间比较应用单因素方差分析。

表 1 各成分离子对及质谱参数

Table 1 Ion pairs and main mass spectrum parameters of each components

成分	$t/\text{min}$	相对分子质量 ( $m/z$ )	母离子 ( $m/z$ )	子离子 ( $m/z$ )	碎裂电压/V	碰撞能/V
斑蝥素	2.939	196.20	197.10	123.1*, 151.0	149	13
黄芩苷	4.440	446.37	447.10	271.1*, 123.0	122	24
卡马西平	5.039	236.27	237.10	194.1*, 193.1	146	13

\*为定量离子。

\* is quantitative ion.

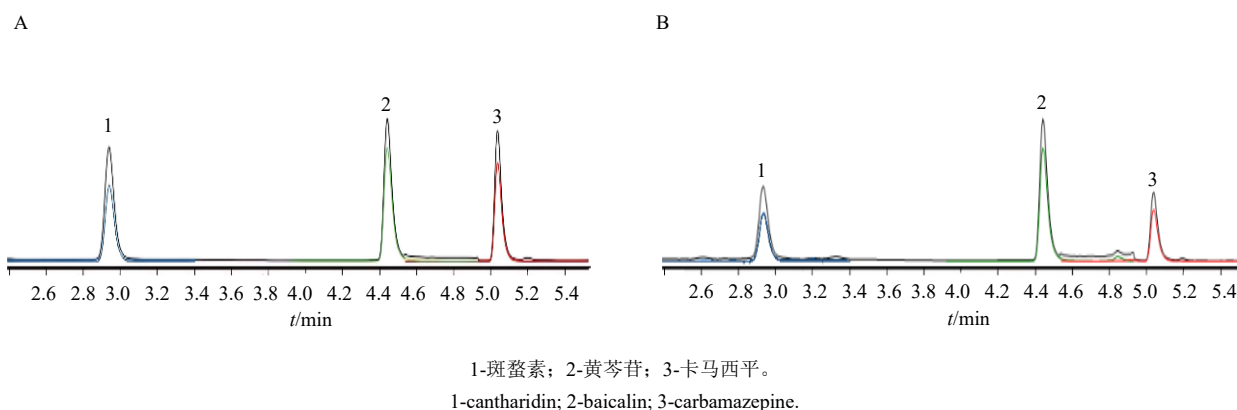


图 1 各成分对照品 (A) 和细胞样品 (B) 色谱图

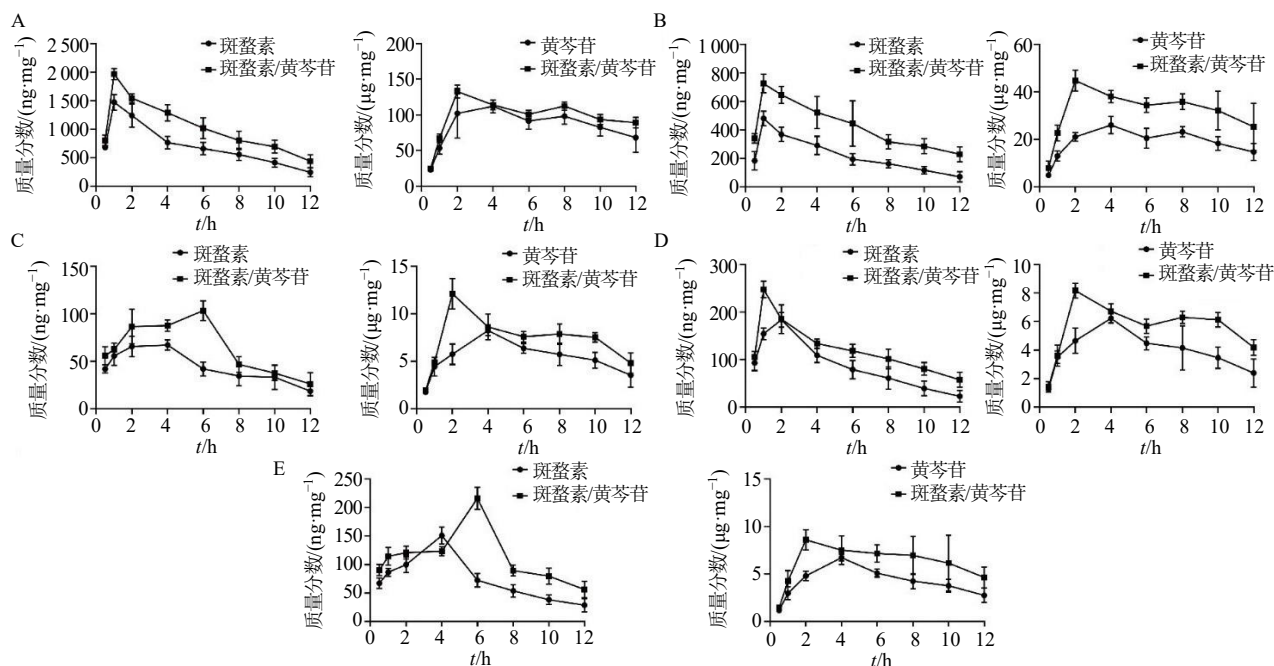
Fig. 1 Representative MRM chromatograms of reference substances (A) and cell sample (B)

