

太岁水对肝硬化小鼠的治疗作用及机制研究

王志业¹ 王红立¹ 张怡² 李娜⁴ 任天斌³
1 伊犁布隆圣泉生物科技有限公司
2 长三角国家技术创新中心有机功能材料与应用技术研究所
3 同济大学医学院
4 上海工程技术大学
DOI:10.12238/bmtr.v7i4.15526

[摘要] 本文探讨了太岁水对肝硬化小鼠模型的治疗作用及机制,将26只C57BL/6小鼠分为对照组、模型组及3M、9M、12M太岁水组(M代表浸泡太岁的月数)。模型组腹腔注射CCl₄诱导肝硬化,太岁水组自由饮用对应浸泡时间的太岁水,检测体重、肝重、肝功能、氧化应激、炎症因子等指标,结合病理染色等技术评估。研究表明,太岁水可显著改善肝硬化小鼠的肝功能,减轻肝纤维化、炎症和氧化应激,且浸泡时间越长(12M最佳)效果越显著,为肝硬化治疗提供新依据。
[关键词] 太岁水; 肝硬化; 炎症因子; 氧化应激
中图分类号: R657.3+1 **文献标识码:** A

Therapeutic Effects and Mechanisms of Tai Sui Water on a Mouse Model of Liver Cirrhosis

Zhiye Wang¹ Hongli Wang¹ Yi Zhang² Na Li⁴ Tianbin Ren³
1 Yili Bulong Shengquan Biotechnology Co., Ltd.
2 Institute of Organic Functional Materials and Application Technology, Yangtze River Delta National Technology Innovation Center
3 School of Medicine, Tongji University
4 Shanghai University of Engineering Scienc

[Abstract] This study investigates the therapeutic effects and underlying mechanisms of Taishui water in a mouse model of liver cirrhosis. Twenty-six C57BL/6 mice were randomly divided into a control group, a model group, and three Taishui water treatment groups (3M, 9M, and 12M, where M represents the soaking duration in months). Liver cirrhosis was induced in the model group by intraperitoneal injection of CCl₄, whereas the Taishui water groups were administered the corresponding Taishui water ad libitum. Parameters including body weight, liver weight, liver function, oxidative stress markers, and inflammatory factors were assessed, and histopathological staining was employed for evaluation. The results demonstrated that Taishui water markedly improved liver function in cirrhotic mice, attenuated fibrosis, inflammation, and oxidative stress, and that longer soaking durations—particularly 12 months—produced the most pronounced therapeutic effects. These findings provide a novel experimental basis for the potential application of Taishui water in the treatment of liver cirrhosis.
[Key words] Taishui water; liver cirrhosis; inflammatory factors; oxidative stress

引言

肝硬化是慢性肝损伤后肝纤维化弥漫发展的结果,以正常结构被再生结节取代、肝功能衰竭为特征^[1-3]。其进展涉及炎症、纤维化、血管生成等机制,导致肝微循环障碍及内皮功能障碍^[4]。晚期可引发食管静脉曲张、腹水、肝性脑病及肝癌等严重并发症^[5]。现有治疗(如抗病毒药、抗纤维化药、肝移植

等)存在局限,亟需寻找安全有效的新疗法。

太岁(肉灵芝)是一种细菌、粘菌和真菌构成的粘菌复合体,朱春玉等发现太岁富含水、蛋白质、核酸及多种微量元素。其浸泡形成的太岁水,据研究具有提高免疫力、延缓衰老、抗自由基等潜在功效。但太岁水治疗肝硬化的作用机制及疗效尚缺乏充分验证。本研究通过构建肝硬化小鼠模型,综合运用生物显微

