

Alopecurone B 逆转人乳腺癌细胞 MCF-7 阿霉素耐药株活性研究

黄莉莉¹, 王欣¹, 李冰冰¹, 缪明星²

(1. 南京大学医学院附属鼓楼医院, 江苏 南京 210008; 2. 中国药科大学药学院, 江苏 南京 210009)

摘要:目的 研究黄酮化合物 Alopecurone B(APB)对人乳腺癌细胞阿霉素耐药株 MCF-7/ADR 多药耐药的逆转活性及逆转机制。方法 人乳腺癌细胞阿霉素耐药株 MCF-7/ADR 维持在含有 250 ng/mL 阿霉素的培养基中,使用 MTT 法、qPCR、Western blot 和流式细胞术研究 APB 对耐药株 P-糖蛋白(P-gp)功能和表达的影响。结果 APB 能逆转 MCF-7/ADR 细胞多药耐药,抑制 P-gp 的功能,下调 P-gp 基因和蛋白的表达。结论 APB 具有强效逆转人乳腺癌细胞 MCF-7/ADR 多药耐药的效应,其机制涉及对 P-gp 的调控。

关键词: Alopecurone B; 阿霉素; 乳腺癌; 多药耐药; P-糖蛋白

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1672-0482(2019)06-0699-05

DOI: 10.14148/j.issn.1672-0482.2019.0699

引文格式: 黄莉莉, 王欣, 李冰冰, 等. Alopecurone B 逆转人乳腺癌细胞 MCF-7 阿霉素耐药株活性研究[J]. 南京中医药大学学报, 2019, 35(6): 699-703.

Reversal Effect and Mechanism of Alopecurone B on MCF-7 Adriamycin-Resistant Subline

HUANG Li-li¹, WANG Xin¹, LI Bing-bing¹, MIAO Ming-xing²

(1. Drum Tower Hospital Affiliated to School of Medicine, Nanjing University, Nanjing, 210008, China; 2. School of pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing, 210009, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the reversal effect and the mechanism of APB on adriamycin (ADR)-induced multidrug-resistant human breast cancer MCF-7/ADR cells. **METHODS** ADR-resistant MCF-7 cells were maintained in RPMI-1640 culture medium containing 10% FBS and 250 ng/mL ADR. MTT assay, qPCR, Western blot and flow cytometry were used to determine the inhibitory effect of APB on P-gp levels and function in MCF-7 or MCF-7/ADR cells. **RESULTS** APB reversed MCF-7/ADR multidrug resistance at the concentration of 10 μ mol/L. Treated with 0, 5, 10, 20 μ mol/L of APB, P-gp gene and protein levels were suppressed significantly in a concentration-dependent manner. Furthermore, APB in 10 μ mol/L markedly inhibited the function of P-gp. **CONCLUSION** APB potent reversed the multidrug resistance in MCF-7 ADR-resistant subline. The mechanism referred to P-gp inhibition.

KEY WORDS: Alopecurone B; adriamycin; breast cancer; multidrug resistance; P-glycoprotein

多药耐药的产生始终是阻碍化疗顺利进行的主要因素。导致多药耐药产生的原因主要是由于癌细胞上存在的外排泵,可以将细胞内的药物排出胞外,使胞内药物浓度减少^[1]。大部分外排泵的结构中都存在一个同源性 ATP 结合结构域,这部分外排泵被称为 ATP 结合盒转运体^[2]。P-糖蛋白(P-gp)是最重要的 ATP 结合盒转运体,用于乳腺癌化疗的许多药物都是 P-gp 的底物,包括阿霉素(ADR)^[3]、柔红霉素^[4]、紫杉醇^[5]、长春花碱^[6]、长春新碱^[7]和

依托泊苷^[8]。目前很多多药耐药逆转剂被报道有较好的体外活性,但是一旦进入体内实验,其结果往往令人失望^[9]。近年来黄酮类化合物由于其良好的多药耐药逆转活性而备受关注^[10-11]。曾有报道称黄酮类化合物在多种多药耐药癌细胞中均能增加 P-gp 底物在细胞内的蓄积并能减少 P-gp 表达^[12]。本实验室从中药苦豆子 *Sophora alopecuroides* L. 中分离得到一种黄酮类化合物,经过结构解析确定为 Alopecurone B(APB)(图 1)^[13]。Xia 等人在骨癌阿

