基于微流控芯片细胞模型的中药半枝莲抗脑胶质瘤活性成分筛选研究

陈 兰[1,2#], 游飘雪[1,2#], 王 辉[1], 晁 亮[1], 陈啸飞[1], 柴逸峰[1], 洪战英[1,2*]

(1. 海军军医大学药学系, 上海市药物 (中药) 代谢产物研究重点实验室, 上海 200433; 2. 福建中医药大学药学院, 福建 福州 350122)

摘要: 脑胶质瘤是恶性程度很高的脑肿瘤, 具有复发率高、易发生耐药等特点, 治疗难度大, 寻找和筛选新的候选治疗药物非常重要。本研究首先采用UHPLC-Q/TOF-MS法鉴定半枝莲提取液成分, 共鉴别出38种成分。构建了含六个独立U251细胞单元的微流控芯片模型, 各U251细胞单元由三个平行通道构成, 中间通道用于培养基质胶包裹的U251细胞, 两侧为培养基或含药物培养基通道, U251细胞在基质胶中形成多细胞球体, 并能够在一定程度上模拟肿瘤缺氧的微环境。基于所构建的脑胶质瘤微流控芯片模型、采用灌注流模式对具有抗肿瘤活性的半枝莲进行活性成分筛选, 使用UHPLC-Q/TOF-MS法分析半枝莲灌流样品, 以内标法计算潜在活性成分的相对含量, 结果发现, 样品中野黄芩苷、芹菜素-7-*O*-*β*-*D*-葡萄糖醛酸苷、木犀草素、野黄芩素、柚皮素和芹菜素的含量显著下降 ($P < 0.05$), 提示这6个化合物具有潜在的抗脑胶质瘤活性。采用CCK-8法、划痕实验和凋亡试验对筛选得到的6个潜在活性成分进行药效验证, 结果发现6个潜在活性成分均能减少U251细胞的增殖, 降低细胞的迁移率, 并通过细胞凋亡杀伤细胞。进一步考察6个潜在活性成分对替莫唑胺的增敏性, 结果表明, 柚皮素、芹菜素和木犀草素分别联用替莫唑胺能增加U251细胞对替莫唑胺的敏感性, 降低细胞存活率。相关结果为半枝莲及其活性成分治疗脑胶质瘤、进一步解决脑胶质瘤治疗药物耐药现象提供技术支撑和科学依据。

关键词: 半枝莲; 脑胶质瘤微流控芯片模型; 活性成分筛选; 药效验证; 联合用药

中图分类号: R917 **文献标识码**: A **文章编号**: 0513-4870(2025)06-1861-12

Research on screening of anti-glioma active components in *Scutellaria barbata* based on a microfluidic chip cell model

CHEN Lan[1,2#], YOU Piao-xue[1,2#], WANG Hui[1], CHAO Liang[1], CHEN Xiao-fei[1], CHAI Yi-feng[1], HONG Zhan-ying[1,2*]

(*1. School of Pharmacy, Naval Medical University, Shanghai Key Laboratory for Pharmaceutical Metabolite Research, Shanghai 200433, China; 2. School of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China*)

Abstract: Gliomas represent highly malignant brain tumors with high recurrence rates, susceptible to drug resistance and difficult to treat, therefore finding and screening new therapeutic candidates is extremely significant. In this study, we firstly used UHPLC-Q/TOF-MS method to identify the chemical constituents of *Scutellaria barbata* extract, and a total of 38 constituents were identified. A microfluidic chip model containing six independent U251 cell units was constructed, each U251 cell unit consisted of three parallel channels, the middle channel was used for culturing matrigel-encapsulated U251 cells, and the channel of medium or drug-containing medium was on both sides, the U251 cells formed a multicellular sphere in the matrigel, and were able to mimic the microenvironment of tumor hypoxia to a certain extent. Based on the constructed glioma microfluidic chip model

收稿日期: 2024-12-02; 修回日期: 2025-02-10.
基金项目: 国家自然科学基金项目 (82173777, 81872829).
#共同第一作者.
*通讯作者 Tel: 86-21-81871269, E-mail: hongzhy001@163.com
DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-1183

and the perfusion flow mode for the screening of active components of *Scutellaria barbata* which had antitumor activity, the perfusion samples of *Scutellaria barbata* were analyzed by using UHPLC-Q/TOF-MS, and the relative concentrations of potential active components were calculated by the internal standard method, and it was found that the constituents of the samples containing scutellarin, apigenin-7-*O*-*β*-*D*-glucuronide, luteolin, scutellarein, naringenin and apigenin were significantly decreased ($P < 0.05$), suggesting that these six compounds have potential anti-glioma activity. Using CCK-8 assay, scratch assay and apoptosis assay to validate the medicinal efficacy of the six potential active components obtained from the screening, it was observed that all the six potential active components could reduce the proliferation of U251 cells, decrease the migration rate of the cells, and kill the cells by apoptosis. The sensitization of temozolomide performed by the six potential active compounds was further investigated, which indicated that naringenin, apigenin and luteolin in combination with temozolomide individually increased the sensitivity of U251 cells to temozolomide as well as decreased the cell viability. These results will provide technical and scientific evidence for treating glioma and further solving the anti-drug resistance phenomenon of glioma treatment by *Scutellaria barbata* and its active components.

Key words: *Scutellaria barbata*; glioma microfluidic chip model; active components screening; drug efficacy verification; co-administration

脑胶质瘤发病率占成人恶性脑肿瘤约80%～85%, 弥漫性侵袭脑实质, 其平均生存期不到2年[1]。其主要治疗方法是肿瘤全切除术, 然后同步进行替莫唑胺的放疗和化疗, 近年来尝试使用一些小分子抑制剂和免疫治疗策略提高脑胶质瘤治疗的疗效[2]。其中, 替莫唑胺在体内主要通过DNA甲基化诱导细胞死亡发挥抗肿瘤作用, 具有耐受性好、易透过血脑屏障和口服生物利用度可达100%等优势, 成为治疗人脑胶质瘤的一线药物[3]。然而, DNA修复途径的过度激活、药物外排增加、高抗凋亡潜力或自噬以及胶质瘤干细胞的出现等原因导致脑胶质瘤细胞对替莫唑胺产生耐药性, 对脑胶质瘤的治疗带来了严重的挑战[4]。虽然近年来在胶质母细胞瘤的分子发病机制和生物学方面的研究取得了重要进展, 但并未显著改善患者的治疗结果[5]。因此, 寻找新的有效治疗药物, 抑制脑胶质瘤细胞的生长, 对脑胶质瘤治疗和预后至关重要。

中药中含有丰富的抗肿瘤化合物, 在脑胶质瘤防治方面具有独特的优势, 通过抑制细胞增殖、诱导细胞周期阻滞、抑制侵袭迁移、诱导细胞凋亡、抗血管生成、提高免疫力等不同途径发挥抗脑胶质瘤作用, 肿瘤治疗方案中常见的中药来源抗肿瘤药物有紫杉烷类、喜树碱类、长春花生物碱以及表鬼臼毒素等[6,7]。中药半枝莲为唇形科半枝莲的全草, 具有清热解毒、化瘀利尿功效, 现代药理研究表明半枝莲有效部位如黄酮类化合物、二萜类化合物和多糖等具有抗肿瘤、抗炎、抗氧化和增强免疫力等作用[8], 可通过调控不同的血管生成因子及信号通路等发挥抗胶质瘤微血管生成, 达到抗脑胶质瘤发生和发展的作用[9]。有研究发现半枝莲80%乙醇提取物对人胶质瘤细胞具有明显抑制迁移、侵袭作用, 并呈浓度依赖性抑制细胞存活率、促凋亡活性[10]。郝晓杉等[11]研究发现半枝莲活性成分半枝莲碱B能够抑制U251细胞增殖, 并诱导DNA损伤和细胞凋亡, 同时下调DNA修复相关蛋白Rad51的表达, 并可能通过激活MAPK信号通路而抑制胶质瘤细胞活性。

微流控芯片技术是一种能够在微米级空间内操纵流体的技术, 具有将生物学和化学等基本实验室功能单元集成到以几平方厘米甚至更小的芯片中的能力[12]。微流控芯片细胞模型可将微流体控制技术、细胞培养技术和在线检测技术相结合, 通过模拟体内环境, 分析药物与靶细胞之间的相互作用, 最终达到药物筛选的目的[13]。本研究构建了具有6个相同单元的脑胶质瘤微流控芯片模型, 开展了半枝莲抗脑胶质瘤活性成分筛选实验, 并对筛选得到的潜在活性成分进行了脑胶质瘤细胞增殖、迁移、凋亡以及联合替莫唑胺等药效验证, 以期为抗脑胶质瘤新药发现和中药活性成分筛选提供新的策略。

