

doi:10.13407/j.cnki.jpp.1672-108X.2020.01.001

· 论 著 ·

## 盐酸小檗碱增敏柔红霉素诱导儿童急性淋巴细胞白血病原代细胞凋亡作用的研究

杨李<sup>1</sup>, 李娇娇<sup>2</sup>, 程衍杨<sup>2</sup>, 卢文婕<sup>1</sup>, 王卓<sup>1</sup>, 陶芳<sup>1</sup>, 聂应明<sup>1</sup>, 范琛<sup>1</sup>, 李建新<sup>1</sup>, 熊昊<sup>1</sup> (1. 华中科技大学同济医学院附属武汉儿童医院, 湖北武汉 430016; 2. 武汉大学人民医院, 湖北武汉 430070)

**[摘要]**目的:探讨盐酸小檗碱(BBR)增敏柔红霉素(DNR)诱导儿童急性淋巴细胞白血病原代细胞(P-ALLCs)凋亡的作用及相关机制。方法:收集初诊初治的急性淋巴细胞白血病(ALL)儿童骨髓标本 12 例,分离单个核细胞,按活细胞数  $2 \times 10^5/\text{mL}$  接种于含 20% 小牛血清 1640 的 96 孔培养板,培养 4 h 后按照设定 DNR 4 个浓度和 BBR 3 个浓度单药及交叉联合应用方案加入不同体积的 PBS 稀释 DNR 和 BBR 储备液培养干预 24 h,采用 cell counting kit-8 assay (CCK-8)检测 DNR 和 BBR 单药作用以及两者联合作用对 P-ALLCs 增殖的抑制作用。结果:DNR 单药作用时抑制率为  $(11.56\% \pm 0.73\%) \sim (59.60\% \pm 2.80\%)$ ,随着 DNR 浓度的增加,P-ALLCs 的增殖抑制逐渐增强,且后一浓度与前一浓度比较差异均有统计学意义( $P$  均  $< 0.05$ );BBR 单药作用时抑制率为  $(12.39\% \pm 1.50\%) \sim (39.75\% \pm 2.43\%)$ ,随着 BBR 浓度的增加,P-ALLCs 的增殖抑制逐渐增强,且后一浓度与前一浓度比较差异均有统计学意义( $P$  均  $< 0.05$ );DNR 联合 BBR 时的抑制率为  $(18.43\% \pm 1.11\%) \sim (89.96\% \pm 1.40\%)$ 。在 4 个联合用药组中,随着 BBR 浓度的增加,对 P-ALLCs 的增殖抑制逐渐增强( $P$  均  $< 0.05$ ),而且每一组中 DNR 联合 BBR 后的抑制率比 DNR 单药作用强( $P$  均  $< 0.05$ )。结论:DNR 和 BBR 对儿童 P-ALLCs 均有细胞毒性作用并成浓度依赖性。两药联合作用时 BBR 可以增加 P-ALLCs 对 DNR 的敏感性,该作用与浓度有一定的相关性。

**[关键词]** 儿童;急性淋巴细胞白血病;原代细胞;盐酸小檗碱;柔红霉素;凋亡

**[中图分类号]** R725.5

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1672-108X(2020)01-0001-03

### Effects of Berberine Enhance on Daunorubicin-Induced Apoptosis of Primary Acute Lymphoblastic Leukemia Cells in Children

Yang Li<sup>1</sup>, Li Jiaojiao<sup>2</sup>, Cheng Yanyang<sup>2</sup>, Lu Wenjie<sup>1</sup>, Wang Zhuo<sup>1</sup>, Tao Fang<sup>1</sup>, Nie Yingming<sup>1</sup>, Fan Jing<sup>1</sup>, Li Jianxin<sup>1</sup>, Xiong Hao<sup>1</sup> (1. Wuhan Children's Hospital of Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Hubei Wuhan 430016, China; 2. Renmin Hospital of Wuhan University, Hubei Wuhan 430070, China)

