# 小檗碱抑制肿瘤干细胞增殖的机制研究及体内安全性评价Δ

谢金金*，陈　燕，杜　鑫，李雨珂，赵梦楠，石三军#（成都中医药大学药学院，成都　611137）

**中图分类号**　R285；R965　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2024）12-1443-08
**DOI**　10.6039/j.issn.1001-0408.2024.12.06

**摘　要　目的**　研究小檗碱对肿瘤干细胞增殖的体外抑制作用机制，并评价其体内安全性。**方法**　采用流式细胞术从小鼠皮肤黑色素瘤B16F10细胞中分选肿瘤干细胞；以CD44、CD133、Nanog同源盒蛋白（NANOG）、八聚体结合转录因子4（OCT4）为指标对肿瘤干细胞进行表征。将肿瘤干细胞分为对照组、全反式维甲酸（ATRA）组和小檗碱组，采用CCK-8法检测小檗碱对肿瘤干细胞活力的影响；采用流式细胞仪检测细胞凋亡率、$CD44^+/CD133^+$细胞比例和性别决定区Y框蛋白2（SOX2）阳性细胞率；记录小檗碱处理后肿瘤球的形态变化；记录各组细胞焦亡形态图并检测乳酸脱氢酶（LDH）释放率，采用Western blot法检测焦亡相关蛋白消皮素E（GSDME）、消皮素E氮端（GSDME-N）、胱天蛋白酶3（caspase-3）和裂解胱天蛋白酶3（cleaved-caspase-3）的蛋白表达水平。采用斑马鱼胚胎毒性实验对小檗碱的体内安全性进行初步评价。**结果**　与B16F10细胞比较，肿瘤干细胞中$CD44^+/CD133^+$细胞比例和NANOG、OCT4荧光强度均显著升高（$P<0.000\ 1$）。小檗碱对肿瘤干细胞的半数抑制浓度为50.98 μmol/L；与对照组比较，小檗碱组细胞凋亡率显著升高，$CD44^+/CD133^+$细胞比例和SOX2阳性细胞率均显著降低（$P<0.000\ 1$），肿瘤干细胞球皱缩，部分细胞死亡。小檗碱处理后的肿瘤干细胞，其最外层细胞膜肿胀，LDH释放率显著增加，且随剂量增大而升高（$P<0.05$）；小檗碱20、40 μmol/L组的GSDME-N、cleaved-caspase-3蛋白表达水平显著上升，GSDME、caspase-3蛋白表达水平显著下降（小檗碱20 μmol/L组除外，$P<0.05$）。经小檗碱处理的斑马鱼胚胎发育几乎未受影响，胚胎存活率达到100%，未观察到明显畸形。**结论**　小檗碱具有较好的抗肿瘤干细胞增殖活性，其作用机制可能与激活GSDME、促进细胞焦亡有关；且小檗碱体内安全性良好。

**关键词**　小檗碱；肿瘤干细胞；焦亡；焦孔素E；安全性

## Study on mechanism of berberine inhibiting tumor stem cells proliferation and its *in vivo* safety evaluation

XIE Jinjin, CHEN Yan, DU Xin, LI Yuke, ZHAO Mengnan, SHI Sanjun (College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China)

**ABSTRACT　OBJECTIVE** To investigate the *in vitro* inhibitory mechanism of berberine on the proliferation of tumor stem cells and evaluate its *in vivo* safety. **METHODS** Flow cytometry was used to select tumor stem cells from mouse skin melanoma B16F10 cells; CD44, CD133, Nanog homologous box protein (NANOG) and octamer-binding transcription factor 4 (OCT4) were used as indicators to characterize tumor stem cells. Tumor stem cells were divided into control group, all-trans retinoic acid (ATRA) group, and berberine group, and the CCK-8 method was used to detect the effects of berberine on the viability of tumor stem cells; flow cytometry was adopted to detect cell apoptotic rate, the proportion of $CD44^+/CD133^+$ and the positive cell rate of sex determining region Y box protein 2 (SOX2); the morphological changes of tumor balls were recorded after treatment with berberine; the morphology of cell pyroptosis in each group was recorded, and the release rate of lactate dehydrogenase (LDH) was detected; Western blot assay was adopted to detect the expressions of pyroptosis-related protein gasdermin E (GSDME), GSDME-N, caspase-3 and cleaved caspase-3. Preliminary evaluation of *in vivo* safety of berberine was conducted by using zebrafish embryo toxicity experiments. **RESULTS** Compared with B16F10 cells, the proportion of $CD44^+/CD133^+$ cells in tumor stem cells and the fluorescence intensity of NANOG and OCT4 were significantly increased ($P<0.000\ 1$). The half-inhibitory concentration of berberine to tumor stem cells was 50.98 μmol/L. Compared with the control group, the apoptotic rate of cells in the berberine group was significantly increased, while the proportion of $CD44^+/CD133^+$ cells and the rate of SOX2 positive cells were reduced significantly ($P<0.000\ 1$); tumor stem cell spheroids were atrophied, with partial cell death. After treatment with berberine, tumor stem cells exhibited swelling in their outermost layer, the release rate of LDH of cells was significantly increased and the release rate of LDH increased with increasing dose; the protein expressions of GSDME-N and cleaved-caspase-3 of cells in berberine 20, 40 μmol/L groups were significantly

Δ **基金项目**　国家自然科学基金青年科学基金项目（No. 82003689）；四川省科技计划项目（No.2022JDJQ0052）

＊**第一作者**　硕士研究生。研究方向：中药活性小分子体外药效评价。E-mail：xjj18402807749@163.com

＃**通信作者**　教授，博士生导师，博士。研究方向：中药活性成分发掘与肿瘤干细胞。E-mail：shisanjuns@163.com

increased, and the protein expressions of GSDME and caspase-3 were significantly reduced (except for berberine 20 μmol/L group, $P<0.05$). The embryonic development of zebrafish treated with berberine was almost unaffected, and the survival rate of embryo reached 100%, with no obvious abnormalities observed. **CONCLUSIONS** Berberine has good activity against the proliferation of tumor stem cells, and its mechanism of action may be related to activating GSDME and promoting cell pyroptosis; berberine has good *in vivo* safety.