收稿日期: 2019-05-29

基金项目: 江苏省中医药管理局科技项目(YB2017046)

第一作者: 黄莉莉,女,副主任药师,E-mail: 3928671@qq.com

通信作者: 王欣,男,副主任药师,主要从事药理学研究,E-mail: 20031269@qq.com

霉素耐药株中对 APB 的逆转活性及其作用机制进行了检测和研究,发现 APB 能显著逆转骨癌耐药株的多药耐药^[12]。本文将用人乳腺癌阿霉素耐药株为模型,研究 APB 逆转乳腺癌耐药的活性和机制。

1 材料和方法

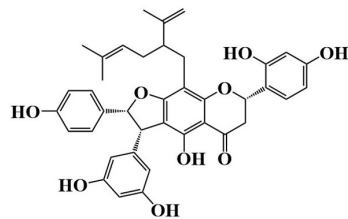
1.1 仪器与材料

1100 Series 高效液相色谱仪(Agilent 公司), HPLC-CD 联用仪(JASCO 公司), AV III-500 型核磁共振波谱仪(Bruker 公司), Tensor-27 红外光谱仪(Bruker 公司), 1100 Series LC/MSD Trap 质谱仪(Agilent 公司), Shim-pack ODS-C₁₈ (4.6 mm × 150 mm) 分析性色谱柱(SHIMADZU 公司), Shim-pack ODS-C₁₈ (20 mm × 250 mm) 制备型色谱柱(SHIMADZU 公司), 薄层硅胶 GF₂₅₄ 预制板(青岛海洋化工厂), Sephadex LH-20 (Pharmacia 公司), ODS-C₁₈ (40~63 μmol/L) (Fuji 公司)。

提取分离与结构鉴定实验材料于 2013 年 7 月采自新疆阿勒泰,经中国药科大学秦民坚教授鉴定为豆科槐属植物苦豆子 *Sophora alopecuroides* L.; 植物样品(20130721S)保存于中国药科大学药学实验中心实验室。

¹H-NMR 谱显示二氢黄酮特有的 3 个双二重峰[δ_{H} 5.76($J = 13.5, 3.0$ Hz), 3.13($J = 13.5, 17.0$ Hz), 2.78($J = 17.0, 3.0$ Hz)], 氢谱还显示有薰衣草基信号[δ_{H} 1.57, 1.52, 1.69 (3H each, brs), 2.05 (2H, m), 2.61 (1H, m), 2.64 (2H, m), 4.73, 4.62 (1H each, brs), 5.04 (1H, t-like m)], 白藜芦醇基信号[δ_{H} 6.63 (2H, d, $J = 8.5$ Hz), 7.02 (2H, d, $J = 8.5$ Hz), 5.80 (2H, d, $J = 2.0$ Hz), 6.02 (H, d, $J = 2.0$ Hz), 5.97 (H, d, $J = 8.5$ Hz), 4.62 (H, d, $J = 8.5$ Hz)] 和芳环的 ABX 系统信号[δ_{H} 6.47 (1H, dd, $J = 8.5, 2.0$ Hz), 6.51 (1H, d, $J = 2.0$ Hz), 7.41 (1H, d, $J = 8.5$ Hz)]。易溶于甲醇、丙酮和 DMSO, 微溶于水; 硅胶薄层板展开后喷 10% 硫酸-乙醇溶液, 加热后显亮黄色。[α]_D²⁵ - 60 (c0.12, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 300 (2.09), 256 (1.26), 204 (2.76) nm; ¹H-NMR (acetone-*d*₆, 500 MHz) 和 ¹³C-NMR (acetone-*d*₆, 125 MHz); 阴离子 ESI-MS m/z 649 [M-H]⁻, 分子式为 C₃₉H₃₈O₉; CD (MeOH): $\Delta\epsilon +5.6(336), -3.9(293), +0.3(279)$ 。

