

基于 *GSDMD* 基因介导 NLRP3/Caspase-1/*GSDMD* 通路的粉防己碱诱导三阴性乳腺癌细胞焦亡机制研究

辛国松^{1,2}, 刘禹含¹, 侯妍秀¹, 李文兰^{1,2}, 于淼^{1,2}, 季宇彬^{1,2}, 李海茹^{3*}

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. 国家教育部抗肿瘤天然药物工程研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150076
3. 哈尔滨医科大学附属第二医院, 黑龙江 哈尔滨 150086

摘要: 目的 探究粉防己碱对三阴性乳腺癌 (triple-negative breast cancer, TNBC) 细胞的作用及作用机制, 明确其是否通过调控 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NOD-like receptor family pyrin domain containing 3, NLRP3)/半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1 (cystein-aspartate protease-1, Caspase-1)/Gasdermin D 蛋白 (Gasdermin D, GSDMD) 通路诱导细胞焦亡, 为 TNBC 的治疗提供新策略。方法 使用不同浓度粉防己碱处理 MDA-MB-231 细胞, 采用 MTT 法检测细胞增殖抑制情况。运用 *GSDMD* 小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 转染技术沉默 *GSDMD* 基因, 通过荧光显微镜观察转染效率, 并利用 Western blotting 验证转染后 *GSDMD* 蛋白表达变化。设置对照组及粉防己碱 (5、10、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 组和粉防己碱 (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + *GSDMD* siRNA (si*GSDMD*) 组, 采用细胞形态观察、集落实验、膜联蛋白 V (Annexin V)/碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 双染色法、乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 细胞毒性实验、划痕实验、Transwell 实验、Western blotting 及 qRT-PCR, 分别从细胞形态、克隆能力、焦亡率、膜通透性、迁移与侵袭能力以及蛋白和基因表达水平多个维度, 系统评估粉防己碱对 MDA-MB-231 细胞的影响, 并探究其是否通过 NLRP3/Caspase-1/*GSDMD* 通路发挥作用。结果 粉防己碱显著抑制 MDA-MB-231 细胞增殖, 呈剂量相关性 ($P < 0.01$), 且能有效诱导细胞焦亡, 表现为细胞形态改变、膜完整性破坏、细胞核固缩以及焦亡率和 LDH 释放量的显著增加 ($P < 0.01$)。同时, 随着粉防己碱给药浓度的增加, 细胞的集落数目、划痕愈合率和侵袭细胞数显著降低 ($P < 0.01$)。机制研究发现, 粉防己碱上调 NLRP3、Caspase-1、白细胞介素-18 (interleukin-18, IL-18) 和 IL-1 β 的蛋白及 mRNA 表达 ($P < 0.01$), 促进 pro-IL-1 β 向 mature-IL-1 β 转化。而 si*GSDMD* 干预可显著逆转粉防己碱的调控作用 ($P < 0.01$), 表明 *GSDMD* 基因在粉防己碱诱导的焦亡过程中发挥关键作用。结论 粉防己碱通过调控 NLRP3/Caspase-1/*GSDMD* 通路诱导 MDA-MB-231 细胞焦亡, 抑制细胞增殖、迁移和侵袭。

关键词: 粉防己碱; 三阴性乳腺癌; NLRP3/Caspase-1/*GSDMD* 通路; *GSDMD* 基因; 细胞焦亡

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)18-6657-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.18.015

Mechanism of tetrandrine induced pyroptosis of triple-negative breast cancer cells based on *GSDMD* gene mediated NLRP3/Caspase-1/*GSDMD* pathway

XIN Guosong^{1,2}, LIU Yuhan¹, HOU Yanxiu¹, LI Wenlan^{1,2}, YU Miao^{1,2}, JI Yubin^{1,2}, LI Hairu³

1. Engineering Research Center for Medicine, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China
2. National Ministry of Education Anti-tumor Natural Drug Engineering Research Center, Harbin 150076, China
3. Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, China

Abstract: Objective To investigate the effect and mechanism of tetrandrine on triple-negative breast cancer (TNBC) cells, clarify whether it induces pyroptosis by regulating NOD-like receptor family pyrin domain containing 3 (NLRP3)/cystein-aspartate protease-1 (Caspase-1)/Gasdermin D (*GSDMD*) pathway, thereby providing a novel therapeutic strategy for TNBC. **Methods** MDA-MB-231 cells were treated with varying concentrations of tetrandrine. Cell proliferation inhibition was assessed via MTT assay. *GSDMD* small

收稿日期: 2025-04-29

基金项目: 黑龙江省自然科学基金项目 (PL2024H130); 2023 年度哈尔滨商业大学镜湖学者支持计划; 哈尔滨市科技计划自筹经费项目 (2023ZCZJCG038); 黑龙江省中医药科研项目 (ZHY2024-239); 2025 年度黑龙江省省属本科高校基本科研业务费项目

作者简介: 辛国松 (1984—), 男, 研究员, 博士 (博士后), 研究方向为抗肿瘤中药药理学研究。E-mail: 13766801150@163.com

*通信作者: 李海茹 (1988—), 女, 副教授, 博士 (博士后), 研究方向为中药药理学。E-mail: lihairu0419@126.com

interfering RNA (siRNA) transfection was used to silence *GSDMD* gene, transfection efficiency was observed by fluorescence microscopy, and the changes in *GSDMD* protein expression after transfection were verified by Western blotting. Control group, tetrandrine (5, 10, 20 $\mu\text{g/mL}$) groups and tetrandrine (20 $\mu\text{g/mL}$) + *GSDMD* siRNA (si*GSDMD*) group were set up. Cell morphology observation, colony assay, Annexin V/propidium iodide (PI) double staining method, lactate dehydrogenase (LDH) cytotoxicity assay, scratch assay, Transwell assay, Western blotting and qRT-PCR were used to systematically evaluate the effects of tetrandrine on MDA-MB-231 cells from multiple dimensions including cell morphology, cloning ability, pyroptosis rate, membrane permeability, migration and invasion ability, as well as protein and gene expression levels, and investigate whether tetrandrine exerts its effect through NLRP3/Caspase-1/*GSDMD* pathway. **Results** Tetrandrine significantly inhibited the proliferation of MDA-MB-231 cells in a dose-dependent manner ($P < 0.01$), and induced pyroptosis, characterized by morphological changes, membrane rupture, nuclear condensation, elevated pyroptosis rates and increased LDH release ($P < 0.01$). At the same time, as the concentration of tetrandrine increased, the number of cell colonies, scratch healing rate and number of invasive cells were significantly decreased ($P < 0.01$). Mechanism studies found that tetrandrine up-regulated the protein and mRNA expressions of NLRP3, Caspase-1, interleukin-18 (IL-18) and IL-1 β ($P < 0.01$), promoted the conversion of pro-IL-1 β to mature-IL-1 β . The intervention of si*GSDMD* could significantly reverse the regulatory effect of tetrandrine ($P < 0.01$), indicating that *GSDMD* gene played a key role in the process of tetrandrine induced pyroptosis. **Conclusion** Tetrandrine induces pyroptosis, inhibits cell proliferation, migration and invasion in MDA-MB-231 cells by regulating NLRP3/Caspase-1/*GSDMD* pathway.