**[Abstract]** **Objective:** To probe into the effects of berberine (BBR) enhance on daunorubicin (DNR)-induced apoptosis of primary acute lymphoblastic leukemia cells (P-ALLCs) in children and the related mechanism. **Methods:** Bone marrow samples were collected from 12 children newly diagnosed with acute lymphoblastic leukemia (ALL), mononuclear cells were isolated,  $2 \times 10^5/\text{mL}$  living cells was inoculated in the 96-well culture plate containing 20% calf serum 1640. After culture for 4 h, different volumes of PBS were added to dilute DNR and BBR stock solutions according to the single drug and cross-combination application scheme of concentration of 4 DNR and 3 BBR for 24 h of culture intervention. Cell counting kit-8 assay (CCK-8) was used to detect the single drug effects of DNR and BBR and the combination effects on the inhibition of P-ALLCs proliferation. **Results:** The inhibition rate of DNR was  $(11.56\% \pm 0.73\%)$  to  $(59.60\% \pm 2.80\%)$ , with the increase of DNR concentration, the proliferation inhibition of P-ALLCs increased, and the difference between the latter concentration and the previous concentration was statistically significant ( $P < 0.05$ ). The inhibition rate of BBR was  $(12.39\% \pm 1.50\%)$  to  $(39.75\% \pm 2.43\%)$ , with the increase of BBR concentration, the proliferation inhibition of P-ALLCs increased, and the difference between the latter concentration and the previous concentration was statistically significant ( $P < 0.05$ ). The inhibition rate of DNR combined with BBR was  $(18.43\% \pm 1.11\%)$  to  $(89.96\% \pm 1.40\%)$ . In the four combined groups, the proliferation inhibition of P-ALLCs increased with the increase of BBR concentration ( $P < 0.05$ ), and the inhibition rate of DNR combined with BBR in each group was stronger than that of DNR alone ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Both DNR and BBR shows cytotoxic effects and concentration dependence on P-ALLCs in children. BBR can increase the sensitivity of P-ALLCs to DNR, and the effect is related to the concentration.

**[Keywords]** children; acute lymphoblastic leukemia; primary cells; berberine; daunorubicin; apoptosis

儿童急性淋巴细胞白血病(acute lymphoblastic leukemia, ALL)是儿童发病率最高的恶性肿瘤,随着多药联合化疗方案的不断改进以及划分危险度分层的个体化治疗,儿

童 ALL 治疗效果得到了显著提高,5 年生存率可达 80%~90%,但是仍有 8%~20% 的 ALL 患儿在化疗期间复发导致治疗失败<sup>[1-5]</sup>。儿童 ALL 复发的机制涉及众多信号

**基金项目:**湖北省科技厅面上项目,编号 2012FFB05302;武汉市卫生计生委临床研究课题项目,编号 WX13B19。

**作者简介:**杨李(1980.02-),男,硕士,主管技师,主要从事免疫相关临床检验工作,E-mail: yanglilifangbaby@163.com。

**通讯作者:**熊昊(1976.09-),男,博士,主任医师,主要从事儿童血液肿瘤病的移植治疗研究,E-mail: 22587481@qq.com。

通路调控异常,最终导致 ALL 细胞对化疗药物耐药使临床治疗失败,因此,提高 ALL 细胞对目前所用化疗药物的敏感性可能是降低复发率的有效途径之一。盐酸小檗碱(berberine, BBR)是一种从中药黄连中提取的生物碱,众多研究表明 BBR 能影响肿瘤细胞基因和信号通路,对肿瘤细胞的生长和增殖产生影响。本研究拟探讨儿童急性淋巴细胞白血病原代细胞(primary acute lymphoblastic leukemia cells, P-ALLCs)中 BBR 是否能提高 ALL 细胞对柔红霉素( daunorubicin, DNR)的敏感性,为提高儿童 ALL 临床化疗效果、降低 ALL 耐药探索新的治疗模式。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

注射用 DNR 购自美国 Pfizer 公司, BBR 购自美国 Sigma 公司, 均用 PBS 溶解为储备液后过滤除菌, -20 °C 保存备用。CCK-8 试剂盒为日本同仁化学研究所产品, 按照说明书操作。

#### 1.2 细胞培养及药物处理

选取 2013 年 3 月至 2014 年 7 月武汉市儿童医院收治的 ALL 患儿 12 例, 其中男 7 例, 女 5 例, 平均年龄 4 岁 5 个月。抽取初诊初治 ALL 患儿的骨髓 2 ~ 3 mL, 用淋巴细胞分离液在生物安全柜中无菌分离 P-ALLCs, 台盼蓝染色计数活细胞后调整细胞浓度至  $2 \times 10^5$  /mL, 接种于 96 孔培养板, 用含 20% 小牛血清的 1640 培养, 添加不同浓度药物培养干预 24 h 后采用细胞计数试剂盒 CCK-8 检测细胞增殖抑制情况。药物分组如下:

