

引用:王伟,周望潮,谢彪.补中益气加味方对裸鼠结直肠癌移植瘤Klotho蛋白及Caspase-1、IL-1 $\beta$ 、IL-18表达的影响[J].中医药导报,2025,31(12):14-19.

# 补中益气加味方对裸鼠结直肠癌移植瘤 Klotho蛋白及Caspase-1、IL-1 $\beta$ 、 IL-18表达的影响\*

王伟<sup>1</sup>,周望潮<sup>2</sup>,谢彪<sup>1</sup>

(1.湖南中医药大学第二附属医院,湖南长沙 410005;

2.湖南中医药大学,湖南长沙 410208)

[摘要] 目的:探讨补中益气加味方通过调控Klotho蛋白及细胞焦亡抑制结直肠癌移植瘤生长的作用机制。方法:建立HCT116人结直肠癌细胞裸鼠移植瘤模型,15 d成模后随机分为模型组、氟尿嘧啶(5-FU)组、补中益气加味方组、Klotho组、补中益气加味方+Klotho组,分别给予生理盐水、5-FU(25 mg/kg)、补中益气加味方(53.43 g/kg)、外源性Klotho蛋白(0.01 mg/kg)和联合使用补中益气加味方及外源性Klotho蛋白。连续干预12 d,在第0天、4天、8天、12天时测定瘤体体积,第12天测定瘤体质量,HE染色观察组织病理,免疫组化法检测肿瘤组织中Klotho、胱天蛋白酶-1(Caspase-1)、白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )和IL-18的表达水平。结果:与模型组相比,5-FU组、补中益气加味方组、Klotho组、补中益气加味方+Klotho组的裸鼠移植瘤质量明显降低( $P<0.01$ 或 $P<0.05$ )。在药物治疗后的第4天、第8天和第12天,5-FU组、补中益气加味方组、Klotho组和补中益气加味方+Klotho组的裸鼠移植瘤体积明显小于模型组( $P<0.01$ ),各治疗组治疗后的移植瘤体积增大幅度均低于模型组。HE染色显示治疗后切片可见细胞核固缩,胞质空泡化,细胞排列疏松,间质胶原纤维增生。免疫组化结果显示5-FU组、补中益气加味方组、Klotho组和补中益气加味方+Klotho组的裸鼠移植瘤Klotho表达高于模型组( $P<0.01$ 或 $P<0.05$ ),补中益气加味方组、Klotho组和补中益气加味方+Klotho组的Caspase-1、IL-1 $\beta$ 和IL-18表达低于模型组( $P<0.01$ 或 $P<0.05$ )。结论:补中益气加味方可有效抑制裸鼠结直肠癌移植瘤生长,其机制可能与上调Klotho表达、抑制Caspase-1依赖性细胞焦亡及降低促炎因子IL-1 $\beta$ 和IL-18的释放有关。

[关键词] 结直肠癌;补中益气加味方;Klotho;细胞焦亡;胱天蛋白酶-1;白细胞介素-1 $\beta$ ;白细胞介素-18;裸鼠

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1672-951X(2025)12-0014-06

DOI:10.13862/j.cn43-1446/r.2025.12.003

## Study on the Effects of Modified Buzhong Yiqi Formula (补中益气加味方) on the Expression of Klotho and Caspase-1, IL-1 $\beta$ and IL-18 in Transplanted Colon Cancer Tumors of Nude Mice

WANG Wei<sup>1</sup>, ZHOU Wangchao<sup>2</sup>, XIE Biao<sup>1</sup>

(1.The Second Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha Hunan 410005, China;

2.Hunan University of Chinese Medicine, Changsha Hunan 410208, China)

[Abstract] Objective: To explore the mechanism of action of the modified Buzhong Yiqi formula in inhibiting the growth of colorectal cancer xenografts by regulating Klotho protein and pyroptosis. Methods: A nude mouse xenograft model was established using HCT116 human colorectal cancer cells. After 15 days of model establishment, the mice were randomly divided into model group, fluorouracil group (5-FU group), modified Buzhong Yiqi formula group, Klotho group, and modified Buzhong Yiqi formula + Klotho group. The treatments administered included normal saline, 5-FU (25 mg/kg), modified Buzhong Yiqi formula (53.43 g/kg), exogenous Klotho (0.01 mg/kg), and a combination of modified Buzhong Yiqi formula and exogenous Klotho. Continuous intervention lasted for 12 days. Tumor volume was measured on day 0, day 4, day 8 and day 12. The tumor mass was measured on the 12<sup>th</sup> day, and tissue pathology through was observed by HE staining. The expression