Key words: tetrandrine; triple-negative breast cancer; NLRP3/Caspase-1/*GSDMD* pathway; *GSDMD* gene; pyroptosis

三阴性乳腺癌 (triple-negative breast cancer, TNBC) 是一种缺乏雌激素受体 (estrogen receptor, ER)、孕激素受体 (progesterone receptor, PR) 和表皮生长因子受体 2 (human epidermal growth factor receptor 2, HER2) 表达的乳腺癌亚型, 占所有乳腺癌病例的 15%~20%^[1]。其临床特征表现为侵袭性强、转移潜能高、易复发及预后差, 尤其多见于年轻女性、非裔人群及乳腺癌易感基因 1 (breast cancer susceptibility gene 1, BRCA1) 突变携带者^[2]。由于缺乏激素受体和 HER2 靶点, TNBC 无法从内分泌治疗或曲妥珠单抗等靶向疗法中获益, 目前主要依赖手术联合化疗, 但化疗耐药性和远处转移仍是治疗失败的主要原因^[3]。因此, 探索 TNBC 的新型治疗靶点和药物机制成为当前研究的迫切需求。细胞焦亡 (pyroptosis) 作为一种程序性炎症性死亡方式, 因其独特的免疫激活特性成为肿瘤治疗研究热点。焦亡通过 Gasdermin 家族蛋白形成膜孔, 释放促炎因子和损伤相关分子模式, 重塑肿瘤微环境并激活抗肿瘤免疫^[4-6]。其中, NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NOD-like receptor family pyrin domain containing 3, NLRP3) /半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1 (cystein-aspartate protease-1, Caspase-1) /Gasdermin D 蛋白 (Gasdermin D, GSDMD) 通路是焦亡的核心调控机制。NLRP3 感知危险信号后募集凋亡相关斑点样蛋白 (apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase-recruitment domain, ASC) 和 pro-Caspase-1 形成复合体, 激活的 Caspase-1 切割

GSDMD 产生 N 端片段, 寡聚化后插入细胞膜形成孔洞, 最终导致细胞肿胀破裂^[7]。值得注意的是, 焦亡在肿瘤中具有“双刃剑”效应, 适度诱导可清除肿瘤细胞并增强免疫监视, 但过度激活可能促进慢性炎症和免疫抑制^[6]。因此, 靶向 *GSDMD* 介导的焦亡通路需精准调控, 而天然化合物因其多靶点特性可能为此提供新思路。

粉防己碱是从防己科植物粉防己 *Stephania tetrandra* S. Moore 的根中提取的双苄基异喹啉生物碱, 具有抗炎、免疫调节和广谱抗肿瘤活性。研究表明, 粉防己碱可通过线粒体依赖性凋亡、细胞周期阻滞 (G_1/S 期)、抑制血管生成等机制抑制多种癌细胞增殖^[8-9]。在胃癌和前列腺癌细胞中, 粉防己碱通过上调 B 细胞淋巴瘤-2 (B-cell lymphoma 2, Bcl-2) 相关 X 蛋白 (Bcl-2-associated X protein, Bax) 与 Bcl-2 的比值、激活 Caspase-3/9 和抑制蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 磷酸化诱导凋亡^[10]。然而, 其在 TNBC 中是否通过调控焦亡通路发挥作用尚未明确。三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞作为 TNBC 的经典模型, 具有基底样、高侵袭性和化疗耐药特征, 广泛用于药物机制研究^[11]。现有研究提示, 化疗药物 (如顺铂) 可通过激活 *GSDME* 依赖的焦亡增强抗肿瘤效果, 但 *GSDMD* 介导的焦亡与天然化合物的协同作用仍属空白^[12]。此外, NLRP3 炎症小体在 TNBC 中的表达与预后相关, 但其与粉防己碱的相互作用尚未被揭示^[13]。因此, 探究粉防己碱是否通过 NLRP3/Caspase-1/*GSDMD* 通路诱导

MDA-MB-231 细胞焦亡, 不仅可拓展天然药物的作用机制认知, 也为克服 TNBC、治疗耐药提供新靶点。本研究对粉防己碱诱导细胞焦亡的机制进行了深入探究, 阐明了粉防己碱基于 *GSDMD* 基因介导 NLRP3/Caspase-1/*GSDMD* 通路诱导 MDA-MB-231 细胞焦亡。为 TNBC 的治疗提供理论依据, 同时为天然化合物与焦亡通路的交叉研究开辟新方向。

1 材料

1.1 细胞株

MDA-MB-231 细胞由北京北纳创联生物技术研究院质控中心提供。

1.2 药品与试剂

粉防己碱(批号 L1607039, 质量分数 $\geq 98\%$)购自阿拉丁试剂有限公司; 胎牛血清(批号 su-101-1b)购自天津阿尔法生物科技有限公司; RPMI 1640 培养基(批号 MA0215)、胰蛋白酶(批号 MA0232)、青霉素/链霉素溶液(批号 MA0110)、MTT(批号 MA0218)、膜联蛋白 V (Annexin V)-FITC/碘化丙啶(propidium iodide, PI) 细胞凋亡试剂盒(批号 MA0220-Nov-19G)、草酸铵结晶紫染色液(批号 MA0148)购自大连美仑生物技术有限公司; 二甲亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO, 批号 710N0313)、PI 染液(批号 C0080)购自北京索莱宝科技有限公司; Hoechst33342 染色液(批号 BL803A)购自 Biosharp 生物科技公司; *GSDMD* 小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA, si*GSDMD*, 批号 PA20230726036)、Ribo FECTMCP Transfection(批号 C10511-05)购自广州锐博科技有限公司; 乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)检测试剂盒(批号 20231025)购自南京建成生物工程研究所有限公司; Matrigel 基质胶(批号 REF356234)购自康宁生命科学有限公司; Transwell 小室(批号 140640)、兔抗 pro-白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 抗体(批号 25-7114-82)购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 兔抗 NLRP3 抗体(批号 WL02635)、兔抗 Caspase-1 抗体(批号 WL02996)、兔抗 *GSDMD* 抗体(批号 WL05411)、兔抗 IL-18 抗体(批号 WL01127)、兔抗 mature-IL-1 β 抗体(批号 WL00891)购自沈阳万类生物科技有限公司。

1.3 仪器

ECO-170P-230 型细胞培养箱、Model 680 型酶标仪(美国 NBS 公司); CKX-41-32 型倒置显微镜(日本 Olympus 公司); CKX-41 荧光显微镜(德国

Leica 公司); Adventurer 型万分之一电子天平(美国 OHAUS 公司); Anke TDL80-2C 离心机(上海安亭科学仪器厂); 680 型全自动酶标仪(美国 Bio-Rad 公司); Optima L-100XP 型低温高速离心机、EPICS-XL 型流式细胞仪(美国 Beckman-Coulter 公司); DYY-7C 型电泳仪、M344039 型垂直电泳转印槽(北京六一仪器厂); Azure Biosystems C500 近红外成像系统(北京深蓝云生物科技有限公司)。