DNR 单药组: (1) DNR 0.05 mg/L; (2) DNR 0.10 mg/L; (3) DNR 0.50 mg/L; (4) DNR 1.00 mg/L。

BBR 单药组: (1) BBR 10  $\mu$ M; (2) BBR 50  $\mu$ M; (3) BBR 100  $\mu$ M。

DNR 联合 BBR 药物组: (1) DNR 0.05 mg/L 联合 BBR 各浓度组, ① DNR 0.05 mg/L + BBR 10  $\mu$ M; ② DNR 0.05 mg/L + BBR 50  $\mu$ M; ③ DNR 0.05 mg/L + BBR 100  $\mu$ M。(2) DNR 0.10 mg/L 联合 BBR 各浓度组, ① DNR 0.10 mg/L + BBR 10  $\mu$ M; ② DNR 0.10 mg/L + BBR 50  $\mu$ M; ③ DNR 0.10 mg/L + BBR 100  $\mu$ M。(3) DNR 0.50 mg/L 联合 BBR 各浓度组, ① DNR 0.50 mg/L + BBR 10  $\mu$ M; ② DNR 0.50 mg/L + BBR 50  $\mu$ M; ③ DNR 0.50 mg/L + BBR 100  $\mu$ M。(4) DNR 1.00 mg/L 联合 BBR 各浓度组, ① DNR 1.00 mg/L + BBR 10  $\mu$ M; ② DNR 1.00 mg/L + BBR 50  $\mu$ M; ③ DNR 1.00 mg/L + BBR 100  $\mu$ M。每个药物浓度设 3 个复孔。

#### 1.3 CCK-8 检测 P-ALLCs 增殖情况

药物作用 24 h 后, 在倒置显微镜下对 P-ALLCs 进行形态学观察, 并用 CCK-8 法检测细胞增殖情况, 按照“生长抑制率 = (1 - 实验组 A / 对照组 A)  $\times$  100%”计算各药物组生长抑制率, 以药物的不同浓度为横轴, 以抑制率为纵轴, 绘制生长抑制率曲线图。

#### 1.4 统计学方法

应用 SPSS 17.0 统计软件, 计数资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间比较采用方差分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 2 结果

结果见表 1 和图 1、图 2。随着 DNR 和 BBR 单药浓度的增加以及两者联合应用时浓度的分别增加, 对 P-ALLCs 的生长抑制作用逐渐增强, 差异均有统计学意义 ( $P$  均  $< 0.05$ )。本研究结果提示, DNR、BBR 对 P-ALLCs 均有毒性作用, 且呈剂量依赖性。两者联合应用后, 对细胞的抑制作用更明显, 且 BBR 可以显著增强 DNR 诱导 P-ALLCs 凋亡作用。

表 1 不同浓度 DNR、BBR 以及两者联合用药对

组别	P-ALLCs 增殖的抑制率 %				
	DNR 0 mg/L	DNR 0.05 mg/L	DNR 0.10 mg/L	DNR 0.50 mg/L	DNR 1.00 mg/L
BBR 0 $\mu$ M	0	11.56 $\pm$ 0.73	26.16 $\pm$ 2.91	39.91 $\pm$ 1.88	59.60 $\pm$ 2.80
BBR 10 $\mu$ M	12.39 $\pm$ 1.50	18.43 $\pm$ 1.11	27.25 $\pm$ 1.93	46.67 $\pm$ 1.64	70.85 $\pm$ 0.93
BBR 50 $\mu$ M	25.61 $\pm$ 3.00	30.77 $\pm$ 2.53	38.65 $\pm$ 1.68	71.91 $\pm$ 5.08	80.28 $\pm$ 1.98
BBR 100 $\mu$ M	39.75 $\pm$ 2.43	46.58 $\pm$ 3.06	53.12 $\pm$ 3.13	79.32 $\pm$ 1.60	89.96 $\pm$ 1.40