## 3 结果

### 3.1 配伍对斑蝥素、黄芩苷在 HepG2 细胞内药动学的影响

斑蝥素与黄芩苷在 HepG2 细胞中药时曲线变化见图 2-A, 药动学参数见表 2。结果显示, 给药 30 min 后, HepG2 细胞内均能检测到斑蝥素与黄芩苷, 表明 2 种药物均能较快地进入 HepG2 细胞内发挥作用; 且斑蝥素在 HepG2 细胞内的浓度变化呈典型的单峰特征, 于给药 1 h 后逐渐降低, 而黄芩苷则呈独特的双峰现象, 分别在 2、8 h 出现浓度峰值,

该特征提示黄芩苷在细胞内的分布、代谢或转运过程存在阶段性变化, 可能与细胞内的再循环过程或外排泵的周期性抑制有关, 且与体内趋势一致<sup>[15]</sup>。药动学参数对比显示, 与斑蝥素单药组相比, 配伍组中斑蝥素在 HepG2 细胞内的达峰浓度 ( $C_{\max}$ ) 和药时曲线下面积 (area under the curve,  $AUC_{0 \sim t}$ ) 均显著升高 ( $P < 0.01$ ),  $AUC_{0 \sim t}$  较单药组升高 48.9%, 平均驻留时间 (mean residence time,  $MRT_{0 \sim t}$ ) 有所延长 ( $P < 0.05$ ), 清除率 (CL) 降低 38.1% ( $P < 0.05$ ), 表明配伍给药能够增加斑蝥素在 HepG2 细



A-细胞内; B-细胞核; C-溶酶体; D-线粒体; E-内质网。

A-intracellular; B-nuclei; C-lysosome; D-mitochondria; E-endoplasmic reticulum.

图 2 斑蝥素与黄芩苷在 HepG2 细胞及不同细胞器内的药-时曲线图 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Fig. 2 Concentration-time curves of cantharidin and baicalin in HepG2 cells and different organelles ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

表 2 斑蝥素与黄芩苷在 HepG2 细胞内的药动学参数 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 2 Pharmacokinetic parameters of cantharidin and baicalin in HepG2 cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

参数	单位	斑蝥素		黄芩苷	
		单药组	配伍组	单药组	配伍组
$t_{1/2}$	h	4.71 $\pm$ 0.67	5.56 $\pm$ 0.55	9.50 $\pm$ 6.70	12.39 $\pm$ 2.90
$C_{max}$	ng·mg <sup>-1</sup>	1 471.30 $\pm$ 138.93	1 964.62 $\pm$ 99.79**	118 922.07 $\pm$ 20 584.00	132 689.89 $\pm$ 9 162.44
$AUC_{0\sim t}$	h·ng·mg <sup>-1</sup>	8 516.65 $\pm$ 868.80	12 680.49 $\pm$ 794.50**	1 046 196.32 $\pm$ 167 028.15	1 197 810.95 $\pm$ 38 114.74
$MRT_{0\sim t}$	h	4.56 $\pm$ 0.15	4.91 $\pm$ 0.06*	6.10 $\pm$ 0.03	6.10 $\pm$ 0.11
CL	mg·h <sup>-1</sup>	2.39 $\pm$ 0.40	1.48 $\pm$ 0.04*	0.07 $\pm$ 0.03	0.04 $\pm$ 0.01
$V_d$	mg	16.01 $\pm$ 0.32	11.83 $\pm$ 0.85**	0.74 $\pm$ 0.09	0.76 $\pm$ 0.05

