DOI:10.13210/j.cnki.jhmu.20250221.005
网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/46.1049.R.20250221.1201.010

基于Nrf2/SLC7A11/GPX4通路调控铁死亡探讨黄连厚朴汤对溃疡性结肠炎模型小鼠的影响

高猎防,马俊远,郑梦晓,谷 娟,李 静,胡晓凤,刘 晨,李琛祺,刘家宝,牛美兰✉
(黄河科技学院,河南 郑州 450063)

[摘要] **目的**:基于核因子E2相关性因子2(Nrf2)/胱氨酸/谷氨酸逆向转运蛋白溶质载体家族7成员11(SLC7A11)/谷胱甘肽过氧化酶4(GPX4)通路观察黄连厚朴汤(Huanglian Houpo Decoction,HLHPD)对溃疡性结肠炎(UC)模型小鼠的影响,并探讨其可能的作用机制。**方法**:将60只小鼠随机分为6组:空白对照组、葡聚糖硫酸钠盐(DSS)模型组、西药柳氮磺吡啶组(西药组)以及黄连厚朴汤低(HLHPD-L组)、中(HLHPD-M组)、高(HLHPD-H组)剂量组,每组10只,除空白组外,采用DSS建立UC模型。造模成功后,除空白组和模型组灌胃等体积蒸馏水外,HLHPD-L组、HLHPD-M组、HLHPD-H组及西药组分别给予相应剂量黄连厚朴汤和柳氮磺吡啶(4 g/kg)药液灌胃,每天1次,连续给药14 d。观察小鼠一般情况、疾病活动指数;酶联免疫吸附实验检测各组小鼠血清白细胞介素IL-6、IL-1β及肿瘤坏死因子TNF-α含量;试剂盒检测结肠组织中MDA、SOD、GSH的含量;通过H&E染色观察各组小鼠结肠组织病理变化;透射电子显微镜观察小鼠结肠组织超微结构;采用Western Blot检测小鼠结肠组织Nrf2、SLC7A11、GPX4蛋白表达情况。**结果**:与空白对照组比较,DSS组小鼠疾病活动指数评分,血清中促炎症细胞因子IL-6、IL-1β和TNF-α的表达水平,以及结肠组织中MDA水平显著上调,SOD、GSH水平明显降低($P<0.01$);各药物干预组上述炎症因子水平较DSS组降低($P<0.01$),HLHPD中剂量组和高剂量组组织中MDA水平降低($P<0.01$),SOD和GSH水平升高($P<0.05$);H&E染色结果显示,HLHPD可有效改善组织病理学损伤,减少组织坏死深度和范围;透射电镜结果显示,HLHPD各组肠黏膜、微绒毛及桥粒结构,以及肠上皮细胞间连接明显恢复;Western blot结果显示,DSS组小鼠结肠组织中Nrf2、GPX4、SLC7A11蛋白表达较空白对照组显著降低($P<0.01$);与DSS组比较,给黄连厚朴汤后,各剂量组Nrf2、GPX4、SLC7A11蛋白表达显著升高($P<0.01$)。**结论**:HLHPD可有效改善UC的炎症损伤,其作用机制可能与调控Nrf2/SLC7A11/GPX4通路介导的铁死亡有关。

[关键词] 黄连厚朴汤;溃疡性结肠炎;铁死亡;Nrf2/SLC7A11/GPX4信号通路
[中图分类号] R285.5 [文献标志码] A [文章编号] 2097-5953(2025)21-1630-09

Effect of Huanglian Houpo Decoction on mice with ulcerative colitis based on Nrf2/SLC7A11/GPX4 signal pathway in mediated ferroptosis

GAO Liefang, MA Junyuan, ZHENG Mengxiao, GU Juan, LI Jing, HU Xiaofeng, LIU Chen, LI Chenqi, LIU Jiabao, NIU Meilan✉
(*Huanghe Science and Technology University*, *Zhengzhou* 450063, *China*)

