

# 化痰祛湿活血方抑制巨噬细胞焦亡改善代谢相关脂肪性肝炎的作用机制研究<sup>Δ</sup>

管雅捷<sup>1,2\*</sup>, 张琪振<sup>1,2</sup>, 徐俊姣<sup>1,2</sup>, 宋艺佳<sup>1,2</sup>, 尚东方<sup>1,3,4,5</sup>, 赵文霞<sup>1,3,4,5</sup>, 刘鸣昊<sup>1,3,4,5#</sup>[1. 河南中医药大学第一附属医院肝病(脾胃)诊疗中心, 郑州 450006; 2. 河南中医药大学第一临床医学院, 郑州 450046; 3. 河南省中医药科学院, 郑州 450046; 4. 中西医防治重大疾病河南省协同创新中心, 郑州 450046; 5. 豫药全产业链研发河南省协同创新中心, 郑州 450046]

中图分类号 R285; R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2026)07-0864-06  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2026.07.07



**摘要** 目的 聚焦NOD样受体蛋白3/胱天蛋白酶1/消皮素D(NLRP3/Caspase-1/GSDMD)经典焦亡通路, 探讨化痰祛湿活血方(HQHF)抑制巨噬细胞焦亡改善代谢相关脂肪性肝炎(MASH)的作用机制。方法 将RAW264.7细胞分为Control组(10%空白血清)、Model组[10%空白血清+5 μg/mL脂多糖(LPS)]、HQHF-L组(2.5%含药血清+7.5%空白血清+5 μg/mL LPS)、HQHF-M组(5%含药血清+5%空白血清+5 μg/mL LPS)、HQHF-H组(10%含药血清+5 μg/mL LPS)。给药后常规培养24 h, 收集细胞及细胞培养上清液。采用扫描电子显微镜和相差荧光显微镜观察细胞形态; 采用免疫荧光法观察消皮素D-N端(GSDMD-N)蛋白的定位与表达; 采用酶联免疫吸附测定法检测细胞培养上清液中白细胞介素1β(IL-1β)、IL-18含量; 采用实时荧光定量聚合酶链式反应法和Western blot法检测细胞中NLRP3、Caspase-1、GSDMD的mRNA及其蛋白表达。结果 与Control组比较, Model组细胞呈现典型焦亡形态, GSDMD-N蛋白在细胞膜聚集且荧光强度显著增强( $P < 0.05$ ), 细胞培养上清液中IL-1β、IL-18含量均显著升高( $P < 0.05$ ), 细胞中NLRP3、Caspase-1、GSDMD mRNA及其蛋白表达均显著上调( $P < 0.05$ )。与Model组比较, HQHF-L、HQHF-M、HQHF-H组细胞的焦亡形态改善, 细胞中GSDMD-N蛋白的膜定位减少且荧光强度显著减弱( $P < 0.05$ ), 细胞培养上清液中IL-1β、IL-18含量均显著降低( $P < 0.05$ ), 细胞中NLRP3、Caspase-1、GSDMD mRNA及其蛋白表达均显著下调( $P < 0.05$ )。结论 化痰祛湿活血方能抑制LPS诱导的巨噬细胞焦亡, 其改善MASH的作用机制可能与抑制NLRP3/Caspase-1/GSDMD经典焦亡通路的激活相关。**关键词** 化痰祛湿活血方; 代谢相关脂肪性肝炎; 巨噬细胞; 焦亡; NOD样受体蛋白3; 胱天蛋白酶1; 消皮素D

## Study on the mechanism of Huatan qushi huoxue formula in improving metabolic dysfunction-associated steatohepatitis by inhibiting macrophage pyroptosis

GUAN Yajie<sup>1,2</sup>, ZHANG Qizhen<sup>1,2</sup>, XU Junjiao<sup>1,2</sup>, SONG Yijia<sup>1,2</sup>, SHANG Dongfang<sup>1,3,4,5</sup>, ZHAO Wenxia<sup>1,3,4,5</sup>, LIU Minghao<sup>1,3,4,5</sup>[1. Liver Disease (Spleen & Stomach) Diagnosis and Treatment Center, the First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450006, China; 2. The First Clinical Medical College, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China; 3. Henan Academy of Chinese Medical Science, Zhengzhou 450046, China; 4. Henan Provincial Collaborative Innovation Center of Prevention and Treatment of Major Diseases by Chinese and Western Medicine, Zhengzhou 450046, China; 5. Henan Collaborative Innovation Center for the Whole Industry Chain R&D of Yu Medicines, Zhengzhou 450046, China]

**ABSTRACT OBJECTIVE** To focus on the classic NOD-like receptor protein 3 (NLRP3)/Caspase-1/gasdermin D (GSDMD) pyroptosis pathway and explore the mechanism by which Huatan qushi huoxue formula (HQHF) inhibits macrophage pyroptosis to ameliorate metabolic dysfunction-associated steatohepatitis (MASH). **METHODS** RAW264.7 cells were divided into 5 groups:

Δ 基金项目 国家自然科学基金项目(No. 82575010, No. 82205086); 河南省科技发展计划项目(No. 242102310500, No. 232102310438); 河南省国家中医药传承创新中心科研专项(No. 2023ZXZX1162); 河南省中医学“双一流”创建科学研究专项课题(No. HSRP-DFCTCM-2023-1-10)