材料与方法

实验材料与试剂 半枝莲 (批号: 2021031203, 上海雷允上有限公司), 经海军军医大学药学系蒋益萍副教授鉴定为唇形科植物半枝莲 *Scutellaria barbata* D. Don的干燥全草。野黄芩素 (批号: 12887)、野黄芩苷 (批号: 1445)、芹菜素-7-*O*-*β*-*D*-葡萄糖苷 (批号: 10856)、木犀草素 (批号: 13537)、柚皮素 (批号: 9259)、芹菜素 (批号: 10991) 均购自上海诗丹德标准技术服务有限公司; 替莫唑胺 (批号: 131966, 上海陶素生化科技有限公司); 甲醇和甲酸 (HPLC级, 德国默克公司); 乙腈 (LC/MS级, DIKMA PURE公司); 基质胶 (美国R&D

Systems 公司); *L*-2-氯苯丙氨酸 (上海一飞生物有限公司); DMEM 高糖培养基 (南京森贝伽生物技术有限公司); 磷酸盐缓冲溶液 (PBS, 武汉塞维尔生物科技有限公司); 胎牛血清 (fetal bovine serum (FBS), 加拿大 Multi Cell 公司); 青霉素−链霉素溶液、0.25% 胰蛋白酶 (美国 Gibco 公司); T25 培养瓶 (美国 Corning 公司); 96 培养孔板和 10 cm 细胞培养皿 (上海秦尼实业有限公司); SU-8 2075 光刻胶 (美国 Microchem 公司); 硅单面抛光片和显影液 (苏州汶颢芯片科技有限公司); 聚二甲基硅氧烷 (PDMS) 预聚体和固化剂 (美国 Dow Corning 公司); 10×多聚赖氨酸 (北京索莱宝科技有限公司)。

实验仪器　CO_2 细胞培养箱、生物安全柜、离心机 (美国 Thermo Fisher 公司); Bio-TEK Synergy 4 酶标仪 (美国 Bio-TEK 公司); CKX41 型高倍显微镜和 IX-71 倒置显微镜 (日本 OLYMPUS 公司); Milli-Q advantage 超纯水系统 (美国 Millipore 公司); TJ-2A 微量推拉注射泵 (保定兰格公司); Harvard 蠕动泵 p-70 (美国 Harvard 仪器公司); 1 mL 无菌注射器 (常州悦康医疗器械有限公司); 十万分之一电子分析天平 (日本 A&D 公司); BD FACS Calibur 流式细胞仪 (美国 BD 公司); Agilent 1290 液相色谱系统和 Agilent 6530 四级杆−飞行时间质谱仪 (美国 Agilent 公司); ACQUITY UPLC BEH C18 色谱柱 (2.1 mm×100 mm, 2.5 μm, 美国 Waters 公司)。

细胞株及细胞培养　人神经胶质细胞瘤细胞 (U251) 来源于美国 ATCC 公司细胞库, 用含有 10% FBS 和 1% 青霉素−链霉素溶液的 DMEM 高糖培养基培养, 置于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养, 实验用的细胞均取自对数生长期。

半枝莲提取液的制备　精密称取半枝莲药材细粉 25 g, 置于 500 mL 75% 乙醇中浸泡 30 min, 90 ℃加热回流提取两次, 分别提取 2 和 1 h。合并两次的提取液, 减压浓缩, 使用 50% 乙醇将浓缩液定容至 50 mL 量瓶中, 即得质量浓度为 500 mg·mL^{-1} (相当于药材重量) 的提取物浓缩液, 备用。进样前取适量浓缩液加入甲醇稀释 50 倍, 使用 0.22 μm 微孔滤膜过滤。

基于 UHPLC-Q/TOF-MS 的半枝莲提取液成分鉴定

色谱条件　色谱柱采用 ACQUITY UPLC BEH C18 (2.1 mm × 100 mm, 2.5 μm), 流动相为含 0.1% 甲酸的乙腈 (A)−含 0.1% 甲酸水溶液 (B), 梯度洗脱: 0～2 min, 10% A; 2～3 min, 10%→20% A; 3～7 min, 20% A; 7～10 min, 20%→35% A; 10～24 min, 35%→90% A; 24～25 min, 90%→98% A; 25～28 min, 98% A。流速为 0.4 mL·min^{-1}, 柱温为 30 ℃, 进样量为 3 μL。

质谱条件　质谱检测器为 Agilent 6530 飞行时间质谱, 电喷雾离子源采用正、负离子两种模式。干燥气温度 350 ℃, 干燥气体流速 11 L·min^{-1}, 雾化器压力 40 psi (1 psi ≈ 6.9 kPa), 正离子模式毛细管电压 4 000 V, 负离子模式毛细管电压 3 500 V, 质谱质量扫描范围为 *m*/*z* 50～1 500。数据采用 Agilent Mass Hunter Qualitative Analysis B.07.00 软件处理和分析。

化学成分数据库的建立与化合物鉴定方法　查阅半枝莲的相关文献, 整理并建立半枝莲的化合物信息数据库, 包括化合物名称、分子式、精确相对分子质量等信息。采用 Agilent Mass Hunter Qualitative Analysis B.07.00 软件进行峰提取和分析处理, 在满足质量偏差 ≤ 5 ppm 基础上, 与对照品或文献中化合物的准分子离子峰、碎片裂解规律进行比对分析, 鉴定化合物的结构。

基于微流控芯片的半枝莲活性成分筛选实验

脑胶质瘤微流控芯片模型的构建　使用 Auto CAD 软件设计、标准光刻法制作了 6 个相同单元的 U251 微流控芯片, 每个单元具有并列平行微流控通道结构, 各通道间由微梯形柱结构隔开, 中间通道为 U251 细胞通道, 两侧为培养基或含药物培养基通道, 如图 1 所示。将密度为 2×10^7 cells·mL^{-1} 的对数生长期的 U251 细胞混悬液与等体积的基质胶 (4 ℃) 进行混合后, 迅速将混合液加入脑胶质瘤通道中, 置于培养箱中孵育 30 min, 取 20 μL 预热后的培养基加入培养基微通道中, 再置于培养箱中孵育 24 h。

半枝莲活性成分筛选系统的搭建　如图 1 所示, 将两根 PE/20 软管分别连接 U251 芯片中培养基通道的进样口和出样口, 软管的液体入口端与蠕动泵紧密相接, 而出口端则与抽取泵相连。蠕动泵将 2 mg·mL^{-1} 的半枝莲提取液以 6 μL·min^{-1} 的恒定流速注入芯片每个单元的通道内, 而液体的出口处通过抽取泵以 6 μL·min^{-1} 的恒定流速吸取半枝莲灌流样本, 将采集到的样本保存于离心管中, 存储至−80 ℃冰箱中备用。

筛选样品预处理

内标溶液配制　精密称取 25 mg 的 *L*-2-氯苯丙氨酸, 置于 25 mL 量瓶中, 甲醇定容, 得到质量浓度为 1 mg·mL^{-1} 的储备液。取 2 mL 储备液用甲醇将内标溶液稀释成 2 μg·mL^{-1}。

样品预处理　将样品与甲醇溶液按 1∶4 (体积比) 充分混合均匀。加入 1 mL 质量浓度为 2 μg·mL^{-1} 内标溶液, 涡旋 5 min, 以确保样品与内标溶液充分融合。混匀后的样品放置于 4 ℃离心机中, 在 10 000 r·min^{-1} 的条件下离心 15 min, 轻轻取出离心后的上清溶液, 氮气吹干。进样前, 加入甲醇吹干复溶样品, 涡旋 5 min, 复溶后, 10 000 r·min^{-1} 低温离心 15 min, 取上清溶液, 进

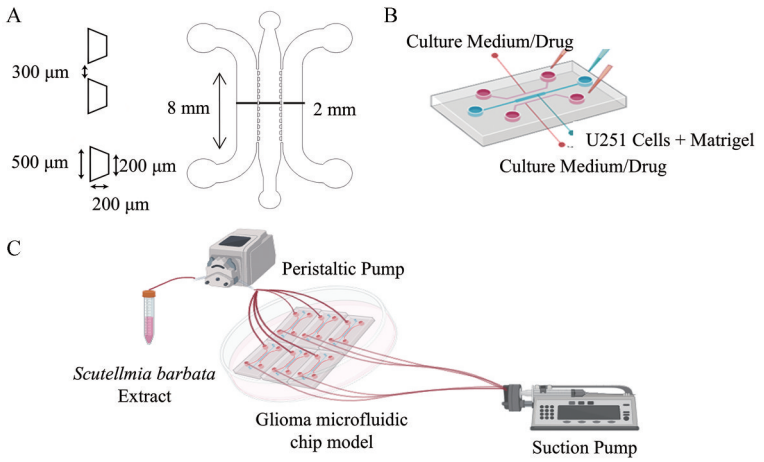


Figure 1 Schematics of the glioma microfluidic chip model (A), the device of this chip contains three channels, the middle channels are U251 cells in Matrigel, and on both sides are the channels for culture medium or drugs (B), and schematic diagram of the screening system for the potential active components of *Scutellaria barbata* (C)

