

多脂鳞伞对四氯化碳诱导小鼠急性肝损伤的保护作用机制

王晓岩¹, 刘岩^{2*}, 贺智杰³, 谈中玉³

1 吉林农业科技学院中药学院, 吉林 吉林 132109

2 长春科技学院医药学院, 吉林 长春 130600

3 长春中医药大学药学院, 吉林 长春 130117

摘要: 多脂鳞伞 *Pholiota adiposa* 是具有多种药理活性的食药两用真菌。本文研究了多脂鳞伞乙醇提取组分(ethanol extract from *Pholiota adiposa*, EPA)对四氯化碳诱导的 BALB/c 小鼠急性肝损伤的保护作用及相关机制。应用 ELISA 法测定小鼠血清中谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 6 (IL-6)含量及肝脏组织中超氧化物歧化酶(SOD)、还原性谷胱甘肽(GSH)及丙二醛(MDA)含量; 应用 H&E 染色法、TUNEL 凋亡分析法分析小鼠肝脏组织病理变化, 并且应用免疫组化法及蛋白质免疫印迹法(Western blot)分析肝脏细胞凋亡情况。结果表明: 经 EPA 给药后, 小鼠肝指数明显降低, 并且血清中 ALT、AST、TNF- α 及 IL-6 含量较模型组均明显降低, 肝组织匀浆中 SOD、GSH 含量明显升高, MDA 含量明显降低, 从而改善肝脏的氧化应激性; H&E 法及 TUNEL 法结果表明, EPA 给药后, 由 CCl₄ 诱导的肝脏细胞肿胀情况明显好转, 肝细胞凋亡率也显著降低; 免疫组化及 Western blot 法分析表明, EPA 能明显抑制 BAX、Caspase3 及 Cleaved Caspase3 凋亡蛋白的过表达, 并降低 Bcl-2 的蛋白水平, 对 CCl₄ 诱导的肝脏细胞凋亡有明显保护作用。

关键词: 多脂鳞伞; 肝损伤保护机制; 生化指标; 免疫组化; 蛋白质印迹

[引用本文]

王晓岩, 刘岩, 贺智杰, 谈中玉, 2025. 多脂鳞伞对四氯化碳诱导小鼠急性肝损伤的保护作用机制. 菌物学报, 44(6): 240354
Wang XY, Liu Y, He ZJ, Tan ZY, 2025. Protective effects and functional mechanism of *Pholiota adiposa* against carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice. Mycosystema, 44(6): 240354

资助项目: 吉林省科技厅青年成长科技计划(20220508074RC)

This work was supported by the Jilin Province Science and Technology Department Project of the Youth Growth (20220508074RC).

*Corresponding author. E-mail: liuyancstu2017@126.com

ORCID: WANG Xiaoyan (0000-0001-7091-8720), LIU Yan (0009-0003-1031-3043)

Received: 2024-12-31; Accepted: 2025-02-13

Protective effects and functional mechanism of *Pholiota adiposa* against carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice

WANG Xiaoyan¹, LIU Yan^{2*}, HE Zhijie³, TAN Zhongyu³

1 College of Traditional Chinese Medicine, Jilin Agricultural Science and Technology University, Jilin 132109, Jilin, China

2 Medical Academy, Changchun Science-Technology University, Changchun 130600, Jilin, China

3 School of Pharmacy, Changchun University of Traditional Chinese Medicine, Changchun 130117, Jilin, China

Abstract: *Pholiota adiposa* is an edible and medicinal fungus with various pharmacological effects. The protective effects and functional mechanism of ethanol extract from *P. adiposa* (EPA) on acute liver injury induced by CCl₄ in BALB/c mice were studied. The liver organ index of mice was measured. The content of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), tumor necrosis factor α (TNF- α), and interleukin 6 (IL-6) in serum and the content of superoxide dismutase (SOD), reducing glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA) in liver were measured by ELISA. H&E staining and TUNEL apoptosis assay were used to analyze the liver histopathological changes, and the apoptosis of liver cells was analyzed by immunohistochemistry analysis and Western blot. The results showed that after EPA administration, the liver index of mice was significantly decreased, and the content of ALT, AST, TNF- α and IL-6 in serum of treated group were significantly decreased as compared with that of model control (MC) group. The content of SOD and GSH in liver homogenate were significantly increased, and the content of MDA was significantly decreased. As a result, the oxidative stress of liver was improved. The results of H&E staining and TUNEL assay showed that the liver cell swelling induced by CCl₄ was significantly improved after EPA administration, and the apoptosis rate of liver cells was also significantly reduced. Immunohistochemical analysis and Western blot analysis showed that EPA could significantly inhibit the overexpression of apoptosis proteins such as BAX, Caspase3 and Cleaved Caspase3, and reduce the level of Bcl-2 protein, showing significant protective effect on CCl₄-induced apoptosis of liver cells.

Keywords: *Pholiota adiposa*; protective mechanism of liver injury; biochemical index; immunohistology; Western blot

众所周知,肝脏是有脊椎动物身体内以代谢功能为主的一个器官,是机体重要脏腑器官之一(Su *et al.* 2018)。目前,社会节奏不断加快,人们生活工作压力不断增加,饮酒、熬夜以及不规律的饮食习惯对肝脏的伤害严重,导致急性肝损伤(Zhao *et al.* 2018; Tien *et al.* 2023; Ohshima *et al.* 2024)。急性肝损伤可引起肝纤维化、肝癌、肝硬化及肝功能衰竭等病症,并且急性肝损伤与机体的各类炎症反应、氧化应激作用及代谢紊乱

综合征等关系密切(Wang *et al.* 2024)。

目前,化学类药物如二甲双胍、环磷酰胺、罗格列酮、头孢、缬沙坦、卡托普利等对肝、肾以及免疫器官具有较强的伤害作用(Duru *et al.* 2019)。自然界中的菌物资源具有良好的药理活性(Wasser 2011),如香菇 *Lentinula edodes* 的抗癌作用(Jai *et al.* 2022),桦褐孔菌 *Inonotus obliquus* 的降血糖作用(Wu *et al.* 2019; Chen *et al.* 2022),安络小皮伞 *Marasmius androsaceus*

