

健脾益气方对肝癌模型大鼠的治疗作用及机制研究[△]

王超^{1,2*}, 岳紫晨¹, 音金萍¹, 蒋筱¹, 卓少元^{1#} (1. 广西中医药大学基础医学院, 南宁 530200; 2. 广西中医药大学广西高发传染病中西医结合转化医学重点实验室, 南宁 530200)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2021)19-2342-05
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2021.19.06



摘要 目的:探讨健脾益气方对二乙基亚硝胺(DEN)诱导的肝癌模型大鼠的治疗作用及机制。方法:将80只雄性SD大鼠分为正常组、模型组、NOD样受体家族3(NLRP3)抑制剂组(MCC950, 4.5 mg/kg)、胱天蛋白酶1(caspase-1)抑制剂组(VX-765, 4.5 mg/kg)和健脾益气方低、中、高剂量组(5.25、10.5、21 g/kg),除模型组20只大鼠外(其中10只用于判断是否造模成功),其余每组10只。除正常组大鼠腹腔注射生理盐水外,其余各组大鼠腹腔注射DEN(70 mg/kg)以复制肝癌模型。造模成功后,正常组和模型组大鼠灌胃生理盐水,各抑制剂组大鼠腹腔注射相应药物,健脾益气方各剂量组大鼠灌胃相应药物,每日1次,连续4周。末次处理后,观察大鼠肝组织病理学形态变化,检测大鼠血清中肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素1 β (IL-1 β)的含量,检测大鼠肝组织中NLRP3以及细胞程序性坏死相关蛋白[衔接子凋亡相关斑点样蛋白(ASC)、caspase-1前体(pro-caspase-1)、受体相互作用蛋白激酶1(RIP1)、RIP3、混合系激酶区域样蛋白(MLKL)]的表达水平。结果:与正常组比较,模型组大鼠的肝细胞可见不同程度的脂肪变性、细胞核增大和呈团块状,部分可见出血和坏死,并伴有增生灶和结节;其肝组织损伤指数和血清中TNF- α 、IL-1 β 含量以及肝组织中NLRP3、ASC、pro-caspase-1、RIP1、RIP3、MLKL蛋白的表达水平均显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与模型组比较,健脾益气方低、中剂量组大鼠的肝组织仍有大量炎性细胞浸润,而其高剂量组和各抑制剂组大鼠的炎性细胞浸润均明显减少;且健脾益气方各剂量组和各抑制剂组大鼠的肝组织损伤指数和血清以及肝组织中上述指标水平大部分显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论:健脾益气方对肝癌模型大鼠具有治疗作用,其作用机制可能与下调NLRP3炎症小体的表达、抑制细胞程序性坏死有关。

关键词 健脾益气方;肝癌;NOD样受体家族3炎症小体;程序性坏死

Study on Therapeutic Effects and Its Mechanism of Jianpi Yiqi Decoction on Liver Cancer Model Rats

WANG Chao^{1,2}, YUE Zichen¹, YIN Jinping¹, JIANG Xiao¹, ZHUO Shaoyuan¹ (1. School of Basic Medicine, Guangxi University of TCM, Nanning 530200, China; 2. Guangxi Key Laboratory of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Translational Medicine for High Incidence Infectious Diseases, Guangxi University of TCM, Nanning 530200, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To explore the therapeutic effects and its mechanism of Jianpi yiqi decoction on diethylnitrosamine (DEN) induced liver cancer model rats. METHODS: Totally 80 male SD rats were divided into normal group, model group, Nod-like receptor family 3 (NLRP3) inhibition group (MCC950, 4.5 mg/kg), caspase-1 inhibitory group (VX-765, 4.5 mg/kg), Jianpi yiqi decoction low-dose, medium-dose and high-dose groups (5.25, 10.5, 21 g/kg), with 10 rats in each group except for 20 rats in model group (10 of them were only used to judge whether modeling was successful). Rats in each group were intraperitoneally injected with DEN (70 mg/kg) to induce liver cancer model, except for the rats in normal group which were replaced by normal saline. After modeling, normal group and model group were given normal saline intragastrically; inhibitor groups were given relevant medicine intraperitoneally; Jianpi yiqi decoction groups were given relevant medicine intragastrically, once a day, for consecutive 4 weeks. After last administration, histopathological morphology of liver tissue was observed. The contents of serum inflammatory factors TNF- α and IL-1 β were detected. The expression of NLRP3 and programmed cell necrosis associated protein (ASC, pro-caspase-1, RIP1, RIP3 and MLKL) in liver tissue were detected. RESULTS: Compared with the normal group, the hepatocytes of model group showed varying degrees of steatosis, enlarged nuclei, lumpy, bleeding and necrosis, accompanied by proliferative foci and nodules. Liver tissue injury index, serum content of TNF- α and IL-1 β as well as the protein expression of NLRP3, ASC, pro-caspase-1, RIP1, RIP3 and MLKL in liver tissue were significantly increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with model group, there were still a large number of inflammatory cell