与单药组比较: \* $P<0.05$  \*\* $P<0.01$ , 下表同。

\* $P<0.05$  \*\* $P<0.01$  vs single-drug group, same as below tables.

胞内的暴露量, 延长其驻留时间, 并减慢其清除速率, 从而可能增强其药理作用, 这种变化可能与黄芩苷抑制了斑蝥素的外排或减慢其代谢速度有关。然而配伍给药对黄芩苷的药动学参数 ( $C_{max}$ 、 $AUC_{0\sim t}$  及  $MRT_{0\sim t}$  等) 均无显著影响, 提示黄芩苷从细胞整体层面而言, 其处置过程未因配伍而发生明显改变。

### 3.2 配伍对斑蝥素、黄芩苷 HepG2 细胞器内药动学的影响

**3.2.1 细胞核的药动学研究** 斑蝥素与黄芩苷在 HepG2 细胞核中药时曲线变化见图 2-B, 药动学参数见表 3。结果显示, 给药 30 min 时, 配伍组中斑蝥素在 HepG2 细胞核内的浓度迅速升高, 斑蝥素在

单药组与配伍组中均于 1 h 时达到浓度峰值; 配伍组的黄芩苷浓度达峰时间较单药组提前 2 h, 且仍保留双峰特征。从药动学参数可知, 与单药组相比, 配伍组显著提高斑蝥素在细胞核内的  $C_{max}$  和  $AUC_{0\sim t}$  ( $P<0.01$ ), 并显著降低其 CL ( $P<0.01$ ), 表明配伍给药主要通过增加斑蝥素在细胞核内的蓄积和降低其清除速度而增强其药理作用; 此外, 配伍也显著提高黄芩苷的  $C_{max}$  和  $AUC_{0\sim t}$  ( $P<0.01$ ), 但对斑蝥素与黄芩苷的半衰期 ( $t_{1/2}$ )、 $MRT_{0\sim t}$  等其他参数均无显著影响。斑蝥素与黄芩苷两者配伍后的细胞核内代谢差异, 在 HepG2 细胞核内的药动学差别可能与物理化学性质差异及配伍对其核转运的影响有关。

表 3 斑蝥素与黄芩苷在 HepG2 细胞核内的药动学参数 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )Table 3 Pharmacokinetic parameters of cantharidin and baicalin in nuclei of HepG2 cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

参数	单位	斑蝥素		黄芩苷	
		单药组	配伍组	单药组	配伍组
$t_{1/2}$	h	3.76 ± 1.40	6.10 ± 1.73	9.68 ± 8.95	15.75 ± 19.78
$C_{\max}$	ng·mg <sup>-1</sup>	479.34 ± 51.33	724.20 ± 65.79**	26 476.72 ± 2 988.40	44 723.66 ± 4 349.10**
$AUC_{0 \sim t}$	h·ng·mg <sup>-1</sup>	2 628.67 ± 68.21	5 094.20 ± 662.94**	234 962.29 ± 20 391.88	395 562.52 ± 33 604.34**
$MRT_{0 \sim t}$	h	4.50 ± 0.42	4.95 ± 0.08	6.11 ± 0.11	6.02 ± 0.25
CL	mg·h <sup>-1</sup>	7.93 ± 0.69	3.44 ± 0.77**	0.31 ± 0.15	0.18 ± 0.11
$V_d$	mg	42.10 ± 11.69	29.05 ± 3.24	3.14 ± 1.23	1.90 ± 0.71

