鳖龙软肝汤对肝癌模型大鼠的影响及作用机制Δ

银思涵*，彭　憬，罗凌威，周　意，胡　莉#（湖南中医药大学第一附属医院肝病研究所，长沙　410007）

中图分类号　R965　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2024）18-2219-06
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2024.18.06

摘　要　目的　探讨鳖龙软肝汤对肝癌模型大鼠的影响及作用机制。**方法**　将32只雄性SD大鼠随机分为对照组、模型组和鳖龙软肝汤低、高剂量组[6.84、27.36 g/（kg·d），以生药量计]，每组8只。除对照组外，其余各组大鼠均腹腔注射二乙基亚硝胺（DEN）50 mg/kg（每周1次，连续16周）以复制肝癌模型。于DEN注射第8周时，鳖龙软肝汤低、高剂量组大鼠灌胃相应药液，每天2次，给药至第16周。观察各组大鼠实验期间的一般状况。末次给药后，称定其体重和肝脏质量，计算肝指数；检测其血清丙氨酸转氨酶（ALT）、天冬氨酸转氨酶（AST）含量；观察其肝脏外观、病理形态和纤维化程度，并进行肝纤维化Ishak评分；检测肝组织中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）、胱天蛋白酶1（caspase-1）、消皮素D（GSDMD）、白细胞介素18（IL-18）、IL-1β mRNA及蛋白的表达情况。**结果**　与模型组比较，鳖龙软肝汤低、高剂量组大鼠一般状态（低剂量组除外）和肝脏质地、表面结节和肿瘤块、炎症细胞浸润及异形细胞数量均有所改善；肝指数（低剂量组除外），Ishak评分（低剂量组除外），血清中ALT、AST含量，以及肝组织中NLRP3、caspase-1、GSDMD、IL-18、IL-1β mRNA和蛋白的表达量均显著降低（$P<0.05$），其中高剂量组上述部分指标显著低于低剂量组（$P<0.05$）。**结论**　鳖龙软肝汤可抑制大鼠肝癌进程，减轻肝损伤，其作用机制可能与抑制NLRP3/caspase-1/GSDMD信号通路、改善炎症反应有关。

关键词　鳖龙软肝汤；肝癌；NLRP3/caspase-1/GSDMD信号通路；炎症反应

Effects and mechanism of Bielong ruangan decoction on liver cancer model rats

YIN Sihan, PENG Jing, LUO Lingwei, ZHOU Yi, HU Li (Hepatology Institute, the First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, China)

ABSTRACT　OBJECTIVE To explore the effects and mechanism of Bielong ruangan decoction on liver cancer model rats. **METHODS** Thirty-two male SD rats were randomly divided into control group, model group, and Bielong ruangan decoction low-dose and high-dose groups [6.84, 27.36 g/(kg·d), by raw material], with 8 rats in each group. Except for the control group, other groups were intraperitoneally injected with diethylnitrosamine (DEN) 50 mg/kg (once a week, for 16 consecutive weeks) to induce liver cancer model. At the 8th week of DEN injection, Bielong ruangan decoction low-dose and high-dose groups were orally administered with the corresponding medication, twice a day, until the 16th week. The general condition of rats in each group was observed during the experimental period. After the final administration, the body weight and liver mass were weighed, and the liver indexes were calculated; serum contents of alanine transaminase (ALT) and aspartate transaminase (AST) were determined; the appearance, pathological morphology and degree of fibrosis of liver were observed; Ishak scoring for liver fibrosis was performed; the mRNA and protein expressions of nucleotide-binding domain leucine-rich repeat and pyrin domain-containing receptor 3 (NLRP3), caspase-1, gasdermin D (GSDMD), interleukin-18 (IL-18), IL-1β in liver tissue were detected. **RESULTS** Compared with the model group, the general condition of rats (except for the low-dose group), liver texture, surface nodules and tumors, inflammatory cell infiltration and abnormal cell amount were all improved in Bielong ruangan decoction low-dose and high-dose groups. Liver index (except for low-dose group), Ishak score (except for low-dose group), the serum contents of ALT and AST, as well as the mRNA and protein expressions of NLRP3, caspase-1, GSDMD, IL-18 and IL-1β in liver tissue were reduced significantly ($P<0.05$), with some of above indicators in high-dose group being significantly lower than those in low-dose group ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** Bielong ruangan decoction can inhibit the progression of liver cancer in rats and reduce liver damage. Its mechanism of action may be related to the inhibition of the NLRP3/caspase-1/GSDMD signaling pathway and the improvement of inflammatory response.