2 方法

2.1 细胞培养

MDA-MB-231 细胞复苏后, 用含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养基, 于 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养, 定期传代以保持细胞的增殖活力。

2.2 MTT 法检测细胞增殖抑制作用

将 MDA-MB-231 细胞以 5×10^3 个/孔接种于 96 孔板中, 培养过夜使细胞贴壁。分别加入含不同质量浓度(1、2、4、8、16 $\mu\text{g}/\text{mL}$)粉防己碱的培养基, 对照组加入等体积不含粉防己碱的培养基, 每组设置 6 个复孔, 培养 48 h。每孔加入 20 μL MTT 溶液(5 mg/mL), 继续培养 4 h。吸去上清液后, 每孔加入 150 μL DMSO, 并在摇床上振荡 10 min 以充分溶解结晶。使用酶标仪在 490 nm 波长处测定各孔的吸光度(A)值, 计算细胞增殖抑制率。

$$\text{细胞增殖抑制率} = 1 - A_{\text{实验}}/A_{\text{对照}}$$

2.3 si*GSDMD* 转染实验

在 6 孔板各孔中接种 1×10^5 个细胞, 使细胞密度处于 30%~50%。采用 $1 \times \text{riboFECT}^{\text{TM}}$ CP Buffer 对 si*GSDMD* 储存液进行稀释, 随后添加 $\text{riboFECT}^{\text{TM}}$ CP Reagent, 并轻轻吹打以确保混合均匀。将混合物置于室温环境下孵育 15 min, 以形成转染复合物。将转染复合物添加到无双抗的完全培养基中, 处理细胞, 于培养箱中孵育 24 h。通过荧光显微镜观察转染效率, 并利用 Western blotting 验证转染后 *GSDMD* 蛋白表达变化。

2.4 细胞形态观察

将 MDA-MB-231 细胞以 1×10^5 个/mL 接种于 6 孔板中, 培养 24 h 后分组处理。对照组不添加药物; 粉防己碱组分别给予终质量浓度为 5、10、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的粉防己碱; 粉防己碱(20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + si*GSDMD* 组先转染细胞 24 h, 随后更换为含 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 粉防己碱的新鲜培养基。各组继续培养 48 h, 用倒置显微镜观察细胞形态并拍照记录。另加入 Hoechst 33342 染色液避光孵育 30 min, 加入 PI 染

色液，于室温避光孵育 15 min，用荧光显微镜观察并拍照。

2.5 集落实验检测细胞克隆能力

将 MDA-MB-231 细胞以 1×10^3 个/mL 接种于 6 孔板中，按“2.4”项下进行分组和给药，培养 7~14 d。用 PBS 洗涤细胞，甲醇固定 10 min，结晶紫染色 15 min，洗涤并干燥后，置于倒置显微镜下观察细胞集落形成情况，并拍照记录。

2.6 划痕实验检测细胞迁移能力

将细胞接种于 6 孔板，培养 24 h 至细胞融合度为 70%~80%。用 200 μ L 移液枪头在每孔中央轻轻划痕，按“2.4”项下进行分组和给药，于 0、48 h 通过倒置显微镜观察细胞迁移情况并拍照，利用 Image J 软件测量划痕宽度并计算划痕愈合率。

2.7 Transwell 实验检测细胞侵袭能力

在 Transwell 小室上层加入按照 1:8 的比例进行稀释的 Matrigel 胶，37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min。按“2.4”项下进行分组和给药，培养 48 h 后，收集细胞，以不含胎牛血清的培养基调整至 2.5×10^4 个/mL，接种至 Transwell 小室上层，每孔 400 μ L，Transwell 小室下层加入 400 μ L 含 12%胎牛血清的完全培养基。培养 24 h 后，用 0.5%结晶紫染色并于显微镜下拍照计数。

2.8 Annexin V/PI 双染法检测细胞死亡率

按“2.4”项下进行分组和给药，培养 48 h 后，

收集细胞，加入 5 μ L Annexin V-FITC 和 10 μ L PI 染液，轻柔吹匀，室温避光孵育 15 min。经 300 目尼龙网滤过后，用流式细胞仪检测，计算双阳性细胞比例。

2.9 细胞上清液中 LDH 活性的检测

将 MDA-MB-231 细胞以 5×10^4 个/mL 接种于 96 孔板中，培养 24 h。按“2.4”项下进行分组和给药，培养 48 h 后，收集细胞，2 000 r/min 离心 5 min，收集上清液，按照试剂盒说明书测定 LDH 活性。

2.10 Western blotting 检测相关蛋白表达

按“2.4”项下进行分组和给药，培养 48 h 后，收集细胞，加入含蛋白酶抑制剂的裂解液提取蛋白，加热 10 min 使蛋白变性，采用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳，转至 PVDF 膜，封闭后加入一抗，4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。TBST 洗膜后加入二抗，37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h，洗膜后加入化学发光试剂，采用凝胶成像系统拍照并进行分析。

2.11 qRT-PCR 检测相关基因表达

按“2.4”项下进行分组和给药，培养 48 h 后，收集细胞，使用 Trizol 试剂提取总 RNA，根据说明使用 qRT-PCR 试剂盒合成第一链 cDNA。使用 2 \times Universal SYBR Green 试剂盒测定 mRNA 的表达水平，并采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析结果。以 GAPDH 为内参，引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	上游引物序列 (5'→3')	下游引物序列 (5'→3')
GAPDH	CGGGAAGGAAATGAATGGGC	TGGAATTTGCCATGGGTGGA
NLRP3	TCCTCAGCAGCAACCAGAAG	TTGTCTCCGAGAGTGTGGC
Caspase-1	GAAAAGCCATGGCCGACAAG	GCTGTGTCAGAGGTCCTGTGCT
GSDMD	CTCGCCGACTTCCGTAAACT	TCCAGCGATCCTGGGTCTTA
IL-18	TTTGTCGCAGATGGCTCTTT	ATGTCCTGGGACACTTCTCT
IL-1 β	CAATTCCTCCAGAGCCAAAG	ACACGCAGGACAGGTACAGA

2.12 统计学分析

用 IBM SPSS Statistics 27.0 软件进行统计分析，数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，多样本均数比较采用 One-way ANOVA 分析，通过 Graphpad Prism 9 软件绘图。

3 结果

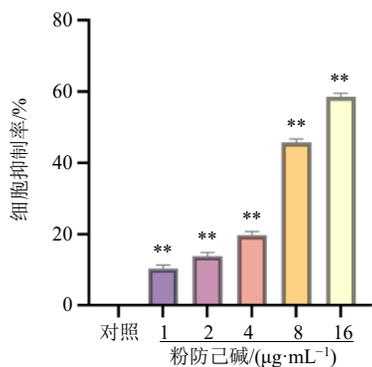
3.1 粉防己碱对 MDA-MB-231 细胞增殖的抑制作用

如图 1 所示，采用不同质量浓度 (1、2、4、8、16 μ g/mL) 的粉防己碱处理 MDA-MB-231 细胞 48 h 后，粉防己碱对 MDA-MB-231 细胞具有显著的增