[*Foundation Project*]: *This study was supported by the Henan Province Medical Science and Technology Research Program (Joint Construction) Project* (*LHGJ*20190273); *National College Students' Innovation and Entrepreneurship Training Program Project* (202111834031); *College Students' Innovation and Entrepreneurship Training Program* (2023*xscxcy*084)

[*Author*]:*GAO Liefang*, *E-mail*:*gaoliefang*@163.*com*.
[*Correspondence to*]:*NIU Meilan*, *Professor*, *E-mail*:809870346@*qq.com*.

Received: 2024-11-15 *Revised*: 2025-01-28 *JHMU*, 2025;31(21):1630-1638

[基金项目] 河南省医学科技攻关计划(联合共建)项目(LHGJ20190273);国家级大学生创新创业训练计划项目(202111834031);大学生创新创业训练项目(2023xscxcy084)

[作者简介] 高猎防,E-mail:gaoliefang@163.com。
[通讯作者] 牛美兰,教授,E-mail:809870346@qq.com。

[收稿日期] 2024-11-15 [修回日期] 2025-01-28 网络出版时间:2025-02-21 14:51:34

View from specialist: It is creative, and of certain scientific and educational value.

[Abstract] **Objective**: To observe the effects of Huanglian Houpo Decoction (HLHPD) on ulcerative colitis (UC) model mice based on the nuclear factor E2-associated factor 2 (Nrf2)/Cystine/Glutamate reverse transporter solute carrier family 7 member 11 (SLC7A11)/glutathione peroxidase 4 (GPX4) pathway, and to explore its possible mechanism of action. **Methods**: A total of 60 mice were randomly divided into 6 groups: the blank group, the model group (DSS group), the Western medicine Sulfasalazine group, the low-dose, medium-dose and high-dose HLHPD groups (HLHPD-L, HLHPD-M, and HLHPD-H), with 10 mice in each group. The UC model was established using dextran sulfate sodium salt (DSS) except the blank group. After the UC moldel was established, except for the blank group and the model group, which were administered equal volumes of distilled water *via* gavage, the HLHPD-L, HLHPD-M, HLHPD-H, and Western medicine groups (4 g/kg) were given the respective doses of the HLHPD and drug by gavage once a day for 14 consecutive days. The general conditions and disease activity index of mice were observed. The concentrations of serum cytokines, including IL-6, IL-1β, and TNF-α, were quantified using enzyme-linked immunosorbent assay kits. The levels of MDA, SOD, and GSH were quantitatively analyzed in colonic tissue samples using standardized biochemical assays. Histopathological alterations in colonic tissues were observed through hematoxylin-eosin (H&E) staining. Furthermore, transmission electron microscopy was utilized to examine the ultrastructural characteristics of colonic specimens. The protein levels of Nrf2, SLC7A11 and GPX4 in the colon tissue of mice was detected by Western Blot. **Results**: Compared to the blank group, the disease activity index, the serum levels of IL-6, IL-1β and TNF-α, and MDA in colon tissue were significantly increased in the DSS group, while SOD and GSH contents were significantly decreased ($P<0.01$). Compared to the DSS group, the serum levels of IL-6, IL-1β and TNF-α in each drug intervention groups were decreased ($P<0.01$), the MDA levels in colon tissue of the HLHPD-M and HLHPD-H were decreased ($P<0.01$), while the SOD and GSH levels were increased ($P<0.05$). H&E staining results showed that HLHPD could effectively improve the histopathological damage and reduce the depth and range of tissue necrosis. Transmission electron microscope results showed that the structure of intestinal mucosa, microvilli, desmosome, and the connections of intestinal epithelial cells recovered obviously. Western blot results revealed a statistically significant downregulation ($P<0.01$) in the protein expression levels of Nrf2, SLC7A11, and GPX4 in the DSS group when compared to the blank group. The protein expression levels of Nrf2, GPX4 and SLC7A11 in each group were significantly increased after administration of HLHPD ($P<0.01$) when compared to the DSS group. **Conclusion**: HLHPD can effectively improve the inflammatory injury of UC, and its mechanism may be related to the regulation of ferroptosis mediated by the Nrf2/SLC7A11/GPX4 pathway.