KEYWORDS　Bielong ruangan decoction; liver cancer; NLRP3/caspase-1/GSDMD signaling pathway; inflammatory response

原发性肝癌是我国第5位常见恶性肿瘤及第2位肿瘤致死原因；2020年我国新增肝癌病例约41万，占全球新发病例总数的45.3%，死亡病例占全球死亡病例总数的47.1%[1]。手术切除、局部治疗、肝移植或靶向免疫治疗等手段虽然能提高肝癌患者的总体生存率，但各有其局限性[2-4]。因此，寻求更为有效的治疗方式或阻断药

Δ**基金项目**　国家自然学科基金青年基金项目（No.81904182）；湖南省自然科学基金医卫行业联合基金项目（No.2024JJ9442）；湖南省中医药科研计划项目（No.D2022040，No.D2022059）

＊**第一作者**　助理研究员，硕士。研究方向：中西医结合防治肝病。E-mail：324066597@qq.com

＃**通信作者**　主管技师，硕士。研究方向：中西医结合防治肝病。E-mail：foxmiss185@163.com

物一直是肝癌治疗领域的研究热点与难点。

鳖龙软肝汤由湖南中医药大学第一附属医院（以下简称“我院”）专科制剂“疏肝理脾汤”改良而来，原名“疏肝理脾Ⅱ号方”，其相关院内制剂于2014年获得湖南省药品监督管理局医疗机构制剂再注册批件（湘制Z20140655），是我院治疗肝纤维化/肝硬化、肝癌的重要中药方剂。多年以来的基础及临床研究均证实，鳖龙软肝汤及其活性成分具有较好的抗肝纤维化、抗肝硬化及抗肝癌作用，临床安全性较好，无明显副作用[5-7]，但其作用机制尚不明确。

细胞焦亡是肿瘤发展过程中一个至关重要的环节，是一种新发现的细胞程序性死亡方式[8]。在众多相关信号通路中，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）/胱天蛋白酶1（caspase-1）/消皮素D（gasdermin D，GSDMD）信号通路介导的焦亡途径尤为典型，该信号通路能促进大量炎症因子[如白细胞介素1β（interleukin-1β，IL-1β）、IL-18]的释放，进而激活炎症级联反应，从而对肿瘤微环境产生显著影响，是肝癌持续进展的一个关键通路[9]。基于此，本研究以二乙基亚硝胺（diethylnitrosamine，DEN）诱导构建肝癌大鼠模型，模拟肝纤维化-肝硬化-肝癌的病变过程，初步考察鳖龙软肝汤对模型大鼠上述病变过程的影响及潜在作用机制，为该方的临床应用提供实验依据。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括Cobas® 8000型自动生化分析仪（瑞士Roche公司）、PikoReal 96型荧光定量聚合酶链式反应（PCR）仪（美国ABI公司）、Odyssey型荧光成像系统（美国LI-COR公司）、Mini-Protean型垂直电泳槽（美国Bio-Rad公司）、BX43型荧光显微镜（日本Olympus公司）等。

1.2 主要药品与试剂

㷀桃仁、醋莪术、醋鳖甲、炒地龙、茯苓、醋柴胡、白芍饮片（批号分别为2023010903、230101、20221206、2023012401、SN22123101、CK23012301、TH23010701）均为道地药材，由我院中药房提供，经我院医学创新实验中心吴迪副研究员鉴定均为真品。

DEN对照品（货号N814760N，纯度99%）购自上海麦克林生化科技股份有限公司；丙氨酸转氨酶（alanine transaminase，ALT）、天冬氨酸转氨酶（aspartate transaminase，AST）检测试剂盒（批号分别为64446201、64235501）均购自罗氏诊断产品（上海）有限公司；苏木精-伊红（HE）染色液（批号20221208）购自常德比克曼生物科技有限公司；Masson三色染色试剂盒（批号1009A051）购自北京索莱宝科技有限公司；mRNA反转录试剂盒（批号CW2569）购自北京康为世纪生物科技有限公司；兔源NLRP3抗体和鼠源caspase-1、IL-1β、1L-18、GSDMD抗体（批号分别为DF7438、AF5418、AF5103、DF6252、AF4012）均购自美国Affinity公司；辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠、羊抗兔IgG二抗和鼠源β-肌动蛋白（β-actin）抗体（批号分别为RS0001-B0101、B0201、B2801）均购自美国Immunoway公司。

1.3 实验动物

清洁级雄性SD大鼠32只，体重（200±20）g，购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司，生产许可证号为SCXK（湘）2019-0004。所有大鼠均饲养于湖南中医药大学东塘校区动物实验中心（环境温度24～28 ℃，相对湿度60%～75%，正常光照）。本实验方案通过我院实验动物伦理委员会审查批准，编号为ZYFY20221109-02。

2 方法

2.1 鳖龙软肝汤的制备

取㷀桃仁10 g、醋莪术10 g、醋鳖甲10 g、炒地龙6 g、茯苓15 g、醋柴胡10 g、白芍15 g，共2批，分别混匀，加10倍量水浸泡1 h后，加热回流提取40 min，过滤；药渣再加6倍量水加热回流40 min，过滤；合并2次药液，加热浓缩，制成质量浓度分别为0.684、2.736 g/mL（以生药量计）的药液，经过滤除菌后分装，于4 ℃下储存，备用。