表 1 各组小鼠的肝重/体重数据

组别	对照组		模型组						模型组+3M
	1-1	1-2	2-1	2-2	2-3	2-4	2-5	2-6	3-1
给药前体重(g)	21.2	20.6	19.2	20.1	20.3	20.6	18.8	20.5	21.7
给药后体重(g)	24.6	23.6	21.2	22.4	23	22.1	20.1	22.2	23.7
肝重(g)	0.7032	0.6418	1.1764	1.2236	1.2909	1.0367	1.0335	1.7508	1.2455
肝重/体重	0.0286	0.0272	0.0555	0.0546	0.0561	0.0469	0.0514	0.0789	0.0526
组别	模型组+3M			模型组+9M					
	3-2	3-3	3-4	3-5	3-6	4-1	4-2	4-3	4-4
给药前体重(g)	21.3	22	19.8	22.8	22.1	20.5	21	21.5	20.5
给药后体重(g)	23.4	24.3	21.1	23.2	24.2	22.2	22.2	23.1	23.6
肝重(g)	1.0272	1.37	1.0078	1.1884	1.4375	1.1002	1.0828	1.1208	1.0178
肝重/体重	0.0439	0.0564	0.0478	0.0512	0.0594	0.0496	0.0488	0.0485	0.0431
组别	模型组+9M		模型组+12M						
	4-5	4-6	5-1	5-2	5-3	5-4	5-5	5-6	
给药前体重(g)	20.3	21.6	20.6	22.2	22.4	22.6	22.4	21.7	
给药后体重(g)	22.3	23.4	23	24.4	24.6	24.1	24.8	23.1	

技术、酶联免疫吸附、定量PCR及Western blot等方法,系统评估太岁水对肝硬化的治疗效果并探究其潜在作用机制,为肝硬化治疗提供新的实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF级雄性C57BL/6小鼠26只,6周龄,体质量(20 ± 2)g,购自杭州子源实验动物科技有限公司[许可证号SCXK(浙)2024-0004],饲养于上海睿太莫斯生物科技有限公司[实验动物使用许可证号:SYXK(沪)2021-0007],环境温度(21 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,给予普通饲料和饮水,12h昼夜循环,实验前适应性饲养1周。

1.2 药品和主要试剂

浸泡太岁3个月(3M)、9个月(9M)和12个月(12M)时间的太岁水由伊犁布隆圣泉饮品有限公司提供;四氯化碳(CCl_4 ,货号TMPY-00646)购于国药集团化学试剂有限公司;丙二醛(MDA)测定试剂盒(TBA法、货号:a003-1-1)、超氧化物歧化酶(SOD)分型试剂盒(羟胺法、货号:a001-2-2)、谷丙转氨酶(ALT/GPT)试剂盒(货号:C009-2-1)、谷草转氨酶(AST/GOT)试剂盒(货号:C010-2-1)和白蛋白测试盒(货号:A028-2-1)均购于南京建成生物工程研究所;总胆红素(TBIL)比色法测试盒(货号:E-BC-K760-M)购于武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司;Mouse IL-1 β ELISA Kit、Mouse IL-6 ELISA kit和Mouse TNF- α ELISA Kit(货号:CME0015、CME0006和CME0004)购于苏州四正柏生物科技有限公司;PrimeScriptTM RT reagent Kit(for real time)和SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II(Tli RNaseH Plus)购于Takara Bio Inc;BCA蛋白浓度测定试剂盒(货号:P0010)和SDS-PAGE凝胶配制试剂盒(货号:P0012A)购于碧云天生物技术有限公司;

1.3 方法

1.3.1 实验分组、建模和给药

将小鼠分为五组:对照组、模型组、模型+3M组、模型+9M组、模型+12M组(M代表浸泡太岁的月数),对照组n=2,模型组n=6。将 CCl_4 与油剂溶液(橄榄油)按照1:4混合,模型组24只小鼠按5 mL/kg体重腹腔注射,每3天注射1次,连续注射6周。模型+3M组、9M组和12M组各6只小鼠分别自由饮用3M太岁水、9M太岁水和12M太岁水6周,每两天记录饮水量。对照组动物腹腔注射等量等次的橄榄油溶剂,正常饮水。正常饮食饲养,观察动物活动、精神状况和饮水量,实验前后称量小鼠体重。

1.3.2 实验取材

给药结束后,水合氯醛呼吸麻醉小鼠,摘眼球取血,室温静置2h后于4 $^{\circ}\text{C}$ 3000r/min离心10分钟,提取血清,放入-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱冻存。同时取肝脏,肝左叶组织1.5cm $\times$ 1cm $\times$ 0.2cm于10%中性福尔马林中固定,石蜡包埋;其余肝组织液氮冷冻-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.3.3 观察指标

