

引用: 龚俊文, 邓嫦, 廖丹丹, 覃阡慧, 罗伟生. 八珍荔核抗纤方调控NLRP3/GSDMD信号通路介导细胞焦亡对HSC-T6细胞的作用机制[J]. 中医导报, 2026, 32(2): 14-18, 23.

八珍荔核抗纤方调控NLRP3/GSDMD信号通路介导细胞焦亡对HSC-T6细胞的作用机制*

龚俊文^{1,2}, 邓 嫦^{1,2}, 廖丹丹^{1,2}, 覃阡慧^{1,2}, 罗伟生¹

(1. 广西中医药大学, 广西 南宁 530200;

2. 广西中医药防治医学分子生物重点实验室, 广西 南宁 530023)

[摘要] 目的: 探讨八珍荔核抗纤方是否可通过调控核苷酸结合结构域富含亮氨酸重复序列和含热蛋白结构域受体3(NLRP3)/焦孔素D(GSDMD)信号通路介导细胞焦亡影响肝纤维化的进程。方法: 将大鼠随机分为空白组及八珍荔核抗纤方低、中、高剂量组, 空白组以生理盐水灌胃, 八珍荔核抗纤方低、中、高剂量组分别按照0.796 g/mL、1.593 g/mL、3.186 g/mL以生理盐水配八珍荔核抗纤方颗粒进行灌胃, 以制备空白血清及八珍荔核抗纤方不同剂量含药血清。通过CCK8法测定不同剂量的八珍荔核抗纤方含药血清对rh TGF-β1激活的HSC-T6细胞的影响。透射电镜观察各组细胞形态。ELISA检测细胞上清液中IL-1β和IL-18含量。采用蛋白印迹(Western blotting)法和RT-qPCR检测HSC-T6细胞中NLRP3、GSDMD和CASPASE-1蛋白的表达及mRNA的表达。结果: CCK8结果显示, 八珍荔核抗纤方低、中、高剂量组均能抑制经rhTGF-β1处理的HSC-T6细胞的增殖($P<0.05$), 随着八珍荔核抗纤方剂量的增加, 抑制增殖作用越明显, 且48 h较24 h效果更佳($P<0.05$)。透射电镜结果发现, 与空白组比较, 模型组及八珍荔核抗纤方低、中、高剂量组细胞均有不同程度的细胞肿胀膨大, 细胞质膜破裂, 细胞膜穿孔。与模型组比较, 八珍荔核抗纤方低、中、高剂量组细胞肿胀程度改善, 细胞膜穿孔减少。ELISA结果显示, 与空白组比较, 模型组中的IL-1β、IL-18含量增加($P<0.05$); 与模型组比较, 八珍荔核抗纤方低、中、高剂量组中的IL-1β、IL-18含量均减少($P<0.05$), 呈浓度依赖性降低。Western blotting结果表明, 与空白组比较, 模型组中的IL-1β、IL-18含量增加($P<0.05$); 与模型组比较, 八珍荔核抗纤方低、中、高剂量组中的IL-1β、IL-18含量均减少($P<0.05$), 呈浓度依赖性降低。RT-qPCR结果显示, 与空白组比较, 细胞模型组的NLRP3 mRNA、GSDMD mRNA、CASPASE-1 mRNA表达水平明显升高($P<0.05$); 八珍荔核抗纤方处理后, 与细胞模型组比较, 八珍荔核抗纤方低、中、高剂量组NLRP3 mRNA、GSDMD mRNA、CASPASE-1 mRNA表达水平显著下调, 其中八珍荔核抗纤方高剂量组下调最明显, 且呈剂量依赖性降低($P<0.05$)。结论: 八珍荔核抗纤方可能通过NLRP3/GSDMD信号通路, 下调NLRP3、GSDMD、CASPASE-1的蛋白表达及mRNA表达, 减少细胞焦亡, 抑制HSC-T6细胞增殖活化, 降低炎症反应。

[关键词] 肝纤维化; 八珍荔核抗纤方; NLRP3/GSDMD信号通路; 细胞焦亡; 增殖

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-951X(2026)02-0014-05

DOI: 10.13862/j.cn43-1446/r.2026.02.003

Mechanism of Bazhen Lihe Kangxian Formula (八珍荔核抗纤方) in Regulating HSC-T6 Cells via the NLRP3/GSDMD Signaling Pathway-Mediated Pyroptosis

GONG Junwen^{1,2}, DENG Chang^{1,2}, LIAO Dandan^{1,2}, QIN Kanhui^{1,2}, LUO Weisheng¹

(1. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning Guangxi 530200, China; 2. Guangxi Key Laboratory of Molecular in Traditional Chinese Medicine Prevention and Treatment, Nanning Guangxi 530023, China)

[Abstract] Objective: To investigate whether Bazhen Lihe Kangxian formula (BZLHKXF) affects the

*基金项目: 国家自然科学基金项目(8216141138)