样分析。

筛选得到的半枝莲潜在活性成分体外药效验证 采用CCK-8法、细胞划痕实验以及Annexin V-FITC/PI染色法, 对从半枝莲提取液中筛选得到的潜在活性成分进行体外验证实验, 考察其对U251细胞在增殖、迁移以及凋亡方面的影响。

CCK-8法考察细胞增殖 取对数生长期的U251细胞, 按照5 000个/孔密度接种于96孔板中, 然后将96孔板置于细胞培养箱中孵育24 h。空白组不加入细胞, 对照组加入不含药物的培养基, 阳性对照组为替莫唑胺给药组, 实验组各孔中加入目标浓度的药物作用24或48 h, 具体给药的分组如下: 替莫唑胺 (100、200、300、400 μmol·L^{-1})、野黄芩苷 (80、100、120、140、160 μmol·L^{-1})、柚皮素 (40、80、120、160、200 μmol·L^{-1})、芹菜素 (20、30、40、50、60 μmol·L^{-1})、野黄芩素 (100、125、150、175、200 μmol·L^{-1})、芹菜素-7-*O*-*β*-*D*-葡萄糖醛酸苷 (60、80、100、120、140 μmol·L^{-1}) 以及木犀草素 (10、20、30、40、50 μmol·L^{-1})。避光条件下, 每孔加入10 μL的CCK-8溶液后继续在细胞培养箱中孵育1 h。使用酶标仪记录波长为450 nm处的吸光度值, 并计算细胞存活率。以上实验均进行3次重复独立实验。

细胞划痕实验检测细胞迁移能力 在超净台内, 使用马克笔在6孔板的底部勾划5条等距离平行线, 取对数生长期的U251细胞, 以4×10^{5}个/孔的密度接种于6孔板中。待细胞密度长至90%以上, 使用200 μL枪头垂直于标识线划痕, PBS轻柔润洗2次后, 分别加入2 mL含有不同浓度野黄芩苷、柚皮素、芹菜素、野黄芩素、芹菜素-7-*O*-*β*-*D*-葡萄糖醛酸苷以及木犀草素的含药培养基 (含1% FBS), 浓度分组同CCK-8实验, 对照组加入不含药物的培养基, 放置于37 ℃、5% CO_2培养箱内孵育24 h, 使用显微镜对刮痕和预留标记交点进行拍照, 重复3次独立实验。

Annexin V-FITC/PI染色法检测细胞凋亡 以2×10^{5}个/孔的密度将对数生长期的U251细胞接种于6孔板中。将接种完毕后的6孔板置于37 ℃、5% CO_2培养箱中过夜孵育。待细胞密度达到约60%～70%时, 吸弃旧培养基, 加入1 mL PBS轻柔润洗1次, 分别加入2 mL含有120 μmol·L^{-1}野黄芩苷、80 μmol·L^{-1}柚皮素、30 μmol·L^{-1}芹菜素、200 μmol·L^{-1}野黄芩素、140 μmol·L^{-1}芹菜素-7-*O*-*β*-*D*-葡萄糖醛酸苷以及40 μmol·L^{-1}木犀草素的培养基, 对照组加入不含药物的培养基, 处理48 h后, 收集细胞和细胞培养液, 按照Annexin V-FITC/PI凋亡检测试剂盒说明书的指导进行实验操作。使用流式细胞仪检测细胞凋亡, 重复3次独立实验。

CCK-8法评估潜在活性成分联合替莫唑胺对U251细胞的抑制作用 取对数生长期的U251细胞, 按每孔5 000个细胞的密度接种至96孔板中, 放入细胞培养箱中孵育24 h。实验包括空白组、对照组和实验组。空白组不加细胞, 对照组加入不含药物的培养基, 实验组为120 μmol·L^{-1}野黄芩苷、80 μmol·L^{-1}柚皮素、30 μmol·L^{-1}芹菜素、200 μmol·L^{-1}野黄芩素、140 μmol·L^{-1}芹菜素-7-*O*-*β*-*D*-葡萄糖醛酸苷以及40 μmol·L^{-1}木犀草素分别联用100、200、300、400 μmol·L^{-1}替莫唑胺, 向96孔板各孔中加入目标浓度的药物孵育48 h。避光条件下, 每孔加入CCK-8溶液10 μL, 37 ℃孵育1 h。使用酶标仪读取并记录波长为450 nm处的吸光度值, 计算细胞存活率。为确保实验结果的可靠性, 重复3次独立实验。

统计学分析 实验数据采用GraphPad Prism 8.4.0

软件进行统计学分析, 组间比较通过 t 检验或单因素方差分析, 当 $P < 0.05$ 时, 认为差异有统计学意义。

结果

1　半枝莲化学成分鉴定

按照UHPLC-Q/TOF-MS分析条件, 采集半枝莲提取液的质谱数据, 分别得到正、负离子模式下的总离子流图 (图2)。通过对照品二级碎片分析和化学成分数据库匹配比对, 从半枝莲提取液样品中共鉴定38个化学成分, 正离子模式鉴定38个、负离子模式鉴定15个, 其中在负离子模式下检测到的15个成分均能在正离子模式下检测到, 且正离子模式质谱响应更佳, 因此后续的基于芯片模型的半枝莲成分筛选鉴定实验采用正离子模式, 具体的化学成分鉴定结果见表1。

2　基于脑胶质瘤芯片模型筛选半枝莲中抗脑胶质瘤的活性成分

采用灌注流筛选方法结合UHPLC-Q/TOF-MS法检测预处理后的灌流样品。通过各组分准分子离子峰与对照品和化学成分数据库匹配比对, 提取并积分各组分的色谱峰, 以内标法计算芯片模型内各化学成分的相对含量, 从半枝莲提取液样品中鉴定并筛选出6种潜在活性成分, 具体结构见图3。结果显示, 野黄芩苷、芹菜素-7-*O*-*β*-*D*-葡萄糖醛酸苷、野黄芩素、木犀草素、柚皮素以及芹菜素等6种半枝莲的化学成分在该芯片模型内灌流后相对含量下降 (表2), 提示这些成分可能为半枝莲潜在的抗脑胶质瘤作用的物质基础。

3　半枝莲潜在活性成分对U251细胞增殖的影响

采用CCK-8法研究不同浓度的野黄芩苷、柚皮素、芹菜素、野黄芩素、芹菜素-7-*O*-*β*-*D*-葡萄糖醛酸苷以及木犀草素对U251细胞增殖的抑制作用, 以一线抗胶质瘤药物替莫唑胺为阳性对照, 考察不同药物24和48 h处理后对U251细胞生长的影响。结果如图4所示, 不同浓度的野黄芩苷、柚皮素、芹菜素、野黄芩素、芹菜素-7-*O*-*β*-*D*-葡萄糖醛酸苷以及木犀草素 (即图4B～G) 在相同作用时间内, 随着药物浓度的逐步增加, U251细胞的活力逐渐下降, 其24 h的半数抑制浓度 (IC_{50}) 分别为341.9、426.6、55.82、284.7、216.5、64.58 μmol·L^{-1}, 48 h的IC_{50}值分别为137.6、108.2、41.63、214.7、176.1、39.88 μmol·L^{-1}, 表明以上潜在活性成分对U251细胞的增殖具有显著的浓度依赖性抑制作用。