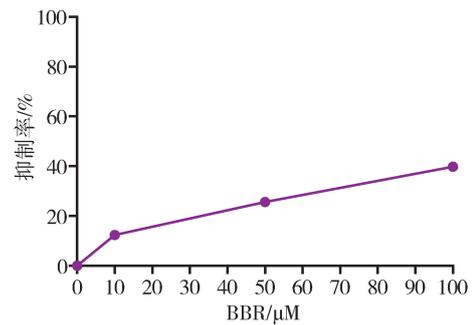


图 1 不同浓度的 BBR 对 P-ALLCs 的增殖抑制作用曲线

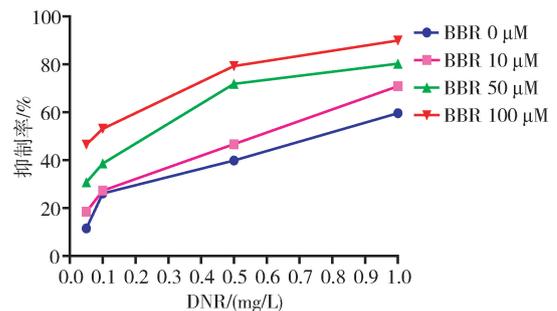


图 2 不同浓度的 DNR 联合不同浓度的 BBR 对 P-ALLCs 的增殖抑制作用曲线

### 3 讨论

急性淋巴细胞白血病(ALL)是儿童时期最常见的血液系统恶性肿瘤, 约占儿童肿瘤性疾病的 30%<sup>[1-2]</sup>。随着以多药联合为基础, 根据危险度分级制定个体化化疗方案的不断改进, 儿童 ALL 的 5 年生存率已达到 80%<sup>[3-5]</sup>, 但是仍有部分患儿对化疗反应欠佳, 白血病细胞对化疗药物的耐药可能是 ALL 复发的主要原因<sup>[6]</sup>, 因此提高 ALL 细胞对化疗药物的敏感性一直是临床研究

的热点。

盐酸小檗碱 (BBR) 是一种从中药黄连中提取的生物碱, 目前主要用于治疗细菌性肠炎, 具有较高的安全性。近年来多项研究表明, 在人类多种肿瘤细胞系中, BBR 表现出抑制细胞增殖, 促进细胞凋亡的抗肿瘤效应<sup>[7-11]</sup>。体外细胞研究表明, BBR 可以通过阻滞细胞周期诱导多种肿瘤细胞凋亡<sup>[12-13]</sup>, 也可以通过调控 IκB 酶的活化, 抑制 NF-κB 的激活, 从而促进细胞凋亡<sup>[14]</sup>。在肺癌细胞中, BBR 可以通过提高细胞自噬而增加肿瘤对放疗的敏感性<sup>[15]</sup>。BBR 还可以抑制血管生长而抑制胃癌细胞 SC-M1 细胞的增殖<sup>[16]</sup>。

针对 BBR 抗肿瘤作用的研究大多来自肿瘤细胞系, 对于原代细胞的研究较少。儿童急性白血病的发生机制和流行病学及预后与成人有很大的区别, 有关 BBR 对儿童 B-ALL 原代细胞的抗肿瘤研究报道较少, BBR 联合 DNR 对儿童 B 淋巴细胞白血病 (B-ALL) 原代细胞增殖的抑制效果也未见深入研究。BBR 及其衍生物具有多种抗肿瘤活性以及增加细胞膜通透性等作用, 与长春新碱、吴茱萸碱、塔斯品碱有协同抗肿瘤作用<sup>[11, 17-18]</sup>。本研究通过收集临床儿童初诊 ALL 骨髓标本, 提取原代白血病细胞, 分别给予不同浓度的传统化疗药物 DNR 及 BBR 干预, 以及两者联合干预后, 用 CCK-8 方法检测细胞的增殖抑制情况。结果表明, 在儿童 P-ALLCs 中, 随着 DNR 浓度的增加 (0.05 ~ 1.00 mg/L), 细胞被抑制的程度增强, BBR 同样如此, 当 DNR 联合 BBR 作用 P-ALLCs 时, 细胞被抑制的程度更强, 且随着联合药物浓度的增加, 抑制作用越明显, 说明 BBR 不仅本身具有对 P-ALLCs 的毒性作用, 还可以增强 P-ALLCs 对传统化疗药物 DNR 的敏感性。

本研究还发现, 传统化疗药物 DNR 在较高浓度时表现出对 P-ALLCs 较高的细胞毒性作用, 而联合 BBR 作用 P-ALLCs 后在较低浓度即可表现出较强的细胞毒性作用。本研究结果显示, 在 0.05 mg/L 的 DNR 联合 100 μM 的 BBR 时即可达到 0.50 mg/L DNR 同样的抑制率; 在 0.50 mg/L 的 DNR 联合 50 μM 的 BBR 时即可达到 1.00 mg/L DNR 联合 10 μM BBR 时同样的抑制率。此结果说明 BBR 可以增强 P-ALLCs 对传统化疗药物的敏感性, 在一定程度上或许可以降低传统化疗药物的作用浓度, 减少化疗药物的毒副作用, 这在儿童群体中的意义更大。但是 BBR 又是如何抑制儿童 P-ALLCs 的生长, 由于本研究没有进行 BBR 诱导 P-ALLCs 的凋亡检测, 所以 BBR 在抑制 P-ALLCs 的同时是否导致了 P-ALLCs 的凋亡, 以及 BBR 对肿瘤细胞的更深层次作用机制尚需进一步研究。体内实验较体外实验有更多的影响因素, 体内实验中 BBR 的效果及毒副反应亦需要更多的实验研究进一步证实。

