

解毒地黄汤拮抗结肠癌线粒体自噬及 NLRP3
活化的作用及机制研究Research on the effect and mechanism of Jiedu Dihuang Decoction in antagonizing
mitochondrial autophagy and NLRP3 activation in colorectal cancer李育民¹, 黄灿灿², 归明彬³,
岳斌⁴, 李兆桓⁴, 王芸¹,
薛秀芳¹, 裴正学⁵

(1. 甘肃省第二人民医院/西北民族大学 附属医院 肿瘤内科 甘肃 兰州 730030; 2. 南通市中医院 妇科, 江苏 南通 226000; 3. 中国人民解放军联勤保障部队第九四〇医院 结直肠肛门外科 甘肃 兰州 730050; 4. 甘肃中医药大学 中医临床学院, 甘肃 兰州 730000; 5. 甘肃省肿瘤医院 中西医结合科, 甘肃 兰州 730050)

LI Yu-min¹, HUANG Can-can²,
GUI Ming-bin³, YUE Bin,
LI Zhao-huan⁴, WANG Yun¹,
XUE Xiu-fang¹, PEI Zheng-xue⁵

(1. Department of Medical Oncology, Gansu Provincial Second People's Hospital / Affiliated Hospital of Northwest Minzu University, Lanzhou 730030, Gansu Province, China; 2. Department of Gynecology, Nantong Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nantong 226000, Jiangsu Province, China; 3. Department of Colorectal & Anal surgery, The 940th Hospital of the Joint Logistics Support Force of Chinese People's Liberation Army, Lanzhou 730050, Gansu Province, China; 4. Clinical College of Chinese Medicine, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, Gansu Province, China; 5. Department of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Gansu Provincial Cancer Hospital, Lanzhou 730050, Gansu Province, China)

基金项目: 甘肃省中医药管理局基金资助项目 (GZKP-2023-23), 甘肃省科技计划基金资助项目 (25JRRA429); 兰州市科技计划基金资助项目 (2024-9-163)

作者简介: 李育民 (1991-), 男, 主治医师, 主要从事中西医结合防治肿瘤相关研究工作

通信作者: 薛秀芳, 副研究员

MP: 13919770279

E-mail: 243825948@qq.com

摘要:目的 探索解毒地黄汤调控线粒体自噬与苷酸结合寡聚化域(NOD)样受体热蛋白结构域相关蛋白3(NLRP3)炎症小体对结肠癌的炎症微环境的干预效应。方法 用腹腔注射氧化偶氮甲烷(AOM)联合饲喂葡聚糖硫酸钠(DSS)成功复制动物模型后随机分为对照组,模型组,解毒地黄汤低、中、高剂量组,阳性药物组,90只C57BL/6雄性小鼠分为6组,每组15只,各组连续处理10w。用苏木精-伊红(HE)染色法评价直肠组织病理形态改变;用免疫荧光染色法观察结肠组织PTEN诱导激酶1(PINK1)、帕金森病蛋白(Parkin)、B细胞淋巴瘤-2蛋白相互作用中心卷曲螺旋蛋白1(Beclin1)的表达部位及强度;用聚合酶链式反应(PCR)法检测直肠NLRP3、凋亡相关斑点样蛋白(ASC)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1(Caspase-1)mRNA的表达;用蛋白质印迹法(WB)检测PINK1、Parkin、Beclin1、NLRP3、ASC、Caspase-1蛋白表达水平;用流式细胞术检测辅助性T细胞1(Th1)与辅助性T细胞2(Th2)的比例;用酶联免疫吸附测定法(Elisa)检测白细胞介素-4(IL-4)、白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-10(IL-10)、白细胞介素-12(IL-12)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、干扰素- γ (IFN- γ)的水平。结果 模型组和对照组的NLRP3 mRNA相对表达水平分别为 2.06 ± 0.22 和 1.01 ± 0.17 ,ASC的相对表达水平分别为 3.03 ± 0.16 和 1.01 ± 0.19 ,Caspase-1 mRNA相对表达水平分别为 3.28 ± 0.22 和 1.00 ± 0.11 ,在统计学上差异均具有统计学意义(均 $P < 0.01$);模型组和对照组PINK1平均荧光强度分别为 76.39 ± 4.89 和 122.99 ± 6.93 ,Parkin平均荧光强度分别为 83.12 ± 5.01 和 138.38 ± 3.84 ,Beclin1平均荧光强度分别为 87.43 ± 3.77 和 143.22 ± 9.42 ,在统计学上差异均具有统计学意义(均 $P < 0.01$);模型组与对照组腹腔液Th1占比分别为 $(0.74 \pm 0.09)\%$ 和 $(4.78 \pm 0.62)\%$,Th2占比分别为 $(2.05 \pm 0.26)\%$ 和 $(0.26 \pm 0.07)\%$,在统计学上差异均具有统计学意义(均 $P < 0.01$);模型组与对照组外周血IL-4水平分别为 (48.98 ± 3.78) 和 $(26.44 \pm 5.64) \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$,IL-6水平分别为 (44.42 ± 2.55) 和 $(24.21 \pm 2.25) \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$,IL-10水平分别为 (37.67 ± 5.34) 和 $(19.06 \pm 3.76) \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$,TNF- α 水平分别为 (79.11 ± 6.32) 和 $(35.78 \pm 13.17) \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$,IL-12水平分别为 (28.28 ± 2.33) 和 $(55.39 \pm 3.47) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,IFN- γ 水平分别为 (238.67 ± 35.78) 和 $(517.72 \pm 52.15) \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$,在统计学上差异均具有统计学意义(均 $P < 0.01$)。解毒地黄汤组低、中、高剂量组及阳性药物组NLRP3 mRNA表达水平分别为 1.75 ± 0.10 、 1.59 ± 0.11 、 1.31 ± 0.11 和 1.48 ± 0.10 ,ASC mRNA表达水平分别为 2.69 ± 0.10 、 1.96 ± 0.14 、 1.54 ± 0.18 和 1.89 ± 0.09 ,Caspase-1 mRNA表达水平分别为 2.85 ± 0.08 、 2.24 ± 0.26 、 1.58 ± 0.22 和 1.94 ± 0.16 ,除解毒地黄汤组低剂量外,各组与模型组在统计学差异均具有统计学意义(均 $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$);PINK1平均荧光强度分别为 87.50 ± 9.38 、 98.75 ± 7.13 、 107.28 ± 6.60 和 94.75 ± 7.11 ,Parkin平均荧光强度分别为 94.11 ± 8.17 、 103.13 ± 8.59 、 111.27 ± 9.66 和 101.27 ± 9.21 ,Beclin1平均荧光强度分别为 100.2 ± 7.11 、 107.92 ± 6.84 、 122.65 ± 8.36 和 105.44 ± 7.55 ,除解毒