通信作者: 罗伟生, 男, 教授, 研究方向为中西医结合疾病病因及发生机制

progression of hepatic fibrosis by regulating the (nucleotide-binding domain leucine-rich repeat and pyrin domain-containing receptor 3, NLRP3)/GSDMD signaling pathway and mediating pyroptosis. Methods: Rats were randomly divided into a blank group and low-dose, medium-dose, and high-dose BZLHKXF groups. The blank group received normal saline by gavage, while the low-dose, medium-dose, and high-dose BZLHKXF groups were administered BZLHKXF granules suspended in normal saline at doses of 0.796, 1.593, and 3.186 g/mL, respectively, to prepare blank serum and drug-containing sera of different doses. The effects of BZLHKXF-containing serum on rh TGF- β 1-activated HSC-T6 cells were assessed using the CCK-8 assay, and the cell inhibition rate was calculated. Cellular morphology was observed by transmission electron microscopy (TEM). The levels of IL-1 β and IL-18 in the cell supernatant were measured by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The protein and mRNA expression of NLRP3, GSDMD, and CASPASE-1 in HSC-T6 cells was detected by Western blotting and RT-qPCR, respectively. Results: CCK-8 results showed that low-dose, medium-dose, and high-dose BZLHKXF inhibited the proliferation of rh TGF- β 1-treated HSC-T6 cells ($P < 0.05$). The inhibitory effect was dose-dependent and more pronounced at 48 h than at 24 h ($P < 0.05$). TEM revealed that compared with the blank group, cells in the model group and low-dose, medium-dose, and high-dose BZLHKXF groups exhibited varying degrees of swelling, plasma membrane rupture, and perforation. Compared with the model group, cell swelling and membrane perforation were alleviated in low-dose, medium-dose, and high-dose BZLHKXF groups. ELISA indicated that IL-1 β and IL-18 levels increased in the model group compared with the blank group ($P < 0.05$). Compared with the model group, IL-1 β and IL-18 levels decreased in the low-dose, medium-dose, and high-dose BZLHKXF groups ($P < 0.05$). The effect was dose-dependent. Western blotting results showed that, compared with the blank group, the expression levels of IL-1 β and IL-18 in the model group were significantly increased ($P < 0.05$). In comparison with the model group, the expression levels of IL-1 β and IL-18 were significantly reduced in the low-dose, medium-dose, and high-dose BZLHKXF group ($P < 0.05$), exhibiting a concentration-dependent decrease. RT-qPCR results showed that, compared with the blank group, the expression levels of NLRP3 mRNA, GSDMD mRNA, and CASPASE-1 mRNA were significantly elevated in the cell model group ($P < 0.05$). Following treatment with BZLHKXF, the expression levels of NLRP3 mRNA, GSDMD mRNA, and CASPASE-1 mRNA were significantly decreased in the low-dose, medium-dose, and high-dose BZLHKXF groups compared with the cell model group, with the most pronounced reduction observed in the high-dose BZLHKXF group, exhibiting a dose-dependent decrease ($P < 0.05$). Conclusion: Bazhen Lihe Kangxian formula may suppress pyroptosis, inhibit the proliferation and activation of HSC-T6 cells, and reduce inflammatory responses by down-regulating the expression of NLRP3, GSDMD, and CASPASE-1 proteins and mRNAs via the NLRP3/GSDMD signaling pathway, thereby exerting anti-hepatic fibrosis effects.

[Keywords] hepatic fibrosis; Bazhen Lihe Kangxian Formula; NLRP3/GSDMD signaling pathway; pyroptosis; proliferation

肝纤维化是由于各种病因引起的反复或持续肝脏损伤,造成肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSCs)持续被激活,肝脏纤维结缔组织异常增生,肝脏内弥漫性细胞外基质(extracellular matrix, ECM)过度增生与沉积,引起纤维增生和分解失衡,从而导致肝脏组织结构发生异常改变的病理过程^[1]。常见病因有感染、药物、嗜酒、代谢异常及自身免疫疾病等^[2-3]。研究表明肝纤维化的进展是可以延缓,甚至可以逆转。及时治疗肝纤维化能有效防止肝纤维化向肝硬化、肝癌方向发展,降低发病率^[4-5]。目前西医尚无应用于临床治疗肝纤维化的特效药物,中医药因其多成分、多靶点、多途径的特色优势,在治疗肝纤维化领域已取得较佳成效^[6-8]。

八珍荔枝抗纤方是在经典方剂八珍汤基础上加味而成的复方,由全国名老中医罗伟生教授根据多年临床经验针对

抗肝纤维化而拟成^[9-10]。该方具有补气养血、调和气血、疏肝散结、行气利湿、活血化瘀等多重功效。八珍荔枝抗纤方成分多、靶点多、作用机制复杂^[11-13],且八珍荔枝抗纤方对于抗肝纤维化中的作用机制尚完全不明确。细胞焦亡作为一种新型细胞死亡方式,核苷酸结合结构域富含亮氨酸重复序列和含热蛋白结构域受体3(nucleotide-binding domain leucine-rich repeat and pyrin domain-containing receptor 3, NLRP3)/焦毒素D(gasdermin D, GSDMD)信号通路是细胞焦亡的经典通路。NLRP3被持续性激活时,能引起胱天蛋白酶-1(cysteine-specific proteinase-1, Caspase-1)活化,并切割GSDMD,从而参与肝纤维化的发生发展。因此,本研究探讨八珍荔枝抗纤方是否能够通过调控NLRP3/GSDMD信号通路介导细胞焦亡来发挥抗肝纤维化的作用。

