

引用:宫善文,李宗泽,徐瑶,等. 蜂胶促进小鼠肝再生的作用和机制研究[J]. 聊城大学学报(自然科学版), 2025, 38(5): 764-772.

Citation: GONG Shanwen, LI Zongze, XU Yao, MIAO Xiulian, XUAN Hongzhuan. Effect and mechanism of propolis on liver regeneration in mice[J]. Journal of Liaocheng University (Natural Science Edition), 2025, 38(5): 764-772.

文章编号 1672-6634(2025)05-0764-09

DOI 10.19728/j.issn1672-6634.2025010010

蜂胶促进小鼠肝再生的作用和机制研究

宫善文, 李宗泽, 徐瑶, 苗秀莲, 玄红专

(聊城大学 农业与生物学院, 山东 聊城 252059)

摘要 在探讨蜂胶对小鼠肝再生过程中肝功能指标及肝细胞增殖进程的影响。将 C57BL/6 雌性小鼠随机分为假手术组、模型组和蜂胶处理组, 蜂胶处理组饮用蜂胶-黄耆胶溶液, 假手术组和模型组饮用纯净水, 连续饲喂 10 d, 然后通过 2/3 肝切除术(partial hepatectomy, PHx)建立肝再生模型。术后第 4 d 收集血清检测谷丙转氨酶(ALT)及谷草转氨酶(AST)活性, 收集小鼠肝脏, 检测肝脏大小变化并计算肝再生率, HE 染色评估小鼠肝组织的形态学变化, 免疫组织化学法检测肝组织中增殖细胞核抗原(Ki67)的表达, RT-qPCR 分析促炎因子及细胞周期相关基因的表达。结果表明, 蜂胶处理组小鼠的肝重体重比及肝再生率显著高于模型组, 血清 ALT 和 AST 活性降低至假手术组水平。蜂胶处理组小鼠肝脏中 Ki67 显著高于模型组和假手术组。蜂胶处理显著上调促炎因子 *Il-6* 和 *Tnf- α* 的基因转录, 明显促进细胞增殖标志基因 *Pcna* 和细胞周期相关基因 *Cdk1*, *Cdc25*, *Ccnd1*, *Ccne1* 的表达水平。研究表明, 蜂胶能通过调控促炎因子的分泌及细胞周期相关蛋白的表达促进肝再生过程和肝功能的恢复, 是一种潜力的促进肝再生的天然蜂产品。

关键词 蜂胶; 部分肝切除术; 肝再生; 促炎因子; 细胞周期

中图分类号 TS201.4; S896.6

文献标志码 A

开放科学(资源服务)标识码(OSID)



Effect and mechanism of propolis on liver regeneration in mice

GONG Shanwen, LI Zongze, XU Yao, MIAO Xiulian, XUAN Hongzhuan

(College of Agriculture and Biology, Liaocheng University, Liaocheng 252059, China)

Abstract To illustrate the effect of propolis on liver function indexes and hepatocyte proliferation during liver regeneration, C57BL/6 mice were randomly divided into three groups: sham group, model group, and ethanol extracts of propolis (EEP) treatment group. Both sham and model group were given pure water, while EEP group received propolis-tragacanth solution for 10 days. And then the liver regeneration model was established by partial hepatectomy (PHx). After successful modeling by PHx, the mice were sacrificed the 4th day and the liver was collected to measure the changes in size and the liver regeneration rate of each group. HE staining were used to evaluate the histomorphologic changes; serum alanine amin-

收稿日期: 2025-01-15

基金项目: 山东省自然科学基金项目(ZR2021MC110); 山东省蜂产业技术体系产品加工与质量控制岗位(SDAIT-24-05); 泰山学者资助计划(tsqn202211172)资助

通信作者: 苗秀莲, 女, 汉族, 副教授, 研究方向: 肝脏损伤及修复机制研究, E-mail: miaoxl@189.cn; 玄红专, 女, 汉族, 博士, 教授, 博士生导师, 泰山学者青年专家, 研究方向: 蜂产品及功能性食品研究, E-mail: hongzhuanxuan@163.com.

otransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) were measured to evaluate the changes in liver function; immunohistochemical staining was used to measure the expression of proliferating cell nuclear Ki67; quantitative real-time PCR were used to measure the expression of pro-inflammatory factors and cell cycle related genes. The results showed that the liver-to-body weight ratio and liver regeneration rate of mice in the EEP-treated group were significantly higher than those in the model group, while serum ALT and AST activities were reduced to the levels observed in the sham-operated group. The level of Ki67 in the liver of the EEP-treated group was significantly higher than that of the model group and the sham-operated group. EEP treatment significantly upregulated the gene transcription of pro-inflammatory factors *Il-6* and *Tnf- α* and markedly promoted the expression levels of cell proliferation marker gene *Pcna* and cell cycle-related genes *Cdk1*, *Cdc25*, *Ccnd1*, and *Ccne1*. The study suggests that propolis can promote liver regeneration and the recovery of liver function by regulating the secretion of pro-inflammatory factors and the expression of cell cycle-related proteins, making it a potential natural bee product for enhancing liver regeneration.

