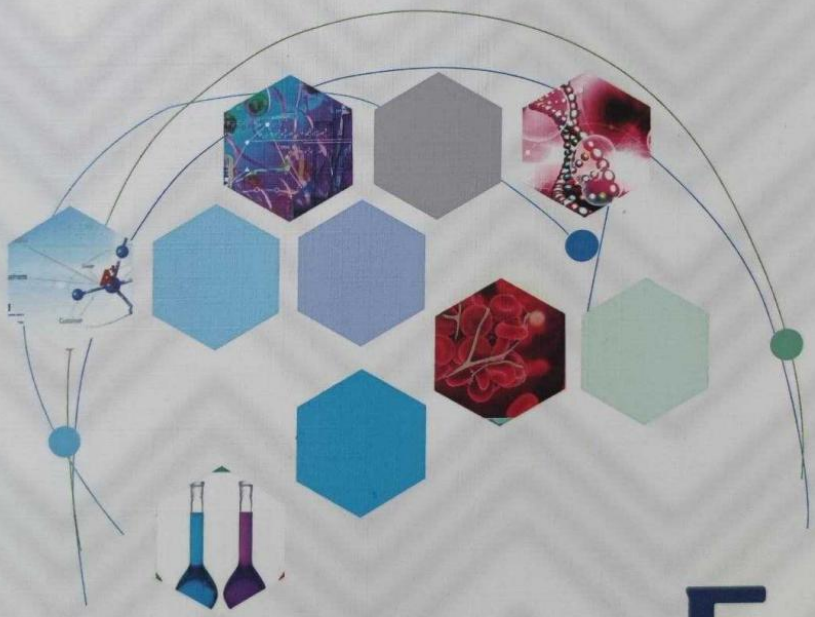
槲皮素逆转肝癌 HepG2 细胞对索拉非尼的耐药性研究、CN（生物化工，一般 CN）2025 年 10 月曹祥祥，王朋博，张子淳，刘思韵，李冠洁，王晓涵，姬国杰，胡焕焕



中国学术期刊网络出版总库全文收录期刊
中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊
中国核心期刊（遴选）数据库期刊
中文科技期刊数据库全文收录期刊
ISSN 2096-0387
CN 36-1336/TQ
CODEN SHHUB5

生物化工

SHENGWU HUAGONG



5
2025
第11卷 第5期(总第60期)
ISSN 2096-0387
江西省科学院应用化学研究所主办

生物化工

双月刊

（双月刊，2015年创刊）

2025年10月

第5期（总第60期）

目 次

研究报告

托品烷生物碱生物合成聚酮合酶的挖掘及其定向改造 …… 陈雅慧，田恬，佘志银，王永江，黄胜雄，黄建萍（1）
药物递送载体 $mPEG_{11}$-$Lys(chz)_6$ 的制备及性能研究 …… 丁艺兰，李泳宇（12）
千里光多糖通过 NO/炎症因子通路调控 RAW264.7 巨噬细胞免疫活性研究 …… 谢传奇，吴静，徐志勇，李泓序，胡居吾，张鹏，吴磊（17）
槲皮素逆转肝癌 HepG2 细胞对索拉非尼的耐药性研究 …… 曹祥祥，王朋博，张子淳，刘思韵，李冠洁，王晓涵，姬国杰，胡焕焕（24）
香菇素对肠细胞转运功能和巨噬细胞免疫活性的调控作用研究 …… 张晓雯，边祥雨，赵慧，霍燕，宋海军，赵珂，彭新颜，李进军，郭晋斌（32）
诱导多能性干细胞向胰岛素分泌细胞分化的方法研究 …… 李洋，芦慧颖，张怡（37）
葡萄糖-6-磷酸酶催化亚基在肾透明细胞癌中的免疫代谢机制研究 …… 王玉芳，王婷婷，黄楠（44）
TNFRSF12A 与甲状腺癌免疫细胞浸润相关性分析 …… 郑小凤，王玉芳，吴梅姐（52）
树莓花青素还原酶 *RiANR* 基因的克隆与表达分析 …… 王亚红，刘缙（61）
基于网络药理学探究香砂六君子汤治疗颈动脉粥样硬化的作用机制 …… 王烁炀，卢垚晔，杨博翔（69）
杠板归的急性毒性及其对急性肺损伤小鼠的治疗作用研究 …… 黄桂坤，黎为能，吴巧敏，兰淑琳，徐灵源（75）
一款含温泉水的特护乳安全性及舒缓功效评价——基于动物试验与体外实验的研究 …… 周欢，许元元，王家琪（81）
木粉/HDPE 复合材料在大振幅剪切过程中剪切模量和黏度的变化研究 …… 张继兵，苗宇，吴邱恒，郝建秀，傅海涛（86）
NH_4Br 界面修饰实现高效稳定的钙钛矿太阳能电池 …… 周进程，李天微（92）

研究简报

基于 AMPK/GLUT4 通路探究黄芩苷改善多囊卵巢综合征伴胰岛素抵抗的机制研究 …… 徐馨文，王琰森，石炜灵，曾黎，刘美平（100）
多肽-药物偶联物在肾细胞癌治疗中的递送效率研究 …… 张静（104）
基因工程风疹病毒重组嵌合抗原表达质粒构建及初步抗原性鉴定 …… 衣鸣，贾斯然，杨悦新，盖文雪，康雪，韩佳彤，张阳（108）
病毒感染诱导宿主细胞自噬反应的调控机制研究 …… 周雨苇，范箫艺，乔东（112）
无血清 Vero 细胞在摆床反应器中培养狂犬病毒的工艺研究 …… 王英伟，黄馨莹，郭岩，李彦辉，赵雪，马赢，李贺，张嵘（116）
特殊医学用途肾病全营养配方食品对腺嘌呤致大鼠慢性肾功能衰竭的影响 …… 华雨薇，闻常青，李邓雅，葛海涛，王富江（121）
可降解生物材料在口服制剂中的应用研究 …… 刘双，刘巍（125）
柱前衍生-HPLC 法测定葡萄糖酸钙锌口服溶液中盐酸赖氨酸含量 …… 舒森，黄妮，周军，徐灿（128）
顶空气相色谱法测定不同材质输液器中环己酮的迁移量 …… 杨黎，张宗朋，孙永康，李浩，张娟（132）
基于荧光微球的脱氢乙酸快速定量免疫层析试纸条的研制 …… 付尽国，柯楚婷，张文静，马欣燕，蔡时威，黄琪欣，林志欣，梁科，李淑红，邓又文（137）
气相色谱法测定炉甘石薄荷脑洗剂中薄荷脑及苯酚含量 …… 许婷，袁文琪，陈靓靓，王忠良，谌莉（142）
间充质干细胞源性外泌体提取方法研究 …… 陈文婧，郝兴霞（146）
胎盘源性造血干细胞提取技术的优化策略研究 …… 许峻荣（149）
不同外耳道皮瓣切口方式对耳内镜下鼓室成形术术后恢复的疗效评估 …… 张佩珊，范煜辉，欧阳绍基（152）
当归种苗真实性显微鉴定研究 …… 王新建，王伟东，唐想芳，包慧琴，刘鹏伟（157）
eDNA 技术在河流施工对鱼类影响评估中的应用——以四川遂宁白家河、联盟河为例 …… 韩诚，夏佳，周丽亭，尚科宇，孙洪飞（161）
基于 SSD 法的江西省某典型工业园区下游农田重金属安全阈值研究 …… 刘燕，李忠，苏凡，唐宗越，蒙智宇（165）
不同方法对焦化废弃土壤中多环芳烃提取效率的影响研究 …… 骆天宇（171）
一种用于含进液失效孔油气井电雷管的引火药研究 …… 王波，马卫东，张煜光（175）
化工原料的成分分析与质量评估方法研究 …… 邓伟（178）
机电设备预测性故障维护在制药工厂中的应用 …… 吴树萍（182）
“三全育人”视域下生物工程专业课程思政教学设计与实践——以“基因扩增技术——实时荧光定量 PCR”为例 …… 蒋慧慧（186）
民办高校微生物学实验教学改革措施及成效分析 …… 唐雪（191）
人工智能赋能生物材料课程科教融合的探索与实践 …… 王昭，叶原丰，张小娟，林青（196）

