

# 白屈菜碱-延胡索乙素联合阿霉素通过 NLRP3/Caspase-1 途径协同诱导人乳腺癌 MCF-7/ADR 细胞焦亡作用机制

邹翔<sup>1</sup>, 孙雨恒<sup>1</sup>, 刘凯丽<sup>1</sup>, 宋冬雪<sup>1</sup>, 盛洁静<sup>2</sup>, 袁洪亮<sup>1</sup>, 隋洋<sup>1</sup>, 曲中原<sup>2\*</sup>

1. 哈尔滨商业大学 药物工程技术研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150076

2. 哈尔滨商业大学药学院, 黑龙江 哈尔滨 150076

**摘要:** **目的** 探究白屈菜碱-延胡索乙素联合阿霉素协同诱导人乳腺癌阿霉素耐药细胞 MCF-7/ADR 细胞焦亡的作用机制。**方法** 以乳腺癌 MCF-7/ADR 细胞为研究对象, 采用 CCK-8 法检测白屈菜碱-延胡索乙素联合阿霉素对 MCF-7/ADR 细胞增殖的影响; 采用划痕实验和 Transwell 小室实验检测白屈菜碱-延胡索乙素联合阿霉素对 MCF-7/ADR 细胞侵袭、迁移的影响; 荧光显微镜测定白屈菜碱-延胡索乙素联合阿霉素对 MCF-7/ADR 细胞线粒体膜电位的影响; 采用分子对接技术考察各成分与焦亡相关蛋白核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 (nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3, NLRP3)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1 (Cystein-aspartate protease-1, Caspase-1)、消皮素 D (gasdermin D, GSDMD) 和白细胞介素-18 (interleukin-18, IL-18) 的结合能力; 采用 qRT-PCR、Western blotting 检测焦亡相关蛋白的表达水平。**结果** 白屈菜碱-延胡索乙素联合阿霉素可显著增强阿霉素对 MCF-7/ADR 细胞的增殖抑制作用, 说明白屈菜碱-延胡索乙素对阿霉素具有协同效应作用。与白屈菜碱-延胡索乙素、阿霉素单独使用比较, 白屈菜碱-延胡索乙素联合阿霉素对 MCF-7/ADR 细胞侵袭、迁移的抑制作用更为显著 ( $P < 0.01$ ); 同时, 亦可显著降低线粒体膜电位 ( $P < 0.01$ )。分子对接结果显示, 白屈菜碱、延胡索乙素和阿霉素与焦亡相关蛋白 NLRP3、Caspase-1、GSDMD 和 IL-18 均具有良好的结合活性。qRT-PCR 结果表明, 与白屈菜碱-延胡索乙素、阿霉素单独使用比较, 白屈菜碱-延胡索乙素联合阿霉素可显著上调 GSDMD、NLRP3 和 Caspase-1 mRNA 表达水平 ( $P < 0.01$ )。Western blotting 结果表明, 与白屈菜碱-延胡索乙素、阿霉素单独使用比较, 白屈菜碱-延胡索乙素联合阿霉素可显著上调 NLRP3、GSDMD、Caspase-1 和 IL-18 的蛋白表达水平 ( $P < 0.01$ ), 与相应的 mRNA 表达结果一致。**结论** 白屈菜碱-延胡索乙素可协同增强阿霉素对人乳腺癌 MCF-7/ADR 细胞的增殖抑制作用, 并可通过激活 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 信号通路诱导耐药细胞发生细胞焦亡。

**关键词:** 白屈菜碱; 延胡索乙素; 人乳腺癌耐药细胞 MCF-7/ADR; 阿霉素耐药; 细胞焦亡

**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2025)04-1234-10

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.04.012

## Mechanism of chelidone-fumarine combined with adriamycin on pyroptosis of human breast cancer MCF-7/ADR cells through NLRP3/Caspase-1 pathway

ZOU Xiang<sup>1</sup>, SUN Yuheng<sup>1</sup>, LIU Kaili<sup>1</sup>, SONG Dongxue<sup>1</sup>, SHENG Jiejing<sup>2</sup>, YUAN Hongliang<sup>1</sup>, SUI Yang<sup>1</sup>, QU Zhongyuan<sup>2</sup>

1. Pharmaceutical Engineering Technology Research Center, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China

2. College of Pharmacy, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China

**Abstract: Objective** To investigate the mechanism of chelidone (CHE)-tetrahydropalmatine (THP) combined with adriamycin (ADR) in synergically inducing pyroptosis of adriamycin-resistant human breast cancer MCF-7/ADR cells. **Methods** CCK-8 method was used to detect the effect of CHE-THP combined with ADR on the proliferation of MCF-7/ADR cells. The impact of CHE-THP combined with ADR on the invasion and migration of MCF-7/ADR cells was detected using scratch assay and Transwell chamber assay. The mitochondrial membrane potential was examined by fluorescence microscopy. Molecular docking was applied to detect the binding ability of each component to the pyroptosis-related proteins, including nucleotide-binding oligomerization domain-like

收稿日期: 2024-11-07

基金项目: 黑龙江省自然科学基金项目 (LH2022H001)

作者简介: 邹翔, 博士, 研究员, 博士生导师, 从事中药药效物质基础及作用机制研究。E-mail: zou8663202@163.com

\*通信作者: 曲中原, 博士, 教授, 博士生导师, 从事中药药效物质基础与质量评价研究。E-mail: qiuqiuqu@163.com

receptor protein 3 (NLRP3), Cystein-aspartate protease-1 (Caspase-1), gasdermin D (GSDMD) and interleukin-18 (IL-18). The expressions of pyroptosis-related proteins were detected by Western Blotting. The expressions of pyroptosis-related genes were detected by qRT-PCR. **Results** CHE-THP in combination with ADR can significantly enhance the inhibitory effect on proliferation of ADR on MCF-7/ADR cells, indicating that CHE-THP has a synergistic effect on ADR. Compared with CHE-THP and ADR treatment alone, the inhibition effect of the combined administration on MCF-7/ADR invasion and migration was more significant ( $P < 0.01$ ). Meanwhile, combined administration could also significantly reduce the mitochondrial membrane potential of MCF-7/ADR cells ( $P < 0.01$ ). The molecular docking showed that the CHE, THP and ADR had excellent binding activity with pyroptosis-related proteins including NLRP3, Caspase-1, GSDMD and IL-18. The results of qRT-PCR revealed that compared with ADR or CHE-THP alone, the combined administration could markedly up-regulate the mRNA expression of GSDMD, NLRP3 and Caspase-1 ( $P < 0.01$ ). Western blotting results also showed that compared with ADR or CHE-THP treatment alone, the protein expression levels of NLRP3, GSDMD, Caspase-1 and IL-18 were significantly up-regulated by combined administration of CHE-THP and ADR ( $P < 0.01$ ), which was consistent with the corresponding mRNA expression results. **Conclusion** CHE-THP can synergistically enhance the proliferation inhibition effect of ADR on human breast cancer MCF-7/ADR cells, as well as induce pyroptosis in ADR-resistant cells by activating NLRP3/Caspase-1/GSDMD signalling pathway.