**3.2.2 溶酶体药动学研究** 斑蝥素与黄芩苷在 HepG2 细胞溶酶体中药时曲线变化见图 2-C, 药动学参数见表 4。结果显示, 配伍组斑蝥素在溶酶体内的浓度达峰时间(6h)较单药组(4h)延迟 2h, 给药 8 h 后两组斑蝥素浓度均呈下降趋势, 且配伍组浓度始终维持在较高水平, 提示 8 h 后溶酶体内的消除过程受配伍影响较小; 而配伍组黄芩苷在溶酶体内的达峰时间较单药组提前 2 h, 且双峰效应消失, 表明配伍可能加速溶酶体对黄芩苷的转运效应。从药动学参数可知, 与单药组相比, 配伍组显著提高了斑蝥素和黄芩苷在溶酶体内的  $C_{\max}$  和  $AUC_{0 \sim t}$  ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ), 两药的 CL 也相应降低, 但无显著影响, 这是导致两药溶酶体内蓄积量增加的主要原因。配伍组斑蝥素的  $V_d$  较单药组显著降低 ( $P < 0.05$ ), 提示配伍可能改变了斑蝥素在 HepG2 细胞溶酶体内的分布特性, 而配伍对黄芩苷的  $V_d$  无显著影响。配伍对斑蝥素与黄芩苷的  $t_{1/2}$ 、 $MRT_{0 \sim t}$  等其他参数的无显著影响, 则表明两药的溶酶体内终

末消除相动力学未受配伍的显著影响。

**3.2.3 线粒体药动学研究** 斑蝥素与黄芩苷在 HepG2 细胞线粒体中药时曲线变化见图 2-D, 药动学参数见表 5。结果显示, 配伍组斑蝥素与黄芩苷浓度在 HepG2 细胞线粒体内的达峰时间分别由单药组的 2、4 h 提前至 1、2 h, 表明两药配伍后能快速地在 HepG2 细胞线粒体内达到浓度峰值, 与斑蝥素改变线粒体膜通透性, 加速药物在线粒体内聚集有关<sup>[16]</sup>; 而配伍组黄芩苷在 8~10 h 时出现浓度平台期, 使其在 HepG2 细胞线粒体内的滞留时间延长, 为其持续发挥药理作用提供了有利条件, 与课题组前期关于两者配伍主要通过作用于线粒体介导凋亡途径抗肝癌机制的研究结论相一致<sup>[8]</sup>。从药动学参数可知, 配伍组显著提高了斑蝥素与黄芩苷的  $C_{\max}$  和  $AUC_{0 \sim t}$  ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ), 两药的清除率 CL 均有所降低, 其中对斑蝥素的 CL 影响更为显著 ( $P < 0.05$ ), 而配伍对斑蝥素与黄芩苷的  $t_{1/2}$ 、 $MRT_{0 \sim t}$  等其他参数无显著性影响。

表 4 斑蝥素与黄芩苷在 HepG2 细胞溶酶体内的药动学参数 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )Table 4 Pharmacokinetic parameters of cantharidin and baicalin in lysosome of HepG2 cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

参数	单位	斑蝥素		黄芩苷	
		单药组	配伍组	单药组	配伍组
$t_{1/2}$	h	5.65 ± 1.63	4.37 ± 2.18	5.97 ± 3.06	7.80 ± 4.34
$C_{\max}$	ng·mg <sup>-1</sup>	71.76 ± 7.09	103.46 ± 10.52*	8 234.27 ± 546.25	12 111.06 ± 1 594.12*
$AUC_{0 \sim t}$	h·ng·mg <sup>-1</sup>	542.10 ± 70.87	793.83 ± 55.67**	67 572.26 ± 2537.97	91 196.96 ± 4 570.57**
$MRT_{0 \sim t}$	h	5.00 ± 0.22	5.12 ± 0.25	5.90 ± 0.12	5.86 ± 0.09
CL	mg·h <sup>-1</sup>	35.35 ± 7.84	25.07 ± 5.20	1.23 ± 0.28	0.85 ± 0.27
$V_d$	mg	275.96 ± 26.99	147.41 ± 53.14*	9.76 ± 3.69	8.48 ± 2.87

表 5 斑蝥素与黄芩苷在 HepG2 细胞线粒体内的药动学参数 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )Table 5 Pharmacokinetic parameters of cantharidin and baicalin in mitochondria of HepG2 cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