综 述

氨基苯并三唑的环境行为、毒性效应与应用研究进展 …… 王一迪，查显科，胡君，顾杰（199）
树脂吸附法在中药有效成分提取中的应用进展 …… 王伟恒，秦华，张庆玲，张丽杰，张萌，张晓（207）
白芍的化学成分及药理作用研究进展 …… 邝惠莹，任晨晨，彭媛，赵梦婷，姚立志（212）
桑黄的活性成分及药理作用研究进展 …… 敖翔（218）
八角茴香油现代提取技术及其在医药领域的应用 …… 李鸿，莫宇（224）
不同生物活性分子的抗衰老作用机制及研究进展 …… 胡良枝（227）
丹参治疗非酒精性脂肪性肝病的现状及研究进展 …… 王子烁，温蕊蒿，马兰，王烁炀，杨博翔（232）
波形蛋白在炎症性肠病中的研究进展 …… 刘霖（235）
PAM 通路抑制剂靶向治疗铂耐药卵巢癌的临床研究进展 …… 杨珂（240）
重组贻贝黏蛋白在伤口敷料中的研究进展 …… 申张宇（245）
机械力对衰老牙源性间充质干细胞功能调控的研究进展 …… 连若彤（248）
高镍三元正极材料掺杂改性的研究进展 …… 宋吾燕，黄晓伟，秦小康（252）

doi:10.20284/j.cnki.swhg.2025.05.004

研究报告

槲皮素逆转肝癌 HepG2 细胞对索拉非尼的耐药性研究

曹祥祥，王朋博，张子淳，刘思韵，李冠洁，王晓涵，姬国杰，胡焕焕*

（豫北医学院 生育力保存重点实验室，河南新乡 453000）

摘　要：目的：探讨索拉非尼联合槲皮素对索拉非尼耐药肝癌细胞的影响及其作用机制。方法：通过体外培养肝癌细胞（HepG2），建立索拉非尼耐药肝癌细胞（HepG2R），采用实时荧光定量 PCR（Real Time quantitative PCR，RT-qPCR）检测耐药细胞株中耐药基因 *ABCB1*、*TOP2B*，自噬基因 *LC3B*、*BECLIN*，凋亡基因 *BAX*、*BCL-2* 在细胞中的表达情况，并计算 *BCL-2/BAX*（比值）。采用 Western-blot 检测耐药细胞株自噬蛋白 LC3B 和凋亡蛋白 Caspase9 的表达情况，以确定耐药株是否成功建立。通过改良寇氏法计算索拉非尼对 HepG2 和 HepG2R 的半数抑制浓度（IC_{50}）。采用 CCK-8 法和细胞划痕实验检测各加药组对 HepG2R 增殖和迁移的影响。利用流式细胞术检测 HepG2R 的细胞周期比例。采用 Western-blot 检测各组细胞自噬蛋白 LC3B 表达情况。结果：HepG2R 对索拉非尼的 IC_{50} 是 HepG2 的 3.78 倍（$p < 0.05$）；HepG2R 对索拉非尼敏感性降低。索拉非尼、槲皮素及联合用药对 HepG2R 增殖和迁移均具有抑制作用，且联合用药组对 HepG2R 的抑制效果明显优于单药组（$p < 0.05$）；通过阻滞 HepG2R 在 G2/M 期的细胞周期来抑制细胞增殖；与对照组相比，索拉非尼、槲皮素及联合用药组能显著降低 LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ的表达（$p < 0.05$），联合用药比单一用药更为显著（$p < 0.05$）。结论：槲皮素协同索拉非尼可逆转 HepG2R 的耐药性。

关键词：肝癌细胞；索拉非尼；槲皮素；耐药性

中图分类号：R735.7　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**2096-0387（2025）05-024-08

Study on the Reversal of Sorafenib Resistance in Liver Cancer HepG2 Cells by Quercetin

CAO Xiangxiang, WANG Pengbo, ZHANG Zichun, LIU Siyun, LI Guanjie, WANG Xiaohan, JI Guojie, HU Huanhuan*

(Key Laboratory of Fertility Preservation, North Henan Medical University, Xinxiang 453000, China)

Abstract: Objective: To investigate the effect of sorafenib combined with quercetin on sorafenib-resistant hepatocellular carcinoma cells and its mechanism. Methods: Hepatoma cells (HepG2) are cultured in vitro to establish sorafenib-resistant liver cancer cells (HepG2R). Real Time quantitative PCR (RT-qPCR) is used to detect the expression levels of the drug resistance gene *ABCB1*, *TOP2B*, the autophagy genes *LC3B*, *BECLIN*, and the apoptosis genes *BAX*, *BCL-2* in the resistant cell line, and the *BCL-2/BAX* ratio is calculated. Western-blot is used to detect the expression of autophagy protein LC3B and apoptosis protein Caspase9 in drug-resistant cell lines to determine the successful establishment of drug-resistant cells. The median inhibitory concentration (IC_{50}) of sorafenib on HepG2 and HepG2R is calculated by Cole' s modified method. The effects of drug addition groups on the proliferation and migration of HepG2R are detected by CCK-8 assay and cell scratch assay. The cell cycle ratio of HepG2R is detected by flow cytometry. Western-blot is used to detect the expression of autophagy protein LC3B in each group. Results: The IC_{50}