[Key words] Huanglian Houpo Decoction; Ulcerative colitis; Ferroptosis; Nrf2/SLC7A11/GPX4 signaling pathway

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis,UC),是一种慢性非特异性炎症性肠病,其病变部位主要在结直肠黏膜和黏膜下层,主要特征为结直肠黏膜连续性、弥漫性炎症改变[1]。临床症状为持续或反复发作的腹泻、黏液脓血便、腹痛及里急后重等,严重者还可伴随体质量下降、发烧、心动过速、乏力,甚至恶心和呕吐等全身性症状[2]。目前,UC已经成为一种全球性疾病。据统计,在过去的10年中,北美和欧洲有超过150万和200万人患有UC,在我国UC的发病率持续增加,且其发病机制尚不明确,这意味着UC的治疗将对世界各地的卫生系统构成巨大挑战[3]。

在中医的传统理论体系中,并未明确包含与UC相对应的概念,但根据其临床表现和病理特点,可将UC归属于中医的“痢疾”“肠澼”“滞下”(A01.03.19)等疾病范畴,与饮食不洁,感染湿热或寒湿疫毒,积滞肠间,阻遏气机,损伤肠络有关。活动期与缓解期交替发生为主的UC属中医学“休息痢”(A01.03.19.05)范畴;慢性持续性UC属“久痢”的范畴;缓解期仅表现为大便溏薄、次数增多时,则可归属于“泄泻”(A04.03.07)范畴[4]。黄连厚朴汤(Huanglian Houpo Decoction,HLHPD)出自《普济方》卷一三三引《德生堂方》,主治伤寒,发热烦渴,大便自利,日夜不止,由黄连3钱、厚朴2钱组成,二者配伍,辛开苦降,温药燥湿、行气降逆,寒药清热解毒,共同发挥清热燥湿、开泄中焦的作用[5,6]。然而其作用机制并不明确。

铁死亡是一种新型程序性细胞死亡形式,由铁依赖性脂质过氧化驱动,受多种代谢途径调控,包括铁代谢、氧化还原稳态、线粒体活性、氨基酸、脂质和糖的代谢、多不饱和脂肪酸等,已被证明参与感染性疾病、肿瘤、癌症、自身免疫性疾病、中枢神经退行性疾病、缺血再灌注损伤、血液疾病及炎性疾病等[7]。有多项研究认为[8,9],核因子E2相关性因子2(Nrf2)/胱氨酸/谷氨酸逆向转运蛋白溶质载体家族7成员11(SLC7A11)/谷胱甘肽过氧化酶4(GPX4)-铁死亡通路异常与炎症的发生、发展密切相关,激活Nrf2/SLC7A11/GPX4-铁死亡通路,可以促进氧化还原平衡恢复,降低炎症因子水平,抑制过度炎症。但是明确黄连厚朴汤可以通过调控

铁死亡对溃疡性结肠炎产生作用有待研究。因此，本研究从铁死亡的角度，探讨黄连厚朴汤通调控Nrf2/SLC7A11/GPX4信号通路对UC模型小鼠的影响及分子机制，为传统中医药经典方剂的研究及临床应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物

60只SPF级健康雄性小鼠（6～8周龄，体质量18～20 g），由河南省实验动物中心提供，动物许可证号SCXK（豫）2022-0001。温度（22±1）℃，相对湿度（45±10）%，12 h/12 h明暗交替生活环境，所有小鼠在适应环境1周后开始实验。本实验方案经黄河科技学院实验动物伦理委员会批准，符合动物伦理委员会规定，伦理审查编号：2024-011。