\*基金项目:国家自然科学基金项目(82374545);袁长津全国名中医传承工作室建设项目

通信作者:谢彪,男,主任医师,研究方向为结直肠癌临床与基础研究

levels of Klotho, Caspase-1, IL-1 $\beta$ , and IL-18 in tumor tissue were assessed using immunohistochemistry. Results: Compared to the model group, the tumor masses of nude mice decreased significantly in the 5-FU group, modified Buzhong Yiqi formula group, Klotho group, and modified Buzhong Yiqi formula + Klotho group ( $P<0.01$  or  $P<0.05$ ). On the 4<sup>th</sup>, 8<sup>th</sup> and 12<sup>th</sup> days post-treatment, the 5-FU group, modified Buzhong Yiqi formula group, Klotho group, and modified Buzhong Yiqi formula + Klotho group showed lower tumor volumes than model group ( $P<0.01$ ). The increase in transplanted tumor volume after treatment was lower in all treatment groups than in the model group. HE staining showed that in the post-treatment sections, there was nuclear shrinkage, cytoplasmic vacuolation, loose cell arrangement, and increased collagen fibers in the interstitium. Immunohistochemical results demonstrated that the 5-FU group, modified Buzhong Yiqi formula group, Klotho group, and modified Buzhong Yiqi formula + Klotho group showed higher expression of Klotho than model group ( $P<0.01$  or  $P<0.05$ ), and that the modified Buzhong Yiqi formula group, Klotho group, and modified Buzhong Yiqi formula + Klotho group showed lower expressions of Caspase-1, IL-1 $\beta$  and IL-18 than model group ( $P<0.01$  or  $P<0.05$ ). Conclusion: The modified Buzhong Yiqi formula can effectively inhibit the growth of colorectal cancer xenografts in nude mice. Its mechanism may be related to the up-regulation of Klotho expression, inhibition of Caspase-1-dependent pyroptosis, and reduction in the release of pro-inflammatory factors (IL-1 $\beta$  and IL-18).

[Keywords] colorectal cancer; modified Buzhong Yiqi formula; Klotho; pyroptosis of cells; Caspase-1; IL-1 $\beta$ ; IL-18; nude mice

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)在全球范围内仍然是一个重大的公共卫生问题,已成为全球范围内发病率(排名第三)及病死率(排名第二)极高的恶性肿瘤之一<sup>[1-2]</sup>。CRC的当前治疗策略主要包括针对局部病灶的手术切除及辅助化疗,其中化疗通常基于氟尿嘧啶(5-FU)方案为中心。然而在晚期阶段,患者总体5年生存率大幅下降,特别是IV期患者的生存率低至9%~12%<sup>[3]</sup>。常规癌症治疗的副作用会显著降低患者的生活质量,因此临床研究越来越注重提高治疗效果的并尽量减少不良反应<sup>[4]</sup>。研究表明<sup>[5]</sup>,长期的中医药治疗能够明显改善肝局限性转移的结直肠癌患者的总体生存结局。一些中草药化合物在增强治疗效果和减轻与化疗相关的副作用方面具有功效,例如减少化疗引起的恶心、疼痛和其他使人衰弱的副作用<sup>[6]</sup>。与单纯化疗相比,中药与5-FU为基础的方案联合使用可产生更高的肿瘤反应率<sup>[6]</sup>。

补中益气加味方是课题组传承全国名老中医袁长津教授治疗结直肠癌的经验,结合大量的临床样本观察所得的中药方,我们发现应用补中益气汤加味方治疗结直肠癌患者,治以补气养血、健脾利湿、行气化瘀解毒,能够明显改善患者的生存质量,延长患者生存时间。本课题组前期预实验表明本方具有明显的抗肿瘤作用,实验得到补中益气加味方对于裸鼠的最佳给药剂量为53.43 g/kg<sup>[7]</sup>。

Klotho蛋白已成为各种类型肿瘤中的关键角色,特别是在CRC中,常发现Klotho有异常表达。研究表明,与正常结肠黏膜上皮细胞相比,Klotho的表达通常会降低,并且这种下调与KLOTHO基因的反向甲基化增加有关,其中86%的肿瘤组织表现出KLOTHO启动子甲基化,而相邻正常组织中仅为14%,这表明在癌症病理学中该肿瘤抑制基因存在显著的表观遗传沉默<sup>[8]</sup>。此外,研究发现Klotho可通过抑制炎症介质的释放、促进细胞凋亡、抑制癌细胞的有氧糖酵解等途径发挥抑癌作

用<sup>[9]</sup>。可见,Klotho是治疗CRC的潜在靶点。

细胞焦亡被认为是一种由胱天蛋白酶(Caspase)调控的程序性细胞死亡形式,其特征为细胞肿胀、膜破裂及促炎细胞因子的释放,显著影响肿瘤微环境和癌症进展。其发生过程常伴随成熟炎症因子白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )和IL-18的释放<sup>[10]</sup>。慢性炎症环境会促进基因组不稳定性,增强血管生成,并创造一个有利于肿瘤进展和转移的微环境,从而支持肿瘤的生长和扩散<sup>[11-12]</sup>。在肿瘤的背景下,Klotho可能与导致细胞焦亡的炎症过程相互作用。Klotho的下调可能会加剧炎症,并有可能增加肿瘤细胞在应对细胞应激因素时发生细胞焦亡的易感性<sup>[13]</sup>。Klotho可能会潜在地影响这些细胞焦亡途径,从而对肿瘤生存能力和炎症反应产生不同的影响<sup>[14]</sup>。在癌症疾病中,炎症和细胞应激通常会升高,在这些情况下对Klotho的调节可能为治疗干预提供一条途径。通过操纵Klotho表达或其下游信号传导效应,或许能够调整肿瘤细胞中的细胞焦亡反应。