**Key words:** chelidonium; tetrahydropalmatine; human breast cancer resistant cells MCF-7/ADR; adriamycin resistance; pyroptosis

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一，其发病率和死亡率均居高不下，严重威胁女性健康<sup>[1-2]</sup>。据统计，我国乳腺癌发病率和死亡率分别位列女性癌症的第1位和第4位，带来巨大的疾病负担和经济负担<sup>[3-4]</sup>。近年来，虽然采用手术结合新辅助化疗、内分泌治疗和靶向治疗的诊疗方案在乳腺癌的临床治疗中取得了一定的疗效，但在部分病人化疗中出现的对蒽环类药物如阿霉素等的耐药性仍然存在<sup>[5]</sup>，极大地制约了治疗效果，甚至导致乳腺癌复发和转移<sup>[6]</sup>。因此，寻找有效的耐药逆转策略具有重要意义<sup>[7]</sup>。多年来，中医药逆转肿瘤耐药的研究取得了积极进展，一些中药复方、中药提取物及单体成分被证明可通过调控丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK)、磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) /蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt)/核因子- $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B)、Wnt/连环蛋白 (Wnt/Catenin) 以及 B 细胞淋巴瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 等多条信号通路发挥化疗耐药逆转作用，为解决肿瘤化疗耐药难题提供了中医药方案<sup>[8-9]</sup>。

白屈菜-延胡索药对是中医辅助治疗肿瘤的常用药对之一<sup>[10]</sup>。本研究前期系统研究了白屈菜-延胡索逆转乳腺癌耐药的药效物质，并发现白屈菜碱和延胡索乙素是这一药对中逆转乳腺癌阿霉素耐药的最主要成分。进一步采用 Synergy Finder 网站 (<https://synergyfinder.fimm.fi>) 进行联合用药分析确定了 2 种组分最佳的配伍剂量<sup>[11]</sup>。现有研究表明，白屈菜碱-延胡索乙素联用可通过下调乳腺癌耐药

细胞中 P-糖蛋白 (P-glycoprotein, P-gp)、乳腺癌耐药蛋白 (breast cancer resistant protein, BCRP)、肺耐药蛋白 (lung resistance protein, LRP) 等耐药相关蛋白的表达水平，并抑制外排蛋白活性，减少阿霉素的外排，增加耐药乳腺癌细胞内阿霉素浓度，从而发挥逆转耐药作用<sup>[12]</sup>。

但白屈菜碱-延胡索乙素联合阿霉素对耐药乳腺癌侵袭、迁移以及细胞焦亡的影响尚未得到系统研究阐明。据此，本研究旨在采用人乳腺癌阿霉素耐药细胞 MCF-7/ADR 模型，研究白屈菜碱-延胡索乙素联合阿霉素对耐药乳腺癌细胞侵袭和迁移的影响，并阐明其诱导耐药乳腺癌细胞焦亡的分子机制，为相关中药物质组分化疗耐药逆转剂的开发利用提供科学依据。

## 1 材料

### 1.1 细胞株

人乳腺癌阿霉素耐药细胞系 MCF-7/ADR (批号 JY721)，购自上海瑾原生物科技有限公司。

### 1.2 药品与试剂

白屈菜碱(批号 DST220428, 质量分数 $\geq 98\%$ )、延胡索乙素(批号 DSTDY010101, 质量分数 $\geq 98\%$ )均购自成都德思特生物技术有限公司；阿霉素(批号 N1111B, 质量分数 $\geq 98\%$ )购自大连美仑生物技术有限公司；胎牛血清(批号 220315JF)购自美国 Gibco 公司；CCK-8 试剂盒(批号 K101828133EF5E)购自美国 APEX BIO 公司；RPMI 1640 培养液(批号 MA0215-Oct-20H)购自大连美仑生物技术有限公司；Matrigel 基质胶(批号 20224821AHZ)购自

厦门模基生物科技有限公司；线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1, 批号120822230407)购自上海碧云天生物技术有限公司；RIPA 细胞裂解液(批号20221211)购自上海碧云天生物技术有限公司；Trizol(批号B3241BAA)购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司；兔抗核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白3(nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3, NLRP3)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1(cystein-aspartate protease-1, Caspase-1)、消皮素D(gasdermin D, GSDMD)多克隆抗体(批号分别为N05263520、23m5315、BC04379548)均由沈阳万类生物科技有限公司提供；辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗(批号BJ08079044)购自北京博奥森生物技术有限公司；兔抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)多克隆抗体(批号3507442021)购自武汉 ABclonal 生物公司；其他试剂均为分析纯，水为蒸馏水。

### 1.3 仪器

CO-150 型二氧化碳培养箱(美国 NBS 公司)、iMark 型酶标仪[伯乐生命医学产品(上海)有限公司]、DYCZ-24DN 型电泳仪(北京六一生物科技有限公司)、ImageQuant LAS500 型分子生物成像仪(通用电器医疗集团生命科学部)、Easy Cyclor 96 型聚合酶链式反应(PCR)仪(德国 Biometra 公司)、QuantStudio™ 1 型实时荧光定量 PCR 仪[英潍捷基(上海)贸易有限公司]。

## 2 方法

### 2.1 细胞培养

将复苏的 MCF-7/ADR 细胞用 RPMI-1640 培养基(含 10%胎牛血清、1%青-链霉素双抗)置于培养箱中培养(5% CO<sub>2</sub>, 37 °C)。细胞每 2~3 天进行 1 次传代。

### 2.2 CCK-8 法检测白屈菜碱-延胡索乙素联合阿霉素对乳腺癌细胞增殖的影响

将对数生长期的细胞制成  $3.5 \times 10^4$  个/mL 的细胞悬液，接种至 96 孔板，每孔 100  $\mu$ L，置培养箱中培养过夜，加入不同浓度的药物进行实验。设置空白组，将细胞分为对照组及阿霉素(1.25、2.50、5.00、10.00、20.00、40.00、80.00  $\mu$ mol/L)组和白屈菜碱-延胡索乙素联合阿霉素组。白屈菜碱(3  $\mu$ mol/L)与延胡索乙素(5  $\mu$ mol/L)配制成白屈菜碱-延胡索乙素溶液后再分别和不同浓度的阿霉素联合<sup>[12]</sup>。每孔加入 100  $\mu$ L 药液，每个浓

度设 6 个复孔。给药 48 h 后，每孔加入 10  $\mu$ L CCK-8 工作液，微量震荡器上混匀 3~5 min 后，利用酶标仪检测 490 nm 处的吸光度(A)值，计算细胞增殖抑制率。

$$\text{细胞增殖抑制率} = (A_{\text{对照}} - A_{\text{实验}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