\* 第一作者 博士研究生。研究方向: 中医药防治消化疾病。E-mail: g18206481922@163.com

# 通信作者 教授, 博士生导师, 博士。研究方向: 中医药防治肝胆病的临床与机制。E-mail: liumh015@163.com

Control group (10% blank serum), Model group [10% blank serum+5 μg/mL lipopolysaccharide (LPS)], HQHF-L group (2.5% drug-containing serum+7.5% blank serum+5 μg/mL LPS), HQHF-M group (5% drug-containing serum+5% blank serum+5 μg/mL LPS), and HQHF-H group (10% drug-containing serum+5 μg/mL LPS). After 24 h of routine culture post-administration, cells and supernatants were collected for assays. Cell morphology was observed via scanning electron microscopy and phase-contrast microscopy; localization and

expression of gasdermin D-N (GSDMD-N) were observed by immunofluorescence. Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and IL-18 contents in supernatants were detected by ELISA; mRNA and protein expressions of NLRP3, Caspase-1, and GSDMD were measured using real-time PCR and Western blot. **RESULTS** Compared with the Control group, the Model group showed typical pyroptotic morphology (cell membrane bulging and pore formation), increased aggregation and fluorescence intensity of GSDMD-N on the cell membrane ( $P<0.05$ ), significantly increased the contents of IL-1 $\beta$  and IL-18 in cell supernatants ( $P<0.05$ ), and significantly up-regulated mRNA and protein expressions of NLRP3, Caspase-1, and GSDMD in cells ( $P<0.05$ ). Compared with the Model group, the HQHF-L, HQHF-M and HQHF-H groups showed improved pyroptotic morphology, reduced membrane localization and significantly weakened fluorescence intensity of GSDMD-N ( $P<0.05$ ), significantly decreased the contents of IL-1 $\beta$  and IL-18 in cell supernatants ( $P<0.05$ ), and significantly down-regulated mRNA and protein expressions of NLRP3, Caspase-1, and GSDMD in cells ( $P<0.05$ ). **CONCLUSIONS** HQHF inhibits LPS-induced macrophage pyroptosis, and its mechanism of improving MASH may be associated with the suppression of the activation of the classical NLRP3/Caspase-1/GSDMD pyroptosis pathway.

**KEYWORDS** Huatan qushi huoxue formula; metabolic dysfunction-associated steatohepatitis; macrophage; pyroptosis; NOD-like receptor protein 3; Caspase-1; gasdermin D

代谢相关脂肪性肝病 (metabolic dysfunction-associated fatty liver disease, MAFLD) 是全球范围内最常见的慢性肝病之一, 其炎症进展阶段——代谢相关脂肪性肝炎 (metabolic dysfunction-associated steatohepatitis, MASH) 以肝脂肪变性、炎症反应和肝纤维化为主要特征<sup>[1]</sup>。巨噬细胞, 尤其是肝脏中的库普弗细胞 (Kupffer cells, KCs), 在 MASH 炎症的启动与级联放大中发挥核心调控作用<sup>[2]</sup>。

细胞焦亡作为一种炎症小体介导的程序性细胞死亡方式, 近年来被证实是 MASH 发病机制的关键环节。其经典通路以 NOD 样受体蛋白 3 (NOD-like receptor protein 3, NLRP3) 炎症小体激活为起始, 进而活化胱天蛋白酶 1 (Caspase-1); 活化的 Caspase-1 可切割消皮素 D (gasdermin D, GSDMD), 生成具有膜穿孔活性的消皮素 D-N 端 (gasdermin D-N, GSDMD-N) 片段, 最终引发细胞膜破裂及白细胞介素 1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、IL-18 等炎症因子释放, 加剧局部及全身炎症反应<sup>[3-4]</sup>。有研究证实, 在 MASH 进程中, 肠道菌群紊乱导致的内毒素易位可能激活 KCs 中 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 通路, 进而驱动肝星状细胞活化及纤维化形成<sup>[5-7]</sup>。因此, 靶向该通路可能成为干预 MASH 炎症进程的有效策略。

目前, MASH 的临床治疗缺乏特异性药物, 常用的他汀类药物也因潜在肝毒性导致应用受限, 而中医药在免疫调控与炎症抑制方面具有独特优势<sup>[8]</sup>。化痰祛湿活血方是第二届全国名中医赵文霞教授制定的用于治疗 MASH 的经验方。本课题组前期研究已证实其可改善脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导的巨噬细胞焦亡形态, 并下调焦亡执行蛋白 GSDMD-N 的表达<sup>[9]</sup>, 提示该方在调控细胞焦亡方面具有明确潜力。然而, 上述研究主要集中在细胞焦亡的终末形态及执行蛋白上, 对方剂干预的上游信号通路调控机制尚未阐明。因此, 本研究基于前期研究基础, 通过用 LPS 诱导建立 RAW264.7 巨噬细胞焦亡模型, 从形态学、炎症因子释放及分子表达等多个层面系统探究化痰祛湿活血方对 NLRP3/Caspase-