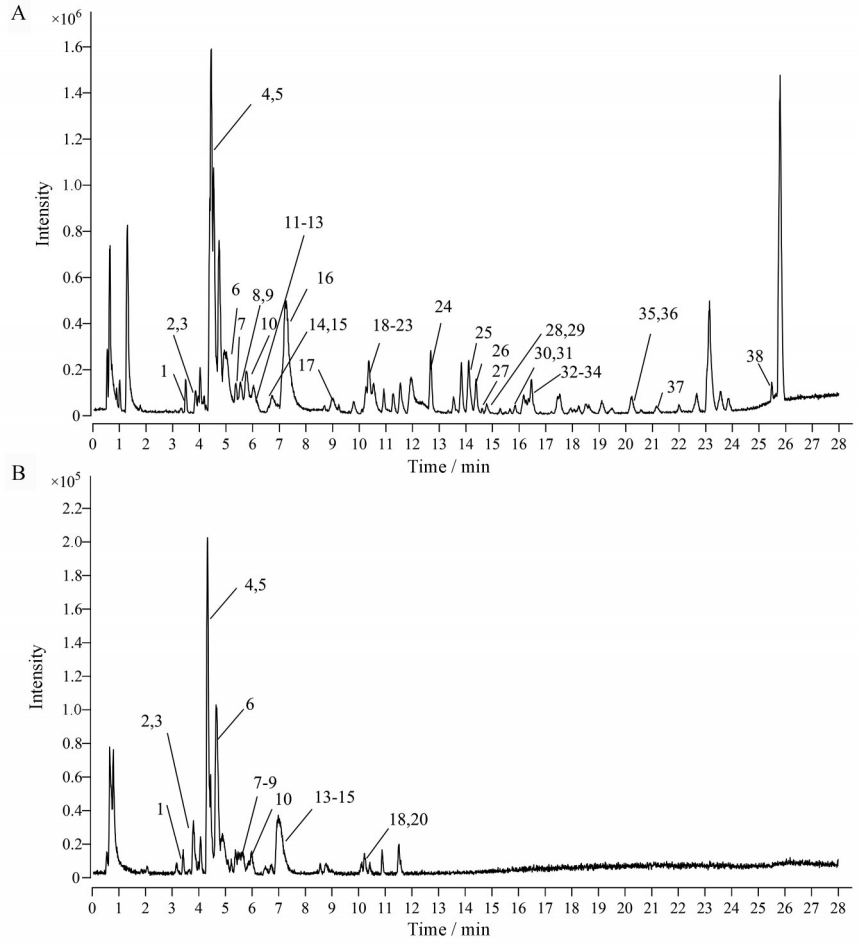


Figure 2　Base peak chromatograms of the extracts of *Scutellaria barbata*. A: Positive ion mode; B: Negative ion mode

Table 1 The chemical components identified in the *Scutellaria barbata* extracts by UHPLC-Q/TOF-MS analysis

No.	t_R/min	Molecular formula	*m/z* (error/ppm)		Identification
			$[M+H]^+$	$[M-H]^-$	
1	3.418	$C_{27}H_{30}O_{15}$	595.167 3 (2.27)	593.150 8 (−0.02)	Luteolin-*O*-rutinoside
2	3.817	$C_{21}H_{20}O_{13}$	481.097 9 (1.13)	479.060 6 (4.83)	Dihydroviscidulin I-7-*O*-*β*-*D*-glucuronide
3	3.992	$C_{21}H_{20}O_{11}$	449.109 0 (2.83)	447.093 2 (−0.44)	Quercitrin
4	4.341	$C_{21}H_{20}O_{12}$	465.102 6 (0.14)	463.090 4 (4.93)	Carthamidin-7-*O*-*β*-*D*-glucuronide
5	4.399	$C_{21}H_{18}O_{12}$	463.087 2 (−0.29)	461.073 9 (−2.93)	Scutellarin
6	4.682	$C_{21}H_{20}O_{12}$	465.103 3 (−5.62)	463.091 3 (6.55)	Isocarthamidin-7-*O*-*β*-*D*-glucuronide
7	5.355	$C_{10}H_{10}O_2$	163.075 4 (−0.21)	477.101 6 (−3.14)	*p*-Hydroxybenzalacetone
8	5.455	$C_{21}H_{18}O_{11}$	447.090 8 (−3.06)	445.077 8 (0.90)	Apigenin-7-*O*-*β*-*D*-glucuronide
9	5.563	$C_{21}H_{20}O_{11}$	449.105 9 (−4.61)	447.092 2 (−3.19)	Scutellarein-7-*O*-*β*-*D*-glucoside
10	5.805	$C_{22}H_{20}O_{12}$	477.102 2 (1.16)	445.088 5 (−0.04)	Hispidulin-7-*O*-*β*-*D*-glucuronide
11	5.917	$C_{15}H_{12}O_6$	289.071 2 (0.89)		Carthamidin
12	6.269	$C_{22}H_{22}O_{12}$	479.118 6 (−0.41)		8-Methoxynaringenina-7-*O*-*β*-*D*-glucuronide
13	6.269	$C_{22}H_{22}O_{12}$	479.116 6 (3.69)	477.106 1 (3.84)	6-Methoxynaringenin-7-*O*-*β*-*D*-glucuronide
14	6.718	$C_{15}H_{10}O_6$	287.054 6 (−1.33)	285.040 6 (0.17)	Scutellarein
15	6.768	$C_{15}H_{12}O_6$	289.070 7 (0.89)	161.050 6 (−2.28)	Carthamidin
16	7.260	$C_{21}H_{18}O_{12}$	463.087 3 (0.08)		5,7,2′,3′-Tetrahydroxy-flavone-7-*O*-*β*-*D*-glucuronidea
17	9.103	$C_{15}H_{10}O_6$	287.055 3 (0.97)		Luteolin
18	10.218	$C_{16}H_{12}O_6$	301.070 2 (1.50)	285.041 5 (3.25)	Hispidulin
19	10.317	$C_{16}H_{14}O_6$	303.085 9 (1.35)		6-Methoxynaringenin
20	10.358	$C_{15}H_{12}O_5$	273.074 4 (5.06)	271.060 3 (−1.10)	Naringenin
21	10.409	$C_{16}H_{12}O_6$	301.071 3 (−2.25)		4′-Hydroxywogoninz
22	10.458	$C_{15}H_{10}O_5$	271.060 4 (−1.08)		Apigenin
23	10.551	$C_{15}H_{10}O_4$	594.211 4 (2.32)		Chrysin
24	12.704	$C_{16}H_{12}O_5$	559.246 3 (−4.27)		Wogoin
25	14.107	$C_{33}H_{33}NO_8$	473.214 8 (−2.10)		Scutebata X
26	14.308	$C_{32}H_{34}N_2O_7$	467.195 1 (2.54)		Scutebarbatine A
27	14.446	$C_{24}H_{34}O_8$	558.248 4 (−0.41)		Scutebart A
28	14.612	$C_{27}H_{28}N_2O_4$	634.264 6 (−0.32)		Aurantiamide acetate
29	14.886	$C_{34}H_{38}N_2O_9$	576.258 1 (−1.49)		Barbatin D
30	15.839	$C_{35}H_{39}NO_{10}$	447.238 8 (1.20)		Scutebarbolide D
31	15.93	$C_{33}H_{37}NO_8$	558.249 7 (0.43)		Scutebartine A
32	16.259	$C_{32}H_{41}NO_9$	457.365 9 (3.78)		Scutolide H
33	16.361	$C_{25}H_{34}O_7$	425.215 (−3.39)		Scutebarbolide I
34	16.444	$C_{33}H_{35}NO_7$	457.368 1 (−1.08)		Scutebartine G
35	20.259	$C_{30}H_{48}O_3$	413.376 7 (−1.76)		Oleanic acid or its isomer
36	20.264	$C_{22}H_{32}O_8$	299.057 6 (3.72)		Scutebarbolide C
37	21.231	$C_{30}H_{48}O_3$	285.074 4 (−6.24)		Oleanic acid or its isomer
38	25.402	$C_{29}H_{48}O$	619.265 (−0.38)		24-Ethylcholest-4-en-3-one

Table 2 Relative contents of six components from *Scutellaria barbata* in the glioma microfluidic chip model. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. $^{**}P < 0.01$ *vs* control group

No.	Analyte	Control group/μg·mL^{-1}	Glioma microfluidic chip model group/μg·mL^{-1}
1	Scutellarin	15.47 ± 2.69	7.794 ± 2.02**
2	Apigenin-7-*O*-*β*-*D*-glucuronide	19.17 ± 2.11	14.57 ± 1.91
3	Scutellarein	1.140 ± 0.43	0.407 ± 0.25
4	Luteolin	1.739 ± 0.14	1.191 ± 0.17**
5	Naringenin	2.127 ± 0.51	1.632 ± 0.58
6	Apigenin	3.531 ± 1.68	2.574 ± 1.67