Keywords propolis; partial hepatectomy; liver regeneration; pro-inflammatory factors; cell cycle

0 引言

蜂胶(propolis)是由蜜蜂采集植物树脂等分泌物,并与其上颚腺、蜡腺等分泌物混合形成的胶粘性物质,具有广谱抗菌、抗炎、抗氧化及抗肿瘤特性^[1-4],可通过降低血糖和血脂水平改善肥胖和糖尿病^[5],能够提高免疫力,保护肝脏、促进伤口愈合及组织再生^[6-7],目前已被广泛应用于食品、药品、保健品等领域,对于预防疾病、促进人体健康起重要作用^[8]。

肝脏是人体的主要代谢器官,具强大的再生能力。当肝脏受到外伤、感染、中毒、切除等刺激后,肝细胞会迅速有序地分裂,显示出超强的再生能力和强大的代偿功能^[9]。肝脏强大的再生能力对肝脏疾病康复具有重要意义。部分肝切除术(partial hepatectomy, PHx)后的顺利恢复主要取决于残余肝的迅速再生及肝功能的快速恢复^[10-11]。PHx后,除残余成熟肝细胞迅速进入细胞有丝分裂进行增殖外,肝干细胞也迅速分化为肝细胞和胆管上皮细胞,参与肝再生^[12]。然而,由于大面积肝组织受损,有时肝脏再生能力不足以恢复到正常水平,往往导致术后肝功能衰竭^[13]。药物是治疗肝脏疾病的重要手段,临床上常用促肝细胞生长素治疗肝脏疾病,但因其属活性多肽物质,服用后可能会出现发热、皮疹、过敏样反应等不良症状反应^[14]。一些小分子药物、中草药提取物等亦具有促进肝再生的作用^[15]。

蜂胶中含有丰富的具药理活性的成分,然而目前有关蜂胶对肝脏再生的贡献鲜有报道^[16]。此外,蜂胶的给药方式多以按照体重通过灌胃进行,这一方式适用于模型构建前的干预,显然不适合肝脏切除后蜂胶的持续给与和作用。基于此,本研究给予蜂胶-黄蓍胶溶液代替日常饮水,建立小鼠部分肝切除术肝再生模型直至实验结束,来探讨饮食持续补充蜂胶对小鼠肝再生的影响,为进一步明确肝脏损伤后蜂胶促进组织的修复及再生功效的机制提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

10~11周龄动物雌性健康C57BL/6小鼠,体重18~20g,购于济南朋悦实验动物繁育有限公司,动物许可证号:SCXK(鲁)20190003,饲养于温度20~24℃、相对湿度40%~70%、12h光照/12h黑暗循环环境中。本实验经聊城大学实验动物伦理委员会审查(批准编号:AP2024101001)。

谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司;RNA提取试剂盒购自北京CarryHelix有限公司;Prime Script™ RT Master Mix逆转录试剂盒和TB Green® Premix Ex Taq™ II试剂盒购自TaKaRa公司;所有引物合成于上海生工有限公司。Ki67抗体、山羊小鼠二抗来自塞维尔生物科技有限公司。

蜂胶购自安徽宣城,杨属型,批次编号 CP22082601。实验中所用到的蜂胶属于成品蜂胶。蜂胶中主要的化合物属于酚酸类和黄酮类,每批蜂胶来源于同一地理区域、同一收集季节的蜂胶,提取工艺经过乙醇提取,超声提取,减压过滤,冷冻干燥,通过同一来源和同一提取工艺来确保蜂胶的一致性。

1.2 方法

1.2.1 总黄酮测定方法。参照国标 GB/T 20574-2006 测定蜂胶乙醇提取物中总黄酮的含量。(1) 芦丁标准曲线测定:精密吸取芦丁标准品工作液 0、40、80、120、160、200、240 μL 于离心管中,再分别加入 600、560、520、480、440、400、360 μL 无水乙醇。随后,在每个离心管中,依次加入 40 μL 硝酸铝(100 g/L)溶液、40 μL 醋酸钾(9.8 g/L)溶液、1.32 mL 水,混匀静置 1 h,在 415 nm 波长处测定吸光值。以芦丁质量(mg)为横坐标,吸光值为纵坐标绘制标准曲线,线性工作范围 0~0.048 mg。(2) 蜂胶乙醇提取物样品测定:按标准曲线的测定方法,测定样品吸光度值,计算蜂胶乙醇提取物样品中的总黄酮含量,总黄酮含量表示为 mg 芦丁当量 RE/g。

1.2.2 总酚酸测定方法。采用 Folin-Ciocalteu 法测定蜂胶样品中的总酚酸含量。(1) 没食子酸标准曲线测定:在没食子酸标准品溶液(1 mg/mL)中加入无水乙醇,逐级稀释至 100、80、60、40、20、10、0 $\mu\text{g/mL}$,各吸取 125 μL 于离心管中,依次加入 125 μL Folin-Ciocalteu 试剂,125 μL 碳酸钠(1 mol/L)溶液,375 μL 水,混匀,避光静置 1 h 后,8 000 r/min 离心 5 min,取上清在 760 nm 波长处测定吸光值。以没食子酸质量(mg)为横坐标,吸光值为纵坐标绘制标准曲线,线性工作范围 0~0.012 5 mg。(2) 蜂胶乙醇提取物样品测定:按标准曲线的测定方法,测定样品吸光度值,计算蜂胶乙醇提取物样品中的总酚酸含量,总酚酸含量表示为 mg 没食子酸当量 GAE/g。

1.2.3 蜂胶溶液的制备。蜂胶乙醇提取物的制备用 95% 乙醇提取蜂胶,经过超声粉碎、减压过滤后在 40 $^{\circ}\text{C}$ 下进行旋转蒸发至恒重,4 $^{\circ}\text{C}$ 储存。使用时取适量蜂胶溶于无水乙醇,加入 0.5% 的黄耆胶溶液,配制 7.5 mg/mL 的蜂胶溶液,置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱待用。