### 2.3 划痕实验检测白屈菜碱-延胡索乙素联合阿霉素对 MCF-7/ADR 细胞迁移的影响

取对数生长期 MCF-7/ADR 细胞制成  $3 \times 10^5$  个/mL 的细胞悬液，按 1 mL/孔接种于 6 孔培养板，置培养箱培养至细胞长满 6 孔板表面。取出 6 孔板使用无菌的 200  $\mu$ L 吸头垂直于 6 孔板悬在孔中，向下移动，在单层细胞中间画出“井”字线。使用 PBS 轻轻洗去残留的细胞碎片 3 次，将 PBS 完全吸干后，倒置显微镜下观察、拍照，记作给药 0 h 的划痕状态。将细胞分为对照组、阿霉素组(6  $\mu$ mol/L)、白屈菜碱(3  $\mu$ mol/L)-延胡索乙素(5  $\mu$ mol/L)低剂量组、白屈菜碱(6  $\mu$ mol/L)-延胡索乙素(10  $\mu$ mol/L)高剂量组、白屈菜碱(3  $\mu$ mol/L)-延胡索乙素(5  $\mu$ mol/L)低剂量联合阿霉素组(6  $\mu$ mol/L)和白屈菜碱(6  $\mu$ mol/L)-延胡索乙素(10  $\mu$ mol/L)高剂量联合阿霉素组(6  $\mu$ mol/L)，每组设 3 个复孔<sup>[12]</sup>。各孔加入相应的含药培养液，置培养箱中继续培养 24、48、72 h，取出培养板于倒置显微镜下拍照记录。使用 Image-J 软件分析细胞划痕宽度，计算细胞迁移率。

$$\text{细胞迁移率} = (\text{0 h 划痕面积} - \text{不同时间点划痕面积}) / \text{0 h 划痕面积}$$

### 2.4 Transwell 法检测白屈菜碱-延胡索乙素联合阿霉素对 MCF-7/ADR 细胞侵袭的影响

预先于 Transwell 小室底膜包被 Matrigel 基质胶，将各组 MCF-7/ADR 细胞用无血清培养基配制成  $2 \times 10^5$  个/mL 的单细胞悬液，分组与给药同“2.3”项下方法。取 100  $\mu$ L 接种于 Transwell 小室上室，下室中加入 500  $\mu$ L 含有 10%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)的培养基。培养 24 h 后取出 Transwell 小室，吸干上室培养基，用棉签轻轻擦拭 Matrigel 和上室内的细胞。取新的 24 孔板加入 4%多聚甲醛 600  $\mu$ L，将小室放入后固定 30 min。取出小室后吸干上室固定液，移到预先加入 0.1%结晶紫的孔中染色 15 min，PBS 洗涤 2 次，用棉签轻轻擦拭小室上侧以清除非特异性结合于小室上表面的染料，于显微镜下进行观察、拍照。使用 Image-J 软件分析侵袭细胞数量。

## 2.5 荧光显微镜检测白屈菜碱-延胡索乙素联合阿霉素对 MCF-7/ADR 细胞线粒体膜电位的影响

取对数生长期 MCF-7/ADR 细胞制成  $2 \times 10^5$  个/mL 的细胞悬液, 分组与给药同“2.3”项下方法。按 2 mL/孔接种于 6 孔板, 置培养箱中培养 24 h 后加入终浓度为  $10 \mu\text{mol/L}$  的 JC-1 试剂,  $37^\circ\text{C}$  孵育 20 min, 孵育结束, 加入 PBS 洗涤 2 次, 荧光显微镜下观察红、绿色荧光细胞比例。在线粒体膜电位较高时, JC-1 聚集在线粒体的基质中形成聚合物产生红色荧光; 在线粒体膜电位较低时, JC-1 不能聚集在线粒体的基质中, 此时 JC-1 为单体, 可以产生绿色荧光。

## 2.6 分子对接预测白屈菜碱、延胡索乙素和阿霉素与细胞焦亡相关蛋白的结合活性

首先从蛋白质结构数据库 (protein data bank, PDB) 数据库 (<https://www.rcsb.org>) 中检索关键靶点蛋白信息, 根据蛋白结构的分辨率、完整性、结合口袋的形状、大小和化学性质以及蛋白结构的共晶配体等相关信息, 确定蛋白结构。利用 PyMOL 软件去除靶点蛋白的水分子和配体。然后利用 PubChem 数据库检索并下载该化学成分的二维结构图 SDF 文件, 保存; 导入 Chem3D 19.0 软件中转化为 3D 结构, 并保存为 mol2 格式; 借助 AutoDocktools 1.5.6 软件, 将靶点蛋白及其对应配体和小分子化合物均保存为 pdbqt 格式文件, 并设置对接参数, 随后进行化合物和关键靶点蛋白的分子对接, 分子对接构象的结合能越低, 则结合构象越稳定, 反映受体分子与配体之间结合的可能性越大。通常认为, 结合能小于  $-4.25 \text{ kcal/mol}$  ( $1 \text{ kcal/mol} = 4.182 \text{ kJ/mol}$ ) 提示配体与受体有一定的结合活性, 小于  $-5.00 \text{ kcal/mol}$  有较好的结合活性, 小于  $-7.00 \text{ kcal/mol}$  有强烈的结合活性<sup>[13]</sup>。结合能预测完成后运用 PyMOL 软件处理相应结果并进行可视化编辑。

## 2.7 qRT-PCR 法检测 MCF-7/ADR 细胞内焦亡相关基因的表达

取对数生长期的 MCF-7/ADR 细胞, 按“2.3”项下方法分组、给药。培养 48 h 后, 收集各组细胞, 以 Trizol 法提取细胞总 RNA, 测定 RNA 浓度及纯度后按照试剂盒说明书进行逆转录反应得到 cDNA。以 cDNA 为模板, 进行 PCR 扩增。扩增条件为  $95^\circ\text{C}$  预变性 30 s;  $95^\circ\text{C}$  变性 5 s,  $60^\circ\text{C}$  退火 30 s, 共 40 个循环。以 GAPDH 为内参, 采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算 NLRP3、Caspase-1、GSDMD 的 mRNA 的相对表达。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primers sequence

引物名称	引物序列 (5'-3')
GSDMD	F: GTGTGTCAACCTGTCTATCAAGG R: CATGGCATCGTAGAAGTGAAG
NLRP3	F: CCACAAGATCGTGAGAAAACCC R: GAGCGGTCTATGTGCTCGTCA
Caspase-1	F: TTTCCGCAAGGTTTCGATTTTCA R: GGCATCTGCGCTCTACCATC
GAPDH	F: AGAAGGCTGGGGCTCATTTG R: AGGGGCCATCCACAGTCTTC

## 2.8 Western blotting 法测定 MCF-7/ADR 细胞焦亡相关蛋白的表达

取对数生长期的 MCF-7/ADR 细胞, 按“2.3”项下方法分组、给药, 继续培养 48 h 后收集各组细胞, 用 RIPA 裂解缓冲液冰浴裂解, 离心后收集蛋白。BCA 法进行蛋白定量后, 置  $95^\circ\text{C}$  恒温金属浴 10 min 变性, 蛋白样品经 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h, 分别加入 NLRP3、Caspase-1、GSDMD、IL-18、GAPDH 一抗 ( $1:1000$ ),  $4^\circ\text{C}$  孵育过夜; 1% TBST 洗膜后, 加入 HRP 标记的山羊抗兔二抗 ( $1:1500$ ), 室温孵育 2 h; 利用 ECL 发光液显色, 采用凝胶成像系统拍照, 并应用 Image-J 软件分析条带灰度值。