参数	单位	斑蝥素		黄芩苷	
		单药组	配伍组	单药组	配伍组
$t_{1/2}$	h	2.77 ± 0.59	6.49 ± 2.27	6.52 ± 2.42	8.85 ± 4.91
$C_{\max}$	ng·mg <sup>-1</sup>	184.17 ± 15.52	248.14 ± 17.54**	6 235.22 ± 325.30	8 188.93 ± 515.22**
$AUC_{0 \sim t}$	h·ng·mg <sup>-1</sup>	1 062.83 ± 155.34	1 470.14 ± 83.24*	49 677.73 ± 1 452.42	70 023.44 ± 5 557.76**
$MRT_{0 \sim t}$	h	4.26 ± 0.38	4.88 ± 0.27	5.74 ± 0.20	6.06 ± 0.03
CL	mg·h <sup>-1</sup>	21.08 ± 3.33	12.07 ± 2.34*	1.68 ± 0.42	1.02 ± 0.30
$V_d$	mg	83.55 ± 19.89	108.46 ± 19.61	14.89 ± 1.59	11.69 ± 2.71



**3.2.4 内质网药动学研究** 斑蝥素与黄芩苷在 HepG2 细胞内质网中药时曲线变化见图 2-E, 药动学参数见表 6。结果显示, 配伍组与单药组斑蝥素浓度在 HepG2 细胞内质网中的达峰时间分别为 6、4 h; 而配伍组与单药组黄芩苷浓度在内质网中的达峰时间分别为 2、4 h。从药动学参数可知, 配伍组

斑蝥素与黄芩苷的  $C_{\max}$  和  $AUC_{0\sim t}$  较单药组均显著升高 ( $P<0.05$ 、 $0.01$ ), 两药的  $AUC_{0\sim t}$  分别增加 52.3%、46.7%, 除配伍组斑蝥素的  $MRT_{0\sim t}$  具显著差异外 ( $P<0.01$ ), 配伍对斑蝥素与黄芩苷的  $t_{1/2}$ 、CL 等其他参数均无显著性影响, 提示配伍给药能延长斑蝥素在细胞内质网中的停留时间。

表 6 斑蝥素与黄芩苷在 HepG2 细胞内质网中药动学参数 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 6 Pharmacokinetic parameters of cantharidin and baicalin in endoplasmic reticulum of HepG2 cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

参数	单位	斑蝥素		黄芩苷	
		单药组	配伍组	单药组	配伍组
$t_{1/2}$	h	4.40±2.15	3.84±0.97	6.70±3.14	8.33±7.10
$C_{\max}$	ng·mg <sup>-1</sup>	151.20±14.87	216.62±19.38**	6 740.87±362.90	9 174.00±300.81**
$AUC_{0\sim t}$	h·ng·mg <sup>-1</sup>	927.08±108.79	1 411.77±119.45**	52 912.53±1 665.76	77 605.88±9 242.80*
$MRT_{0\sim t}$	h	4.78±0.28	5.50±0.04**	5.84±0.29	5.99±0.33
CL	mg·h <sup>-1</sup>	21.96±4.94	14.04±2.00	1.53±0.38	0.97±0.38
$V_d$	mg	131.41±42.43	76.37±14.39	13.66±3.60	9.25±3.73

#### 4 讨论

前期实验通过 CCK-8 法筛选出斑蝥素与黄芩苷的安全给药质量浓度分别为 6、30 μg/mL, 给药时间为 12 h, 在此条件下 HepG2 细胞存活率在 85% 以上, 为后续的细胞药动学研究提供了可靠的实验条件。本研究采用 UPLC-MS/MS 技术系统考察了斑蝥素与黄芩苷在 HepG2 细胞不同亚细胞结构中的动态分布规律及两者配伍对其药动学行为的相互作用。