[△] 基金项目:国家自然科学基金地区科学基金项目(No.81860824, No.81660775);广西自然科学基金资助项目(No.2017GXNSFBA-198086, No. 2018GXNSFAA281045);广西中医药大学2018年引进博士科研启动基金项目(No.04B1803616)

* 主管技师, 博士。研究方向:肝癌的中医药防治。E-mail: wangc@gxtcmu.edu.cn

通信作者:教授, 硕士生导师, 博士。研究方向:肝癌的中医药防治。E-mail: sherwin_zhuo@126.com

infiltration in the liver tissue of rats in Jianpi yiqi decoction low-dose and medium dose groups, while the inflammatory cell infiltration of rats in high-dose group and inhibitor groups decreased significantly; the liver tissue injury index and above indexes levels in serum and liver tissue were decreased significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). CONCLUSIONS: Jianpi yiqi decoction shows therapeutic effect on liver cancer model rats, the mechanism of which may be associated with down-regulating the expression of NLRP3 inflammasome and inhibiting programmed cell necrosis.

KEYWORDS Jianpi yiqi decoction; Liver cancer; Nod-like receptor family 3 inflammasome; Programmed necrosis

肝癌是最常见的恶性肿瘤之一。2020年全球肝癌新发病例数超90万例,其中我国占45%,且发病率居第5位、病死率居第2位^[1]。研究表明,癌细胞转移是导致大部分癌症患者死亡的主要原因,其中肿瘤炎症微环境在癌细胞转移中发挥了重要作用^[2-3]。

肝癌属于中医学“肝积”“肝壅”等范畴,临床实践证明中医药治疗肝癌能改善患者的临床症状、延长其生存期^[4]。健脾是目前中医临床防治肝癌的重要治则。健脾益气方是本课题组根据肝癌临床治疗经验和相关文献研究归纳总结出的防治肝癌的基本方。该方由黄芪、白术、云苓、白芍、半夏、薏仁和神曲等7味中药组成,对肝癌具有良好的治疗作用^[5-6]。本课题组前期研究发现,健脾益气方能明显下调NOD样受体家族3(NLRP3)炎症小体核心分子胱天蛋白酶1(caspase-1)的表达,抑制肝癌细胞的增殖和侵袭,诱导肝癌细胞凋亡^[7-8],但其治疗肝癌的具体作用机制尚不明确。

细胞程序性坏死是一种炎症相关的程序性死亡,可由肿瘤坏死因子 α (TNF- α)激发信号,使受体相互作用蛋白激酶1(RIP1)进入细胞质,然后招募RIP3形成RIP1-RIP3复合物,使RIP3磷酸化,从而募集并磷酸化混合系激酶区域样蛋白(MLKL);磷酸化后的MLKL转移至细胞膜,形成膜孔从而引起细胞坏死^[9-11]。研究发现,在肝癌发生发展中发挥重要作用的NLRP3炎症小体主要由NLRP3、衔接子凋亡相关斑点样蛋白(ASC)及效应分子caspase-1前体(pro-caspase-1)组成,激活的NLRP3炎症小体可以促进TNF- α 的释放^[12]。因此,本课题组推测健脾益气方可能是通过下调NLRP3炎症小体的活性来影响TNF- α 的释放,进而抑制细胞程序性坏死,发挥治疗肝癌的作用。