1.2 药品与试剂

黄连购自宿迁御草庄有限公司，厚朴购自徐州康巴晓草中药材种植有限公司，并由郑州市中医院药剂科闫沛沛主管中药师鉴定符合2020年版《中华人民共和国药典》规定；柳氮磺吡啶肠溶片（山西同达药业有限公司，批号：231101，0.25 g/片）；葡聚糖硫酸钠盐（dextran sulfate sodium salt，DSS）（天津佰玛科技有限公司，批号：0216011010）；10%水合氯醛（上海易恩化学技术有限公司，批号：R163506）；白细胞介素IL-6（interleukin-6，IL-6）检测试剂盒（上海信裕生物科技有限公司，批号：20239423）；小鼠IL-1β（interleukin-1β，IL-1β）检测试剂盒（Abcam，批号：ab214025）；丙二醛（MDA）、谷胱甘肽（GSH）检测试剂盒（Aladdin，批号分别为C2412252，R486204）；超氧化物歧化酶（SOD）检测试剂盒（Sigma，批号：19160）；肿瘤坏死因子-α（tumor necrosis factor-α，TNF-α）检测试剂盒（上海润裕生物科技有限公司，批号：20238627）；核红细胞2相关因子2（Nrf2）抗体、溶质载体家族7成员11（SLC7A11）抗体、谷胱甘肽过氧化物酶4（GPX4）抗体、β-肌动蛋白（β-actin）抗体（Abcam，批号分别为ab31163、ab307601、ab252833、ab8224）。

1.3 仪器

Secura125-1CN电子天平（德国赛多利斯公司）；Eclipse Ci-L显微镜（Nikon）；Rotofix 32A台式离心机（德国Hettich公司）；Power Snap电泳仪，iBright CL1500成像系统（Thermo Fisher公司）；RM2245石蜡切片机（德国Leica公司）；HT7800透射电子显微镜（HITACHI公司）。

1.4 黄连厚朴汤的制备

依据原方配比，将黄连与厚朴饮片按3∶2混合，置于20倍超纯水中浸泡1 h，待药物充分浸泡后，武火煮沸，文火煎煮1 h，消毒纱布过滤。收集滤渣，向滤渣中加入10倍量超纯水，继续煎煮1 h，再次过滤。将2次过滤后的液体混合，60 ℃下减压浓缩至1 g/mL，保存在4 ℃冰箱，以获得黄连厚朴汤煎剂。结合预实验结果，根据小鼠与人体表面积比换算，确定以1.50、3.00、6.00 g/kg 3个剂量进行研究。

1.5 分组与造模

60只小鼠随机分为6组：空白对照组、DSS模型组、西药柳氮磺吡啶组（西药组）、黄连厚朴汤低剂量组、黄连厚朴汤中剂量组、黄连厚朴汤高剂量组，每组10只。空白组小鼠给予自由饮用蒸馏水，其他组自由饮用3%DSS溶液，连续给药10 d，隔天更换新鲜DSS溶液。

1.6 干预措施

空白组和模型组灌胃蒸馏水，西药组灌胃柳氮磺吡啶混悬液0.4 g/kg，黄连厚朴汤低、中、高剂量组分别给予1.50、3.00、6.00 g/kg灌胃，每天1次，连续给药14 d。

1.7 标本制备与采集

末次给药后禁食24 h，以10%水合氯醛溶液腹腔注射麻醉小鼠，腹主动脉采集血液标本，于室温下离心15 min（速度3 500 r/min，离心半径为10 cm），分离血清；取血后立即取小鼠结肠组织，并用生理盐水冲洗肠腔，切取适量组织分别用4%多聚甲醛溶液和电镜固定液固定，其余组织冷冻（－80 ℃）保存，用于后续分析。