(1)体重和肝重:各组小鼠实验期间体重变化、肝重变化、肝重量/体重;(2)血清中肝功能指标:丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、总胆红素(TBL)、白蛋白(ALB)。超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-px)、丙二醛(MDA)水

平;(3)炎症因子:Elisa检测血清中IL-1 β 、IL-6、TNF- α 含量;(4)H&E和天狼星红染色:肝组织切片染色观察肝脏炎症和肝纤维化进程;(5)免疫组织化学染色:检测肝成纤维标志物 α -SMA、Collagen I;(6)qPCR检测:肝组织 α -SMA和Collagen I mRNA表达水平;(7)WB检测:免疫印记实验检测肝组织 α -SMA和Collagen I蛋白表达水平。

1.4 统计学方法

采用GraphPad Prism 8.0统计软件进行数据分析。数据采用Mean $\pm$ SD表示,所有数据的正态性用Kolmogorov-Smirnov检验或Shapiro-Wilk检验进行分析。当数据呈正态分布时,使用单因素方差分析(One-way ANOVA)来比较各组之间的差异。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肝重/体重

对各组小鼠给药前后的体重、肝重进行称量,并计算肝重与饲养后的体重比。数据如表3所示。与对照组相比,模型组小鼠肝重比显著增加,喂养不同水(3M、9M、12M)后肝重比减小,且12M水的效果尤为显著,表明12M水能改善小鼠肝硬化,见表1。

与对照组相比,模型组小鼠肝重比显著增加,喂养不同水(3M、9M、12M)后肝重比减小,其中12M水的效果尤为显著,表明12M水能改善小鼠肝硬化。见图1。

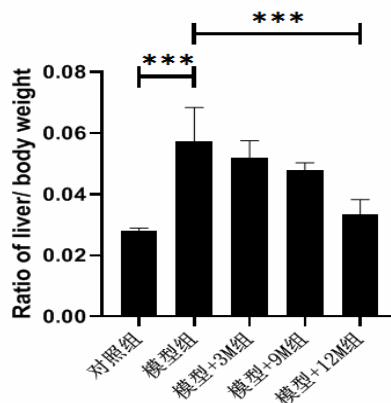


图1 各组小鼠的肝重/体重数据

2.2 各组小鼠生化指标比较

收集小鼠血液,立即在4 $^{\circ}\text{C}$ 下以3,000r/min离心10min。将上清液移入离心管中。据ELISA试剂盒说明书进行操作,检测各组小鼠肝功能指标ALT、AST、TBL、ALB;SOD、GSH-px、MDA水平;炎症因子IL-1 β 、IL-6、TNF- α 。

与对照组相比,模型组肝功能指标ALB、GSH、SOD水平减少,ALT、AST、TBL、MDA水平增加,表明小鼠肝硬化造模后肝功能异常,促炎因子IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平增加,喂养不同水(3M、9M、12M)后肝功能指标ALB、GSH、SOD水平增加,ALT、AST、TBL、MDA水平增加,促炎因子IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平减少,其中12M水的效果尤为显著,表明12M水对改善小鼠肝硬化导致的肝功能损伤有显著作用。见图2。