本研究通过建立裸鼠结直肠癌移植瘤模型,检测补中益气加味方干预后肿瘤细胞内Klotho及细胞焦亡相关蛋白Caspase-1、IL-1 $\beta$ 和IL-18的表达情况,探究其是否能通过调控Klotho及细胞焦亡相关通路发挥抗肿瘤的作用。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** 4~5周龄SPF级BALB/c nude裸鼠30只,体质量( $20\pm2$ )g,雌雄各半,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供[实验动物生产许可证号:SCXK(湘)2019-0002],实验动物质量合格证号:430727241102273565/430727241102336186。实验动物饲养于湖南中医药大学SPF级动物实验中心[实验动物使用许可证号:SYXK(湘)2023-0001],饲养环境清洁,室内温度控制在20~26℃,相对湿度控制在40%~70%,换气次数≥15次/h,每日12 h/12 h交替照明,实验动物照度为

15~20 Lx。实验所需HCT116人结肠癌细胞株,由中国科学院上海细胞库提供,目录号为:SCSP-5076。本实验通过湖南中医药大学第二附属医院伦理审查(编号:IACUC-KY2024016/017)。

**1.2 药物** 补中益气加味方配制:所有中药均来源于湖南中医药大学第二附属医院中药房,由湖南三湘中药饮片有限公司提供。经聂孝平主任药师鉴定为正品,药品质量符合2020年版《中华人民共和国药典》要求。补中益气加味方组成:黄芪30 g,白术15 g,太子参30 g,当归15 g,白芍20 g,黄芩15 g,升麻10 g,柴胡10 g,莪术12 g,黄连10 g,厚朴15 g,陈皮10 g,薏苡仁30 g,甘草8 g,白花蛇舌草30 g。煎药方法:首次煎煮时,将药物用纯水浸泡30 min后用大火煮沸,然后转小火煎煮30 min,过滤取液;药渣加水重复煮沸和小火煎煮过程,将两次煎煮所得药液混合均匀,浓缩至1000 mL,得到生药含量为0.78 g/mL的药液,冷藏于4℃环境中备用。5-FU溶液:购自上海旭东海普药业有限公司,批号:FA220907,取1 mL 5-FU溶液及9 mL 0.9% NaCl溶液至10 mL,质量浓度为2.5 mg/mL。外源性Klotho蛋白溶液:购自美国Sigma-Aldrich公司,批号:SRP3102。使用生理盐水复溶至0.1 mg/mL。

**1.3 主要试剂** Klotho蛋白抗体(批号:28100-1-AP)、Caspase-1抗体(批号:22915-1-AP)、IL-1 $\beta$ 抗体(批号:26048-1-AP)及IL-18抗体(批号:10663-1-AP)均购自武汉三鹰生物技术有限公司;PBS缓冲液(北京索莱宝科技有限公司,批号:P1010);DAB显色液(批号:P0202)及苏木精染液(批号:C0107)均购自上海碧云天生物科技有限公司,中性树胶(北京索莱宝科技有限公司,批号:G8590)。

**1.4 主要仪器** 石蜡包埋机(湖南金盛徕生物科学有限公司,型号:YB-8LF);轮转式切片机(德国Leica公司,型号:RM2245);生物组织摊烤片机(孝感市亚光医用电子技术有限公司,型号:YT-7F);自动组织脱水机(深圳市达科为医疗科技有限公司,型号:HP300);光学显微镜(日本奥林巴斯,型号:BX53);恒温水浴锅(劳达恒温设备有限公司,型号:Eco Silver)。

**1.5 造模方法** 将裸鼠适应性饲养1周,麻醉后严格按照无菌操作,取人结直肠癌细胞株HCT116 200  $\mu$ L(约含细胞2 $\times$ 10<sup>6</sup>个)注射于右侧腋窝<sup>[15]</sup>。退针后立即用棉签压迫,尽量减少细胞悬液外溢。注射完毕后将裸鼠放回笼中饲养。每日观察裸鼠的精神状态、饮食和活动情况。当移植瘤体积达到0.5 mm<sup>3</sup>时提示造模成功。

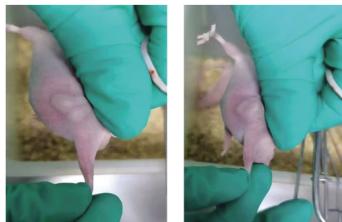


图1 裸鼠结直肠癌移植瘤模型图

**1.6 分组及给药** 造模后第15天即可形成裸鼠结直肠癌移植瘤模型,然后将裸鼠随机分为模型组、5-FU组、补中益气加味方组、Klotho组、补中益气加味方+Klotho组,每组各6只,雌雄各半。按裸鼠体表面积换算,模型组灌胃生理盐水0.4 mL;根据临床等效量换算,5-FU组腹腔注射给药量为25 mg/kg,补