**KEYWORDS** berberine; tumor stem cells; pyroptosis; gasdermin E; safety

肿瘤干细胞也被称为“肿瘤起始细胞”，是肿瘤中一小群同时具备干细胞和癌细胞特性的细胞群，具有自我更新和多向分化能力，以及先天耐药性和高致瘤性[1]。肿瘤干细胞在大多数实体瘤中均有发现，其可促进治疗后肿瘤的发生、扩张、耐药、复发和转移[2-3]。目前认为，肿瘤干细胞对化疗和放疗的抵抗是导致肿瘤复发和转移的重要原因之一，因此，从根本上杀死肿瘤干细胞，是根除肿瘤、提高患者治愈率的关键。通过对肿瘤干细胞表面标志物进行鉴定并实施针对性干预是基于肿瘤干细胞理论治疗肿瘤的重要手段。目前已有多种针对肿瘤干细胞的靶向疗法（如免疫治疗、小干扰RNA递送和基因敲除等），通过抑制肿瘤干细胞的干性、内源性或外源性信号传递、体内致瘤性等途径达到治疗肿瘤的目的[4-5]。

小檗碱，亦称黄连素，是从中药黄连中分离的一种季铵型生物碱。小檗碱具有广泛的抗癌作用，包括减少细胞增殖、抑制细胞转移并诱导细胞凋亡等[6-7]。本团队在针对抗肿瘤干细胞的药效实验中发现，小檗碱能诱导肿瘤干细胞肿胀膨大、膜起泡，该现象与细胞焦亡现象非常相似。细胞焦亡是一种独特的程序性细胞死亡，其依赖于消皮素（gasdermin，GSDM）的介导，GSDM家族蛋白激活后释放的氮端片段可通过寡聚并易位插入胞膜，形成孔洞，进而使DNA断裂、染色质凝集、细胞肿胀、胞质外流、细胞膜破裂、细胞内容物渗出，从而导致细胞死亡[8]。

中药进入生物体内经过代谢可能会转化成毒性较强的成分，通过多途径、多靶点对机体产生整体调节作用。斑马鱼是被广泛认可的用于高效评价药物毒理作用的模型动物，既具有快速、高效、费用低等优势，又能有效模拟完整代谢系统下中药的在体综合效应，弥补体外模型的不足[9]。本研究以小鼠皮肤黑色素瘤B16F10细胞系分选的肿瘤干细胞为研究对象，基于小檗碱诱导肿瘤干细胞焦亡，初步探讨小檗碱体外抑制肿瘤干细胞增殖的作用机制，并通过斑马鱼胚胎毒性实验对其体内安全性进行初步评价，以期为基于肿瘤干细胞的肿瘤治疗策略提供实验依据和思路。

## 1 材料

### 1.1 主要仪器

SGX-FA110型万分之一电子天平购自上海实干实业有限公司；XDS200型光学显微镜购自江西凤凰光学科技有限公司；BPN-150CH（UV）型气套式$CO_2$恒温培养箱、GHP-9080型恒温生化培养箱购自上海一恒科学仪器有限公司；iMark™型多功能酶标仪购自美国Bio-Rad公司；LC-LX-HR165A型台式高速冷冻离心机购自上海力辰邦西仪器科技有限公司；FACS Canto Ⅱ型流式细胞仪购自美国BD公司；OI 600MF型多功能成像仪购自广州光仪生物科技有限公司；M165 FC型荧光体视显微镜购自德国Leica公司。

### 1.2 主要药品与试剂

小檗碱（货号B226165，纯度98%）购自上海玻尔化学试剂有限公司；全反式维甲酸（all-trans retinoic acid，ATRA）（货号R106320-25g）购自上海阿拉丁生化科技有限公司。DMEM/F12培养基、B27补充剂（50×）（批号分别为6123006、2670457）均购自美国Gibco公司；人表皮生长因子、人碱性成纤维细胞生长因子（批号分别为CM745505、CM735737）均购自乔默生物技术（上海）有限公司；重组人胰岛素干粉（批号L410909）购自上海源培生物科技股份有限公司；FITC荧光CD44抗体（CD44-FITC）和PE荧光CD133抗体（CD133-PE）（批号分别为B378954、B389953）均购自美国BioLegend公司；兔消皮素E（gasdermin E，GSDME）多克隆抗体、兔性别决定区Y框蛋白2（sex determining region Y box protein 2，SOX2）多克隆抗体（批号分别为13075-1-AP、11064-1-AP）均购自美国Proteintech公司；消皮素E氮端（GSDME-N）单克隆抗体（批号AF4016）购自江苏亲科生物研究中心有限公司；兔胱天蛋白酶3（caspase-3）多克隆抗体、兔裂解胱天蛋白酶3（cleaved-caspase-3）多克隆抗体（批号分别为R04194004、N12281992）均购自沈阳万类生物科技有限公司；青链霉素混合液、兔Nanog同源盒蛋白（Nanog homologous box protein，NANOG）多克隆抗体（批号分别为18K10A16、XA4779BP11374）购自武汉博士德生物工程有限公司；鼠八聚体结合转录因子4（octamer-binding transcription factor 4，OCT4）单克

