

基于 TXNIP/NLRP3/Caspase-1/GSDMD 通路探讨归芪益元膏联合顺铂对 Lewis 肺癌小鼠的抑瘤作用

郭琼琼¹, 李文杰¹, 李金田^{1*}, 梁建庆², 田萍¹, 胡蓉¹, 东旭超¹, 薛美昊¹, 许龙鑫¹

(1. 甘肃中医药大学中医临床学院, 甘肃兰州 730000; 2. 甘肃中医药大学基础医学院, 甘肃兰州 730000)

摘要: **目的** 探讨归芪益元膏联合顺铂对 Lewis 肺癌小鼠的抑瘤作用。**方法** 选取 10 只 C57BL/6J 小鼠作为空白组, 60 只建立 Lewis 肺癌小鼠移植瘤模型, 模型建立成功后分为模型组、顺铂组 (5 mg/kg)、归芪益元膏高剂量组 (6.6 g/kg) 和归芪益元膏低、中、高剂量联合顺铂组 (1.6、3.3、6.6 g/kg+5 mg/kg), 每组 10 只。空白组和模型组灌胃给予生理盐水, 归芪益元膏灌胃给药 (每天 1 次), 顺铂腹腔注射给药 (隔天 1 次)。给药 14 d 后处死小鼠, 观察一般情况及体质量变化; 称取肿瘤质量, 计算抑瘤率; HE 染色观察肿瘤组织病理变化; ELISA 法检测血清 IL-1 β 、IL-18 及 HMGB1 水平; 透射电镜观察肿瘤焦亡情况; 免疫荧光定位肿瘤组织 TXNIP、GSDMD-N 表达; Western blot 法检测肿瘤组织 TXNIP、NLRP3、Caspase-1、cleaved Caspase-1、GSDMD、GSDMD-N 蛋白表达。**结果** 与模型组比较, 顺铂组和归芪益元膏各剂量联合顺铂组小鼠肿瘤质量降低 ($P<0.05$), 抑瘤率提高; 肿瘤组织坏死增加, 呈现焦亡特征性形态; 血清 IL-1 β 、IL-18、HMGB1 水平升高 ($P<0.05$); 焦亡相关蛋白 TXNIP、NLRP3、Caspase-1、cleaved Caspase-1、GSDMD、GSDMD-N 表达升高 ($P<0.05$); 其中以归芪益元膏高剂量联合顺铂组效果最优 ($P<0.05$)。**结论** 归芪益元膏能够增加顺铂的敏感性, 二者联用具有协同作用, 其对 Lewis 肺癌小鼠的抑瘤机制可能与调控 TXNIP/NLRP3/Caspase-1/GSDMD 通路有关。

关键词: 归芪益元膏; 顺铂; 肺癌; Lewis 细胞; TXNIP/NLRP3/Caspase-1/GSDMD 通路; 焦亡

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2025)09-2894-08

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2025.09.011

Investigation of tumor-suppressive mechanism of Guiqi Yiyuan Extract combined with cisplatin in Lewis lung cancer mice via TXNIP/NLRP3/Caspase-1/GSDMD pathway

GUO Qiong-qiong¹, LI Wen-jie¹, LI Jin-tian^{1*}, LIANG Jian-qing², TIAN Ping¹, HU Rong¹, DONG Xu-chao¹, XUE Mei-hao¹, XU Long-xin¹

(1. Clinical School of Traditional Chinese Medicine, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China; 2. School of Basic Medical Sciences, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China)

ABSTRACT: AIM To investigate the tumor-suppressive mechanism of Guiqi Yiyuan Extract combined with cisplatin in Lewis lung cancer mice. **METHODS** Ten intact C57BL/6J mice were assigned to the blank group. Sixty additional mice were developed into Lewis lung cancer models bearing transplanted tumor and subsequently allocated into the model group, the cisplatin group (5 mg/kg), the high-dose Guiqi Yiyuan Extract group (6.6 g/kg), and the low-dose, medium-dose and high-dose Guiqi Yiyuan Extract combined with cisplatin group (1.6,

收稿日期: 2024-10-29

基金项目: 国家自然科学基金 (82160872); 甘肃省教育厅“双一流”科研重点项目 (GSSYLXM-05); 甘肃省中医药研究中心开放课题 (zyzx-2020-zx17); 2022 年度中医学一级学科“岐黄英才”导师专项基金 (2022-13)

作者简介: 郭琼琼 (1997—), 女, 博士生, 研究方向为经方防治肺系疾病。Tel: 15838817756, E-mail: 1983905418@qq.com

* **通信作者:** 李金田 (1964—), 男, 硕士, 教授, 博士生导师, 研究方向为经方防治肺系疾病。Tel: 13609385352, E-mail: ljtg@gszy.edu.cn

3.3, 6.6 g/kg+5 mg/kg), with 10 mice in each group. Mice in the blank and model groups received saline *via* daily gavage, while treatment groups were administered Guiqi Yiyuan Extract orally (once daily), and cisplatin injection intraperitoneally (once every other day). After 14 days of drug administration, mice were euthanized for endpoint analysis. The following assessments were conducted: general health status and body weight changes monitored throughout the study period; tumor excision and weighing for inhibition rate calculation; histopathological examination of tumors *via* hematoxylin-eosin (HE) staining; serum quantification of IL-1 β , IL-18 and HMGB1 by ELISA; ultrastructural analysis of tumor cell death using transmission electron microscopy (TEM); spatial localization of TXNIP and GSDMD-N in tumor sections *via* immunofluorescence (IF); and Western blot detection of TXNIP, NLRP3, Caspase-1, cleaved Caspase-1, GSDMD, GSDMD-N protein expressions in tumor tissues.