1 材料与方

1.1 实验动物及细胞 大鼠肝星状细胞株HSC-T6(批号:CL-0116)由武汉普诺赛生命科技公司提供。24只SPF级SD大鼠,雄性,6周龄,体质量200~220 g,购于长沙市天勤生物科技有限公司。实验动物生产许可证号:SCXK湘2024-0021;动物质量合格证号:430726250100030583。大鼠饲养于广西中医药大学动物实验中心,12 h/12 h明暗交替,温度20~23 ℃,相对湿度50%~60%,饲养期间可自由饮食。本实验已通过广西中医药大学伦理审核委员会批准,伦理批准号:DW20220213-121。

1.2 药物及主要试剂 八珍荔核抗纤方(颗粒剂)药物组成:人参10 g,荔枝核30 g,海金沙10 g,柴胡10 g,茯苓15 g,甘草6 g,川芎10 g,白芍15 g,当归10 g,丹参15 g,熟地黄10 g,莪术10 g,五味子10 g,黄芪20 g,白术10 g,购于江阴天江药业有限公司;NLRP3抗体(批号:GB114320-100)、GSDMD抗体(批号:GB114198-100)和Caspase-1抗体(批号:GB15383-100)均购于武汉赛维尔生物科技有限公司;白细胞介素-1 β (IL-1 β)酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(批号:E-EL-R0012C)和白细胞介素-19(IL-18)ELISA试剂盒(批号:E-EL-R0567c)均购于武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司。

1.3 主要仪器 超灵敏多功能成像仪(美国通用公司中国有限公司,型号:AI6000);倒置显微镜(日本OLYMPUS公司,型号:OLYMPUS LX71);酶标仪(赛默飞世尔科技有限公司,型号:Multiskan SkyHigh 1510);电泳仪(美国Bio-Rad公司,型号:165-8033);荧光定量PCR仪(上海罗氏制药有限公司,型号:Light Cycler 480);透射电子显微镜[日立(中国)有限公司,型号:H-9500]。

1.4 含药血清制备 将24只雄性SD大鼠适应性喂养1周,随机分为空白对照组、八珍荔核抗纤方低剂量组、八珍荔核抗纤方中剂量组和八珍荔核抗纤方高剂量组,每组6只。依据《实验药理方法学》,大鼠灌胃剂量=人临床剂量 \div 70 \times 6.3,故空白对照组以生理盐水灌胃,八珍荔核抗纤方含低、中、高剂量组分别按照0.796 g/mL、1.593 g/mL、3.186 g/mL以生理盐水溶解八珍荔核抗纤方颗粒进行灌胃,持续7 d。第6天灌胃后给予禁食处理,次日灌胃后2 h后,使用3%的异氟醚麻醉,进行腹主动脉采血,低温静置1 h后,进行离心,吸取上清(即为含药血清),-80 ℃冰箱保存备用。

1.5 HSC-T6细胞培养及分组给药

1.5.1 HSC-T6细胞培养 从-80 ℃冰箱取出HSC-T6细胞,进行复苏,并使用含10%胎牛血清的DMEM高糖培养基中,待细胞生长密度达到80%~90%时,按照1:3传代,传代至第三代为实验备用。

1.5.2 细胞分组与给药 (1)分组:将HSC-T6细胞空白组(空白血清)、模型组(rhTGF- β 1+空白血清)、八珍荔核抗纤方低剂量组(rhTGF- β 1+八珍荔核抗纤方低剂量含药血清)、八珍荔核抗纤方中剂量组(rhTGF- β 1+八珍荔核抗纤方中剂量含药血清)、八珍荔核抗纤方高剂量组(rhTGF- β 1+八珍荔核抗纤方高剂量含药血清)。(2)给药:将HSC-T6细胞于六孔板,调整细胞浓度为 1×10^5 /mL个,培养24 h,待细胞贴壁后,模型组、八

珍荔核抗纤方低剂量组、八珍荔核抗纤方中剂量组、八珍荔核抗纤方高剂量组均加入100 μ L rhTGF- β 1溶液,37 $^\circ$ 恒温培养24 h后,进行换液,空白组和模型组加入含10%空白血清的完全培养基,八珍荔核抗纤方低剂量组、八珍荔核抗纤方中剂量组、八珍荔核抗纤方高剂量组分别加入含10%相应剂量的含药血清完全培养基,37 $^\circ$ 恒温培养48 h。

1.6 观察指标

1.6.1 CCK8法测定八珍荔核抗纤方含药血清对rhTGF- β 1活化后的HSC-T6细胞增殖影响 将HSC-T6细胞种于96孔板,调整细胞浓度为 1×10^4 /mL个,并设立3个复孔,培养24 h细胞贴壁后,各组均加入100 μ L rhTGF- β 1溶液。继续培养24 h后,对照组加入含10%空白血清的完全培养基,八珍荔核抗纤方各剂量组分别加入含10%相应剂量的含药血清完全培养基,24或48 h后,每孔加10 μ L CCK8溶液,避光培养2 h后,使用酶标仪测定吸光度。