隆抗体（批号L14NO11）购自成都正能生物技术有限责任公司；兔甘油醛-3-磷酸脱氢酶（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase，GAPDH）抗体、磷酸盐缓冲液（PBS）、RIPA细胞快速裂解液、无蛋白快速封闭溶液、磷酸化蛋白酶抑制剂（批号分别为AC2111013A、GA2310014、CR2309010、CR2306034、CR2303107）均购自武汉赛维尔生物科技有限公司；Omni-Easy™速溶型蛋白上样缓冲液（5×）、双色预染蛋白Marker（15～250 kDa）、聚丙烯酰胺凝胶电泳（polyacrylamide gel electrophoresis，PAGE）凝胶快速制备试剂盒（12.5%）（批号分别为38116996、28231000、037B1900）均购自上海雅酶生物医药科技有限公司；Alexa Fluor®647标记的山羊抗兔IgG荧光二抗（批号230719L01-01）购自上海百赛生物技术股份有限公司；BCA蛋白浓度测定试剂盒、乳酸脱氢酶（lactate dehydrogenase，LDH）细胞毒性检测试剂盒（批号分别为82123240311、11123230523）均购自上海碧云天生物技术股份有限公司；PVDF转移膜（批号0000286825）购自美国Millipore公司；辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG二抗（批号RS0002）购自美国ImmunoWay公司；超敏化学发光检测试剂盒（批号220314E01-03）购自苏州优逸兰迪生物科技有限公司；CCK-8细胞增殖检测试剂盒（批号23118704）购自北京兰杰柯科技有限公司；Annexin Ⅴ-FITC/PI凋亡检测试剂盒（批号A0217031）购自翌圣生物科技（上海）股份有限公司。

### 1.3 细胞与实验动物

小鼠皮肤黑色素瘤B16F10细胞购自美国典型培养物保藏中心。

野生型AB品系斑马鱼由成都中医药大学斑马鱼实验平台提供，并根据标准方案培养。在室温27.5～28.5 ℃、pH 7.2～7.6、光照14 h/黑夜10 h交替的环境下，将性成熟斑马鱼以1∶1进行雌雄配对、交配、自然产卵，供实验研究。

## 2 方法

### 2.1 肿瘤干细胞的获得

#### 2.1.1 肿瘤干细胞分选和培养

利用肿瘤干细胞特征蛋白CD44和CD133进行细胞分选。收集B16F10细胞，用CD44-FITC和CD133-PE染色30 min，随后使用流式细胞仪进行分选。未分选的B16F10细胞在普通培养瓶中培养；分选得到的肿瘤干细胞在含有B27补充剂（1×）、人表皮生长因子（20 ng/mL）、人碱性成纤维细胞生长因子（20 ng/mL）、重组人胰岛素干粉（5 μg/mL）和青链霉素混合液（1×）的DMEM/F12培养基中进行培养（所用培养瓶为超低吸附培养瓶）。在光学显微镜下观察并记录细胞形态。

#### 2.1.2 肿瘤干细胞表征

利用肿瘤干细胞特征蛋白CD44、CD133、NANOG、OCT4对肿瘤干细胞进行表征。分别制备细胞数量为$5\times10^5$个/mL的B16F10细胞和肿瘤干细胞悬液，重悬至体积为100 μL后加入FITC-CD44、PE-CD133，37 ℃避光孵育30 min；用PBS洗涤，弃去上清液，随后在流式细胞仪上对$CD44^+/CD133^+$细胞比例进行分析。继续将两种细胞与Alexa Fluor®647标记的山羊抗兔IgG荧光二抗进行孵育，在流式细胞仪上检测两种细胞中NANOG、OCT4的荧光强度。以$CD44^+/CD133^+$细胞比例和NANOG、OCT4的荧光强度表示目的蛋白的表达情况，若CD44、CD133、NANOG、OCT4高表达，表明成功分选到B16F10来源的肿瘤干细胞[10]。

### 2.2 小檗碱对肿瘤干细胞增殖的影响

#### 2.2.1 肿瘤干细胞活力检测

实验分为空白组（只含培养基）、对照组（不含药物，含细胞、培养基）、ATRA组和小檗碱组。将肿瘤干细胞以$6\times10^3$个/孔接种至96孔板中，然后将ATRA和小檗碱分别用培养基稀释成梯度浓度后加入相应培养孔中。根据本课题组前期实验结果及相关研究设定药物浓度[11]，ATRA和小檗碱的给药浓度均为1.562 5、3.125、6.25、12.5、25、50、100 μmol/L，每个浓度设3个复孔。分别培养48 h后，每孔加入CCK-8溶液10 μL，孵育2 h后，用酶标仪在450 nm波长处检测其光密度（optical density，OD）值，并计算细胞存活率。细胞存活率（%）=（给药组OD－空白组OD）/（对照组OD－空白组OD）×100%。利用GraphPad Prism 8.0软件计算两种药物的半数抑制浓度（$IC_{50}$）。

#### 2.2.2 肿瘤干细胞凋亡率检测

实验分为对照组（不含药物，含细胞、培养基）、ATRA组（40 μmol/L）、小檗碱组（40 μmol/L），浓度根据“2.2.1”项下结果设置，每组设3个复孔。将肿瘤干细胞以$2\times10^5$个/孔接种至6孔板中，置于37 ℃恒温培养箱内培养过夜，然后与ATRA、小檗碱分别共同孵育24 h，收集各组细胞，按照Annexin Ⅴ-FITC/PI凋亡检测试剂盒说明书操作，采用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

#### 2.2.3 肿瘤干细胞分化程度检测

参照“2.2.2”项下方法分组和给药，每组设3个复孔，将肿瘤干细胞与ATRA和小檗碱分别共同孵育48 h后收集各组细胞，加入CD44-FITC、CD133-PE、SOX2一抗（稀释度均为1∶200），37 ℃孵育30 min。针对SOX2一抗，孵育结束后，用PBS洗涤，加入Alexa Fluor®647标记的山羊抗兔IgG荧光二抗（稀释度为1∶400），避光孵育

30 min。采用流式细胞术对$CD44^+/CD133^+$细胞比例和SOX2阳性细胞率进行测定，该比例（率）数值越小，表示目的蛋白的阳性表达越弱，肿瘤干细胞的分化程度越高。