2.2 动物分组、造模与给药

所有大鼠适应性喂养1周后，随机分为对照组、模型组、鳖龙软肝汤低剂量组和鳖龙软肝汤高剂量组，每组8只。除对照组大鼠腹腔注射生理盐水外，其余各组大鼠均腹腔注射DEN 50 mg/kg（以生理盐水为溶剂），每周1次，连续16周，以复制肝癌模型[10]。

本课题组预实验参照《新药临床前研究的剂量设计要点》[11]和《药理学实验方法》[12]，确定大鼠给药剂量，鳖龙软肝汤低剂量以临床常用剂量换算，即6.84 g/（kg·d）（以生药量计，下同），中、高剂量[13.68、27.36 g/（kg·d）]分别是低剂量的2、4倍。预实验结果显示，低、中剂量的干预效果无明显差异，故本研究选择低、高剂量进行实验。于DEN注射第8周时，鳖龙软肝汤低、高剂量组大鼠分别按6.84、27.36 g/（kg·d）灌胃相应药液，对照组和模型组大鼠灌胃等体积水，每天2次，给药至第16周。

2.3 大鼠一般状况观察

观察并记录整个实验过程中每组大鼠的饮食、精神、活动、毛色、体重、皮肤黏膜颜色等一般状况。

2.4 取样和肝指数检测

实验第16周末次给药后1 h，称定各组大鼠体重，用3%戊巴比妥钠麻醉，采集腹主动脉血，离心后取上层血清，置于EP管中，备用。取血完成后，处死各组大鼠，剖开腹腔，取出整个肝脏后拍照、观察并称重，计算肝指数[肝指数＝肝脏质量/体重×100%]。肝脏出现结节者统一取结节及结节边缘1 cm^3的组织，未出现结节者则统一取1 cm^3的组织，一部分固定于4%多聚甲醛中，另一部分于－80 ℃下保存，备用。

2.5 肝组织病理形态学和纤维化改变观察

取“2.4”项下固定于4%多聚甲醛中的各组大鼠肝组织适量，常规石蜡包埋、切片，经HE染色后，使用显微

镜观察其肝组织的病理形态学变化；另取上述石蜡切片，经Masson染色后，使用显微镜观察其肝纤维化程度，并按肝纤维化Ishak评分系统进行量化[13]。

2.6 肝功能主要指标检测

取“2.4”项下各组大鼠的血清样品，采用自动生化分析仪检测其血清中ALT、AST含量。上述检测委托我院医学检验中心完成。

2.7 肝组织中NLRP3/caspase-1/GSDMD信号通路相关基因表达检测

采用定量PCR法进行检测。取“2.4”项下各组大鼠冻存的肝组织适量，提取其肝组织总RNA，测定浓度、纯度后，将其反转录成cDNA，以此cDNA为模板进行扩增。PCR反应体系（20 μL）包括：cDNA模板2 μL，2×SYBR Green PCR Master Mix 10 μL，正、反向引物（10 μmol/L）各0.8 μL，无核酸酶水6.4 μL。反应条件如下：95 ℃预变性10 min；95 ℃变性15 s，60 ℃退火延伸30 s，共40个循环。以β-actin为内参，采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法分析肝组织中NLRP3/caspase-1/GSDMD信号通路相关基因的表达量。引物由北京擎科新业生物技术有限公司设计、合成，其序列与产物大小见表1。

表1 引物序列与产物大小

目的基因	引物序列（5′→3′）	产物大小/bp
NLRP3	正向引物：CACCTCTTCTCTGCCTACCTG	181
	反向引物：AGCTGTAAAATCTCTCGCAGT	
caspase-1	正向引物：CTAGACTACAGATGCCAACCAC	128
	反向引物：GGCTTCTTATTGGCATGATTCCC	
GSDMD	正向引物：TTAGTCTGCTTGCCGTACTCC	197
	反向引物：GTCCTGTAAAATCCTCCCGATG	
IL-18	正向引物：ACCGAACAGCCAACGAA	217
	反向引物：TGTCCTGGCACACGTTT	
IL-1β	正向引物：CAGCAGCATCTCGACAAGAG	123
	反向引物：AAAGAAGGTGCTTGGGTCCT	
β-actin	正向引物：ACATCCGTAAAGACCTCTATGCC	223
	反向引物：TACTCCTGCTTGCTGATCCAC	

2.8 肝组织中NLRP3/caspase-1/GSDMD信号通路相关蛋白表达检测

采用Western blot法检测。取“2.4”项下各组大鼠冻存的肝组织适量，裂解，提取蛋白，利用BCA法测定蛋白含量后变性。取变性蛋白30 μg，经电泳分离后转膜，用5%脱脂牛奶室温封闭1 h；加入NLRP3、caspase-1、GSDMD、IL-1β、IL-18、β-actin一抗（稀释比例均为1∶1 000），于4 ℃下孵育过夜；加入相应二抗（稀释比例为1∶10 000），于常温下孵育1 h；以ECL显色后，置于荧光成像系统下成像。以目的蛋白与内参蛋白（β-actin）的灰度值比值表示目的蛋白的表达量。