以上数据与文献报道一致,故鉴定该化合物为 Alopecurone B(图 1)。



Chemical Formula: C₃₉H₃₈O₉ Molecular Weight: 650.72

图 1 APB 的结构、分子式、分子量

1.2 试剂和药品

RPMI-1640 培养基购于 Hyclone 公司, 优质胎牛血清购自 Thermo 公司, APB 为本实验室同文献方法分离所得, 纯度大于 90%^[13], 阿霉素(批号: S120813)、紫杉醇(批号: S114804)、长春新碱(批号: S124106)、顺铂(批号: S116613)、维拉帕米(批号: S420202)购于 Selleck 公司。罗丹明 123 染料(Rh123)、胰蛋白酶、四甲基偶氮唑蓝(MTT)和 TRIZOL 试剂盒购于 Sigma 公司, Annexin V-APC/7-AAD 凋亡检测试剂盒购于凯基生物有限公司, SYBR Green 染料购于罗氏公司, 兔抗人 P-gp 抗体, 鼠抗人 GAPDH 抗体及相应 HRP 标记的二抗购于 Cell signaling technology 公司。

1.3 细胞与培养

人乳腺癌细胞 MCF-7 及其阿霉素耐药株 MCF-7/ADR 购于凯基生物有限公司, 用含 10% 优质胎牛血清的 RPMI-1640 培养基于 5% CO₂、37 °C 条件下培养。MCF-7/ADR 维持在含有 250 ng/mL 阿霉素的培养基中, 于实验前脱药 1 周后使用。

1.4 MTT 法检测 MCF-7/ADR 耐药性和 APB 的逆转活性

取对数生长期细胞 MCF-7 和 MCF-7/ADR, 调整细胞密度为 3.0 × 10⁴ mL⁻¹。铺 96 孔板, 每孔 180 μL 细胞悬液, 5% CO₂、37 °C 条件下过夜培养。加入一系列浓度梯度的阿霉素、紫杉醇、长春新碱或顺铂检测耐药株的耐药水平; 分别加入一系列浓度梯度上述化疗药物的同时每孔再加入 10 μmol/L 的 APB, 5 μmol/L 的维拉帕米作为阳性对照。继续培养 48 h 后, 每孔加入 20 μL 的 MTT 溶液再培养 4 h。培养结束后弃上清, 每孔加入 150 μL 的 DM-SO, 在平板摇床微振荡 10 min。吸光度值为酶标仪在 570 nm 处读取的吸光值减去 630 nm 处的背景值。

计算公式: 耐药指数 = MCF-7/ADR IC₅₀ 值 / MCF-7 IC₅₀ 值^[14]。

逆转倍数 = MCF-7/ADR IC₅₀ 值 / MCF-7/ADR

加入 10 $\mu\text{mol/L}$ APB 后 IC_{50} 值^[15]。

1.5 qPCR 检测 MDR1 基因表达

细胞给药后 48 h 使用 TRIzol 试剂盒提取细胞的总 RNA, 琼脂糖凝胶电泳检查总 RNA 样本纯度, 每组分取 1 μg 总 RNA 进行反转录, 并将反转录产物稀释 5 倍后进行 qPCR 实验。实验结果采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法进行相对定量, 用 GAPDH 基因做参比进行校正。引物信息为: MDR1 正义 5'-AGAGT-CAAGGAGCATGGCAC-3', 反义 5'-ACAGT-CAGAGTTCCTACTGGCG-3'; GAPDH 正义 5'-GAAAGCCTGCCGGTGACTAA-3', 反义 5'-AG-GAAAAGCATCACCCGGAG-3'。

1.6 Western blot 实验检测 P-gp 蛋白表达

选择对数生长期 MCF-7 或 MCF-7/ADR 细胞, 以每孔 5×10^5 接种于 6 孔培养板中, 放入培养箱培养。过夜待细胞贴壁, 分别加入 APB 0、5、10、20 $\mu\text{mol/L}$, 继续孵育 48 h 后, 收集细胞, 加入预配制的含 PMSF 和蛋白酶抑制剂混合物的 Western 及 IP 细胞裂解液, 制备蛋白样品, BCA 法测定蛋白浓度。制备 10% 的分离胶和 4% 浓缩胶对蛋白样品进行电泳分离, 转 PVDF 膜, 脱脂牛奶封闭 2 h, 将入相应的一抗 (1:1000) 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, HRP 标记的二抗 (1:10000) 常温孵育 2 h, 加入增强型化学发光液上机用于 P-gp 的检测, GAPDH 为内参, 应用图像分析仪对条带进行扫描。