2.2.4　肿瘤干细胞肿瘤球破坏实验

参照“2.2.2”项下分组，根据“2.2.1”项下结果设置药物浓度，每组设3个复孔。预先收集肿瘤干细胞肿瘤球并接种至24孔板中，第2天分别用ATRA（10 μmol/L）、小檗碱（10 μmol/L）处理肿瘤球，继续培养3 d。使用光学显微镜在药物处理0、48、72 h时拍摄并记录肿瘤球形态变化。

### 2.3　小檗碱对肿瘤干细胞焦亡的影响

2.3.1　肿瘤干细胞焦亡形态观察

收集肿瘤干细胞并接种至24孔板中，根据前期预实验和“2.2.1”项下$IC_{50}$结果，将细胞分为对照组（不含药物，含细胞、培养基）和小檗碱组（10、20、40 μmol/L），用培养基或小檗碱处理24 h后，在光学显微镜下观察肿瘤干细胞的焦亡形态，并拍照记录。

2.3.2　肿瘤干细胞LDH释放检测

参照“2.3.1”项下方法进行分组和给药，每组设3个复孔，同时设6个对照孔（不含药物，含细胞、培养基）。处理23 h后，取3个对照孔，分别加入200 μL LDH释放剂作为细胞最大酶活性孔，继续作用1 h后收集细胞上清液，于4 ℃以1 500 r/min离心5 min；取120 μL上清液至96孔板中，每孔加入60 μL新鲜配制的LDH检测工作液，室温孵育30 min，立即用酶标仪检测各孔在490 nm波长处的OD值，并计算LDH释放率。LDH释放率（%）=（给药孔OD－对照孔OD）/（最大酶活性孔OD－对照孔OD）×100%。

2.3.3　肿瘤干细胞焦亡相关蛋白表达检测

采用Western blot法检测。参照“2.3.1”项下方法进行分组和给药。细胞培养24 h后，弃去培养基，用PBS清洗，以含磷酸酶抑制剂的RIPA裂解液于冰上裂解30 min，于4 ℃以13 000 r/min离心15 min，收集上清液，采用BCA法检测后于100 ℃变性处理，用十二烷基硫酸钠-PAGE分离；转膜，室温封闭5～10 min后加入相应一抗（GSDME、GSDME-N、caspase-3、cleaved-caspase-3、GAPDH的稀释比例均为1∶1 000），在4 ℃下孵育过夜；用TBST洗涤10 min×3次，加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG二抗（稀释度为1∶1 000，稀释液为含5%BSA的TBST溶液），室温孵育1.5 h后，利用ECL发光液显影，并在多功能成像仪下成像。以目的蛋白与内参蛋白GAPDH的灰度值比值表示目的蛋白的表达水平。

### 2.4　斑马鱼胚胎毒性实验

收集健康斑马鱼胚胎，随机分为对照组（只含胚胎养殖水）、溶剂组（0.1%二甲基亚砜溶液）、ATRA组（10 μmol/L）、小檗碱组（10 μmol/L），每组设3个复孔。在12孔板中每孔随机放入10个斑马鱼胚胎，于28.5 ℃培养箱中培养。以受精卵凝固、缺乏体节、缺乏心跳3个致死条件中任何1个发生为胚胎死亡标准；以斑马鱼胚胎体节发育异常、心包水肿、躯干水肿等情况为畸形标准。分别于药物处理前0 h及药物处理后24、48 h，使用体视显微镜记录胚胎存活数和畸形数，计算48 h时的胚胎存活率和畸形率。胚胎存活率（%）=胚胎存活数/胚胎总数×100%；胚胎畸形率（%）=胚胎畸形数/胚胎存活数×100%。

### 2.5　统计学方法

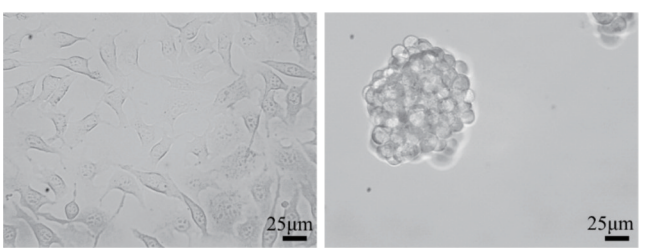
采用GraphPad Prism 8.0软件对实验数据进行统计学分析。满足正态分布的计量资料以$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用单因素方差分析，进一步两两比较采用LSD-$t$检验。检验水准$\alpha=0.05$。

## 3　结果

### 3.1　肿瘤干细胞获得结果

3.1.1　肿瘤干细胞分选和培养结果

由图1可知，在普通培养瓶中培养的B16F10细胞呈纺锤形和上皮样细胞的混合群体，在超低吸附培养瓶中培养的肿瘤干细胞形成肿瘤球。




A. B16F10细胞　　B. 肿瘤干细胞

**图1　B16F10细胞与肿瘤干细胞形态图**

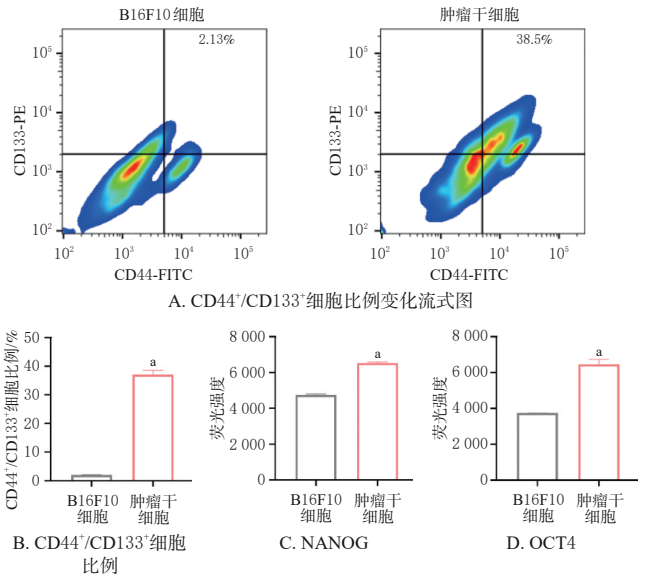
3.1.2　肿瘤干细胞表征结果

由图2可知，与B16F10细胞比较，肿瘤干细胞中$CD44^+/CD133^+$细胞比例和NANOG、OCT4荧光强度均显著升高（$P<0.000\ 1$），表明成功分选到B16F10来源的肿瘤干细胞。