殖抑制作用 ($P < 0.01$)，且呈剂量相关性。粉防己碱作用于 MDA-MB-231 细胞 48 h 的半数抑制浓度 (half inhibitory concentration, IC₅₀) 为 10.43 μ g/mL。因此，采用 5、10、20 μ g/mL 的粉防己碱进行后续实验。

3.2 siGSDMD 转染效率及蛋白表达变化

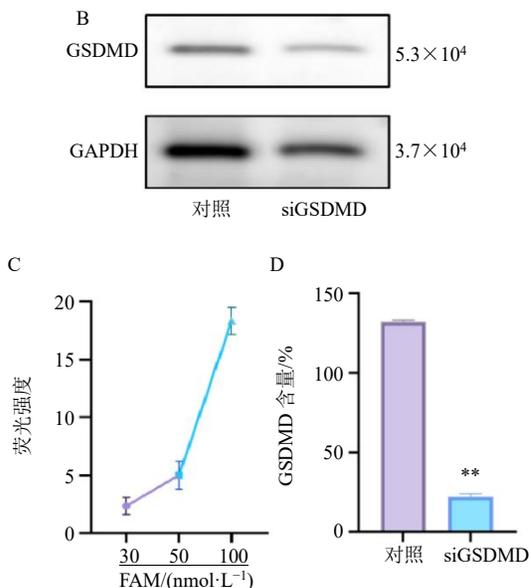
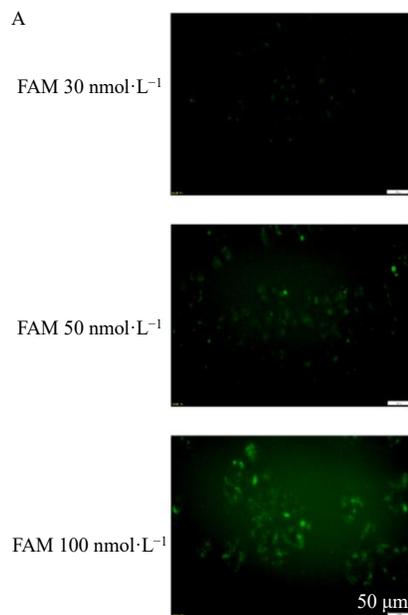
利用荧光显微镜检测不同浓度 (30、50、100 nmol/L) 的 FAM 标记 siGSDMD 的转染效率。结果显示，随着浓度增加，荧光强度逐渐增强，FAM 的



与对照组比较: ** $P < 0.01$ 。
** $P < 0.01$ vs control group.

图 1 粉防己碱对 MDA-MB-231 细胞的增殖抑制作用
($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 1 Inhibitory effect of tetrandrine on proliferation of MDA-MB-231 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)



A、C-FAM 标记的 siRNA 转染 MDA-MB-231 细胞后的代表性荧光显微镜图像 ($\times 200$) 及定量分析结果; B、D-siGSDMD 对 MDA-MB-231 细胞 GSDMD 蛋白表达的影响; 与对照组比较: ** $P < 0.01$ 。

A, C-representative fluorescence microscopy images of FAM-labeled siRNA-transfected MDA-MB-231 cells ($\times 200$) and quantitative statistical analysis result; B, D-effect of siGSDMD on GSDMD protein expression in MDA-MB-231 cells; ** $P < 0.01$ vs control group.

图 2 siGSDMD 转染效率及蛋白表达变化 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Transfection efficiency of siGSDMD and protein expression changes ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