基于此,本研究采用二乙基亚硝胺(DEN)诱导建立大鼠肝癌模型,以MCC950(NLRP3抑制剂)和VX-765(caspase-1抑制剂)为对照进行干预^[13-14],初探健脾益气方是否基于NLRP3炎症小体介导的程序性坏死来发挥治疗肝癌的作用,以期为肝癌的临床治疗提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器有:Epoch Biotek型全波长酶标仪(美国Bio-Tek公司)、DMI3000B型倒置显微镜(德国Leica公司)、ST 16R型高速离心机(美国Thermo Fisher Scientific公司)、DYCZ-24DN型双垂直电泳槽(北京六一生物科技有限公司)、ChemDoc MP全能型成像分析

系统(美国Bio-Rad公司)。

1.2 主要药品与试剂

黄芪、白术、云苓、白芍、半夏、薏仁、神曲等药材均购自广西中医药大学第一附属医院,由广西中医药大学中药鉴定教研室田慧教授鉴定均为真品。其他主要药品与试剂有: DEN(美国Sigma公司,批号N0756-10ML), TNF- α 酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(武汉华美生物工程有限公司,批号L17013096), 白细胞介素1 β (IL-1 β)ELISA试剂盒(武汉依莱瑞特生物科技股份有限公司,批号6S5915PQSP), 兔源甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)多克隆抗体、兔源RIP1多克隆抗体(武汉三鹰生物技术公司,批号分别为17519-1-AP、00060976), 兔源RIP3多克隆抗体、兔源MLKL多克隆抗体(武汉爱博泰克生物科技有限公司,批号分别为A5431、A13451), 兔源NLRP3多克隆抗体(美国Abcam公司,批号B-3), 鼠源ASC单克隆抗体、鼠源pro-caspase-1单克隆抗体(美国Santa Cruz公司,批号分别为#J1518、#J1518), 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔免疫球蛋白G(IgG)多克隆抗体(二抗)、辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠IgG多克隆抗体(二抗)、ECL发光试剂盒(北京中杉金桥生物有限公司,批号分别为00081002、00062578、7E34E9); MCC950、VX-765(美国MCE公司,批号分别为#39462、#32669); 其余试剂均为实验室常用规格,水为纯净水。

1.3 动物

本研究所用动物为SPF级SD大鼠,雄性,体质量(140 \pm 20)g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,动物生产许可证号为SCXK(湘)2016-0002。大鼠饲养于广西中医药大学SPF级实验动物中心,均自由摄食饮水。本研究动物实验均符合广西中医药大学动物伦理委员会标准。

2 方法

2.1 健脾益气方灌胃溶液的制备

按健脾益气方处方称取黄芪、白术、云苓、白芍、半夏、薏仁、神曲等药材适量,加10倍量(按L/kg计,下同)水浸泡1h后,煎煮1.5h,过滤;再加8倍量水煎煮1h,过滤;合并2次滤液,浓缩制成质量浓度为1g/mL(以生药量计)的药液,经过滤除菌后分装备用。

2.2 分组、造模与给药

将80只大鼠适应性喂养3d后,随机分为正常组、模型组、NLRP3抑制剂组(MCC950, 4.5 mg/kg, 剂量参考

文献[13]设置)、caspase-1抑制剂组(VX-765, 4.5 mg/kg, 剂量参考文献[15]设置)和健脾益气方低、中、高剂量组(5.25、10.5、21 g/kg, 剂量分别为临床等效剂量的3、6、12倍),除模型组20只大鼠外,其余每组10只。除正常组大鼠腹腔注射生理盐水外,其余各组大鼠腹腔注射DEN(70 mg/kg)以复制肝癌模型^[16]。造模前和造模后分别从模型组中取5只大鼠处死进行对比分析,当造模后大鼠肝组织病理学形态等指标显著变化时,则表明肝癌模型复制成功^[17]。造模成功后,正常组和模型组大鼠灌胃生理盐水,各抑制剂组大鼠腹腔注射相应药物,健脾益气方各剂量组大鼠灌胃相应药物,每日1次,连续4周。