单药组中, 斑蝥素与黄芩苷在不同细胞器中的分布差异, 为揭示两者固有的作用靶点倾向性提供了直接证据。斑蝥素在各细胞器的暴露水平 (以  $AUC_{0\sim t}$  计) 依次为细胞核>线粒体>内质网>溶酶体。其显著的核靶向性, 一方面源于其较强的脂溶性, 使其易于穿透核膜的脂质双分子层, 并在核内亲脂性环境中滞留; 另一方面, 与其作为蛋白磷酸酶 2A (protein phosphatase 2A, PP2A) 抑制剂, 阻碍 DNA 损伤修复并导致 DNA 双链断裂积累, 最终引发细胞周期阻滞的机制密切相关<sup>[17]</sup>。其次, 斑蝥素在线粒体中的高暴露水平, 与其诱导线粒体膜电位崩溃、开启线粒体通透性转换孔 (mitochondrial permeability transition pore, mPTP) 以启动凋亡的已知作用直接关联<sup>[18]</sup>。与斑蝥素不同, 黄芩苷在各细胞器的暴露水平 (以  $AUC_{0\sim t}$  计) 呈现如下分布: 细胞核>溶酶体>内质网>线粒体。黄芩苷在细胞核的高积累, 可能源于其作为黄酮类化合物可直接嵌入 DNA 双链, 或通过抑制拓扑异构酶而引起 DNA

损伤; 而黄芩苷在溶酶体中表现出仅次于细胞核的高暴露量, 可能由于黄芩苷作为弱酸性化合物, 在溶酶体的酸性环境 (pH 4.5~5.5) 中发生离子捕获效应, 从而促进了其蓄积, 这是其发挥抗癌效应的另一个关键靶点。此外, 黄芩苷分子含多个羟基极性基团, 水溶性较强, 难以快速穿透线粒体膜, 导致其在线粒体内蓄积最低。

斑蝥素与黄芩苷配伍, 显著改变了两者在 HepG2 细胞亚细胞结构中的药动学特征。在细胞核中, 配伍使斑蝥素与黄芩苷的核内  $AUC_{0\sim t}$  分别显著提高 93.8% 和 68.4%, 同时降低清除率, 导致药物核内高浓度蓄积。这一发现与文献报道相符, 即两药单用均可通过诱导周期阻滞、增强 DNA 损伤及抑制修复等机制抑制肝癌细胞增殖<sup>[19-20]</sup>。配伍后的药动学改变协同增强了诱导 HepG2 细胞核 DNA 双链断裂和扩大 DNA 损伤范围的能力, 有效阻断细胞增殖周期, 与前期发现的斑蝥素/黄芩苷配伍诱导 G<sub>2</sub>/M 期阻滞结论相符<sup>[8]</sup>。溶酶体是启动凋亡的关键细胞器, 其膜稳定性的破坏可触发凋亡级联反应<sup>[21]</sup>。研究表明, 黄芩苷可通过增加肝癌细胞内活性氧水平干预溶酶体稳定性, 增加膜通透性而发挥抗肝癌效应<sup>[22]</sup>。本研究发现配伍给药后, HepG2 细胞溶酶体内斑蝥素浓度的达峰时间虽被延缓, 但蓄积量却增加, 这一动力学变化可能与黄芩苷调控溶酶体稳定性, 进而调节凋亡启动节奏的机制密切相关。线粒体与内质网是调控细胞凋亡的核心靶点, 配伍后, 斑蝥素与黄芩苷在线粒体和内质网的

AUC<sub>0~t</sub>同步增加。值得注意的是,线粒体内两药的达峰时间分别由单药时的 2、4 h 提前至 1、2 h,这反映了斑蝥素破坏线粒体膜通透性与黄芩苷增强线粒体凋亡敏感性的协同作用,这种协同效应可能通过改变线粒体膜的物理特性或能量状态,加速了药物向线粒体内的转运或富集,从而更早地启动凋亡过程,提高抗肝癌的效率<sup>[13,23-24]</sup>。此外,斑蝥素在内质网中 MRT<sub>0~t</sub>延长,表明黄芩苷可能通过调控内质网应激通路,延长斑蝥素的作用时间,从而增强其抗肿瘤活性。