1.7 流式细胞术检测阿霉素诱导的细胞凋亡

取对数生长期 MCF-7/ADR 细胞, 铺 6 孔板, 每孔 1×10^6 个细胞。加入 2 $\mu\text{mol/L}$ 的阿霉素或 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 APB 单独或联合孵育 48 h, 收集细胞用 500 μL 的 Binding buffer 重悬, 分别加入 5 μL 的 Annexin V-APC 和 7-AAD, 混匀, 室温避光孵育 15 min, 1 h 内上机检测。

1.8 流式细胞术检测 Rh123 外排实验

取对数生长期 MCF-7 或 MCF-7/ADR 细胞, 铺 6 孔板, 每孔 1×10^6 个细胞。每孔加入 5 $\mu\text{mol/L}$ 的 Rh123 避光孵育 1.5 h, PBS 洗 3 次, 再加入 10

$\mu\text{mol/L}$ 的 APB 或 5 $\mu\text{mol/L}$ 的维拉帕米 (阳性对照) 孵育 1.5 h。不加药物和 Rh123 的细胞为本底, 不加逆转剂只孵育 Rh123 的细胞做阴性对照。孵育结束后, 收集细胞, 冰冷的 PBS 洗 2 次上机, FL1 通道检测。

1.9 统计学方法

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 使用 GraphPad Prism 5.0 统计学软件对数据进行处理并进行方差齐性检查和 t 或 t' 检验, 其中 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 APB 细胞毒性

结果显示 0 ~ 40 $\mu\text{mol/L}$ 的 APB 不能抑制 MCF-7 或 MCF-7/ADR 的细胞活性, 给予 40 $\mu\text{mol/L}$ 的 APB 后 MCF-7 或 MCF-7/ADR 的细胞活性仍高于 90% (图 2)。

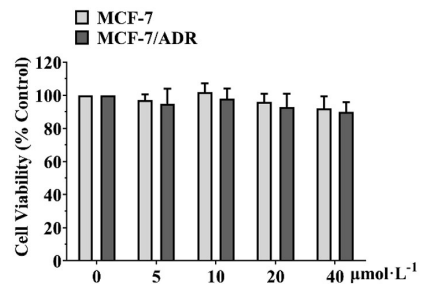


图 2 APB 的细胞毒性

2.2 APB 能逆转 MCF-7/ADR 细胞的多药耐药

与敏感株 MCF-7 细胞比较, 耐药株 MCF-7/ADR 对阿霉素显示出高倍耐药, 耐药指数高达 48.55 ($P < 0.01$), 给予 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 APB 能逆转人乳腺癌 MCF-7/ADR 耐药株对阿霉素的耐药性, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 其逆转倍数为 9.64, 效果优于阳性对照药维拉帕米 (5 $\mu\text{mol/L}$) (表 1)。除了阿霉素外, MCF-7/ADR 细胞还对多种 P-gp 底物 (紫杉醇、长春新碱) 显示出耐药性 ($P < 0.01$), APB 能克服 MCF-7/ADR 细胞的多药耐药 ($P < 0.01$)。此外, MCF-7/ADR 对顺铂也显示出次等强度的耐药性 ($P < 0.05$), APB 能逆转 MCF-7/ADR 对顺铂的耐药 ($P < 0.05$), 效果强于维拉帕米。