1.2.4 动物分组与模型的构建。首先进行预实验,用液体饲喂瓶给与小鼠 7.5 mg/mL 的蜂胶溶液,7 d 后进行肝切手术。预实验结果显示饲喂蜂胶溶液的给药方式可行,小鼠术后伤口愈合快,肝脏增殖明显。正式实验将小鼠随机分为 3 组,每组 6 只,假手术组(Sham 组)正常饮食和饮水,腹部做约 2 cm 的伤口后立刻进行缝合。模型组(Model 组)正常饮食,用液体饲喂瓶饲喂 0.5% 黄耆胶溶液 10 d,自由取食,不提供饮水,进行 2/3 肝脏切除建立肝再生模型。蜂胶处理组(EEP 组)自由取食,不提供饮水,饲喂蜂胶溶液 10 d 建立肝再生模型。Model 组和 EEP 组每天称重,计算每只小鼠摄入液体的量。肝再生模型的构建:使用异氟烷进行吸入式气体麻醉,将小鼠固定在自制的泡沫鼠板上。进行腹部正中切口,使用安尔碘消毒 3 遍,切口长约 2 cm。打开腹腔,使用自制腹腔小拉钩暴露肝脏,采用 1-0 手术丝线对左外侧叶肝蒂进行集束结扎,并切除左外侧叶和中叶。完成肝部结扎和切除后,检查无出血,使用 0 号手术线迅速缝合腹部切口。术后小鼠苏醒后正常进食、进水。蜂胶处理组继续饲喂蜂胶溶液,定时观察小鼠生存情况。

1.2.5 测定血清肝功能指标。肝切手术后 4 d,摘眼球采集血液,常温条件静置 1 h,4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱静置 3 h,然后 4 $^{\circ}\text{C}$ 、4 000 r/min 离心 15 min,吸取上清即为血清液待测。按照试剂盒说明书测定血清中 ALT 和 AST 活性。

1.2.6 计算肝再生率。参照 Zupa A 贝克尔公式计算肝再生率: $\eta_{\text{肝再生率}}(\%) = 100 \times [C - (A - B)] / A$,其中 A 为接受 PHx 小鼠的平均估计全肝质量,B 为接受 PHx 后小鼠切除的肝组织质量,C 为相应时间点肝再生后的残肝湿重。

1.2.7 肝组织形态学检测。固定的肝组织用梯度乙醇、二甲苯脱水、浸蜡,包埋成石蜡块后切片,取各组织用二甲苯透明、梯度乙醇逐级复水,依次用苏木精-伊红染液染色,之后梯度乙醇逐级脱水、二甲苯透明、封片,置于显微镜下观察并拍照。

1.2.8 肝组织免疫组织化学检测。石蜡切片,用 10% 山羊血清室温封闭 1 h,然后用抗 Ki67 (Abcam, 1 : 200)抗体孵育,抗兔二抗孵育、显色,染色后用 Olympus IX-73 显微镜观察并拍照。Image-Pro Plus 6.0 进行定量分析。

1.2.9 RNA 提取和荧光实时定量 PCR 分析。将肝组织研磨为匀浆,用 Trizol 法按照试剂供应商提供的说明提取肝组织中总 RNA 并储存于 -80°C 。通过逆转录试剂盒对总 RNA 进行逆转录,使用 TB Green © Premix Ex Taq™ II 试剂盒对基因转录物进行实时荧光定量 PCR。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法进行数据分析,用 β -actin 作为内参基因归一化目的基因的表达。引物序列见表 1。

表 1 qRT-PCR 引物序列

Tab. 1 Primer sequences for qRT-PCR

基因名称	引物序列(5'-3')	
<i>Cdk1</i>	F: ACTCCAGGCTGTATCTCAT	R: CACTOGTATCGGTATTCCAA
<i>Cdc25</i>	F: TGACGTCTATAGCCCCACC	R: TAAGCGGAGAGGCAGACATC
<i>Pcna</i>	F: TGCTCTGAGGTACCTGAACCT	R: TGCTTCCTCATCTTCAATCT
<i>Ccnd1</i>	F: GTTCATTTCCAACCCACCCCTC	R: AGAAAGTGCGTTGTGCGGTAG
<i>Ccne1</i>	F: ACAGCAGGTCTTCGTGCAGATC	R: CTGAAGCAGCCACATCCAG
<i>Ccna2</i>	F: TTGCTCCTCTTAAGGACCTTCC	R: ATTTAACCTCCATTTCCCTAAGGT
<i>Il-6</i>	F: TAGTCCTTCCTACCCCAATTTCC	R: TTGGTCCTTAGCCACTCCTTG
<i>Tnf-α</i>	F: CCCTCACACTCAGATCATCTTCT	R: GCTACGACGTGGGCTACAG
<i>β-actin</i>	F: CACTGCCGCATCCTCTTCTCC	R: CAATAGTGATGACCTGGCCGT

1.3 统计学方法

所有实验数据均至少进行三次重复,不同处理之间通过 GraphPad Prism 8.0 软件进行数据分析,多组间采用单因素方差分析(One-way ANOVA),组间两两比较通过 Duncan 法检验。统计分析的结果以平均数±标准误差(SEM)表示, $p<0.05$ 表示不同处理间显著具差异性。