1.6.2 透射电镜观察HSC-T6细胞细胞焦亡 各组细胞干预完成后,加入电镜固定液,采用琼脂预包埋法包埋细胞,使用超薄切片机进行切片,在透射电子显微镜下观察细胞。

1.6.3 ELISA检测各组细胞上清液IL-1 β 、IL-18水平 各组细胞干预完成后,吸取细胞上清液,根据ELISA试剂盒步骤操作,检测细胞上清液中IL-1 β 、IL-18含量。

1.6.4 Western blotting法检测NLRP3、GSDMD、CASPASE-1蛋白的表达 使用RIPA裂解液(含蛋白酶抑制剂)提取培养后的HSC-T6细胞总蛋白,通过BCA法测定蛋白浓度;随后将蛋白上样缓冲液与蛋白质样品按1:4比例混匀并离心,沸水浴15 min,确保蛋白质完全变性。制胶,取蛋白上样并进行电泳分离,电泳结束后,将分离的蛋白转至PVDF膜;转膜完成后,用5%脱脂牛奶封闭1 h后,NLRP3、GSDMD、CASPASE-1一抗(稀释比例为1:1 000)在4 $^\circ$ 孵育过夜,次日用相应的二抗室温孵育1 h,采用ECL试剂盒通过AI6000型超灵敏多功能成像仪对蛋白条带进行显影,采用Image J软件测定各蛋白条带灰度值。

1.6.5 RT-qPCR法检测NLRP3 mRNA、GSDMD mRNA、CASPASE-1 mRNA 表达水平 采用TRIzol试剂从各组HSC-T6细胞中提取总RNA。按照逆转录试剂盒的操作说明,将RNA逆转录为cDNA。使用荧光定量PCR仪进行扩增,反应程序设置为两步法:95 $^\circ$ C预变性10 s,60 $^\circ$ C退火/延伸30 s,共进行40个循环。基因表达水平的相对定量分析采用2 $^{-\Delta\Delta C_t}$ 法,并以 β -actin作为内参基因进行标准化。实验所用引物由武汉赛维尔生物科技有限公司合成。(见表1)

表1 引物序列表

目的基因	引物(5'-3')	扩增产物片段长度/bp
GSDMD	上游引物:GGAGATCATGCAACCTGAAAGG	224
	下游引物:TCTTCTTCCGGCTTTGGTGG	
NLRP3	上游引物:GATTTCTCCACAACCTACCCAA	112
	下游引物:AGTCTGGAAGAACAGGCAACAT	
CASPASE-1	上游引物:TGTAATGAAGACTGTACTCTGGC	251
	下游引物:CGAGTGGGTGTTTTTCATTATTGG	
β -actin	上游引物:TGCTATGTTCCCTAGACTTCC	240
	下游引物:GTTGCCATAGAGGCTCTTTACGG	

1.7 统计学方法 采用SPSS 26.0软件和GraphPad Prism 10.0软件进行数据统计分析和制作图表,计量资料符合正态分布,以“均数±标准差”($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用LSD-*t*法;若不符合正态性分布或方差不齐,则采用KruskalWallis *H*检验。 $P<0.05$ 表示差异统计学意义。

2 结 果

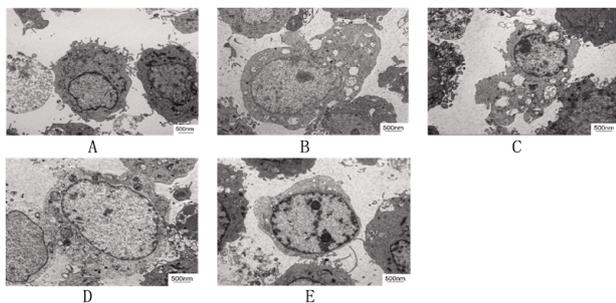
2.1 八珍荔核抗纤方对rhTGF- β 1处理HSC-T6细胞24 h和48 h增殖抑制率的影响 CCK8结果显示,八珍荔核抗纤方低、中、高剂量组均能抑制经rhTGF- β 1处理的HSC-T6细胞的增殖($P<0.05$),并且随着八珍荔核抗纤方剂量的增加,抑制增殖作用越明显,且48 h较24 h效果更佳($P<0.05$)。(见表2)

表2 各组HSC-T6细胞培养24 h和48 h增殖抑制率($\bar{x}\pm s$)

组别	n	24 h细胞		48 h细胞	
		吸光度	抑制率/%	吸光度	抑制率/%
模型组	3	0.726±0.029	0	1.006±0.041	0
八珍荔核抗纤方低剂量组	3	0.653±0.004	10.94±0.5967 ^a	0.859±0.004	16.59±0.5088 ^{ab}
八珍荔核抗纤方中剂量组	3	0.582±0.006	21.53±0.8951 ^a	0.780±0.008	25.50±0.9049 ^{ab}
八珍荔核抗纤方高剂量组	3	0.524±0.007	30.13±1.048 ^a	0.703±0.007	34.15±0.7925 ^{ab}