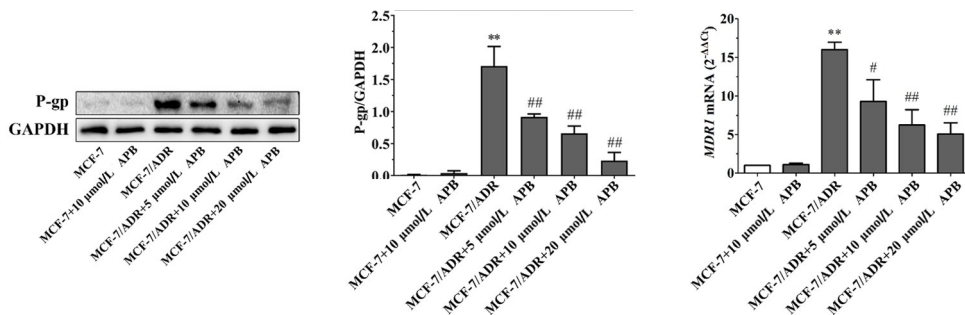
表 1 APB 对人乳腺癌阿霉素耐药株 MCF-7/ADR 多药耐药的逆转活性 ($\bar{x} \pm s, \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)

化疗药物	MCF-7	MCF-7/ADR	耐药指数	MCF-7/ADR+维拉帕米	MCF-7/ADR+APB	APB 的逆转倍数
阿霉素	1.18 \pm 0.69	57.29 \pm 3.86 **	48.55	8.72 \pm 1.07 #	5.94 \pm 0.63 ##	9.64
紫杉醇	3.91 \pm 0.85	28.75 \pm 1.94 **	7.35	13.82 \pm 1.61 #	9.15 \pm 0.72 ##	3.14
长春新碱	1.58 \pm 0.31	19.37 \pm 1.28 **	12.26	10.49 \pm 0.83 #	7.52 \pm 1.05 ##	2.58
顺铂	3.16 \pm 0.57	9.20 \pm 1.33 *	2.91	7.64 \pm 1.15	5.92 \pm 0.36 #	1.55

注: 与 MCF-7 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 MCF-7/ADR 组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

2.3 APB 能抑制耐药株中 P-gp 基因和蛋白的表达与敏感株 MCF-7 比较,耐药株 MCF-7/ADR 中,P-gp 基因(MDR1)和蛋白表达明显升高,给予 APB 处理后,不仅能在 24 h 显著抑制耐药株中

MDR1 表达,还能在 48 h 有效抑制耐药株中 P-gp 蛋白水平,并呈浓度依赖性。给予 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 APB 不能影响敏感株 MCF-7 中 P-gp 基因和蛋白的表达水平。见图 3。

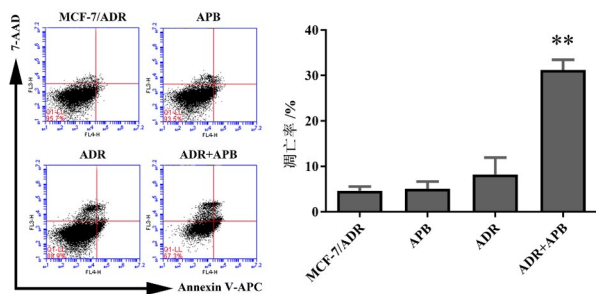


注:与 MCF-7 组比较, ** $P < 0.01$; 与 MCF-7/ADR 组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

图 3 APB 抑制 MCF-7/ADR 中 P-gp 基因和蛋白的表达

2.4 APB 能显著增强阿霉素诱导的 MCF-7/ADR 细胞凋亡

给予 MCF-7/ADR 细胞 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 APB 不能诱导细胞产生凋亡,单独给予 MCF-7/ADR 细胞 2 $\mu\text{mol/L}$ 的阿霉素能轻微诱导细胞的凋亡。而 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 APB 能显著增强 2 $\mu\text{mol/L}$ 阿霉素诱导的 MCF-7/ADR 细胞产生凋亡 ($P < 0.01$)。见图 4。