参考文献:

[1] INABA H, GREAVES M, MULLIGHAN C G. Acute lymphoblastic leukaemia [J]. Lancet, 2013, 381(9881): 1943-1955.

[2] LO NIGRO L. Biology of childhood acute lymphoblastic leukemia [J]. J Pediatr Hematol Oncol, 2013, 35(4): 245-252.

[3] PUI C H, WILLIAM E E. A 50-year journey to cure childhood acute lymphoblastic leukemia [J]. Semin Hematol, 2013, 50(3): 185-196.

[4] PUI C H, CAMPANA D, PEI D, et al. Treating childhood acute lymphoblastic leukemia without cranial irradiation [J]. N Engl J Med, 2009, 360(26): 2730-2741.

[5] 高怡瑾. 儿童急性淋巴细胞白血病治疗方案演进[J]. 儿科药理学杂志, 2009, 15(2): 1-2.

[6] YANG J J, CHENG C, DEVIDAS M, et al. Genome-wide association study identifies germline polymorphisms associated with relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia [J]. Blood, 2012, 120(20): 4197-4204.

[7] CHOI M S, YUK D Y, OH J H, et al. Berberine inhibits human neuroblastoma cell growth through induction of p53-dependent apoptosis [J]. Anticancer Res, 2008, 28(6A): 3777-3784.

[8] CHOI M S, OH J H, KIM S M, et al. Berberine inhibits p53-dependent cell growth through induction of apoptosis of prostate cancer cells [J]. Int J Oncol, 2009, 34(5): 1221-1230.

[9] KATIYAR S K, MEERAN S M, KATIYAR N, et al. p53 cooperates berberine-induced growth inhibition and apoptosis of non-small cell human lung cancer cells in vitro and tumor xenograft growth in vivo [J]. Mol Carcinog, 2009, 48(1): 24-37.

[10] ZHANG X L, GU L B, LI J S, et al. Degradation of MDM2 by the interaction between berberine and DAXX Leads to potent apoptosis in MDM2-overexpressing cancer cells [J]. Cancer Res, 2010, 70(23): 9895-9904.

[11] 牟凤林, 郝坡, 肖忠华, 等. 小檗碱诱导肿瘤细胞凋亡分子机制研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2018(23): 2964-2966.

[12] SUN Y, XUN K, WANG Y, et al. A systematic review of the anticancer properties of berberine, a natural product from Chinese herbs [J]. Anticancer drugs, 2009, 20(9): 757-769.

[13] 周杰彬, 邓春梅, 施晓柯, 等. 原小檗碱衍生物诱导急性淋巴白血病细胞凋亡活性及 PAMPA 研究[J]. 中山大学学报 (自然科学版), 2016, 55(5): 66-72.

[14] PANDEY M K, SUNG B, KUNNUMAKKARA A B, et al. Berberine modifies cysteine 179 of IκBα kinase, suppresses nuclear factor-κB-regulated antiapoptotic gene products, and potentiates apoptosis [J]. Cancer Res, 2008, 68(13): 5370-5379.

[15] PENG P L, KUO W H, TSENG H C, et al. Synergistic tumor-killing effect of radiation and berberine combined treatment in lung cancer: the contribution of autophagic cell death [J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2008, 70(2): 529-542.

[16] LIN S, TSAI S C, LEE C C, et al. Berberine inhibits HIF-1α expression via enhanced proteolysis [J]. Mol Pharmacol, 2004, 66(3): 612-619.

[17] 张龙, 史明星, 刘金凤, 等. 小檗碱衍生物的合成及其药理活性研究进展[J]. 国际药学研究杂志, 2018, 45(5): 325-332.

[18] 李钧. 小檗碱抗肿瘤研究进展[J]. 黑龙江科技信息, 2017(14): 119-120.

(编辑:杨丹)

(收稿日期:2019-01-24 修回日期:2019-02-27)