本研究揭示的斑蝥素/黄芩苷配伍在亚细胞分布上的协同优势,在与其他已报道的抗肝癌中药配伍的比较中尤为突出。人参皂苷 Rg<sub>3</sub>与五味子乙素联用被证实在整体细胞水平显示出良好的 HepG2 细胞促凋亡效应;黄芪甲苷-姜黄素可通过调节血管生成和血栓形成相关因子及微小核糖核酸(microRNA, miRNA)的表达而协同抑制 HepG2 裸鼠肿瘤微血管形成和肿瘤生长;肉桂醛与姜黄素可能通过调节磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B(protein kinase B, Akt)信号通路而有效抑制人肝癌 SMMC-7721 细胞活性,诱导其凋亡<sup>[25-27]</sup>。然而,这些研究大多侧重于整体细胞水平的药效叠加或特定信号通路的交互作用,对其在亚细胞器层面的动态分布规律与时空协同递送行为则鲜有报道。本研究清晰地展示了斑蝥素/黄芩苷配伍能同步、显著地提升在细胞核、线粒体、内质网、溶酶体这 4 个关键细胞器中的药物暴露量,并优化其达峰时间与滞留时间,实现了多靶点、多环节的协同。

综上,本研究通过细胞药动力学方法揭示了斑蝥素与黄芩苷配伍在 HepG2 细胞亚细胞水平(细胞核、溶酶体、线粒体、内质网)的动态分布与药动力学特征变化,阐明了配伍如何通过影响药物在关键细胞器的暴露量、清除速率、达峰时间及滞留时间,协同增强诱导 DNA 损伤、破坏溶酶体稳定性、促进线粒体/内质网凋亡通路激活等效应,最终实现抗肝癌增效。不仅为深入理解斑蝥素/黄芩苷配伍协同增效抗肝癌的作用本质提供了关键的药动力学支撑,也为基于亚细胞靶向的药物组合设计提供了新的思路和实验依据。然而,本研究主要揭示了药动力学的宏观变化,介导药物跨细胞器膜转运的关键蛋白(如转运体、离子通道)是否在配伍后发生了表达或功能的改变,以及这些改变如何与细胞药动力学行为

相关联,将是未来研究的重点。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] Lohitesh K, Chowdhury R, Mukherjee S. Resistance a major hindrance to chemotherapy in hepatocellular carcinoma: An insight [J]. *Cancer Cell Int*, 2018, 18(1): 44.
- [2] Yang C, Li D, Ko C N, et al. Active ingredients of traditional Chinese medicine for enhancing the effect of tumor immunotherapy [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1133050.
- [3] Zhou Y, Wang Z, Ren S, et al. Mechanism of action of protopanaxadiol ginsenosides on hepatocellular carcinoma and network pharmacological analysis [J]. *Chin Herb Med*, 2024, 16(4): 548-557.
- [4] Yan J, Deng X L, Ma S Q, et al. Cantharidin suppresses hepatocellular carcinoma development by regulating EZH2/H3K27me3-dependent cell cycle progression and antitumour immune response [J]. *BMC Complement Med Ther*, 2023, 23(1): 160.
- [5] Wang R L, Wang C Y, Lu L H, et al. Baicalin and baicalein in modulating tumor microenvironment for cancer treatment: A comprehensive review with future perspectives [J]. *Pharmacol Res*, 2024, 199: 107032.
- [6] 侯晓杰, 张建锋, 侯长周, 等. 黄芩苷药理活性和作用机制研究进展 [J]. *药物评价研究*, 2024, 47(11): 2688-2696.
- [7] 李敏. 斑蝥酸钠维生素 B<sub>6</sub>注射液联合痰热清注射液治疗癌性发热 [J]. *华西医学*, 2010, 25(4): 753-754.
- [8] Huang L, Yang Z L, He Y, et al. Development of cantharidin/baicalin co-delivery system based on mitochondrial targeting strategy for enhanced hepatocellular carcinoma therapy [J]. *Appl Mater Today*, 2024, 40: 102374.
- [9] 高昱, 杨磊, 金凯, 等. 叶酸修饰的斑蝥素/黄芩苷脂质体在正常大鼠与荷瘤大鼠体内的药动力学及组织分布差异研究 [J]. *中国药理学杂志*, 2025, 60(1): 39-46.
- [10] Lv L J, You Y Y, Liu Y J, et al. Advanced research in cellular pharmacokinetics and its cutting-edge technologies [J]. *Curr Pharm Des*, 2022, 28(37): 3095-3104.
- [11] Li Q, Zhou T, Wu F, et al. Subcellular drug distribution: Mechanisms and roles in drug efficacy, toxicity, resistance, and targeted delivery [J]. *Drug Metab Rev*, 2018, 50(4): 430-447.
- [12] Hsia T C, Yu C C, Hsu S C, et al. Cantharidin induces apoptosis of H460 human lung cancer cells through mitochondria-dependent pathways [J]. *Int J Oncol*, 2014,