的增殖、迁移及侵袭能力均具有显著的抑制作用, 且粉防己碱可能通过靶向 GSDMD 调控细胞增殖、迁移及侵袭。

3.4 粉防己碱诱导 MDA-MB-231 细胞形态学变化及膜损伤

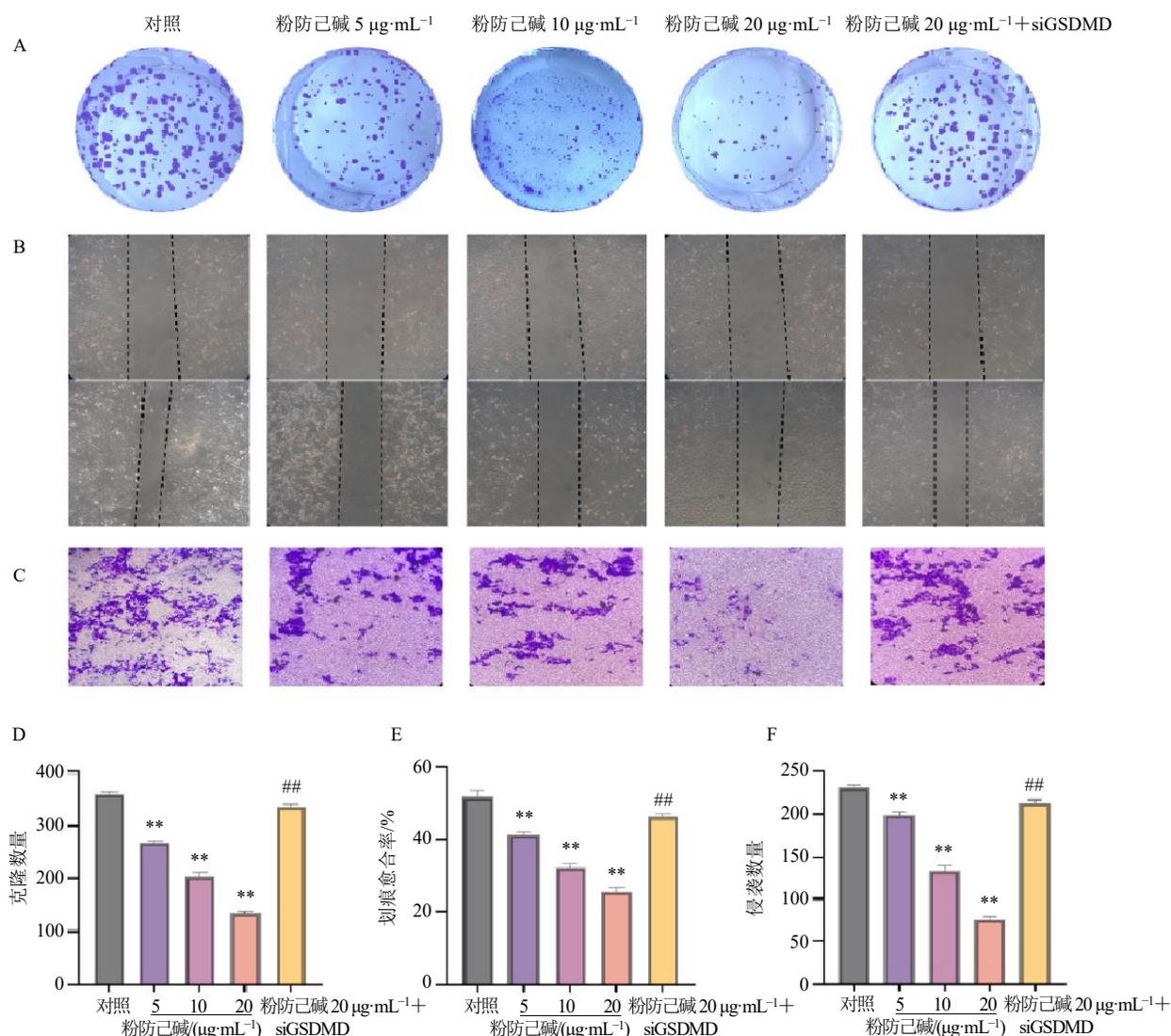
通过倒置显微镜及荧光显微镜对 MDA-MB-

浓度为 100 nmol/L 时转染效率满足实验要求 (图 2-A、C)。进一步通过 Western blotting 检测 MDA-MB-231 细胞及 GSDMD 瞬时转染后细胞中 GSDMD 蛋白表达量, 发现转染 GSDMD 后细胞中 GSDMD 蛋白表达显著低于对照组 ($P < 0.01$, 图 2-B、D), 表明 siGSDMD 转染成功降低了 GSDMD 蛋白表达。

3.3 粉防己碱对 MDA-MB-231 细胞增殖、迁移和侵袭的影响

集落实验 (图 3-A、D)、划痕实验 (图 3-B、E)、Transwell 实验 (图 3-C、F) 结果显示, 与对照组比较, 粉防己碱显著抑制细胞克隆形成、划痕愈合率和细胞迁移 ($P < 0.01$), 且呈剂量相关性; 与粉防己碱高剂量组比较, 粉防己碱+siGSDMD 组细胞克隆形成数、划痕愈合率和细胞迁移数显著升高 ($P < 0.01$)。表明粉防己碱对 MDA-MB-231 细胞

231 细胞进行观察, 如图 4-A 所示, 经不同浓度的粉防己碱处理后, 细胞生长逐渐变稀疏, 细胞间隙明显增大, 细胞膜完整性被破坏, 出现破裂现象, 细胞间轮廓模糊不清, 细胞核发生固缩, 染色质浓缩聚集, 形成凋亡小体, 在荧光显微镜下观察到较强荧光信号, 且呈剂量相关性。Hoechst/PI 双染结



A、D-集落实验检测 MDA-MB-231 细胞克隆形成能力 ($\times 40$)；B、E-划痕实验检测 MDA-MB-231 细胞迁移能力 ($\times 100$)；C、F-Transwell 实验检测 MDA-MB-231 细胞侵袭能力 ($\times 200$)。与对照组比较：** $P < 0.01$ ；与粉防己碱高剂量组比较：## $P < 0.01$ ，下图同。

A, D-colony forming ability of MDA-MB-231 cells detected by colony experiment ($\times 40$); B, E-migration ability of MDA-MB-231 cells detected by scratch assay ($\times 100$); C, F-invasion ability of MDA-MB-231 cells detected by Transwell assay ($\times 200$); ** $P < 0.01$ vs control group; ## $P < 0.01$ vs tetrandrine high-dose group, same as below figures.

图 3 粉防己碱对 MDA-MB-231 细胞增殖、迁移和侵袭的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

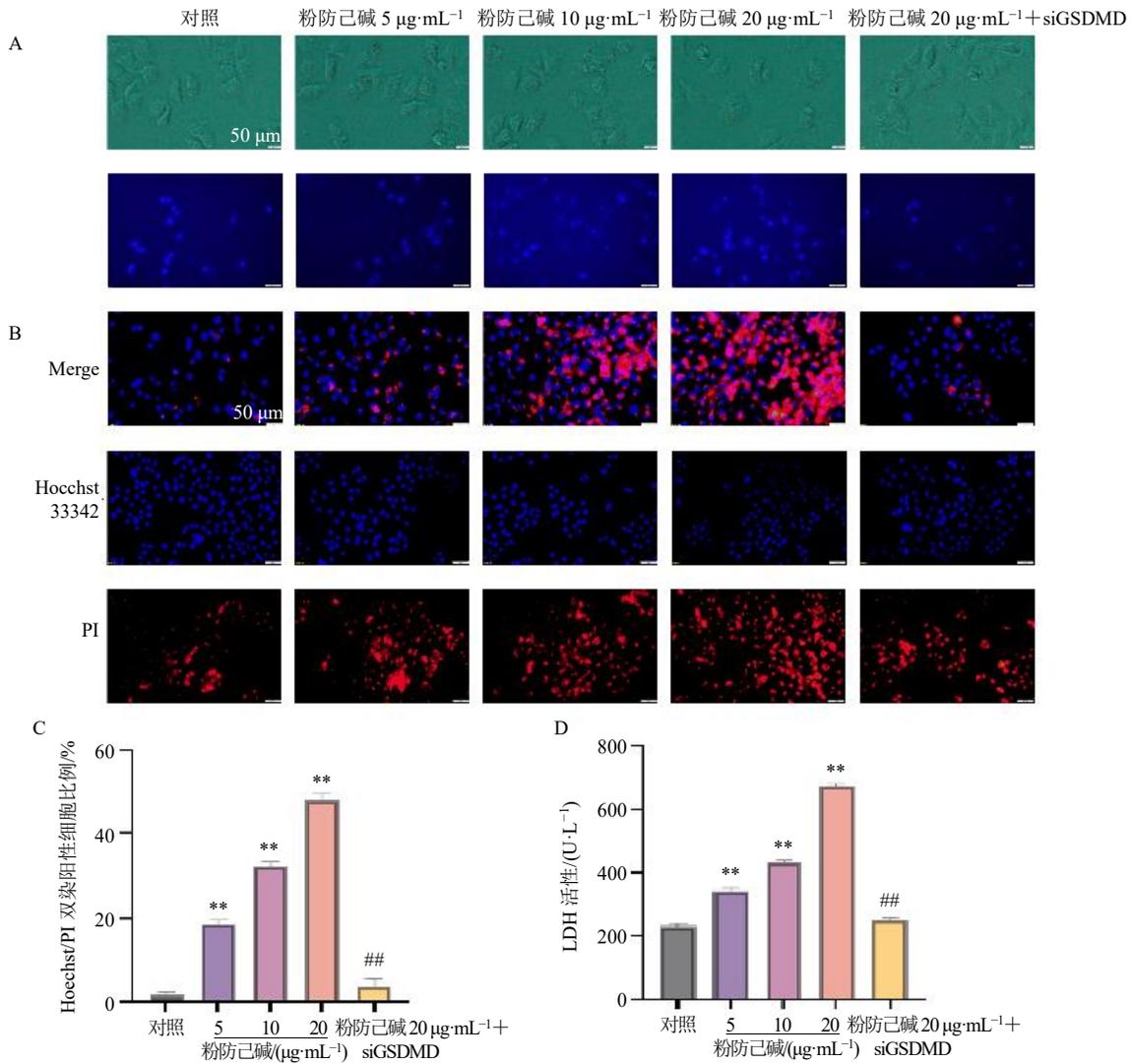
Fig. 3 Effect of tetrandrine on proliferation, migration and invasion of MDA-MB-231 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