1.8 疾病活动指数评估

观察记录各组小鼠的精神状况、毛发状态、活动情况、进食情况以及粪便性状等。评估小鼠疾病活动指数（disease activity index，DAI），评估指标包括体质量下降百分比、粪便性状、便血情况[10]。体质量下降评分：体质量未下降计0分；1%～5%体质量下降计1分；5%～10%体质量下降计2分；10%～20%体质量下降计3分；超过20%体质量下降计4分。粪便性状评分：正常颗粒状粪便计0分；成形但具黏附性粪便计1分；半成形粪便计2分；介于半成形和水样腹泻之间粪便计3分；呈水样腹泻计4分。便血程度评分：粪便潜血阴性，0分；粪便潜血阳性（＋），1分；粪便潜血强阳性（＋＋），2分；便血弱阳性（＋），3分；便血强阳性（＋＋），4分。DAI评分为体质量变化百分比评分、粪便性状评分、便血程度评分3项之和。

1.9 酶联免疫吸附（ELISA）法检测小鼠血清IL-6、

IL-1β、TNF-α的水平

将储存在－80 ℃的小鼠血清取出，室温下解冻，根据试剂盒说明书检测血清中IL-6、IL-1β和TNF-α水平，进行定量分析。

1.10 小鼠结肠组织氧化应激指标水平测定

将储存在－80 ℃的小鼠结肠组织取出，准确称重、剪碎、低温制成匀浆，于4 ℃离心机10 000 r/min离心15 min，取上清，按照试剂盒说明书要求，测定SOD、MDA、GSH水平。

1.11 结肠组织病理学检查

将结肠组织固定、脱水、石蜡包埋，切片用于后续染色分析；采用苏木素-伊红染色，封片，显微镜镜检及图像采集分析。

1.12 结肠黏膜结构透射电镜分析

将结肠组织置于电镜固定液中固定、脱水、包埋，制成60～70 nm超薄切片，用透射电镜观察肠黏膜组织结构。

1.13 Western blot检测小鼠结肠组织中Nrf2、SLC7A11、GPX4蛋白的表达

提取各组结肠组织蛋白，经电泳分离、转膜、封闭后，分别加入相应一抗：Nrf2、SLC7A11、GPX4、β-actin，4 ℃孵育过夜，加入二抗，孵育2 h。采用化学发光液法监测蛋白表达，通过ImageJ软件进行分析。

1.14 统计学处理

使用SPSS26.0统计软件进行统计分析，单因素方差分析进行多组间差异比较，计量资料采用均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，$P<0.05$为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 一般状态和DAI评分

空白对照组小鼠毛发顺滑，光泽鲜亮，活泼好动，进食量稳定，尿色及大便色正常；模型组小鼠毛发色泽暗淡，活动减少，蜷曲紧缩，体质量显著减轻，尿量减少，稀便，肛周污秽，上述症状随着时间延长加重，并出现便血。给予柳氮磺吡啶和各剂量黄连厚朴汤药物干预后，上述病症有所好转。治疗结束后，与空白组比较，模型对照组DAI评分显著提高（$P<0.01$）；黄连厚朴汤中、高剂量组DAI评分明显低于模型对照组（$P<0.01$），其中高剂量组DAI评分最低；与西药柳氮磺吡啶组比较，黄连厚朴汤各剂量组DAI评分升高（$P<0.05$，$P<0.01$）。见表1。

表1 各组小鼠DAI比较（n=6，$\bar{x}\pm s$）

Tab 1 Comparison of DAI in each group（n=6，$\bar{x}\pm s$）

组别	DAI
空白组	0.00±0.00
模型组	$10.50\pm1.87^{**}$
西药组	$3.00\pm1.67^{\#\#}$
黄连厚朴汤低剂量组	$7.83\pm1.72^{\#\#\triangle\triangle}$
黄连厚朴汤中剂量组	$5.67\pm1.63^{\#\#\triangle\triangle}$
黄连厚朴汤高剂量组	$4.83\pm1.17^{\#\#\triangle}$
F	36.373
P	<0.001