基金项目：河南省高等学校青年骨干教师培养计划（2023GGJS201）；河南省高等教育教学改革研究与实践项目（本科教育类）（2024SJGLX0627）；新乡医学院三全学院生物与医药省级重点学科项目（ZDXKXM003；ZDXKXM015）；新乡医学院三全学院学术技术带头人培养计划（SQ2023XSJSDTR01）；新乡医学院三全学院骨干教师培养计划（SQ2023GGJS06）；新乡医学院三全学院优秀青年教师培养计划（SQ2025YQJH04）。

作者简介：曹祥祥（1988—），男，河南永城人，硕士，助教，研究方向为基因表达与调控。

通信简介：胡焕焕（1987—），女，河南商丘人，硕士，副教授，研究方向为生育力保存。E-mail：huhuanhuan1987@163.com。

万方数据

of HepG2R to sorafenib is 3.78 times that of HepG2 ($p < 0.05$); the sensitivity of HepG2R to sorafenib is decreased. Sorafenib, quercetin and their combination have inhibitory effects on the proliferation and migration of HepG2R, and the combination group has the stronger inhibitory effect on HepG2R than single drug group ($p < 0.05$). By inhibiting the blockage of HepG2R in the G2/M phase of the cell cycle, cell proliferation can be suppressed; compared with the control group, sorafenib, quercetin and the combination therapy significantly reduced the expression of LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ ($p < 0.05$), and the combination therapy was more significant than the single drug ($p < 0.05$). Conclusion: Quercetin collaborates with sorafenib to reverse the drug resistance of HepG2R.

Keywords: liver cancer cells; sorafenib; quercetin; drug resistance

原发性肝癌是在肝组织内形成的癌症，是我国乃至世界上最常见、最具有危害性的恶性肿瘤之一，其导致的死亡率高居第 3 位[1]。化疗是治疗肝癌的主要方法之一。常用的化疗药物包括 5-氟尿嘧啶、阿霉素、顺铂和奥沙利铂[2-3]。通过这些治疗尽管能延长病人的总生存期，但肝癌治疗存在预后不良、复发率高、五年生存率低、易产生耐药性等问题[4]。索拉非尼是一种口服多激酶酪氨酸激酶抑制剂，通过抑制 Raf（蛋白激酶）/MEK（丝裂原活化蛋白激酶）/ERK（细胞外调节蛋白激酶）通路抑制血管内皮生长因子受体（VEGFR1、2 和 3）和血小板衍生生长因子受体 β，阻断肿瘤细胞增殖[5]。临床试验（NCT00105443 和 NCT00492752）结果表明，肝癌患者对索拉非尼存在先天或获得性耐药性[6]。为了克服索拉非尼在肝癌中的耐药性，急需寻找一种逆转其耐药性的方法。槲皮素是一种存在于水果（苹果、葡萄、梨等）、蔬菜（洋葱和西兰花）、茶(绿茶)和其他可食用植物中的多酚[7]。大量研究表明，槲皮素具有抗氧化、抗炎、抗衰老和抗肿瘤等多种作用[8]。最近的研究证实，槲皮素与顺铂、阿霉素等化疗药物联合使用具有良好的抗癌效果，因此可作为一种协同化疗药物使用[9-10]。本研究通过梯度浓度培养成功获得索拉非尼耐药的肝癌细胞株（HepG2R），并使用 HepG2R 进行体外实验，以验证槲皮素通过阻断 G2/M 期细胞周期和降低自噬水平来提高 HepG2R 对索拉非尼的敏感性。

1　材料与方法

1.1　细胞、试剂与仪器

肝癌细胞 HepG2（货号：CL-0103），武汉普诺赛生命科技有限公司；索拉非尼（货号：S5080）、RPMI 1640 培养基（货号：31800）、二甲基亚砜（DMSO，货号：D8371），北京索莱宝科技有限公司；槲皮素（货号：HY-18085A），美国 MCE 公司；胎牛血清（FBS，货号：A5256701）、胰蛋白酶（货号：25200056），美国 Thermo Fisher 公司；BCA 蛋白测定试剂盒（货号：P0010）、HRP 标记山羊抗兔 lgG 抗体（货号：P0948）、细胞计数试剂盒 -8（CCK-8，货号：C0038），上海碧云天生物技术有限公司；LC3B 抗体（货号：18725-1-AP）、Caspase9（货号：10380-1-AP）、GAPDH（货号：60004-1-Ig）抗体，武汉三鹰生物技术有限公司；PowerPac HC 电泳仪、Labcycler PCR 仪、ChemiDolXRS+ 化学发光系统，美国 Bio-Rad 公司；51031528 细胞培养箱、1510 酶标仪，美国 Thermo Fisher 公司；CytoFLEX 流式细胞仪，美国 Beckman 公司、AE2000 倒置显微镜，中国麦克奥迪公司。

1.2　实验方法

1.2.1　耐药 HepG2 细胞株的构建

以 3×10^5 个细胞接种在培养瓶中，置于 37 ℃、体积分数为 5% 的 CO_2 细胞培养箱中培养，12 h 后，在终浓度为 2.5 μmol/L 索拉非尼的培养基中培养，传代 3 次后，索拉非尼的浓度从 2.5 μmol/L 梯度增加至 19.0 μmol/L（半抑制浓度），培养时间延长至 24 h，并继续培养 3 代，即得人肝癌细胞耐药模型——HepG2/sorafenib 细胞（HepG2R）。

1.2.2　细胞培养

将肝癌细胞株（HepG2 和 HepG2R）接种在含体积分数为 10% 胎牛血清（Fetal Bovine Serum，FBS）的 RPMI 1640 完全培养基中，放置在细胞培养箱中传代培养（37℃，5% CO_2），待细胞状态稳定后进行后续实验。

1.2.3　半数抑制浓度（IC_{50}）测定

收集对数生长期的 HepG2 和 HepG2R 细胞。然后，将 1×10^4 个细胞接种到 96 孔细胞培养板中，放置在

万方数据

培养箱进行培养（37 ℃，5% CO_2）。当细胞融合度约为 70% 时，用含不同浓度（5、10、20、40、80 μmol/L）索拉非尼的培养基（给药组）替换孔板中的培养基，并将等体积的二甲基亚砜（Dimethyl Sulfoxide，DMSO）添加到对照组中。48 h 后，向 96 孔板中各孔中加 10 μL CCK-8 溶液，孵育 3 h。打开酶标仪，调节波长至 492 nm，检测各孔的吸光度（A），并计算 IC_{50} 值，以此评价不同浓度的索拉非尼对肝癌细胞的抑制作用。抑制率的计算公式为：$[1-(A_{给药组}-A_{空白组})/(A_{对照组}-A_{空白组})]\times 100\%$。