RESULTS Compared to the model group, the cisplatin group and all combination therapy groups exhibited significant reduction in tumor weight ($P < 0.05$) and increased tumor suppression rate; enhanced tumor tissue necrosis with characteristic pyroptotic morphology; elevated serum levels of IL-1 β , IL-18 and HMGB1 ($P < 0.05$); and upregulated expressions of pyroptosis-associated proteins TXNIP, NLRP3, Caspase-1, cleaved Caspase-1, GSDMD and GSDMD-N ($P < 0.05$). The high dose combination group demonstrated optimal therapeutic efficacy ($P < 0.05$). **CONCLUSION** Guiqi Yiyuan Extract enhances cisplatin sensitivity, demonstrating synergistic anti-tumor effects in Lewis lung carcinoma-bearing mice. This combinatorial therapeutic effect likely involves modulation of the TXNIP/NLRP3/Caspase-1/GSDMD pathway.

KEY WORDS: Guiqi Yiyuan Extract; cisplatin; lung cancer; Lewis cells; TXNIP/NLRP3/ Caspase-1/GSDMD pathway; pyroptosis

2022年癌症的最新数据显示,肺癌是导致全球癌症发病率居高不下的主要原因,每年有250万的新增病例,占全球癌症的12.4%,死亡率也是所有癌症之首,约有180万人死于肺癌,占所有癌症相关死亡的18.7%^[1]。肺癌早期症状隐匿,多数患者就诊时已属晚期,晚期肺癌患者的整体5年生存率仅在20%左右^[2]。以铂类为主的化疗是晚期肺癌治疗的主要手段之一,能够有效延长患者生存期,带来生存获益^[3]。而化疗也会产生诸多不良反应,如胃肠道反应、骨髓抑制及肝肾毒性等,严重影响患者的生存质量^[4]。因此,亟需一种安全有效的治疗方法应对肿瘤临床治疗中出现的挑战。

中药资源丰富、安全可靠,中药活性成分对肿瘤具有抑制作用,可提升机体免疫力。研究已证实中西医结合治疗可以提升化疗药物的敏感性,减轻毒副反应,减少并发症^[5-6]。归芪益元膏是李金田教授以《医学心悟》中黄芪汤为本加当归化裁而来,全方共奏固本培元、养血活血、益气滋阴之效。课题组前期研究发现,该方对放射后损伤及旁效应损伤有防护作用^[7],同时又可以增强顺铂对肿瘤的杀伤力,促进癌细胞凋亡^[8]。本研究将建立Lewis肺癌移植瘤模型,从焦亡角度探讨归芪益元膏联合化疗药物对肺癌的干预效应,以期深入了

解肺癌的发病机制,更好地为临床提供科研实验支撑。

1 材料

1.1 动物与细胞株 SPF级雄性C57BL/6J小鼠,6~8周龄,体质量(20 \pm 2)g,购于斯贝福(北京)生物技术有限公司[实验动物生产许可证号SCXK(京)2019-0010],饲养于甘肃中医药大学动物实验中心[实验动物使用许可证号SYXK(甘)2021-0004],温度20~25 $^{\circ}$ C,相对湿度50%~55%,自由进食和饮水。动物实验经甘肃中医药大学动物伦理委员会批准(批准号SY2023-769)。小鼠Lewis肺癌细胞(批号CL-0140),购于武汉普诺赛生命科技有限公司,在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂培养箱中孵育。

1.2 药物 归芪益元膏由黄芪30g、当归15g、麦冬15g、人参15g、熟地15g、枸杞子15g、五味子10g组成,药材购自甘肃中医药大学附属医院,由兰州和盛堂制药股份有限公司制备。药材加水提取2次,加水量分别为8、6倍,每次煎煮2h,合并2次药液,减压浓缩成清膏后,加入清膏量0.2%的苯甲酸混匀,另将蜂蜜炼至中等程度,再与含苯甲酸的清膏混匀,炼至“挂旗”状态,即得归芪益元膏,每1mL药膏相当于原药材0.767g^[9-10]。注射用顺铂(冻干型,批号2E0156B03,规

格 20 mg/瓶), 购于齐鲁制药有限公司。

1.3 试剂 胎牛血清(长沙赛尔博克斯生物科技有限公司, 批号 2024050801); Omni-Easy™即用型 BCA 蛋白定量试剂盒(上海雅酶生物医药科技有限公司, 批号 03831430); 核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 (nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor pyrin domain containing 3, NLRP3) 抗体(英国 Abcam 公司, 批号 1007080-49); 消皮素 D (gasdermin D, GSDMD) /消皮素 D 的 N 端结构域 (N-terminal domain of gasdermin D, GSDMD-N) 抗体(美国 Affinity 公司, 批号 55h2355); 硫氧还蛋白相互作用蛋白 (thioredoxin-interacting protein, TXNIP)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1 (cysteine aspartic acid protease-1, Caspase-1) /切割型 (cleaved) Caspase-1、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体、二抗山羊抗兔 IgG、山羊抗鼠 IgG (美国 ImmunoWay 公司, 批号 B2201RC9、B4301、3673F16F12、B0203、B011120); 8% 和 10% PAGE 凝胶快速制备试剂盒 [翌圣生物科技(上海)股份有限公司, 批号 P6301010、P1403070]; 白细胞介素 (interleukin, IL) -1 β 、IL-18、高迁移率族蛋白 B1 (high mobility group box 1, HMGB1) ELISA 试剂盒(江苏酶免生物科技有限公司, 批号 2312M27、2312M13、2312M40)。