1/GSDMD 这一经典焦亡通路的干预作用, 旨在为揭示中医“痰湿瘀”理论的生物学内涵以及 MASH 的中医药治疗提供实验依据。

## 1 材料

### 1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括 Infinite M Nano 型全波长酶标仪 (瑞士 Tecan 公司), IX73 型倒置相差荧光显微镜 (日本 Olympus 公司), SU8100 型扫描电子显微镜 (日本 Hitachi 公司), 3111 型 CO<sub>2</sub> 细胞培养箱 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司), DY CZ-24DN 型双垂直电泳仪、DY CZ-40D 型转印电泳仪 (北京六一仪器厂), GeneAmp<sup>®</sup> 9700 型实时荧光定量聚合酶链式反应 (real-time PCR) 仪 (美国 ABI 公司)。

### 1.2 主要药品与试剂

化痰祛湿活血方颗粒剂 (规格 12 g/袋, 批号 22053020) 购自江苏省江阴天江药业有限公司; LPS (批号 S11060) 购自上海源叶生物科技有限公司; DMEM 培养基 (批号 6125558) 购自美国 Gibco 公司; IL-18 酶联免疫吸附测定 (ELISA) 试剂盒 (批号 FN250901C) 购自武汉菲恩生物科技有限公司; 总 RNA 提取试剂 (批号 2500090005) 购自北京索莱宝科技有限公司; 兔源 NLRP3 抗体 (批号 ab263899) 购自英国 Abcam 公司; 兔源 GSDMD 抗体 (批号 AF4012) 购自美国 Affinity 公司; 兔源 GSDMD-N 抗体 (批号 GB154198-100) 购自武汉赛维尔生物科技有限公司; Western blot 快速封闭液、IL-1 $\beta$  ELISA 试剂盒以及兔源 Caspase-1、鼠源甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 抗体、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 二抗、辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠 IgG 二抗 (批号分别为 20036548、40002794、22915-1-Ap-100、00173787、20001626、20001659) 均购自武汉三鹰生物技术有限公司。

### 1.3 动物

SPF 级 SD 大鼠 30 只, 雄性, 体重 (150  $\pm$  20) g, 购自浙江维通利华实验动物技术有限公司桐乡分公司, 动物

生产许可证号为SCXK(浙)2020-0002。大鼠饲养于河南中模生物技术研究院,饲养环境温度为24℃、相对湿度为50%、12 h光/12 h暗循环,饲养期间自由摄食和饮水。本研究中动物实验方案已通过河南中模生物技术研究院实验动物伦理委员会批准[伦理编号:ZM(伦)202510010]。

#### 1.4 细胞

RAW264.7小鼠单核巨噬细胞白血病细胞株(货号CL-0190)购自武汉普诺赛生命科技有限公司。本实验室按照标准流程进行细胞的常规培养、传代及冻存操作。

### 2 方法

#### 2.1 含药血清制备

将SD大鼠随机分为空白组(5只)和化痰祛湿活血方组(25只),先适应性喂养7 d后再进行正式实验。正式实验中,化痰祛湿活血方组大鼠灌胃化痰祛湿活血方颗粒剂15 g/(kg·d)<sup>[10]</sup>,空白组大鼠灌胃等体积去离子水,每天灌胃1次,连续给药7 d。末次灌胃后1 h,经大鼠腹主动脉采血。将血液在室温下静置30 min后,以3 000 r/min离心15 min分离血清,经0.22 μm无菌滤膜过滤除菌后,再以56℃水浴灭活30 min,分别得到含药血清和空白血清,分装后于-80℃环境下冻存,备用。

#### 2.2 含药血清对RAW264.7细胞增殖的影响考察

将RAW264.7细胞接种于96孔板中,每孔 $5 \times 10^3$ 个。将细胞分为对照组(不加含药血清)和2.5%、5%、10%、15%含药血清组,每组设置3个复孔;另设不含细胞和药物的调零组。常规培养细胞,待其贴壁后,吸弃培养基,加入含相应浓度血清的培养基,于37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱中继续培养24 h后,加入CCK-8溶液,继续培养2 h。培养结束后,采用酶标仪检测450 nm波长处各孔的吸光度(OD)值,并计算细胞存活率。细胞存活率=(加药组OD值-调零组OD值)/(对照组OD值-调零组OD值)×100%。

#### 2.3 细胞分组、造模与给药

将细胞分为5组,其给药和造模情况如下:空白对照组(Control组)——加入含10%空白血清的DMEM完全培养基;模型组(Model组)——加入含10%空白血清的DMEM完全培养基+5 μg/mL LPS(诱导建立RAW264.7巨噬细胞焦亡模型<sup>[9]</sup>,下同);低浓度含药血清组(HQHF-L组)——加入含2.5%含药血清+7.5%大鼠空白血清的DMEM完全培养基+5 μg/mL LPS;中浓度含药血清组(HQHF-M组)——加入含5%含药血清+5%大鼠空白血清的DMEM完全培养基+5 μg/mL LPS;高浓度含药血清组(HQHF-H组)——加入含10%含药血清的DMEM完全培养基+5 μg/mL LPS。每组设置3个复孔。各给药组含药血清的浓度根据“2.2”项下实验结果确定。各组细胞均置于培养箱中常规培养24 h,培养结束后收集细胞及细胞培养上清液,用于后续指标检测。