注:与 ADR 组比较, ** $P < 0.01$ 。

图 4 APB 增强阿霉素诱导的 MCF-7/ADR 细胞凋亡

2.5 APB 能减少 P-gp 对 Rh123 的外排

由图 5 可知,耐药株 MCF-7/ADR 内 Rh123 的荧光强度低于敏感株 MCF-7 内 Rh123 的荧光强度,说明 MCF-7/ADR 耐药细胞膜上 P-gp 蛋白的功能增强,P-gp 将其底物排至细胞外的能力增大。加入 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 APB 能抑制 P-gp 功能,显著升高耐药株 $P < 0.01$ 内 Rh123 的荧光强度,增加 Rh123 在耐药株 $P < 0.01$ 内的保留,效果强于阳性对照组维拉帕米。

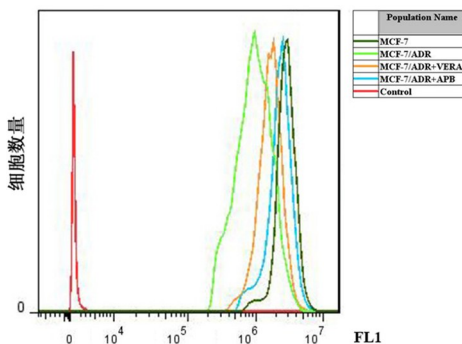


图 5 APB 抑制细胞膜表面 P-gp 的功能

3 讨论

现阶段对癌症多药耐药逆转剂的研究多集中在无毒剂量(细胞活性 $> 90\%$)下测试其逆转倍数,研究其对 ABC 家族蛋白如 P-gp 或 MRP1 等功能和表达的抑制机理^[14-15]。对于癌症化疗的协同给药,所使用的药物都具有抑制癌细胞增殖的活性,当联合给药时可降低单味药物的给药剂量,有效提高疗效,减小毒副作用,与耐药逆转剂有明显的区别。

在前人的研究中,实验人员利用阿霉素诱导人骨肉瘤细胞 MG-63 构建了 MG-63 的阿霉素耐药株,发现 APB 不仅能显著逆转 MG-63 耐药株对阿霉素的耐受,还能增加 MG-63 耐药株对其他化疗药物的敏感性,进一步研究发现 APB 能抑制 NF- κ B 信号转导通路,抑制 I κ B- α 的激活从而抑制 p65 磷酸化入核并抑制下游 P-gp 基因转录^[12]。本实验首次在乳腺癌阿霉素耐药株 MCF-7/ADR 中检测了 APB 逆转 MCF-7/ADR 细胞多药耐药的活性;MTT 实验证明阿霉素对 MCF-7/ADR 细胞的 IC₅₀ 值与 MCF-7 细胞相比明显升高;qPCR 和 Western blot 实验证明耐药细胞中 P-gp 基因和蛋白的表达

显著上调;流式细胞术证明耐药细胞中 P-gp 的功能增强,这些都证明 MCF-7/ADR 细胞具有高度的耐药性,并且耐药的主要机制是由于异常的 P-gp 基因和蛋白的升高。

APB 是黄酮类化合物^[13],其结构特点是在 A 环 8 位连有单萜,6、7 位稠合有白藜芦醇片段的二氢黄酮,其中 B 环 2'位的一 OH 取代较为少见。目前没有关于 APB 能逆转乳腺癌多药耐药的报道。本实验证明 APB 具有强效的逆转乳腺癌耐药的活性,其逆转机制主要涉及抑制耐药细胞膜表面 P-gp 的功能,降低 P-gp 的表达;减少 P-gp 对阿霉素的外排作用,使耐药细胞内阿霉素的蓄积浓度升高,达到有效的细胞增殖抑制浓度从而逆转耐药。值得注意的是,单独给予 APB 不能产生细胞毒性,也不能诱导乳腺癌细胞产生凋亡。癌细胞对顺铂的耐药并不完全与 P-gp 有关^[16],因此本实验中与 MCF-7 细胞比较,MCF-7/ADR 细胞对顺铂的耐药被 APB 逆转亦存在其他机制。

与耐药乳腺癌细胞比较,APB 对敏感株 MCF-7 细胞中 P-gp 的表达抑制作用较弱,造成这一现象的情况可能是由于:①MCF-7 中 P-gp 基因和蛋白的表达水平较低,10 $\mu\text{mol/L}$ 的 APB 对 MCF-7 中本底 P-gp 水平影响较弱;②MCF-7/ADR 细胞中异常的 P-gp 表达与 MCF-7 中本底 P-gp 表达的机制不同,APB 对异常 P-gp 表达有抑制作用,而对 P-gp 的正常表达无影响。

基于上述结果,APB 有望成为一种高效、低毒的逆转剂用于肿瘤耐药的辅助化疗。

参考文献:

[1] HUANG S, HOLZEL M, KNIJNENBURG T, et al. MED12 controls the response to multiple cancer drugs through regulation of TGF- β receptor signaling [J]. *Cell*, 2012, 151(5): 937-950.