的镇痛作用以及白囊耙齿菌 *Irpex lacteus* 的抗炎作用等(戴玉成和杨祝良 2008; Qin X *et al.* 2023; Qiu Y *et al.* 2023), 红托竹荪 *Dictyophora rubrovalvata* 对肺损伤的修复作用(王益等 2023; 李紫薇等 2024)。因此, 在菌物资源中探索具有对急性肝损伤保护作用的真菌意义深远。

多脂鳞伞 *Pholiota adiposa* (Batsch) P. Kumm., 是一种食药兼用真菌, 隶属于球盖菇科 *Strophariaceae* (王晓岩等 2014), 通常生长在杨、柳等多种阔叶树活立木、倒木、腐朽木上(戴玉成和图力古尔 2007)。笔者在前期的工作中应用 UPLC-QTOF-MS 法对多脂鳞伞乙醇提取组分(EPA)进行分析, 其麦角甾醇类化合物与单糖类及二糖类成分占比较高; 在抗肿瘤实验中发现, EPA 对体外诱导人源肝癌细胞 HepG2 细胞凋亡能力最强(邢峻嘉和王晓岩 2021), 对 H22 肝癌荷瘤小鼠抗肿瘤作用极为明显, 并能够调节荷瘤小鼠的肠道菌群(Wang *et al.* 2022)。本研究基于前期工作基础上, 首次应用多脂鳞伞乙醇提取物(EPA)于 CCl_4 诱导的急性肝损伤的保护作用, 并研究其相关分子机理, 为该菌物资源的开发利用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料及试剂

本研究所用多脂鳞伞子实体为人工栽培种, 购自松原市菇乡食用菌专业合作社。

实验所用乙醇(EtOH)、四氯化碳(CCl_4)为分析纯, 购自北京化工厂; 苏木素-伊红染液(H&E)购自南京建成生物工程研究所; 谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、还原性谷胱甘肽(glutathione, GSH)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、ELISA 酶联免疫试剂盒购自中国安迪基因生物科技有限公司; TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒购自罗氏应用科学公司; Bax、Bcl-2、 β -actin、caspase3、cleaved

caspase3、二抗购自 Thermo Fisher 公司。

1.1.2 主要仪器

增强化学发光检测系统(安发玛西亚生物技术公司); 光学显微镜、RM2015 包埋机(莱卡公司); HC-2517 高速离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司); MiniSpin 离心机(艾本德公司); PL303 电子天平(上海梅特勒-托利多仪器有限公司); T10 高速组织匀浆机(IKA); YD-1508R 轮转式切片机(浙江金华市益迪医疗设备有限公司); MK3 酶标仪(Thermo Fisher 公司); CKX31-A12PHP 倒置显微镜(OLYMPUS 公司)。

1.2 多脂鳞伞乙醇提取物(EPA)制备

将 1 kg 多脂鳞伞干燥子实体进行粉碎, 用 75% 的乙醇进行超声提取, 超声功率 500 W, 超声温度 60 $^{\circ}\text{C}$, 乙醇浓度 75%, 液料比 37:1, 提取时间 40 min, 重复 3 次, 合并提取液, 将 EPA 浓缩。最终得到 EPA 浸膏 66.42 g, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.3 实验动物分组及造模

实验小鼠为 SPF 级 BALB/c 鼠, 40 只, 雄性, 4–6 周龄, 体重 18–22 g, 由辽宁长生生物科技有限公司提供, 许可证编号: SCXK (辽) 2024-0001。动物实验在长春中医药大学动物中心进行, 动物饲养及实验条件符合长春中医药大学实验动物伦理委员会意见(Attitude of the Animal Care & Welfare Committee), 动物实验伦理号: 2024755。在(25 $\pm$ 2) $^{\circ}\text{C}$ 的温度下以 12 h 的光照/黑暗循环饲养小鼠, 小鼠自由进食饮水。所有实验小鼠于实验室条件下饲养一周后, 随机分为 4 组($n=10$), 空白对照组(normal control, NC)、模型组(model control, MC)、EPA 低剂量组(low dose group of EPA, LD-EPA, 100 mg/kg/d)、EPA 高剂量组(high dose group of EPA, HD-EPA, 300 mg/kg/d)。

实验过程中, EPA 低剂量组(LD-EPA)及 EPA 高剂量组(HD-EPA)按照相应剂量连续给药 10 d, 空白组(NC)与模型组(MC)给与等量生理盐水, 末次给药后, 除空白组(NC)外, 模型组(MC)、EPA 低剂量组(LD-EPA)及 EPA 高剂量组(HD-EPA)均用 CCl_4 进行腹腔注射造模(CCl_4 与

橄榄油按体积比 1:1 混合, 1.0 mL/kg/只), 空白组小鼠(NC)腹腔注射等量橄榄油。与空白组小鼠相比, 造模组小鼠肝脏病理显示肝细胞严重肿胀及变形、肝脏坏死面积显著增加, 说明急性肝损伤造模成功(肖冬焱等 2024)。CCl₄ 造模 24 h 后, 人道方法处死小鼠(腹腔注射 3% 戊巴比妥钠 30 mg/kg, 后摘除眼球取血), 全血 4 °C、4 000 ×g 离心 2 次, 取血清-20 °C 保存备用。解剖取得小鼠肝脏进行称量, 并将肝脏左叶置于 40 g/L 多聚甲醛溶液中用于 H&E 病理切片、TUNEL 凋亡分析等实验, 肝脏右叶用锡箔纸包裹置于-80 °C 保存, 用于 ELISA 酶联免疫实验、免疫组化及 Western blot 实验。

1.4 体质量变化及脏器指数测定

实验过程中记录小鼠给药前及解剖前的体质量, 其差值为小鼠体质量变化值。解剖得到小鼠肝脏进行称量。

肝指数=(肝质量/体质量)×100%。

1.5 ELISA 法测定血清及肝组织匀浆的生化参数

离心后取得血清, 应用 ELISA 法测小鼠血清中谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、肿瘤坏死因子 α (TNF-α)、白细胞介素 6 (IL-6) 含量。取得肝脏进行组织匀浆, 取匀浆上清液, 应用 ELISA 法测定肝脏组织中超氧化物歧化酶(SOD)、还原性谷胱甘肽(GSH)及丙二醛(MDA) 含量。实验方法按照 ELISA 试剂盒说明书进行。