地黄汤组低剂量外,各组与模型组在统计学差异均具有统计学意义($P < 0.05$ 、 $P < 0.01$);腹腔液 Th1 占比分别为(1.34 ± 0.13)、(1.78 ± 0.21)、(2.89 ± 0.23)和(2.47 ± 0.24)%;腹腔液 Th2 占比分别为(1.65 ± 0.18)、(1.06 ± 0.11)、(0.57 ± 0.14)和(0.68 ± 0.07)%,除解毒地黄汤组低剂量外,各组与模型组在统计学差异均具有统计学意义(均 $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$);外周血 IL-4 水平分别为(41.67 ± 4.31)、(36.39 ± 5.93)、(33.61 ± 4.30)和(33.94 ± 5.81) $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$;IL-6 水平分别为(39.10 ± 2.89)、(32.85 ± 3.98)、(28.91 ± 1.91)和(27.63 ± 1.98) $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$;IL-10 水平分别为(32.11 ± 7.50)、(26.28 ± 4.65)、(23.22 ± 4.35)和(26.22 ± 6.15) $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$;TNF- α 水平分别为(64.13 ± 13.12)、(57.44 ± 13.62)、(47.45 ± 10.06)和(50.78 ± 10.9) $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$;IL-12 水平分别为(34.09 ± 2.49)、(38.53 ± 3.84)、(42.67 ± 3.87)和(41.93 ± 4.39) $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$;IFN- γ 水平分别为(286.57 ± 54.77)、(358.59 ± 52.15)、(435.28 ± 73.12)和(405.33 ± 39.33) $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$,除解毒地黄汤组低剂量外,各组与模型组在统计学差异均具有统计学意义($P < 0.05$ 、 $P < 0.01$)。结论 解毒地黄汤可以改善结肠癌的炎症微环境,这可能与线粒体自噬调控 NLRP3 炎症小体有关。

关键词:解毒地黄汤;结肠癌;NLRP3 炎症小体;线粒体自噬

DOI:10.13699/j.cnki.1001-6821.2026.03.010

中图分类号:R289.5 **文献标志码:**A

文章编号:1001-6821(2026)03-0356-08

Abstract: Objective To explore the intervention effect of jiedu dihuang decoction on the inflammatory microenvironment of colon cancer by regulating mitophagy and nucleotide-binding oligomerization domain (NOD) like receptor hot protein domain-related protein 3 (NLRP3) inflammasome. **Methods** The animal model was successfully replicated by intraperitoneal injection of azoxymethane (AOM) combined with feeding dextran sodium sulfate (DSS). The animals were randomly divided into A: control group, B: model group, C, D, E: Jiedu Dihuang Decoction low, medium and high dose group, F: positive drug group. Ninety male C57BL/6 mice were randomly divided into 6 groups of 15 mice each, and all groups were treated continuously for 10 weeks. The pathological changes of rectal tissue were evaluated by hematoxylin-eosin (HE) staining. Immunofluorescence staining was used to observe the expression site and intensity of PTEN-induced kinase 1 (PINK1), Parkinson's disease protein (Parkin) and B-cell lymphoma-2-interacting myosin-like coiled-coil protein 1 (Beclin1) in colon tissue. The expression of NLRP3, apoptosis-associated speck-like protein (ASC) and Caspase-1 mRNA in rectum was detected by polymerase chain reaction (PCR). The protein expression levels of PINK1, Parkin, Beclin1, NLRP3, ASC and Caspase-1 were detected by Western blotting (WB). The ratio of helper T cell 1 (Th1) to helper T cell 2 (Th2) was detected by flow cytometry. The levels of interleukin-4 (IL-4), interleukin-6 (IL-6), interleukin-10 (IL-10), interleukin-12 (IL-12), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interferon- γ (IFN- γ) were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (Elisa). **Results** The mRNA expression levels of NLRP3, ASC and Caspase-1 in the model group were 2.06 ± 0.22 , 3.03 ± 0.16 and 3.28 ± 0.22 , respectively, while those in the control group were 1.01 ± 0.17 , 1.01 ± 0.19 and 1.00 ± 0.11 , respectively, with statistically significant differences between the two groups (all $P < 0.01$). The mean fluorescence intensities of PINK1, Parkin and Beclin1 in the model group were 76.39 ± 4.89 , 83.12 ± 5.01 and 87.43 ± 3.77 , respectively, compared with 122.99 ± 6.93 , 138.38 ± 3.84 and 143.22 ± 9.42 in the control group, and the differences were statistically significant (all $P < 0.01$). As for the proportion of T helper cells in peritoneal fluid, the model group showed a significantly lower Th1 proportion (0.74 ± 0.09)% and a significantly higher Th2 proportion (2.05 ± 0.26)% compared with the control group [(4.78 ± 0.62) % and (0.26 ± 0.07) %, respectively, all $P < 0.01$]. In terms of peripheral blood cytokine levels, the concentrations of IL-4, IL-6, IL-10 and TNF- α in the model group were (48.98 ± 3.78) $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$, (44.42 ± 2.55) $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$, (37.67 ± 5.34) $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ and (79.11 ± 6.32) $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively, which were significantly higher than those in the control group [(26.44 ± 5.64) $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$, (24.21 ± 2.25) $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$, (19.06 ± 3.76) $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ and (35.78 ± 13.17) $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively]. Conversely, the levels of IL-12 and IFN- γ in the model group were (28.28 ± 2.33) $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ and (238.67 ± 35.78) $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively, which were significantly lower than those in the control group [(55.39 ± 3.47) $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ and (517.72 ± 52.15) $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively], with all differences reaching statistical significance (all $P < 0.01$). The mRNA expression