1.4 仪器 低温型研磨仪(武汉赛维尔生物科技有限公司, 型号 SWE-FP); 低温高速离心机(美国 Kendro 公司, 型号 D37520); 电泳仪、全能型蛋白转印系统、全能型成像系统、酶标仪(美国 Bio-Rad 公司, 型号 041BR170297、Trans-Blot Turb、ChemiDoc MP、CYTAION1); 正置荧光显微镜(日本尼康公司, 型号 C1000); 透射电子显微镜(日本电子公司, 型号 1400)。

2 方法

2.1 Lewis 肺癌小鼠模型建立 取出 Lewis 细胞解冻、复苏, 用配备好的完全培养基 (DMEM 高糖培养基中加入 10% 胎牛血清和 1% 青链霉素混合液) 进行培养、传代, 孵育至足够数量和密度后, 胰蛋白酶消化, 1 000 r/min 离心 5 min, 用 PBS 配制成 1×10^7 /mL 细胞悬液, 接种于小鼠右前腋下, 每只 0.2 mL^[11]。除 10 只空白组小鼠外, 其余 60 只小鼠均建立 Lewis 肺癌模型。接种 7 d 左右, 摸到皮下有明显的 3~5 mm³ 米粒样凸起, 即造模成功^[12]。

2.2 分组及给药 将造模成功的 60 只肺癌荷瘤小鼠按照随机数字表法分为模型组、顺铂组、归芪益元膏高剂量组和归芪益元膏低、中、高剂量联合顺铂组, 每组 10 只。根据小鼠和人体表面积剂量换算, 归芪益元膏低、中、高剂量分别为 1.6、3.3、6.6 g/kg, 每只 0.2 mL, 每天灌胃 1 次; 空白组、模型组每天灌胃等量生理盐水; 顺铂以 5 mg/kg 腹腔注射, 每只 0.2 mL, 隔天 1 次, 共给药 14 d。第 15 天, 小鼠眼球取血后, 颈椎脱臼处死, 剥取肿瘤组织, 冲洗干净后称重, 固定、冻存待用。

2.3 指标检测

2.3.1 一般情况 给药期间, 每天观察和记录小鼠的生长状态, 活动情况, 进食、饮水量等, 每 2 d 称定 1 次体质量。

2.3.2 肿瘤质量及抑瘤率 末次给药 24 h 后, 剥离肿瘤组织, 生理盐水冲洗, 用滤纸将表面多余液体、脂肪吸擦干净, 准确称定质量, 计算肿瘤抑制率。抑瘤率 = [(模型组平均肿瘤质量 - 给药组平均肿瘤质量) / 模型组平均肿瘤质量] $\times 100\%$ ^[13]。

2.3.3 HE 染色观察肿瘤组织病理变化 肿瘤组织于 4% 多聚甲醛中固定, 石蜡包埋、切片, 二甲苯脱蜡, 分别用苏木素液和伊红染色液进行染色, 于光学显微镜下观察肿瘤组织形态学变化。

2.3.4 ELISA 法检测血清 IL-1 β 、IL-18 及 HMGB1 水平 小鼠全血静置 30 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心, 取上层血清, 严格按照 ELISA 试剂盒方法检测血清 IL-1 β 、IL-18 及 HMGB1 水平。

2.3.5 透射电镜观察肿瘤组织焦亡情况 将肿瘤组织切成 1 mm \times 1 mm 左右的样品, 2.5% 戊二醛固定, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存, 脱水, 包埋, 烘箱内固化, 切成 70 nm 厚的切片, 3% 醋酸铀-枸橼酸铅双染色, 于透射电镜下观察并拍照。

2.3.6 免疫荧光定位肿瘤组织 TXNIP、GSDMD-N 表达 固定肿瘤组织, 梯度酒精进行脱水, 二甲苯等透明剂处理, 石蜡包埋, 抗原修复, 5% 正常山羊血清封闭切片上未被抗体结合的位点, 滴加一抗孵育过夜, PBS 洗涤, 加入二抗室温避光孵育, 再次用 PBS 洗涤, DAPI 染核, 使用抗荧光衰减封片剂封片, 于荧光显微镜下观察。蓝色 DAPI 通道代表细胞核, 红色通道代表阳性表达指标。

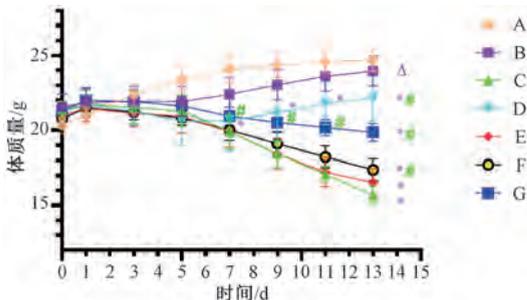
2.3.7 Western blot 法检测肿瘤组织 TXNIP、NLRP3、Caspase-1、cleaved Caspase-1、GSDMD、GSDMD-N 蛋白表达 称取 0.2 g 组织, 4 $^{\circ}\text{C}$ 研磨并离心后, 取上清液, BCA 法测定蛋白浓度, 进行

归一化处理，制备蛋白样品。蛋白上样，电泳，转膜，室温下脱脂奶粉溶液封闭 2.5 h，TBST 清洗 3 次，加入一抗 TXNIP (1 : 1 000)、NLRP3 (1 : 1 000)、GSDMD (1 : 1 000)、GSDMD-N (1 : 1 000)、Caspase-1 (1 : 1 000)、cleaved Caspase-1 (1 : 1 000)、GAPDH (1 : 5 000) 抗体 4 ℃ 孵育过夜，次日 TBST 清洗，滴加兔二抗 (1 : 8 000) 或鼠二抗 (1 : 8 000)，室温下摇床孵育 2 h，TBST 清洗后进行曝光，通过 Image J 软件分析条带灰度值。