1.6 肝组织 H&E 染色及 TUNEL 凋亡分析

小鼠肝脏组织经固定、脱水、浸蜡与包埋等工序制成病理切片, 以 5 μm 厚度为标准进行切片, 二甲苯进行脱蜡, 采用苏木精-伊红染色法(H&E)对小鼠肝脏组织切片进行染色, 参考 Chen & Chen (2017) 的方法, 通过光学显微镜获得肿瘤组织细胞的病理变化结果。

切片方法同上, 取 5 μm 厚度切片, 应用 TUNEL 染色法检测小鼠肝脏组织中凋亡情况。室温条件下, 肝脏切片用蛋白酶 K 处理 15 min, 并在含 3% 过氧化氢的甲醇溶液中孵育 20 min, 孵育过后, 加入 50 μL TUNEL 试剂孵育 60 min (37 °C)。参考 Wang et al. (2014) 的方法, 观察肝

脏组织细胞变化情况及染色阳性(凋亡)细胞百分率。

1.7 免疫组化染色

小鼠肝脏组织于 10% 甲醛溶液中固定 24 h, 随后取出组织, 应用浓度为 3% 过氧化氢溶液消除肝脏组织内源性过氧化物酶的活性, 进行免疫组织化学染色法, 利用小鼠/兔 IgG 免疫组化试剂盒(Bcl-2、BAX、Caspase3)。应用 DAB 和苏木精进行初染和复染, 随后, 通过显微镜下观察细胞序列、细胞完整性、细胞核数目、坏死面积大小、阳性细胞计数和染色强度评分来评价肿瘤组织的生长和凋亡情况, 实验设 3 次重复(Pei et al. 2014; Wang & Liu 2023)。

1.8 蛋白质免疫印迹法

采用蛋白质免疫印迹法(Western blot)从肝脏组织中提取总蛋白, 并使用 BCA 试剂盒测定每个细胞样品的蛋白质含量和蛋白质浓度。随后, 制备 30% 丙烯酰胺储存液、1.5 mol/L Tris-Cl (pH 8.8) 缓冲液、1.0 mol/L Tris-Cl (pH 6.8) 缓冲液及其他相关试剂溶液, 凝胶电泳分离蛋白质。电泳后将蛋白转移至 PVDF 膜上, 用 5% 脱脂乳封闭, TBST 洗涤 3 次, 加入一抗 4 °C 孵育过夜, TBST 洗涤后第二天再用二抗孵育。最后, 通过添加显影液进行显影。Western blot 检测各组小鼠肝组织中 BAX、Bcl-2、Caspase3 表达水平。

1.9 统计分析法

在本实验中, 所有实验数据均以平均值±标准差表示, 使用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析。采用单因素方差分析(one-way analysis of variance, ANOVA)法和 Duncan's 检验法进行差异显著性分析。应用 GraphPad Prism 6.0.4 软件进行方差分析及图形处理。

2 结果与分析

2.1 EPA 对 CCl₄ 致肝损伤小鼠肝脏指数影响

CCl₄ 能严重破坏机体肝脏组织, 使小鼠肝脏组织发生急性损伤(图 1)。与空白对照组(NC)相比, CCl₄ 造模组的小鼠肝指数均明显升高 ($P<0.05$); 与模型组(MC)对比, EPA 低剂量组

(LD-EPA)与 EPA 高剂量组(HD-EPA)小鼠肝指数明显降低($P<0.05$) (表 1)。因此可得出结论, EPA 可缓解 CCl_4 对小鼠的急性肝损伤致使的小鼠肝脏肿胀作用, 相比 EPA 低剂量组(LD-EPA)与 EPA 高剂量组(HD-EPA), 从肝脏指数相比较, 差异不大($P>0.05$)。

2.2 EPA 对 CCl_4 致肝损伤小鼠生化指标影响
应用 ELISA 酶联免疫法测定小鼠血清中 ALT、AST、 $\text{TNF-}\alpha$ 及 IL-6 的含量, 实验结果表明, 与 NC 组对比, CCl_4 造模组的 ALT、AST、 $\text{TNF-}\alpha$ 及 IL-6 的含量均有所升高, 与 MC 组对比, LD-EPA 与 HD-EPA 组以上 4 种血清指标均明显降低。ELISA 法测定小鼠肝组织匀浆上清液中超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、还原性谷胱甘肽(glutathione, GSH)及丙二醛

(malondialdehyde, MDA)的含量, 与 NC 组对比, CCl_4 造模组中 SOD 及 GSH 含量均明显降低, MDA 含量上升, 但是 LD-EPA 与 HD-EPA 组中 SOD 及 GSH 含量均明显高于 MC 组,MDA 含量低于 MC 组。以上几种生化指标对比中, LD-EPA 与 HD-EPA 两组间无显著性差异(图 2)。

2.3 肝脏组织切片 H&E 染色及 TUNEL 凋亡结果分析
苏木精-伊红染色(H&E)切片结果表明, NC 组小鼠肝脏细胞结构完整, 形态正常, 无病变、肿胀的现象; 与 NC 组相比, 模型组小鼠肝脏细胞出现明显病变, 肿胀现象严重($P<0.05$), 经 EPA 给药后, LD-EPA 及 HD-EPA 组小鼠肝脏细胞肿胀情况均有所好转($P<0.05$), 并且 HD-EPA 组肝脏细胞恢复较为明显($P<0.05$, 图 3A)。