## 2.9 统计学分析

采用 SPSS for Windows 27.0 软件和 GraphPad Prism 9.0 软件对数据进行分析处理, 数据结果以  $\bar{x} \pm s$  表示。多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。

## 3 结果

### 3.1 对 MCF-7/ADR 细胞增殖的影响

如图 1 所示, 阿霉素的半抑制浓度 (half maximal inhibitory concentration,  $\text{IC}_{50}$ ) 为  $(23.58 \pm 1.03) \mu\text{mol/L}$ , 而白屈菜碱-延胡索乙素联合阿霉素给药后  $\text{IC}_{50}$  为  $(3.29 \pm 0.29) \mu\text{mol/L}$ 。与阿霉素组比较, 白屈菜碱-延胡索乙素联合阿霉素对细胞的增殖抑制作用更为显著, 说明白屈菜碱-延胡索乙素有效增强了阿霉素对乳腺癌耐药细胞的增殖抑制作用。

### 3.2 对 MCF-7/ADR 细胞迁移的影响

如图 2 所示, 对照组在 24、48、72 h 相对迁移面积分别为 19.9%、29.4%、54.9%。与对照组比较, 阿霉素、白屈菜碱-延胡索乙素单独给药均可显著降低 MCF-7/ADR 细胞相对迁移面积 ( $P < 0.01$ )。白

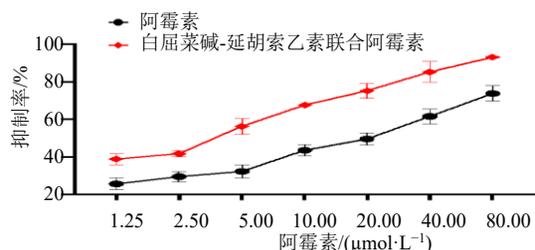
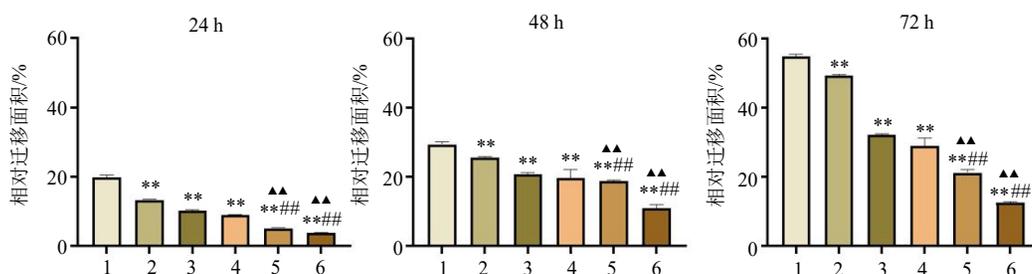
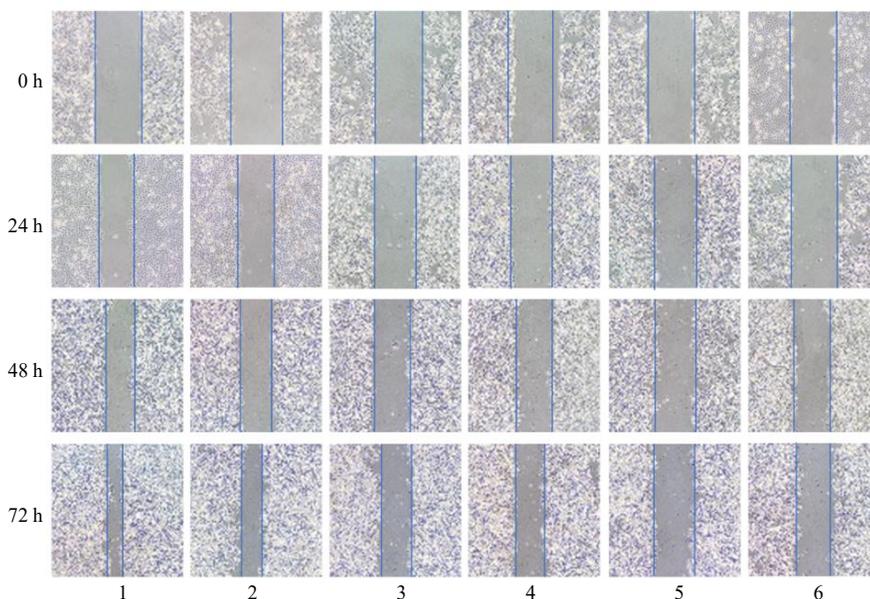


图1 对 MCF-7/ADR 细胞增殖的影响

Fig. 1 Effects on proliferation of MCF-7/ADR cells

屈菜碱-延胡索乙素低、高剂量联合阿霉素组在 24、48、72 h 细胞迁移率分别为 5.1%、18.7%、21.2%和 3.7%、10.9%、12.5%。与阿霉素组比较，白屈菜碱-延胡索乙素单独给药、白屈菜碱-延胡索乙素联合阿霉素处理 24、48、72 h 均可显著减小 MCF-7/ADR 细胞迁移率 ( $P < 0.01$ )。此外，与相同剂量白屈菜碱-延胡索乙素单独给药组比较，白屈菜碱-延胡索乙素联合阿霉素组细胞迁移的抑制作用显著增强 ( $P < 0.01$ )。



1-对照组; 2-阿霉素组; 3-白屈菜碱-延胡索乙素低剂量组; 4-白屈菜碱-延胡索乙素高剂量组; 5-白屈菜碱-延胡索乙素低剂量联合阿霉素组; 6-白屈菜碱-延胡索乙素高剂量联合阿霉素组; 与对照组比较: \*\* $P < 0.01$ ; 与阿霉素组比较: \*\*\* $P < 0.01$ ; 与相同剂量白屈菜碱-延胡索乙素组比较: ▲▲ $P < 0.01$ ; 下图同。

1-control group; 2-adriamycin group; 3-low-dose group of chelidonium-tetrahydropalmatine; 4-high-dose group of chelidonium-tetrahydropalmatine; 5-low-dose group of chelidonium-tetrahydropalmatine combined with adriamycin; 6-high-dose group of chelidonium-tetrahydropalmatine combined with adriamycin; \*\* $P < 0.01$  vs control group; \*\*\* $P < 0.01$  vs ADR group; ▲▲ $P < 0.01$  vs same-dose group of chelidonium-tetrahydropalmatine; same as below figures.