### 3.2　小檗碱对肿瘤干细胞增殖的影响

3.2.1　小檗碱对肿瘤干细胞活力的影响

CCK-8实验结果显示，在1.562 5～100 μmol/L浓度范围内，ATRA和小檗碱均能抑制肿瘤干细胞增殖，且随着药物浓度的增加，细胞存活率逐渐降低，呈剂量依赖趋势。结果见图3。进一步计算$IC_{50}$值，结果显示，ATRA的$IC_{50}$为130.5 μmol/L，小檗碱为50.98 μmol/L。




a：与B16F10细胞比较，$P<0.000\ 1$。

**图2　肿瘤干细胞特征蛋白在B16F10细胞和肿瘤干细胞中的表达情况（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）**

因此，后续实验采用对细胞活力无显著影响的剂量（＜50.98 μmol/L）开展研究，即小檗碱剂量为10、20或40 μmol/L。

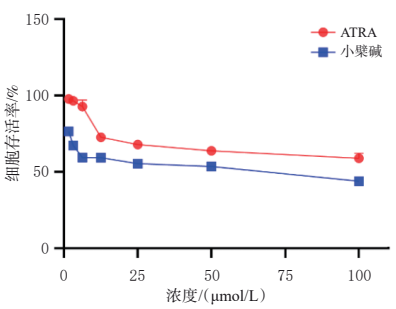



**图3　小檗碱对肿瘤干细胞活力的影响（$n=3$）**

3.2.2　小檗碱对肿瘤干细胞凋亡的影响

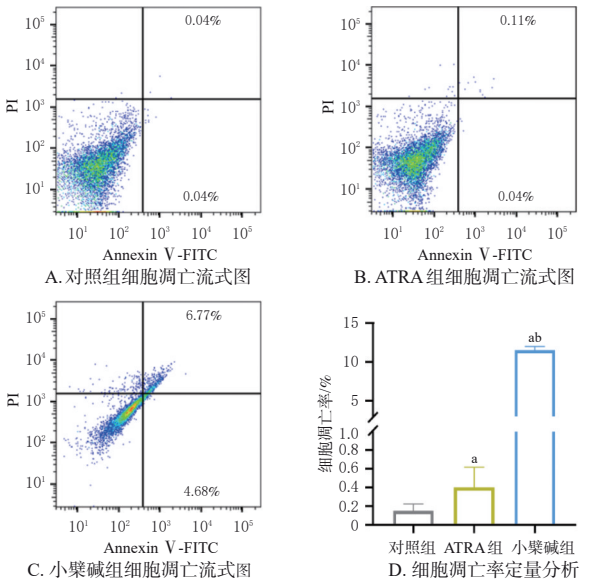
与对照组比较，ATRA组和小檗碱组的肿瘤干细胞凋亡率均显著升高（$P<0.000\ 1$），且小檗碱组的细胞凋亡率显著高于ATRA组（$P<0.000\ 1$）。结果见图4。

3.2.3　小檗碱对肿瘤干细胞分化的影响

与对照组比较，ATRA组和小檗碱组的CD44⁺/CD133⁺细胞比例、SOX2阳性细胞率均显著降低（$P<0.000\ 1$）。ATRA组和小檗碱组的CD44⁺/CD133⁺细胞比例、SOX2阳性细胞率比较差异无统计学意义（$P>0.05$）。结果见图5。

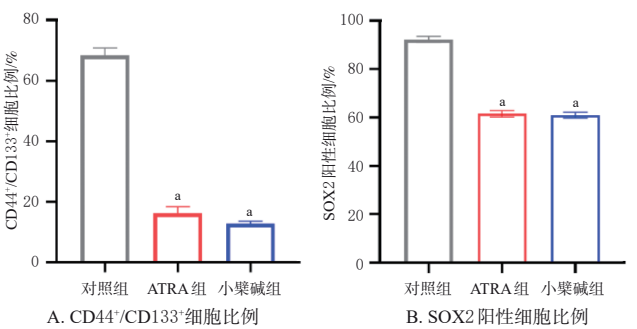
3.2.4　小檗碱对肿瘤干细胞肿瘤球的影响

观察结果显示，对照组肿瘤球体积增大，细胞正常增殖；ATRA组肿瘤球体积没有明显变化；小檗碱组肿瘤球略微皱缩，球体积变小，最外层细胞被破坏，部分细胞死亡。结果见图6。