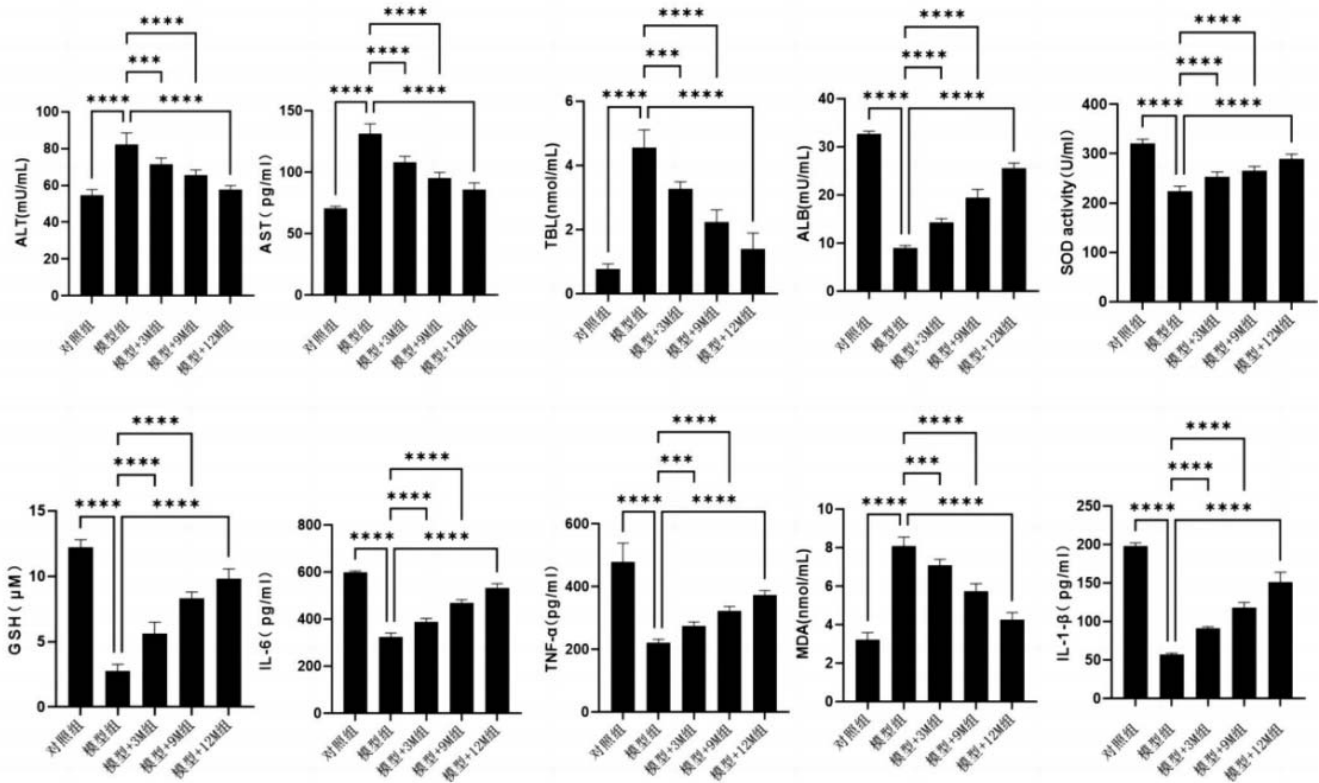


图 2 各组小鼠生化指标

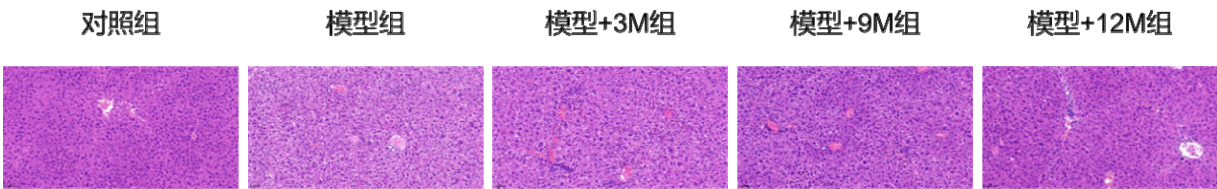


图 3 各组肝组织病理变化

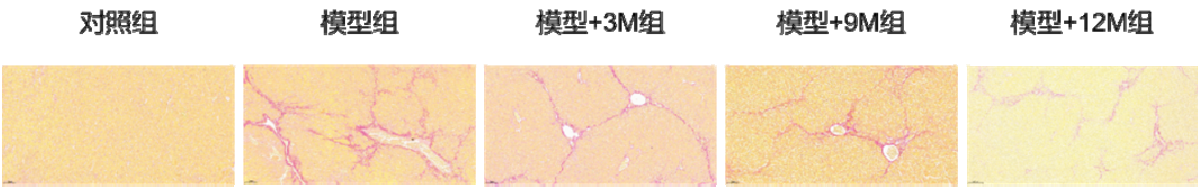


图 4 各组肝组织纤维化情况

2.3 各组肝组织病理变化比较

H&E染色显示，对照组肝细胞形态完整，肝组织结构正常，无明显病理变化；模型组肝组织结构破坏，肝细胞肿胀、气球样变性，炎性细胞明显浸润，伴肝细胞坏死和胶原沉积及假小叶形成；与模型组相比，模型组+3M、+9M组肝细胞炎性浸润及坏死轻度好转，模型组+12M组则明显减少，肝纤维化程度明显减轻。见图3。