2.4 统计学分析 通过 GraphPad Prism 10.0 软件进行处理，计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示，根据正态性和方差齐性检验，多组间比较采用单因素方差分析，方差齐时采用最小显著性差异法 (LSD) 检验。 $P < 0.05$ 差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 归芪益元膏联合顺铂对 Lewis 肺癌小鼠一般情况及体质量的影响 空白组小鼠皮毛紧致光亮，活动灵活，饮食正常，体质量逐渐增加；各造模组小鼠皮毛疏松灰暗，有掉毛现象，喜抱团蜷缩，活动和饮食都不同程度减少，体质量下降，给药末期，部分小鼠出现失温，尤以顺铂组最为严重，而归芪益元膏高剂量组、归芪益元膏高剂量联合顺铂组小鼠状态相对较好。与模型组比较，顺铂组生长状况差，体质量下降 ($P < 0.05$)，归芪益元膏高剂量组小鼠状态略优于模型组，体质量呈上升趋势，但低于模型组；与顺铂组比较，除归芪益元膏低剂量联合顺铂组外，各联合给药组小鼠生长状况较好，体质量虽呈下降趋势，但下降微缓，归芪益元膏高剂量联合顺铂组体质量总体水平高于顺铂组 ($P < 0.05$)。结果见图 1。

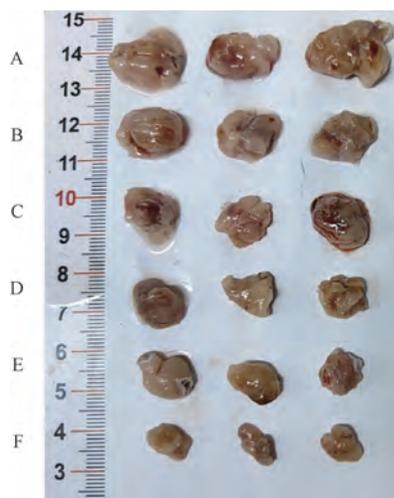


注：A 为空白组，B 为模型组，C 为顺铂组，D 为归芪益元膏高剂量组，E~G 分别为归芪益元膏低、中、高剂量联合顺铂组。与空白组比较， $\Delta P < 0.05$ ；与模型组比较， $* P < 0.05$ ；与顺铂组比较， $\# P < 0.05$ 。

图 1 各组小鼠体质量变化 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 1 Changes of body weight of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

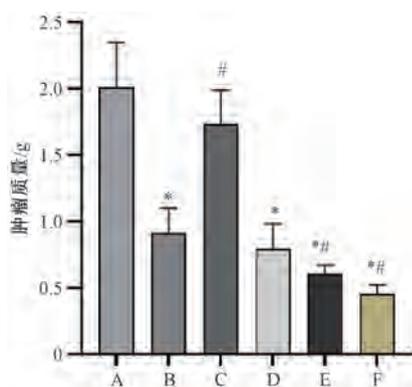
3.2 归芪益元膏联合顺铂对 Lewis 肺癌小鼠肿瘤质量及抑瘤率的影响 与模型组比较，顺铂组和归芪益元膏各剂量联合顺铂组小鼠肿瘤质量均降低 ($P < 0.05$)；与顺铂组比较，归芪益元膏中、高剂量联合顺铂组小鼠肿瘤质量降低更显著 ($P < 0.05$)，见图 2~3。顺铂组、归芪益元膏高剂量组和归芪益元膏低、中、高剂量联合顺铂组抑瘤率分别为 54.38%、13.61%、60.31%、69.59%、77.35%。



注：A 为模型组，B 为顺铂组，C 为归芪益元膏高剂量组，D~F 分别为归芪益元膏低、中、高剂量联合顺铂组。

图 2 各组小鼠肿瘤组织实体图

Fig. 2 Solid diagram of tumor tissue of mice in each group



注：A 为模型组，B 为顺铂组，C 为归芪益元膏高剂量组，D~F 分别为归芪益元膏低、中、高剂量联合顺铂组。与模型组比较， $* P < 0.05$ ；与顺铂组比较， $\# P < 0.05$ 。

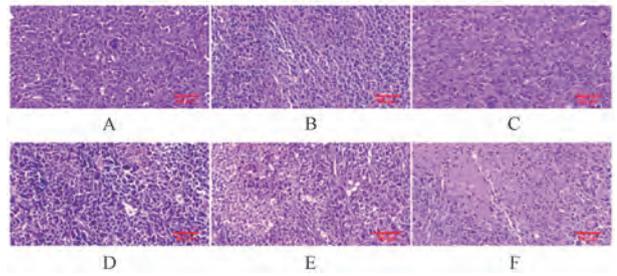
图 3 各组小鼠肿瘤质量比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 3 Comparison of mouse tumor weight in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

3.3 归芪益元膏联合顺铂对 Lewis 肺癌小鼠肿瘤组织病理形态的影响 模型组肿瘤细胞分布呈实体状，排列紧密，轮廓清晰，核大深染，核分裂像明显，局部见瘤巨细胞；与模型组比较，各给药组肿

瘤细胞都出现不同程度的损伤，细胞核逐渐呈现空泡状，肿瘤组织内有散在的凋亡细胞，归芪益元膏高剂量组损伤最轻；顺铂组肿瘤细胞分布呈实体状、片状，排列稍紧密，大小不一，核分裂像多见，中央可见片状坏死；与顺铂组比较，各联合给药组肿瘤细胞排列较疏松，坏死增加，其中归芪益元膏高剂量联合顺铂组坏死程度最为严重，见图4。