1.2.4 细胞增殖实验

收集对数生长期的细胞，将每孔 1×10^4 个细胞接种至 96 孔细胞培养板，并置于培养箱中培养。当细胞融合度约为 70% 时，分为对照组、索拉非尼组、槲皮素组、联合用药组。对照组为无血清培养基，索拉非尼组浓度分别为 5、10、20、40、80 μmol/L，槲皮素单药组为 5 μmol/L，联合用药组为不同浓度的索拉非尼（5、10、20、40、80 μmol/L）+5 μmol/L 的槲皮素。药物处理 48 h 后，向每个孔中加入 10 μL CCK-8 溶液，孵育 3 h，在 450 nm 处测定吸光度。

1.2.5 实时定量 PCR

利用 Trizol 提取总 RNA，将其逆转录为 cDNA，热循环设置：95 ℃预变性 3 min，95 ℃变性 30 s，60 ℃延伸 30 s，共 40 个循环。每个样本至少重复 3 次，使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$（循环阈值）法测定相对表达水平。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

基因名称	引物	序列
ABCB1	上游引物	5′-TCTATGGTTGGCAACTAACACT-3′
	下游引物	5′-CTCCTGAGTCAAAGAAACAACG-3′
TOP2B	上游引物	5′-TGAAACTGTGCAAGACATTCTG-3′
	下游引物	5′-TGTAGATTCTGCTCCCAACATT-3′
LC3B	上游引物	5′-GATGTCCGACTTATTCGAGAGC-3′
	下游引物	5′-TTGAGCTGTAAGCGCCTTCTA-3′
BECLIN	上游引物	5′-CCATGCAGGTGAGCTTCGT-3′
	下游引物	5′-GAATCTGCGAGAGACACCATC-3′
BAX	上游引物	5′-ATTGCCGCCGTGGACACAGA-3′
	下游引物	5′-ATGGTGAGTGAGGCGGTGAG-3′
BCL-2	上游引物	5′-ATGTGTGTGGAGAGCGTCAACC-3′
	下游引物	5′-GAGCAGAGTCTTCAGAGACAGCC-3′
GAPDH	上游引物	5′-AGAAGGCTGGGGCTCATTTG-3′
	下游引物	5′-AGGGGCCATCCACAGTCTTC-3′

1.2.6 蛋白印记实验

收集各组细胞，并分别和细胞裂解液、蛋白酶抑制剂（细胞裂解液和蛋白酶抑制剂体积比为 99∶1）混合，在冰上破碎 30 min，然后于 4 ℃条件下 12 000 r/min 离心 5 min，蛋白浓度由 BCA 试剂盒测定。取蛋白样品 30 μg 进行电泳分离，电泳结束后，将胶上蛋白转移到聚偏二氟乙烯（Polyvinylidene Difluoride，PVDF）膜上，进行脱脂牛奶封闭，2 h 后滴加稀释后的一抗 LC3B（1∶1 000）、Caspase9（1∶1 000）、GAPDH（1∶1 000），4 ℃孵育过夜。聚丁二酸丁二醇酯 - 对苯二甲酸丁二醇酯共聚物（PBST）洗膜 3 次，每次 10 min，二抗（1∶2 000）室温孵育 1 h。加入 ECL 化学发光液进行拍照，并使用 Image J 9.0 软件进行灰度值分析。

1.2.7 细胞划痕实验

收集各组细胞，6 孔培养板每孔接种 2×10^5 个细胞，并放置在培养箱中培养，当细胞融合度约为 70% 时，进行划线。用倒置显微镜在培养 0、24、48 h 后观察并拍照。

1.2.8 流式检测细胞周期

用不同组的药物处理 48 h 后，收集细胞，加 1 mL 含体积分数 70% 的乙醇重新悬浮，并在 -20 ℃下固定过夜。将固定的细胞以 5 000 r/min 离心 3 min。加入 1 mL 低渗溶液，37 ℃孵育 30 min。离心收集细胞，加入 1 mL 碘化丙啶（PI）溶液（50 μg/mL），在冰水中浸泡 30 min。最后，通过流式细胞仪检测细胞周期。

1.3 统计学处理

用 GraphPad Prism 8.0 和 SPSS 21.0 软件进行数据分析。所有实验均进行 3 组平行实验，并以平均值 ± 标准差表示。两组比较使用 Student's-t 检验分析均值之间的差异，多组比较采用 ANOVA 检验。$p<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 肝癌耐药细胞系的成功建立

用不同浓度的索拉非尼（5、10、20、40、80 μmol/L）分别处理 HepG2、HepG2R 细胞 48 h，采用 CCK8 法检测索拉非尼对 HepG2 和 HepG2R 抑制作用。如表 2 所示，不同浓度的索拉非尼均对 HepG2 和 HepG2R 有抑制作用，且抑制作用呈现剂量依赖性。

万方数据

同浓度的索拉非尼对 HepG2 的抑制作用明显高于 HepG2R，且差异具有统计学意义（$p < 0.001$）。索拉非尼对 HepG2 和 HepG2R 的 IC_{50} 值分别为 19 μmol/L 和 72 μmol/L。

实时荧光定量 PCR（Real Time quantitative PCR，RT-qPCR）结果显示（表 3），HepG2R 细胞中耐药基因 *ABCB1* 和 *TOP2B* 的表达量显著高于 HepG2 细胞。HepG2R 细胞中自噬基因 *LC3B* 和 *BECLIN* 的表达量显著高于 HepG2 细胞。与 HepG2 细胞相比，HepG2R 细胞中癌基因 *BCL-2* 表达量显著降低，*BAX* 表达量显著升高，且 *BCL-2* 与 *BAX* 的比值显著降低，表明在相同浓度的索拉非尼干预下，HepG2R 细胞的凋亡水平显著低于 HepG2 细胞，以上结果均具有统计学差异（$p < 0.05$）。

Western blot 结果显示（表 4、图 1），HepG2R 细胞的微管相关蛋白轻链 3（LC3）- Ⅱ与 LC3- Ⅰ的比值高于 HepG2 细胞，差异具有统计学意义（$p < 0.05$），表明 HepG2R 的自噬水平显著高于 HepG2。Caspase9（半胱氨酸蛋白酶）在 HepG2R 细胞中的表达高于 HepG2 细胞，差异有统计学意义（$p < 0.05$），表明 HepG2R 细胞的凋亡水平明显低于 HepG2 细胞。以上结果说明 HepG2R 抗性细胞系已经成功建立。