注：与空白组相比，$^{**}P<0.01$；与模型组相比，$^{\#\#}P<0.01$；与西药组相比，$^{\triangle}P<0.05$，$^{\triangle\triangle}P<0.01$。

2.2 各组对小鼠血清IL-6、IL-1β、TNF-α水平的比较

与空白对照组比较，模型组小鼠血清中促炎症细胞因子IL-6、IL-1β和TNF-α的表达水平显著上调（$P<0.01$）；药物干预后，西药组上述炎症因子水平较模型组降低（$P<0.01$），黄连厚朴汤各剂量组小鼠上述3个促炎症细胞因子水平不同程度降低（$P<0.01$），黄连厚朴汤3个剂量组中以高剂量组IL-6、IL-1β和TNF-α的水平最低；与西药柳氮磺吡啶组比较，黄连厚朴汤各剂量组IL-1β、TNF-α水平及低、中剂量组1L-6水平升高（$P<0.01$），黄连厚朴汤高剂量组1L-6水平无显著差异（$P>0.05$）。见表2。

表2 各组小鼠血清1L-1β、1L-6、TNF-α水平的比较（pg/mL，n=6，$\bar{x}\pm s$）

Tab 2 Comparison of serum interleukin 1L-1β, 1L-6, and TNF-α in each group（pg/mL，n=6，$\bar{x}\pm s$）

组别	1L-1β	1L-6	TNF-α
空白组	7.77±1.22	8.52±0.82	9.06±0.67
模型组	$36.79\pm1.83^{**}$	$29.39\pm3.88^{**}$	$28.01\pm3.02^{**}$
西药组	$20.47\pm2.14^{\#\#}$	$18.52\pm1.52^{\#\#}$	$19.07\pm1.76^{\#\#}$
黄连厚朴汤低剂量组	$28.00\pm1.09^{\#\#\triangle\triangle}$	$24.40\pm2.04^{\#\#\triangle\triangle}$	$26.95\pm2.92^{\triangle\triangle}$
黄连厚朴汤中剂量组	$25.29\pm2.73^{\#\#\triangle\triangle}$	$21.72\pm2.21^{\#\#\triangle}$	$24.12\pm2.78^{\#\#\triangle\triangle}$
黄连厚朴汤高剂量组	$24.73\pm1.61^{\#\#\triangle\triangle}$	$20.91\pm2.36^{\#\#}$	$22.92\pm2.23^{\#\#\triangle\triangle}$
F	159.632	53.646	51.385
P	<0.001	<0.001	<0.001

注：与空白组相比，$^{**}P<0.01$；与模型组相比，$^{\#\#}P<0.01$；与西药组相比，$^{\triangle}P<0.05$，$^{\triangle\triangle}P<0.01$。

2.3　各组小鼠SOD、MDA、GSH水平的比较

与空白组比较，模型组小鼠MDA水平明显升高，SOD、GSH水平明显降低（$P<0.01$）；与模型组比较，不同剂量黄连厚朴汤均UC小鼠结肠组织中的MDA水平下降和SOD、GSH水平升高，其中，中剂量组和高剂量组MDA水平显著低于模型组（$P<0.01$），SOD和GSH水平高于模型组（$P<0.05$或$P<0.01$）；与西药组对比，黄连厚朴汤中、高剂量组MDA、SOD水平及高剂量组GSH水平差异无统计学意义（$P>0.05$），黄连厚朴汤低剂量组MDA、SOD、GSH水平及中剂量组GSH水平差异有统计学意义（$P<0.05$）。见表3。