2.4 天狼星红染色

天狼星红染色显示，I型胶原蛋白呈红色，与对照组比，模型组I型胶原蛋白表达增加，肝成纤维细胞明显增多，肝纤维化明显。喂养不同水（3M、9M、12M）后I型胶原蛋白表达及肝成纤维细胞减少，肝纤维化程度下降，且12M水的效果尤为显著。见图4。

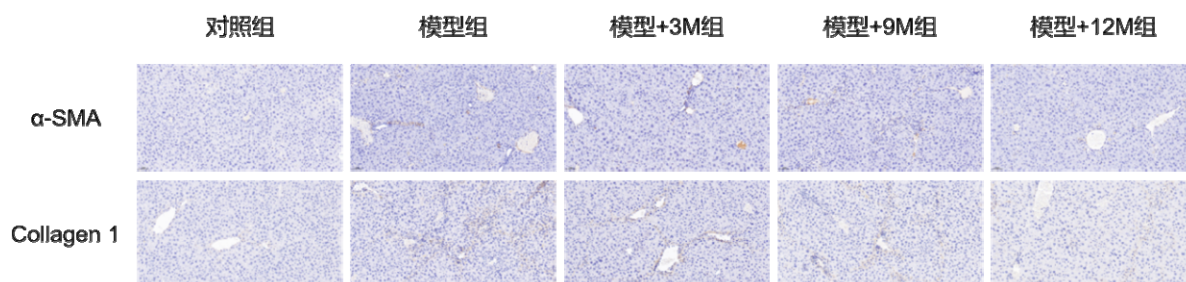


图5 免疫组织化学染色结果

2.5 免疫组织化学染色

与对照组相比, 模型组肝成纤维细胞标志物 α -SMA 和 Collagen 1 表达显著增加, 表明模型组小鼠肝纤维化程度增加, 喂养不同水 (3M、9M、12M) 后肝成纤维细胞的标志物 α -SMA 和 Collagen 1 表达减少, 且12M水的效果尤为显著, 表明12M水可改善小鼠肝纤维化。见图5。

2.6 qPCR检测

与对照组相比, 模型组肝成纤维细胞的标志物 α -SMA 和 Collagen 1 mRNA 水平显著增加, 表明模型组小鼠肝纤维化程度增加, 喂养不同水 (3M、9M、12M) 后肝成纤维细胞的标志物 α -SMA 和 Collagen 1 mRNA 水平减少, 且12M水的效果尤为显著, 表明12M水可改善小鼠肝纤维化。见图6。

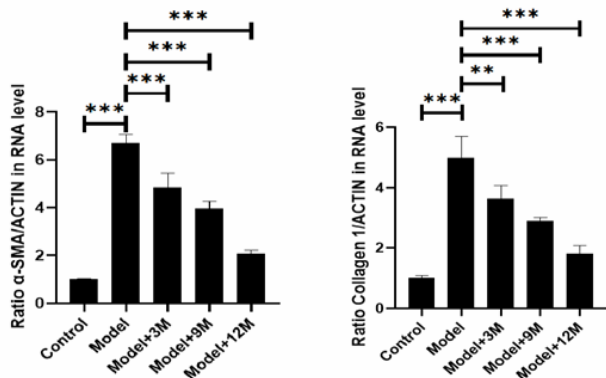


图6 各组小鼠肝组织中炎症因子水平数据分析

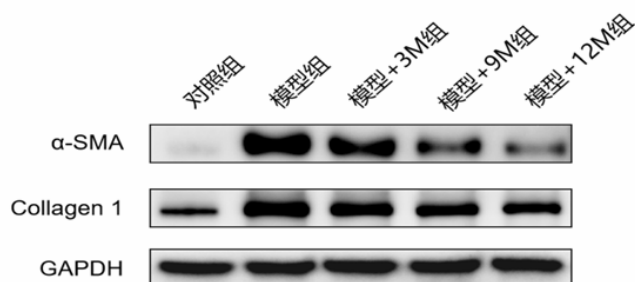


图7 免疫印迹法检测各组小鼠肝组织蛋白表达

2.7 WB检测

与对照组相比, 模型组肝成纤维细胞的标志物 α -SMA 和 Collagen 1 蛋白表达显著增加, 表明模型组小鼠肝纤维化程度增加, 喂养不同水 (3M、9M、12M) 后肝成纤维细胞的标志物 α -SMA 和 Collagen 1 mRNA 蛋白表达减少, 其中12M水的效果尤为显著, 表明12M水可改善小鼠肝纤维化。