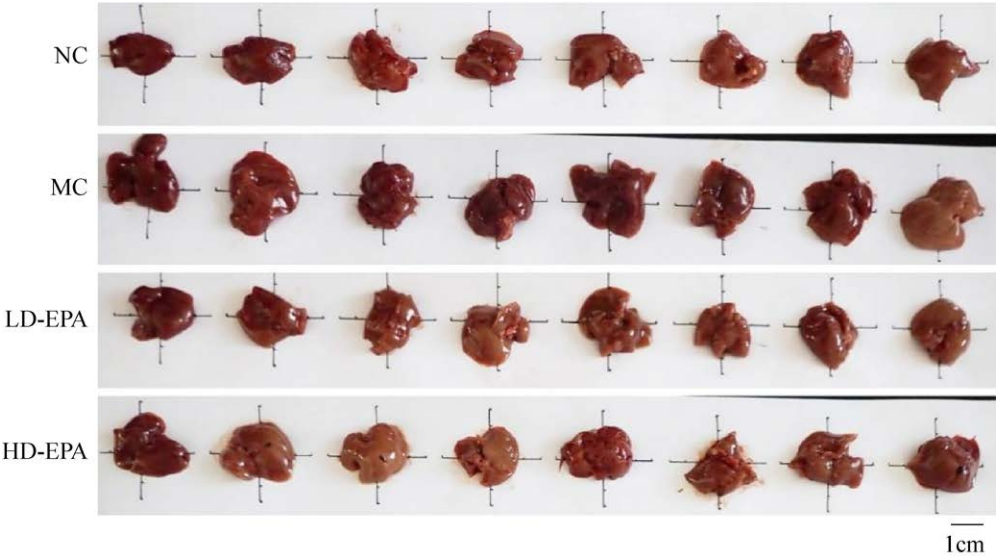


图 1 各组小鼠肝脏组织
Fig. 1 Liver tissue of mice in each group. NC: Normal control; MC: Model control; LD-EPA: Low does group of EPA treatment; HD-EPA: High dose group of EPA treatment. The same below.

表 1 EPA 对各组小鼠脏器指数影响
Table 1 Effects of EPA on mouse organ index

组别 Groups	肝脏质量 Liver weight (g)	体质量 Body weight (g)	肝指数 Liver index (%)
空白组 NC	1.54 ± 0.03	36.84 ± 0.46	4.18 ± 0.09
模型组 MC	1.89 ± 0.11	36.55 ± 0.65	5.17 ± 0.11*
EPA 低剂量 LD-EPA	1.72 ± 0.06	37.48 ± 0.74	4.59 ± 0.07 [#]
EPA 高剂量 HD-EPA	1.68 ± 0.04	37.82 ± 0.85	4.45 ± 0.04 [#]

注: 与正常组比较, * $P<0.05$; 与模型组比较, [#] $P<0.05$
Note: * $P<0.05$, compared with the normal group; [#] $P<0.05$, compared with the model group.

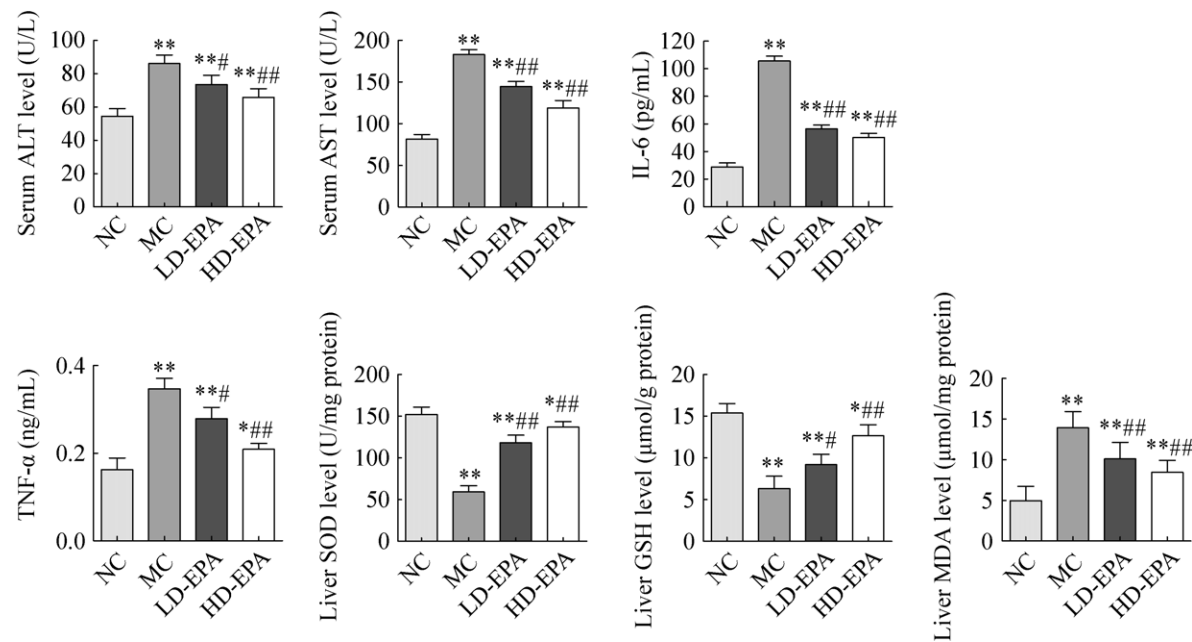


图 2 EPA 对 CCl₄ 致肝损伤小鼠生化指标影响 与正常组比较, **P*<0.05, ***P*<0.01; 与模型组比较, #*P*<0.05, ##*P*<0.01. 下同

Fig. 2 Effects of EPA on biochemical indexes of CCl₄-induced liver injury in mice. Compared with normal group, **P*<0.05, ***P*<0.01; Compared with model group, #*P*<0.05, ##*P*<0.01. The same below.