#### 2.4 细胞形态学观察

取对数生长期细胞,接种于预先放置有盖玻片的6

孔板中,按“2.3”项下方法分组、造模与给药。常规培养24 h后,收集细胞进行如下观察:(1)扫描电子显微镜观察——取出盖玻片,用2.5%戊二醛固定,然后用钨酸后固定,并经梯度乙醇脱水、临界点干燥、喷金后,在扫描电镜下观察细胞形态学特征;(2)相差荧光显微镜观察——直接观察各组细胞形态特征,记录是否出现焦亡相关形态改变。

#### 2.5 细胞中GSDMD-N蛋白的定位与表达检测

采用免疫荧光法检测。将处于对数生长期的细胞接种于12孔板中,按“2.3”项下方法分组、造模与给药。培养24 h后,用4%多聚甲醛固定15 min;样本用快速封闭液封闭,随后与GSDMD-N抗体(抗体浓度按产品说明书配制)在4℃下孵育过夜;以磷酸盐缓冲液(PBS)清洗细胞5次后,加入荧光二抗(抗体浓度按产品说明书配制),室温下避光孵育1 h;采用含DAPI的抗荧光淬灭封片剂避光孵育5 min后,将细胞置于倒置相差荧光显微镜下观察并采集图像(阳性信号呈绿色荧光,与蓝色细胞核形成共定位,可直观反映GSDMD-N蛋白的亚细胞定位)。采用Image J软件分析细胞中GSDMD-N蛋白的荧光强度,荧光强度越强,表明GSDMD-N蛋白表达水平越高。

#### 2.6 细胞培养上清液中IL-1β、IL-18含量检测

采用ELISA法检测。取“2.3”项下各组细胞的上清液,按ELISA试剂盒说明书操作,使用酶标仪在450 nm波长下测定各孔的OD值,依据标准曲线计算细胞培养上清液中IL-1β、IL-18含量。

#### 2.7 细胞中NLRP3、Caspase-1、GSDMD mRNA表达检测

采用real-time PCR法检测。取“2.3”项下各组细胞,提取细胞中总RNA,检测其浓度和纯度后,将其逆转录合成cDNA,并以cDNA为模板进行PCR扩增。反应体系为:2×Universal Blue SYBR Green qPCR Master Mix 10 μL,上、下游引物各0.4 μL,cDNA模板2.0 μL,无酶水7.2 μL。反应条件为:95℃预变性30 s;95℃变性15 s,60℃退火/延伸30 s,40个循环。以GAPDH为内参,采用2<sup>-ΔΔCt</sup>法计算细胞中NLRP3、Caspase-1、GSDMD的mRNA相对表达水平。PCR引物由湖南艾科瑞生物工程有限公司设计并合成,具体引物序列及扩增产物长度见表1。

表1 引物序列及扩增产物长度

基因名称	引物序列(5'→3')	扩增产物长度/bp
NLRP3	上游:GACCGTGAGGAAAGGACCAG	125
	下游:GGCCAAAGAGGAATCGGACA	
Caspase-1	上游:ACCCCAAACCTAAGGACACG	119
	下游:CAGGGAGAAAGTCGTCATCCG	
GSDMD	上游:TGCGTGTGACTCAGAAGACC	108
	下游:CAAACAGGTCATCCCCACGA	
GAPDH	上游:GTTCCACCTAGAAAGTCCA	146
	下游:ACTTGGAGGAGGTTTGCTGG	

#### 2.8 细胞中NLRP3、Caspase-1、GSDMD蛋白表达检测

采用Western blot法检测。取对数生长期细胞,以每孔 $2 \times 10^5$ 个细胞的密度接种于6孔板中,按“2.3”项下

方法分组、造模与给药。培养24 h后,弃去上清液,收集细胞,采用RIPA裂解液提取各组细胞中总蛋白。采用BCA法对蛋白定量后,调整浓度并加入上样缓冲液进行沸水浴变性。取8 μg 变性蛋白上样进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(先以电压80 V电泳30 min,再以电压120 V电泳90 min);采用湿转法(300 mA 恒流、冰浴2 h)将蛋白转移至0.45 μm PVDF膜,以5%脱脂奶粉室温封闭1.5 h;加入NLRP3、Caspase-1、GSDMD(稀释比例均为1:2 000)一抗和GAPDH一抗(稀释比例为1:20 000),4 ℃孵育过夜;次日用TBST洗膜后,加入荧光二抗(稀释比例为1:10 000),室温避光孵育1 h。加入ECL底物显影成像后,采用Image J软件分析条带灰度值,以目的蛋白与内参蛋白(GAPDH)条带灰度值的比值表示目的蛋白的表达水平。实验重复3次。

### 2.9 统计学方法

采用GraphPad Prism 10.0软件进行数据分析和作图。计量资料符合正态分布,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Tukey检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

## 3 结果

### 3.1 不同浓度含药血清对细胞增殖的影响

对照组和2.5%、5%、10%、15%含药血清组细胞存活率分别为(103.23±1.26)%、(102.36±1.82)%、(98.77±2.15)%、(92.42±1.75)%、(82.29±2.03)%。与对照组比较,2.5%、5%含药血清组细胞存活率差异均无统计学意义( $P>0.05$ ),提示2.5%、5%含药血清安全性良好,不会损伤细胞活力;10%含药血清组细胞存活率虽显著降低( $P<0.05$ ),但降低幅度处于可接受范围。因此,本研究后续选取2.5%、5%、10%含药血清用于探讨化痰祛湿活血方对巨噬细胞炎症及焦亡的调控作用。