注:与模型组比较,^a $P<0.05$;48 h与24 h比较,^b $P<0.05$ 。

2.2 透射电镜观察各组HSC-T6细胞形态 与空白组比较,模型组、八珍荔核抗纤方低、中、高剂量组细胞均有不同程度的细胞肿胀膨大,细胞质膜破裂,细胞膜穿孔。与模型组比较,八珍荔核抗纤方低、中、高剂量组细胞肿胀程度改善,细胞膜穿孔减少。(见图1)



注:A.空白组;B.模型组;C.八珍荔核抗纤方低剂量组;D.八珍荔核抗纤方中剂量组;E.八珍荔核抗纤方高剂量组。

图1 透射电镜下各组HSC-T6细胞形态($\times 3000$)

2.3 各组细胞上清液IL-1 β 、IL-18含量水平 与空白组比较,模型组中的IL-1 β 、IL-18含量增加($P<0.05$);与模型组比较,八珍荔核抗纤方低、中、高剂量组中的IL-1 β 、IL-18含量均减少($P<0.05$),呈浓度依赖性降低。(见表3)

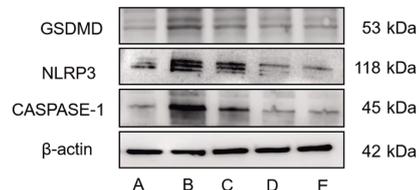
表3 各组细胞上清液IL-1 β 、IL-18含量水平($\bar{x}\pm s$)

组别	n	IL-1 β /(pg/mL)	IL-18/(pg/mL)
空白组	3	98.71±0.55	40.36±1.40
模型组	3	295.6±1.67 ^a	157.69±1.91 ^a
八珍荔核抗纤方低剂量组	3	200.33±1.41 ^{ab}	94.68±0.78 ^{ab}
八珍荔核抗纤方中剂量组	3	173.98±5.53 ^{ab}	77.76±5.14 ^{ab}
八珍荔核抗纤方高剂量组	3	134.81±1.48 ^{ab}	60.98±1.32 ^{ab}

注:与空白组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$ 。

2.4 各组细胞48 h NLRP3、GSDMD、CASPASE-1蛋白相对表达量比较 与空白组比较,模型组中的NLRP3、GSDMD、

CASPASE-1蛋白相对表达量显著升高($P<0.05$);与模型组比较,八珍荔核抗纤方低、中、高剂量组中的NLRP3、GSDMD、CASPASE-1蛋白相对表达量均下调,其中八珍荔核抗纤方高剂量组下调最明显,并呈剂量依赖性降低($P<0.05$)。(见图2、表4)。



注:A.空白组;B.模型组;C.八珍荔核抗纤方低剂量组;D.八珍荔核抗纤方中剂量组;E.八珍荔核抗纤方高剂量组。

图2 各组细胞48 h NLRP3、GSDMD、CASPASE-1蛋白的影响

表4 各组细胞48 h中NLRP3、GSDMD、CASPASE-1蛋白相对表达量比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	NLRP3	GSDMD	CASPASE-1
空白组	3	0.425±0.013 ^b	0.425±0.013 ^b	0.274±0.017 ^b
模型组	3	1.237±0.069 ^a	1.237±0.069 ^a	1.344±0.060 ^a
八珍荔核抗纤方低剂量组	3	0.767±0.009 ^{ab}	0.767±0.009 ^{ab}	0.647±0.004 ^{ab}
八珍荔核抗纤方中剂量组	3	0.752±0.062 ^{ab}	0.752±0.062 ^{ab}	0.426±0.057 ^{ab}
八珍荔核抗纤方高剂量组	3	0.614±0.068 ^{ab}	0.614±0.068 ^{ab}	0.368±0.038 ^{ab}

注:与空白组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$ 。

2.5 各组细胞48 h中NLRP3 mRNA、GSDMD mRNA、CASPASE-1 mRNA相对表达量比较 与空白组比较,细胞模型组的NLRP3 mRNA、GSDMD mRNA、CASPASE-1 mRNA相对表达量明显升高($P<0.05$);与细胞模型组比较,八珍荔核抗纤方低、中、高剂量组NLRP3 mRNA、GSDMD mRNA、CASPASE-1 mRNA相对表达量比较,其中八珍荔核抗纤方高剂量组下调最明显,并且呈剂量依赖性降低($P<0.05$)。(见表5)

表5 各组细胞48 h中NLRP3 mRNA、GSDMD mRNA、CASPASE-1 mRNA相对表达量比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	NLRP3 mRNA	GSDMD mRNA	CASPASE-1 mRNA
空白组	3	1.000±0.0143 ^b	1.000±0.021 ^b	1.000±0.017 ^b
模型组	3	3.487±0.211 ^a	4.300±0.189 ^a	9.648±0.2 ^a
八珍荔核抗纤方低剂量组	3	2.251±0.087 ^{ab}	2.423±0.064 ^{ab}	2.87±0.139 ^{ab}
八珍荔核抗纤方中剂量组	3	1.840±0.019 ^{ab}	1.787±0.076 ^{ab}	2.544±0.052 ^{ab}
八珍荔核抗纤方高剂量组	3	1.566±0.033 ^{ab}	1.445±0.061 ^{ab}	1.754±0.074 ^{ab}

