

小檗碱抗人结直肠腺癌的作用及其机制

周军挺¹, 王丽¹, 吴婷¹, 杨婷婷¹, 鄢连和^{1,2,3*}

1. 丽水市人民医院, 浙江 丽水 323000

2. 丽水市畲族医药研究所, 浙江 丽水 323000

3. 温州医科大学药学院, 浙江 温州 325035

摘要: 目的 探讨黄连的主要药用成分小檗碱的抗结直肠腺癌的机制。方法 不同浓度的小檗碱作用于人结直肠腺癌(HCT-15)细胞后,用显微镜观察人结直肠腺癌细胞的形态学改变;细胞染色方法观察细胞凋亡和自噬;细胞计数分析(CCK-8)检测小檗碱对细胞增殖的影响;免疫印迹法检测小檗碱对人结直肠腺癌细胞自噬和凋亡相关指标的影响;裸鼠移植瘤模型观察小檗碱的体内抑制肿瘤生长活性。结果 显微镜观察结果显示小檗碱作用 HCT-15 细胞后细胞数量减少、间距增大、皱缩。小檗碱能够抑制 HCT-15 细胞增殖,对 HCT-15 细胞增殖的半数抑制浓度(IC₅₀)为 50 μmol/L。免疫荧光和印迹法显示 0、50、100 μmol/L 的小檗碱处理细胞不同时间后,细胞凋亡和自噬对应的标志物明显上升。免疫印迹结果显示小檗碱诱导 HCT-15 细胞自噬和凋亡从而抑制细胞的增殖。小檗碱诱导细胞自噬和凋亡主要通过激活 p38 途径。裸鼠实验结果表明小檗碱能够有效缩小体内肿瘤体积,0、10、20 mg/kg 的小檗碱的抑瘤率分别为 0、32%、74%。结论 小檗碱在体外对 HCT-15 细胞增殖具有明显抑制作用,其机制主要是通过激活 p38 信号通路促进肿瘤细胞自噬和凋亡,并能有效抑制体内肿瘤的生长。

关键词: 小檗碱; 人结直肠腺癌; 自噬; 凋亡; p38 途径

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2017)03-0519-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.03.016

Anticancer property of berberine in human colorectal adenocarcinoma

ZHOU Jun-ting¹, WANG Li¹, WU Ting¹, YANG Ting-ting¹, YAN Lian-he^{1,2,3}

1. People's Hospital of Lishui City, Lishui 323000, China

2. Sheyao Research Institute of Lishui City, Lishui 323000, China

3. Pharmacy School, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China

Abstract: Objective To illustrate the anticancer property induced by berberine, which is extracted from Chinese medicine *Coptidis Rhizoma*. **Methods** Human colorectal adenocarcinoma cells, HCT-15, were treated with different concentration of berberine. Cells were then observed under the optical microscope to analyze the morphological changes; CCK-8 assay was used to detect the inhibition of cell proliferation of HCT-15; Immunoblotting was used to detect the changes of autophagy and apoptosis related markers. Athymic mice injected with HCT-15 cells were used to detect the pharmacological activity of berberine *in vivo*. **Results** After berberine treatment, with the increased dose of berberine, the cell number reduced, cell spacing increased, and cell shape shrunk. The IC₅₀ for berberine treatment in HCT-15 cell was 50 μmol/L. Autophagy and apoptosis markers were enhanced after treatment of 0, 50, and 100 μmol/L of berberine. The data further showed that enhanced autophagy and apoptosis were the main contributors for inhibiting cell proliferation. Immunoblotting analysis showed that berberine induced HCT-15 cells to autophagy and apoptosis mainly through p38 pathway. Athymic mice study showed that berberine treatment could decrease the volume of tumor *in vivo*, and the tumor inhibitory rates by berberine at 0, 50, and 100 mg/kg were 0, 32% and 74%, respectively. **Conclusion** Berberine inhibits the HCT-15 cell proliferation, mainly by p38 pathway and enhances autophagy and apoptosis. Berberine can effectively inhibit tumor growth *in vivo*.

Key words: berberine; human colorectal adenocarcinoma; autophagy; apoptosis; p38 pathway

小檗碱是从中药中提取的天然产物,如从黄连根茎中提取的黄连碱。传统的研究表明,小檗碱主要要用于治疗心血管疾病,如抗心律失常、抗心衰、降血压、调节血脂等^[1],另外对胃肠炎、细菌性痢疾

收稿日期: 2016-08-27

基金项目: 丽水市高层次人才培养项目(2014RC27); 浙江省中医药科学研究基金计划(2011ZA115)