levels of NLRP3 in the low, medium, high-dose Jiedu-Dihuang Decoction groups and the positive drug group were 1.75 ± 0.10 , 1.59 ± 0.11 , 1.31 ± 0.11 and 1.48 ± 0.10 , respectively; the mRNA expression levels of ASC were 2.69 ± 0.10 , 1.96 ± 0.14 , 1.54 ± 0.18 and 1.89 ± 0.09 , respectively; and the mRNA expression levels of Caspase-1 were 2.85 ± 0.08 , 2.24 ± 0.26 , 1.58 ± 0.22 and 1.94 ± 0.16 , respectively. Except for the low-dose Jiedu-Dihuang Decoction group, the differences between the other treatment groups and the model group were statistically significant ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The mean fluorescence intensities of PINK1 in each treatment group were 87.50 ± 9.38 , 98.75 ± 7.13 , 107.28 ± 6.60 and 94.75 ± 7.11 , respectively; those of Parkin were 94.11 ± 8.17 , 103.13 ± 8.59 , 111.27 ± 9.66 and 101.27 ± 9.21 , respectively; and those of Beclin1 were 100.2 ± 7.11 , 107.92 ± 6.84 , 122.65 ± 8.36 and 105.44 ± 7.55 , respectively. Except for the low-dose Jiedu-Dihuang Decoction group, the differences between the other treatment groups and the model group were statistically significant ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The proportions of Th1 in peritoneal fluid of each treatment group were $(1.34 \pm 0.13)\%$, $(1.78 \pm 0.21)\%$, $(2.89 \pm 0.23)\%$ and $(2.47 \pm 0.24)\%$, respectively; and the proportions of Th2 were $(1.65 \pm 0.18)\%$, $(1.06 \pm 0.11)\%$, $(0.57 \pm 0.14)\%$ and $(0.68 \pm 0.07)\%$, respectively. Except for the low-dose Jiedu-Dihuang Decoction group, the differences between the other treatment groups and the model group were statistically significant (all $P < 0.05$, $P < 0.01$). The levels of IL-4 in peripheral blood of each treatment group were (41.67 ± 4.31) , (36.39 ± 5.93) , (33.61 ± 4.30) and (33.94 ± 5.81) $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively; those of IL-6 were (39.10 ± 2.89) , (32.85 ± 3.98) , (28.91 ± 1.91) and (27.63 ± 1.98) $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively; those of IL-10 were (32.11 ± 7.50) , (26.28 ± 4.65) , (23.22 ± 4.35) and (26.22 ± 6.15) $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively; those of TNF- α were (64.13 ± 13.12) , (57.44 ± 13.62) , (47.45 ± 10.06) and (50.78 ± 10.9) $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively; those of IL-12 were (34.09 ± 2.49) , (38.53 ± 3.84) , (42.67 ± 3.87) and (41.93 ± 4.39) $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively; and those of IFN- γ were (286.57 ± 54.77) , (358.59 ± 52.15) , (435.28 ± 73.12) and (405.33 ± 39.33) $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively. Except for the low-dose Jiedu-Dihuang Decoction group, the differences between the other treatment groups and the model group were statistically significant (all $P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion** Jiedu-Dihuang Decoction can improve the inflammatory microenvironment of colon cancer, which may be related to the regulation of NLRP3 inflammasome by mitochondrial autophagy.

Key words: Jiedu Dihuang Decoction; colon cancer; NLRP3 inflammasome; mitochondrial autophagy

结肠癌(colorectal cancer, CRC)是消化道常见恶性肿瘤,发病率和死亡率常年居高不下^[1]。该病的发病机制尚不明确,促炎因子的过度产生可增加患CRC的风险^[2]。研究表明,线粒体自噬在炎症疾病中发挥着重要作用^[3],异常的线粒体自噬会激活核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白(nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3)炎症小体并释放炎症因子^[4],进而导致大量炎性细胞浸润,这与溃疡性结肠炎特征相符^[5]。炎症反应是引起免疫失衡进而诱发肿瘤细胞持续生长、正常细胞不断恶变的重要原因。中医认为正损于内,邪气来袭,久病必瘀,因瘀致毒,因毒致变,瘀毒互结,日久成癥是结肠癌的基本病机,“毒”既是病理产物,也是致病因子,所谓“癌毒”常被认为是持续性炎症状态、过量的氧化应激、NLRP3等异常活化后免疫炎症通路激活并释放的大量白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6

(IL-6)等促炎细胞因子,这些物质共同构成了促癌的“炎症微环境”。而“瘀”则不仅指血瘀证候,亦涵盖了微循环障碍、组织缺氧、细胞外基质重塑以及免疫细胞功能受抑等肿瘤微环境的特征^[6]。本研究旨在通过调控线粒体自噬、抑制NLRP3炎症小体活化,为其临床应用提供理论依据。

材料与方法

1 材料

动物 选取6~8周龄C57BL/6雄性小鼠共90只,体质量控制在18~20 g,饲养于兰州兽医研究所动物房(无特定病原体级),动物生产许可证号:SCXK(甘)2020-0010。本实验经中国农业科学院兰州兽医研究所实验动物伦理委员会批准(伦理批号:LVRIAEC-2024-090)。