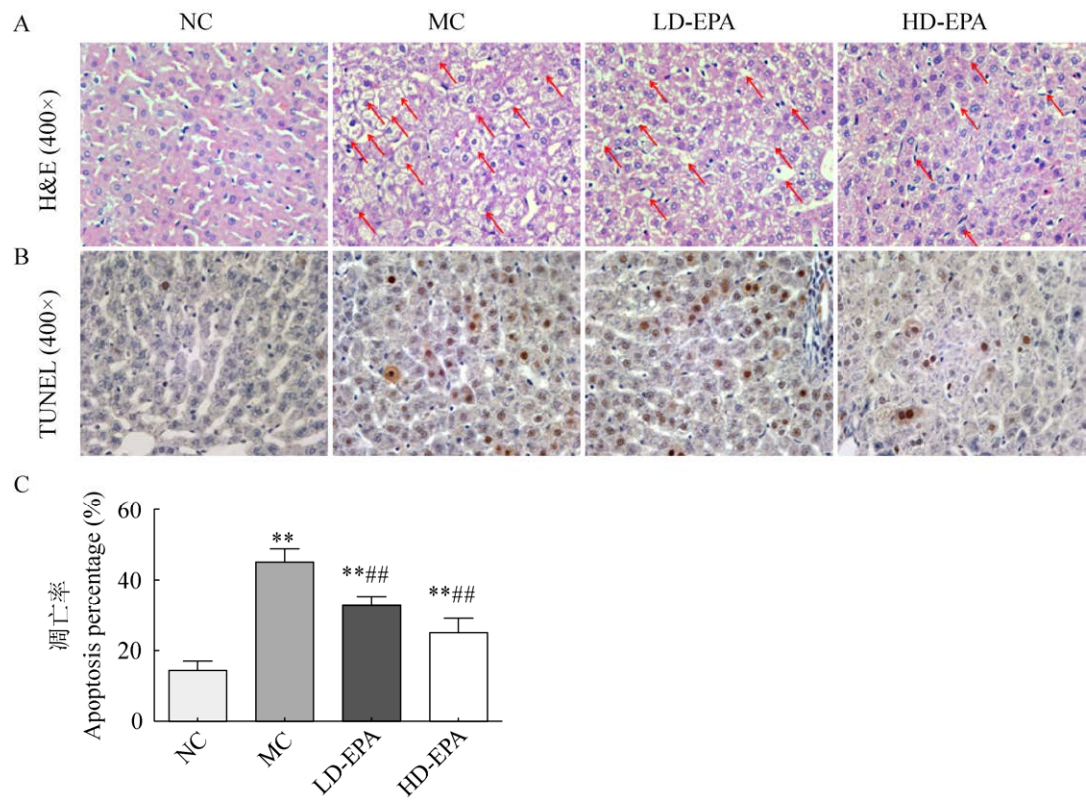


图 3 小鼠肝脏组织 H&E (A)、TUNEL 法(B, C)染色结果(400×)

Fig. 3 Histological examination of the morphological changes in liver tissues of H22-bearing mice by H&E staining (A) (400×) and TUNEL assay (B, C) (400×).

TUNEL 凋亡实验中, 其染色状态为棕色被认定其结果呈阳性(Samantha *et al.* 2017)。实验结果表明, 与 NC 组相比, MC 组小鼠肝脏细胞凋亡率最高, 为 51% ($P<0.05$), LD-EPA 及 HD-EPA 组小鼠肝脏细胞凋亡率分别为 27%及 19% ($P<0.05$) (图 3B, 3C)。因此, EPA 给药后, 小鼠肝脏细胞凋亡率下降明显, 并随着浓度的升高呈现一定浓度依赖性。

2.4 肝脏组织凋亡相关蛋白分析

本研究为进一步验证 EPA 对 CCl₄ 诱导急性肝损伤的保护作用, 应用免疫组化法及蛋白质免疫印迹法(Western blot)对所有组小鼠肝脏组织进行凋亡相关蛋白分析。应用免疫组化分析法对肝脏组织中 BAX、Bcl-2、Caspase3 蛋白进行分析, 实验结果表明, 与 NC 组相比, CCl₄ 造模组 BAX、Caspase3 蛋白表达水平均

明显上升, Bcl-2 蛋白的表达水平显著下降 ($P<0.05$); 经 EPA 给药后, BAX、Caspase3 蛋白表达水平较模型组相比有所下降, Bcl-2 蛋白的表达水平上升($P<0.05$), 并且呈一定浓度依赖性(图 4)。

蛋白质免疫印迹法(Western blot)对所有组小鼠肝脏中 BAX、Bcl-2、Caspase3 及 Cleaved Caspase3 蛋白进行免疫印迹分析, 研究结果表明, 与 NC 组相比, CCl₄ 造模组 BAX、Caspase3 及 Cleaved Caspase3 蛋白印迹表达程度显著升高 ($P<0.05$), Bcl-2 蛋白印迹表达程度降低 ($P<0.05$); 经 EPA 给药后, BAX、Caspase3 及 Cleaved Caspase3 蛋白印迹表达水平较模型组相比有所下降, Bcl-2 蛋白印迹的表达水平上升, 并呈现一定浓度依赖性($P<0.05$), 该结果(图 5)与免疫组化结果相吻合。

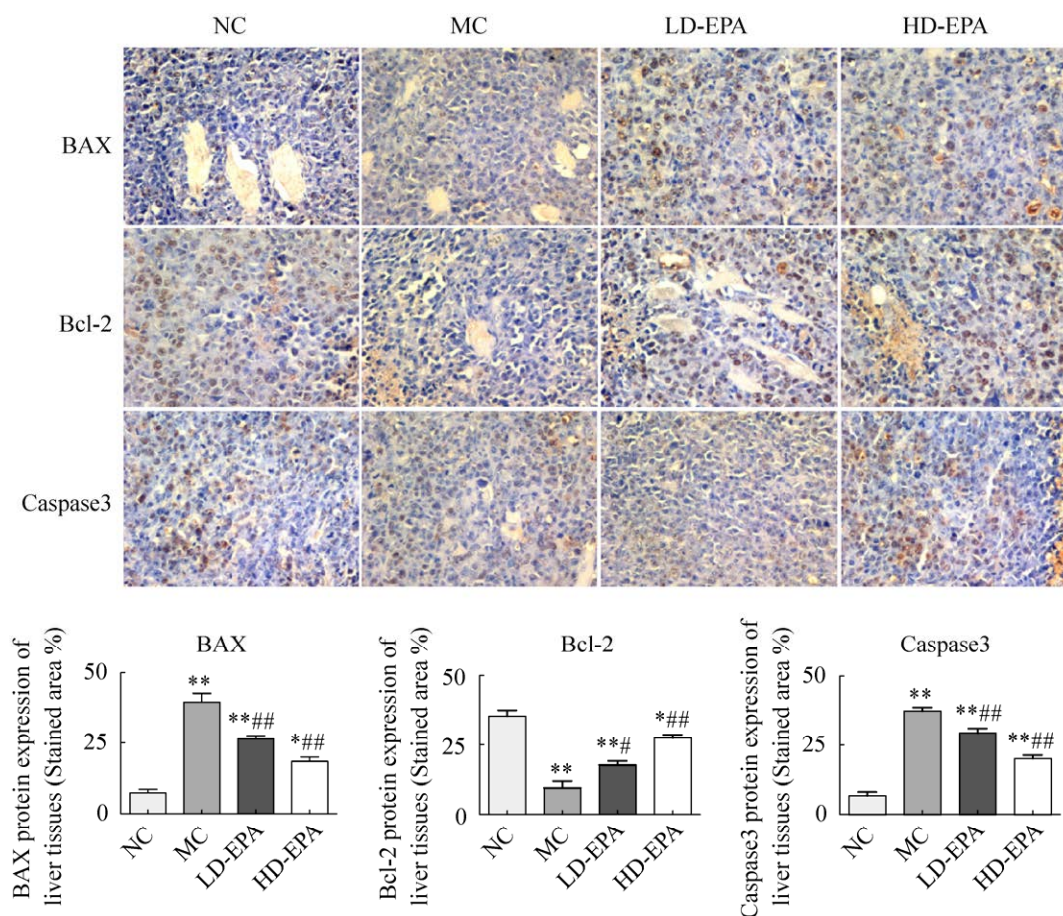


图 4 小鼠肝脏组织免疫组化分析结果

Fig. 4 Immunohistochemical analyses and stained area of liver tissues.