果(图 4-B、C)显示,对照组细胞形态均一,细胞核呈均匀蓝色荧光,PI 染色阴性;经粉防己碱处理后,细胞出现细胞核固缩、染色质凝集,且细胞膜破裂导致 PI 阳性率显著升高,呈剂量相关性。上述形态学变化与焦亡的膜损伤和核固缩特征相符。LDH 释放量(图 4-D)结果显示,与对照组比较,粉防己碱组 LDH 释放量显著升高($P < 0.01$),表明细胞膜通透性破坏导致细胞内容物外泄,是焦亡发生的核心证据。而给予 siGSDMD 干预后,可显著逆转粉防己碱对细胞形态学及膜损伤的调控作用

($P < 0.01$),提示 GSDMD 介导的膜孔形成是 LDH 释放的关键机制。

3.5 粉防己碱通过 NLRP3/Caspase-1 依赖的 GSDMD 活化诱导 MDA-MB-231 细胞焦亡

Western blotting 结果(图 5-A、B)及 qRT-PCR 结果(图 5-C)显示,粉防己碱显著调控了 MDA-MB-231 细胞中与焦亡相关的蛋白和基因表达。与对照组比较,粉防己碱组 Caspase-1 蛋白表达上调($P < 0.01$),表明其激活了细胞焦亡程序;同时,NLRP3 蛋白表达增加($P < 0.01$),与 Caspase-1 协



A-倒置显微镜及荧光显微镜观察 MDA-MB-231 细胞形态的代表性图像 (×400); B-Hoechst/PI 双染色后荧光显微镜观察 MDA-MB-231 细胞的代表性图像 (×200); C-Hoechst/PI 双染阳性细胞比例的定量统计分析结果; D-LDH 释放量的定量统计分析结果。

A-representative images of morphology of MDA-MB-231 cells observed by inverted microscope and fluorescence microscope (× 400); B-representative images of MDA-MB-231 cells after Hoechst/PI double staining observed by fluorescence microscope (× 200); C-quantitative statistical analysis of proportion of Hoechst/PI double-stained positive cells; D-quantitative statistical analysis of LDH release.

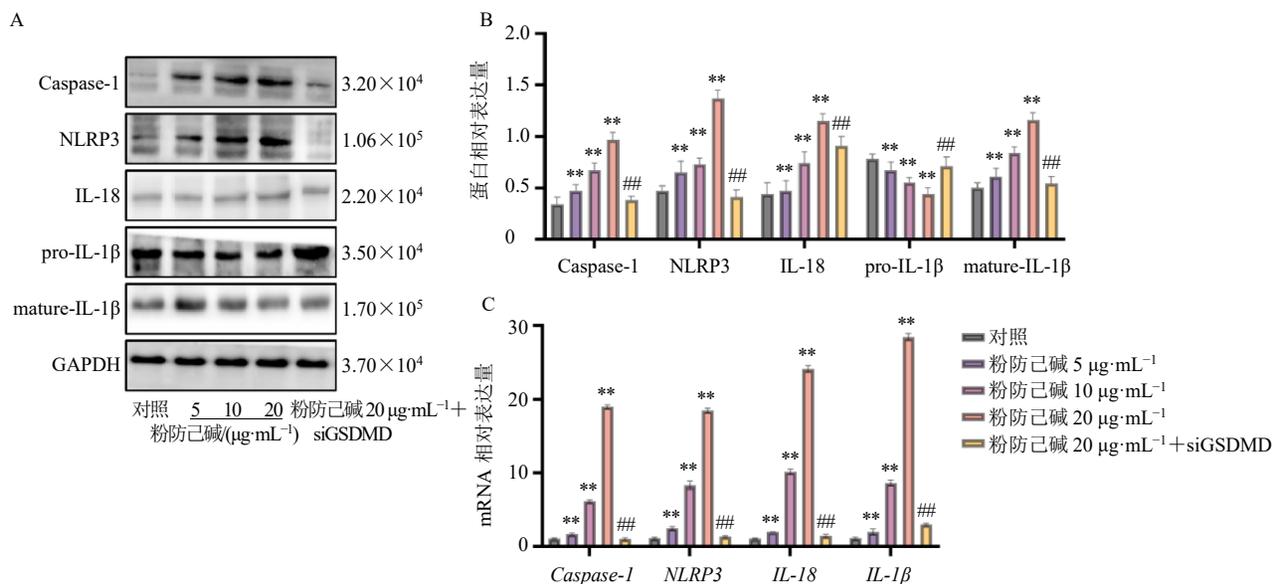
图 4 粉防己碱诱导 MDA-MB-231 细胞形态学变化及膜损伤 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Tetrandrine induces morphological changes and membrane damage in MDA-MB-231 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

同作用,促进了下游炎症因子的成熟与释放。IL-18 蛋白作为一种重要的促炎细胞因子,其表达水平在粉防己碱处理后明显上升 ($P < 0.01$),反映出炎症反应的增强。此外,粉防己碱还促进了 pro-IL-1 β 向 mature-IL-1 β 的剪切转化,而 GSDMD 蛋白的表达变化则直接关联着细胞膜通透性的改变,是细胞焦亡发生的重要标志。在基因表达层面, *NLRP3*、*Caspase-1*、*IL-18* 和 *IL-1 β* 的 mRNA 表达水平在粉防己碱处理后均显著上调 ($P < 0.01$),表明粉防己碱在转录水平上激活了细胞焦亡通路。而给予

siGSDMD 干预后,显著逆转粉防己碱对上述蛋白及基因的调控作用 ($P < 0.01$)。

在明确分子机制的基础上,采用流式细胞仪检测进一步验证了焦亡的细胞表型,如图 6 所示,与对照组比较,粉防己碱组细胞焦亡率显著升高 ($P < 0.01$),且呈剂量相关性;给予 siGSDMD 干预后,细胞焦亡率显著降低 ($P < 0.01$),证实 GSDMD 是粉防己碱诱导焦亡的必需分子。以上结果表明粉防己碱通过激活 GSDMD 介导的焦亡途径对 MDA-MB-231 细胞发挥抗肿瘤作用。



A、B-各组 Caspase-1、NLRP3、IL-18、pro-IL-1β 和 mature-IL-1β 蛋白表达；C-各组 *Caspase-1*、*NLRP3*、*IL-18* 和 *IL-1β* mRNA 表达。
A, B-Caspase-1, NLRP3, IL-18, pro-IL-1β and mature-IL-1β protein expressions in each group; C-Caspase-1, NLRP3, IL-18 and IL-1β mRNA expressions in each group.