### 3.2 细胞形态学观察结果

#### 3.2.1 扫描电子显微镜观察结果

Control组细胞形态完整,表面光滑、微绒毛丰富,未见明显孔洞形成。Model组细胞呈现典型焦亡特征:细胞肿胀;膜表面微绒毛消失,可见大量散在或密集穿

孔;部分细胞膜破裂,细胞质外溢,且细胞空洞数量较多。与Model组比较,HQHF-L、HQHF-M、HQHF-H组细胞的细胞膜完整性均有不同程度改善。结果见图1。

#### 3.2.2 相差荧光显微镜观察结果

Control组细胞呈圆形,形态规则。Model组细胞形态不规则,多呈长触角状。与Model组比较,HQHF-H组细胞形态改善最明显,偶见长触角;HQHF-L、HQHF-M组细胞形态亦有不同程度改善。结果见图2。

### 3.3 细胞中GSDMD-N蛋白的定位与表达检测结果

Control组细胞中GSDMD-N蛋白的荧光强度(10.19±3.02)微弱。与Control组比较,Model组细胞中GSDMD-N蛋白主要聚集于细胞膜,荧光强度(92.91±0.28)显著增强( $P<0.05$ );HQHF-H、HQHF-M、HQHF-L组细胞中GSDMD-N蛋白的膜定位减少,荧光强度(分别为31.54±2.65、35.60±2.75、56.38±6.21)均显著减弱( $P<0.05$ )。结果见图3。

### 3.4 细胞培养上清液中IL-1β、IL-18含量测定结果

与Control组比较,Model组细胞培养上清液中IL-1β、IL-18含量均显著升高( $P<0.05$ );与Model组比较,HQHF-L、HQHF-M、HQHF-H组细胞培养上清液中IL-18、IL-1β含量均显著降低( $P<0.05$ )。结果见图4。

### 3.5 细胞中NLRP3、Caspase-1、GSDMD mRNA及其蛋白表达测定结果

与Control组比较,Model组细胞中NLRP3、Caspase-1、GSDMD mRNA及其蛋白表达水平均显著升高( $P<0.05$ );与Model组比较,HQHF-L、HQHF-M、HQHF-H组细胞中NLRP3、Caspase-1、GSDMD mRNA及其蛋白表达水平均显著降低( $P<0.05$ )。结果见表2、图5。

## 4 讨论

MAFLD疾病谱从单纯性脂肪肝可进展为MASH、肝纤维化、肝硬化甚至肝细胞癌,已成为全球性的重大公共卫生挑战<sup>[11]</sup>。MAFLD发病机制复杂,“多重打击学说”认为,脂毒性、胰岛素抵抗、内质网应激、线粒体功能障碍和慢性炎症之间的复杂交互作用,共同驱动该疾病进展。其中,MASH作为MAFLD进展的关键阶段,其核

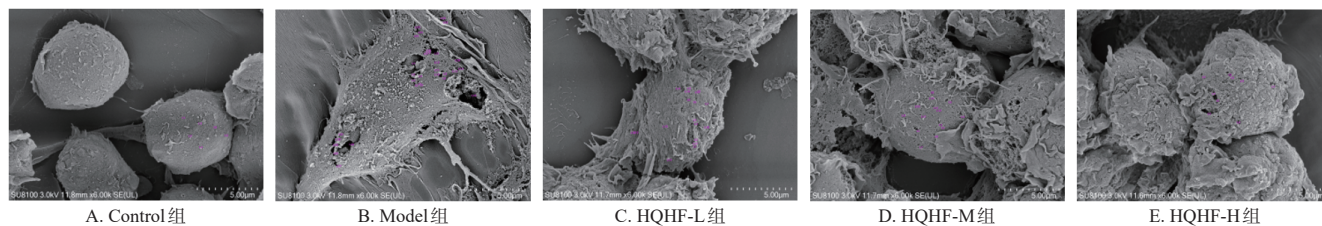


图1 各组细胞形态学观察的扫描电子显微镜图(标尺:5 μm)

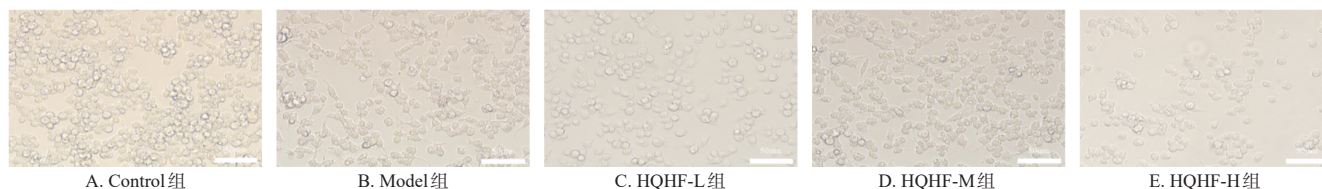


图2 各组细胞形态学观察的相差荧光显微镜图(标尺:50 μm)