作者简介: 周军挺(1982—), 主管中药师。Tel: 18957091951 E-mail: zhoujunting820824@163.com

*通信作者 鄢连和(1963—), 主任中药师。E-mail: ylh1963@163.com

等肠道感染、眼结膜炎、化脓性中耳炎等也有效。随着中药的广泛应用,越来越多的研究发现小檗碱在体外和体内均具有不同程度的抗肿瘤作用^[2-3],其抗肿瘤机制主要是通过调节细胞周期阻滞在 G₂ 期从而抑制肿瘤细胞增殖和扩散^[4],诱导线粒体损伤从而抑制 ATP 生成^[5],或诱导肿瘤细胞凋亡^[3,6]等途径。然而,小檗碱的抗肿瘤活性在不同类型的肿瘤中作用机制不尽相同,且抗癌机制尚不完全明确。因此,本实验旨在采用分子生物学技术研究小檗碱对结直肠腺癌的药理学机制,通过建立裸鼠移植瘤模型,探讨小檗碱的体内抗肿瘤活性,从而为临床上合理用药提供一定的理论依据。

1 材料

1.1 药品与试剂

小檗碱购自美国 Sigma 公司,用二甲基亚砜(DMSO)溶解,储存浓度为 100 mmol/L;青-链霉素、DMEM 培养基、MDC 染液及 DAPI 染液、自噬抑制剂 3-MA、p38 途径抑制剂 SB205380 以及凋亡抑制剂 Z-DEVD-FMK(氟甲基酮)均购自 Sigma 公司。CCK-8 试剂盒购自合肥博美生物科技有限责任公司;实验用抗体均购自武汉博士德生物工程有限公司;胎牛血清购自浙江天杭生物科技有限公司。

1.2 细胞与动物

人结直肠腺癌 HCT-15 细胞(中国科学院上海细胞库);实验用裸鼠均出生 5 周生长健康,大小均一,体质量约 30 mg,购自上海斯莱克动物实验有限公司。所有动物实验遵循 SYXK(浙)2015-0009 规章。动物实验经过相关部门培训并取得实验动物伦理学资格。

1.3 主要仪器

IX73 型倒置光学显微镜购自奥林巴斯;9602A 型酶标仪购自南京朗普医疗器械有限公司;7100 型荧光显微镜购自奥林巴斯;syntek 电子数显游标卡尺购自德清盛泰芯电子科技有限公司。

2 方法

2.1 细胞培养

HCT-15 细胞用含 10% 胎牛血清(青-链霉素各 100 U/mL)的 DMEM 培养基于 37 °C、饱和湿度、5% CO₂ 培养箱孵育培养,待细胞长至 80%融合时进行实验。

2.2 细胞形态学观察

将处于对数生长期的 HCT-15 细胞接种到 6 cm 的细胞培养皿中,待细胞长到 80%左右,分别用不同浓度的小檗碱(0、50、100 μmol/L)处理细胞 24

h,以及用 50 μmol/L 小檗碱作用 HCT-15 细胞不同的时间(0、24、48 h)后,将细胞培养皿放置于倒置光学显微镜下观察细胞形态变化并拍照记录。

2.3 细胞增殖检测

将对数生长期的细胞按照 7×10^3 个/孔接种于 96 孔板中,12 h 后,分别加入不同浓度的小檗碱(0、50、100 μmol/L)处理 24 h,以及用 50 μmol/L 小檗碱作用 HCT-15 细胞不同的时间(0、24、48 h),每组设置 6 个平行孔。待小檗碱处理后,每孔加入 10 μL CCK-8 试剂孵育 10 min 后,用酶标仪读出吸光度(A)值,并计算细胞增殖率($A_{\text{小檗碱}}/A_{\text{对照}}$)。

2.4 MDC 染色观察自噬泡以及 DAPI 染色观察核裂

取对数生长期细胞,用胰酶消化,充分吹打,使之成单细胞悬液。按 5×10^4 个/mL 接种到 6 孔板,置 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。待细胞长至 80%融合时,分别加入不同浓度的小檗碱(0、50、100 μmol/L)处理 24 h,以及用 50 μmol/L 小檗碱作用 HCT-15 细胞不同的时间(0、24、48 h),置于 37 °C 孵育,吸弃培养液,每孔加终浓度为 50 μmol/L 的 MDC 或者 DAPI,37 °C、5% CO₂ 培养箱中避光孵育 30 min。30 min 后,吸弃 MDC 染液或者 DAPI,用预热的 PBS 洗涤 3 次。封片,荧光显微镜观察并拍照。

2.5 免疫印迹法检测凋亡和自噬相关蛋白表达

取不同浓度的小檗碱(0、50、100 μmol/L)处理 24 h 的细胞或以 50 μmol/L 小檗碱作用 0、24、48 h 后的细胞,加入细胞裂解液研磨 15 min,用 BCA 法测量蛋白质量浓度。各组不同处理的样品分别取 30 μg 用聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,电转移至 PVDF 膜上,分别加一抗 LC3(1:1 000)、ATG5(1:500)、β-actin(1:3 000)、Bax(1:500)、Bcl-2(1:500)、caspase-3(1:1 000)、Survivin(1:1 000)、p38(1:1 000)、p-p38(1:500),室温孵育 2 h。PBST 洗脱 30 min 后,孵育二抗,分别为羊抗兔以及兔抗鼠(1:2 000)。用 ECL 发光法显色曝光,胶片用扫描仪扫描分析。