2 结果与分析

2.1 蜂胶中总黄酮和总酚酸含量

对实验所用蜂胶参照国标 GB/T 20574-2006 和 Folin-Ciocalteu 法,分别测定了总黄酮和总酚酸含量,结果见表 2。

表 2 蜂胶乙醇提取物中总黄酮和总酚酸的含量

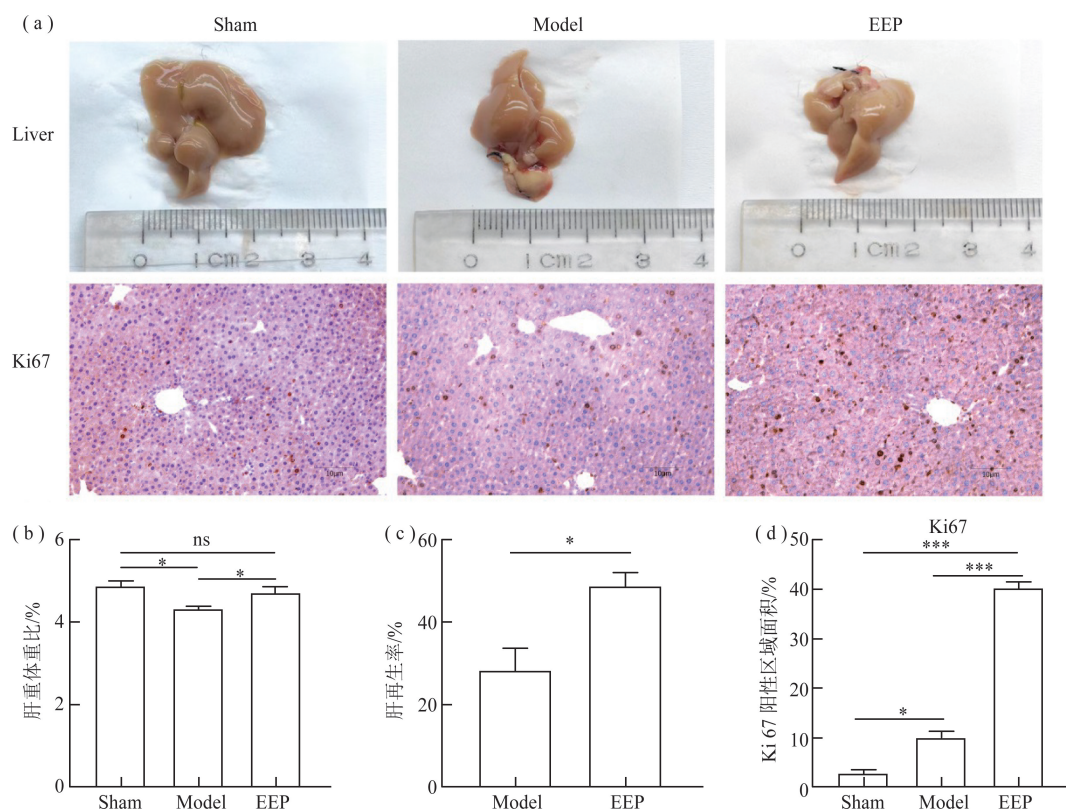
Tab. 2 Contents of total flavonoids and total phenolic acids in ethanol extract of propolis ($n=3$)

变量	单位	含量
黄酮	mg RE/g	207.05±10.06
酚酸	mg GAE/g	264.21±25.98

2.2 蜂胶促进小鼠肝切除后再生

蜂胶处理期间,各组小鼠的体重均略有上升。液体饲喂瓶饲喂小鼠蜂胶溶液,1 d 小鼠摄入液体的量较少,且个体差异较大,平均每只小鼠的摄入量为 1.71 ± 1.25 mL/d,之后维持在 3.71 ± 0.68 mL/d,这与正常小鼠每天饮用纯水的量基本相当。PHx 术后 1 d,平均每只小鼠饮用蜂胶液体的量降低至 0.64 ± 0.34 mL/d,术后 2 d 逐渐恢复正常。

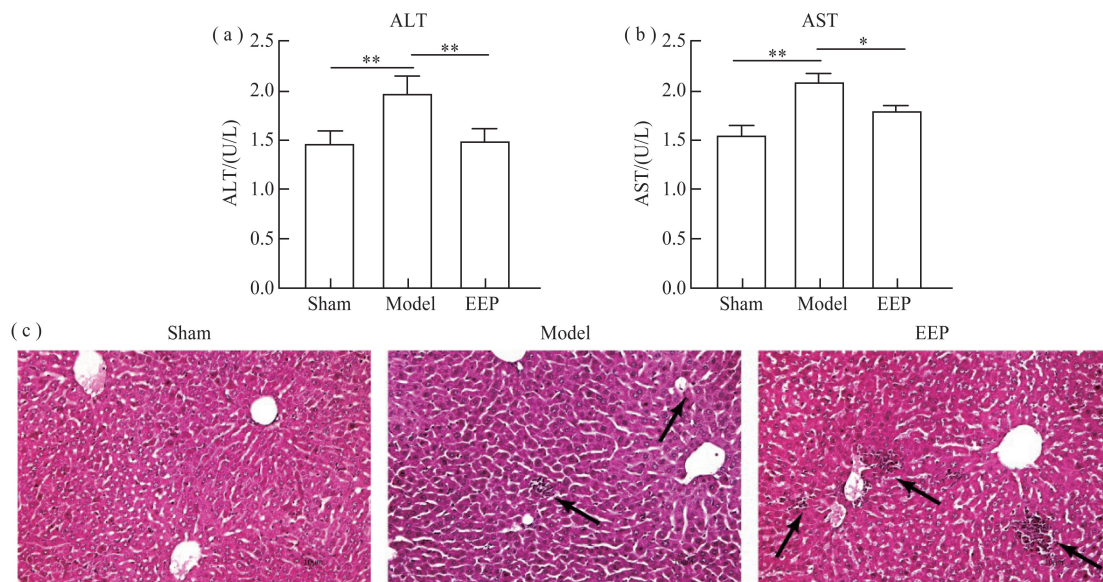
研究表明,PHx 手术后 2~4 d 为肝再生的高峰期,于 PHx 手术后 4 d 计算肝重体重比及肝再生率,结果显示,EEP 组的肝重体重比及肝再生率显著高于 Model 组($p<0.05$)。Ki67 是一种核蛋白,全称为“细胞核抗原 Ki67”。Ki67 蛋白的表达水平与细胞的增殖状态密切相关,当细胞处于增殖阶段时,Ki67 的表达显著增加。IHC 染色结果显示,增殖细胞主要分布在肝实质细胞中,并呈血管周围点状分布。Sham 组、Model 组和 EEP 组肝组织 Ki67 平均光密度值分别为 $(0.30\pm0.05)\%$ 、 $(1.00\pm0.13)\%$ 、和 $(4.01\pm0.13)\%$,与 Model 组相比,EEP 组肝脏组织中 Ki67 阳性面积显著增加($p<0.001$,图 1(a)和(d))。以上结果提示蜂胶具明显促进小鼠肝再生的作用。