2.9 统计学方法

采用SPSS 25.0和GraphPad Prism 9软件对数据进行统计分析并生成图表。符合正态分布的计量资料以$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用单因素方差分析，两两比较采用LSD-*t*检验（方差齐）或Wilcoxon秩和检验（方差不齐）。检验水准$\alpha=0.05$。

3 结果

3.1 大鼠一般状况比较

对照组大鼠饮食正常，动作敏捷，体态偏胖，毛色光泽，口鼻趾甲皮肤暴露部位色泽红润。模型组大鼠精神萎靡，行动迟缓，摄食减少，趾甲耳廓泛白，毛色枯槁，大便为灰白色。鳖龙软肝汤低剂量组大鼠的一般状况接近于模型组。鳖龙软肝汤高剂量组大鼠的一般状况优于模型组，耳廓趾甲颜色渐红润，活动增多，毛色渐光泽，精神状态好转，但仍不及对照组。

3.2 大鼠体重、肝脏质量和肝指数比较

与对照组比较，其余各组大鼠的体重均显著降低，肝脏质量和肝指数均显著升高（$P<0.05$）。与模型组和鳖龙软肝汤低剂量组比较，鳖龙软肝汤高剂量组大鼠的肝脏质量和肝指数均显著降低（$P<0.05$）。结果见表2。

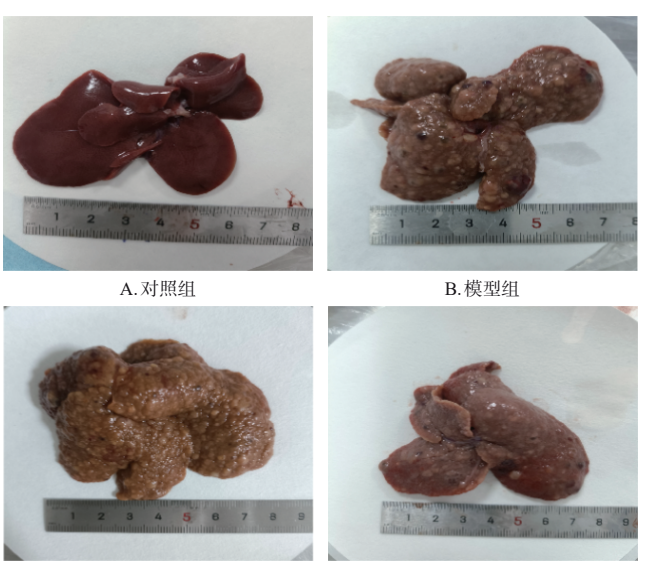
表2 各组大鼠体重、肝脏质量和肝指数比较（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

组别	体重/g	肝脏质量/g	肝指数/%
对照组	468.1±38.1	12.4±1.4	2.7±0.4
模型组	363.5±45.4[a]	28.4±4.5[a]	8.0±1.8[a]
鳖龙软肝汤低剂量组	362.1±17.3[a]	28.3±4.6[a]	7.8±1.1[a]
鳖龙软肝汤高剂量组	368.3±49.3[a]	21.1±6.0[abc]	5.8±1.5[abc]

a：与对照组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$；c：与鳖龙软肝汤低剂量组比较，$P<0.05$。

3.3 大鼠肝脏形态和病理、肝纤维化改变比较

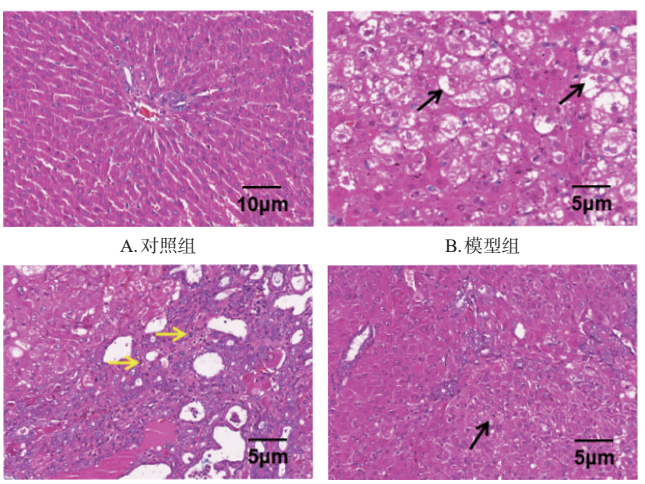
外观观察显示，对照组大鼠肝组织形态正常，表面光滑，质地细腻柔软，呈红褐色，边缘清晰锐利。模型组大鼠肝脏肿大、质硬，表面粗糙且无光泽，遍布大小不一的灰白色结节，并可见暗黑色肿瘤块。鳖龙软肝汤低剂量组大鼠肝脏肿大、质韧，表面结节和暗红色肿瘤块较模型组少或小。鳖龙软肝汤高剂量组大鼠肝脏质稍硬，肝脏肿大、表面结节、肿瘤块均较模型组和低剂量组改善或减少。结果见图1。