表 2　不同浓度的索拉非尼对 HepG2 和 HepG2R 的抑制作用

项目	不同索拉非尼浓度下的抑制率 /%					*p*	*F*
	5 μmol/L	10 μmol/L	20 μmol/L	40 μmol/L	80 μmol/L		
HepG2	9 ± 0.001 1	24 ± 0.000 1	52 ± 0.002	79 ± 0.001 4	91 ± 0.010 0	< 0.001	9 777.06
HepG2R	1 ± 0.001 3	4 ± 0.000 15	13 ± 0.004	22 ± 0.000 1	42 ± 0.010 3	< 0.001	5 204.97
p	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001		
t	−42.02	−59.30	−109.17	−110.56	−18.86		

表 3　HepG2 和 HepG2R 各基因相对表达量

项目	*ABCB1*	*TOP2B*	*LC3B*	*BECLIN*	*BAX*	*BCL-2*	*BCL/BAX*
HepG2	0.71 ± 0.01	0.76 ± 0.02	0.65 ± 0.04	0.85 ± 0.01	0.39 ± 0.02	0.96 ± 0.03	2.46 ± 0.13
HepG2R	1.00 ± 0.06	0.84 ± 0.04	0.83 ± 0.03	0.96 ± 0.03	0.91 ± 0.02	0.72 ± 0.03	0.79 ± 0.04
p	0.002	0.035	0.003	0.004	0.000	0.001	0.000
t	−4.14	−1.33	−2.57	−2.75	−13.00	4.00	9.82

表 4　HepG2 和 HepG2R 中 LC3- Ⅰ、LC3- Ⅱ、Caspase9 的表达水平

项目	Caspase9	LC3- Ⅰ	LC3- Ⅱ	LC3- Ⅱ /LC3- Ⅰ
HepG2	0.92 ± 0.01	0.9 ± 0.01	0.31 ± 0.01	0.35 ± 0.01
HepG2R	0.49 ± 0.01	1.1 ± 0.1	0.84 ± 0.01	0.85 ± 0.01
p	0.000	0.030	0.000	0.000
t	21.50	−1.82	−26.50	−25.00

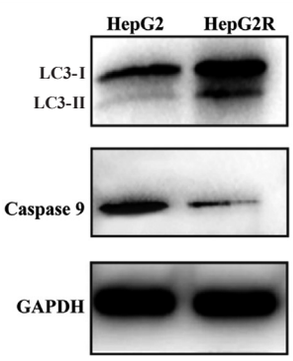


图 1　HepG2 和 HepG2R 细胞中自噬蛋白表达

2.2　不同组 HepG2R 细胞的增殖能力比较

从表 5 可知，不同浓度（5、10、20、40、80 μmol/L）索拉非尼单独使用和不同浓度索拉非尼联合槲皮素（5 μmol/L）均能抑制耐药 HepG2R 细胞的增殖，且呈剂量依赖性。同一浓度下，与索拉非尼组相比，联合用药组的抑制作用更为显著，差异有统计学意义（$p < 0.05$）。以上结果表明，槲皮素可以在不同浓度索拉非尼下逆转耐药细胞 HepG2R 对索拉非尼的耐药性。

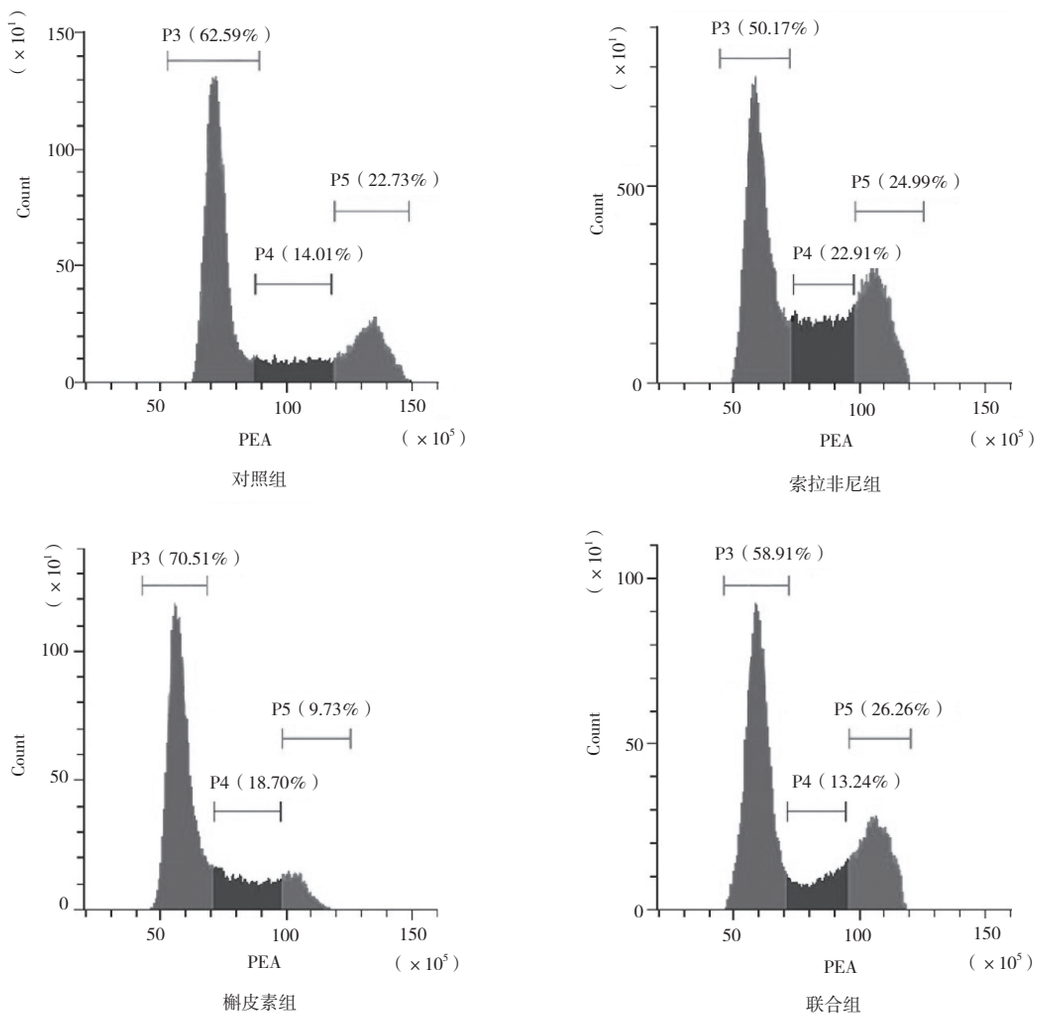
2.3　不同组细胞周期比较

不同实验组的细胞周期比较结果见图 2。可以看出，与对照组相比，索拉非尼组 G2/M 期细胞比例上升 2.26%，槲皮素组 G2/M 期细胞比例下降 13%，联合用药组 G2/M 期细胞比例上升 3.53%。且同一周期各