注: (a) 肝组织形态及 Ki67 染色; (b) 肝重体重比; (c) 肝再生率; (d) Ki67 阳性面积 (比例尺为 1 : 10 μm)
平均数 $\pm$ 标准误差, $n=6$, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ 。

图 1 蜂胶促进小鼠肝脏再生, 不同组之间比较

Fig. 1 Propolis promotes liver regeneration vs each group



注: (a) and (b) PHx 术后血清中 AST 和 ALT 活性; (c) 肝组织 H&E 染色 (比例尺为 1 : 10 μm)。黑色箭头所示为肝脏中炎症细胞聚集形成轻微炎症病灶。

图 2 肝功能指标及 HE 染色

Fig. 2 Liver function indicators and HE staining

2.3 蜂胶有利于 PHx 后小鼠肝功能恢复

ALT 和 AST 是肝功能检查最常用的检查指标,也是提示肝脏损害最敏感的检测指标。PHx 后 4 d,检测血清中 ALT 和 AST 活性。与 Sham 组相比,EEP 组小鼠的 ALT 和 AST 水平无显著差异,而 Model 组

显著升高,见图2(a)和(b)。PHx术后肝功能受损,ALT和AST升高,但小鼠在继续饮用蜂胶后ALT和AST水平恢复至Sham组水平,表明蜂胶处理能有助于肝再生过程中肝功能的恢复。

2.4 蜂胶对PHx术后肝脏组织形态的影响

不同处理组小鼠的肝脏组织HE染色发现,Sham组小鼠的肝细胞排列紧密规则,胞质着色均匀,中央静脉和门管区结构完整。Model组与EEP组小鼠的肝细胞之间肝血窦明显变宽,肝门管区可见大量炎性细胞浸润,且伴有轻微水肿。EEP组的炎性细胞浸润区域明显高于模型组,肝细胞形态及肝窦更趋于正常[图2(c)]。

2.5 蜂胶处理对PHx小鼠肝组织中TNF- α 以及IL-6 mRNA相对表达的影响

TNF- α 以及IL-6在肝脏再生的启动过程中发挥着十分重要的作用,在启动过程中,它们促使着处于G0期的肝脏细胞向G1期转变。在肝切除术第4d,EEP组与Model组相比显著上调了IL-6和TNF- α 的基因水平,表明蜂胶处理可能通过促进IL-6和TNF- α 的mRNA表达促进肝细胞的快速增殖(图3)。

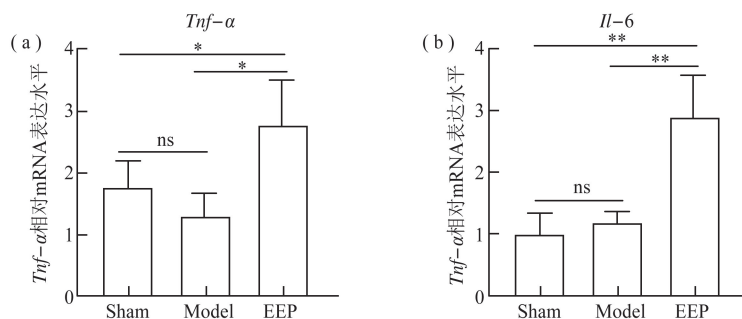


图3 促炎因子TNF- α 、IL-6的mRNA表达

Fig. 3 The mRNA expression of pro-inflammatory factors TNF- α and IL-6 in liver tissue

2.6 蜂胶处理促进细胞周期相关基因的表达

肝脏部分切除后,肝脏体积和重量急剧下降,干细胞数量迅速减少,肝切除术这一刺激作为信号被反馈至残余的肝脏细胞,因此剩余的处于G0期的肝细胞在信号刺激后,进入肝细胞快速增殖阶段,促使残存肝脏快速恢复其原有的体积和重量。基于此,我们检测了蜂胶处理对肝细胞细胞周期相关基因表达的影响。与Sham组相比,Model组和EEP组中的细胞增殖的关键因子Cdk1和Ccn2及细胞增殖的标志基因Pcna的表达显著升高,表明PHx后细胞周期相关蛋白快速启动肝再生的过程。此外,蜂胶组中Cdc25,Ccnd1和Ccn1基因的表达水平均显著高于模型组,表明蜂胶在肝细胞增殖过程中促进细胞周期相关基因的表达[图3(a~f)],加速肝脏的恢复和重建。

3 讨论

肝切除术后肝脏的修复和再生对于肝脏患者是极为重要的。术后的药物治疗往往也是影响肝脏再生状况的重要因素。蜂胶是一种天然蜂产品,在传统医学中被广泛用于治疗伤口愈合、外伤、癌症、感染等^[17]。因此,本研究通过PHx构建小鼠肝再生模型,在术前术后给予小鼠饮用蜂胶溶液,以探讨蜂胶在小鼠肝再生过程的作用与机制。

肝再生的发生由肝实质细胞和非实质细胞(包括肝窦内皮细胞、Kupffer细胞和卫星细胞等)共同参与,两者协同参与了PHx后的肝再生过程^[18-19]。再生初期(0~2 d)以成熟肝实质细胞的增殖为主,晚期阶段(4~8 d)有内皮细胞、Kupffer细胞等多种非实质细胞共同参与增殖,说明PHx后2~4 d为重要时间的节点,肝实质细胞和其他细胞可能在这一时间段扮演着不同角色,共同参与并加速肝再生的发生^[20]。本实验发现,饮食中添加蜂胶后促进PHx后小鼠肝再生率与肝重体重比显著增加,血清ALT和AST的水平显著降低,说明蜂胶有一定的保护肝脏的功效,并且肝再生的速度及肝功能的恢复,这与蜂胶对由药物性肝损伤、酒精性肝损伤、四氯化碳及氨基半乳糖等所致肝损伤的作用一致^[21-22]。蜂胶含有丰富的生物活性物质,如黄酮类化合物、酚酸类物质、萜烯类及芳香族化合物,能通过降低肝酶的水平抑制肝细胞的死亡^[23],特别是蜂