2.6 自噬、凋亡抑制剂与小檗碱合用对 HCT-15 细胞增殖的影响

分别将不同浓度的小檗碱(0、50、100 μmol/L)与 3-MA(2 mmol/L)或 Z-DEVD-FMK(10 μmol/L)合用作用细胞 24 h,以及将 50 μmol/L 小檗碱与 3-MA(2 mmol/L)或 Z-DEVD-FMK(10 μmol/L)合用作用细胞 0、24、48 h,同时设相应的单用小檗碱组,按“2.3”项方法检测细胞增殖。

2.7 小檗碱抑制细胞增殖与激活 MAPK-P38 通路的关系

分别设对照组、小檗碱 (100 $\mu\text{mol/L}$) 组及小檗碱 (100 $\mu\text{mol/L}$) + SB205380 (10 $\mu\text{mol/L}$) 组, 处理细胞 24 h 后按“2.5”项方法检测 p38 途径相关蛋白表达。分别以不同浓度小檗碱 (0、50、100 $\mu\text{mol/L}$) 单用或与 SB205380 (10 $\mu\text{mol/L}$) 联用, 分别作用于细胞 24 h, 按“2.3”项方法检测细胞增殖。

2.8 裸鼠模型制备

收集处于对数生长期的 HCT-15 细胞制成 1×10^3 个/mL 的单细胞悬液, 每只裸鼠的右腹部 sc 0.2 mL 细胞悬液, 共注射 30 只。将 30 只裸鼠随机分成 3 组, 分别为对照组、10 mg/kg 小檗碱处理组、20 mg/kg 小檗碱处理组。于细胞接种后第 4 天开始 ig 给药, 连续给药 20 d。接种细胞后, 每隔 4 d 用游标卡尺测量瘤的长径 (a) 和宽径 (b), 用公式计算瘤的体积 ($V=0.5 ab^2$)。实验结束后剥离皮下瘤并称瘤体的质量, 计算抑瘤率。

抑瘤率 = (对照组平均瘤体质量 - 实验组平均瘤体质量) / 对照组平均瘤体质量

2.9 统计学方法

应用 SPSS 17.0 统计软件分析, 组间比较采用单因素方差分析和 t 检验, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

3.1 小檗碱对 HCT-15 细胞形态的影响

在普通光学显微镜下检测不同浓度小檗碱 (0、50、100 $\mu\text{mol/L}$) 作用 HCT-15 细胞 24 h, 以及用 50 $\mu\text{mol/L}$ 小檗碱作用 HCT-15 细胞 0、24、48 h 后的形态变化。结果显示, 实验组 HCT-15 细胞的生长状态发生明显改变, 随着小檗碱的浓度增加以及

作用时间的延长, 细胞数量减少且逐渐变得扁平萎缩, 细胞外形变长且细胞间隙增大 (图 1)。

3.2 小檗碱对 HCT-15 细胞增殖的影响

分别采用不同浓度的小檗碱 (0、50、100 $\mu\text{mol/L}$) 处理 HCT-15 细胞 24 h 以及用 50 $\mu\text{mol/L}$ 小檗碱作用 HCT-15 细胞 0、24、48 h 后用 CCK-8 试剂检测细胞增殖情况。结果见图 2。在小檗碱的作用下, 细胞的增殖率与小檗碱的浓度呈现剂量负相关。0、50、100 $\mu\text{mol/L}$ 的小檗碱处理 24 h 后, HCT-15 细胞的增殖率分别为 100%、55% 和 29%。而 50 $\mu\text{mol/L}$ 的小檗碱处理细胞 0、24、48 h 后细胞的增殖率分别为 100%、52% 和 22%。进一步计算显示小檗碱对 HCT-15 细胞在 24 h 的半数抑制浓度 (IC_{50}) 约为 50 $\mu\text{mol/L}$ 。因此采用 50、100 $\mu\text{mol/L}$ 的浓度研究小檗碱的药理学活性可以显著地观察到细胞增殖抑制。