图2 对 MCF-7/ADR 细胞迁移能力的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 2 Effect on migration of MCF-7/ADR cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

结果表明,白屈菜碱-延胡索乙素可抑制 MCF-7/ADR 细胞迁移能力,且白屈菜碱-延胡索乙素联合阿霉素对 MCF-7/ADR 细胞迁移能力的抑制作用更为显著。

### 3.3 对 MCF-7/ADR 细胞侵袭能力的影响

如图 3 所示,与对照组比较,各给药组均可

显著降低 MCF-7/ADR 细胞侵袭能力 ( $P < 0.01$ );与阿霉素组比较,白屈菜碱-延胡索乙素联合阿霉素显著降低 MCF-7/ADR 细胞侵袭数目 ( $P < 0.01$ );与相同剂量白屈菜碱-延胡索乙素单独给药组比较,白屈菜碱-延胡索乙素联合阿霉素组细胞

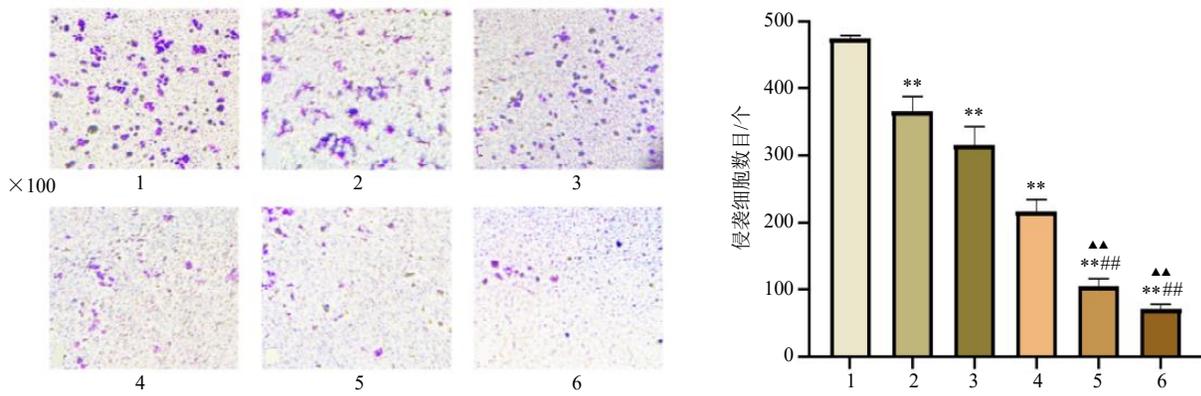


图3 对 MCF-7/ADR 细胞侵袭能力的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 3 Effect on invasion ability of MCF-7/ADR cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

侵袭数目亦显著减少 ( $P < 0.01$ )。以上结果表明, CHE-THP 可显著增强 ADR 对人乳腺癌耐药细胞 MCF-7/ADR 的侵袭抑制作用。

### 3.4 对 MCF-7/ADR 细胞线粒体膜电位的影响

如图 4 所示, 与对照组比较, 各给药组均可显著降低 MCF-7/ADR 细胞线粒体膜电位 ( $P < 0.01$ ); 与阿霉素组比较, 白屈菜碱-延胡索乙素联合阿霉素组 MCF-7/ADR 细胞线粒体膜电位亦显著降低 ( $P < 0.01$ )。此外, 与相同剂量白屈菜碱-延胡索乙素组比较, 白屈菜碱-延胡索乙素联合阿霉素对耐药细胞线粒体膜电位的降低作用

更显著 ( $P < 0.01$ )。以上结果说明, 白屈菜碱-延胡索乙素可显著增强阿霉素对人乳腺癌耐药细胞 MCF-7/ADR 线粒体膜电位的降低作用。

### 3.5 白屈菜碱、延胡索乙素和阿霉素与细胞焦亡相关蛋白的结合情况

白屈菜碱、延胡索乙素和阿霉素与 4 个焦亡相关蛋白 NLRP3、GSDMD、Caspase-1 和 IL-18 的结合能均  $\leq -5$  kcal/mol, 表明 3 种药物与 4 个关键焦亡相关靶点蛋白均具有良好的结合能力, 其中结合能  $< -8$  kcal/mol 的对接组合有 4 组, 其可视化分析结果见图 5。

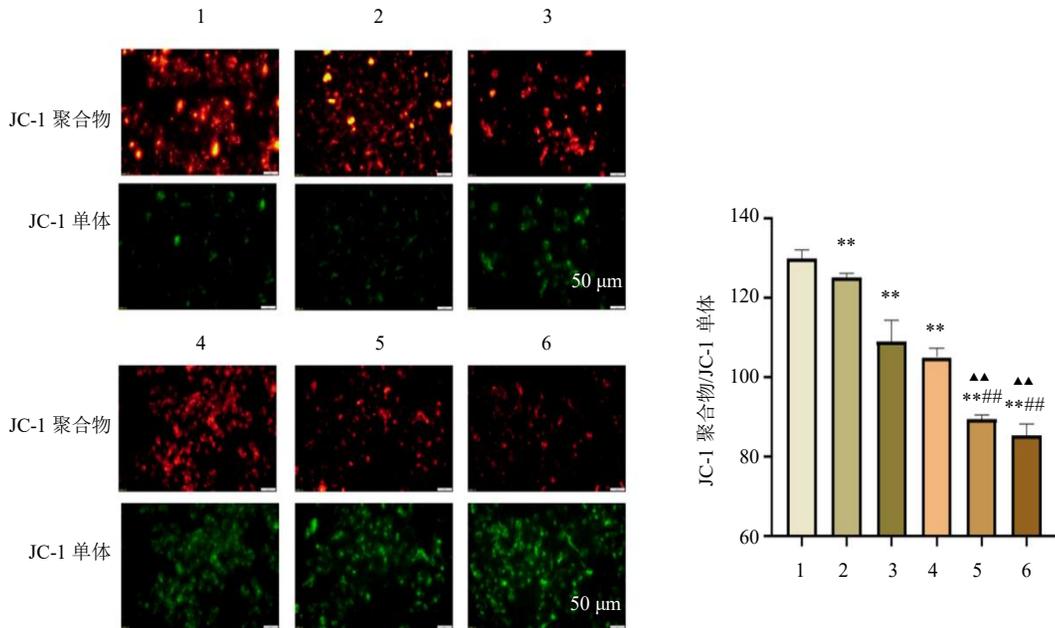


图4 对 MCF-7/ADR 细胞线粒体膜电位的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 4 Effect on mitochondrial membrane potential of MCF-7/ADR cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

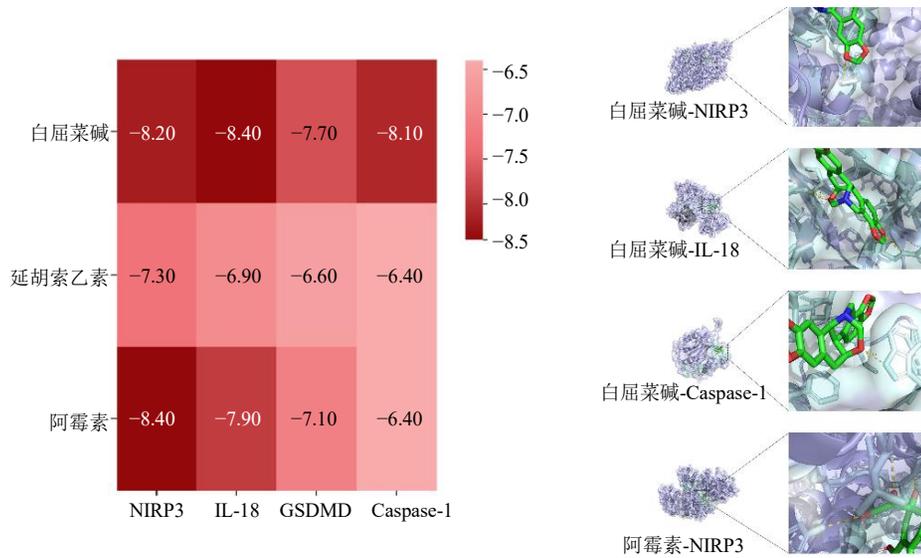


图5 分子对接结果

Fig. 5 Result of molecular docking

### 3.6 对 MCF-7/ADR 细胞内焦亡相关蛋白表达的影响

如图6所示,与对照组比较,各给药组均可上调MCF-7/ADR细胞内NLRP3、GSDMD、Caspase-1和IL-18蛋白的表达水平( $P < 0.01$ );与阿霉素组比较,白屈菜碱-延胡索乙素各剂量联合阿霉素处理细胞可显著上调NLRP3、GSDMD、Caspase-1和IL-18的蛋白表达水平( $P < 0.01$ );与相同剂量白