胶中的主要功效组分如咖啡酸苯乙酯、槲皮素、白杨素、松属素等,这些物质对于促进肝细胞再生,降低感染,可能发挥重要作用^[24]。

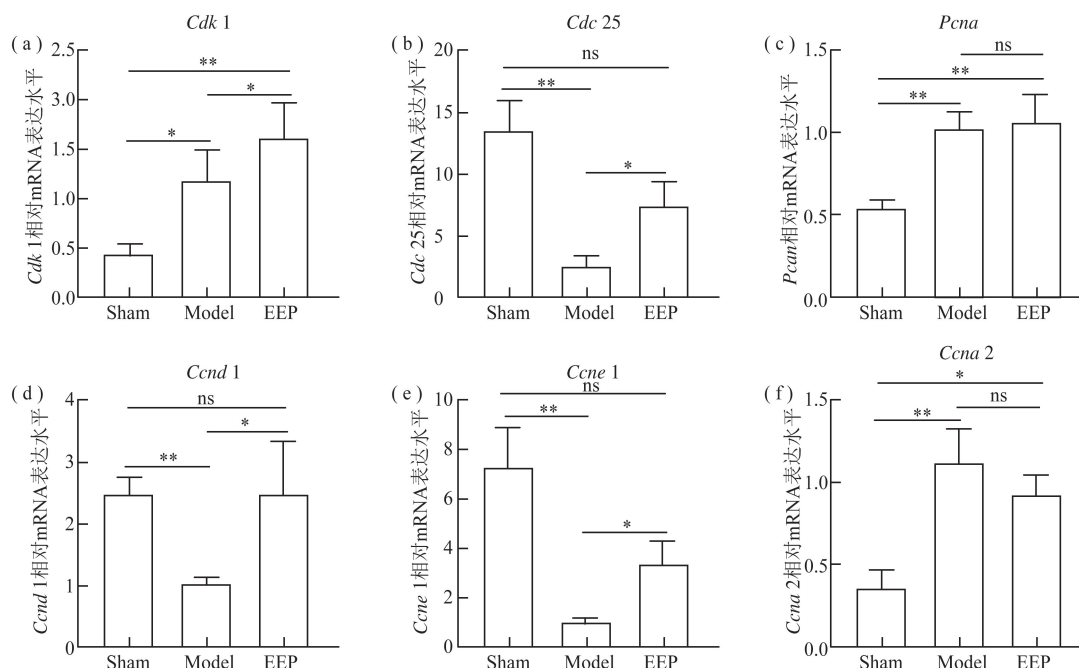


图 4 蜂胶处理对肝再生过程中细胞周期相关基因表达的影响

Figure 4 Effect of propolis on the expression of cell cycle related genes during liver regeneration

蜂胶处理促进小鼠肝再生的机制可能与调控细胞周期蛋白有关。肝再生增殖期,细胞周期蛋白发挥着关键的作用,如 Cyclin D1,Cyclin E,Cyclin A 和 Cyclin B。细胞周期蛋白依赖性激酶 1(CDK1)是一个高度保守的 Ser/Thr 蛋白激酶,在细胞周期循环中起着重要作用。CDK1 与细胞周期蛋白形成复合物磷酸化一系列的目标底物,从而导致细胞周期循环的发生^[25]。从 G1 期到 S 期主要通过 Cyclin D1-CDK4/6 复合物调控。Cyclin D1-CDK4/6 与 pRb-E2F 复合物相互作用,导致肿瘤抑制蛋白视网膜母细胞瘤蛋白(pRb)磷酸化,触发重要的细胞周期相关基因的转录,主要包括 Cyclin A 和 Cyclin D,Cdc25 和 Cdk2 基因,而 CCNE1 蛋白是细胞周期由 G1 期向 S 期转变的关键调节因子^[26]。此外,Cyclin D1-CDK4 可以隔离 CDK 相互作用蛋白/激酶抑制蛋白(Cip/Kip)家族 p21 和 p27,从而激活 CDK1 和 CDK2,进而 CDK2 与 Cyclin E 结合形成介导 G1/S 过渡的 Cyclin E-CDK 2 复合物。CDK2 的激活还与 CCNA2 周期蛋白相关,CCNA2 蛋白的升高往往标志着细胞增殖的发生,从而促进干细胞向 G1/S 期过渡^[27]。当肝细胞进入 S 期时,Cyclin A 替代 Cyclin E 并产生 Cyclin A-CDK2 复合体,从而控制 S 期发生的 DNA 复制等事件^[26]。此外,细胞核抗原 Ki67 和细胞周期蛋白增殖细胞核抗原(Pcna)在 DNA 复制过程中发挥了关键的作用,在 S 期表达量最高,是细胞增殖的标志性蛋白。在 S 期后期,CDK1 与 Cyclin A 结合,形成 Cyclin A-CDK1 复合物,有助于将细胞转移到 G2 期。在 G2 期后期,Cyclin B 形成 B-CDK1 复合物,这个过程使肝细胞在通过 G2-M 检查点时起到了关键作用^[28]。在本研究中,与 Model 组相比,EEP 组细胞核抗原 Ki67 的表达、肝细胞中 Cdk1, Ccne1,Cdc25 和 Ccnd1 等基因的表达均显著升高,表明蜂胶处理促进细胞周期的顺利进行和细胞周期循环。