中益气加味方组予以临床等效剂量53.43 g/kg汤药灌胃,Klotho组以外源性Klotho蛋白的0.01 mg/kg剂量腹腔注射<sup>[16]</sup>,补中益气加味方+Klotho组为53.43 g/kg剂量汤药灌胃+Klotho 0.01 mg/kg腹腔注射。以上各组每天给药1次,连续12 d。末次给药2 h后,将裸鼠脱颈处死,剥离瘤体,肉眼观察瘤体组织形态、色泽,测量其体积及质量,将其置于多聚甲醛固定,常规进行组织脱水和石蜡包埋。

**1.7 移植瘤体积及质量** 给药期间,采用活体成像仪测量裸鼠移植瘤最大径( $a$ )及最小径( $b$ ), $V=(a\times b^2)/2$ 。每4 d测量1次,裸鼠于治疗后第12天脱颈处死,解剖后取出移植瘤称质量。

**1.8 肿瘤组织病理** 苏木精-伊红(HE)染色 使用10%甲醛溶液固定组织,进行包埋与切片,苏木素-伊红染液染色后封片,使用光学显微镜下观察肿瘤组织的结构改变。

**1.9 免疫组化法检测** Klotho、Caspase-1、IL-1 $\beta$ 和IL-18 将包埋的肿瘤组织切取4  $\mu$ m石蜡切片,常规脱蜡复水后,使用柠檬酸钠缓冲液在100℃下抗原复苏10 min。随后使用3%过氧化氢溶液灭活内源性过氧化物酶。封闭通透后使用PBS缓冲液冲洗切片,然后滴加Klotho、Caspase-1、IL-1 $\beta$ 和IL-18抗体溶液,4℃孵育过夜。次日使用二抗(1:500)室温孵育30 min,清洗后将切片浸泡于DAB(3,3'-二氨基联苯胺)显色液中,室温显色5~10 min,用流水冲洗切片以终止反应。随后,用苏木精染液复染细胞核1~2 min,流水冲洗后脱水透明封片。Klotho、Caspase-1、IL-1 $\beta$ 和IL-18显示胞质及胞膜有黄色或棕褐色颗粒为阳性。使用ImageJ软件进行阳性细胞百分比定量分析。

**1.10 统计学方法** 使用GraphPad Prism 9软件进行数据分析处理。计量资料以“均数±标准差”( $\bar{x}\pm s$ )表示,多组间比较采用方差分析,不同时间点多组比较采用重复测量方差分析,两组间比较采用Tukey检验。非正态分布或方差不齐的计量资料采用秩和检验。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 补中益气加味方对裸鼠移植瘤质量的影响** 与模型组比较,5-FU组、补中益气加味方组、Klotho组、补中益气加味方+Klotho组的裸鼠移植瘤质量明显降低( $P<0.01$ 或 $P<0.05$ ),表明5-FU、补中益气加味方和外源性Klotho均能够抑制移植瘤的生长。(见表1)

组别	n	移植瘤质量
模型组	6	0.56±0.06
5-FU组	6	0.41±0.07 <sup>a</sup>
补中益气加味方组	6	0.44±0.07 <sup>b</sup>
Klotho组	6	0.46±0.05 <sup>b</sup>
补中益气加味方+Klotho组	6	0.41±0.06 <sup>a</sup>
F		5.892
P		0.002

注:与模型组比较,<sup>a</sup> $P<0.01$ ,<sup>b</sup> $P<0.05$ 。

**2.2 补中益气加味方对裸鼠移植瘤体积的影响** 所有裸鼠干预后不同时间节点移植瘤体积比较,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),即存在时间效应,各组内各观测时间段裸鼠移植瘤体积均较前有所增大。各组裸鼠移植瘤体积总体比较,差异有

统计学意义( $P<0.05$ ),即存在分组效应,在药物治疗后的第4天、第8天和第12天中,5-FU组、补中益气加味方组、Klotho组和补中益气加味方+Klotho组的裸鼠移植瘤体积明显低于模型组( $P<0.01$ ),而各治疗组间差距不大,提示5-FU、补中益气加味方和外源性Klotho均能够抑制移植瘤的生长且补中益气加味方与化疗药物5-FU具有相近的疗效。时间因素与分组因素存在交互效应,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),各治疗组治疗后的移植瘤体积增大幅度均低于模型组。(见表2、图2)

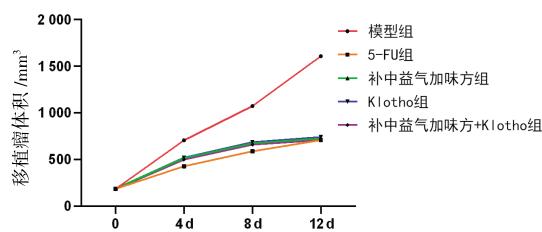


图2 各时间节点裸鼠移植瘤体积折线图

2.3 裸鼠移植瘤组织HE染色结果 模型组可见细胞核大、深染,核质比增高,核仁明显,可见病理性核分裂象,细胞排列密集,异型性明显。经过治疗后,各治疗组切片可见细胞核固缩,胞质空泡化,细胞排列疏松,间质胶原纤维增生。(见图3)