图5 粉防己碱对 MDA-MB-231 细胞 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 通路的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 5 Effect of tetrandrine on NLRP3/Caspase-1/GSDMD pathway in MDA-MB-231 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

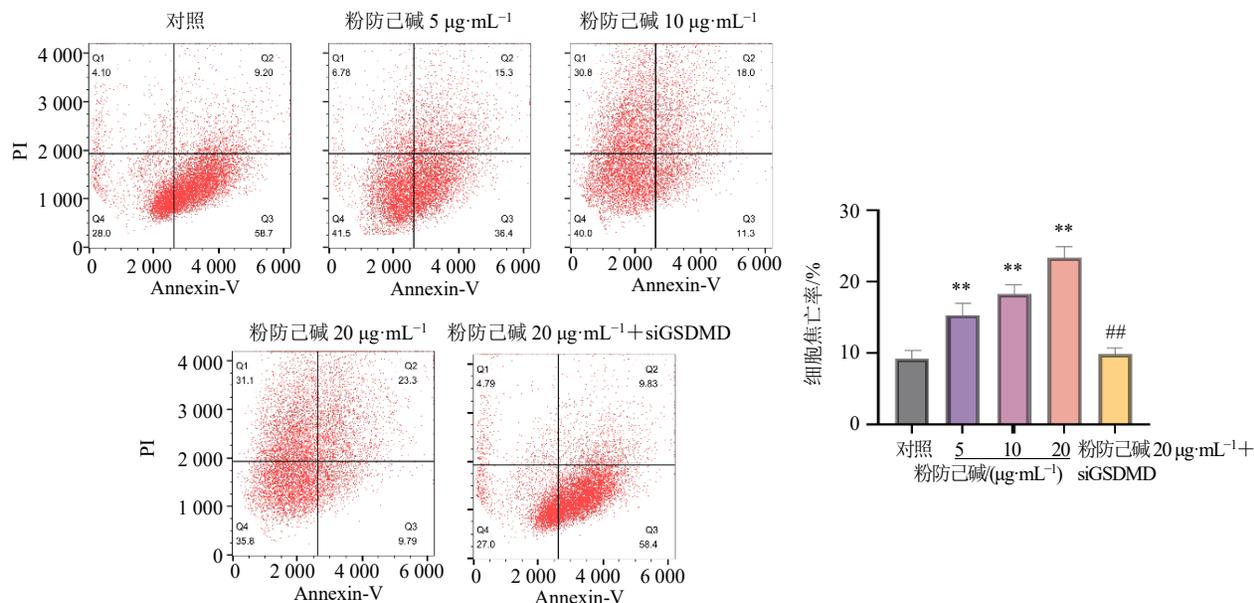


图6 粉防己碱诱导 MDA-MB-231 细胞焦亡 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 6 Tetrandrine induces pyroptosis in MDA-MB-231 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

本研究通过系统分析粉防己碱对 MDA-MB-231 细胞的影响，揭示了其通过激活 NLRP3/Caspase-1 依赖性 GSDMD 切割诱导细胞焦亡的抗肿瘤机制。结果显示，粉防己碱呈剂量相关性地抑制 MDA-MB-231 细胞增殖，并通过形态学观察和

LDH 释放实验证实细胞焦亡的发生^[14]。siGSDMD 干预后细胞焦亡率显著下降，Western blotting 结果显示 NLRP3、Caspase-1 及 IL-1β/IL-18 表达同步降低。GSDMD 作为焦亡终末执行者，其沉默对上游蛋白的反馈性抑制可能源于孔道形成缺失导致的离子失衡^[15-16]。GSDMD-NT 介导的钾离子外流是

NLRP3 炎症小体激活的关键次级信号^[16-17], siGSDMD 将削弱此正反馈循环。GSDMD-NT 孔道形成后介导的 K⁺外流可降低胞内 K⁺浓度, 而低 K⁺环境是 NLRP3 炎症小体组装的关键触发信号。当 siGSDMD 时, 孔道缺失导致 K⁺外流减少, 胞内 K⁺浓度维持较高水平, 从而反馈性抑制 NLRP3/Caspase-1 的持续活化^[18]。这一发现与 Gasdermin 家族蛋白在焦亡中的经典作用机制相吻合, 即 Caspase-1 介导的 GSDMD 切割引发膜孔形成, 导致细胞内容物外泄和炎症因子释放^[19]。

在肿瘤生物学层面, 粉防己碱对迁移和侵袭的抑制作用尤为关键。集落形成和 Transwell 实验结果显示, siGSDMD 可显著逆转粉防己碱对细胞克隆形成和侵袭的抑制作用, 表明 GSDMD 介导的焦亡不仅直接杀伤肿瘤细胞, 还可能通过调控基质重塑相关信号影响肿瘤转移^[20-21]。这一现象与 NLRP3 炎症小体在肿瘤微环境中的双重作用相关: 一方面, IL-1 β /IL-18 的释放可激活抗肿瘤免疫应答; 另一方面, 过度炎症反应可能促进免疫抑制性微环境形成^[22-23]。本研究发现粉防己碱处理组 IL-18 表达显著升高, 而既往研究提示 IL-18 可通过诱导干扰素 γ 增强 CD8⁺ T 细胞活性^[24], 这为后续探索粉防己碱与免疫治疗的协同效应提供了理论依据。

从分子机制角度, Western blotting 与 qRT-PCR 结果共同揭示了粉防己碱的多层次调控作用: 在转录水平上调 NLRP3、Caspase-1 等基因表达, 在翻译后水平促进 pro-IL-1 β 向 mature-IL-1 β 转化。这种双重调控模式可能与粉防己碱的钙离子调控能力有关, 早期研究曾发现粉防己碱可通过升高胞内 Ca²⁺水平增强药物敏感性^[25], 而 Ca²⁺信号已被证实可激活 NLRP3 炎症小体组装^[26]。此外, 粉防己碱对 GSDMD 的特异性作用具有重要临床意义, 三阴性乳腺癌因其缺乏 ER/PR/HER2 靶点而治疗选择有限, 本研究表明靶向焦亡通路可能成为新的治疗策略, 这与近期关于 GSDME 激活剂抗肿瘤效果的研究趋势一致^[27]。

此外, 本研究结果中 GSDMD 沉默仅部分逆转粉防己碱的抑制作用, 提示存在其他并行机制。粉防己碱可能通过内质网应激途径诱导自噬^[28], 或调控 Hippo/YAP 信号通路影响耐药性^[29]。这种多靶点特性与其植物来源生物碱的复杂药理作用相符, 如粉防己地上部分提取物含多种具有抗肿瘤活性的生物碱成分^[30]。未来研究需进一步解析不同成分的