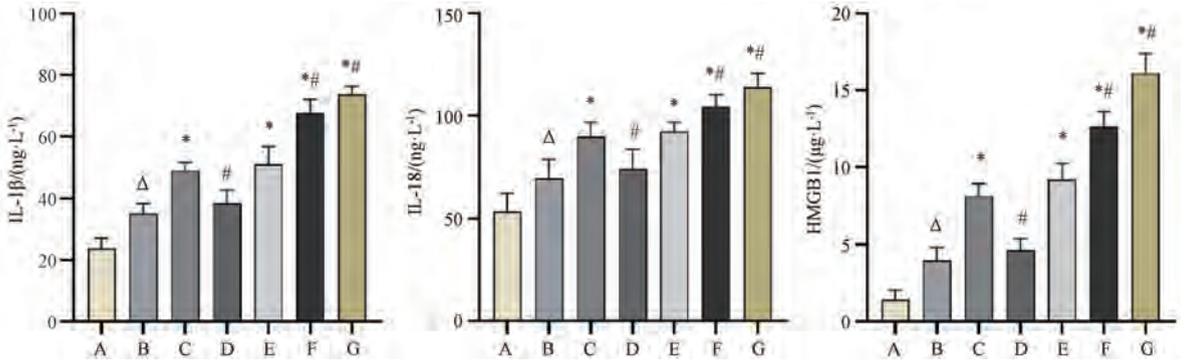
3.4 归芪益元膏联合顺铂对 Lewis 肺癌小鼠血清 IL-1 β 、IL-18 及 HMGB1 水平的影响 与空白组比较，模型组小鼠血清 IL-1 β 、IL-18 及 HMGB1 水平均升高 ($P<0.05$)；与模型组比较，顺铂组和归芪益元膏各剂量联合顺铂组小鼠血清 IL-1 β 、IL-18 及 HMGB1 水平升高 ($P<0.05$)；与顺铂组比较，归



注：A 为模型组，B 为顺铂组，C 为归芪益元膏高剂量组，D~F 分别为归芪益元膏低、中、高剂量联合顺铂组。

图4 各组小鼠肿瘤组织病理形态变化 (HE 染色, $\times 400$)
Fig. 4 Pathological changes of tumor tissue in mice in each group (HE staining, $\times 400$)

芪益元膏中、高剂量联合顺铂组 IL-1 β 、IL-18 及 HMGB1 水平升高更显著 ($P<0.05$)，见图5。



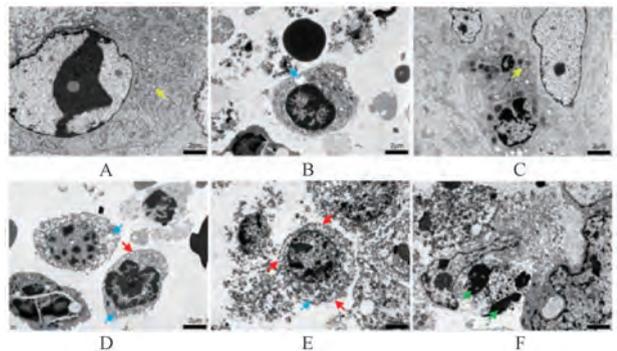
注：A 为空白组，B 为模型组，C 为顺铂组，D 为归芪益元膏高剂量组，E~G 分别为归芪益元膏低、中、高剂量联合顺铂组。与空白组比较， $\Delta P<0.05$ ；与模型组比较，* $P<0.05$ ；与顺铂组比较，# $P<0.05$ 。

图5 各组小鼠血清 IL-1 β 、IL-18 及 HMGB1 水平比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Fig. 5 Comparison of mouse serum IL-1 β , IL-18 and HMGB1 levels in each group ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

3.5 归芪益元膏联合顺铂对 Lewis 肺癌小鼠肿瘤组织超微结构的影响 模型组肿瘤组织结构致密，核仁较大且轮廓清晰，线粒体数量较多，膜结构完整，部分线粒体嵴断裂；与模型组比较，各给药组肿瘤组织有不同程度的损伤，细胞核逐渐皱缩深染、崩解，线粒体和内质网数量减少，线粒体嵴断裂，自噬，并空泡化，胞浆可见多处电子透亮区 (即焦亡小体)，细胞器逐渐消失，膜上出现孔隙，细胞内容物渗出；其中归芪益元膏高剂量联合顺铂组损伤程度最为严重，细胞轮廓消失，核仁崩解，核膜消失，染色质分散，线粒体萎缩深染，染色质分散，细胞器丢失，见图6。

3.6 归芪益元膏联合顺铂对 Lewis 肺癌小鼠肿瘤组织 TXNIP、GSDMD-N 荧光表达的影响 与模型组比较，顺铂组和归芪益元膏各剂量联合顺铂组小鼠肿瘤组织 TXNIP、GSDMD-N 荧光表达量均增加 ($P<0.05$)；与顺铂组比较，归芪益元膏中、高剂

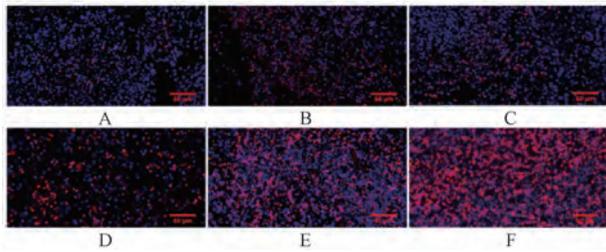


注：A 为模型组，B 为顺铂组，C 为归芪益元膏高剂量组，D~F 分别为归芪益元膏低、中、高剂量联合顺铂组。黄色箭头指示线粒体嵴断裂、自噬，蓝色箭头指示焦亡小体，红色箭头指示膜孔隙，绿色箭头指示核仁崩解、染色质分散。