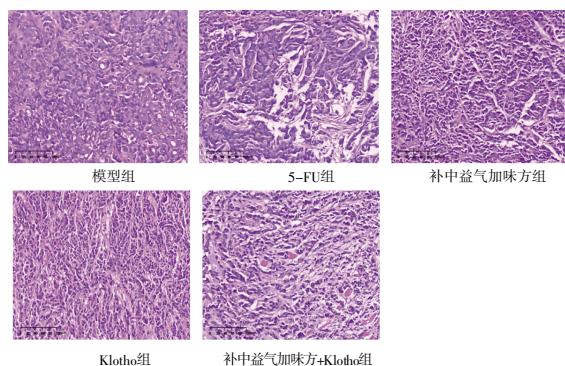


图3 裸鼠移植瘤组织HE染色图(标尺=100 μm,×200)

2.4 补中益气加味方对裸鼠移植瘤Klotho、Caspase-1、IL-1β和IL-18表达的影响 5-FU组、补中益气加味方组、Klotho组和补中益气加味方+Klotho组的裸鼠移植瘤Klotho表达高于模型组( $P<0.01$ 或 $P<0.05$ ),补中益气加味方组、Klotho组和补中益气加味方+Klotho组的裸鼠移植瘤Caspase-1、IL-1β和IL-18表达低于模型组( $P<0.01$ 或 $P<0.05$ )。(见表3、图4)

表3 裸鼠移植瘤Klotho、Caspase-1、IL-1β和IL-18的表达情况

组别	n	Klotho	Caspase-1	IL-1β	IL-18
模型组	6	23.60±13.23	74.79±6.00	73.11±4.87	69.41±14.93
5-FU组	6	52.11±22.83 <sup>a</sup>	57.43±20.21	51.95±11.26	52.39±19.1
补中益气加味方组	6	56.94±14.91 <sup>b</sup>	42.75±10.83 <sup>b</sup>	39.97±20.27 <sup>b</sup>	36.47±13.19 <sup>b</sup>
Klotho组	6	72.08±14.89 <sup>b</sup>	50.44±19.80 <sup>b</sup>	44.00±18.60 <sup>b</sup>	31.89±10.27 <sup>b</sup>
补中益气加味方+Klotho组	6	74.16±14.66 <sup>b</sup>	36.07±13.04 <sup>b</sup>	33.39±14.09 <sup>b</sup>	27.55±10.60 <sup>b</sup>
H		14.925	12.636	15.976	15.243
P		0.005	0.013	0.003	0.004

注:和模型组比较,<sup>a</sup> $P<0.05$ ,<sup>b</sup> $P<0.01$ 。

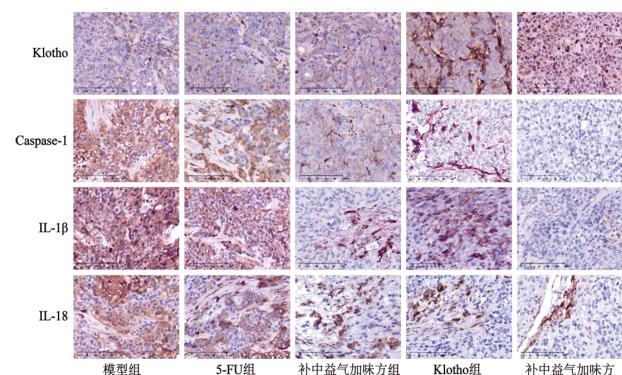


图4 裸鼠移植瘤Klotho、Caspase-1、IL-1β和IL-18的表达(免疫组化法)(标尺=100 μm,×400)

### 3 讨论

细胞焦亡是一种由炎症性胱天蛋白酶(Caspase)调控的程序性细胞死亡形式,释放炎性细胞因子是细胞焦亡的特征之一,当细胞发生焦亡时发生细胞肿胀和膜破裂,导致其细胞内内容物释放,IL-1β和IL-18等细胞因子被释放并促进炎症的发生。炎性细胞因子的分泌充当一种强效的促炎信号,招募并激活各种免疫细胞,促进针对病原体的强烈免疫反应来抑制肿瘤进展。然而,在肿瘤发生的背景下,这些细胞因子的释放也可促成慢性炎症环境,促进肿瘤生长和进展<sup>[17-18]</sup>。炎性细胞因子的存在有助于创建一个有利于肿瘤发展的环境<sup>[19]</sup>。IL-1β可以通过促进与炎症和细胞存活相关的通路的激活来鼓励血管生成和肿瘤细胞生长<sup>[20]</sup>。然而,细胞焦亡过程中释放的炎症介质可能有助于建立一个促进肿瘤生长和扩散的微环境。长期可导致各种细胞反应,包括增殖、支持促进肿瘤存

表2 各时间节点裸鼠移植瘤体积( $\bar{x}\pm s$ , mm³)