在相同药物浓度作用后, U251细胞的活力随着作用时间的增加而降低, 说明这些活性成分对U251细胞增殖的抑制作用具有时间依赖性。与阳性药物替莫唑胺组相比, 柚皮素、芹菜素在24和48 h内均显示出较强的U251细胞增殖抑制作用, 效果优于阳性药物组; 野黄芩苷、芹菜素-7-*O*-*β*-*D*-葡萄糖醛酸苷以及木犀草素在作用初期 (24 h) 对U251细胞的增殖抑制作用相对较弱, 随着作用时间延长至48 h后, 增殖抑制作用逐渐增强, 其中野黄芩苷、木犀草素的抑制效果优于替莫唑胺组。综上, 野黄芩苷、柚皮素、芹菜素、野黄芩素、芹菜素-7-*O*-*β*-*D*-葡萄糖醛酸苷和木犀草素均在一定程度上对U251细胞的增殖具有抑制作用。

4 半枝莲潜在活性成分对U251细胞迁移能力的影响

肿瘤转移是导致脑胶质瘤治疗失败的一个重要原

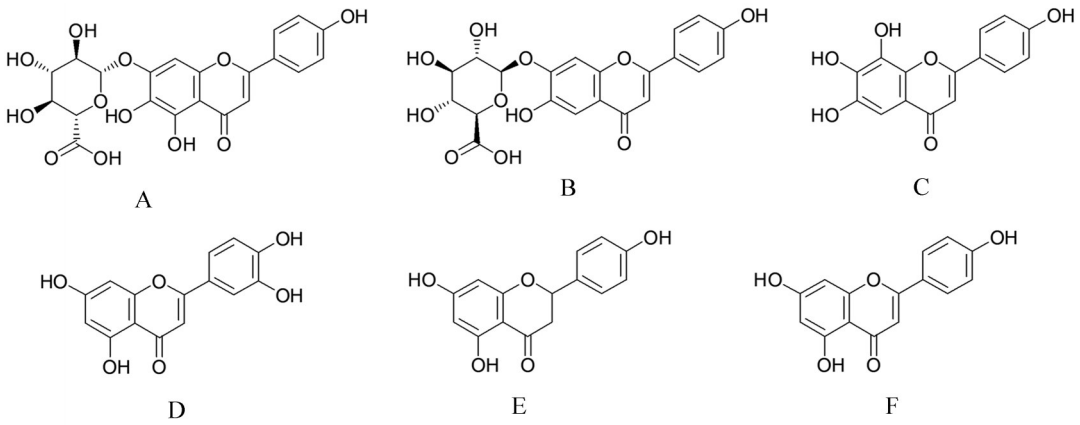


Figure 3　Chemical structures of six potentially active components contained in *Scutellaria barbata*. A: Scutellarin; B: Apigenin-7-*O*-*β*-*D*-glucuronide; C: Scutellarein; D: Luteolin; E: Naringenin; F: Apigenin

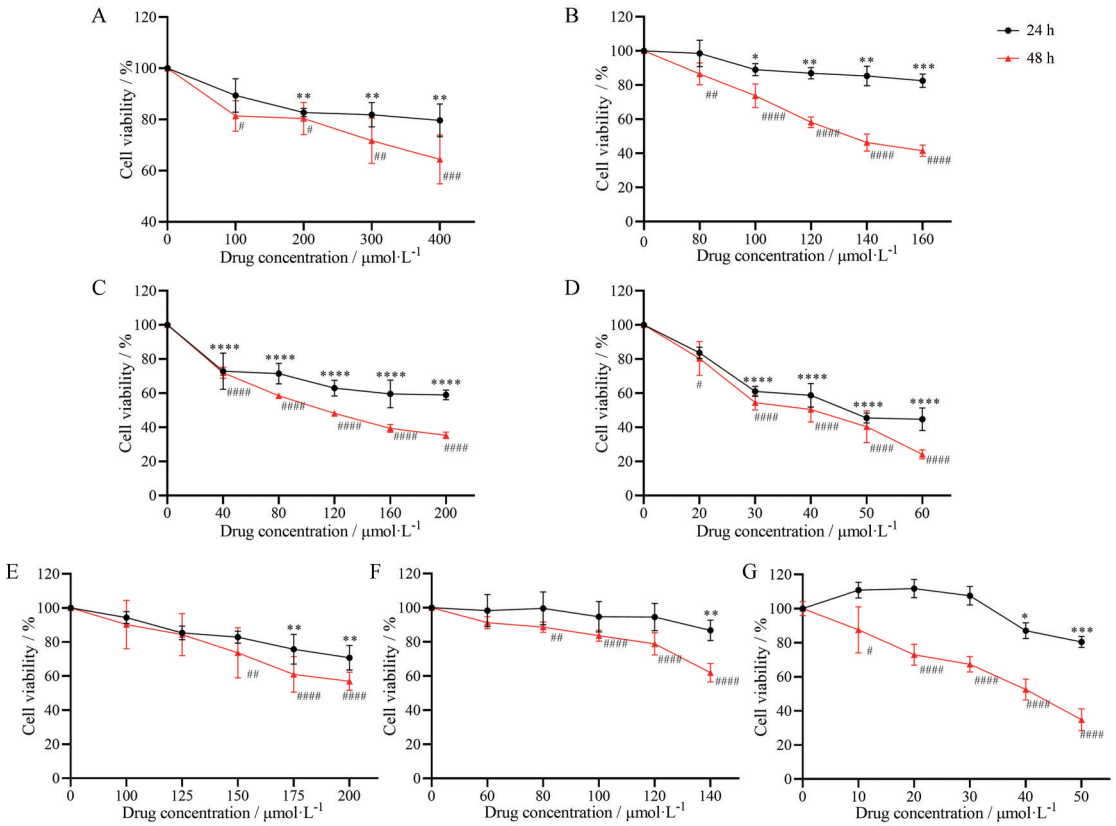


Figure 4　The effect of positive drug and six potential active components of *Scutellaria barbata* on the cell activity of U251. A: Temozolomide; B: Scutellarin; C: Naringenin; D: Apigenin; E: Scutellarein; F: Apigenin-7-*O*-*β*-*D*-glucuronide; G: Luteolin. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$, $^{****}P < 0.000\ 1$ *vs* control group at 24 h; $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$, $^{\#\#\#}P < 0.001$, $^{\#\#\#\#}P < 0.000\ 1$ *vs* control group at 48 h

因, 脑胶质瘤细胞除了在原发灶内大量增殖外, 还可以通过血管、淋巴管等途径向其他组织和器官进行迁移和增殖。本研究采用细胞划痕实验观察半枝莲潜在活性成分对U251细胞迁移的影响。结果如图5所示, 与Control组相比, 随着药物浓度的增加, 细胞划痕的愈合率显著下降 ($P < 0.05$), 表明野黄芩苷、柚皮素、芹菜素、野黄芩素、芹菜素-7-*O*-*β*-*D*-葡萄糖醛酸苷和木犀草素在作用于U251细胞24 h后, 能够显著减弱细胞的迁移能力, 并且对细胞迁移的抑制作用具有明显的浓度依赖性。