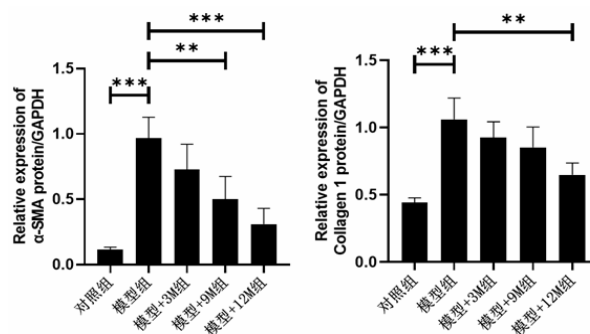


图8 肝组织中的蛋白水平数据分析

3 结论

本次实验成功建立肝硬化小鼠模型, 模型组小鼠出现典型的肝功能损害和肝脏病理改变。为探究不同浸泡时间的太岁水对该模型的影响, 各组结果结论如下:

(1) 太岁水具治疗肝硬化潜力, 在一定程度上可减少肝组织炎症、降低肝纤维化程度; (2) 不同浸泡时间的太岁水对肝硬化小鼠治疗效果不同, 且浸泡的时间越长效果越好, 以12M的太岁水治疗效果最佳; (3) 虽然太岁水对肝硬化有一定治疗效果, 但仍需进一步研究来完善治疗方案和深入探讨其硬化机制。

4 讨论

肝硬化病理网络涵盖肝星状细胞活化、炎症级联反应、氧化应激损伤及微循环障碍四大核心环节: (1) TGF- β 等因子激活肝星状细胞, 驱动细胞外基质过度沉积[14-15]; (2) 免疫细胞浸润释放TNF- α 、IL-6等加重实质损伤[16]; (3) ROS通过MAPK/NF- κ B通路协同促纤维化与炎症[17]; (4) 肝窦内皮细胞功能障碍导致微循环血流动力学紊乱[18]。传统单一靶向治疗难以突破多维度病理交互作用。

低氧水通过三重机制干预病程: ①同位素效应降低自由基

生成,减轻脂质过氧化损伤[19-20];②小分子团改善肝脏微循环,促进物质交换与代谢废物清除;③调控SOD/GSH-Px抗氧化系统,阻断ROS介导的肝星状细胞活化。动物研究证实其可显著改善纤维化病理特征。

太岁水的多组分协同:活性多糖通过PI3K/Akt/eNOS通路增强肝窦NO释放,改善微循环灌注;生物碱成分抑制NF-κB信号转导,降低促炎因子表达;硒元素通过GPx4调控抑制铁死亡;小分子肽段则通过免疫调节平衡Th17/Treg细胞比例,减轻自身免疫性损伤。这种“代谢-免疫-微循环”多维调控模式为肝硬化治疗提供了新策略。

与低氧水联用协同:前者(基础代谢/氧化还原)与后者(病理微环境调控)互补,研究显示可抑制星状细胞活化、促肝再生(机制涉线粒体-内质网偶联及免疫重塑),需深入探索剂量与靶

点互作。

[参考文献]

[1]陈果.肝硬化的治疗方案[J].肝博士,2024,(06):32-33.
[2]王昱.太岁水提取物对衰老皮肤透明质酸和表皮角蛋白K19的影响[J].西北民族大学学报(自然科学版),2020,41(2):31-35.
[3]朱春玉,白婷婷,姜秋实,等.“太岁”生物学组分的研究[J].微生物学杂志,2011,31(01):1-5.
[4]李海月,黄继红,冯军伟,等.太岁的研究进展[J].农产品加工,2015,(11):73-76.
[5]李景色.太岁[J].今日科苑,2013,(05):54-56.

作者简介:

王志业(1995--),男,汉族,新疆伊犁人,本科,研究方向:医美大健康,生物材料。