协同效应, 并评估体内模型中焦亡诱导对肿瘤免疫微环境的重塑作用^[27,31]。

综上, 本研究系统阐明了粉防己碱通过 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 通路诱导 MDA-MB-231 细胞焦亡的分子机制, 为开发基于焦亡调控的天然药物疗法提供了实验依据。鉴于焦亡相关炎症因子在肿瘤进展中的双重作用^[23,32], 后续研究应重点关注给药方案的优化, 以平衡抗肿瘤效应与炎症相关不良反应, 推动该化合物向临床转化。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Tong L, Yu X L, Wang S, *et al.* Research progress on molecular subtyping and modern treatment of triple-negative breast cancer [J]. *Breast Cancer*, 2023, 15: 647-658.
- [2] Wahba H A, El-Hadaad H A. Current approaches in treatment of triple-negative breast cancer [J]. *Cancer Biol Med*, 2015, 12(2): 106-116.
- [3] Xiong N T, Wu H M, Yu Z K. Advancements and challenges in triple-negative breast cancer: A comprehensive review of therapeutic and diagnostic strategies [J]. *Front Oncol*, 2024, 14: 1405491.
- [4] Xia X J, Wang X, Cheng Z, *et al.* The role of pyroptosis in cancer: Pro-cancer or pro-“host”? [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(9): 650.
- [5] Lu L Q, Zhang Y, Tan X M, *et al.* Emerging mechanisms of pyroptosis and its therapeutic strategy in cancer [J]. *Cell Death Discov*, 2022, 8(1): 338.
- [6] Du T T, Gao J, Li P L, *et al.* Pyroptosis, metabolism, and tumor immune microenvironment [J]. *Clin Transl Med*, 2021, 11(8): e492.
- [7] Zhao Y, Quan Y, Lei T, *et al.* The role of inflammasome NLRP3 in the development and therapy of periodontitis [J]. *Int J Med Sci*, 2022, 19(10): 1603-1614.
- [8] Lu J J, Bao J L, Chen X P, *et al.* Alkaloids isolated from natural herbs as the anticancer agents [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2012, 2012: 485042.
- [9] 王蒙, 王知斌, 孙延平, 等. 粉防己碱对人乳腺癌 MCF-7 细胞线粒体能量代谢的影响 [J]. *中草药*, 2021, 52(17): 5244-5249.
- [10] Liu W, Kou B, Ma Z K, *et al.* Tetrandrine suppresses proliferation, induces apoptosis, and inhibits migration and invasion in human prostate cancer cells [J]. *Asian J Androl*, 2015, 17(5): 850-853.
- [11] Yue X, Li M Z, Chen D X, *et al.* UNBS5162 induces growth inhibition and apoptosis via inhibiting PI3K/AKT/mTOR pathway in triple negative breast cancer MDA-

- MB-231 cells [J]. *Exp Ther Med*, 2018, 16(5): 3921-3928.
- [12] Wu J C, Wu Y, Zhao T Y, *et al.* Targeting RAC1 reactivates pyroptosis to reverse paclitaxel resistance in ovarian cancer by suppressing P21-activated kinase 4 [J]. *MedComm*, 2024, 5(9): e719.
- [13] Akbal A, Dernst A, Lovotti M, *et al.* How location and cellular signaling combine to activate the NLRP3 inflammasome [J]. *Cell Mol Immunol*, 2022, 19(11): 1201-1214.
- [14] Hamida R S, Albasher G, Bin-Meferij M M. Oxidative stress and apoptotic responses elicited by *Nostoc*-synthesized silver nanoparticles against different cancer cell lines [J]. *Cancers*, 2020, 12(8): 2099.
- [15] He W T, Wan H Q, Hu L C, *et al.* Gasdermin D is an executor of pyroptosis and required for interleukin-1 β secretion [J]. *Cell Res*, 2015, 25(12): 1285-1298.
- [16] Rathinam V A K, Zhao Y, Shao F. Innate immunity to intracellular LPS [J]. *Nat Immunol*, 2019, 20(5): 527-533.
- [17] Ma C M, Yang D X, Wang B W, *et al.* Gasdermin D in macrophages restrains colitis by controlling cGAS-mediated inflammation [J]. *Sci Adv*, 2020, 6(21): eaaz6717.
- [18] You H M, Wang L, Meng H W, *et al.* Pyroptosis: Shedding light on the mechanisms and links with cancers [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1290885.
- [19] Shao R F, Lou X R, Xue J F, *et al.* Review: The role of GSDMD in sepsis [J]. *Inflamm Res*, 2022, 71(10/11): 1191-1202.
- [20] 赵鹏, 李艳梅, 邱剑飞, 等. Cyanoside H 对三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖和转移的影响及其机制 [J]. *中国生物制品学杂志*, 2024, 37(10): 1190-1199.
- [21] 马飞, 宋瑾萱, 贺敏, 等. 抗菌肽 WK-13-3D 对三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的抑制作用及其机制 [J]. *解放军医学杂志*, 2025, 50(6): 740-746.
- [22] Lee H E, Lee J Y, Yang G, *et al.* Inhibition of NLRP3 inflammasome in tumor microenvironment leads to suppression of metastatic potential of cancer cells [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 12277.
- [23] Wu J X, Wang L, Xu J W. The role of pyroptosis in modulating the tumor immune microenvironment [J]. *Biomark Res*, 2022, 10(1): 45.
- [24] Saetang J, Chonpathompikunlert P, Sretrirutchai S, *et al.* Anti-cancer effect of engineered recombinant interleukin 18 [J]. *Adv Clin Exp Med*, 2020, 29(10): 1135-1143.
- [25] 王金华, 叶祖光, 孙爱续, 等. 粉防己碱逆转人乳腺癌 MCF-7 多药耐药细胞的抗凋亡作用 [J]. *中国中药杂志*, 2002, 27(1): 50-54.
- [26] Lin T Y, Tsai M C, Tu W, *et al.* Role of the NLRP3 inflammasome: Insights into cancer hallmarks [J]. *Front Immunol*, 2021, 11: 610492.
- [27] Huang H Y, Weng Y M, Tian W, *et al.* Molecular mechanisms of pyroptosis and its role in anti-tumor immunity [J]. *Int J Biol Sci*, 2023, 19(13): 4166-4180.
- [28] 赵立娜, 翟臻, 梁晨, 等. 粉防己碱诱导雌激素受体阳性乳腺癌细胞自噬与凋亡的机制研究 [J]. *解放军医药杂志*, 2021, 33(10): 25-28.
- [29] 辛国松, 王毛毛, 侯妍秀, 等. 基于 Hippo/YAP 信号通路探究粉防己碱抗乳腺癌耐药机制 [J]. *中草药*, 2023, 54(18): 5960-5967.
- [30] 薛佳芸, 郭弯, 康云, 等. 粉防己地上部分化学成分及其潜在作用靶点及活性研究 [J]. *中成药*, 2024, 46(9): 2980-2986.
- [31] Theivanthiran B, Haykal T, Cao L D, *et al.* Overcoming immunotherapy resistance by targeting the tumor-intrinsic NLRP3-HSP70 signaling axis [J]. *Cancers*, 2021, 13(19): 4753.
- [32] 范慧敏, 胡容. 炎症小体在肿瘤中的双重作用 [J]. *药物生物技术*, 2017, 24(2): 155-158.

[责任编辑 李亚楠]