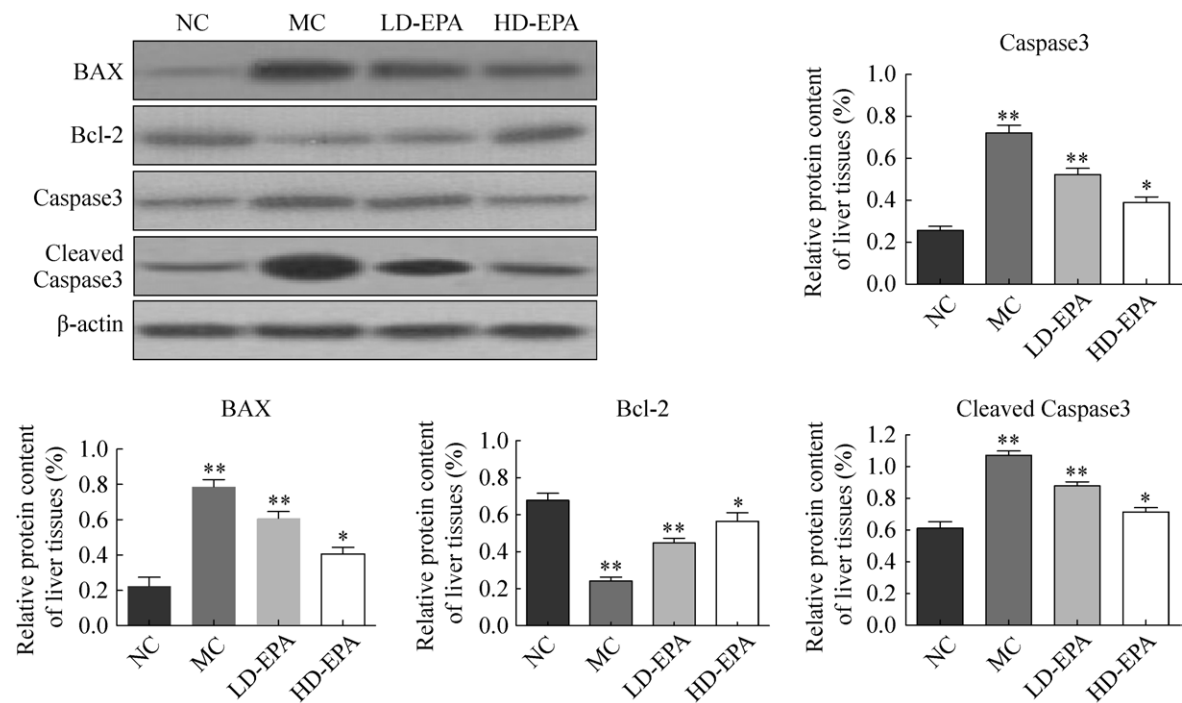


图 5 蛋白免疫印迹法检测肝脏组织中 BAX、Bcl-2、Caspase3、Cleaved Caspase3 蛋白相对表达水平
Fig. 5 Relative protein expression of BAX, Bcl-2, Caspase3 and Cleaved Caspase3 in liver tissues detected by Western blot.

3 讨论

CCl₄ 在实验中作为急性肝损伤的造模药，能短时间内破坏小鼠肝脏组织，发生严重的肝细胞肿胀作用，并且谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)水平会明显升高。在本实验中，经 EPA 给药干预后，给药组小鼠肝脏细胞肿胀程度明显减轻，肝指数趋于正常水平，并且 ALT 与 AST 水平明显降低($P<0.05$)，该结果与国内外研究结论一致(Long *et al.* 2022)。

研究发现，机体的炎症反应会加重急性肝损伤的症状，可导致肝细胞变形及坏死(Qian *et al.* 2023)。其中，机体中肿瘤坏死因子 α (TNF- α)含量的升高能大量分泌活化核因子 κ B，而核因子 κ B 激活又能诱发炎症级联反应，促进白细胞介素 6 (IL-6)等多种炎症因子的生成，加重炎症反应及肝细胞肿胀坏死程度(Qian *et al.* 2023)。本研究中，CCl₄造模的小鼠血清中 TNF- α 含量与 IL-6 含量均显著增加，经 EPA 给药干预后，小鼠血清中 TNF- α 含量与 IL-6 含量均明显下降($P<0.05$)，因此，EPA 对急性肝损伤的保护

作用可能与其减轻机体炎症反应呈正相关。

机体中的氧化系统及抗氧化系统在正常情况下应处于动态平衡状态，当机体脏腑器官氧化应激性增强，而抗氧化剂失衡时，其氧化应激反应会加重脏器损伤(Xu *et al.* 2019;戴玉成 2022)。本研究中，CCl₄ 造模的小鼠肝脏组织匀浆中 MDA 显著升高($P<0.05$)，GSH 和 SOD 显著降低($P<0.05$)，经 EPA 给药干预后，小鼠肝脏组织匀浆中 GSH、SOD 水平显著升高，MDA 含量降低($P<0.05$)。因此，EPA 通过调节 MDA、GSH 和 SOD 活性，提高肝脏中抗氧化酶水平及降低氧化应激水平来保护肝脏。

H&E 和 TUNEL 染色观察各组小鼠肝脏组织形态变化。对照组(NC)肝细胞分布均匀，细胞完整性未受损，CCl₄造模组肝细胞肿胀严重，甚至发生变形及破裂现象。EPA 给药干预后，肝脏细胞肿胀情况明显减轻，尤其是 HD-EPA 组，与 MC 组相比较，肝脏细胞肿胀程度明显好转。TUNEL 凋亡分析 LD-EPA 及 HD-EPA 给药组小鼠肝脏细胞凋亡率分别为 27%及 19% ($P<0.05$)，与模型组的 51%相比显著降低。由此可知 EPA