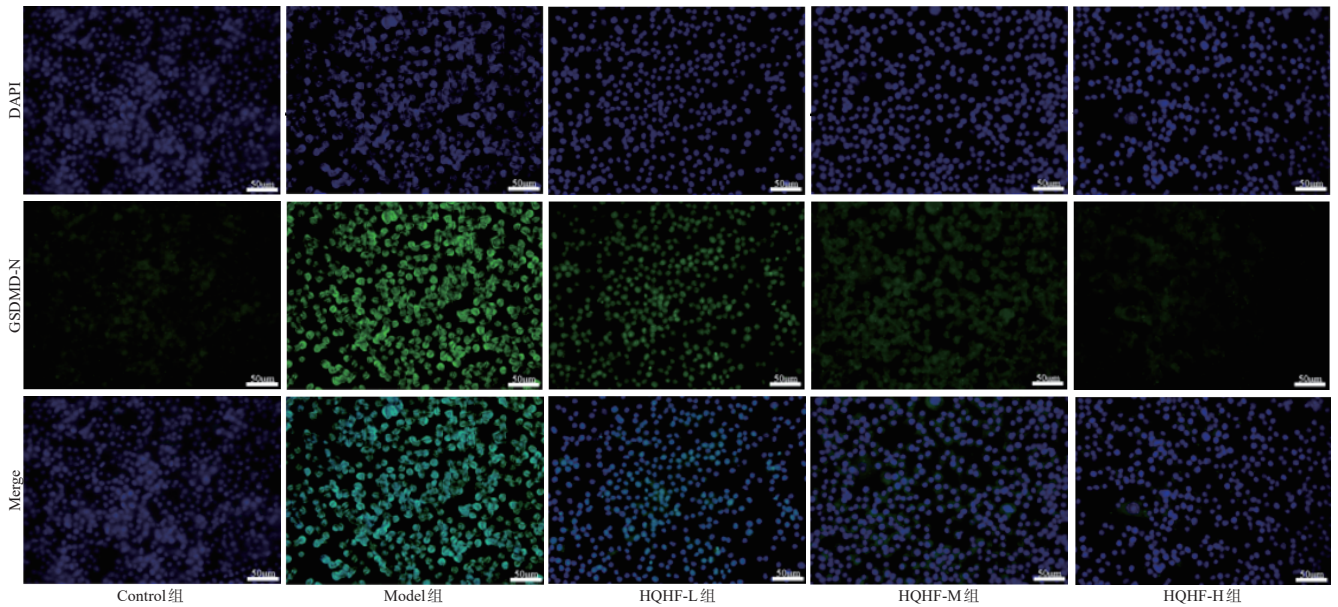
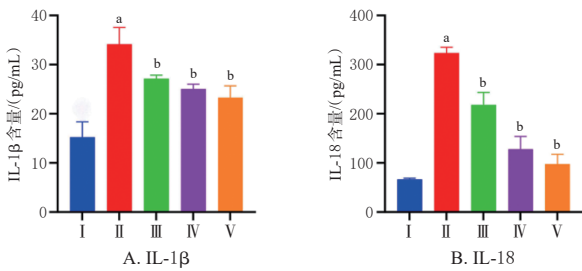


图3 各组细胞中GSDMD-N的免疫荧光染色图(标尺:50 µm)



I: Control组; II: Model组; III: HQHF-L组; IV: HQHF-M组; V: HQHF-H组; a: 与Control组比较,  $P < 0.05$ ; b: 与Model组比较,  $P < 0.05$ 。  
图4 各组细胞培养上清液中IL-1 $\beta$ 、IL-18含量测定结果( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

表2 各组细胞中NLRP3、Caspase-1、GSDMD mRNA及其蛋白表达水平比较( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	NLRP3		Caspase-1		GSDMD	
	mRNA	蛋白	mRNA	蛋白	mRNA	蛋白
Control组	1.00 ± 0.08	0.25 ± 0.05	2.11 ± 0.03	0.71 ± 0.21	0.99 ± 0.05	0.65 ± 0.28
Model组	11.26 ± 1.07 <sup>a</sup>	1.76 ± 0.06 <sup>a</sup>	13.50 ± 0.66 <sup>a</sup>	1.20 ± 0.11 <sup>a</sup>	1.42 ± 0.05 <sup>a</sup>	1.87 ± 0.90 <sup>a</sup>
HQHF-L组	8.99 ± 0.41 <sup>b</sup>	0.73 ± 0.05 <sup>b</sup>	11.01 ± 0.41 <sup>b</sup>	0.70 ± 0.18 <sup>b</sup>	1.15 ± 0.06 <sup>b</sup>	0.67 ± 0.17 <sup>b</sup>
HQHF-M组	8.68 ± 0.14 <sup>b</sup>	0.56 ± 0.03 <sup>b</sup>	9.94 ± 0.49 <sup>b</sup>	0.41 ± 0.23 <sup>b</sup>	1.04 ± 0.05 <sup>b</sup>	0.36 ± 0.10 <sup>b</sup>
HQHF-H组	7.82 ± 0.56 <sup>b</sup>	0.35 ± 0.02 <sup>b</sup>	8.14 ± 0.77 <sup>b</sup>	0.39 ± 0.18 <sup>b</sup>	0.67 ± 0.10 <sup>b</sup>	0.31 ± 0.02 <sup>b</sup>