2.3 样本采集

末次处置后1 h,各组大鼠腹腔注射3%戊巴比妥进行麻醉,腹主动脉采血;血样静置4 h后,以3 000 r/min离心15 min,取上层血清,备用。取血完成后,处死各组大鼠,取其肝组织,一部分固定于4%多聚甲醛中,备用;另一部分保存于-80 ℃条件下,备用。

2.4 大鼠肝组织病理学形态观察

取“2.3”项下各组大鼠固定于4%多聚甲醛的肝组织,进行石蜡包埋、切片和常规苏木精-伊红(HE)染色,然后于光学显微镜下观察大鼠肝组织病理学变化,并参考文献[18-19]方法,评价肝组织的损伤指数:0分为无细胞变性、坏死及炎性细胞浸润;1分为轻度充血、水肿及炎症;2分为充血水肿、部分炎性细胞浸润;3分为高度充血水肿、部分肝细胞坏死;4分为大量肝细胞坏死、纤维化。

2.5 大鼠血清中TNF- α 、IL-1 β 含量的检测

采用ELISA法进行检测。取“2.3”项下各组大鼠血清,按试剂盒说明书相关方法操作,采用酶标仪于450 nm波长处测定血清中TNF- α 、IL-1 β 的含量。

2.6 大鼠肝组织中NLRP3、ASC、pro-caspase-1、RIP1、RIP3、MLKL蛋白表达水平的检测

采用Western blot法进行检测。取“2.3”项下于-80 ℃条件下保存的各组大鼠肝组织20 mg,加入RIPA裂解液于冰上裂解;按BCA法测定蛋白浓度,将各组蛋白稀释至同一浓度水平,加入5倍上样缓冲液混匀,并于100 ℃条件下变性5 min。取变性后蛋白,进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),转膜,以封闭液室温封闭1 h,然后分别加入NLRP3、ASC、pro-caspase-1、RIP1、RIP3、MLKL、GAPDH一抗(稀释度均为1:600),于4 ℃孵育过夜;以TBST洗膜10 min \times 3次,加入相应二抗(稀释度均为1:5 000),于37 ℃孵育1 h;以TBST洗膜10 min \times 3次,以ECL化学发光试剂显色后,置于全能型成像分析系统中成像。采用Image J 1.49v软件进行分析,以目标蛋白与内参蛋白GAPDH的灰度值比值表示目标蛋白的表达水平。

2.7 统计学方法

采用SPSS 20.0软件进行统计分析。符合正态分布

和方差齐性的数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD-*t*检验;符合非正态分布的数据以中位数表示,采用Mann-Whitney *U*秩和检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 健脾益气方对肝癌模型大鼠肝组织病理学形态的影响

正常组大鼠的肝细胞完整、大小均匀、无核分裂,在肝小叶中央静脉周围呈放射状排列;与正常组比较,模型组大鼠的肝细胞可见不同程度的脂肪变性、细胞核增大和呈团块状,部分可见出血和坏死,并伴有增生灶和结节,其肝组织损伤指数显著升高($P<0.01$);与模型组比较,健脾益气方低、中剂量组大鼠的肝组织仍有大量炎性细胞浸润,而其高剂量组和NLRP3抑制剂组、caspase-1抑制剂组大鼠肝组织的炎性细胞浸润均明显减少,且健脾益气方各剂量组和各抑制剂组大鼠的肝组织损伤指数均显著降低($P<0.01$),详见图1、表1。