屈菜碱-延胡索乙素组比较,白屈菜碱-延胡索乙素联合阿霉素组MCF-7/ADR细胞NLRP3、GSDMD、Caspase-1和IL-18蛋白表达的上调作用增加( $P < 0.01$ )。上述结果说明,阿霉素、白屈菜碱-延胡索乙素可显著上调细胞NLRP3、GSDMD、Caspase-1和IL-18蛋白表达水平,进而诱导MCF-7/ADR细胞发生焦亡,且白屈菜碱-延胡索乙素联合阿霉素作用显著优于单独给药。

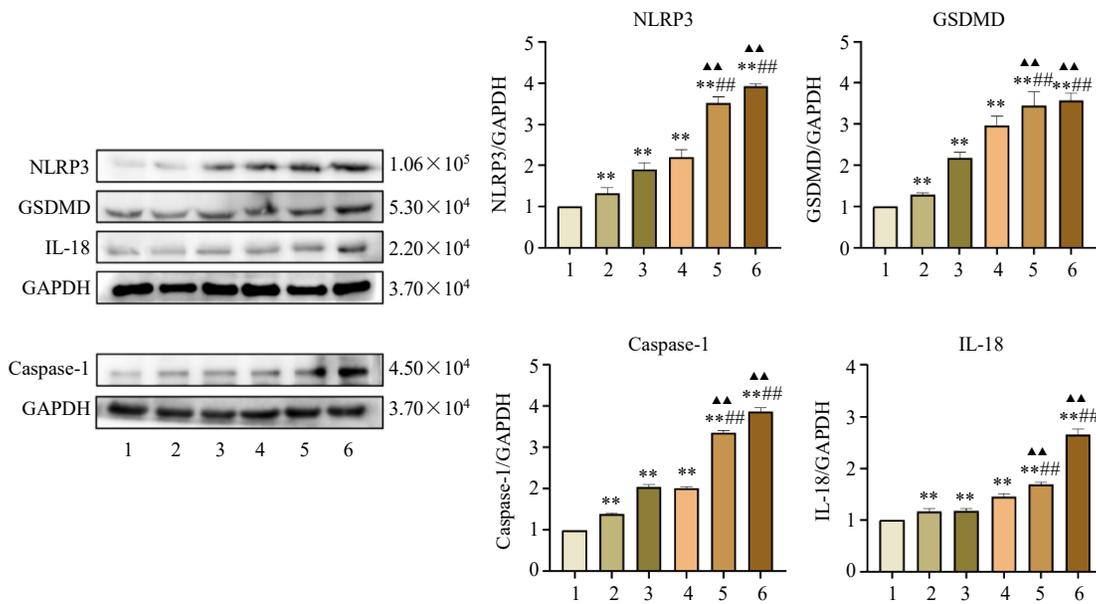


图6 对MCF-7/ADR细胞焦亡相关蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 6 Effect on expression of pyroptosis-related proteins in MCF-7/ADR cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

### 3.7 对 MCF-7/ADR 细胞内焦亡相关基因表达的影响

如图 7 所示, 与对照组比较, 各给药组细胞中 *GSDMD*、*NLRP3* 和 *Caspase-1* mRNA 的表达水平均上调 ( $P < 0.01$ ); 与 ADR 单独作用相比, CHE-THP 联合 ADR 可显著上调细胞中三者 mRNA 表达水平 ( $P < 0.01$ )。与阿霉素组比较, 白屈菜碱-延胡索乙素联合阿霉素组可显著升高

细胞中 *GSDMD*、*NLRP3* 和 *Caspase-1* mRNA 水平 ( $P < 0.01$ ); 与相同剂量白屈菜碱-延胡索乙素组比较, 白屈菜碱-延胡索乙素联合阿霉素组调控焦亡相关 mRNA 表达升高更为显著 ( $P < 0.01$ )。上述结果说明, CHE-THP 可协同 ADR 上调 *GSDMD*、*NLRP3* 和 *Caspase-1* mRNA 表达水平, 较单独处理组相比作用更显著, 与相应的蛋白表达结果一致。

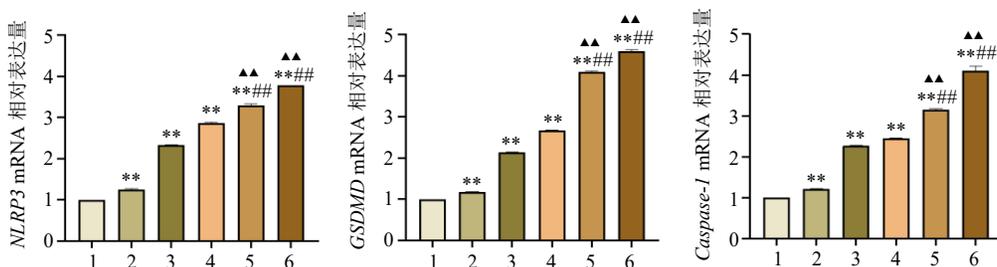


图 7 对 MCF-7/ADR 细胞中 *GSDMD*、*NLRP3*、*Caspase-1* mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 7 Effect on mRNA expressions of *GSDMD*, *NLRP3* and *Caspase-1* in MCF-7/ADR cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

### 4 讨论

乳腺癌不仅在全球范围内已经成为女性癌症发病率和死亡率最高的恶性肿瘤, 而且也是导致我国女性癌症死亡的主要原因。同时, 我国乳腺癌的发病呈现出年轻化的特征, 成为女性生命健康的重大威胁<sup>[14]</sup>。近年来研究发现, 中药有效成分在肿瘤的辅助治疗中获得了良好的疗效, 已成为肿瘤治疗领域研究的热点<sup>[15]</sup>。以往研究表明, 白屈菜 (*Chelidonium majus* L.) 和延胡索 (*Corydalis yanhusuo* W. T. Wang) 都富含生物碱类成分, 均具有良好的抗乳腺癌作用<sup>[16-19]</sup>。此外, 白屈菜-延胡索药对在乳腺癌临床治疗中也有应用报道。本研究前期研究发现, 白屈菜-延胡索药对对人乳腺癌耐药细胞模型 MCF-7/ADR 具有逆转耐药作用<sup>[11]</sup>, 并采用偏最小二乘回归 (partial least squares, PLS) 分析发现白屈菜碱和延胡索乙素是药对中最主要的逆转肿瘤耐药的有效成分, 且白屈菜碱-延胡索乙素能够通过下调 MCF-7/ADR 细胞 P-gp、BCRP 和 LRP 蛋白和基因表达水平发挥逆转 MCF-7/ADR 细胞阿霉素耐药<sup>[12]</sup>。本研究主要在此基础上, 进一步探讨 CHE-THP 协同 ADR 抑制人乳腺癌耐药细胞 MCF-7/ADR 的增殖、迁移和侵袭的作用以及诱导细胞焦亡的机制。