万方数据

表 5　索拉非尼单药组和联合用药组对 HepG2R 的抑制作用

项目	不同索拉非尼浓度下的抑制率 /%				
	5 μmol/L	10 μmol/L	20 μmol/L	40 μmol/L	80 μmol/L
索拉非尼组	1.23 ± 0.04	3.82 ± 0.05	12.6 ± 0.48	22.49 ± 0.62	41.57 ± 0.40
联合用药组	9.04 ± 0.09	23.98 ± 0.17	51.98 ± 0.18	78.91 ± 0.26	91.39 ± 1.32
p	＜ 0.001	＜ 0.001	＜ 0.001	＜ 0.001	＜ 0.001
t	60.08	91.64	59.67	64.11	28.97



P3 代表 G1 期、P4 代表 S 期、P5 代表 G2/M 期。

图 2　不同实验组的细胞周期图

组见的细胞比例差异显著（p ＜ 0.001）。

2.4　不同组自噬水平比较

如图 3、表 6 所示，与对照组相比，联合用药组的 LC3-Ⅱ与 LC3-Ⅰ比值（LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ）显著降低（p ＜ 0.05），表明联合用药可使自噬水平降低，并能有效逆转耐药性。

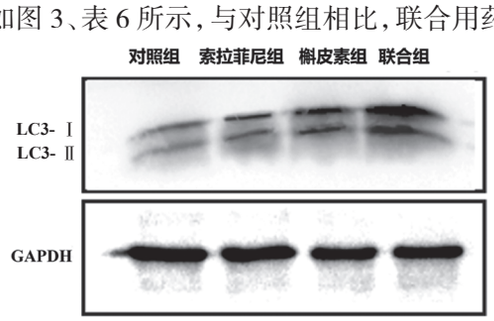


图 3　HepG2R 中 LC3-Ⅰ、LC3-Ⅱ蛋白表达

表 6　HepG2R 中 LC3-Ⅰ、LC3-Ⅱ的灰度值

组别	LC3-Ⅰ	LC3-Ⅱ	LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ
对照组	31.41 ± 0.99	24.68 ± 1.73	0.79 ± 0.04
索拉非尼组	37.07 ± 1.89	28.68 ± 1.73	0.77 ± 0.01[a]
槲皮素组	81.69 ± 5.16	58.48 ± 3.86	0.72 ± 0.01[ab]
联合用药组	81.17 ± 4.66	53.69 ± 2.04	0.66 ± 0.02[abc]

注：a 表示与对照组相比，p ＜ 0.05；b 表示与索拉非尼组相比，p ＜ 0.05；c 表示与槲皮素组相比，p ＜ 0.05。

万方数据

2.5　不同组迁移水平比较

如图 4 所示，与对照组相比，索拉非尼处理 HepG2R 细胞 24、48 h 后，HepG2R 细胞迁移水平无明显改变；槲皮素和联合用药处理 HepG2R 细胞 24、48 h 后，迁移水平被抑制。

3　讨论与结论

肝癌为全球死亡率排名前三的恶性肿瘤[1]，大部分肝癌患者并未接受早期治疗，晚期患者以索拉非尼和全身综合治疗为主。然而，如果长时间使用索拉非尼，肿瘤细胞的敏感性不可避免地会降低，致使药物的耐药性发生变化，从而导致化学疗法失败[11-12]。因此，如何降低肝癌耐药性并找到化学增敏剂成为亟待解决的问题。研究表明，槲皮素是源自植物的天然类黄酮化合物，可减轻化疗和放疗的副作用，并可通过抑制自噬逆转肿瘤细胞多药耐药性[9]。因此，探究槲皮素抗肿瘤作用机制，对研究和开发抗肿瘤新药具有重要意义。

HepG2 细胞株因其在药物耐药性研究中的重要性而受到关注，是一种广泛应用于肝癌研究的细胞系。耐药 HepG2 细胞株的构建旨在模拟肝癌细胞对化疗药物的耐受性，以便研究其机制并寻找潜在的治疗策略。耐药 HepG2 细胞株不仅用于基础研究，还可用于药物筛选和机制研究，帮助研究人员理解肝癌细胞如何逃避药物治疗的影响。这些细胞模型为开发新型抗癌药物和治疗策略提供了重要的实验基础。

ABCB1 基因编码的 P-糖蛋白在多药耐药（MDR）中起着关键作用。该基因的表达水平与肿瘤细胞对抗癌药物的耐药性密切相关。研究表明，*ABCB1* 在多种癌症类型中表现出过表达，导致药物从细胞内排出，促进耐药性的发展[13]。*TOP2B* 基因编码 DNA 拓扑异构酶Ⅱ β，*TOP2B* 的表达与多种癌症的耐药性相关，尤其是在接受化疗的患者中，*TOP2B* 的过表达可能导致对某些药物的耐药性增加[14]。研究显示，*TOP2B* 的表达水平在耐药细胞中通常较高，这可能是细胞对化疗药物的适应性反应所致[15]。本研究中，RT-qPCR 结果显示，HepG2R 细胞中耐药基因 *ABCB1* 和 *TOP2B* 的表达量高于 HepG2 细胞，两种细胞中 *ABCB1* 和 *TOP2B* 表达量的差异具有统计学意义。

在耐药细胞的研究中，自噬基因 *LC3B* 和 *BECLIN* 的 mRNA 表达水平是一个重要的研究方向。这些基因在细胞的自噬过程中发挥关键作用，影响细胞对化疗药物的耐药性。研究表明，槲皮素可以通过抑制 PI3K（胞内磷脂酰肌醇激酶）/Akt（蛋白激酶 B）信号通路促进肿瘤细胞凋亡[16]。在本研究中，HepG2R 细胞中自噬基因 *LC3B* 和 *BECLIN* 的表达量高于 HepG2 细胞，两者之间的差异具有统计学意义。BCL-2 和 BAX 是细胞凋亡（程序性细胞死亡）调