药品与试剂 解毒地黄汤(熟地8 g、炒山药10 g、

茯苓 5 g、泽泻 5 g、牡丹皮 9 g、木香 5 g、草豆蔻 3 g、党参 9 g、黄芪 15 g、太子参 15 g、金银花 9 g、连翘 9 g、白花蛇舌草 15 g、半枝莲 9 g、醋三棱 10 g、醋莪术 10 g、麸炒白术 15 g、麸炒薏苡仁 10 g) 以 1:10 的药水比, 常法煎煮, 药液浓缩至每 1 mL 药液含生药 1 g; 组织总核糖核酸 (ribonucleic Acid, RNA) 提取试剂盒, 购自上海翊圣生物科技有限公司; 氧化偶氮甲烷 (azoxymethane, AOM) 和葡聚糖硫酸钠 (dextran sulfate sodium, DSS), 均购自北京康瑞纳生物科技有限公司; PTEN 诱导激酶 1 (PTEN-induced kinase 1, PINK1) 和抗 Parkin 抗体, 均购自美国 GeneTex 公司; 抗 B 细胞淋巴瘤-2 蛋白相互作用中心卷曲螺旋蛋白 1 (B-cell lymphoma-2-interacting myosin-like coiled-coil protein 1, Beclin1) 和抗半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1 (cysteiny aspartate-specific protease 1, Caspase-1), 均购自美国 Abcam 公司; 山羊抗兔 IgG (immunoglobulin G, IgG), 浙江购自华安生物技术有限公司; 抗 NLRP3 购自美国 Cell Signaling Technology 公司; 抗 ASC, 购自武汉正能生物技术有限公司; 小鼠 IL-4 (interleukin-4, IL-4) 试剂盒和小鼠 IL-6 试剂盒, 均购自上海酶联生物科技有限公司; 小鼠 IL-10 试剂盒、小鼠 IL-12 试剂盒、小鼠 TNF- α (tumor Necrosis Factor α , TNF- α) 试剂盒和小鼠 IFN- γ (interferon- γ , IFN- γ) 试剂盒, 均购自江苏酶标生物科技有限公司。

仪器 JY600C 电泳仪系统, 北京君意东方电泳设备有限公司产品; Gentier 96E 实时荧光定量 PCR 仪, 陕西西安天隆科技有限公司产品; Multiskan FC 酶标仪, 美国赛默飞世尔科技公司产品; BD FACSCelesta 流式细胞仪, 美国 BD 公司 BD FACSCelesta 产品。

2 实验方法

2.1 模型构建、动物分组与处理方法

适应性喂养结束后, 将 90 只小鼠随机分为 6 组: 对照组, 模型组, 解毒地黄汤低、中、高剂量组、阳性药物柳氮磺胺吡啶 (Sulfasalazine) 组, 每组 15 只。模型构建采用腹腔注射 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ AOM, 注射 1 次, 1 w 后联合 3 个循环 DSS 饲喂 (2% DSS 饮水 1 w + 正常饮水 2 w 为 1 个循环)^[7]。从腹腔注射单剂量 AOM 开始, 对照组给予纯水灌胃, 解毒地黄汤用量低、中、高剂量分别是 $10.53 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $21.06 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $42.12 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 柳氮磺胺吡啶给药量为 $0.455 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

2.2 评价各组小鼠一般情况及体质量

观察小鼠的一般情况, 包括自主活动精神状态等, 记录小鼠体质量变化每周称质量, 实验结束前禁

食 8 h, 进行内眦静脉取血, 颈椎脱臼法处死小鼠后暴露小鼠腹腔剖取结肠并测量长度。每只小鼠开腹后 3 mL 磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffer saline, PBS) 冲洗腹腔后, 吸取 2 mL 以备检测辅助性 T 细胞 1 (helper T cell 1, Th1)、辅助性 T 细胞 2 (helper T cell 2, Th2) 细胞; 待 PBS 冲洗干净后, 观察小鼠成瘤情况, 记录位置、大小和数目。

2.3 HE 染色法评价结肠组织病理形态改变

剖取小鼠结肠以多聚甲醛固定后, 进行石蜡包埋, 然后进行切片及 HE 染色, 封片后显微镜下观察小鼠结肠组织的病理形态学变化, 显微镜下拍照、分析。

2.4 免疫荧光染色法观察结肠组织 PINK1、Parkin、Beclin1 的表达部位及强度

结肠组织包埋, 切片之后将小鼠结肠组织孵育 20 min 以修复组织中的抗原。山羊血清孵育小鼠结肠组织, 再将 PINK1、Parkin、Beclin1 抗体以 1:100 稀释, 4°C 孵育过夜。再孵育二抗山羊抗兔 IgG (1:200), 在室温下孵育 2 h。清洗后, DAPI 孵育切片 5 min, PBS 再次清洗后封片, 置于荧光显微镜下观察并拍照。

2.5 PCR 方法检测测定结肠 NLRP3、ASC、Caspase-1 mRNA 的表达

依据 Trizol 法提取各组结肠组织样本的总 RNA, 逆转录 cDNA, 逆转录产物可直接用于荧光定量 PCR 反应, 进行扩增。将 Trizol 裂解液加入到结肠组织中, 按照试剂盒说明书提取 RNA, 超微光分光光度计检测 RNA 浓度, 再反转录为 cDNA, 进行扩增, 扩增后采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算分析。引物序列见表 1。

2.6 蛋白质印迹法 (Western blot, WB) 检测 PINK1、Parkin、Beclin1、NLRP3、ASC、Caspase-1 的表达

取直肠组织加裂解液, 冰上研磨, 离心后取上清液, 加缓冲液, 变性后 BCA 法测蛋白浓度; 配胶、上样、电泳、转膜后封闭。 4°C 一抗孵育过夜; 一抗孵育

表 1 引物序列信息

Table 1 Primer sequences

Item	F (5'-3')	R (5'-3')	Length (bp)
NLRP3	GCCTTGAAGAAGAGT-GGATGG	CTGCGTGTAGCGACT-GTTG	176
ASC	CTGGAGTCGTATG-GCTTGGA	TGTCTTGGCTGCTG-GTCTC	286
Caspase-1	GGACCCTCAAGTTTT-GCCCT	AACTTGAGCTCCAAC-CCTCG	161
GAPDH	CCCTTAAGAGGGAT-GCTGCC	TACGGCCAAATCCGT-TCACA	124