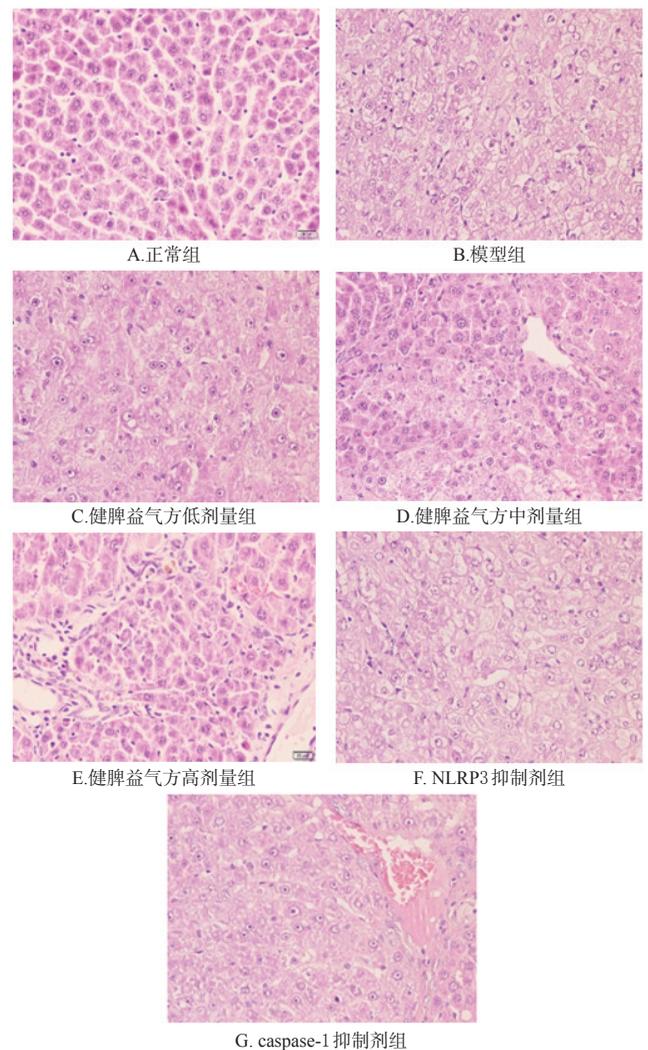


图1 各组大鼠肝组织病理学形态的显微图(HE染色, $\times 400$)

Fig 1 Histopathological micrograph of liver tissue of rats in each group(HE staining, $\times 400$)

表1 各组大鼠肝组织损伤指数测定结果($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 1 Liver tissue injury index of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	损伤指数	组别	损伤指数
正常组	0.33 ± 0.50	健脾益气方高剂量组	1.78 ± 0.63 ^{##}
模型组	3.67 ± 0.47 ^{**}	NLRP3抑制剂组	1.22 ± 0.79 ^{##}
健脾益气方低剂量组	2.89 ± 0.31 ^{##}	caspase-1抑制剂组	1.11 ± 0.57 ^{##}
健脾益气方中剂量组	1.56 ± 0.50 ^{##}		

注:与正常组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,^{##} $P < 0.01$

Note: vs. normal group, ** $P < 0.01$; vs. model group, ^{##} $P < 0.01$

3.2 健脾益气方对肝癌模型大鼠血清中TNF- α 、IL-1 β 含量的影响

与正常组比较,模型组大鼠血清中TNF- α 、IL-1 β 含量均显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,健脾益气方各剂量组、NLRP3抑制剂组、caspase-1抑制剂组大鼠血清中TNF- α (健脾益气方低、高剂量组除外)、IL-1 β 含量均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),详见表2。

表2 各组大鼠血清中TNF- α 、IL-1 β 含量测定结果($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 2 Content of TNF- α and IL-1 β in serum of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	TNF- α , pg/mL	IL-1 β , pg/mL
正常组	10.41 ± 0.67	24.46 ± 9.02
模型组	13.55 ± 2.46 ^{**}	51.31 ± 6.90 ^{**}
健脾益气方低剂量组	12.32 ± 0.96	37.45 ± 2.46 [#]
健脾益气方中剂量组	10.38 ± 0.27 ^{##}	37.31 ± 1.94 [#]
健脾益气方高剂量组	12.21 ± 0.81	38.35 ± 2.94 [#]
NLRP3抑制剂组	11.47 ± 0.46 [#]	33.81 ± 6.33 ^{##}
caspase-1抑制剂组	8.20 ± 0.28 ^{##}	34.13 ± 3.66 ^{##}