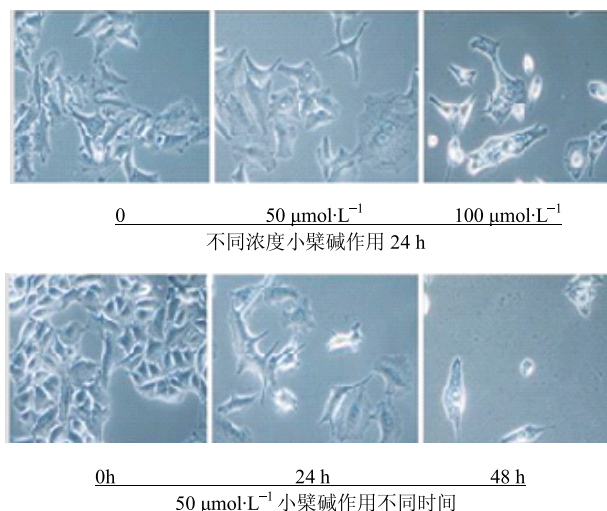


图 1 小檗碱对 HCT-15 细胞形态的影响

Fig. 1 Effect of berberine on morphology of HCT-15 cells

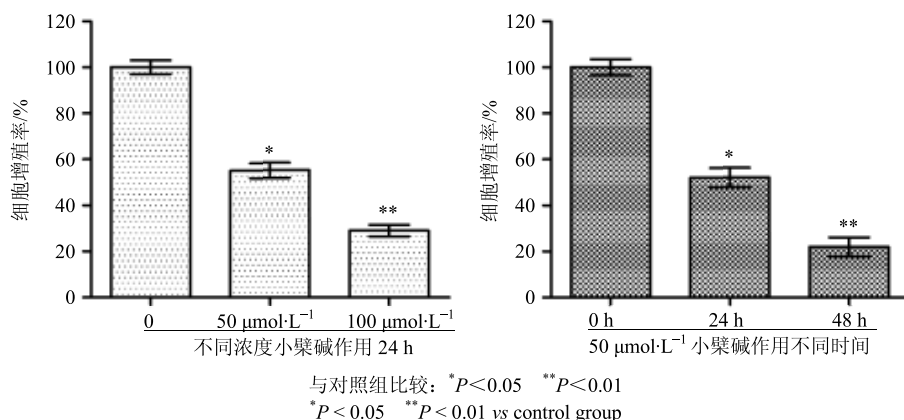


图 2 小檗碱对 HCT-15 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 2 Effect of berberine on proliferation of HCT-15 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3.3 小檗碱对 HCT-15 细胞自噬与凋亡的影响

细胞自噬和凋亡是肿瘤细胞维持生理平衡的重要过程,通常情况下肿瘤细胞受到外界刺激的时候,都会自主调节自噬和凋亡的过程,以适应环境的改变。自噬和凋亡过程已经被用作临床肿瘤治疗的潜在靶点。自噬和凋亡的主要特征分别是自噬泡以及凋亡小体的形成。

3.3.1 对自噬及相关蛋白表达的影响 MDC 染色法是常用的检测自噬泡的手段,分别采用不同浓度(0、50、100 $\mu\text{mol/L}$)小檗碱处理 HCT-15 细胞 24 h 以及用 50 $\mu\text{mol/L}$ 小檗碱作用 HCT-15 细胞 0、24、48 h 后用 MDC 法染色观察到自噬泡的数量随着小檗碱的浓度以及时间的增加而增多(图 3),进一步用免疫印迹法观察到自噬的标志性蛋白 ATG5 以及 LC3 的表达与小檗碱处理呈剂量与时间依赖性上调(图 3),说明小檗碱诱导了 HCT-15 细胞发生自噬。

3.3.2 对凋亡及相关蛋白表达的影响 凋亡小体(DAPI)的染色结果见图 4,主要体现在细胞核分裂,随着小檗碱处理浓度的增加以及时间的延长,细胞核分裂所占的比例明显增大。进一步检测了凋亡过程中主要蛋白的表达,结果显示剪切型

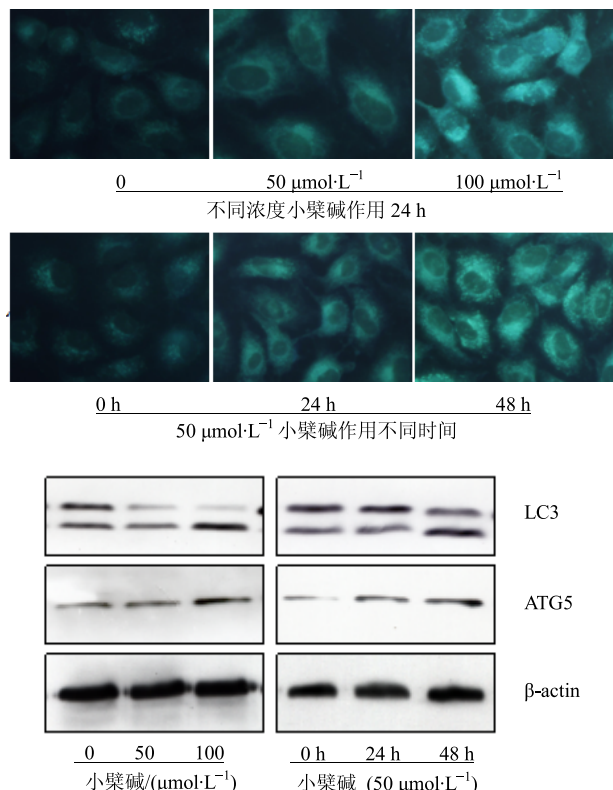


图 3 小檗碱对 HCT-15 细胞自噬及相关蛋白表达的影响
Fig. 3 Effect of berberine on autophagy and related protein expression of HCT-15 cells