a：与对照组比较，$P<0.000\ 1$；b：与ATRA组比较，$P<0.000\ 1$。

**图4　小檗碱对肿瘤干细胞凋亡的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）**




a：与对照组比较，$P<0.000\ 1$。

**图5　小檗碱对肿瘤干细胞分化的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）**

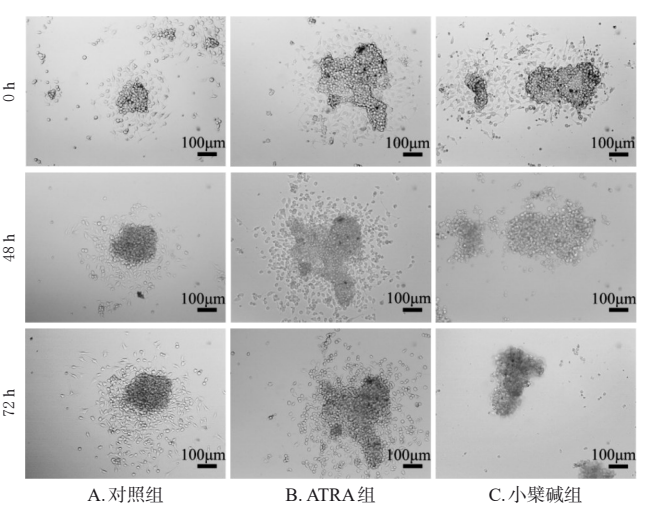
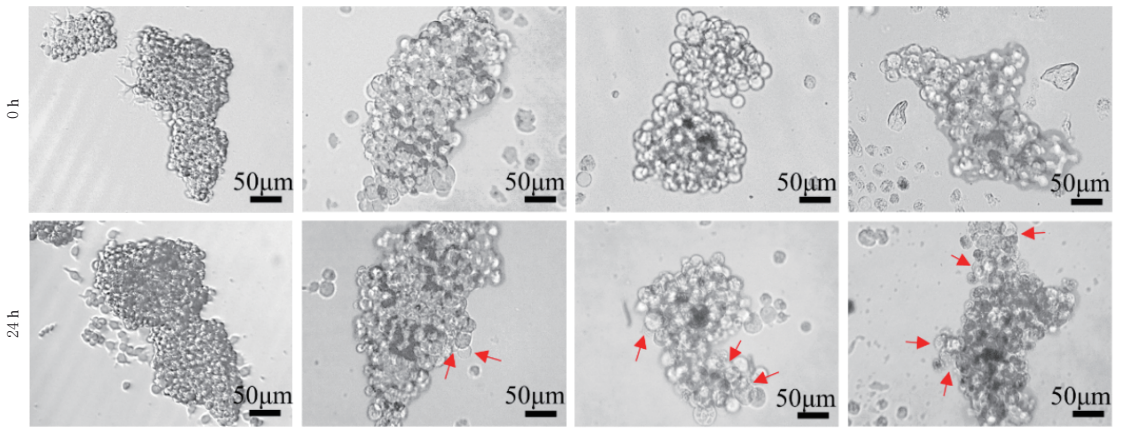



**图6　小檗碱对肿瘤干细胞肿瘤球影响的显微图**

### 3.3　小檗碱对肿瘤干细胞焦亡的影响结果

3.3.1　小檗碱对肿瘤干细胞焦亡形态的影响

经小檗碱处理后的肿瘤干细胞，其最外层细胞膜肿胀，伴随气泡状突出物，即焦亡细胞。结果见图7。




A. 对照组　B. 小檗碱 10 μmol/L 组　C. 小檗碱 20 μmol/L 组　D. 小檗碱 40 μmol/L 组

注：红色箭头代表焦亡细胞。

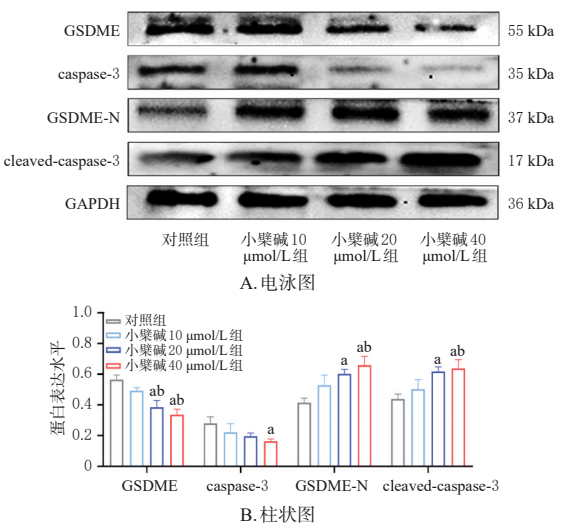
**图 7　小檗碱对肿瘤干细胞焦亡形态影响的显微图**

3.3.2　小檗碱对肿瘤干细胞 LDH 释放的影响

LDH 释放检测结果显示，与小檗碱 10、20 μmol/L 组[(15.93±0.87)%、(18.16±0.87)%]比较，小檗碱 40 μmol/L 组肿瘤干细胞的 LDH 释放率[(23.80±3.10)%]显著增加（$P<0.05$）。

3.3.3　小檗碱对肿瘤干细胞焦亡相关蛋白表达的影响

Western blot 检测结果显示，与对照组比较，小檗碱 20、40 μmol/L 组的 GSDME-N、cleaved-caspase-3 蛋白表达水平均显著增加（$P<0.05$），而 GSDME、caspase-3（小檗碱 20 μmol/L 组除外）蛋白表达水平均显著下降（$P<0.05$）。与小檗碱 10 μmol/L 组比较，小檗碱 20、40 μmol/L 组的 GSDME 蛋白表达水平均显著下降（$P<0.05$），小檗碱 40 μmol/L 组的 GSDME-N、cleaved-caspase-3 蛋白表达水平均显著升高（$P<0.05$）。结果见图 8。