注:与正常组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$

Note: vs. normal group, ** $P < 0.01$; vs. model group, [#] $P < 0.05$,

^{##} $P < 0.01$

3.3 健脾益气方对肝癌模型大鼠肝组织中NLRP3、ASC、pro-caspase-1、RIP1、RIP3、MLKL蛋白表达的影响

与正常组比较,模型组大鼠肝组织中NLRP3、ASC、pro-caspase-1、RIP1、RIP3、MLKL蛋白表达水平均显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);与模型组比较,健脾益气方各剂量组、NLRP3抑制剂组、caspase-1抑制剂组大鼠肝组织中NLRP3、ASC、pro-caspase-1、RIP1(caspase-1抑制剂组除外)、RIP3、MLKL(健脾益气方低、中剂量组和caspase-1抑制剂组除外)蛋白表达水平均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),详见表3、图2。

4 讨论

脾虚是肝癌最重要的病机之一,因而中医在临床上常以健脾之法防治肝癌^[4]。临床实践表明,健脾类方药能明显改善肝癌患者的临床症状、增强其机体免疫力、提高其生活质量、延长其生存期^[4,20-21]。本课题组前期研究表明,健脾益气方具有补益正气、健脾祛湿、散结消痞的功效^[5-6],且对肝癌具有良好的治疗作用。

表3 各组大鼠肝组织中NLRP3、ASC、pro-caspase-1、RIP1、RIP3、MLKL蛋白表达水平测定结果($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 3 Protein expression of NLRP3, ASC, pro-caspase-1, RIP1, RIP3 and MLKL in liver tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	NLRP3/ GAPDH	ASC/ GAPDH	pro-caspase-1/ GAPDH	RIP1/ GAPDH	RIP3/ GAPDH	MLKL/ GAPDH
正常组	0.27 ± 0.01	0.66 ± 0.06	0.54 ± 0.04	0.63 ± 0.01	0.72 ± 0.06	0.33 ± 0.01
模型组	0.69 ± 0.07 ^{**}	1.09 ± 0.07 ^{**}	0.81 ± 0.01 ^{**}	0.74 ± 0.03 [*]	0.94 ± 0.09 [*]	0.66 ± 0.08 [*]
健脾益气方低剂量组	0.38 ± 0.03 ^{##}	0.53 ± 0.04 ^{##}	0.56 ± 0.03 ^{##}	0.64 ± 0.04 [#]	0.72 ± 0.08 [#]	0.55 ± 0.06
健脾益气方中剂量组	0.32 ± 0.01 ^{##}	0.77 ± 0.03 ^{##}	0.60 ± 0.03 ^{##}	0.66 ± 0.02 [#]	0.74 ± 0.06 [#]	0.56 ± 0.05
健脾益气方高剂量组	0.43 ± 0.02 ^{##}	0.89 ± 0.05 ^{##}	0.62 ± 0.03 ^{##}	0.60 ± 0.02 [#]	0.69 ± 0.06 [#]	0.51 ± 0.05 [#]
NLRP3抑制剂组	0.28 ± 0.01 [#]	0.85 ± 0.04 ^{##}	0.19 ± 0.09 ^{##}	0.28 ± 0.01 [#]	0.65 ± 0.05 [#]	0.23 ± 0.02 ^{##}
caspase-1抑制剂组	0.61 ± 0.01 [#]	0.76 ± 0.04 ^{##}	0.74 ± 0.05 [#]	0.69 ± 0.03	0.72 ± 0.06 [#]	0.61 ± 0.03

注:与正常组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$

Note: vs. normal group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; vs. model group, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$

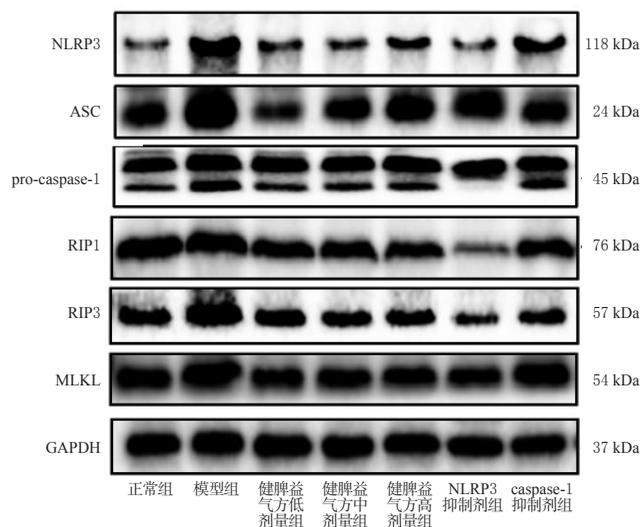


图2 各组大鼠肝组织中NLRP3、ASC、pro-caspase-1、RIP1、RIP3、MLKL蛋白表达的电泳图

Fig 2 Electrophoretogram of protein expression of NLRP3, ASC, pro-caspase-1, RIP1, RIP3 and MLKL in liver tissues of rats in each group