PINK1、Parkin、Beclin1、NLRP3、ASC、Caspase-1(均以1:1 000稀释)、Actin(1:2 000);二抗(1:1.0×10⁴)孵育;ECL法显影,用Image-J测量灰度值及目标蛋白表达量。

2.7 流式细胞术检测测定 Th1 细胞及 Th2 细胞的表达

将腹腔液离心,弃上清液,混匀后加入等比例的细胞悬液及培养基(各250 μL);恒温孵育,混匀,以1 500 r·min⁻¹离心5 min,弃上清;加入CD4,避光孵育后加入固定A液继续孵育后再以固定B液和抗IFN-γ及IL-4进行核染后,调整浓度后检测Th1和Th2。

2.8 Elisa 法检测 IL-10、IL-4、IL-12、TNF-α 的表达

戊巴比妥钠麻醉后,用眼球取血法取小鼠外周血,离心取上清,-80℃保存,按试剂盒说明检测小鼠外周血IL-4、IL-6、IL-10、IL-12、TNF-α、IFN-γ水平。

3 统计学处理

用GraphPad Prism 9.5进行数据统计及绘图。计量资料均符合正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用单因素方差分析。

结 果

1 解毒地黄汤对模型小鼠死亡率、体质量、肿瘤个数及结肠长度的影响

实验中5只模型组小鼠及4只低剂量组小鼠死亡,中剂量、高剂量及阳性对照组死亡小鼠各1只。各组小鼠干预前及第1周时的体质量,在统计学上差异均无统计学意义(均 $P>0.05$);治疗第2~10周时,与对照组相比,模型组小鼠的体质量显著偏低($P<0.01$),药物干预后除低剂量组,中剂量组、高剂量组及阳性药物组的体质量均显著高于模型组($P<0.05$, $P<0.01$)。与对照组相比,模型组肿瘤数目显著增多,结肠长度显著缩短(均 $P<0.01$),药物干预后,除解毒地黄汤低剂量组,其余各组肿瘤数目

较模型组显著减少,结肠长度显著增加($P<0.05$, $P<0.01$),见表2。

2 解毒地黄汤对模型小鼠病理形态的影响

HE染色显示:对照组小鼠结肠组织腺体排列整齐,仅少量炎症反应细胞浸润;模型组小鼠结肠组织内可见炎症反应细胞浸润明显,出现组织坏死现象,细胞排列混乱、细胞核出现固缩和大小不一的,且有腺癌形成;药物干预后,腺体和细胞核形态及排列逐渐恢复,解毒地黄汤中、高剂量组及阳性药物组,结肠HE染色可见正常腺体结构、炎症反应细胞浸润减少,腺癌数目降低,见图1。

3 解毒地黄汤对模型小鼠对线粒体自噬相关蛋白荧光强度的影响

免疫荧光显示:与对照组相比,模型小鼠结肠组织PINK1、Parkin、Beclin1表达降低;药物干预后,与模型组相比,除解毒地黄汤低剂量组以外,各给药组PINK1、Parkin、Beclin1表达均有所升高,以解毒地黄汤高剂量组效果最明显,高剂量组与模型组各参数比较,在统计学上差异均有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$),见表3。

表2 6组小鼠肿瘤细胞个数及结肠长度的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of the number of tumor cells and colon length in 6 groups of mice($\bar{x} \pm s$)

Groups	n	Tumor numbers	Colon length (cm)
Control	10	—	8.43 ± 0.89
Model	10	3.00 ± 0.67 ^{##}	5.57 ± 0.55 ^{##}
Experimental-L	10	2.70 ± 0.67	6.31 ± 0.54
Experimental-M	10	1.50 ± 0.85 ^{**}	6.92 ± 0.88 [*]
Experimental-H	10	1.30 ± 0.67 ^{**}	7.27 ± 0.89 ^{**}
Sulfasalazine	10	1.60 ± 0.84 ^{**}	6.85 ± 0.63 [*]

AOM/DSS:azoxymethane/dextran sulfate sodium. Control Group: Pure water was administered via gavage; Model group: AOM/DSS; Experimental-L group: 10.53 g·kg⁻¹ Jiedu Dihuang Decoction; Experimental-M group: 21.06 g·kg⁻¹ Jiedu Dihuang Decoction; Experimental-H group: 42.12 g·kg⁻¹ Jiedu Dihuang Decoction; Sulfasalazine: 0.455 g·kg⁻¹ sulfasalazine. Compared with the blank group, ^{##} $P<0.01$; compared with the model group, ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$.

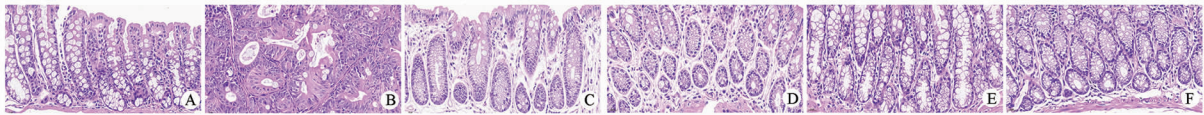


图1 各组小鼠结肠组织病理形态的改变(×200)

Figure 1 Histopathological changes in the colon tissues of mice in each group(×200)

A: Control group; B: Model group; C: Low-dose Jiedu Dihuang Decoction group; D: Medium-dose Jiedu Dihuang Decoction group; E: High-dose Jiedu Dihuang Decoction group; F: Positive drug group.