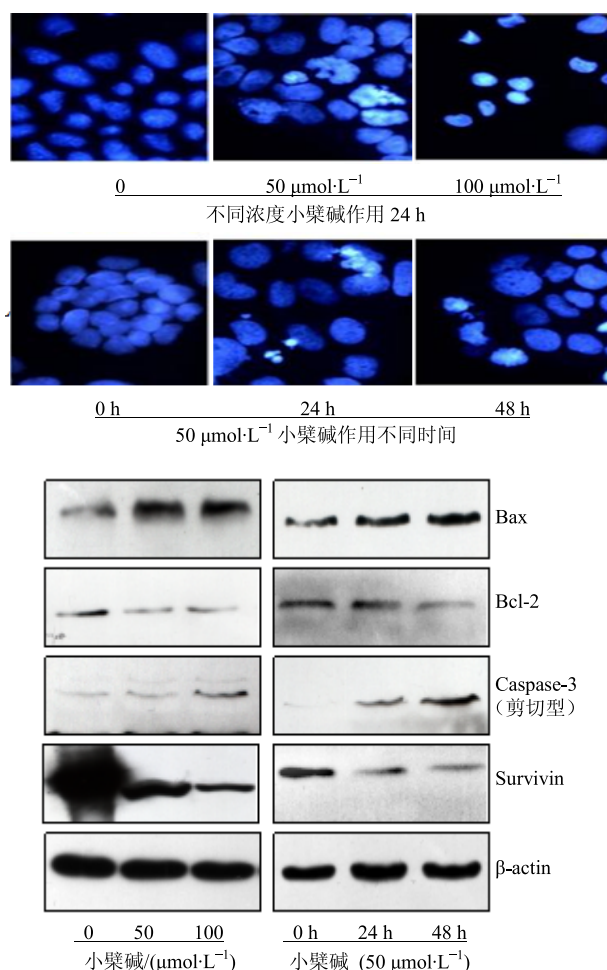


图 4 小檗碱对 HCT-15 细胞凋亡及相关蛋白表达的影响
Fig. 4 Effect of berberine on apoptosis and related protein expression of HCT-15 cells

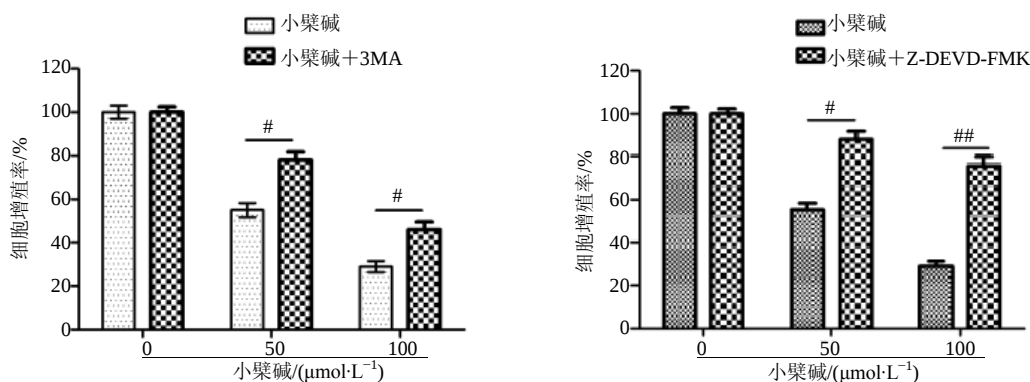
Caspase-3 明显增多,线粒体凋亡相关蛋白 Bax 的表达明显增加,但 Bcl-2 表达减少,细胞生存相关指标 Survivin 的表达明显减少,这些结果进一步证明小檗碱诱导了细胞凋亡。

3.4 自噬或凋亡抑制剂对小檗碱抑制细胞增殖的影响

用自噬抑制剂 3-MA 以及凋亡抑制剂 Z-DEVD-FMK 来抑制小檗碱诱导的自噬和凋亡的过程,进一步检测对细胞增殖的影响。CCK-8 结果(图 5)显示,3-MA 以及 Z-DEVD-FMK 能明显提高小檗碱处理后的细胞增殖率,说明小檗碱处理的肿瘤细胞发生的自噬与凋亡过程促进了细胞的死亡,从而达到抑制细胞增殖的目的。