对 CCl₄ 所致急性肝脏组织损伤有较好的改善作用。

线粒体依赖性途径是经典的细胞凋亡途径之一,其最重要的参与者是 Bcl-2 家族蛋白(严伟伟等 2022),细胞凋亡与 BAX/Bcl-2 蛋白比值相关,细胞凋亡主要由 Bcl-2 蛋白的下调和 BAX 蛋白的轻微上调引起(严伟伟等 2022)。Caspase3 是细胞凋亡相关蛋白酶,在细胞凋亡过程中发挥重要作用,Caspase3 激活是线粒体或内质网死亡诱导细胞凋亡的标志(Kesavardhana *et al.* 2020; Obeng 2021),是参与细胞凋亡的关键酶。免疫组化与蛋白质免疫印迹法结果表明,EPA 处理后,BAX/Bcl-2 比值降低,表明线粒体途径参与凋亡信号通路,减轻肝脏细胞凋亡情况。与 NC 组相比,CCl₄ 诱导后,可提高肝脏细胞中 BAX、caspase3、Cleaved Caspase3 蛋白的表达,而降低 Bcl-2 蛋白的表达水平,加剧肝细胞凋亡程度。然而,在 EPA 给药后,上述反应均有所改善,证明 EPA 可缓解 CCl₄ 所诱导小鼠的肝细胞凋亡情况,确定其抗肝细胞凋亡的分子机理 ($P<0.05$)。

综上所述,多脂鳞伞乙醇提取物(EPA)对 CCl₄ 所诱导的 BALB/c 小鼠急性肝损伤具有保护作用,并能明显抑制干细胞中 BAX、Caspase3 及 Cleaved Caspase3 凋亡蛋白的表达。

致谢

感谢长春中医药大学动物中心提供实验室条件;感谢吉林农业大学图力古尔教授及包海鹰教授提供实验材料及对实验的设计与指导。

作者贡献

王晓岩:实验设计及操作、数据处理、论文构思及撰写;刘岩:论文审核与修改;贺智杰:实验操作;谈中玉:实验操作。

利益冲突

作者声明,本研究不存在任何潜在利益冲突的商业或财务关系。

[REFERENCES]

- Chen SS, Ma YY, Li HJ, Lang H, Li YC, Wu J, Zhou M, He YX, Liu Y, Guo EF, 2022. Anti-diabetic effects of *Inonotus obliquus* extract in high fat diet combined streptozotocin-induced type 2 diabetic mice. *Nutricion Hospitalaria*, 39(6): 1256-1263
- Chen XL, Chen C, 2017. Frozen section with improved H & E staining for follicular morphometric analysis of mouse ovary in oestrus cycle. *Acta Physiologica Sinica*, 69(6): 781-784
- Dai YC, 2022. New trend of edible and medicinal fungi research in China—based on publications in *Mycosystema* during 2000–2021. *Journal of Fungal Research*, 20: 141-156 (in Chinese)
- Dai YC, Bau T, 2007. Illustrations of edible and medicinal fungi in northeastern China. Science Press, Beijing. 1-231 (in Chinese)
- Dai YC, Yang ZL, 2008. A revised checklist of medicinal fungi in China. *Mycosystema*, 27(6): 801-824 (in Chinese)
- Duru KC, Kovaleva EG, Danilova IG, Pieter VDB, 2019. The pharmacological potential and possible molecular mechanisms of action of *Inonotus obliquus* from preclinical studies. *Phytotherapy Research*, 33(8): 1953-2138
- Jai HP, Sunjin B, Inkeun P, Sun SM, Tsukasa T, Jun T, Kohei H, Insoo K, 2022. AHCC®, a standardized extract of cultured *Lentinula edodes* mycelia, promotes the anti-tumor effect of dual immune checkpoint blockade effect in murine colon cancer. *Frontiers in Immunology*, 13: 875872
- Kesavardhana S, Malireddi RKS, Kanneganti TD, 2020. Caspases in cell death, inflammation, and pyroptosis. *Annual Review of Immunology*, 38(1): 567-595
- Li ZW, Wu D, Zhang Z, Liu P, Chen WC, Li W, Wang YF, Yang Y, 2024. Antioxidant properties, UV damage repair activities and structural characteristics of crude polysaccharides of *Phallus rubrovolvatus* volva colloid isolation product. *Mycosystema*, 43(8): 240047 (in Chinese)
- Long XY, Wang P, Zhou YJ, Wang Q, Ren LX, Li Q, Zhao X, 2022. Preventive effect of *Lactobacillus plantarum* HFY15 on carbon tetrachloride CCl₄-induced acute liver injury in mice. *Journal of Food Science*, 87(6): 2626-2639
- Obeng E, 2021. Apoptosis (programmed cell death) and its signals-a review. *Brazilian Journal of Biology*, 81(4): 1133-1143
- Ohshima K, Torii S, Shimizu S, 2024. Presence of gut microbiota worsens D-galactosamine and lipopolysaccharide-induced hepatic injury in mice. *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms*, 30(1): e13183
- Pei F, Shi Y, Gao XY, Wu FN, Mariga AM, YangWJ, Zhao LY, An XX, Xin ZH, Yang FM, Hu QH, 2014. Changes in non-volatile taste components of button mushroom (*Agaricus bisporus*) during different stages of freeze drying and freeze drying combined with microwave vacuum drying. *Food Chemistry*, 165: 547-554
- Qian A, Zhou L, Shi DX, Pang ZR, Lu BN, 2023. *Portulaca oleracea* alleviates CCl₄-induced acute liver injury by