A.对照组　B.模型组　C.鳖龙软肝汤低剂量组　D.鳖龙软肝汤高剂量组

图1 各组大鼠肝脏形态图

HE染色显示，对照组大鼠肝小叶细胞在中央静脉周围呈放射状排列，大小均匀，无核分裂现象，未见淋巴细胞渗出，肝血窦内无充血。模型组大鼠肝组织中肿瘤细胞呈堆积状，核质比大，核大小、形态各异，肝血窦结构扭曲，有空泡状变性。鳖龙软肝汤低剂量组大鼠肝小叶中央静脉周围可见大量炎症细胞浸润，但异形细胞较模型组明显减少。鳖龙软肝汤高剂量组大鼠肝小叶中央静脉周围可见少量炎症细胞浸润，肝细胞排列相对整齐，异形细胞和空泡状变性肿瘤细胞均较模型组明显减少。结果见图2。



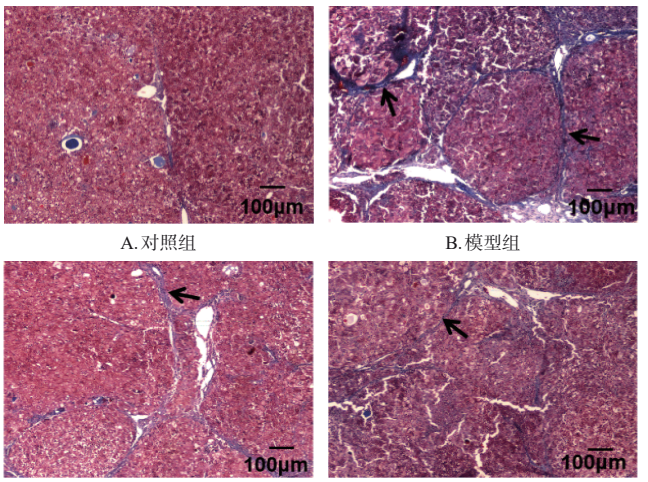
A.对照组　B.模型组

C.鳖龙软肝汤低剂量组　D.鳖龙软肝汤高剂量组

黑色箭头：肿瘤细胞空泡状变性；黄色箭头：炎症细胞。

图2　各组大鼠肝脏病理形态学观察的显微图（HE染色）

Masson染色显示，对照组大鼠肝脏门静脉周围未见纤维化改变，Ishak评分为0分。模型组大鼠肝组织可见纤维间隔将肝细胞分割并包绕形成假小叶，门静脉-门静脉和门静脉-中央静脉之间有显著的桥样间隔，其Ishak评分[(5.25±0.71)分]显著高于对照组（$P<0.05$）。鳖龙软肝汤低剂量组大鼠肝组织可见从门静脉区拓展的纤维间隔，偶见假小叶形成，其Ishak评分[(4.63±0.92)分]与模型组比较差异无统计学意义（$P>0.05$）。鳖龙软肝汤高剂量组大鼠肝组织中桥样间隔明显减少，但仍不及对照组，其Ishak评分[(3.37±0.92)分]显著低于模型组和低剂量组（$P<0.05$）。结果见图3。



A.对照组　B.模型组

C.鳖龙软肝汤低剂量组　D.鳖龙软肝汤高剂量组

黑色箭头：纤维间隔。

图3　各组大鼠肝纤维化改变的显微图（Masson染色）

3.4　大鼠肝功能指标比较

与对照组比较，其余各组大鼠血清中ALT、AST含量均显著升高（$P<0.05$）。与模型组比较，鳖龙软肝汤低、高剂量组大鼠血清中ALT、AST含量均显著降低（$P<0.05$），且高剂量组显著低于低剂量组（$P<0.05$）。结果见表3。

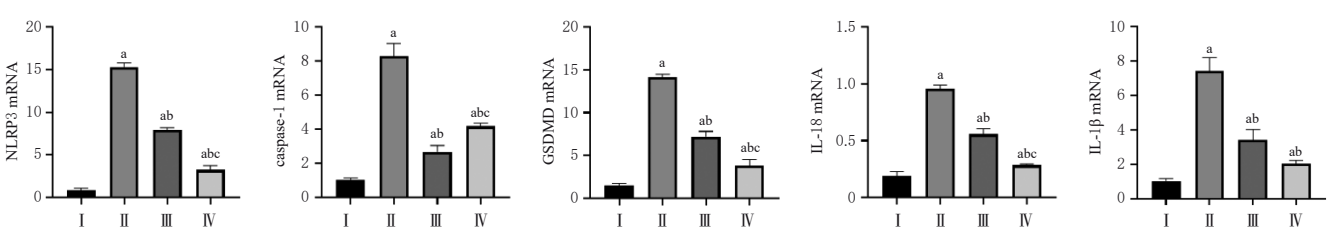
表3　各组大鼠肝功能指标比较（$\bar{x}\pm s$，$n=8$，U/L）