4 解毒地黄汤对模型小鼠对 NLRP3 炎症小体相关分子 mRNA 的影响

与对照组相比,模型小鼠结肠组织 *NLRP3*、*ASC*、*Caspase - 1* mRNA 表达增高,药物干预后,与模型组相比,除解毒地黄汤低剂量组以外,各给药组 *NLRP3*、*ASC*、*Caspase - 1* mRNA 表达降低,以中药高剂量组最为明显,在统计学上差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),见表 3。

5 解毒地黄汤对线粒体自噬及 NLRP3 炎症小体蛋白的影响

WB 显示,与空白组相比,模型小鼠结肠组织 PINK1、Parkin、Beclin1 蛋白相对表达水平均显著降低, *NLRP3*、*ASC*、*Caspase - 1* 蛋白表达增高,药物

干预后,与模型组相比,除解毒地黄汤低剂量组以外,各给药组 PINK1、Parkin、Beclin1 蛋白相对表达水平有所升高, *NLRP3*、*ASC*、*Caspase - 1* 蛋白相对表达水平显著降低,以解毒地黄汤高剂量组效果最明显,高剂量组与模型组各参数比较,在统计学上差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),见图 2 和表 4。

6 解毒地黄汤对模型小鼠腹腔液 Th1/Th2 的影响

流式细胞术显示:与对照组相比,模型小鼠腹腔液 Th1 计数减少、Th2 计数增加,药物干预后,除中药低剂量组以外,各给药组腹腔液 Th1 计数显著增加, Th2 计数显著减小,以解毒地黄汤高剂量组效果最明显,2 组各参数比较,在统计学上差

表 3 6 组小鼠肿瘤组织线粒体自噬相关分子平均荧光强度及核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 (NLRP3) 炎症小体相关分子基因的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of average fluorescence intensity of mitophagy - related molecules and nucleotide - binding oligomerization domain - like receptor thermal protein domain associated protein 3 (NLRP3) inflammasome - related molecule genes in tumor tissues of 6 groups of mice ($\bar{x} \pm s$)

Groups	Average fluorescence intensity			mRNA		
	PINK1	Parkin	Beclin1	NLRP3	ASC	Caspase - 1
Control	122.99 ± 6.93	138.38 ± 3.84	143.22 ± 9.42	1.01 ± 0.17	1.01 ± 0.19	1.00 ± 0.11
Model	76.39 ± 4.89 ^{##}	83.12 ± 5.01 ^{##}	87.43 ± 3.77 ^{##}	2.06 ± 0.22 ^{##}	3.03 ± 0.16 ^{##}	3.28 ± 0.22 ^{##}
Experimental - L	87.50 ± 9.38	94.11 ± 8.17	100.2 ± 7.11	1.75 ± 0.10	2.69 ± 0.10	2.85 ± 0.08
Experimental - M	98.75 ± 7.13 ^{**}	103.13 ± 8.59 ^{**}	107.92 ± 6.84 ^{**}	1.59 ± 0.11 [*]	1.96 ± 0.14 ^{**}	2.24 ± 0.26 ^{**}
Experimental - H	107.28 ± 6.60 ^{**}	111.27 ± 9.66 ^{**}	122.65 ± 8.36 ^{**}	1.31 ± 0.11 ^{**}	1.54 ± 0.18 ^{**}	1.58 ± 0.22 ^{**}
Sulfasalazine	94.75 ± 7.11 ^{**}	101.27 ± 9.21 ^{**}	105.44 ± 7.55 ^{**}	1.48 ± 0.10 ^{**}	1.89 ± 0.09 ^{**}	1.94 ± 0.16 ^{**}

Compared with the control group, ^{##} $P < 0.01$; compared with the model group, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$.

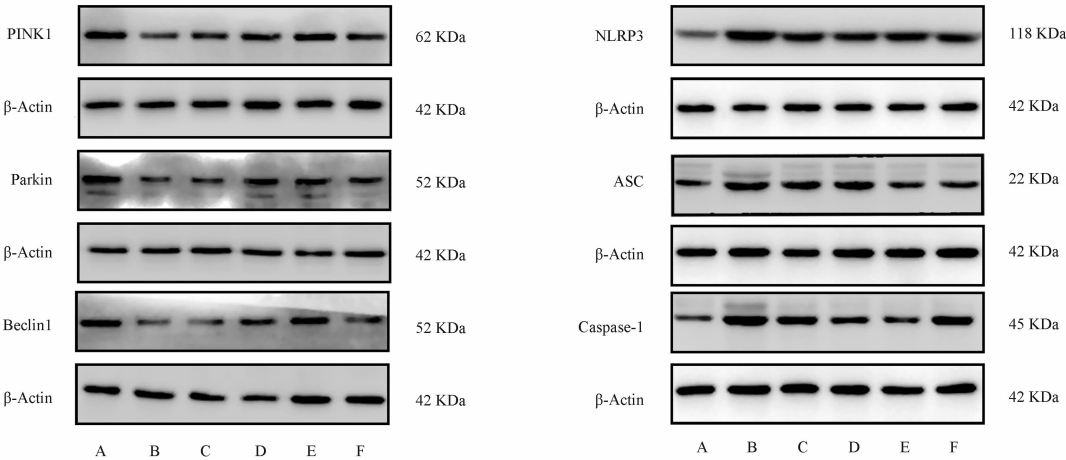


图 2 各组小鼠结肠组织 NLRP3、ASC、Caspase - 1、PINK1、Parkin、Beclin1 的表达

Figure 2 Expression of NLRP3, ASC, Caspase - 1, PINK1, Parkin, and Beclin1 in the colon tissues of mice from each group
A: Blank group; B: Model group; C: Experimental - L group; D: Experimental - M group; E: Experimental - H group; F: Sulfasalazine group.

表5 6组小鼠腹腔液中辅助性T细胞1(Th1)及辅助性T细胞2(Th2)占比的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Comparison of the percentages of helper T cell 1(Th1) and helper T cell 2(Th2) cells in the peritoneal lavage fluid among the six groups of mice($\bar{x} \pm s$)

Groups	Th1/CD4 + T	Th2/CD4 + T
Control	4.78 ± 0.62	0.26 ± 0.07
Model	0.74 ± 0.09 ^{##}	2.05 ± 0.26 ^{##}
Experimental - L	1.34 ± 0.13	1.65 ± 0.18
Experimental - M	1.78 ± 0.21 [*]	1.06 ± 0.11 [*]
Experimental - H	2.89 ± 0.23 [*]	0.57 ± 0.14 [*]
Sulfasalazine	2.47 ± 0.24 [*]	0.68 ± 0.07 [*]

Compared with the control group, ^{##}*P* < 0.01; Compared with the model group, ^{*}*P* < 0.05, ^{**}*P* < 0.01.