3.5 小檗碱对 MAPK-p38 途径蛋白表达的影响及 SB203580 与小檗碱合用对细胞增殖和相关蛋白表达的影响

MAPK 途径的激活参与了肿瘤的生理平衡过程。



与小檗碱组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$, 下同
[#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs berberine group, same as below

图 5 小檗碱和自噬抑制剂 3-MA 或者凋亡抑制剂 Z-DEVD-FMK 共同处理细胞后细胞增殖率 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 5 Proliferation rate of HCT-15 cells treated by berberine combined with 3-MA or berberine combined with Z-DEVD-FMK ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

大多数情况下,当肿瘤细胞受到外界刺激时,MAPK 途径会被激活。通常评价 MAPK 途径的活化程度的指标为其家族的相关蛋白的磷酸化修饰,例如 JNK、ERK 以及 p38 经过磷酸化修饰后变成 p-JNK、p-ERK 以及 p-p38。用不同浓度的小檗碱处理细胞 24 h,或者 50 $\mu\text{mol/L}$ 小檗碱作用细胞 0、24、48 h 后,用免疫印迹法检测发现 p38 的磷酸化增多,而总的 p38 表达没有变化(图 6),说明小檗碱诱导了 p38 途径的激活。为了证明该途径的激活参与了小檗碱诱导的细胞增殖抑制作用,用 p38 相关的抑制剂 SB203580 处理细胞,发现小檗碱与 SB203580 共同处理的细胞 p38 的磷酸化水平降低(图 7)。CCK-8 结果显示 SB203580 可以减弱小檗碱对细胞的增殖抑制作用(图 8)。综上所述,小檗碱诱导的 HCT-15 细胞的增殖抑制作用与激活 MAPK-p38 途径有关。

3.6 小檗碱对裸鼠体内肿瘤生长的影响

为了进一步证实小檗碱能在体内抑制肿瘤的生长,将相同数量处于对数期生长的 HCT-15 细胞接

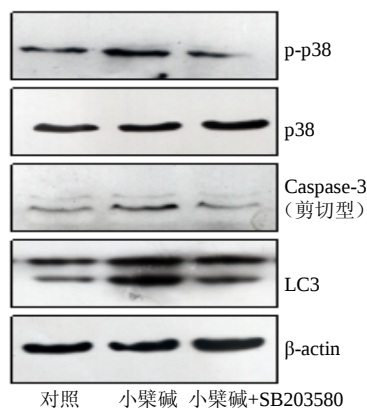


图 7 小檗碱和 SB203580 合用对 HCT-15 细胞 MAPK-p38 途径相关蛋白表达的影响

Fig. 7 Effect of berberine combined with SB203580 on expression of protein related to MAPK-p38 pathway in HCT-15 cells

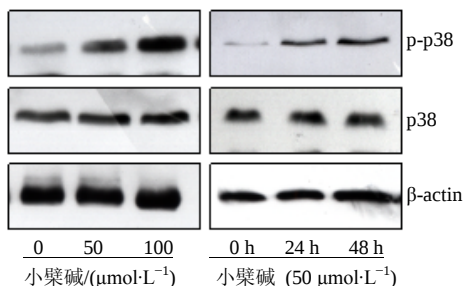


图 6 小檗碱对 HCT-15 细胞 p38 蛋白磷酸化的影响

Fig. 6 Effect of berberine on p38 protein phosphorylation of HCT-15 cells

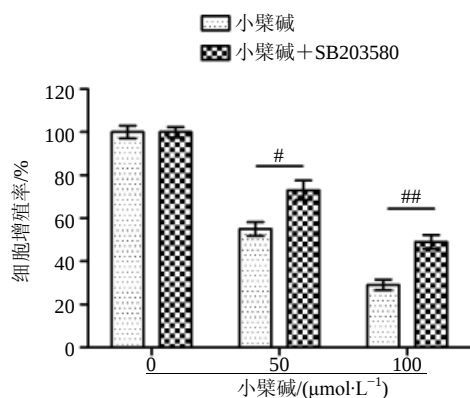


图 8 小檗碱和 SB203580 合用对 HCT-15 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 8 Effect of berberine combined with SB203580 on proliferation of HCT-15 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

种到裸鼠的皮下部位。结果显示接种后小鼠的成瘤率为 100%。从接种后的第 5 天开始测量, 各组瘤体的生长状况基本相同(图 9), 同时从第 5 天开始给予不同剂量的小檗碱处理小鼠, 第 10 天开始, 对照组裸鼠的肿瘤体积增长明显快于其他组, 每组 10 只裸鼠所测量得到的结果取平均值, 药物处理组和对对照组比较差异具有统计学意义($P < 0.05$ 、 0.01)。待第 30 天实验结束后, 剥出皮下肿瘤并称重肿瘤的质量, 结果显示小檗碱处理组肿瘤质量明显低于未处理组, 抑瘤率达到 74% (表 1)。