近年来, 对于白屈菜碱和延胡索乙素抗肿瘤作用及机制的研究取得了诸多进展<sup>[19]</sup>。蒋姝亭等<sup>[20]</sup>研

究发现白屈菜碱可通过抑制 NF- $\kappa$ B 信号转导通路诱导人乳腺癌 MCF-7 细胞凋亡。Li 等<sup>[21]</sup>研究发现, 白屈菜碱可通过诱导 M 期阻滞和抑制 AKT/叉头框蛋白 O3 (forkhead box O3, FOXO3) /FOXO1 轴, 从而诱导乳腺癌细胞有丝分裂灾难和凋亡样死亡。Xia 等<sup>[22]</sup>研究表明, 延胡索乙素可通过诱导细胞周期阻滞而显著抑制雌激素受体  $\alpha$  (estrogen receptor  $\alpha$ , ER $\alpha$ ) 乳腺癌细胞的增殖, 是一种有潜力的 ER $\alpha$  乳腺癌治疗药物。本研究结果表明, 白屈菜碱-延胡索乙素可以有效抑制 MCF-7/ADR 细胞的增殖、降低细胞迁移率、减少侵袭细胞数, 增强 MCF-7/ADR 细胞对阿霉素的敏感性, 说明二者联合应用可有效抑制耐药乳腺癌的增殖、迁移和侵袭。

细胞焦亡是一种由炎症小体介导的程序性细胞死亡方式。它可以激活免疫系统, 抑制肿瘤的免疫逃逸<sup>[23-25]</sup>。当细胞受到特定的刺激, 如细菌、病毒等病原体感染或内源性危险信号时, 炎症小体被激活<sup>[26]</sup>。炎症小体组装后, 激活 Caspase-1 或 Caspase-4/5/11, 这些酶进而切割 GSDMD 蛋白<sup>[27]</sup>。被切割后的 GSDMD 的 N 端片段会在细胞膜上形成孔洞, 导致细胞肿胀破裂, 释放出细胞内容物, 包括炎症因子 IL-1 $\beta$  和 IL-18 以及其他危险信号分子<sup>[28-29]</sup>。经典细胞焦亡的发生过程中, 可观察到 GSDMD-N 端蛋白、NLRP3 和 cleaved Caspase-1 蛋白表达量升高<sup>[30]</sup>。有研究发现, 银杏叶提取物通过

上调 GSDMD、Caspase-1、cleaved Caspase-1 蛋白表达水平诱导人乳腺癌 MCF-7 细胞焦亡发挥抗肿瘤作用<sup>[31]</sup>。此外,小檗碱可通过下调三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞 NLRP3、Caspase-1、IL-1 $\beta$  和 IL-18 的表达降低肿瘤细胞的侵袭能力<sup>[32]</sup>。在黑色素瘤 MeWo 细胞中,降低膜穿孔蛋白 E (gasdermin E, GSDME) 的表达可使细胞获得抗依托泊苷的耐药性,促进肿瘤细胞焦亡可能会增加其对化疗药物的敏感性<sup>[33]</sup>。在乳腺癌 MCF-7 细胞中 GSDME 高表达,降低 GSDME 的表达可能导致 MCF-7 细胞获得抗紫杉醇的耐药性<sup>[34]</sup>。上述研究表明,提高焦亡相关蛋白表达,促进恶性肿瘤细胞的焦亡有利于逆转化疗耐药。因此,本研究基于体外耐药细胞模型阐明了白屈菜碱-延胡索乙素联合阿霉素对 MCF-7/ADR 细胞焦亡的影响。研究表明,细胞受到刺激启动焦亡程序后,线粒体膜电位通常会下降,这与活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的产生、线粒体膜通透性转换孔 (mitochondrial permeability transition pore, MPTP) 的开放等多种因素有关<sup>[35]</sup>。本研究发现,白屈菜碱-延胡索乙素联合阿霉素处理 MCF-7/ADR 细胞可显著降低线粒体膜电位。线粒体膜电位下降意味着癌细胞功能紊乱,细胞膜通透性增加<sup>[36]</sup>,癌细胞细胞膜功能改变会导致多种不同的细胞死亡方式,例如,细胞在缺乏能量或者受外界刺激情况下细胞膜结构改变会导致细胞自噬<sup>[37-38]</sup>。而细胞膜破裂并释放出内容物与可能会导致细胞焦亡。本研究发现,CHE、THP 和 ADR 与 GSDMD、NLRP3、Caspase-1 和 IL-18 均有良好的结合活性;同时,CHE-THP 联合 ADR 可显著升高上述 4 种焦亡相关蛋白的表达水平;qRT-PCR 结果也证实 CHE-THP 联合 ADR 可显著上调 GSDMD、NLRP3 和 Caspase-1 的 mRNA 表达水平,提示 CHE-THP 联合 ADR 可能通过上调焦亡相关基因和蛋白的表达水平激活 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 焦亡经典通路,诱导耐药乳腺癌细胞的焦亡。

综上,本研究发现白屈菜碱-延胡索乙素可增强阿霉素对人乳腺癌耐药 MCF-7/ADR 细胞的增殖抑制作用。白屈菜碱-延胡索乙素联合阿霉素能够有效抑制 MCF-7/ADR 细胞的侵袭迁移,并可通过激活 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 这一经典通路协同诱导耐药细胞发生焦亡。本研究为应用中药有效组分协同促进临床乳腺癌化疗耐药的问题提供新的思路和依据,但白屈菜碱-延胡索乙素是否对其他