由NLRP3、ASC和效应分子pro-caspase-1组成的NLRP3炎症小体可介导多种疾病的炎症反应^[22]。其在肿瘤的发生、发展和转移中也具有重要作用,如刘钱^[23]研究发现,与正常肝细胞比较,肝癌细胞中NLRP3水平显著上调。在生理条件下,NLRP3炎症小体处于非活动状态;当感知到危险信号时,NLRP3招募并裂解pro-caspase-1,从而激活caspase-1;激活的caspase-1可将pro-IL-1 β 、pro-IL-18切割成IL-1 β 、IL-18,使之分泌至细胞外,进而发挥各种炎症效应^[24]。另外,IL-1 β 、IL-18还可增强细胞黏附作用,促进黑色素瘤的肝转移^[25]。

细胞程序性坏死是一种炎症相关的程序性死亡,由TNF- α 下游的RIP1/RIP3/MLKL信号通路介导,使得炎

症加剧、细胞死亡,进而促进癌细胞转移^[9-11]。细胞程序性坏死可以通过释放损害相关分子模式(damage-associated molecular patterns, DAMPs),从而参与NLRP3炎症小体的激活;且激活的NLRP3炎症小体还可以促进TNF- α 的释放^[12]。研究发现,NLRP3与细胞焦亡(pyroptosis)也有关,而细胞焦亡主要依赖caspase-1的活化^[26]。因此,本研究采用caspase-1的抑制剂VX-765来排除细胞焦亡对本研究的影响,与NLRP3抑制剂组共同作为对照探讨健脾益气方治疗肝癌的作用机制。

本研究结果显示,经DEN诱导后,肝癌模型大鼠的肝组织损伤指数和血清中TNF- α 、IL-1 β 含量以及肝组织中NLRP3、ASC、pro-caspase-1、RIP1、RIP3、MLKL蛋白表达水平均显著升高,表明肝癌模型大鼠的细胞程序性坏死信号通路TNF- α /RIP1/RIP3/MLKL被激活。经健脾益气方和NLRP3抑制剂、caspase-1抑制剂干预后,模型大鼠肝组织损伤指数和血清中TNF- α (健脾益气方低、高剂量组除外)、IL-1 β 含量以及肝组织中NLRP3、ASC、pro-caspase-1、RIP1(caspase-1抑制剂组除外)、RIP3、MLKL(健脾益气方低、中剂量组和caspase-1抑制剂组除外)均显著降低,表明健脾益气方可通过下调NLRP3炎症小体的表达,抑制细胞程序性坏死,进而治疗肝癌。

综上所述,健脾益气方对肝癌模型大鼠具有治疗作用,其作用机制可能与下调NLRP3炎症小体的表达、抑制细胞程序性坏死有关。

参考文献

[1] World Health Organization. World cancer report 2020[EB/OL].[2021-05-08]. https://www.iarc.fr/cards_page/world-cancer-report/.

[2] NAJAFOV A, CHEN H, YUAN J. Necroptosis and cancer[J]. Trends Cancer, 2017, 3(4):294-301.

[3] QIN L X. Inflammatory immune responses in tumor microenvironment and metastasis of hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Microenviron, 2012, 5(3):203-209.

[4] 方肇勤,李永健,唐辰龙,等. 2 060例原发性肝癌患者证候特点分析[J]. 中医杂志, 2004, 45(1):53-55.

[5] 方肇勤,管冬元,梁尚华. 清热活血健脾中药对大鼠肝癌基因转录差异的调整[J]. 世界华人消化杂志, 2003, 11(3):276-280.