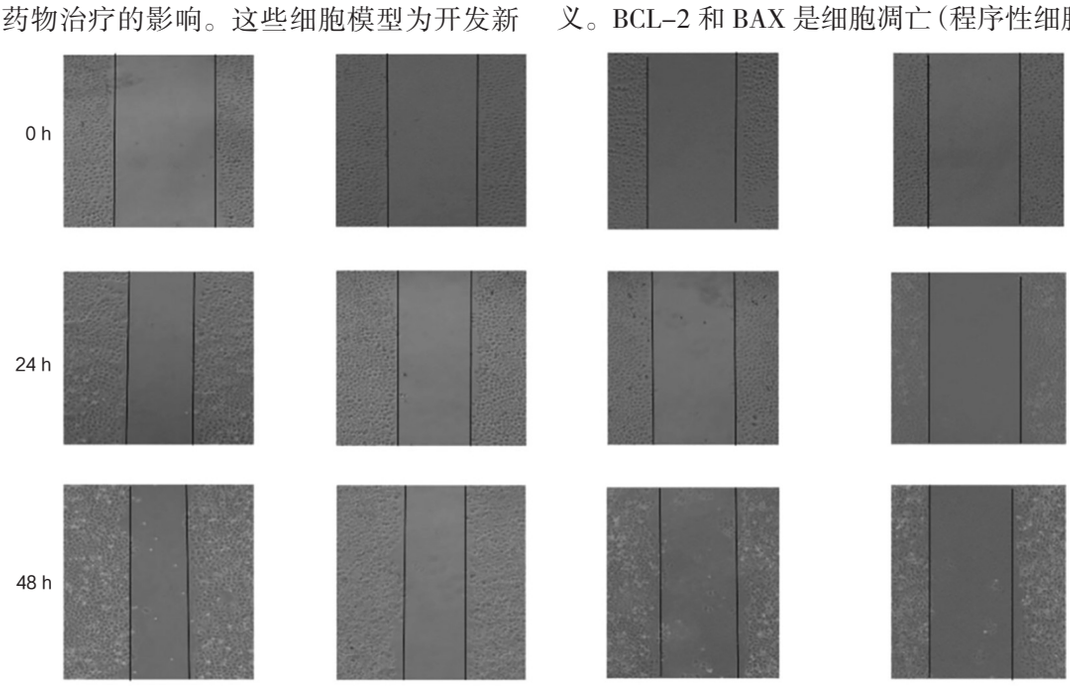


图 4　耐药株细胞迁移水平检测结果图

万方数据

控中的关键蛋白，BCL-2 家族蛋白通过调节线粒体膜的通透性抑制细胞凋亡，而 BAX 则是通过调节线粒体膜的通透性促进细胞凋亡[17]。两者的表达比值（BCL-2/BAX 比值）被广泛研究，以评估细胞对凋亡信号的反应。本研究中，BCL-2 与 BAX 的比值显著降低，表明在相同浓度的索拉非尼干预下，HepG2R 细胞的凋亡水平显著低于 HepG2 细胞。以上结果表明，耐药性细胞株构建成功。

在细胞周期中，G2/M 期是细胞准备分裂的关键阶段。细胞在此阶段会进行 DNA 的检查和修复，以确保在分裂时遗传物质的完整性。G2/M 期出现异常，可能导致细胞增殖失控，进而促进肿瘤的发展[18]。索拉非尼作为多靶点激酶抑制剂，主要通过抑制 Raf/MEK/ERK 信号通路、血管生成相关受体（VEGFR）、促凋亡蛋白 BAX 的表达，抑制肿瘤细胞增殖并诱导凋亡[19]。此外，其通过抑制抗凋亡蛋白（MCL-1），可能增强细胞对 DNA 损伤的敏感性，导致部分细胞停止在 G2/M 期等待修复[20]。因此，在耐药细胞中，索拉非尼可能无法有效诱导凋亡，反而通过残留促存活信号使细胞短暂停滞于 G2/M 期，最终逃逸并继续增殖，索拉非尼组 G2/M 期比例上升 2.26%，可能反映耐药细胞的部分组织效应。槲皮素作为天然黄酮类化合物，通过上调促凋亡蛋白（BAX、Caspase-3），并抑制抗凋亡蛋白（BCL-2）[21]。因此，槲皮素可能有限诱导 G2/M 期细胞凋亡，而非单纯阻滞。实验结果显示，槲皮素处理后，HepG2 细胞增殖能力显著降低，这可能与槲皮素下调 ABC 转运蛋白，促使耐药细胞更快进入凋亡，减少 G2/M 期积累有关。联合用药组 G2/M 期比例上升 3.53%，表明槲皮素与索拉非尼存在协同作用。这说明槲皮素可能通过抑制 ABC 转运蛋白，提高索拉非尼在细胞内的积累，从而促进索拉非尼耐药 HepG2 细胞的 G2/M 阻滞，逆转索拉非尼耐药。综上，槲皮素通过多靶点逆转索拉非尼耐药性，并在细胞周期调控中与索拉非尼形成协同作用，最终表现为联合用药组 G2/M 期比例上升，提示更强的抗肿瘤效果。

多项体外实验表明，槲皮素能够显著抑制不同类型癌细胞（卵巢癌、骨肉瘤等）的迁移和侵袭。在卵巢癌细胞中，槲皮素通过抑制 PI3K/Akt 和 Ras/Raf 信号通路，降低细胞的存活和迁移能力[22]。在骨肉瘤细胞中，槲皮素处理后，细胞迁移和侵袭能力显著降低，同时伴随缺氧诱导因子 -1α（Hypoxia Inducible Factor-1，HIF-1α）、血管内皮生长因子（Vascular Endothelial Growth Factor，VEGF）和基质金属蛋白酶（Matrix Metalloprotease，MMP）-2/9 等相关蛋白表达的下调[23]。本研究中，耐药株细胞中，与对照组相比，索拉非尼处理细胞 48 h 后迁移水平无明显改变，槲皮素组和联合用药组处理的耐药细胞迁移水平被抑制，说明槲皮素下调了肝癌细胞对索拉非尼的耐药性。索拉非尼诱导的耐药细胞往往伴随着上皮 - 间质转化特征，表现为形态梭形化、迁移相关蛋白上调等[24]。耐药细胞通过激活 PI3K/Akt/mTOR（丝氨酸 / 苏氨酸蛋白激酶）或信号转导和转录激活因子（STAT3）通路，增强基质金属蛋白酶表达，促进细胞外基质降解和迁移[25]，但耐药细胞中残余的 PI3K/AKT 或 STAT3 信号可维持迁移能力。此外，索拉非尼诱导自噬（LC3- Ⅱ）表达水平的升高，而自噬可为迁移提供能量和代谢支持，形成促迁移自噬微环境。槲皮素则能显著下调 STAT3 磷酸化水平，抑制其核转位及靶基因（如 *MMP-2*、*MMP-9*、*VEGF*）转录直接抑制迁移相关的通路[25]。联合用药组（索拉非尼 + 槲皮素）的迁移抑制效果显著优于单一用药组，可能与槲皮素下调自噬基因并上调促凋亡蛋白（Caspase-3），而索拉非尼能增大 BAX/BCL-2 比值，两者协同诱导凋亡主导的细胞死亡，削弱迁移所需细胞存活信号有关。综上，索拉非尼单独使用无法抑制迁移，提示耐药性不仅限于增殖逃逸，还涉及侵袭表型的维持。槲皮素通过多靶点干预耐药相关迁移信号，与索拉非尼形成协同效应，为克服肿瘤耐药 - 转移恶行循环提供了新的治疗思路。

综上，索拉非尼、槲皮素及联合用药通过阻滞 HepG2R 停留在 G2/M 期从而抑制细胞增殖和迁移，且联合用药组对 HepG2R 的抑制效果最为显著，表明槲皮素逆转了 HepG2R 细胞对索拉非尼的耐药性。这为肝癌患者的临床治疗提供了重要的理论依据。

参考文献

[1] SUNG H,FERLAY J,SIEGEL R L,et al.Global cancer statistics

万方数据

2020:globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J].CA-A Cancer Journal for Clinicians,2021,71(3):209-249.