A. 电泳图　B. 柱状图

a：与对照组比较，$P<0.05$；b：与小檗碱 10 μmol/L 组比较，$P<0.05$。

**图 8　小檗碱对肿瘤干细胞焦亡相关蛋白表达的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）**

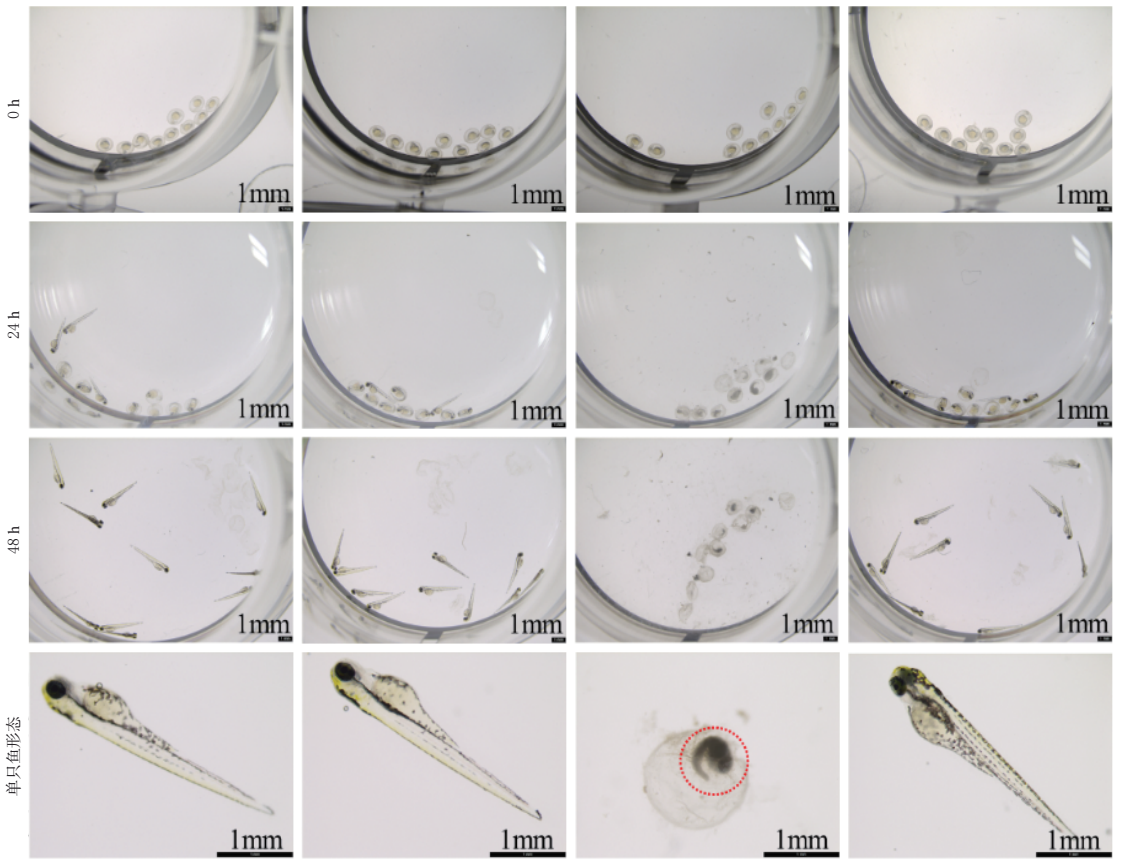
### 3.4　斑马鱼胚胎毒性实验结果

与对照组比较，ATRA 可在 24 h 内诱导斑马鱼受精卵凝固，胚胎死亡率为 100%。相反，经小檗碱处理的斑马鱼胚胎发育几乎未受影响，胚胎存活率达到 100%，且未观察到明显畸形。结果见图 9、图 10。

## 4　讨论

肿瘤干细胞是肿瘤中极小一群具有高度自我更新与致瘤特性的群体，在体内以极少数量即可形成肿瘤，并且涉及肿瘤细胞的异质性、侵袭性和对治疗的耐受性等[1,12]，这些特性使得肿瘤干细胞成为启动、维持肿瘤并使其进一步恶化的关键参与者。

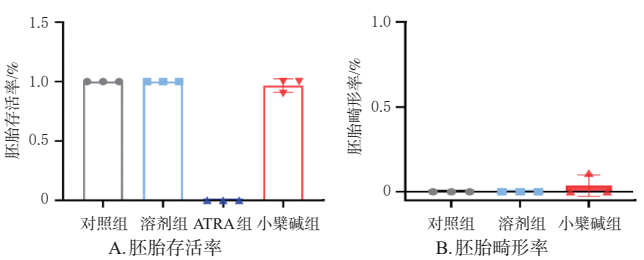
本研究结果显示，在进行抗肿瘤干细胞活性评价过程中，小檗碱对肿瘤干细胞的体外增殖抑制作用较 ATRA 更强。细胞凋亡实验中，ATRA 对肿瘤干细胞的凋亡诱导作用较弱，而经小檗碱处理后的肿瘤干细胞，细胞凋亡率显著升高。细胞分化实验中，小檗碱显著降低了肿瘤干细胞特征蛋白 $CD44^+/CD133^+$ 细胞比例和 SOX2 阳性细胞率，但与同等剂量的分化诱导剂 ATRA 比较，差异无统计学意义（$P>0.05$），表明小檗碱可能具备与 ATRA 相似的诱导分化效应。肿瘤球破坏实验中，与 ATRA 组比较，肿瘤球对小檗碱表现更敏感，球体积变小，部分细胞死亡。以上结果提示，小檗碱可能具有比 ATRA 更强的体内抗肿瘤干细胞活性。同时，经过不同剂量小檗碱处理后，肿瘤干细胞表现出细胞膜肿胀和气泡状突出物特征。LDH 释放检测及 Western blot 实验进一步表明，小檗碱对肿瘤干细胞具有焦亡诱导作用，且在一定浓度范围内，小檗碱的焦亡诱导作用随着浓度的增大而增强；同时，小檗碱处理后细胞内 cleaved-caspase-3、GSDME-N 蛋白表达均上调，GSDME、cas-




A. 对照组　B. 溶剂组　C. ATRA 组　D. 小檗碱组

注：红色圆圈代表受精卵凝固。

**图 9　不同时间点各组斑马鱼胚胎发育情况的显微图**




A. 胚胎存活率　B. 胚胎畸形率

注：符号代表不同组别数据的误差。

**图 10　各组斑马鱼胚胎存活率与畸形率比较柱状图（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）**

pase-3 蛋白表达均下调。caspase-3 是执行细胞凋亡的关键因子，可切割多种底物，对凋亡发生过程有重要作用[13]；GSDME 被活化的 caspase-3 切割后，产生的 GSDME-N 可诱导细胞膜形成孔洞，将非炎性细胞凋亡转化为炎性细胞而焦亡[14]，这种转化有助于原发性和记忆性抗癌免疫原性分子的释放[15—16]，从而对肿瘤微环境产生影响，进而抑制肿瘤生长。