图6 各组小鼠肿瘤组织电镜图 ($\times 2500$)

Fig. 6 Electron microscopic images of tumor tissues in each group ($\times 2500$)

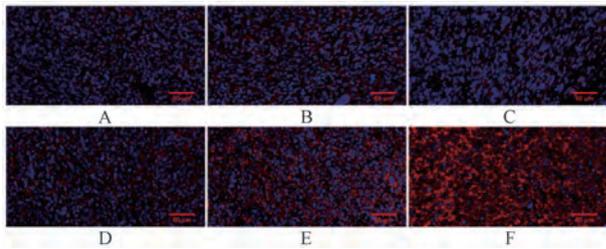
量联合顺铂组小鼠肿瘤组织 TXNIP、GSDMD-N 荧光表达量增加更显著 ($P<0.05$)，见图7~9。



注：A为模型组，B为顺铂组，C为归芪益元膏高剂量组，D~F分别为归芪益元膏低、中、高剂量联合顺铂组。

图7 各组小鼠肿瘤组织 TXNIP 荧光表达 (×400)

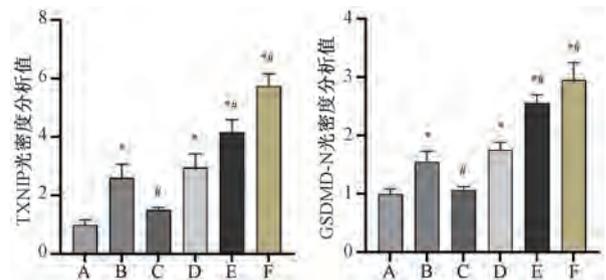
Fig. 7 Fluorescence expression of TXNIP in mouse tumor tissues in each group (×400)



注：A为模型组，B为顺铂组，C为归芪益元膏高剂量组，D~F分别为归芪益元膏低、中、高剂量联合顺铂组。

图8 各组小鼠肿瘤组织 GSDMD-N 荧光表达 (×400)

Fig. 8 Fluorescence expression of GSDMD-N in mouse tumor tissues in each group (×400)



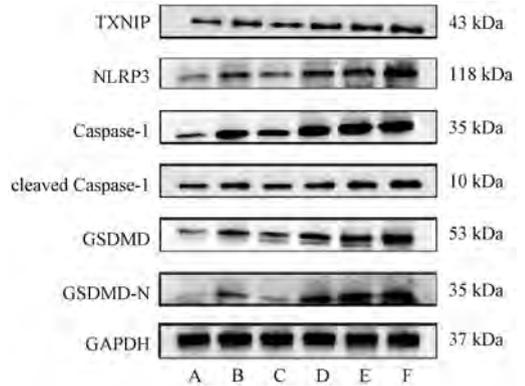
注：A为模型组，B为顺铂组，C为归芪益元膏高剂量组，D~F分别为归芪益元膏低、中、高剂量联合顺铂组。与模型组比较，* $P < 0.05$ ；与顺铂组比较，# $P < 0.05$ 。

图9 各组小鼠肿瘤组织 TXNIP、GSDMD-N 荧光表达比较 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 9 Comparison of fluorescence expressions of TXNIP and GSDMD-N in mouse tumor tissues in each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.7 归芪益元膏联合顺铂对 Lewis 肺癌小鼠肿瘤组织 TXNIP、NLRP3、Caspase-1、cleaved Caspase-1、GSDMD、GSDMD-N 蛋白表达的影响 与模型组比较，顺铂组及归芪益元膏各剂量联合顺铂组小鼠肿瘤组织 TXNIP、NLRP3、Caspase-1、cleaved Caspase-1、GSDMD、GSDMD-N 蛋白表达升高 ($P < 0.05$)；与顺铂组比较，归芪益元膏中、高剂

量联合顺铂组小鼠肿瘤组织 TXNIP、NLRP3、Caspase-1、cleaved Caspase-1、GSDMD、GSDMD-N 蛋白表达升高更显著 ($P < 0.05$)，表明归芪益元膏与顺铂联用可以影响焦亡相关蛋白表达，增强顺铂对肿瘤的抑制作用，见图 10~11。