[2] ZHAO XQ, XIE JD, CHEN XG, et al. Neratinib reverses ATP-binding cassette B1-mediated chemotherapeutic drug resistance *in vitro*, *in vivo*, and *ex vivo* [J]. *Mol Pharmacol*, 2012, 82(1): 47-58.

[3] 柴冰阳,陈泽慧,张闪闪,等. 4 种细胞毒活性方法评价紫草素体外肿瘤细胞抑制作用效果[J]. *中草药*, 2019, 50(1): 172-

177.

[4] 蒋卉男,刘卓刚,胡荣. Embelin 逆转 K562/D 细胞对柔红霉素耐药与 P-gp 及 MDR1 mRNA 无关 [J]. *中国实验血液学杂志*, 2017, 25(5): 1342-1349.

[5] 卢善翊,王芸芸,李果,等. EphA2 经 P-糖蛋白调控鼻咽癌紫杉醇敏感性的实验研究 [J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*, 2018, 24(1): 33-38.

[6] CHEN Q, BIAN Y, ZENG S. Involvement of AP-1 and NF- κ B in the up-regulation of P-gp in vinblastine resistant Caco-2 cells [J]. *Drug Metab Pharmacok*, 2014, 29(2): 223-226.

[7] 雷荣荣,吴春珍. 天然产物逆转肿瘤多药耐药性研究进展 [J]. *世界临床药物*, 2014, 35(8): 495-500.

[8] ADES S, MAXFIELD LF, GOULD CJ, et al. Selection of non-P-glycoprotein mediated high-level etoposide resistant cell lines by adriamycin with P-gp inhibitors[J]. *Int J Oncol*, 2006, 28(3): 747-753.

[9] GILL J, AHLUWALIA MK, GELLER D, et al. New targets and approaches in osteosarcoma[J]. *Pharmacol Ther*, 2013, 137(1): 89-99.

[10] ZHU XZ, WONG ILK, CHAN KF, et al. Triazole bridged flavonoid dimers as potent, nontoxic, and highly selective breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) inhibitors[J]. *J Med Chem*, 2019, 62(18): 8578-8608.

[11] KO JH, SETHI G, UM JY, et al. The role of resveratrol in cancer therapy [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(12): 2589.

[12] XIA YZ, NI K, GUO C, et al. Alopecurone B reverses doxorubicin-resistant human osteosarcoma cell line by inhibiting P-glycoprotein and NF- κ B signaling [J]. *Phytomedicine*, 2015, 22(3): 344-351.

[13] IINUMA M, OHYAMA M, TANAKA T. 6 flavonostilbenes and a flavanone in roots of *sophora-alopecuroides* [J]. *Phytochemistry*, 1995, 38(2): 519-525.

[14] XIA YZ, YANG L, WANG ZD, et al. Schisandrin A enhances the cytotoxicity of doxorubicin by the inhibition of nuclear factor- κ B signaling in a doxorubicin-resistant human osteosarcoma cell line [J]. *Rsc Adv*, 2015, 5(18): 13972-13984.

[15] ZHOU XW, XIA YZ, ZHANG YL, et al. Tomentodione M sensitizes multidrug resistant cancer cells by decreasing P-glycoprotein via inhibition of p38 MAPK signaling [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(60): 101965-101983.

[16] 崔美英,贺红柳,李盼,等. 柚皮苷对人肺癌顺铂耐药株 A549/DDP 细胞的逆转作用 [J]. *中国病理生理杂志*, 2019, 35(3): 466-472.

(编辑:杨巍敏)