组别	n	第0天	第4天	第8天	第12天	F	P
模型组	6	186.32±28.40	708.09±51.56 <sup>a</sup>	1 076.83±100.70 <sup>ab</sup>	1 612.58±128.77 <sup>abc</sup>	457.368	0.000
5-FU组	6	185.43±27.25	430.69±58.88 <sup>ad</sup>	595.10±107.50 <sup>abd</sup>	719.43±136.40 <sup>abd</sup>	81.312	0.000
补中益气加味方组	6	187.82±25.75	518.05±42.55 <sup>ad</sup>	681.20±105.26 <sup>abd</sup>	734.01±112.68 <sup>abd</sup>	116.239	0.000
Klotho组	6	187.77±27.47	521.85±58.93 <sup>ad</sup>	693.33±102.41 <sup>abd</sup>	746.98±100.29 <sup>abd</sup>	120.563	0.000
补中益气加味方+Klotho组	6	185.00±30.29	500.04±44.83 <sup>ad</sup>	666.79±111.26 <sup>abd</sup>	715.69±111.76 <sup>abd</sup>	108.193	0.000
F		0.013	23.765	19.599	66.573		
P		1.000	0.000	0.000	0.000		

注: $F_{\text{时间主效应}}=433.821$ , $P_{\text{时间主效应}}=0.000$ ; $F_{\text{分组主效应}}=80.457$ , $P_{\text{分组主效应}}=0.019$ ; $F_{\text{交互效应}}=25.994$ , $P_{\text{交互效应}}=0.000$ 。与第0天比较,<sup>a</sup> $P<0.05$ ;与第4天比较,<sup>b</sup> $P<0.05$ ;与第8天比较,<sup>c</sup> $P<0.05$ ;与模型组比较,<sup>d</sup> $P<0.01$ 。

活、侵袭和转移的通路<sup>[18-20]</sup>。研究结果表明,在某些条件下,高水平的细胞焦亡可通过招募免疫细胞来刺激抗肿瘤免疫,与此同时,释放的细胞因子(IL-1β,IL-18)也能创建一个促进肿瘤生长和适应免疫微环境的反馈回路<sup>[18-19]</sup>。相反,抑制肿瘤免疫反应的成分或抑制炎症可降低肿瘤细胞中的细胞焦亡水平,随后抑制这种炎症性细胞死亡形式。这种调节可能导致免疫细胞活化减少和肿瘤清除水平降低,使肿瘤细胞有可能逃避免疫监视并增殖<sup>[21]</sup>。总之,细胞焦亡及相关的炎症反应在增强抗肿瘤免疫以及在某些条件下促进肿瘤生长方面都起着关键作用,两者之间存在一个平衡阈值。本研究发现补中益气加味方在肿瘤质量和体积方面显著抑制了其生长,同时也抑制了IL-1β和IL-18的产生,降低了肿瘤组织中的炎症水平。其中潜在的原因可能是补中益气加味方在治疗肿瘤的同时,降低了能够促进肿瘤生长和适应免疫微环境的阈值,使肿瘤生长得到受限并且更容易被清除。

Klotho最初被确定为一种抗衰老因子,从细胞膜脱落可和多种与细胞增殖、凋亡和肿瘤进展相关的信号通路的调节剂发挥作用<sup>[22]</sup>。Klotho与肿瘤发生之间的联系是多方面的,其表达似乎与各种癌症中的肿瘤发展和侵袭性呈负相关,其表达在许多恶性肿瘤中通常显著降低。在CRC中,生物信息学分析表明,外源性Klotho蛋白给药可预防和治疗结直肠癌<sup>[23]</sup>。较低的Klotho表达水平被发现与食管鳞状细胞癌中的临床分期、淋巴结转移和总体生存率呈负相关<sup>[24]</sup>。在肝癌细胞中,Klotho过表达能够通过诱导细胞凋亡抑制细胞增殖<sup>[24]</sup>,这表明Klotho可能通过控制关键生长因子信号通路在调节肿瘤生长和恶性转化中发挥重要作用。Klotho的作用不仅限于直接抑制肿瘤,它还能够影响肿瘤微环境。在肾细胞癌中,Klotho能够作用于IGF-1R,抑制其信号传导从而抑制肿瘤生长和迁移<sup>[25]</sup>。

Klotho在一定情况下同样可以影响细胞焦亡,因其作为一种抗衰老因子,具有抗炎和抗氧化应激活性。Klotho(细胞结合或可溶性)可以抑制NF-κB和NLRP3,从而降低活性IL-1β、膜穿孔和细胞死亡(焦亡)<sup>[26]</sup>。此外,Klotho还通过抑制氧化应激、炎症和NF-κB/NLRP3介导的细胞焦亡来减轻造影剂诱导的急性肾损伤<sup>[27]</sup>。尽管还缺少Klotho与肿瘤细胞焦亡调节之间的密切相互作用,但Klotho可能抑制各种形式的细胞应激反应表明它们存在潜在的交集。细胞焦亡与炎症紧密相连,Klotho已被证明可负向调节炎症,这可能进一步确立其针对不受控制的细胞生长及由此导致的肿瘤发展的保护作用,间接影响焦亡的参与<sup>[15]</sup>。本研究发现,Caspase-1作为细胞焦亡的关键酶,应用外源性Klotho蛋白治疗明显降低了Caspase-1的表达,并且降低的炎症反应,同时抑制了移植瘤的生长。这间接证明了Klotho可能通过抑制细胞焦亡从而抑制肿瘤的发生发展。补中益气加味方增加Klotho表达的同时,也降低了Caspase-1、IL-1β和IL-18的表达,提示该方可能具有外源性Klotho蛋白的作用,也可能通过其他途径促进Klotho的表达,从而发挥抑制细胞焦亡和肿瘤生长的作用。