组别	ALT	AST
对照组	24.96±4.77	106.45±25.70
模型组	152.40±29.70[a]	361.53±54.69[a]
鳖龙软肝汤低剂量组	101.18±24.56[ab]	232.28±19.79[ab]
鳖龙软肝汤高剂量组	75.68±27.76[abc]	186.70±55.50[abc]

a：与对照组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$；c：与鳖龙软肝汤低剂量组比较，$P<0.05$。

3.5　大鼠肝组织中NLRP3/caspase-1/GSDMD信号通路相关基因表达比较

与对照组比较，其余各组大鼠肝组织中NLRP3、caspase-1、GSDMD、IL-18、IL-1β mRNA的表达量均显著升高（$P<0.05$）；与模型组比较，鳖龙软肝汤低、高剂量组大鼠肝组织中NLRP3、caspase-1、GSDMD、IL-18、IL-1β mRNA的表达量均显著降低（$P<0.05$），且高剂量组大鼠肝组织中NLRP3、GSDMD、IL-18 mRNA的表达量均显著低于低剂量组，caspase-1 mRNA的表达量显著高于低剂量组（$P<0.05$）。结果见图4。



A. NLRP3 mRNA　B. caspase-1 mRNA　C. GSDMD mRNA　D. IL-18 mRNA　E. IL-1β mRNA

Ⅰ：对照组；Ⅱ：模型组；Ⅲ：鳖龙软肝汤低剂量组；Ⅳ：鳖龙软肝汤高剂量组；a：与对照组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$；c：与鳖龙软肝汤低剂量组比较，$P<0.05$。

图4　各组大鼠肝组织中NLRP3/caspase-1/GSDMD信号通路相关基因表达比较（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

3.6 大鼠肝组织中NLRP3/caspase-1/GSDMD信号通路相关蛋白表达比较

与对照组比较，其余各组大鼠肝组织中NLRP3、caspase-1、GSDMD、IL-18、IL-1β蛋白的表达量均显著升高（$P<0.05$）；与模型组比较，鳖龙软肝汤低、高剂量组大鼠肝组织中NLRP3、caspase-1、GSDMD、IL-18、IL-1β蛋白的表达量均显著降低（$P<0.05$），且高剂量组大鼠肝组织中NLRP3、caspase-1、GSDMD、IL-1β蛋白的表达量均显著低于低剂量组（$P<0.05$）。结果见图5、图6。

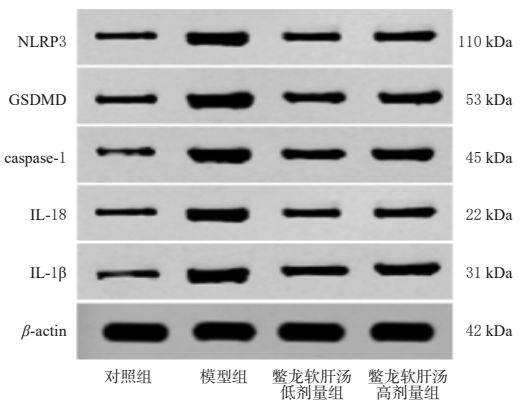
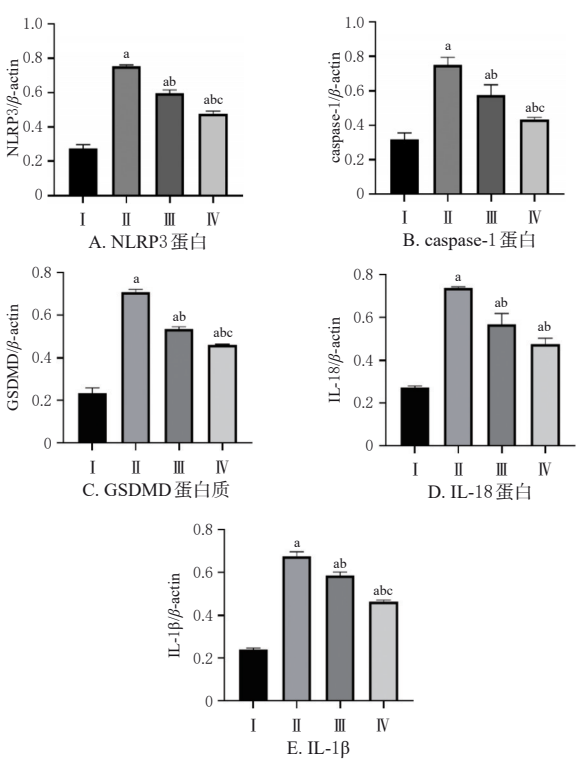


图5 各组大鼠肝组织中NLRP3/caspase-1/GSDMD信号通路相关蛋白表达的电泳图



Ⅰ：对照组；Ⅱ：模型组；Ⅲ：鳖龙软肝汤低剂量组；Ⅳ：鳖龙软肝汤高剂量组；a：与对照组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$；c：与鳖龙软肝汤低剂量组比较，$P<0.05$。

图6 各组大鼠肝组织中NLRP3/caspase-1/GSDMD信号通路相关蛋白表达比较（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