5　半枝莲潜在活性成分对U251细胞凋亡的影响

细胞凋亡是细胞死亡的重要途径之一, 诱导细胞凋亡是肿瘤治疗的重要手段。在正常肿瘤细胞中, 磷脂酰丝氨酸只存在于细胞膜的磷脂双分子层内侧,

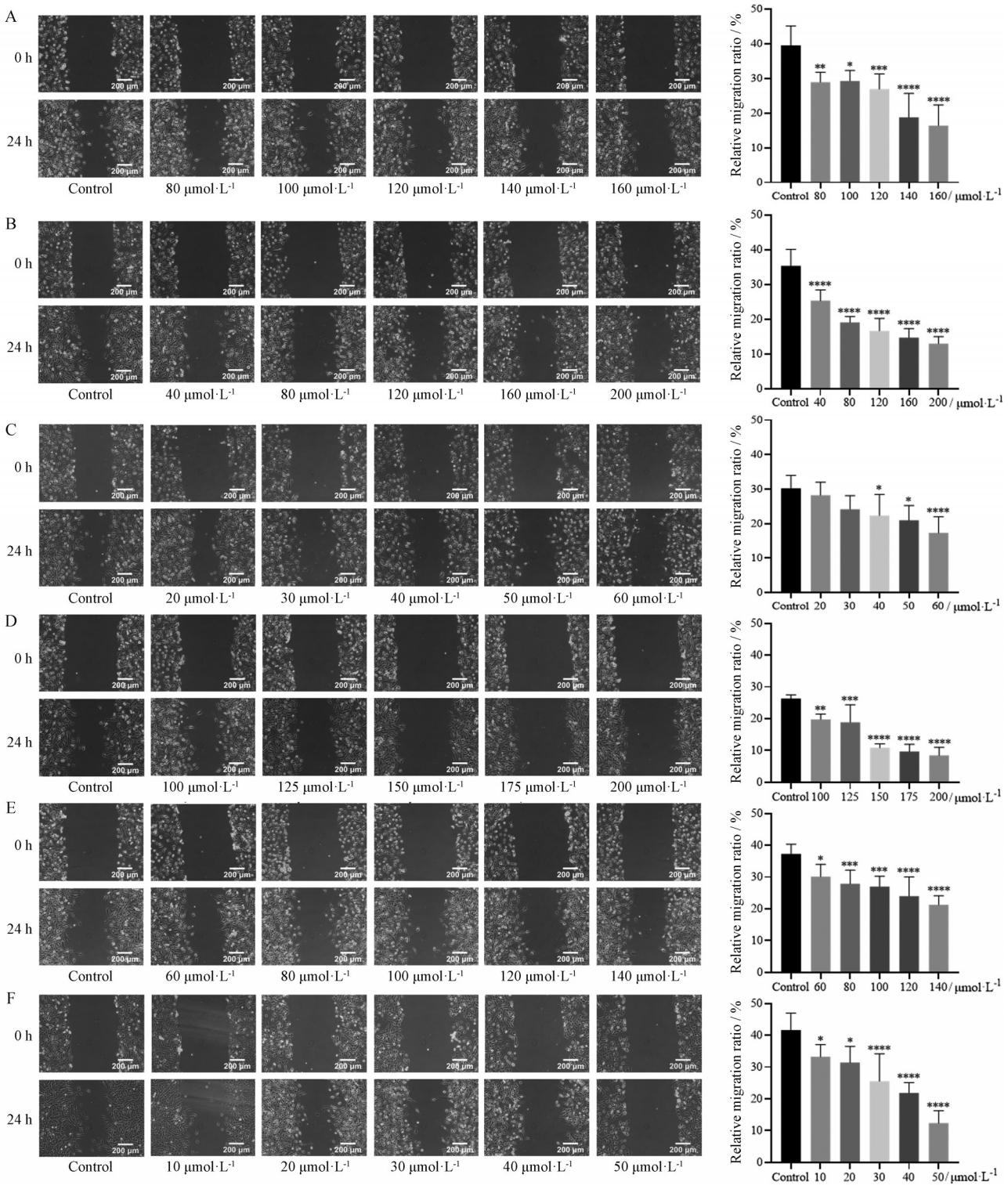


Figure 5 The effect of six potentially active components of *Scutellaria barbata* on the migratory ability of U251 cells. A: Scutellarin; B: Naringenin; C: Apigenin; D: Scutellarein; E: Apigenin-7-*O*-*β*-*D*-glucuronide; F: Luteolin. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$, $^{****}P < 0.000\ 1$ *vs* control group

Annexin V可与磷脂酰丝氨酸选择性结合, 但在细胞处于凋亡期时, 细胞膜内侧的磷脂酰丝氨酸外翻, 此时PI可穿透细胞膜, 将细胞核染成红色。为了进一步探究这些活性成分对细胞增殖抑制作用是否与细胞凋亡相关, 本研究采用Annexin V-FITC/PI双染法考察半枝莲潜在活性成分作用于U251细胞48 h后的凋亡情况, 根据CCK-8实验的结果, 选择各成分作用于U251细胞48 h后抑制率50%的浓度作为给药浓度。结果如图6所

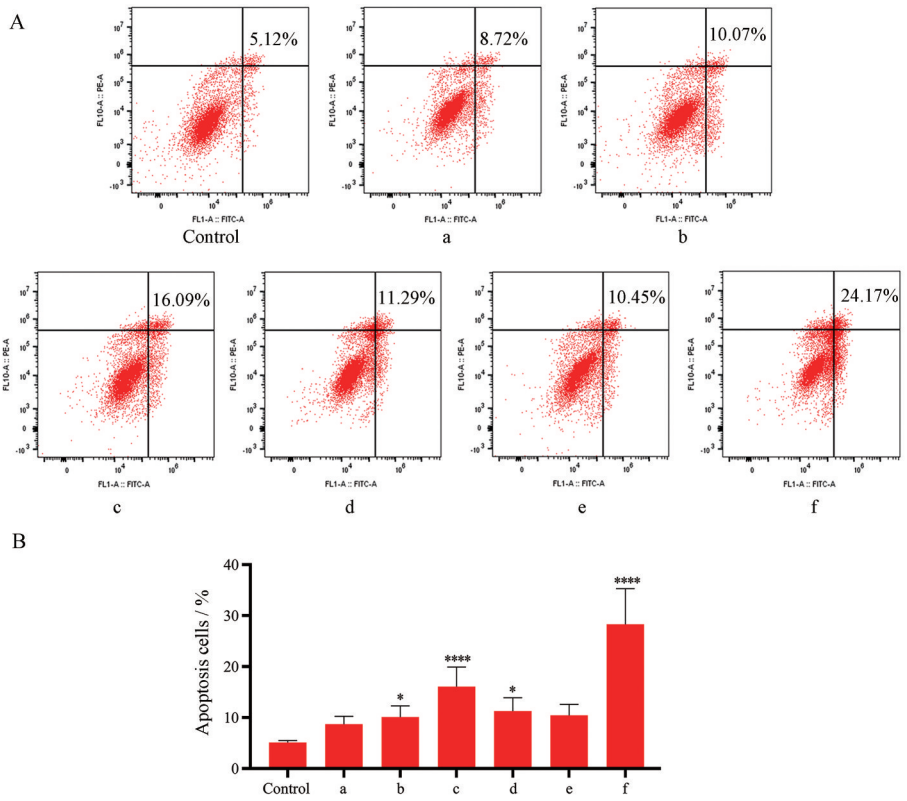


Figure 6　The effect of six potentially active components of *Scutellaria barbata* on the apoptosis of U251 cells (A) and the statistical results of their apoptosis rate of U251 cells (B). $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. $^{*}P < 0.05$, $^{****}P < 0.000\ 1$ *vs* control group. Figure 6A indicates necrotic cells in the upper left, living cells in the lower left, and apoptotic cells in the upper and lower right, and the total proportion of apoptotic cells is plotted in the upper right corner. a: 120 μmol·L^{-1} Scutellarin group; b: 80 μmol·L^{-1} Naringenin group; c: 30 μmol·L^{-1} Apigenin group; d: 200 μmol·L^{-1} Scutellarein group; e: 140 μmol·L^{-1} Apigenin-7-*O*-*β*-*D*-glucuronide group; f: 40 μmol·L^{-1} Luteolin group

示, 与Control组相比, 野黄芩苷、柚皮素、芹菜素、野黄芩素、芹菜素-7-*O*-*β*-*D*-葡萄糖醛酸苷和木犀草素组细胞的凋亡率较高, 其中, 80 μmol·L^{-1}柚皮素、30 μmol·L^{-1}芹菜素、200 μmol·L^{-1}野黄芩素和40 μmol·L^{-1}木犀草素组的凋亡率显著高于对照组 ($P < 0.05$), 表明这些潜在活性成分可通过诱导细胞凋亡而杀伤U251细胞。

6　半枝莲中潜在活性成分联合替莫唑胺对U251细胞的抑制作用

本研究采用CCK-8法测定不同浓度替莫唑胺 (100、200、300、400 μmol·L^{-1}) 作用以及分别联合野黄芩苷 (120 μmol·L^{-1})、柚皮素 (80 μmol·L^{-1})、芹菜素 (30 μmol·L^{-1})、野黄芩素 (200 μmol·L^{-1})、芹菜素-7-*O*-*β*-*D*-葡萄糖醛酸苷 (140 μmol·L^{-1}) 和木犀草素 (40 μmol·L^{-1}) 作用48 h后U251细胞的活力, 评价联合用药对细胞活性的影响。实验结果如图7所示, 与对应浓度的替莫唑胺组相比, 多数成分与替莫唑胺联合使用均能抑制U251细胞的活力, 其中柚皮素联用400 μmol·L^{-1}替莫唑胺组 (图7B)、芹菜素联用400 μmol·L^{-1}替莫唑胺组 (图7C) 抑制作用非常显著, 野黄芩素联用100或400 μmol·L^{-1}替莫唑胺组 (图7D) 以及木犀草素联用400 μmol·L^{-1}替莫唑胺组 (图7F), 能够有效地抑制U251细胞的活力, 表明这些活性成分与替莫唑胺之间可能存在协同作用, 在相同药物浓度下联合用药组能够产生更显著的抑制效果, 为进一步探究从中药中寻找活性成分改善替莫唑胺耐药现象提供了实验依据。