表4 6组小鼠肿瘤组织线粒体自噬及NLRP3炎症小体相关蛋白的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Comparison of mitophagy and NLRP3 inflammasome-related proteins in tumor tissues of 6 groups of mice($\bar{x} \pm s$)

Groups	PINK1	Parkin	Beclin1	NLRP3	ASC	Caspase - 1
Control	1.05 ± 0.03	1.00 ± 0.06	1.11 ± 0.09	0.40 ± 0.05	0.59 ± 0.09	0.40 ± 0.04
Model	0.31 ± 0.11 ^{##}	0.29 ± 0.06 ^{##}	0.37 ± 0.09 ^{##}	1.07 ± 0.09 ^{##}	1.24 ± 0.05 ^{##}	1.01 ± 0.17 ^{##}
Experimental - L	0.53 ± 0.06	0.43 ± 0.05	0.52 ± 0.01	0.91 ± 0.14	1.07 ± 0.09	0.99 ± 0.05
Experimental - M	0.72 ± 0.09 [*]	0.58 ± 0.12 [*]	0.70 ± 0.04 [*]	0.79 ± 0.06 [*]	0.98 ± 0.08 [*]	0.63 ± 0.06 [*]
Experimental - H	0.91 ± 0.05 [*]	0.74 ± 0.12 [*]	0.83 ± 0.05 [*]	0.72 ± 0.07 [*]	0.66 ± 0.12 [*]	0.52 ± 0.03 [*]
Sulfasalazine	0.66 ± 0.10 [*]	0.51 ± 0.11 [*]	0.62 ± 0.04 [*]	0.80 ± 0.05 [*]	0.96 ± 0.11 [*]	0.68 ± 0.10 [*]

Compared with the control group, ^{##}*P* < 0.01; Compared with the model group, ^{*}*P* < 0.05, ^{**}*P* < 0.01; PINK1: PTEN-induced kinase 1; Parkin: Parkin RBR E3 ubiquitin protein ligase; Beclin1: Beclin 1 autophagy related; NLRP3: NOD-like receptor pyrin domain containing 3; ASC: Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD; Caspase-1: Cysteine-dependent aspartate-directed protease 1.

表6 6组小鼠外周血炎症因子的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 6 A comparison of peripheral blood inflammatory cytokine levels among the six groups of mice($\bar{x} \pm s$)

Groups	IL - 4 (pg · mL ⁻¹)	IL - 6 (pg · mL ⁻¹)	IL - 10 (pg · mL ⁻¹)	IL - 12 (ng · mL ⁻¹)	TNF - α (pg · mL ⁻¹)	IFN - γ (pg · mL ⁻¹)
Control	26.44 ± 5.64	24.21 ± 2.25	19.06 ± 3.76	55.39 ± 3.47	35.78 ± 13.17	517.72 ± 52.15
Model	48.98 ± 3.78 ^{##}	44.42 ± 2.55 ^{##}	37.67 ± 5.34 ^{##}	28.28 ± 2.33 ^{##}	79.11 ± 6.32 ^{##}	238.67 ± 35.78 ^{##}
Experimental - L	41.67 ± 4.31	39.10 ± 2.89 [*]	32.11 ± 7.50	34.09 ± 2.49 [*]	64.13 ± 13.12	286.57 ± 54.77
Experimental - M	36.39 ± 5.93 [*]	32.85 ± 3.98 [*]	26.28 ± 4.65 [*]	38.53 ± 3.84 [*]	57.44 ± 13.62 [*]	358.59 ± 52.15 [*]
Experimental - H	33.61 ± 4.30 [*]	28.91 ± 1.91 [*]	23.22 ± 4.35 [*]	42.67 ± 3.87 [*]	47.45 ± 10.06 [*]	435.28 ± 73.12 [*]
Sulfasalazine	33.94 ± 5.81 [*]	27.63 ± 1.98 [*]	26.22 ± 6.15 [*]	41.93 ± 4.39 [*]	50.78 ± 10.9 [*]	405.33 ± 39.33 [*]

Compared with the control group, ^{##}*P* < 0.01; Compared with the model group, ^{*}*P* < 0.05, ^{**}*P* < 0.01; IL - 4: Interleukin - 4; IL - 6: Interleukin - 6; IL - 10: Interleukin - 10; IL - 12: Interleukin - 12; TNF - α: Tumor necrosis factor - α; IFN - γ: Interferon - γ.

异均具有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$),见表5。

7 解毒地黄汤对模型小鼠血清炎症因子的影响

Elisa 实验显示:与对照组相比,模型小鼠外周血 IL - 4、IL - 6、IL - 10、TNF - α 水平显著增高、IL - 12、IFN - γ 水平降低,药物干预后,各给药组血清 IL - 6 水平降低而 IL - 12 水平显著增加;除中药低剂量组以外,其余给药组外周血 IL - 4、IL - 10 水平显著降低,IFN - γ 水平增高,且以解毒地黄汤高剂量组效果最明显,高剂量组与模型组各参数比较,在统计学上差异均具有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$),见表6。

讨 论

中医学认为结肠癌属于“癌毒”“癥瘕”范畴,该病病因病机为脏腑受邪,邪气积聚于脏腑,下趋于直肠,最终导致癌邪内蕴日久积聚形成。而对于癌邪久

蕴的转归,结合结肠癌的发病过程,可从以下3个方面认识。第一,邪藏肠中、蕴久成毒。第二,毒积肠内,阻碍气血。第三,毒瘀互结、日久成癥。毒作为一种侵袭力极强的致病因素,极易侵犯周围脏腑经络。瘀血结于肠道,毒邪与瘀血相合,可使毒邪于肠道之内有根附着,瘀血因邪毒相合,导致瘀血具备侵袭力、