4 讨论

原发性肝癌属于中医“癥瘕”“积聚”“鼓胀”等范畴[14]。虚、瘀、毒是肝癌的主要病机，贯穿肝癌全程。因此，“扶正”结合“祛邪”是中医辨治肝癌的重要原则。扶正重在健脾益气、补益肝肾，祛邪重在活血化瘀、清热解毒、行气化湿等。瘀血阻络是肝硬化、肝癌的基本病机，血瘀既是肝硬化、肝癌形成的原因，也是其病程中始终存在的病理因素，且随病情进展而加剧。因此，活血化瘀、破血祛瘀是肝癌的重要治法，应贯穿肝癌治疗的始终[15-16]。鳖龙软肝汤中桃仁、莪术、地龙入肝经破血逐瘀，白芍、鳖甲补肝阴，柴胡、茯苓疏肝健脾，诸药共奏疏肝理脾、化瘀扶正之功。

DEN主要通过产生自由基，造成机体氧化应激损伤并引发炎症反应，从而诱导肝脏发生肝纤维化-肝硬化-肝癌病变[17]，与人类肝癌发病进程相似。基于此，本研究通过DEN诱导建立了大鼠肝癌模型。

NLRP3/caspase-1/GSDMD信号通路可激活肿瘤炎症微环境，是肝癌形成的关键分子机制之一。研究指出，NLRP3是细胞焦亡的关键起始位点，当机体受到外源或内源微生物感染、相关因子刺激或损伤时，NLRP3可与凋亡相关斑点样蛋白和caspase-1前体结合，形成有活性的NLRP3炎性小体，在此过程中，caspase-1前体可裂解形成活化的caspase-1，这一转变可进一步剪切IL-18前体和IL-1β前体，从而促进炎症因子IL-18和IL-1β的成熟、释放以及GSDMD的表达，进而引发强烈的炎症反应，最终加剧细胞焦亡[9]。然而，关于NLRP3炎性小体与细胞焦亡在肝癌发生发展中的作用，目前的研究结果尚存在一定分歧：一方面，炎性小体过度激活所导致的炎症反应会促进肿瘤的发生发展；另一方面，激活炎性小体可诱导肿瘤细胞发生焦亡，从而有效杀伤肿瘤细胞[18]。本研究通过DEN诱导建立肝癌大鼠模型，考察鳖龙软肝汤能否通过调节NLRP3/caspase-1/GSDMD信号通路来发挥抗肝癌作用。结果显示，与模型组比较，鳖龙软肝汤可显著降低大鼠肝脏质量和肝指数，改善肝功能，提示该方能减轻DEN诱导的大鼠肝损伤，具有一定的肝脏保护作用。外观观察和HE、Masson染色结果显示，经鳖龙软肝汤干预后，模型大鼠肝脏表面结节、肿瘤块和炎症细胞浸润均明显减少，Ishak评分显著降低，提示鳖龙软肝汤具有抗肝纤维化、抗肝癌的作用，可抑制肝癌进程，与王雅等[6]研究结果基本一致。同时，鳖龙软肝汤可下调模型大鼠肝组织中NLRP3、caspase-1、GSDMD、IL-18、IL-1β mRNA和蛋白的表达，提示该方可能通过抑制NLRP3/caspase-1/GSDMD信号通路来减轻肝脏炎症反应，改善DEN诱导的肝癌模型大鼠体内炎症微环境，从而发挥抗肝癌作用。

综上所述，鳖龙软肝汤可抑制大鼠肝癌进程，减轻肝损伤，其作用机制可能与抑制NLRP3/caspase-1/GSDMD信号通路、改善炎症反应有关。

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] 国家卫生健康委员会医政医管局. 原发性肝癌诊疗指南: 2022年版[J]. 中华肝脏病杂志, 2022, 30(4): 367-388.
Bureau of Medical Administration, National Health Commission. Standardization for diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma: 2022 edition[J]. Chin J Hepatol, 2022, 30(4): 367-388.

[3] 刘江荣, 王霞, 胡玫. 精准医学下肝癌研究热点的可视化分析[J/OL]. 肿瘤综合治疗电子杂志, 2022, 8(1): 99-106 [2024-07-21]. http://www.jmcm2018.com/CN/10.12151/JMCM.2022.01-15. DOI: 10.12151/JMCM.2022.01-05.
LIU J R, WANG X, HU M. Analysis of research hotspots of liver cancer under precision medicine based on bibliometric[J/OL]. J Multidiscip Cancer Manag (Electronic Version), 2022, 8(1): 99-106[2024-07-21]. http://www.jmcm2018.com/CN/10.12151/JMCM.2022.01-15. DOI: 10.12151/JMCM.2022.01-05.

[4] HSUEH K C, LEE T Y, KOR C T, et al. The role of liver transplantation or resection for patients with early hepatocellular carcinoma[J]. Tumor Biol, 2016, 37(3): 4193-4201.