讨论

脑胶质瘤是恶性程度很高的脑肿瘤, 其弥漫性侵袭脑实质使手术难以完全切除和对放疗和化疗药物的耐药性导致容易复发[14,15], 此外, 脑胶质瘤细胞容易沿着神经束、脑膜和血管迁移, 从而使脑胶质瘤的治疗难度加大[16]。目前, 手术切除、放疗、化疗、基因治疗、免疫疗法、光疗、纳米疗法等治疗策略取得了许多进展, 但并未显著降低患者的生存率[17]。为此, 寻找新的治疗策略和药物来提高脑胶质瘤患者的总体生存率仍迫在眉睫。中医药在脑胶质瘤防治方面具有独特的优势, 中药半枝莲提取物对人脑胶质瘤细胞具有明显的抑制迁移、侵袭作用, 本研究构建了脑胶质瘤微流控芯

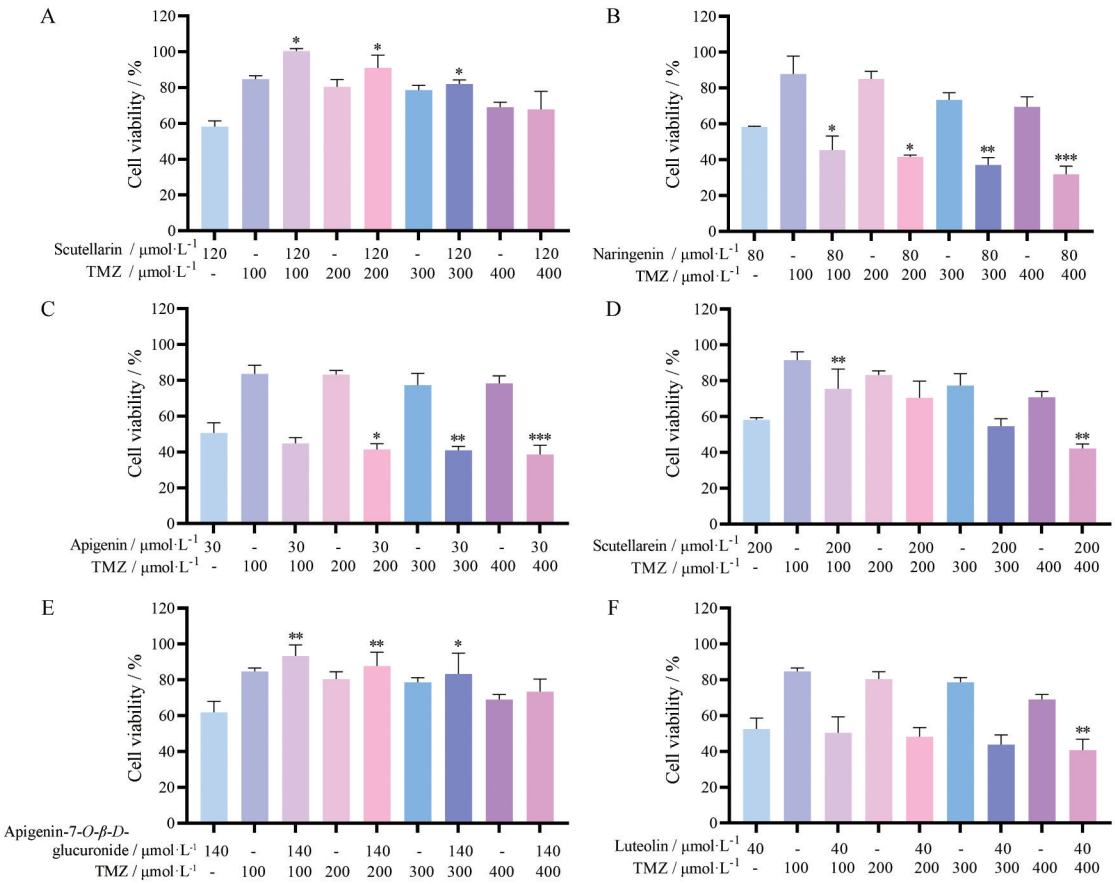


Figure 7 The effect of six potentially active components of *Scutellaria barbata* in combination with temozolomide (TMZ) on cellular activity of U251. A: Scutellarin; B: Naringenin; C: Apigenin; D: Scutellarein; E: Apigenin-7-*O*-*β*-*D*-glucuronide; F: Luteolin. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ *vs* the corresponding concentration of TMZ group

片模型, 用于研究半枝莲提取液中发挥抗脑胶质瘤作用的物质基础。

目前, 抗脑胶质瘤药物筛选方法主要是基于细胞模型的筛选, 大多数是二维的细胞培养, 不能模拟体内微环境[18], 相比之下, 三维模型提供了细胞−细胞、细胞−基质相互作用以及空间和物理化学多样性的优势[19]; 此外, 三维培养模型提供了可持续的高通量平台, 可用于药物筛选[20]。因此, 集微流体控制、细胞培养和在线检测于一体的微流控芯片细胞筛选模型是一种极具潜力的高通量药物筛选新方法。按照微流体操控模式的不同, 可将基于微流控技术的细胞水平高通量药物筛选系统分为大3类, 分别是灌注流模式、液滴模式和微阵列模式[21]。本研究利用微流控芯片技术, 成功构建了含六个独立U251模型单元的芯片模型。各U251模型单元由三个平行通道构成, 中间通道用于培养基质胶包裹的U251细胞。U251细胞在基质胶中形成多细胞球体, 保持高活性, 并能够在一定程度上模拟肿瘤缺氧的微环境。该脑胶质瘤微流控芯片模型为评估药物的抗肿瘤作用提供了平台, 也为体外抗脑胶质瘤药物的药效评价与筛选提供了新的方法。基于构建的脑胶质瘤芯片模型, 采用灌注流模式进行半枝莲抗脑胶质瘤活性成分筛选实验, 从半枝莲提取液中筛选出6个潜在抗脑胶质瘤活性成分, 即野黄芩苷、柚皮素、芹菜素、野黄芩素、芹菜素-7-*O*-*β*-*D*-葡萄糖醛酸苷和木犀草素。现代药理研究表明, 半枝莲中含黄酮、萜类、多糖及生物碱等多类化学成分, 但在半枝莲提取液中部分成分含量较低, 本研究采用的U251微流控芯片筛选体系可能无法筛选出含量很低却具有明显抑制肿瘤细胞增殖、调控细胞凋亡等作用的活性成分, 例如生物碱类成分[22]。此外, 人体脑胶质瘤微环境具有高度复杂的细胞间相互作用网络、独特的血管生成模式以及动态的营养物质和代谢产物梯度等特性, 本文所构建的微流控芯片模型难以完全模拟这些特性, 与人体真实脑胶质瘤微环境仍存在差异, 为提高模型的生物学相关性与精度, 可考虑进一步引入人脑微血管内皮细胞等以构建血脑屏障, 模拟更多元化的肿瘤微环境; 同时结合脑胶质瘤动物模型进行相应的筛选成分药效验证。

对筛选得到的6个潜在抗脑胶质瘤活性成分进行药效验证, 采用CCK-8法评估这些潜在活性成分对U251细胞增殖的影响、划痕实验评估细胞的迁移能力、Annexin V-FITC/PI双染法评估细胞的凋亡。实验发现, 6个潜在活性成分均能在一定程度上减少U251细胞的增殖, 降低细胞的迁移率, 并通过细胞凋亡杀伤细胞。其中, 芹菜素对U251细胞增殖抑制效果最显著, 野黄芩素则在抑制U251细胞迁移方面表现最为突出, 木犀草素对U251细胞凋亡的诱导作用相对较强。考察各单体成分对替莫唑胺的增敏性, 由于48 h的孵育时间能够使药物充分发挥作用[23,24], 在CCK-8法评估潜在活性成分联合替莫唑胺对U251细胞的抑制作用实验中, 选择孵育48 h的IC_{50}作为联合用药的浓度。实验结果表明, 柚皮素、芹菜素和木犀草素联用替莫唑胺能增加U251细胞对替莫唑胺的敏感性, 从而使细胞存活率降低。此外, 实验发现野黄芩苷和芹菜素-7-*O*-*β*-*D*-葡萄糖醛酸苷分别与替莫唑胺联合用药后细胞活力反而增强, 可能与野黄芩苷和芹菜素-7-*O*-*β*-*D*-葡萄糖醛酸调控细胞相关蛋白表达和信号通路有关。野黄芩苷是MPR2、MRP3和BCRP等ATP结合盒转运蛋白的底物[25], 可能通过上调肿瘤细胞表面的药物外排转运蛋白的表达与活性, 使替莫唑胺被外排出细胞的量增加, 导致细胞内替莫唑胺的有效浓度降低, 减弱其对肿瘤细胞的杀伤作用, 进而使细胞活力增强[26]。另外, 野黄芩苷可激活PI3K-AKT等抗凋亡信号通路, 促使下游抗凋亡蛋白表达增加, 抑制替莫唑胺诱导的细胞凋亡程序, 导致细胞活力上升[27]。芹菜素-7-*O*-*β*-*D*-葡萄糖醛酸苷可激活MAPK信号通路[28], 从而促进胶质母细胞瘤细胞对替莫唑胺的耐药, 加速细胞增殖[29], 因此其与替莫唑胺联合用药后细胞活力反而增强。