注:与空白组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$ 。

3 讨 论

中医学将肝纤维化归集于“积聚”“胁痛”等疾病范畴。其本质为肝脏受到损伤,以致损伤阴精,无法将其化为气,从而导致气血运行不畅,瘀血在体内蕴积,未能及时消散,最终形成积块^[4]。罗伟生教授基于“因虚致瘀”理论,提出治疗肝纤维化应该“从虚”论治观点,并根据临床经验拟八珍荔核抗纤方治疗肝纤维化^[15-16]。此方由以八珍汤为底方补气养血,调和气血;加黄芪补气升阳;加柴胡、荔枝核疏肝解郁,行气散结;加丹参、莪术活血化瘀药;加海金沙清热利湿;加五味子味酸入肝经,引诸药达病所。

肝星状细胞位于肝窦周隙,当肝星状细胞持续被激活,可活化增殖,转化为肌成纤维样细胞,成为肝纤维化的核心

细胞,从而导致肝纤维化^[17-18]。本研究中,CCK8结果发现,八珍荔核抗纤方各剂量组在24h和48h内均能抑制rhTGF-β1活化后的HSC-T6细胞增殖,且八珍荔核抗纤方高剂量组效果最显著,呈浓度依赖性,同时48h相较于24h抑制效果更佳,表明八珍荔核抗纤方能够抑制rhTGF-β1活化后的HSC-T6细胞增殖。

细胞焦亡是一种程序性细胞死亡。在经典通路中,NLRP3被激活后,可引发Caspase(包括Caspase-1及Caspase-4/5/11)的活化。活化的Caspase切割Gasdermin D(GSDMD)蛋白,使其N端片段在细胞膜上形成孔隙,导致细胞肿胀、细胞膜破裂,并释放大量促炎因子,如IL-1β、IL-18等。这些促炎因子进一步加强炎症反应,激活肝星状细胞,最终导致肝纤维化的发生^[19-21]。本研究中,透电镜观察发现,与空白组,模型组细胞肿胀膨大,细胞质膜破裂,细胞膜穿孔,表明HSC-T6细胞发生细胞焦亡;与模型组比较,八珍荔核抗纤方各浓度剂量组细胞肿胀程度改善,细胞膜穿孔减少,且随着八珍荔核抗纤方剂量的增加,改善效果越好,表明八珍荔核抗纤方能够减少细胞焦亡,改善细胞形态,发挥抗肝纤维化的作用。ELISA结果显示,与空白组比较,模型组中的IL-1β、IL-18含量增加;与模型组比较,八珍荔核抗纤方各剂量组中的IL-1β、IL-18含量均减少,表明八珍荔核抗纤方能够减少IL-1β、IL-18等促炎因子的释放,降低炎症反应,从而减少肝脏损伤。此外,CHENG Q C等^[22]发现在四氯化碳诱导的慢性肝损伤小鼠模型中,二氢杨梅素可以降低Caspase-1、NLRP3、GSDMD和IL-1β蛋白表达及mRNA表达水平,调节细胞焦亡,改善慢性肝损伤。KAI J等^[23]发现千层纸素A可通过减少ROS积累来抑制NLRP3炎性小体活化,调控细胞焦亡。XIAO L X等^[24]发现黄精多糖可通过NLRP3/GSDMD信号抑制细胞焦亡,从而减轻脂多糖诱导的脓毒性肝损伤。肝纤维化是一个动态可逆的过程,其发病机制复杂,常涉及多条信号通道参与其发生发展。细胞焦亡是肝纤维化治疗的主要途径之一,而NLRP3/GSDMD信号通路是细胞焦亡的核心调控机制之一^[25-26]。干预NLRP3/GSDMD信号通路上下游关键应答因子阻断信号传导,调控细胞焦亡,可发挥抗肝纤维化的作用。本实验中Western blotting法和RT-PCR法结果显示,与空白组比较,模型组中NLRP3、GSDMD、CASPASE-1蛋白表达水平和mRNA表达水平明显升高,经过八珍荔核抗纤方各剂量干预后,细胞中NLRP3、GSDMD、CASPASE-1蛋白表达水平和mRNA表达水平均有不同程度降低,其中八珍荔核抗纤方高剂量组最明显,并呈剂量依赖性降低,表明八珍荔核抗纤方下调细胞焦亡中NLRP3/GSDMD信号通路的蛋白表达及mRNA表达。

综上,八珍荔核抗纤方可能通过调节NLRP3/GSDMD信号通路,下调NLRP3、GSDMD、CASPASE-1的蛋白表达及mRNA表达,抑制HSC-T6细胞增殖活化,减少细胞焦亡,降低炎症反应。

参考文献

[1] 中国中西医结合学会肝病专业委员会.肝纤维化中西医结合诊疗指南(2019年版)[J].中华肝脏病杂志,2019,27(7):494-504.