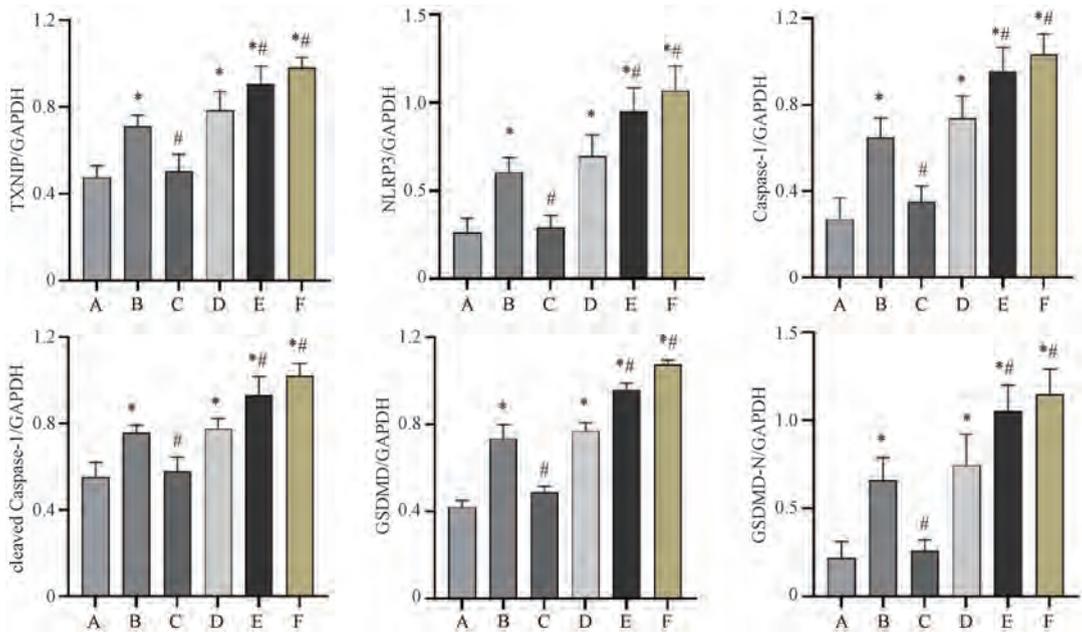
注：A为模型组，B为顺铂组，C为归芪益元膏高剂量组，D~F分别为归芪益元膏低、中、高剂量联合顺铂组。

图10 各组小鼠肿瘤组织 TXNIP、NLRP3、Caspase-1、cleaved Caspase-1、GSDMD、GSDMD-N 蛋白条带

Fig. 10 Protein bands of TXNIP, NLRP3, Caspase-1, cleaved Caspase-1, GSDMD and GSDMD-N in mouse tumor tissues in each group

4 讨论

中医典籍中并无肺癌病名，依据其咳嗽、咳痰、咯血及喘息等症状，可归入“咳嗽”“痰饮”“肺积”“癥瘕”等范畴^[14]。正虚与邪实是肺癌发生发展的两大条件，毒、瘀、痰、热、虚是其主要病理因素^[15]。化疗药物多具有寒热属性，属“药毒”“邪毒”范畴，治疗中起“以毒攻毒”的效果，虽可祛除癌毒，但也会使气、血、阴津等衰少，属“虚虚之治疗”^[16]。研究发现，气阴两虚是晚期肺癌患者及化疗后患者最为常见的证型，故肺癌治疗当以扶正培元为核心，侧重气阴双补，兼以攻逐实邪。归芪益元膏方中黄芪、当归益气补血，为君药；人参、熟地黄补气生津，填精益髓，为臣药；枸杞子、麦冬补益肝肾，滋阴润肺，为佐药；五味子敛固肺气，为使药，共奏固本培元、益气养阴之效。前期在临床诊疗中已发现归芪益元膏联合化疗药物对于气阴两虚型肺癌患者疗效显著^[17]。本实验结果显示，顺铂单独给药后小鼠体质质量下降，活动摄食减少，而归芪益元膏联合顺铂给药后小鼠体质质量下降减缓，活动和饮食量增加，证实归芪益元膏可以缓解顺铂毒性，改善小鼠一般情况。



注：A 为模型组，B 为顺铂组，C 为归芪益元膏高剂量组，D~F 分别为归芪益元膏低、中、高剂量联合顺铂组。与模型组比较，* $P < 0.05$ ；与顺铂组比较，# $P < 0.05$ 。

图 11 各组小鼠肿瘤组织 TXNIP、NLRP3、Caspase-1、cleaved Caspase-1、GSDMD、GSDMD-N 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 11 Comparison of TXNIP, NLRP3, Caspase-1, cleaved Caspase-1, GSDMD and GSDMD-N protein expressions in tumor tissues of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

近年来，细胞焦亡在肺癌治疗中展现出巨大潜力。焦亡是一种炎性程序性死亡，NLRP3 炎症小体激活后，通过 Caspase-1/4/5/11 剪切激活 GSDMD，在细胞膜上形成孔洞，导致细胞膨胀、破裂，内容物释放^[18-19]。TXNIP/NLRP3/Caspase-1/GSDMD 通路是介导细胞焦亡的经典通路^[20]。TXNIP 在癌症中通常低表达，而其过度表达可抑制癌细胞增殖^[21]。氧化应激是肺癌的发病机制之一。在氧化应激情况下，TXNIP 将与硫氧还蛋白 (thioredoxin, TRX) 分离并结合 NLRP3，激活 NLRP3 炎症小体，驱动抗肿瘤免疫反应并诱导焦亡介导的肿瘤细胞死亡^[22]。GSDMD 是焦亡的关键执行者，裂解后 GSDMD 的 N 端片段迁移到细胞膜上穿孔，改变癌细胞生存环境，抑制肺癌细胞的生长^[23-24]。本研究结果显示，归芪益元膏联合顺铂提高了小鼠抑瘤率，促进了肿瘤细胞死亡，表明归芪益元膏具有显著的化疗增敏作用，而联合给药组小鼠肿瘤组织出现明显焦亡特征，TXNIP、NLRP3、Caspase-1、cleaved Caspase-1、GSDMD 和 GSDMD-N 焦亡相关因子的表达升高，以归芪益元膏高剂量联合顺铂组效果最佳，提示归芪益元膏联合顺铂可能促进焦亡反应发挥抗肿瘤作用。

焦亡诱导的炎症因子释放具有双重作用，适度焦亡可激活抗肿瘤免疫反应，促进肿瘤冷环境向热环境转变^[22]，但过度焦亡则导致免疫抑制或促癌效应^[25]。本研究结果显示，联合给药组小鼠血清 IL-1 β 、IL-18 及 HMGB1 水平升高，与适度焦亡激活抗肿瘤免疫反应的观点一致。然而，归芪益元膏单独使用时，焦亡相关分子表达及抑瘤率与模型组相比无明显变化，表明其抗肿瘤作用主要通过与顺铂联用实现，发挥中药成分多靶点、多途径的优势，增强顺铂的敏感性，产生协同作用。