- 45(1): 245-254.
- [13] Wang Z X, Jiang C P, Chen W B, *et al.* Baicalein induces apoptosis and autophagy via endoplasmic reticulum stress in hepatocellular carcinoma cells [J]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014: 732516.
- [14] Zhang Z Q, Yue P F, Lu T Q, *et al.* Role of lysosomes in physiological activities, diseases, and therapy [J]. *J Hematol Oncol*, 2021, 14(1): 79.
- [15] Xing J, Chen X Y, Zhong D F. Absorption and enterohepatic circulation of baicalin in rats [J]. *Life Sci*, 2005, 78(2): 140-146.
- [16] Feng S M, Zhu J, Xia K S, *et al.* Cantharidin inhibits anti-apoptotic bcl-2 family proteins and induces apoptosis in human osteosarcoma cell lines MG-63 and MNNG/HOS via mitochondria-dependent pathway [J]. *Med Sci Monit*, 2018, 24: 6742-6749.
- [17] Kuo J H, Shih T Y, Lin J P, *et al.* Cantharidin induces DNA damage and inhibits DNA repair-associated protein expressions in TSGH8301 human bladder cancer cell [J]. *Anticancer Res*, 2015, 35(2): 795-804.
- [18] Huang W W, Ko S W, Tsai H Y, *et al.* Cantharidin induces G2/M phase arrest and apoptosis in human colorectal cancer colo 205 cells through inhibition of CDK1 activity and caspase-dependent signaling pathways [J]. *Int J Oncol*, 2011, 38(4): 1067-1073.
- [19] 王燕, 蒋汝荷, 余玥, 等. 斑蝥素及其衍生物抗癌作用机制的研究进展 [J]. 复旦学报: 医学版, 2024, 51(4): 620-631.
- [20] 刘梦珂, 纪濛濛, 程林, 等. 黄芩苷抗肿瘤作用机制的研究进展 [J]. 上海交通大学学报: 医学版, 2021, 41(2): 246-250.
- [21] Zhao M, Antunes F, Eaton J W, *et al.* Lysosomal enzymes promote mitochondrial oxidant production, cytochrome c release and apoptosis [J]. *Eur J Biochem*, 2003, 270(18): 3778-3786.
- [22] Wang L, Feng T, Su Z L, *et al.* Latest research progress on anticancer effect of baicalin and its aglycone baicalein [J]. *Arch Pharm Res*, 2022, 45(8): 535-557.
- [23] Chang C, Zhu Y Q, Tang X Y, *et al.* The anti-proliferative effects of norcantharidin on human HepG2 cells in cell culture [J]. *Mol Biol Rep*, 2011, 38(1): 163-169.
- [24] Bravo-Sagua R, Rodriguez A E, Kuzmicic J, *et al.* Cell death and survival through the endoplasmic reticulum-mitochondrial axis [J]. *Curr Mol Med*, 2013, 13(2): 317-329.
- [25] 石珂, 周泓妍, 张涵, 等. 薄膜超声法制备共载人参皂苷 Rg<sub>3</sub> 和五味子乙素脂质体及其质量评价 [J]. 中草药, 2025, 56(21): 7725-7735.
- [26] 朱巧凤, 周蓓, 吴燕春, 等. 基于网络药理学-分子对接及实验研究探讨肉桂醛联合姜黄素抗肝细胞癌的作用机制 [J]. 天津中医药, 2024, 41(8): 1055-1062.
- [27] Zhang S, Tang D C, Zang W H, *et al.* Synergistic inhibitory effect of traditional Chinese medicine astragaloside IV and curcumin on tumor growth and angiogenesis in an orthotopic nude-mouse model of human hepatocellular carcinoma [J]. *Anticancer Res*, 2017, 37(2): 465-473.

[责任编辑 李亚楠]