[6] 管冬元,方肇勤. 清热、活血、健脾等不同中医治法对癌基因ras转录调节的实验研究[J]. 中医药通报, 2004, 3(4):44-47.

[7] 卓少元,谢金玲. 健脾益气方含药血清下调Vimentin蛋白水平对人肝癌细胞SMMC-7721的影响[J]. 时珍国医国药, 2017, 28(1):55-59.

[8] 卓少元,谢金玲. 健脾益气方含药血清通过caspase-3/vimentin促进人肝癌MHCC-97H细胞凋亡[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(24):161-166.

[9] NEWTON K, WICKLIFFE K E, DUGGER D L, et al. Cleavage of RIPK1 by caspase-8 is crucial for limiting apoptosis and necroptosis[J]. Nature, 2019, 574(7778):

428-431.

[10] MOMPEAN M, LI W, LI J, et al. The structure of the necrosome RIPK1-RIPK3 core, a human hetero-amyloid signaling complex[J]. Cell, 2018, 173(5):1244-1253.

[11] SEEHAWER M, HEINZMANN F, D'ARTISTA L, et al. Necroptosis microenvironment directs lineage commitment in liver cancer[J]. Nature, 2018, 562(7725):69-75.

[12] 王玲. NLRP3在TNFL促LDL跨内皮细胞穿胞的作用及其靶向分子干预[D]. 武汉:华中科技大学, 2017.

[13] DONOVAN C, LIU G, SHEN S, et al. The role of the microbiome and the NLRP3 inflammasome in the gut and lung[J]. J Leukoc Biol, 2020, 108(3):925-935.

[14] LI S, LI H, ZHANG Y L, et al. SFTSV infection induces Bak/Bax-dependent mitochondrial DNA release to trigger NLRP3 inflammasome activation[J]. Cell Rep, 2020, 30(13):4370-4385.

[15] RAVIZZA T, LUCAS S M, BALOSSO S, et al. Inactivation of caspase-1 in rodent brain: a novel anticonvulsive strategy[J]. Epilepsia, 2006, 47(7):1160-1168.

[16] 汤靓. DEN诱导大鼠肝癌模型的代谢组学研究[D]. 上海:第二军医大学, 2010.

[17] 杨琪,卓少元. Caspase-1及其相关炎症因子在二乙基亚硝胺诱导大鼠肝癌形成过程中的变化及意义[J]. 安徽医科大学学报, 2019, 54(9):1382-1386.

[18] 今井清,榎本真,任进,等. 图解毒性病理学:毒性病理学[M]. 昆明:云南科技出版社, 2006:145-147.

[19] 周兴华. 加味茵陈蒿汤对急性肝损伤大鼠肝组织TLR4信号转导通路及Th1/Th2影响的实验研究[D]. 成都:成都中医药大学, 2013.

[20] 杨静波,张娟,马纯政. 健脾扶正汤对晚期原发性肝癌患者临床疗效及免疫功能、血清肿瘤标志物的影响[J]. 中药药理与临床, 2017, 33(4):163-166.

[21] 贾文霞,赵红兵,陈桂杰,等. 肝癌的中医用药方法[J]. 中国中医基础医学杂志, 2017, 23(1):121-123.

[22] OGURA Y, SUTTERWALA F S, FLAVELL R A. The inflammasome: first line of the immune response to cell stress[J]. Cell, 2006, 126(4):659-662.

[23] 刘钱. NLRP3炎症体在肝细胞内表达和功能的初步研究[D]. 重庆:第三军医大学, 2014.

[24] STROWIG T, HENAO-MEJIA J, ELINAV E, et al. Inflammasomes in health and disease[J]. Nature, 2012, 481(7381):278-286.

[25] VIDAL-VANACLOCHA F, FANTUZZI G, MENDOZA L, et al. IL-18 regulates IL-1 beta-dependent hepatic melanoma metastasis via vascular cell adhesion molecule-1[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97(2):734-739.

[26] SHI J, ZHAO Y, WANG K, et al. Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death[J]. Nature, 2015, 526(7575):660-665.

(收稿日期:2021-06-08 修回日期:2021-08-05)

(编辑:唐晓莲)