综上所述，归芪益元膏能够有效抑制荷瘤小鼠移植瘤生长，提高化疗小鼠生存质量，其作用可能与激活 TXNIP/NLRP3/Caspase-1/GSDMD 通路增强顺铂的抗肿瘤效果有关。

参考文献：

- [1] Bray F, Laversanne M, Sung H, *et al.* Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2024, 74(3): 229-263.
- [2] 中华医学会肿瘤学分会, 中华医学会杂志社. 中华医学会肿瘤学分会肺癌临床诊疗指南 (2021 版) [J]. *中华肿瘤杂志*, 2021, 43(6): 591-621.

- [3] 赵恒贻, 刘鹏飞, 程 峰, 等. 非小细胞肺癌患者术后辅助化疗的研究进展[J]. 世界复合医学, 2022, 8(8): 195-198.
- [4] 张 俊. 化疗不良反应的预防和处理[J]. 健康向导, 2023, 29(4): 52-53.
- [5] 胡晓炜, 骆莹滨. 中医药治疗非小细胞肺癌研究进展[J]. 光明中医, 2024, 39(10): 2108-2110.
- [6] 陈开伦, 陈瑜腾, 陈嘉斌, 等. 中医药治疗晚期非小细胞肺癌的研究进展[J]. 空军军医大学学报, 2024, 45(5): 591-595.
- [7] 马天星, 李金田, 李 娟, 等. 辐射防护中药复方归芪益元膏对¹²C⁶⁺束辐射右肺致左肺旁效应损伤大鼠保护机制[J]. 中国中药杂志, 2023, 48(24): 6740-6748.
- [8] 孔思琪, 李金田, 李 娟, 等. 归芪益元膏联合顺铂通过内质网应激途径和线粒体凋亡途径对 Lewis 肺癌小鼠的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(20): 54-61.
- [9] 侯昕阳, 李金田, 万玲娟, 等. 归芪益元膏提取工艺优化及质量控制方法研究[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(21): 2978-2983.
- [10] 张 悦, 李金田, 李 娟, 等. 归芪益元膏对重离子辐射大鼠旁效应损伤的保护作用[J]. 中成药, 2023, 45(6): 1998-2001.
- [11] Cao C J, Su Y, Sun J, *et al.* Anti-tumor effect of *Ginkgo biloba* Exocarp extracts on B16 melanoma bearing mice involving PI3K/Akt/HIF-1 α /VEGF signaling pathways[J]. *Iran J Pharm Res*, 2019, 18(2): 803-811.
- [12] Tong J B, Zhang X X, Wang X H, *et al.* Qiyusanlong decoction suppresses lung cancer in mice *via* Wnt/ β -catenin pathway[J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(4): 5320-5327.
- [13] 刘莲芳, 卢子涵, 胡 霞, 等. 益气养阴解毒方对 Lewis 肺癌小鼠的免疫调节及抗肿瘤作用[J]. 南京中医药大学学报, 2025, 41(1): 95-101.
- [14] 张思雨, 李晓斌, 喻 明, 等. 基于肺脾肾“五行相生”理论论治肺癌[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(15): 172-178.
- [15] 王 寅, 吴朝旭, 王 玥, 等. 基于现代医学诊疗模式的非小细胞肺癌中医证型梳理与浅析[J]. 天津中医药, 2020, 37(10): 1195-1200.
- [16] 连粉红, 夏小军, 郭炳涛, 等. 中医药防治化疗损伤的思路和方法[J]. 中医临床研究, 2023, 15(2): 36-39.
- [17] 马天星, 李金田, 梁建庆, 等. 归芪益元膏联合化疗治疗小细胞肺癌局限期气阴两虚证 30 例临床观察[J]. 甘肃中医药大学学报, 2022, 39(1): 42-46.
- [18] 胡颖超, 杨 硕. 细胞焦亡的研究进展[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2021, 41(8): 1245-1251.
- [19] 徐 飞, 吴俏兰, 陈修保, 等. 细胞焦亡的分子调控机制及其在肺癌中的研究进展[J]. 肿瘤学杂志, 2021, 27(1): 69-73.
- [20] 杨 洋, 梅 胜, 辛 龙. 桂枝附子汤调控 TXNIP/NLRP3/caspase-1 通路抑制软骨细胞焦亡的机制研究[J]. 现代实用医学, 2021, 33(6): 709-712; 696.
- [21] Pan M, Zhang F, Qu K, *et al.* TXNIP: a double-edged sword in disease and therapeutic outlook[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 7805115.
- [22] Dahiya R, Sutariya V B, Gupta S V, *et al.* Harnessing pyroptosis for lung cancer therapy: the impact of NLRP3 inflammasome activation[J]. *Pathol Res Pract*, 2024, 260: 155444.
- [23] Thangavelu L, Goyal A, Afzal M, *et al.* Pyroptosis in lung cancer: the emerging role of non-coding RNAs[J]. *Pathol Res Pract*, 2024, 263: 155619.
- [24] Zhou W, Zhao L, Wang H, *et al.* Pyroptosis: a promising target for lung cancer therapy[J]. *Chin Med J Pulm Crit Care Med*, 2023, 1(2): 94-101.
- [25] Wang J, Su H, Wang M, *et al.* Pyroptosis and the fight against lung cancer[J]. *Med Res Rev*, 2025, 45(1): 5-28.