[2] BATALLER R, BRENNER D A. Liver fibrosis[J]. J Clin Invest, 2005, 115(2):209-218.

[3] AYDIN M M, AKCALI K C. Liver fibrosis [J]. Turk J Gastroenterol, 2018, 29(1):14-21.

[4] 陈国凤.复方鳖甲软肝片可以逆转肝纤维化肝硬化[J].肝博士,2022(2):40-41.

[5] 齐婧姝,胡旭东,刘成海.肝纤维化的逆转机制[J].中华肝脏病杂志,2022,30(6):577-582.

[6] 赵芯,牛群,董海舰,等.中药调控细胞死亡治疗肝纤维化的研究进展[J].中草药,2025,56(3):1016-1027.

[7] 成琳,刘汶,王雅欣,等.通络软肝方对肝纤维化大鼠TGF-β1/Smad信号通路和氧化应激的影响[J].中医导报,2023,29(7):13-18,23.

[8] 李涵,李佳璐,郝瑞春,等.雄芍汤对刀豆蛋白A所致肝纤维化大鼠TGF-β1/p38MAPK信号通路的影响[J].中医导报,2023,29(12):1-6.

[9] 刘光桥,罗伟生.罗伟生教授从虚论治慢性肝病验案举隅[J].中西医结合肝病杂志,2021,31(12):1134-1135.

[10] 唐燕,马晓聪,黎敏航,等.罗伟生教授从肝阳虚论治慢性乙型肝炎肝纤维化学术思想探微[J].中西医结合肝病杂志,2022,32(12):1130-1131.

[11] 唐燕,司马玲,王婷,等.基于Wnt/β-catenin信号通路探讨八珍荔核抗纤方对HSC活化增殖、迁移的影响[J].时珍国医国药,2024,35(1):5-11.

[12] 杨爽.八珍荔核抗纤方联合恩替卡韦治疗肝郁脾虚夹瘀型慢性乙型肝炎临床疗效观察[D].南宁:广西中医药大学,2021.

[13] 唐燕.基于网络药理学及实验研究探讨八珍荔核抗纤方抗肝纤维化的作用机制[D].南宁:广西中医药大学,2023.

[14] 邝鸣,汤洋,宋浩,等.从“虚损生积”论治肝纤维化[J].湖南中医药大学学报,2025,45(4):753-756.

[15] 甘雨晴,谢家诚,魏文悦,等.罗伟生以“化瘀四法”辨治慢性肝病[J].中医学报,2024,39(4):782-786.

[16] 曾俊深,杨靖芸,甘雨晴,等.罗伟生教授运用八珍荔核方治疗肝癌临床经验[J].广西中医药,2023,46(6):48-50.

[17] GENG Y N, SCHWABE R F. Hepatic stellate cell heterogeneity: Functional aspects and therapeutic implications[J]. Hepatology, 2025. DOI:10.1097/HEP.0000000000001386.

[18] AKKIZ H, GIESELER R K, CANBAY A. Liver fibrosis: From basic science towards clinical progress, focusing on the central role of hepatic stellate cells[J]. Int J Mol Sci, 2024, 25(14):7873.

[19] JIN X Y, MA Y C, LIU D D, et al. Role of pyroptosis in the pathogenesis and treatment of diseases[J]. Med Comm, 2023, 4(3):e249.

[20] WEI Y N, YANG L, PANDEYA A, et al. Pyroptosis-induced inflammation and tissue damage[J]. J Mol Biol, 2022, 434(4):167301.

(下转第23页)