肝再生的起始阶段,炎症反应影响了肝细胞的增殖和分化。这一过程中,炎症因子 TNF- α 和 IL-6 的增多是炎症标志发生的重要标志。大多情况下,炎症因子的增多被认为是促进炎症发生的关键因素,但在肝脏恢复与再生过程中,炎症因子 IL-6 的增多会促进血管生成、细胞增殖和代谢,并且抑制细胞凋亡和氧化应激的发生。研究表明,IL-6 缺陷小鼠肝切除术后,其肝再生功能受损,表现为肝衰竭或肝坏死、肝细胞 DNA 合成减慢及 G1 期异常^[29]。与此同时,TNF 信号通路也是影响干细胞增殖的关键因素,TNF 诱导 NF- κ B 的核易位,触发 IL-6 的产生并随后激活信号转导及转录激活蛋白 3 (STAT3)^[30-31]。另一方面,TNF- α 可以通过

磷酸化 JNK 来诱导靶基因的转录,其中包括细胞分裂周期相关蛋白 *CDC2* 和 *CDK1*^[32]。本研究发现,在肝再生过程中,蜂胶处理明显促进 *Tnf- α* 和 *Il-6* 的基因表达水平,表明在 PHx 后蜂胶引起的炎症反应在肝再生的起始阶段发挥关键作用。

尽管本研究首次证实了蜂胶能够促进 PHx 后的肝脏再生,并初步阐明了其主要作用机制,但我们也认识到研究存在一定局限性。一方面,本研究仅测定了蜂胶乙醇提取物中的总黄酮和总酚酸含量,尚未借助液质联用技术对提取物中具体的活性成分及其含量进行分析。另一方面,在肝再生早期,细胞因子和细胞周期蛋白相关基因的 mRNA 水平通常率先改变,随后才反映在蛋白质层面。这种转录水平的变化是细胞对刺激快速响应的敏感指标,已在多项研究中被证实与蛋白水平变化高度相关。而本研究主要聚焦于基因水平对炎症因子和细胞周期因子表达的检测,尚未开展蛋白水平的检测工作。再者,本研究仅关注了蜂胶对肝脏术后第 4 天的影响,并未延长术后观察时间,以进一步评估蜂胶在更长时段内对肝脏术后恢复的作用。

针对本研究存在的局限性,未来研究的重点方向及重要性体现在以下几个方面:(1) 尽管现有文献表明蜂胶在雌雄小鼠中展现出相似生理效应,但在特定条件下,性别差异仍可能对其作用产生不同影响。因此,在后续研究中,应当系统对比蜂胶在雌雄小鼠体内的生物学效应,以此全面评估其作用机制,为蜂胶的应用提供更具普适性的理论依据。(2) 后续研究将运用液质联用技术(如 UPLC-MS/MS),对蜂胶乙醇提取物中的具体活性成分及其含量展开精确分析。该技术能够提供精准的成分鉴定与定量数据,助力深入探究蜂胶的生物学效应及作用机制,为解析其药理特性夯实基础。(3) 为更全面地揭示炎症因子和细胞周期因子的作用机制,后续研究将采用蛋白免疫印迹、免疫组织化学、酶联免疫吸附等方法,对目标蛋白的表达水平进行检测。通过多维度的蛋白水平分析,弥补基因水平研究的不足,从而更深入地理解相关因子在蜂胶作用过程中的调控机制。(4) 未来研究将借助组学分析手段(如转录组学、蛋白质组学、代谢组学),从系统生物学视角全面剖析蜂胶的作用机制。这种全方位的研究方式能够在分子水平和通路水平提供更深入的证据,为揭示蜂胶的复杂作用网络提供有力支撑。(5) 尽管先前研究已经表明,PHx 之后第四天为肝脏增值高峰期,此段时间分析样本能够更好地反映药物对肝脏术后增殖的影响。然而,肝脏再生是一个动态的过程,仅观察早期阶段可能无法全面反映蜂胶对肝再生的整体影响。在后续研究中,我们将把实验观察时间延长至术后 7 天、14 天甚至更长时间点,通过在不同时间节点采集样本,系统分析肝组织形态学、肝功能指标、细胞增殖及相关分子标志物的变化情况,从而全面揭示蜂胶在肝再生中的作用及其潜在机制,为临床应用提供更具时效性和完整性的理论指导。

4 结论

本研究通过 PHx 建立肝再生模型,探讨蜂胶处理对小鼠肝再生的影响。在 PHx 术前和术后持续补充蜂胶,显著促进肝功能的恢复,促进肝细胞再生,其主要作用机制与蜂胶调控细胞周期蛋白、促进促炎因子 IL-6 和 TNF- α 的表达密切相关。总之,饮食中补充蜂胶有助于肝切除术后肝脏的再生,促进肝功能的恢复。

参 考 文 献

- [1] PRZYBYLEK I, KARPIŃSKI T M. Antibacterial properties of propolis[J]. *Molecules*, 2019, 24(11): 2047.
- [2] KOCOT J, KIELCZYKOWSKA M, LUCHOWSKA-KOCOT D, et al. Antioxidant potential of propolis, bee pollen, and royal Jelly: possible medical application[J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018: 7074209.
- [3] VALIVAND N, ARAVAND S, LOTFI H, et al. Propolis: a natural compound with potential as an adjuvant in cancer therapy-a review of signaling pathways[J]. *Molecular Biology Reports*, 2024, 51(1): 931.
- [4] WANG F, YUAN J, LI J, et al. Antibacterial activity of Chinese propolis and its synergy with β -lactams against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2022; 53(4): 1789-1797
- [5] CHEN Y, WANG J, WANG Y B, et al. A propolis-derived small molecule ameliorates metabolic syndrome in obese mice by targeting the CREB/CRTC2 transcriptional complex[J]. *Nature Communications*. 2022, 13(1): 246.
- [6] OGAWA T, TERADA T. The beneficial effect of brazilian propolis for liver damage through endoplasmic reticulum stress[J]. *Biological Pharmaceutical Bulletin*, 2024, 47(7): 1265-1274.