[2] VOGEL A,MARTINELLI E,ESMO Guidelines Committee.Updated treatment recommendations for hepatocellular carcinoma (HCC) from the ESMO Clinical Practice Guidelines[J].Annals of Oncology,2021,32(6):801-805.

[3] LU J,ZHANG X P,ZHONG B Y,et al.Management of patients with hepatocellular carcinoma and portal vein tumour thrombosis:comparing east and west[J].Lancet Gastroenterology & Hepatology,2019,4(9):721-730.

[4] RAHMANI F,ZIAEEMEHR A,SHAHIDSALES S,et al.Role of regulatory miRNAs of the PI3K/AKT/mTOR signaling in the pathogenesis of hepatocellular carcinoma[J].Journal of Cellular Physiology,2020,235(5):4146-4152.

[5] SUN J L,ZHOU C H,ZHAO Y,et al.Quiescin sulfhydryl oxidase 1 promotes sorafenib-induced ferroptosis in hepatocellular carcinoma by driving EGFR endosomal trafficking and inhibiting NRF2 activation[J].Redox Biology,2021,41:101942.

[6] CHENG A L,KANG Y K,CHEN Z D,et al.Efficacy and safety of sorafenib in patients in the Asia-Pacific region with advanced hepatocellular carcinoma:a phase Ⅲ randomised,double-blind,placebo-controlled trial[J].The Lancet Oncology,2009,10(1):25-34.

[7] SAVIC GAJIC I M,NIKOLIC V D,SAVIC I M,et al.Optimization of quercetin extraction from green tea (*Camellia sinensis*) using central composite design,and the pharmacological activity of the extract[J].Chemical and Biochemical Engineering Quarterly,2016,30(1):103-115.

[8] ALIZADEH S R,EBRAHIMZADEH M A.Quercetin derivatives:drug design,development,and biological activities,a review[J].European Journal of Medicinal Chemistry,2022,229:114068.

[9] BRITO A F,RIBEIRO M,ABRANTES A M,et al.Quercetin in cancer treatment,alone or in combination with conventional therapeutics?[J].Current Medicinal Chemistry,2015,22(26):3025-3039.

[10] WU R,ZHOU T,XIONG J,et al.Quercetin,the ingredient of Xihuang Pills,inhibits Hepatocellular carcinoma by regulating autophagy and macrophage polarization[J].Frontiers in Bioscience-Landmark,2022,27(12):323.

[11] 胡倍源，覃伟，董琼珠，等 . 肝细胞癌 (HCC) 对索拉非尼耐药相关机制的研究进展 [J]. 复旦学报 (医学版),2018,45(6):884-888.

[12] 罗羽田，李世朋，徐红伟，等 . 铁死亡在肝癌中的调控机制及作用研究进展 [J]. 新乡医学院学报 ,2021,38(1):91-96.

[13] CHEN H K,CHEN Y L,WANG C Y,et al.ABCB1 regulates immune genes in breast cancer[J].Breast Cancer:Targets and Therapy,2023,15:801-811.

[14] 蔡凌翼，陈涛，张晓琳，等 . 基于基因组学视角的乳腺癌化疗耐药机制研究进展 [J]. 中华全科医学 ,2023,21(12):2005-2008.

[15] PAN M,WRIGHT W C,CHAPPLE R H,et al.The chemotherapeutic CX-5461 primarily targets TOP2B and exhibits selective activity in high-risk neuroblastoma[J].Nature Communications,2021,12(1):6468.

[16] JIANG J,YANG Y,WANG F H,et al.Quercetin inhibits breast cancer cell proliferation and survival by targeting Akt/mTOR/PTEN signaling pathway[J].Chemical Biology & Drug Design,2024,103(6):e14557.

[17] WANG Q Q,ZHANG L L,YUAN X D,et al.The relationship between the Bcl-2/Bax proteins and the mitochondria-mediated apoptosis pathway in the differentiation of adipose-derived stromal cells into neurons[J].PLoS One,2016,11(10):e0163327.

[18] 董明新，孙晓辉，徐畅，等 .DNA 损伤修复与细胞周期阻滞 [J]. 国际生物医学工程杂志 ,2021,44(4):329-333.

[19] 徐颖洁，刘明慧，陈佳婧，等 .IL-6/STAT3 信号通路介导索拉非尼治疗原发性肝癌耐药机制的研究进展 [J]. 现代医药卫生 ,2024,40(17):3017-3022.

[20] 廖于，李照东，左的于，等 . 索拉非尼诱导 HepG2 细胞凋亡过程中 Mcl-1 与 bFGF-2 的表达及意义 [J]. 重庆医学 ,2013,42(3):255-257.

[21] YANG J X,MARIA T C,ZHOU B,et al.Quercetin improves immune function in Arbor Acre broilers through activation of NF-κB signaling pathway[J].Poultry Science,2020,99(2):906-913.

[22] 祝珊珊，余惟一，毕丽伟，等 . 槲皮素通过激活 PTEN 抑制 PI3K/AKT 及 JNK 信号通路诱导人乳腺癌细胞凋亡 [J]. 细胞与分子免疫学杂志 ,2022,38(8):714-720.

[23] LAN H F,HONG W,FAN P,et al.Quercetin inhibits cell migration and invasion in human osteosarcoma cells[J].Cellular Physiology and Biochemistry,2017,43(2):553-567.

[24] 付鑫雅 .CDK4/6 抑制剂阿贝西利联合顺铂对人胃癌细胞生物学行为的影响 [D]. 呼和浩特 : 内蒙古医科大学 ,2023.

[25] 黄文涛，周进，王贵玉 . 槲皮素对 SW620 细胞迁移和侵袭的影响 [J]. 中成药 ,2019,41(9):2079-2083.

万方数据