结直肠癌在中医学中归属于“肠覃”“积聚”“脏毒”等范畴。从病因病机而言,结直肠癌以脾肾亏虚为发病之本,《脾胃论》中提到“内伤脾胃,百病由生”。脾失健运则湿浊内生,肾精亏损则气化无权,二者共同构成“痰、湿、瘀、毒”等病理

产物蓄积的微环境基础。补中益气加味方由黄芪、白术、太子参、当归、白芍、黄芩、升麻、柴胡、莪术、黄连、厚朴、陈皮、薏苡仁、甘草、白花蛇舌草组成。方中升麻、柴胡升提清气,与厚朴、陈皮降胃浊之气相配,升降相因,调畅气机。黄芪、白术温补中焦,配伍黄芩、黄连苦寒清热,寒温并用,攻补兼施,形成“补脾不助热,清热不伤阳”的动态平衡。补气行气与补血活血药同用,以气血同治。诸药合用,共奏补气养血、健脾利湿、行气化瘀解毒之功。现代中医药理研究发现,黄芪可以增强细胞和体液免疫功能,抑制肿瘤生长,并防止化疗引起的损伤,从而为结直肠癌的传统疗法提供一种补充方法<sup>[28]</sup>。其所含的黄芪甲苷Ⅳ表现出了显著的抗肿瘤特性,能够诱导结肠癌细胞凋亡和抑制转移相关途径<sup>[28-29]</sup>。此外,补中益气加味方中所含有的柴胡皂苷、镰叶芹醇和芍药苷等单体化合物都具有诱导细胞凋亡和抑制肿瘤细胞增殖的能力<sup>[30-32]</sup>,这进一步证明了该方在治疗结直肠癌的适用性。

综上,补中益气加味方能够显著抑制裸鼠结直肠癌移植瘤体积和质量增长,疗效与5-FU接近,并且外源性Klotho蛋白也具有一定抗肿瘤的效果。补中益气加味方和外源性Klotho蛋白均能够降低Caspase-1、IL-1β、IL-18的表达,并且补中益气加味方能够上调肿瘤组织中Klotho的表达,表明补中益气加味方可能通过促进Klotho表达来抑制肿瘤细胞焦亡,从而发挥抗肿瘤的作用。此外,外源性Klotho蛋白联合补中益气加味方表现出更优的抗炎和抗肿瘤的效果,这可能成为具有前景的结直肠癌治疗方法。

## 参考文献

- [1] 李琳,李旭,谭坤,等.中美结直肠癌流行病学现状及趋势[J].中国普外基础与临床杂志,2025,32(6):694-701.
- [2] WADHWA V, PATEL N, GROVER D, et al. Interventional gastroenterology in oncology[J]. CA Cancer J Clin, 2023, 73(3):286-319.
- [3] MCCULLOCH M, LY H, BROFFMAN M, et al. Chinese herbal medicine and fluorouracil-based chemotherapy for colorectal cancer: A quality-adjusted meta-analysis of randomized controlled trials[J]. Integr Cancer Ther, 2016, 15(3):285-307.
- [4] LIU N N, WU C J, JIA R, et al. Traditional Chinese medicine combined with chemotherapy and cetuximab or bevacizumab for metastatic colorectal cancer: A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial [J]. Front Pharmacol, 2020, 11:478.
- [5] SHAO C, ZUO Q, LIN J T, et al. Effect of Chinese herbal medicine on the survival of colorectal cancer patients with liver-limited metastases: A retrospective cohort study, 2008 to 2017[J]. Integr Cancer Ther, 2019, 18:1534735419883687.
- [6] CHEN P, NI W, XIE T, et al. Meta-analysis of 5-fluorouracil-based chemotherapy combined with traditional Chinese medicines for colorectal cancer treatment [J]. Integr Cancer Ther, 2019, 18:1534735419828824.