a: 与Control组比较,  $P < 0.05$ ; b: 与Model组比较,  $P < 0.05$ 。

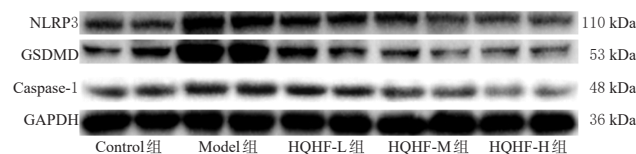


图5 各组细胞中NLRP3、Caspase-1、GSDMD蛋白表达的电泳图

心病理特征为肝内持续性炎症与肝细胞损伤,这也是疾病向纤维化、肝硬化演进的核心节点<sup>[2]</sup>。巨噬细胞作为肝脏先天免疫的核心细胞,在维持肝脏内环境稳态和启动炎症反应中扮演着关键角色,其异常活化是介导肝内持续性炎症的核心环节<sup>[23]</sup>。而细胞焦亡作为炎症小体

介导的促炎型程序性细胞死亡方式,以细胞膜孔道形成、细胞肿胀破裂为特征,伴随IL-1 $\beta$ 、IL-18等促炎因子大量释放,可显著放大局部炎症级联反应,在MASH的炎症放大与肝细胞损伤中发挥关键驱动作用<sup>[4]</sup>。脂毒性物质、氧化应激产物、肠道LPS等代谢应激信号均可触发巨噬细胞焦亡通路,因此靶向抑制肝巨噬细胞焦亡,已成为干预MASH进展的重要策略。

中医药理论将MASH归属于“肝癖”“胁痛”范畴,其核心病机为“痰湿瘀互结,痹阻肝络”,这一病机与现代医学中MASH的核心病理改变高度关联<sup>[15]</sup>。“痰湿”作为中医病理产物,其病理特征与现代医学中肝脏脂质蓄积、胰岛素抵抗及促炎微环境紊乱等病理改变高度契合。过量脂质蓄积可引起脂毒性,而胰岛素抵抗会进一步加重脂肪变性,并提供炎症致敏信号;上述改变与代谢应激、肠道菌群紊乱等因素共同作用,激活NLRP3炎症小体,进而启动炎症级联反应<sup>[16]</sup>。而肝脏“瘀血”状态则对应现代医学中微循环障碍、局部缺氧及肝纤维化启动等病理过程。活化的巨噬细胞可通过焦亡途径释放IL-1 $\beta$ 、IL-18等促炎因子,驱动肝星状细胞活化增殖;受损肝细胞释放的内源性危险信号——损伤相关分子模式可进一步放大炎症反应,形成“痰湿致瘀、瘀阻生痰”的病理恶性循环<sup>[17]</sup>。“痰湿”与“瘀血”相互交织、互为因果,共同构成MASH发生发展的核心病理基础。基于此,中医药确立了以“化痰、祛湿、活血”为核心的治疗法则,并在临床实践中显示出良好前景。

化痰祛湿活血方由泽泻、海藻、丹参、郁金、水飞蓟、决明子、山楂、柴胡8味中药组成。方中泽泻利水渗湿、行气消痰,为君药;丹参活血化瘀、凉血安神,郁金活血止痛、行气解郁,海藻化痰利湿、软坚消痰,共为臣药;决明子清肝明目,山楂消积散瘀,水飞蓟清热解毒,共为佐药;柴胡疏肝理气,为使药。诸药合用,共奏化痰、祛湿、活血之效。本课题组前期临床与动物研究已证实,该方

能有效改善患者临床症状、肝功能及肝脂肪病变,并可减轻MASH模型大鼠的肝脏炎症与脂质堆积<sup>[18-20]</sup>。然而,该方发挥抗炎保肝作用的潜在分子机制,尤其是其是否可通过调控巨噬细胞焦亡及相关通路发挥对MASH的改善作用尚未明确,这构成了本研究的出发点和核心科学问题。

本研究聚焦NLRP3/Caspase-1/GSDMD这一经典焦亡通路,通过体外实验证实,化痰祛湿活血方含药血清可改善LPS诱导的RAW264.7巨噬细胞焦亡:(1)在形态学层面,化痰祛湿活血方含药血清可显著改善巨噬细胞细胞膜鼓泡、孔洞形成等焦亡典型表型,维持细胞膜结构完整性,直接佐证了其抑制细胞焦亡的抑制效应;(2)在分子层面,化痰祛湿活血方含药血清可显著下调细胞中NLRP3、Caspase-1、GSDMD mRNA及其蛋白表达,同时减少细胞膜上GSDMD-N片段聚集,提示其可从通路起始、中游活化及下游执行全环节抑制焦亡通路活性;(3)在功能层面,化痰祛湿活血方含药血清能有效降低细胞培养上清液中IL-1 $\beta$ 、IL-18含量,该过程依赖Caspase-1介导的前体剪切活化,其释放量减少表明该方能阻断炎症因子的胞外释放,进而抑制炎症级联反应。上述结果表明,抑制NLRP3/Caspase-1/GSDMD通路,可能是化痰祛湿活血方发挥抗炎作用的重要分子机制之一。