- regulating hepatic S100A8 and S100A9. Chinese Herbal Medicines, 15(1): 110-116
- Qin X, Yang K, Wang XL, Tu T, Wang Y, Zhang J, Su XY, Yao B, Huang HQ, Luo HY, 2023. Insights into the H₂O₂-driven lytic polysaccharide monooxygenase activity on efficient cellulose degradation in the white rot fungus *Irpex lacteus*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 71(21): 8104-8111
- Qiu Y, Sun Y, Song J, Mou FM, Gou J, Geng XQ, Li XY, Nie ZQ, Wang JX, Zheng Y, Wang M, 2023. Carboxymethylation of the polysaccharide from the fermentation broth of *Marasmius androsaceus* and its antidepressant mechanisms. Food Science and Human Wellness, 12(6): 2417-2427
- Samantha LE, Sarah LR, Maica LH, Karla JO, Colin F, Thomas HG, Thomas MW, 2017. Total protein analysis as a reliable loading control for quantitative fluorescent Western blotting. PLoS One, 8(8): e72457
- Su JK, Yeon JS, Seok KK, Jung LH, Mee-Young A, Jun KS, Young-Mi K, Youl LK, Jaewon L, Mu LB, Sik KH, 2018. Hepatic damage exacerbates cisplatin-induced acute kidney injury in Sprague-Dawley rats. Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A, 81(11): 397-407
- Tien S, Zhou HX, ZHOU Q, Liu HL, Wu B, Guo YW, 2023. PTTG1 alleviates acute alcoholic liver injury by inhibiting endoplasmic reticulum stress-induced hepatocyte pyroptosis. Liver International, 43(4): 840-854
- Wang L, Wang ZP, Zhao YY, Yang B, Huang GB, Li JB, Zhou X, Jiang HM, Lan PX, Chen ZS, 2024. Gut microbiota-mediated bile acid metabolism aggravates biliary injury after liver transplantation through mitochondrial apoptosis. International Immunopharmacology, 143(P3): 113413
- Wang T, William CH, James WG, Praveen KP, Yang SH, Mei LA, Petrenko VA, Torchilin VP, 2014. Enhanced tumor delivery and antitumor activity *in vivo* of liposomal doxorubicin modified with MCF-7-specific phage fusion protein. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine, 10(2): 421-430
- Wang XY, Bau T, Bao HY, 2014. Antioxidant activity of *Pholiota adiposa* and *Pholiota microspora* and effect on serum IL-2 level in mice. Acta Edulis Fungi, 21(4): 71-75 (in Chinese)
- Wang XY, Liu Y, 2023. Anti-tumor activity of the water-soluble protein extract of *Tricholoma mongolicum* (Agaricomycetes) in H22 tumor-bearing mice and the possible underlying mechanism. International Journal of Medicinal Mushrooms, 25(3): 75-85
- Wang XY, Zhang Y, Liu FF, 2022. Influence of *Pholiota adiposa* on gut microbiota and promote tumor cell apoptosis properties in H22 tumor-bearing mice. Scientific Reports, 12(1): 8589
- Wang Y, Hu T, Yan X, Chen XL, Shen LM, Luo P, 2023. Effects of *Dictyophora rubrovalvata* polysaccharide on lung injury induced by arsenic poisoning in rats. Mycosystema, 42(7): 1601-1610 (in Chinese)
- Wasser SP, 2011. Current findings, future trends, and unsolved problems in studies of medicinal mushrooms. Applied Microbiology and Biotechnology, 89(5): 1323-1332
- Wu F, Zhou LW, Yang ZL, Bau T, Li TH, Dai YC, 2019. Resource diversity of Chinese macrofungi: edible, medicinal and poisonous species. Fungal Diversity, 98: 1-76
- Xiao DY, He W, Xiao ZY, Liao Y, Mao JH, He YH, Jiang ZG, 2024. Protective effect and mechanism of icariin against carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice. Chinese Journal of Tissue Engineering Research, 28(23): 3654-3660 (in Chinese)
- Xing JJ, Wang XY, 2021. Chemical components of *Pholiota adiposa* analyzed by UPLC-QTOF-MS and their antitumor effects. Mycosystema, 40(9): 2423-2432 (in Chinese)
- Xu FL, Xu JX, Xiong X, Deng YQ, 2019. Salidroside inhibits MAPK, NF-κB, and STAT3 pathways in psoriasis-associated oxidative stress via SIRT1 activation. Redox Report, 24(1): 70-74
- Yan WW, Li GH, Jia YM, Lou Y, Gan XY, 2022. Effects of paeoniflorin on apoptosis and Bcl-2/Bax protein expression in hippocampal neurons induced by lead acetate. Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy, 39(6): 730-737
- Zhao ZW, Chang J, Lin LW, Tsai FH, Chang HC, Wu CR, 2018. Comparison of the hepato protective effects of four endemic *Cirsium* species extracts from Taiwan on CCl₄-induced acute liver damage in C57BL/6 mice. International Journal of Molecular, 19(5): 1329

[附中文参考文献]

- 戴玉成, 2022. 中国食药真菌研究发展的新趋势——以《菌物学报》2000–2021 年发表论文分析. 菌物研究, 20: 141-156
- 戴玉成, 图力古尔, 2007. 中国东北野生食药真菌图志. 北京: 科学出版社. 1-231
- 戴玉成, 杨祝良, 2008. 中国药用真菌名录及部分名称的修订. 菌物学报, 27(6): 801-824
- 李紫薇, 吴迪, 张忠, 刘朋, 陈万超, 李文, 王元凤, 杨焱, 2024. 红托竹荪菌托胶质分离产物的抗氧化和光损伤修复作用及其粗多糖的结构特征. 菌物学报, 43(8): 240047
- 王晓岩, 图力古尔, 包海鹰, 2014. 多脂鳞伞与滑子蘑抗氧化活性及对小鼠血清中 IL-2 的影响. 食用菌学报, 21(4): 71-75
- 王益, 胡婷, 严习, 陈晓露, 沈立明, 罗鹏, 2023. 红托竹荪多糖对神中毒大鼠肺损伤的影响. 菌物学报, 42(7): 1601-1610
- 肖冬焱, 何伟, 肖志滢, 廖月, 毛家豪, 何毅怀, 蒋智钢, 2024. 淫羊藿苷对四氯化碳诱导小鼠急性肝损伤的保护作用机制. 中国组织工程研究, 28(23): 3654-3660
- 邢峻嘉, 王晓岩, 2021. 基于 UPLC-QTOF-MS 技术分析多脂鳞伞特征性成分及体外抗肿瘤作用. 菌物学报, 40(9): 2423-2432
- 严伟伟, 李国辉, 贾仰民, 姜懿, 干晓瑜, 2022. 芍药苷对醋酸铅诱导海马神经元凋亡及 Bcl-2/Bax 蛋白表达的影响. 中国现代应用药学, 39(6): 730-737