- [7] MANGINSTAR C O, TALLOEI T E, NIODE N J, et al. Therapeutic potential of propolis in alleviating inflammatory response and promoting wound healing in skin burn[J]. *Phytotherapy Research*, 2024, 38(2): 856-879.
- [8] 祝梅斐, 鲍佳益, 黄凯靓, 等. 2023 年国内外蜂胶研究概况[J]. *蜜蜂杂志*, 2024, 44(3): 1-10.
- [9] LIU Q, WANG S Y, FU J, et al. Liver regeneration after injury: mechanisms, cellular interactions and therapeutic innovations[J]. *Clinical and Translation Medicine*, 2024, 14(8): e1812.
- [10] 杨雪钰, 赵雨. 肝癌肝切除术后发生肝衰竭的危险因素分析[J]. *临床医学*, 2023, 43(11): 49-52.
- [11] SUN R B, FEI F D, JIN D, et al. The integrated analysis of gut microbiota and metabolome revealed steroid hormone biosynthesis is a critical pathway in liver regeneration after 2/3 partial hepatectomy[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2024, 15: 1407401.
- [12] KAUR I, JUNEJA P, TIWARI R, et al. Secondary bile acids in portal blood contribute to liver regeneration in a rat model of partial hepatectomy[J]. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2024, 327(4): G586-G597.
- [13] LUND A, ANDERSEN K J, MEIER M, et al. Biochemical and morphological responses to post-hepatectomy liver failure in rats[J]. *Scientific Reports*, 2023, 13(1): 13544.
- [14] 麦泳瑶, 张文洁, 左长京, 等. 原研促肝细胞生长素治疗不同肝脏疾病疗效的 Meta 分析[J]. *中国新药杂志* 2018, 27(10): 1202-1208.
- [15] 余婧婷, 吴晓明. 促进肝脏再生的药物及其机制[J]. *药学研究*, 2019, 38(8): 486-489.
- [16] ROCHAHORA MENDONC A A K, DE JESUS C V F, DE ANDRADE DE CARVALHO F M, et al. Regenerative hepatic effect of red propolis extract administration after partial hepatectomy in rats[J]. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 2020, 30(5): 683-692.
- [17] ŠURAN J, CEPANEC I, MAŠEK T, et al. Propolis extract and Its bioactive compounds—from traditional to modern extraction technologies[J]. *Molecules*, 2021, 26(10): 2930.
- [18] SHUBHAM S, KUMAR D, ROOGE S, et al. Cellular and functional loss of liver endothelial cells correlates with poor hepatocyte regeneration in acute-on-chronic liver failure[J]. *Hepatology International*, 2019, 13(6): 777-787.
- [19] SHU W Z, YANG M F, YANG J Y, et al. Cellular crosstalk during liver regeneration: unity in diversity[J]. *Cell Communication and Signaling*, 2022, 20(1): 117.
- [20] 邱倩, 张慧, 尹贺贺, 等. 基于损伤模式建立肝再生小鼠模型的研究进展[J]. *中华肝胆外科杂志*, 2024, 30(7): 552-556.
- [21] JUWITA D A, AHMADIN A, ABDILLAH R, et al. Hepatoprotective effect of Indonesian propolis from *Apis mellifera* in carbon tetrachloride (CCl₄) induced liver injury in mice[J]. *Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences*, 2023, 36(4): 189-193.
- [22] SAHLAN M, RIZKA ALIA HAPSARI N, DIAH PRATAMI K, et al. Potential hepatoprotective effects of flavonoids contained in propolis from South Sulawesi against chemotherapy agents[J]. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2021, 28(10): 5461-5468.
- [23] 葛怡青, 汪浅, 全涛. 蜂胶功能成分及生物活性研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2022, 13(4): 1027-1035.
- [24] 王雨宵, 常相伟, 陈博文, 等. 蜂胶化学成分、药理作用及临床应用研究进展[J]. *中国现代中药*, 2023, 25(3): 665-685.
- [25] DIEHL J A. Cycling to cancer with cyclin D1[J]. *Cancer Biology and Therapy*, 2002, 1(3): 226-231.
- [26] BENDRIS N, LEMMERS B, BLANCHARD J M, et al. Cyclin A2 mutagenesis analysis: a new insight into CDK activation and cellular localization requirements[J]. *PLoS One*, 2011, 6(7): e22879.
- [27] FU H W, XU J H, CHEN J, et al. Microarray analysis reveals Tmub1 as a cell cycle-associated protein in rat hepatocytes[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2018, 17(3): 4337-4344.
- [28] CALDAS H, JIANG Y Y, HOLLOWAY M P, et al. Survivin splice variants regulate the balance between proliferation and cell death[J]. *Oncogene*, 2005, 24(12): 1994-2007.
- [29] WANG M J, ZHANG H L, CHEN F, et al. The double-edged effects of IL-6 in liver regeneration, aging, inflammation, and diseases[J]. *Experimental Hematology and Oncology*, 2024, 13(1): 62.
- [30] GAO B, WANG H, LAFDIL F, et al. STAT proteins-key regulators of anti-viral responses, inflammation, and tumorigenesis in the liver[J]. *Journal of Hepatology*, 2012, 57(2): 430-441.
- [31] WELTE T, ZHANG S S M, WANG T, et al. STAT3 deletion during hematopoiesis causes Crohn's disease-like pathogenesis and lethality: a critical role of STAT3 in innate immunity[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 2003, 100(4): 1879-1884.
- [32] BRENNER C, GALLUZZI L, KEPP O, et al. Decoding cell death signals in liver inflammation[J]. *Journal of Hepatology*, 2013, 59(3): 583-594.

(责任编辑:刘庆松)