综上,本研究以肝巨噬细胞焦亡为切入点,初步揭示了化痰祛湿活血方可能通过抑制NLRP3/Caspase-1/GSDMD通路的激活,减轻肝巨噬细胞焦亡及促炎因子释放,从而达到减轻巨噬细胞炎症损伤、发挥细胞保护的作用,为MASH的中西医结合治疗提供了新的理论支撑。本研究存在一定局限性,如本研究仅基于RAW264.7巨噬细胞体外模型开展实验,相关机制尚未经体内实验验证,且方剂调控焦亡通路的核心活性成分及多成分协同作用机制仍不明确。后续本课题组将构建MASH动物模型进行体内验证,进一步为该方的标准化应用提供实验依据。

## 参考文献

[1] COTTER T G, RINELLA M. Nonalcoholic fatty liver disease 2020: the state of the disease[J]. *Gastroenterology*, 2020, 158(7):1851-1864.

[2] BARREBY E, CHEN P, AOUADI M. Macrophage functional diversity in NAFLD-more than inflammation[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2022, 18(8):461-472.

[3] MRIDHA A R, WREE A, ROBERTSON A A B, et al. NLRP3 inflammasome blockade reduces liver inflammation and fibrosis in experimental NASH in mice[J]. *J Hepatol*, 2017, 66(5):1037-1046.

[4] LUO R X, HU Y D, WANG L, et al. *Penthorum chinense* Pursh extract ameliorates hepatic steatosis by suppressing pyroptosis via the NLRP3/Caspase-1/GSDMD pathway [J]. *Food Sci Nutr*, 2024, 12(7):5176-5187.

[5] GAUL S, LESZCZYNSKA A, ALEGRE F, et al. Hepatocyte pyroptosis and release of inflammasome particles

induce stellate cell activation and liver fibrosis[J]. *J Hepatol*, 2021, 74(1):156-167.

[6] ZHAO Q, DAI M Y, HUANG R Y, et al. *Parabacteroides distasonis* ameliorates hepatic fibrosis potentially via modulating intestinal bile acid metabolism and hepatocyte pyroptosis in male mice[J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1):1829.

[7] DONG L, ZHANG H T, KANG Y Y, et al. NLRP3 and gut-liver axis: new possibility for the treatment of alcohol-associated liver disease[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2025, 40(5):1070-1078.

[8] WANG F, RUAN D Y, XU R H. Challenges and opportunities in oncology drug development and clinical research in China[J]. *Cell*, 2024, 187(7):1578-1583.

[9] 刘鸣昊,刘素彤,尚东方,等.化痰祛湿活血方对脂多糖诱导的巨噬细胞焦亡形态的影响[J]. *临床肝胆病杂志*, 2022, 38(9):2016-2019.

[10] 马庆亮,张丽慧,刘鸣昊,等.化痰祛湿活血方含药血清对HepG 2.2.15细胞乙型肝炎病毒复制能力及脂肪代谢相关基因表达的影响[J]. *中医杂志*, 2021, 62(7):622-627.

[11] ARGENZIANO M E, KIM M N, MONTORI M, et al. Epidemiology, pathophysiology and clinical aspects of hepatocellular carcinoma in MAFLD patients[J]. *Hepatol Int*, 2024, 18(Suppl.2):922-940.

[12] NUSSE Y, KUBES P. Liver macrophages: development, dynamics, and functions[J]. *Cell Mol Immunol*, 2025, 22(10):1178-1189.

[13] FILIPOVIC B, MARJANOVIC-HALJILJI M, MIJAC D, et al. Molecular aspects of MAFLD-new insights on pathogenesis and treatment[J]. *Curr Issues Mol Biol*, 2023, 45(11):9132-9148.

[14] AL MAMUN A, AKTER A, HOSSAIN S, et al. Role of NLRP3 inflammasome in liver disease[J]. *J Dig Dis*, 2020, 21(8):430-436.

[15] 姚树坤,刘婧,周天惠.代谢相关脂肪性肝病的发病机制与中医病机[J]. *临床肝胆病杂志*, 2024, 40(10):1954-1958.

[16] FARRELL G C, VAN ROOYEN D, GAN L, et al. NASH is an inflammatory disorder: pathogenic, prognostic and therapeutic implications[J]. *Gut Liver*, 2012, 6(2):149-171.

[17] TILG H, MOSCHEN A R, RODEN M. NAFLD and diabetes mellitus[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2017, 14(1):32-42.

[18] LIU S T, ZHANG L H, XU J J, et al. Identification of ferroptosis-related genes in MAFLD/MASH and HQHF validation[J]. *Hepat Med*, 2025, 17:13-24.

[19] 刘素彤,张丽慧,顾亚娇,等.化痰祛湿活血方对非酒精性脂肪性肝炎大鼠模型肝细胞线粒体超微结构的影响[J]. *临床肝胆病杂志*, 2022, 38(8):1780-1783.

[20] 管雅捷,张丽慧,刘素彤,等.基于网络药理学和动物实验探究化痰祛湿活血方治疗非酒精性脂肪性肝炎的作用机制[J]. *医学研究杂志*, 2025, 54(5):52-59.

(收稿日期:2025-12-24 修回日期:2026-03-06)

(编辑:林 静)