参考文献

- [1] 沙勤,林洁,胡晓清,等.依托咪酯对神经母细胞瘤细胞增殖、迁移、铁死亡和Nrf2/HO-1信号通路的影响[J].南昌大学学报(医学版),2023,63(1):21-26.
- [2] 贾安娜,战世佳,张璇,等.C12ORF66对MYCN扩增的高危神经母细胞瘤细胞的活性调控[J].基础医学与临床,2024,44(3):288-294.
- [3] 侯栋亮,张飞,韦源.HMGB1、MYCN在儿童神经母细胞瘤组织中的表达及其意义[J].实用癌症杂志,2024,39(1):61-63,69.
- [4] 周莹,涂宁,冯洪燕,等.18F-FDG PET/CT代谢参数对儿童神经母细胞瘤MYCN基因扩增的预测价值及预后评估[J].武汉大学学报(医学版),2024,45(8):928-932.
- [5] 卓嘉璐,李子祥,杨宁,等.枸杞多糖对绝经后骨质疏松患者肠道菌群结构及短链脂肪酸的影响[J].微循环学杂志,2023,33(4):27-34.
- [6] 关天越,任怡琳,管祺杰,等.枸杞多糖体外调节人体肠道菌群的功能研究[J].食品与生物技术学报,2023,42(9):74-81.
- [7] 宋艳梅,张启立,崔治家,等.枸杞子化学成分和药理作用的研究进展及质量标志物的预测分析[J].华西药学杂志,2022,37(2):206-213.
- [8] 张晴晴.枸杞多糖诱导乳腺癌细胞铁死亡的作用机制研究[D].银川:宁夏医科大学,2023.
- [9] CROTEAU N, NUCHTERN J, LAQUAGLIA M P. Management of neuroblastoma in pediatric patients [J]. Surg Oncol Clin N Am,2021Apr,30(2):291-304.
- [10] TONINI G P, CAPASSO M. Genetic predisposition and chromosome instability in neuroblastoma[J]. Cancer Metastasis Rev,2020,39(1):275-285.
- [11] 刘思,宋娟,洋雯茜,等.枸杞多糖结构特征、生物活性及其降解研究进展[J].中草药,2025,56(4):1440-1455.
- [12] 张丽,黄小华,沈梦伊,等.基于不同机器学习算法的影像组学模型预测浸润性乳腺癌Ki-67表达的价值[J].中国医学计算机成像杂志,2024,30(1):39-44.
- [13] 郑竞雄,黄景涛,孙光蕊,等.miR-203a-3p对食管癌细胞侵袭迁移能力的影响及其与Survivin的靶向调控关系[J].山东医药,2024,64(5):22-25.
- [14] 刘雪柔,杨玉梅,蔡慧,等.阿美替尼具有较好的抗神经母细胞瘤作用:基于下调MMP2和MMP9的表达[J].南方医科大学学报,2023,43(9):1493-1499.
- [15] 王晓玲,孟莉丹,王学敏,等.HOTTIP通过竞争性结合miR-506调节Vimentin基因的表达调控肾透明细胞癌细胞迁移[J].现代肿瘤医学,2024,32(7):1200-1207.
- [16] 岳芙蓉,彭科瑜,张力,等.Fibronectin 1促进胃癌细胞耐药及其作用机制研究[J].肿瘤药理学,2023,13(1):43-49.
- [17] TANG D L, CHEN X, KANG R, et al. Ferroptosis: Molecular mechanisms and health implications[J]. Cell Res,2021,31(2):107-125.
- [18] LIU J, KANG R, TANG D L. Signaling pathways and defense mechanisms of ferroptosis[J]. FEBS J,2022,289(22):7038-7050.
- [19] OU Q L, CHENG L, CHANG Y L, et al. Jianpi Jiedu decoction reverses 5-fluorouracil resistance in colorectal cancer by suppressing the xCT/GSH/GPX4 axis to induce ferroptosis[J]. Heliyon,2024,10(5):e27082.
- [20] WANG X, ZHU W J, XING M, et al. Matrine disrupts Nrf2/GPX4 antioxidant system and promotes hepatocyte ferroptosis[J]. Chem Biol Interact,2023,384:110713.
- [21] ZHAO Z L, HU B X, DENG Y L, et al. Sick cell disease induces chromatin introversion and ferroptosis in CD8⁺ T cells to suppress anti-tumor immunity[J]. Immunity,2025,58(6):11484-1501.
- [22] HE Z K, LIAN Z Y, WU J N, et al. PFKFB3 confers cisplatin resistance in gastric cancer by inhibiting ferroptosis through SLC7A11/xCT dephosphorylation [J]. Int Immunopharmacol,2025,159:114914.
- [23] HUANG Q, LIU J S, PENG C, et al. Hesperidin ameliorates H₂O₂-induced bovine mammary epithelial cell oxidative stress via the Nrf2 signaling pathway[J]. J Anim Sci Biotechnol,2024,15(1):57.
- [24] ZHANG Y, WANG X S, LI X Q, et al. Novel methyltransferase G9a inhibitor induces ferroptosis in multiple myeloma through Nrf2/HO-1 pathway[J]. Ann Hematol,2024,103(7):2405-2417.
- (收稿日期:2025-04-08 编辑:李海洋)
- (上接第18页)
- [21] YU P, ZHANG X, LIU N, et al. Pyroptosis: Mechanisms and diseases[J]. Signal Transduct Target Ther,2021,6(1):128.
- [22] CHENG Q C, FAN J, DENG X W, et al. Dihydromyricetin ameliorates chronic liver injury by reducing pyroptosis[J]. World J Gastroenterol,2020,26(41):6346-6360.
- [23] KAI J, YANG X, WANG Z M, et al. Oroxylin a promotes PGC-1 α /Mfn2 signaling to attenuate hepatocyte pyroptosis via blocking mitochondrial ROS in alcoholic liver disease[J]. Free Radic Biol Med,2020,153:89-102.
- [24] XIAO L X, QI L, ZHANG G Z, et al. Polygonatum sibiricum polysaccharides attenuate lipopoly-saccharide-induced septic liver injury by suppression of pyroptosis via NLRP3/GSDMD signals[J]. Molecules,2022,27(18):5999.
- [25] 焦明静,尹洪竹.焦孔素D介导的细胞焦亡在肝病中的研究进展[J].临床荟萃,2024,39(10):940-944.
- [26] WANG C, YANG T, XIAO J Q, et al. NLRP3 inflammasome activation triggers gasdermin D-independent inflammation[J]. Sci Immunol,2021,6(64):eabj3859.
- (收稿日期:2025-04-16 编辑:时格格)