穿透性和变化性,瘀与毒结日久癥瘕积聚乃成;因此,结肠癌产生的主要病机可总结为“正虚邪恋、瘀毒互结,日久成癥”^[8-10]。

解毒地黄汤起扶正益气、解毒化瘀之功,契合“正虚、毒蕴、血瘀”的核心病机。本实验显示,解毒地黄汤可以有效减少模型小鼠肿瘤数目,增加结肠长度,可认为解毒地黄汤的“解毒”功效通过以下多维度调控炎症微环境来实现:首先清除“致毒之源”,即清除受损细胞器,从源头减少内源性“毒”物质的产生;其次直接“抑制毒火”即抑制炎症小体的活化,有利于抑制“毒火剧燃”,从而减轻组织炎症损伤。再者“解毒”还在于改善“生毒之壤”即改善局部微循环及微环境。解毒地黄汤发挥“扶正祛毒”的功效,本方通过调节 Th1/Th2 平衡,扶助机体免疫正气,增强其识别和清除“毒邪”,改善肿瘤细胞及促癌微环境的能力。

大量研究证实,NLRP3 炎症小体的活化在炎症性肠病发生发展中起重要作用,通过多靶点抑制 NLRP3 炎症小体的活化,可以减轻结肠炎症反应和缓解盆腔粘连^[11-13]。国内亦有研究发现,NLRP3 炎症小体的活化并进一步介导的炎症级联反应和细胞焦亡参与结肠癌的发生^[14],而线粒体功能及自噬异常可能会造成结肠癌炎症反应。本研究亦显示,解毒地黄汤干预后,线粒体自噬关键蛋白表达增高,NLRP3 炎症小体活化蛋白表达降低,这可能与该方提高了机体免疫清除能力,自噬被激活,受损的线粒体和细胞器被清除,内源性的损伤因子减少,NLRP3 炎症小体的活化程度降低,减轻局部炎症反应,从而降低炎症性结肠癌的发生。

本研究提示:解毒地黄汤能有效改善结肠癌模型小鼠的病理状态、纠正免疫失衡,其分子层面的效应与协同性上调线粒体自噬和抑制 NLRP3 炎症小体活化相关联。解毒地黄汤可以改善结肠癌的炎症微环境,使小鼠各项指标更加接近正常值。本研究聚焦于解毒地黄汤全方的整体药效评价及初步机制探索,证实了该复方在动物模型中的综合疗效。后续我们将以解析该复方的药效物质基础及其协同作用机制为切入点和方向进行着力研究。

参考文献:

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, *et al.* Global cancer statistics 2020; GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71 (3): 209—249.
- [2] STIDHAM R W, HIGGINS P D R. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease [J]. *Clin Colon Rectal Surg*, 2018; 31 (3): 168—178.
- [3] HE S Y, YAN C Q, WANG Z, *et al.* Icariside II relieves radiation enteritis by regulating PINK/Parkin-mediated mitophagy [J/OL]. *Int. Immunopharmacol*, 2025, 146: 113861. 2024 - 12 - 28 [2025 - 09 - 26]. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2024.113861>.
- [4] VAFAEI S, TAHERI H, *et al.* The role of NLRP3 inflammasome in colorectal cancer: Potential therapeutic target [J]. *Clin Transl Oncol*, 2022, 24, (10): 1881—1889.
- [5] CHASSAING B, AITKEN JD, MALLESHAPPA M, *et al.* Dextran sulfate sodium (DSS) - induced colitis in mice [J]. *Curr protoc in immunol*, 2014, 104(1): 15—25.
- [6] 徐兵,裴正学,张海伟. 裴正学教授运用自拟裴氏扶本方体现“异病同治”的临床经验[J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19 (93): 226—228.
- [7] 刘俊杰, 梁家, 庞天舒, 等. 香菇多糖通过 IL-6/STAT3 通路对 AOM/DSS 诱导结肠炎相关结肠癌的抑制作用及机制[J]. 肿瘤防治研究, 2024, 51(11): 908—912.
- [8] 归明彬, 王雅楠, 邹敏, 等. 结肠癌肝肾阴虚证与气血两虚证患者肠道菌群差异性研究[J]. 中国微生态学杂志, 2024, 36 (6): 694—699.
- [9] 邹敏, 王雅楠, 归明彬, 等. 基于 LC-MS 的结肠癌瘀毒内阻证与气血两虚证患者的血清代谢组学研究[J]. 结直肠肛门外科, 2024, 30(1): 42—49.
- [10] 归明彬, 王雅楠, 邹敏, 等. 结肠癌瘀毒内阻证与气血两虚证患者肠道菌群差异性研究[J]. 中国微生态学杂志, 2023, 35 (7): 797—801, 805.
- [11] 崔锦珠, 何晓金, 覃小华, 等. 龙血竭对小鼠急性溃疡性结肠炎及结肠黏膜 NLRP3/Caspase-1 焦亡通路的影响[J]. 中成药, 2025, 47(5): 1647—1652.
- [12] 宋英英, 郑佳慧, 艾金霞, 等. 基于 TLR4/NF- κ B/NLRP3 信号通路的马齿苋生物碱对溃疡性结肠炎作用机制[J]. 北华大学学报(自然科学版), 2025, 26(3): 322—328.
- [13] 赵冠宇, 辛蕊华, 王颖, 等. 中药复方调控 NLRP3 炎症小体相关信号通路治疗溃疡性结肠炎研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2025, 31(17): 305—314.
- [14] 陈俣晴. OSW-1 通过 ROS/NLRP3 信号通路诱导结肠癌细胞焦亡的机制研究[D]. 辽宁 大连: 大连医科大学, 2023.

(本文编辑:王珊 收稿日期 2025-09-29)