综上, 本研究通过UHPLC-Q/TOF-MS鉴定和分析了半枝莲的化学成分, 基于脑胶质瘤微流控芯片模型对其进行抗脑胶质瘤活性成分筛选, 并通过CCK-8实验、划痕实验和流式细胞术等探究潜在活性成分和各成分联合替莫唑胺的抗脑胶质瘤作用, 发现半枝莲有效成分野黄芩苷、柚皮素、芹菜素、野黄芩素、芹菜素-7-*O*-*β*-*D*-葡萄糖醛酸苷和木犀草素均能通过抑制细胞增殖、抑制细胞迁移和诱导细胞凋亡等方式发挥抗脑胶质瘤作用, 柚皮素、芹菜素和木犀草素联用替莫唑胺能够更有效地抑制U251细胞的活力, 为进一步研究半枝莲及其活性成分抗脑胶质瘤的作用机制提供科学依据。

作者贡献: 陈兰和游飘雪负责实验设计研究方案、实验研究过程、实验数据采集与分析并撰写论文, 二人同等贡献; 王辉负责协助实验完成和论文修改; 晁亮负责论文修改; 陈啸飞负责论文指导和修改; 柴逸峰负责论文指导; 洪战英负责提出实验思路、实验设计与指导、论文修改及基金支持。

利益冲突: 本文无利益冲突。

References

[1] Schaff LR, Mellinghoff IK. Glioblastoma and other primary brain malignancies in adults: a review [J]. JAMA, 2023, 329: 574-587.

[2] Ma R, Taphoorn M, Plaha P. Advances in the management of glioblastoma [J]. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2021, 92: 1103-1111.

[3] Wen X, Zhao DM, Chen FH. *In vitro* anti-tumor activities and mechanisms of phenothiazines in combined treatment with temozolomide in human glioma cell lines [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2024, 59: 918-929.

[4] Tomar MS, Kumar A, Srivastava C, et al. Elucidating the mechanisms of temozolomide resistance in gliomas and the strategies to overcome the resistance [J]. Biochim Biophys Acta Rev Cancer, 2021, 1876: 188616.

[5] Wen PY, Weller M, Lee EQ, et al. Glioblastoma in adults: a society for neuro-oncology (SNO) and European Society of Neuro-Oncology (EANO) consensus review on current management and future directions [J]. Neuro Oncol, 2020, 22: 1073-1113.

[6] Datta S, Luthra R, Bharadvaja N. Medicinal plants for glioblastoma treatment [J]. Anticancer Agents Med Chem, 2022, 22: 2367-2384.

[7] Wang JJ, Qi FH, Wang ZX, et al. A review of traditional Chinese medicine for treatment of glioblastoma [J]. Biosci Trends, 2020, 13: 476-487.

[8] Chen Q, Rahman K, Wang SJ, et al. *Scutellaria barbata*: a review on chemical constituents, pharmacological activities and clinical applications [J]. Curr Pharm Des, 2020, 26: 160-175.

[9] Tang DD, Zhao XP, Fan XX, et al. Research progress on anti-glioma microangiogenesis of *Scutellaria barbata* [J]. Glob Tradit Chin Med (环球中医药), 2023, 16: 1701-1706.

[10] Han CH. A Study on Inhibiting Effects and Mechanism of the Extracts of Oldenlandia diffusa Willd., Sculellaria barbata and their Herb Pair on the Migration and Invasion of Human Malignant Glioma Cells (白花蛇舌草、半枝莲及其药对提取物对人胶质瘤细胞迁移侵袭的影响及作用机制研究) [D]. Dalian: Dalian Medical University, 2019.

[11] Hao XS, Feng PP, Zhang YY, et al. Scutebarbatine B suppresses proliferation and induces apoptosis of human glioma U251 cells [J]. Chin J Pathophysiol (中国病理生理杂志), 2022, 38: 1001-1007.

[12] Jia XM, Yang XP, Luo GA, et al. Recent progress of microfluidic technology for pharmaceutical analysis [J]. J Pharm Biomed Anal, 2022, 209: 114534.

[13] Fan XY, Deng ZF, Yan YY, et al. Application of microfluidic

chips in anticancer drug screening [J]. Bosn J Basic Med Sci, 2022, 22: 302-314.

[14] Minniti G, Niyazi M, Alongi F, et al. Current status and recent advances in reirradiation of glioblastoma [J]. Radiat Oncol, 2021, 16: 36.

[15] Oraiopoulou ME, Tzamali E, Papamatheakis J, et al. Phenocopying glioblastoma: a review [J]. IEEE Rev Biomed Eng, 2023, 16: 456-471.

[16] Lah TT, Novak M, Breznik B. Brain malignancies: glioblastoma and brain metastases [J]. Semin Cancer Biol, 2020, 60: 262-273.

[17] Aldoghachi AF, Aldoghachi AF, Breyne K, et al. Recent advances in the therapeutic strategies of glioblastoma multiforme [J]. Neuroscience, 2022, 491: 240-270.

[18] Monteduro AG, Rizzato S, Caragnano G, et al. Organs-on-chips technologies-a guide from disease models to opportunities for drug development [J]. Biosens Bioelectron, 2023, 231: 115271.

[19] Cardoso BD, Castanheira EMS, Lanceros-Méndez S, et al. Recent advances on cell culture platforms for *in vitro* drug screening and cell therapies: from conventional to microfluidic strategies [J]. Adv Healthc Mater, 2023, 12: e2202936.

[20] Fan Y, Nguyen DT, Akay Y, et al. Engineering a brain cancer chip for high-throughput drug screening [J]. Sci Rep, 2016, 6: 25062.

[21] Liang YX, Pan JZ, Fang Q. Research advances of high-throughput cell-based drug screening systems based on microfluidic technique [J]. Chin J Chromatogr (色谱), 2021, 39: 567-577.

[22] Patel A, Vanecha R, Patel J, et al. Development of natural bioactive alkaloids: anticancer perspective [J]. Mini Rev Med Chem, 2022, 22: 200-212.

[23] Gautam M, Gabrani R. Combinatorial effect of temozolomide and naringenin in human glioblastoma multiforme cell lines [J]. Nutr Cancer, 2022,74: 1071-1078.

[24] Wang D, Wang ZJ, Dai XD, et al. Apigenin and temozolomide synergistically inhibit glioma growth through the PI3K/AKT pathway [J]. Cancer Biother Radiopharm, 2024, 39: 125-132.

[25] Xiao L, Yi T, Chen M, et al. A new mechanism for increasing the oral bioavailability of scutellarin with Cremophor EL: activation of MRP3 with concurrent inhibition of MRP2 and BCRP [J]. Eur J Pharm Sci, 2016, 93: 456-467.

[26] Perazzoli G, Prados J, Ortiz R, et al. Temozolomide resistance in glioblastoma cell lines: implication of MGMT, MMR, P-glycoprotein and CD133 expression [J]. PLoS One, 2015, 10: e0140131.

[27] Xie XH, Wang F, Ge WX, et al. Scutellarin attenuates oxidative stress and neuroinflammation in cerebral ischemia/reperfusion injury through PI3K/Akt-mediated Nrf2 signaling pathways [J]. Eur J Pharmacol, 2023, 957: 175979.

[28] Hu WC, Wang XF, Wu L, et al. Apigenin-7-*O*-*β*-*D*-glucuronide inhibits LPS-induced inflammation through the inactivation of AP-1 and MAPK signaling pathways in RAW 264.7 macrophages and protects mice against endotoxin shock [J]. Food Funct, 2016, 7: 1002-1013.

[29] Xu P, Zhang GF, Hou SX, et al. MAPK8 mediates resistance to temozolomide and apoptosis of glioblastoma cells through MAPK signaling pathway [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 106: 1419-1427.