- [7] 朱俊芝,袁婉靖,叶鑫,等.补中益气加味方对结直肠癌移植瘤模型细胞凋亡的影响[J].中医药导报,2024,30(12):8-12.
- [8] PERVEEZ M, AJAZ M, AFROZE D. Promoter hypermethylation of KLOTHO; an anti-senescence related gene in colorectal cancer patients of Kashmir valley[J]. Mol Biol Res Commun,2015,4(4):217-224.
- [9] LIGUMSKY H, MERENBAKH-LAMIN K, KEREN-KHADMY N, et al. The role of  $\alpha$ -klotho in human cancer: Molecular and clinical aspects[J]. Oncogene,2022, 41(40):4487-4497.
- [10] RAO Z P, ZHU Y T, YANG P, et al. Pyroptosis in inflammatory diseases and cancer[J]. Theranostics,2022, 12(9):4310-4329.
- [11] WANG W, XU S W, TENG Y, et al. The dark side of pyroptosis of diffuse large B-cell lymphoma in B-cell non-Hodgkin lymphoma: Mediating the specific inflammatory microenvironment[J]. Front Cell Dev Biol,2021, 9:779123.
- [12] WANG J Y, WANG Y, STEFFANI M, et al. Novel risk classification based on pyroptosis-related genes defines immune microenvironment and pharmaceutical landscape for hepatocellular carcinoma[J]. Cancers,2022, 14(2):447.
- [13] XIE B, CAO K, LI J J, et al. Hmgb1 inhibits Klotho expression and malignant phenotype in melanoma cells by activating NF- $\kappa$ B[J]. Oncotarget,2016,7(49):80765-80782.
- [14] DEHGHANI M, BROBEY R K, WANG Y, et al. Klotho inhibits EGF-induced cell migration in Caki-1 cells through inactivation of EGFR and p38 MAPK signaling pathways[J]. Oncotarget,2018,9(42):26737-26750.
- [15] 寇胜兰,陈思勤,杨家翔,等.健脾消癌方对裸鼠结肠癌耐药移植瘤的作用机制[J].世界中医药,2025,20(6):961-965.
- [16] 王媛.外源性 $\alpha$ -Klotho蛋白改善CKD小鼠认知障碍的作用途径及机理研究[D].成都:成都医学院,2023.
- [17] LI S, CHEN P X, CHENG B, et al. Pyroptosis predicts immunotherapy outcomes across multiple cancer types[J]. Clin Immunol,2022,245:109163.
- [18] LOU X Y, LI K X, QIAN B H, et al. Pyroptosis correlates with tumor immunity and prognosis [J]. Commun Biol,2022,5(1):917.
- [19] WU J B, ZHU Y Y, LUO M M, et al. Comprehensive analysis of pyroptosis-related genes and tumor microenvironment infiltration characterization in breast cancer [J]. Front Immunol,2021,12:748221.
- [20] GUO W H, LI Z H, HUANG H L, et al. VB12-sericin-PBLG-IR780 nanomicelles for programming cell pyroptosis via photothermal (PTT)/photodynamic (PDT) effect-induced mitochondrial DNA (mitoDNA) oxidative damage[J]. ACS Appl Mater Interfaces,2022,14(15):17008-17021.
- [21] NAJAFI S, MIRSHAFIEY A. The role of T helper 17 and regulatory T cells in tumor microenvironment [J]. Immunopharmacol Immunotoxicol,2019,41(1):16-24.
- [22] ARBEL RUBINSTEIN T, SHAHMOON S, ZIGMOND E, et al. Klotho suppresses colorectal cancer through modulation of the unfolded protein response[J]. Oncogene,2019, 38(6):794-807.
- [23] TANG X, FAN Z, WANG Y, et al. Expression of klotho and  $\beta$ -catenin in esophageal squamous cell carcinoma, and their clinicopathological and prognostic significance[J]. Dis Esophagus,2016,29(3):207-214.
- [24] SUN H D, GAO Y C, LU K M, et al. Overexpression of Klotho suppresses liver cancer progression and induces cell apoptosis by negatively regulating Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway[J]. World J Surg Oncol,2015,13:307.
- [25] KIM J H, HWANG K H, LKHAGVADORJ S, et al. Klotho plays a critical role in clear cell renal cell carcinoma progression and clinical outcome[J]. Korean J Physiol Pharmacol,2016,20(3):297-304.
- [26] PRUD'HOMME G J, WANG Q H. Anti-inflammatory role of the klotho protein and relevance to aging [J]. Cells,2024,13(17):1413.
- [27] FU Y B, CAO J F, WEI X B, et al. Klotho alleviates contrast-induced acute kidney injury by suppressing oxidative stress, inflammation, and NF- $\kappa$ B/NF-RP3-mediated pyroptosis[J]. Int Immunopharmacol,2023, 118:110105.
- [28] SHEN L, RA G, YANG C Z, et al. Astragalus-containing Chinese herbal medicine combined with chemotherapy for cervical cancer: A systematic review and meta-analysis[J]. Front Pharmacol,2021,12:587021.
- [29] TAN X Y, XU M T, LIU F Y, et al. Antimetastasis effect of Astragalus membranaceus-Curcuma zedoaria via  $\beta$ -catenin mediated CXCR4 and EMT signaling pathway in HCT116[J]. Evid Based Complement Alternat Med,2019,2019:9692350.
- [30] 张璇,林鹏,杨玉,等.芍药苷抗肿瘤作用机制的研究进展[J].癌变·畸变·突变,2024,36(2):164-167.
- [31] XIAO X, GAO C F. Saikosaponins targeting programmed cell death as anticancer agents: Mechanisms and future perspectives[J]. Drug Des Devel Ther,2024,18:3697-3714.
- [32] KOBAEK-LARSEN M, BAATRUP G, KHATAEINO-TABI M, et al. Dietary polyacetylenic oxylipins falcarinol and falcarindiol prevent inflammation and colorectal neoplastic transformation: A mechanistic and dose-response study in a rat model[J]. Nutrients,2019,11(9):2223.

(收稿日期:2025-05-09 编辑:刘国华)