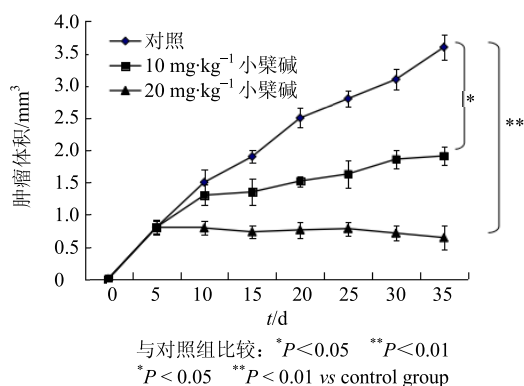


图 9 小檗碱对裸鼠体内肿瘤生长的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)
Fig. 9 Effect of berberine on tumor growth of nude mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

表 1 小檗碱对裸鼠肿瘤质量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 1 Effect of berberine on tumor weight of nude mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	肿瘤质量/g	抑瘤率/%
对照	—	8.33 ± 0.75*	0
小檗碱	10	5.73 ± 0.53**	31.2
	20	2.14 ± 0.22**	74.0

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

4 讨论

小檗碱药理作用广泛^[7-8], 其抗癌机制还需要进一步的阐述^[9-10]。由于其强大的抗菌活性, 小檗碱通常被用于治疗各种传染病, 包括细菌性腹泻、肠道寄生虫感染、眼部沙眼感染等。尽管许多研究也报道了小檗碱具有抗肿瘤活性, 包括将肝癌 HepG2 细胞周期阻滞在 G₂/M 期, 诱导癌细胞凋亡等^[11-12]。但其机制尚不明确。本研究阐述了小檗碱诱导 HCT-15 细胞发生自噬与凋亡, 从而达到抑制癌细胞增殖的能力, 进一步证实小檗碱通过激活 p38 途径达到其抑制增殖的作用。

越来越多的关于抗肿瘤药物的研究表明, 其抑制肿瘤的增殖主要是通过诱导肿瘤细胞自噬和凋亡实现。自噬和凋亡为细胞程序性死亡的 2 种表现形式, 自噬通常被认作是一种主动的死亡过程, 而凋亡是一种被动的细胞死亡程序, 有研究发现自噬可能是凋亡过程的一部分, 自噬发生在凋亡的前期, 当自噬达到一定程度后就会诱发凋亡^[13]。本实验以小檗碱诱导 HCT-15 细胞为模型, 通过免疫荧光以及免疫印迹发现小檗碱诱导的自噬现象指标以及凋亡指标都很明显, 表明小檗碱同时诱导了 HCT-15 细胞的自噬和凋亡。当用自噬抑制剂 3-MA 阻滞小檗碱诱导的自噬, 细胞的增殖率升高, 表明小檗碱诱导的细胞自噬抑制了细胞增殖。同样的, 用凋亡抑制剂 Z-DEVD-FMK 干预小檗碱诱导的细胞凋亡过程, 细胞的增殖率也提高了, 这些结果表明小檗碱诱导的自噬和凋亡共同抑制了细胞增殖, 从而起到抗肿瘤的作用。

MAPK 家族是细胞中广泛表达的丝氨酸/酪氨酸激酶, 该信号的激活在哺乳动物的生命活动中起着重要的作用。MAPKs 有 3 个主要家族 ERK、JNK 和 p38。其中 p38 信号通路是 MAPK 通路重要的分支之一, 其主要是在炎症反应、细胞应激、凋亡、细胞周期和生长等多种生理和病理过程中发挥作用。研究发现 p38 通路的激活参与了多种刺激引起的信号级联反应^[14-15]。同时, p38 在细胞凋亡中也显示调节效应, 近年来的研究发现 p38 信号的激活是导致肿瘤药物发挥其抗肿瘤疗效、引起肿瘤细胞凋亡的必须途径^[16-19]。因此其在凋亡中的作用受到众多研究者的关注。本实验中小檗碱诱导了细胞自噬和凋亡, 从而抑制细胞的增殖, 研究清楚小檗碱是如何诱导这一过程将有助于提高小檗碱的临床应用价值。实验结果表明小檗碱能诱导 p38 途径的活化, 当用 p38 特异性抑制剂 SB203580 来阻止 p38 途径的激活时, 能显著减弱小檗碱对 HCT-15 细胞的增殖抑制作用, 同时在 SB203580 抑制 p38 途径的激活后, 可以明显地阻滞小檗碱诱导的细胞自噬和凋亡, 表明 p38 途径的激活是小檗碱发挥疗效的必经之路。鉴于 p38 信号在小檗碱诱导的细胞自噬和凋亡中的作用, 下一步将考虑以 p38 为核心, 在动物体内研究联合用药。