药物处理后斑马鱼胚胎的存活率和畸形率是衡量药物急性毒性的重要生物毒理学指标。在本实验条件下，经 ATRA 和小檗碱处理 24、48 h，小檗碱组的斑马鱼胚胎发育过程中均未见胚胎死亡，也未见发育畸形；而 ATRA 组在处理 24 h 即出现明显的受精卵凝固现象，表明胚胎死亡，说明其严重影响胚胎发育，这与早前的其他研究结果一致[17]。该结果初步表明，中药小分子小檗碱对斑马鱼胚胎无明显毒性，安全性较好。

目前，已有学者在乳腺癌、结直肠癌等多种细胞系中验证了细胞焦亡的存在[18—19]。尽管 *GSDME* 是与焦亡介导的细胞死亡相关的肿瘤抑制基因[20]，但低水平的 GSDME 表达是大多数癌细胞的共同特征[21]，因此，发掘能激活 GSDME 表达的中药小分子非常有前景。

综上所述，小檗碱具有较好的抗肿瘤干细胞增殖活性，其作用机制可能与激活 GSDME、促进细胞焦亡，从而抑制其增殖有关；且小檗碱的体内安全性良好。

## 参考文献

[1] REYA T, MORRISON S J, CLARKE M F, et al. Stem cells, cancer, and cancer stem cells[J]. Nature, 2001, 414: 105-111.

[2] 邬俊，王贵，陈毅，等. 纳米雄黄对 MCF-7 乳腺癌干细胞的体外抑制作用[J]. 中国药房，2022，33(4)：473-480.
WU J, WANG G, CHEN Y, et al. *In vitro* inhibitory effects of realgar nanoparticles on MCF-7 breast cancer stem cells[J]. China Pharm, 2022, 33(4): 473-480.

[3] FANG D, NGUYEN T K, LEISHEAR K, et al. A tumori-

genic subpopulation with stem cell properties in melanomas[J]. Cancer Res,2005,65(20):9328-9337.

[4] SHEN S Y,XU X,LIN S Q,et al. A nanotherapeutic strategy to overcome chemotherapeutic resistance of cancer stem-like cells[J]. Nat Nanotechnol,2021,16(1):104-113.

[5] SHI S J,HAN L,GONG T,et al. Systemic delivery of microRNA-34a for cancer stem cell therapy[J]. Angew Chem Int Ed,2013,52(14):3901-3905.

[6] SUN Y F,ZHOU Q Q,CHEN F M,et al. Berberine inhibits breast carcinoma proliferation and metastasis under hypoxic microenvironment involving gut microbiota and endogenous metabolites[J]. Pharmacol Res,2023,193:106817.

[7] 李俊平,吴春芝,岳文,等. 小檗碱的临床新用途及新剂型研究进展[J]. 中国药房,2016,27(22):3154-3158.
LI J P,WU C Z,YUE W,et al. Research progress on new clinical uses and new dosage forms of berberine[J]. China Pharm,2016,27(22):3154-3158.

[8] ZHANG Z B,ZHANG Y,XIA S Y,et al. Gasdermin E suppresses tumour growth by activating anti-tumour immunity[J]. Nature,2020,579(7799):415-420.

[9] KANUNGO J,CUEVAS E,ALI S F,et al. Zebrafish model in drug safety assessment[J]. Curr Pharm Des,2014,20(34):5416-5429.

[10] DIAS CÂMARA D A,LUIZ DE SÁ JUNIOR P,ALEXANDRE DE AZEVEDO R,et al. Identification of very small cancer stem cells expressing hallmarks of pluripotency in B16F10 melanoma cells and their reoccurrence in B16F10-derived clones[J]. Exp Cell Res,2020,391(2):111938.

[11] ZHAO Z Y,ZENG J H,GUO Q,et al. Berberine suppresses stemness and tumorigenicity of colorectal cancer stem-like cells by inhibiting $m^6A$ methylation[J]. Front Oncol,2021,11:775418.

[12] SAYGIN C,MATEI D,MAJETI R,et al. Targeting cancer stemness in the clinic:from hype to hope[J]. Cell Stem Cell,2019,24(1):25-40.

[13] WU Y Q,ZHUANG J B,ZHAO D,et al. Interaction between caspase-3 and caspase-5 in the stretch-induced programmed cell death in the human periodontal ligament cells[J]. J Cell Physiol,2019,234(8):13571-13581.

[14] YU P,ZHANG X,LIU N,et al. Pyroptosis:mechanisms and diseases[J]. Signal Transduct Target Ther,2021,6(1):128.

[15] WANG Q Y,WANG Y P,DING J J,et al. A bioorthogonal system reveals antitumour immune function of pyroptosis[J]. Nature,2020,579(7799):421-426.

[16] ROGERS C,ERKES D A,NARDONE A,et al. Gasdermin pores permeabilize mitochondria to augment caspase-3 activation during apoptosis and inflammasome activation [J]. Nat Commun,2019,10(1):1689.

[17] RHINN M,DOLLÉ P. Retinoic acid signalling during development[J]. Development,2012,139(5):843-858.

[18] KIM M S,LEBRON C,NAGPAL J K,et al. Methylation of the DFNA5 increases risk of lymph node metastasis in human breast cancer[J]. Biochem Biophys Res Commun,2008,370(1):38-43.

[19] WANG Y B,YIN B,LI D N,et al. GSDME mediates caspase-3-dependent pyroptosis in gastric cancer[J]. Biochem Biophys Res Commun,2018,495(1):1418-1425.

[20] BEECK K O D,VAN CAMP G,THYS S,et al. The DFNA5 gene,responsible for hearing loss and involved in cancer,encodes a novel apoptosis-inducing protein[J]. Eur J Hum Genet,2011,19(9):965-973.

[21] 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.

(收稿日期:2024-01-04 修回日期:2024-03-19)
(编辑:舒安琴)