[5] 雷久士, 李观林, 郭建生, 等. 鳖龙软肝片对实验大鼠肝纤维化的病理研究[J]. 湖南中医学院学报, 2000, 20(1): 22-23.
LEI J S, LI G L, GUO J S, et al. Pathological study of Bielongruangan tablet on hepatic fibrosis in experimental rats[J]. J Hunan Coll Tradit Chin Med, 2000, 20(1): 22-23.

[6] 王雅, 熊焰, 张涛, 等. 鳖龙软肝片抗肝纤维化临床观察[J]. 湖南中医药大学学报, 2010, 30(9): 181-183.
WANG Y, XIONG Y, ZHANG T, et al. Clinical study of Bielong ruangan capsule on liver fibrosis[J]. J Tradit Chin Med Univ Hunan, 2010, 30(9): 181-183.

[7] 石文静, 彭杰, 张涛, 等. 鳖龙软肝片联合抗病毒药治疗乙型肝炎肝硬化的回顾性临床研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2024, 44(3): 473-478.
SHI W J, PENG J, ZHANG T, et al. Retrospective clinical study on Bielong ruangan tablets combined with antiviral drugs in treating hepatitis B cirrhosis[J]. J Hunan Univ Chin Med, 2024, 44(3): 473-478.

[8] 黄鑫悦, 晁旭, 黄峰. 细胞焦亡在原发性肝癌进展中的作用研究进展[J]. 药物评价研究, 2021, 44(7): 1535-1540.
HUANG X Y, CHAO X, HUANG F. Research progress on role of pyroptosis in progress of primary liver cancer [J]. Drug Eval Res, 2021, 44(7): 1535-1540.

[9] KELLEY N, JELTEMA D, DUAN Y H, et al. The NLRP3 inflammasome: an overview of mechanisms of activation and regulation[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(13): 3328.

[10] TOLBA R, KRAUS T, LIEDTKE C, et al. Diethylnitrosamine (DEN)-induced carcinogenic liver injury in mice[J]. Lab Anim, 2015, 49(Suppl. 1): 59-69.

[11] 黄守坚. 新药临床前研究的剂量设计要点[C]//中国药学会. 第二届药品技术审评研讨会论文集. 北京: 中国药学会, 2003: 423-425.
HUANG S J. Key points of dose design in preclinical studies of new drugs[C]//Chinese Pharmaceutical Association. Proceedings of the Second Drug Technical Review Seminar. Beijing: Chinese Pharmaceutical Association, 2003: 423-425.

[12] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 3版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 202-204.
XU S Y, BIAN R L. CHEN X. Pharmacological experimental methodology[M]. 3rd edition. Beijing: People's Health Publishing House, 2002: 202-204.

[13] GOODMAN Z D. Grading and staging systems for inflammation and fibrosis in chronic liver diseases[J]. J Hepatol, 2007, 47(4): 598-607.

[14] 蒋益兰, 潘敏求, 黄钢. 原发性肝癌中西医结合诊疗专家共识[J]. 中医药导报, 2021, 27(9): 101-107.
JIANG Y L, PAN M Q, HUANG G. Consensus on diagnosis and treatment of primary liver cancer with integrated traditional Chinese and western medicine[J]. Guid J Tradit Chin Med Pharm, 2021, 27(9): 101-107.

[15] 聂广, 张赤志, 唐智敏, 等. 拓展王伯祥教授"肝络瘀阻"学说构建中医肝病分期辨证体系[J]. 中西医结合肝病杂志, 2022, 32(9): 773-779, 786.
NIE G, ZHANG C Z, TANG Z M, et al. Expanding Professor Wang Boxiang's theory of "stasis of liver collateral" and constructing stage syndrome differentiation system of liver disease in traditional Chinese medicine[J]. Chin J Integr Tradit West Med Liver Dis, 2022, 32(9): 773-779, 786.

[16] 顾姣, 邵铭. 邵铭教授治疗肝硬化的活血化瘀法用药经验[J]. 中医临床研究, 2019, 11(5): 59-61.
GU J, SHAO M. Experience of Professor Shao Ming in treating cirrhosis with the Huoxue huayu therapy[J]. Clin J Chin Med, 2019, 11(5): 59-61.

[17] 王明亮, 彭蕴茹. 二乙基亚硝胺诱导小鼠肝纤维化动态模型的建立及病理机制初探[J]. 实验动物科学, 2021, 38(3): 1-9.
WANG M L, PENG Y R. To establish a dynamic model of hepatic fibrosis induced by diethylnitrosamine and explore its pathological mechanism in mice[J]. Lab Anim Sci, 2021, 38(3): 1-9.

[18] 何欢欢, 宋新强, 王帅. 细胞焦亡在癌症发生发展及治疗中作用的研究进展[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2022, 36(7): 536-543.
HE H H, SONG X Q, WANG S. Roles of pyroptosis in occurrence, development and treatment of cancer: a review [J]. Chin J Pharmacol Toxicol, 2022, 36(7): 536-543.

(收稿日期: 2024-03-28 修回日期: 2024-08-23)
(编辑: 邹丽娟)