综上所述, 小檗碱作为一种具有广泛药理作用的异喹啉类生物碱, 在体内外均具有良好的抗肿瘤活性, 主要是通过激活 p38 信号通路, 激活自噬和凋亡的过程, 从而抑制 HCT-15 细胞的增殖。

参考文献

- [1] 姜 甜, 贾友宏, 李一石. 小檗碱调脂作用机制的研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2016, 31(5): 727-730.
- [2] Tang J, Feng Y, Tsao S, *et al.* Berberine and *Coptidis rhizoma* as novel antineoplastic agents: a review of traditional use and biomedical investigations [J]. *J Ethnopharmacol*, 2009, 126(1): 5-17.
- [3] Sun D, Kumarasamy V. A natural alkaloid, berberine, as a novel transcriptional repressor of RET proto-oncogene in medullary thyroid carcinoma [J]. *Cancer Res*, 2015, 75(15): 5546-5546.
- [4] Serafim T L, Oliveira P J, Sardao V A, *et al.* Different concentrations of berberine result in distinct cellular localization patterns and cell cycle effects in a melanoma cell line [J]. *Cancer Chemoth Pharm*, 2008, 61(6): 1007-1018.
- [5] Pereira G C, Branco A F, Matos J A, *et al.* Mitochondrially-targetted effects of berberine on K1735-M2 mouse melanoma cells-comparison with direct effects on isolated mitochondrial fractions [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2007, 323(2): 636-649.
- [6] Pandey M K, Sung B, Kunnumakkara A B, *et al.* Berberine modifies cysteine 179 of IkappaBalpha kinase, suppresses nuclear factor-kappaB-regulated antiapoptotic gene products, and potentiates apoptosis [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(13): 5370-5379.
- [7] 黄 兴, 李艳芬, 寇冠军, 等. 小檗碱抗动脉粥样硬化作用机制研究进展 [J]. 药物评价研究, 2016, 39(3): 469-473.
- [8] Deng Y J, Zhang Y P, Yang Q H, *et al.* Effects of berberine on hepatic sirtuin 1-uncoupling protein 2 pathway in non-alcoholic fatty liver disease rats induced by high-fat diet [J]. *Chin Herb Med*, 2016, 8(4): 359-365.
- [9] 温宝芳, 李文涛, 庄宝祥, 等. 盐酸小檗碱/叶酸-壳聚糖纳米粒的制备及其对 CNE-1 细胞的抑制作用 [J]. 中草药, 2016, 47(20): 3594-3601.
- [10] 张 娜, 郭旭辉, 李林森. 小檗碱抗肿瘤作用机制研究进展 [J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(4): 1030-1032.
- [11] Yu R, Zhang Z Q, Wang B, *et al.* Berberine-induced apoptotic and autophagic death of HepG2 cells requires AMPK activation [J]. *Cancer Cell Int*, 2014, 14(1): 1-8.
- [12] Yip N K, Ho W. Berberine induces apoptosis via the mitochondrial pathway in liver cancer cells [J]. *Oncol Rep*, 2013, 30(3): 1107-1112.
- [13] Kapuy O, Vinod P, Mandl J, *et al.* A cellular stress-directed bistable switch controls the crosstalk between autophagy and apoptosis [J]. *Mol Biosyst*, 2013, 9(2): 296-306.
- [14] 龚小卫, 姜 勇. 丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 生物学功能的结构基础 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2003, 19(1): 5-11.
- [15] Kamel WA-E, Sugihara E, Yamaguchi S I, *et al.* Statins induce apoptosis in osteosarcoma cells by activation of Ampk and p38-MAPK via suppression of mevalonate pathway [J]. *Cancer Res*, 2016, 76(14): 4182.
- [16] Ono K, Han J. The p38 signal transduction pathway activation and function [J]. *Cell Signal*, 2000, 12(1): 1-13.
- [17] 王国军, 刘亚伟, 李玉花, 等. p38 丝裂原活化蛋白激酶抑制剂研究进展 [J]. 生物技术通讯, 2009, 20(3): 399-403.
- [18] Hsieh Y H, Wu T T, Huang C Y, *et al.* p38 mitogen-activated protein kinase pathway is involved in protein kinase C α -regulated invasion in human hepatocellular carcinoma cells [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(9): 4320-4327.
- [19] Semaan J, Pinon A, Rioux B, *et al.* Resistance to 3-HTMC-induced apoptosis through activation of PI3K/Akt, MEK/ERK, and p38/COX-2/PGE2 pathways in human HT-29 and HCT116 colorectal cancer cells [J]. *J Cell Biochem*, 2016, 117(12): 2875-2885.