化疗药物也具有协同增效作用及其相关机制还有待深入探讨。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] 何思怡,李贺,曹毛毛,等.全球及我国女性乳腺癌疾病负担年龄分布及变化趋势 [J].中国肿瘤,2023,32(1):1-7.
- [2] 赵静怡,陈丽萍,宣建伟.乳腺癌药品评价指标体系的构建 [J].药物评价研究,2024,47(3):588-596.
- [3] 中国抗癌协会乳腺癌专业委员会.中国抗癌协会乳腺癌诊治指南与规范(2021年版) [J].中国癌症杂志,2021,31(10):954-1040.
- [4] 师金,梁迪,李道娟,等.全球女性乳腺癌流行情况研究 [J].中国肿瘤,2017,26(9):683-690.
- [5] Customizing local and systemic therapies for women with early breast cancer: The St. Gallen International Consensus Guidelines for treatment of early breast cancer 2021 [J].*Ann Oncol*,2021,32(10):1216-1235.
- [6] Heins M J, de Ligt K M, Verloop J, et al. Adverse health effects after breast cancer up to 14 years after diagnosis [J].*Breast*,2022,61:22-28.
- [7] 刘彦娟,曹雨虹,匡荣.肿瘤多药耐药发生机制及中药逆转研究进展 [J].中国药学杂志,2024,59(7):561-570.
- [8] Deljanin M, Nikolic M, Baskic D, et al. *Chelidonium majus* crude extract inhibits migration and induces cell cycle arrest and apoptosis in tumor cell lines [J].*J Ethnopharmacol*,2016,190:362-371.
- [9] Gao J L, Shi J M, He K, et al. Yanhusuo extract inhibits metastasis of breast cancer cells by modulating mitogen-activated protein kinase signaling pathways [J].*Oncol Rep*,2008,20(4):819-824.
- [10] 张青,富琦.郁仁存常用抗肿瘤药对 [M].北京:科学出版社,2017:122-124.
- [11] 邹翔,张雪瑞,于佳慧,等.白屈菜-元胡药对逆转乳腺癌阿霉素耐药药效物质研究 [J].中草药,2024,55(7):2259-2270.
- [12] 邹翔,舒淇,吴双,等.白屈菜-元胡药对抗雌激素受体阳性乳腺癌药效物质及作用机制 [J].中国药房,2023,34(8):935-940.
- [13] 高艳多,阎炯,赵胜,等.1990—2019 年中国女性乳腺癌发病和死亡趋势的年龄-时期-队列模型分析 [J].中国预防医学杂志,2022,23(12):909-916.
- [14] 袁敏,孙艾琳,刘欣欣,等.中药单体联合化疗治疗乳腺癌作用机制的研究进展 [J].中医药学报,2023,51(1):104-109.
- [15] Rica C I, Wouters A, Lardon F, et al. *In vitro* and *in vivo* investigations on the antitumour activity of *Chelidonium*

- majus* [J]. *Phytomedicine*, 2015, 22(14): 1279-1287.
- [16] Och A, Zalewski D, Komsta L, et al. Cytotoxic and proapoptotic activity of sanguinarine, berberine, and extracts of *Chelidonium majus* L. and *Berberis thunbergii* DC. toward hematopoietic cancer cell lines [J]. *Toxins*, 2019, 11(9): 485.
- [17] 何晓凤, 张晶, 张梅. 延胡索化学成分、药理活性及毒副作用研究进展 [J]. 上海中医药杂志, 2017, 51(11): 97-100.
- [18] Zhao Y, Gao J L, Ji J W, et al. Cytotoxicity enhancement in MDA-MB-231 cells by the combination treatment of tetrahydropalmatine and berberine derived from *Corydalis yanhusuo* W. T. Wang [J]. *J Intercult Ethnopharmacol*, 2014, 3(2): 68-72.
- [19] Herrmann R, Skaf J, Roller J, et al. Anticancer effects of NSC-631570 (Ukraine) in head and neck cancer cells: *In vitro* analysis of growth, invasion, angiogenesis and gene expression [J]. *Oncol Rep*, 2020, 43(1): 282-295.
- [20] 蒋姝亭, 张红波, 谈胤求, 等. 白屈菜碱通过抑制核因子- $\kappa$ B 信号促进乳腺癌 MCF-7 细胞凋亡 [J]. 中华实验外科杂志, 2022, 39(5): 862-864.
- [21] Li H M, Tang X Y, Sun Z W, et al. Integrating bioinformatics and experimental models to investigate the mechanism of the chelidonine-induced mitotic catastrophe via the AKT/FOXO3/FOXM1 axis in breast cancer cells [J]. *Biomol Biomed*, 2024, 24(3): 560-574.
- [22] Xia X H, He J C, Liu B, et al. Targeting ER $\alpha$  degradation by *L*-tetrahydropalmatine provides a novel strategy for breast cancer treatment [J]. *Int J Biol Sci*, 2020, 16(12): 2192-2204.
- [23] 朱甜甜, 刘培民, 李东东. 天然化合物通过细胞焦亡途径抗肿瘤作用的研究进展 [J]. 中华中医药学刊, 2023, 41(8): 126-130.
- [24] Jia C, Chen H W, Zhang J, et al. Role of pyroptosis in cardiovascular diseases [J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 67: 311-318.
- [25] Gao Y L, Zhai J H, Chai Y F. Recent advances in the molecular mechanisms underlying pyroptosis in sepsis [J]. *Mediators Inflamm*, 2018, 2018: 5823823.
- [26] Zhao Y, Shi J J, Shao F. Inflammatory caspases: Activation and cleavage of gasdermin-D *in vitro* and during pyroptosis [J]. *Methods Mol Biol*, 2018, 1714: 131-148.
- [27] 任静静. GSDME 通过细胞焦亡逆转 MCF-7/Taxol 细胞的耐药性研究 [D]. 郑州: 郑州大学, 2019.
- [28] Li X D, Xie X J. GSDMD-mediated pyroptosis in retinal vascular inflammatory diseases: A review [J]. *Int Ophthalmol*, 2023, 43(4): 1405-1411.
- [29] Jiang M X, Qi L, Li L S, et al. The caspase-3/GSDME signal pathway as a switch between apoptosis and pyroptosis in cancer [J]. *Cell Death Discov*, 2020, 6: 112.
- [30] Wang J G, Jian W J, Li Y, et al. Nobiletin promotes the pyroptosis of breast cancer via regulation of miR-200b/JAZF1 axis [J]. *Kaohsiung J Med Sci*, 2021, 37(7): 572-582.
- [31] 李军, 黄梅, 林曼迪, 等. 基于 Calpain-1/NLRP3 调控的细胞焦亡及 Th17/Treg 途径探讨银杏叶抑制乳腺癌细胞增殖的机制 [J]. 广东医学, 2022, 43(7): 793-798.
- [32] Yao M J, Fan X D, Yuan B, et al. Berberine inhibits NLRP3 Inflammasome pathway in human triple-negative breast cancer MDA-MB-231 cell [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2019, 19(1): 216.
- [33] 朱潇雨, 李杰. 诱导细胞焦亡抑制恶性肿瘤的新策略研究进展 [J]. 肿瘤防治研究, 2021, 48(4): 393-399.
- [34] Wang Y P, Gao W Q, Shi X Y, et al. Chemotherapy drugs induce pyroptosis through caspase-3 cleavage of a gasdermin [J]. *Nature*, 2017, 547(7661): 99-103.
- [35] Malik A, Kanneganti T D. Inflammasome activation and assembly at a glance [J]. *J Cell Sci*, 2017, 130(23): 3955-3963.
- [36] Marcondes N A, Terra S R, Lasta C S, et al. Comparison of JC-1 and MitoTracker probes for mitochondrial viability assessment in stored canine platelet concentrates: A flow cytometry study [J]. *Cytometry A*, 2019, 95(2): 214-218.
- [37] Debnath J, Gammoh N, Ryan K M. Autophagy and autophagy-related pathways in cancer [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2023, 24(8): 560-575.
- [38] Li X H, He S K, Ma B Y. Autophagy and autophagy-related proteins in cancer [J]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1): 12.

[责任编辑 罗 曦]