表3　各组小鼠MDA、SOD、GSH水平的比较（n=6，$\bar{x}\pm s$）

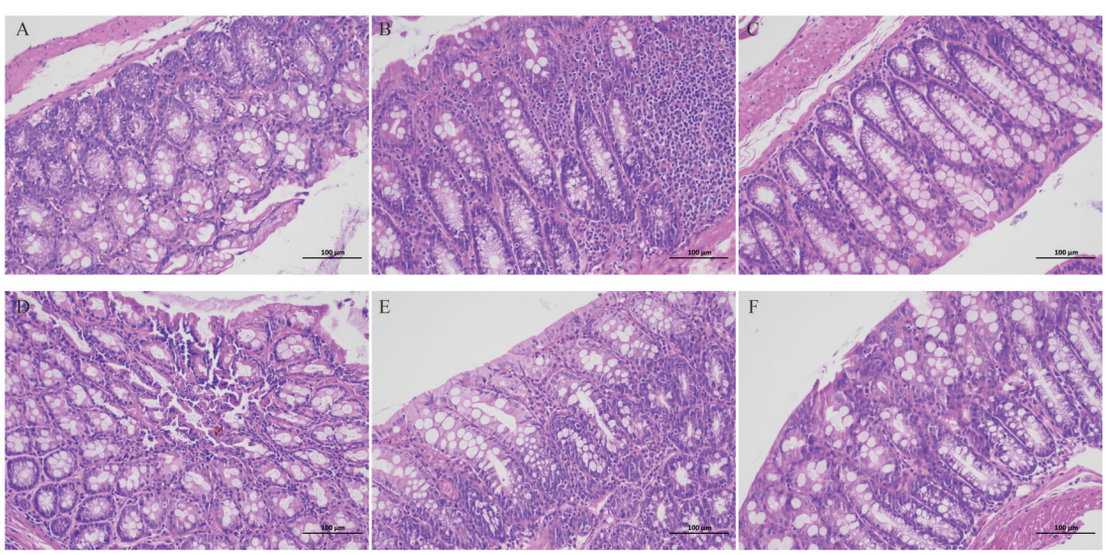
Tab 3 Comparison of MDA, SOD, and GSH activity levels of mice in each group（n=6，$\bar{x}\pm s$）

组别	MDA(nmol/mgprot)	SOD(U/mgprot)	GSH(μmol/gprot)
空白组	3.10±0.48	18.62±1.01	9.40±1.58
模型组	$7.58\pm1.33^{**}$	$11.32\pm1.73^{**}$	$4.36\pm1.37^{**}$
西药组	$4.52\pm0.88^{*\#\#}$	$15.09\pm2.20^{**\#\#}$	$7.90\pm1.09^{*\#\#}$
黄连厚朴汤低剂量组	$6.32\pm0.43^{**\#\triangle\triangle}$	$12.53\pm2.25^{**\triangle}$	$5.41\pm0.98^{**\triangle\triangle}$
黄连厚朴汤中剂量组	$5.55\pm1.15^{**\#\#}$	$13.85\pm2.22^{**\#}$	$6.34\pm0.95^{**\#\#\triangle}$
黄连厚朴汤高剂量组	$5.22\pm1.22^{**\#\#}$	$14.44\pm2.93^{**\#}$	$6.71\pm0.87^{**\#\#}$
F	14.65	8.275	14.076
P	<0.001	<0.001	<0.001

注：与空白组相比，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$；与模型组相比，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$；与西药组相比，$^{\triangle}P<0.05$，$^{\triangle\triangle}P<0.01$。

2.4　结肠组织病理形态的改变

空白对照组结肠组织病理学检查显示，结肠黏膜结构完整，腺体排列规整，未见炎性细胞浸润及水肿；模型组呈现大量淋巴细胞浸润，炎性细胞浸润至黏膜下层，肌层可见肌纤维水样变性，细胞肿胀，胞质疏松淡染；与模型组比较，西药组和黄连厚朴汤低、中、高剂量组可见结肠组织充血程度、腺体破坏程度、炎性细胞浸润程度等均有所减轻，显著改善UC小鼠结肠组织结构。黄连厚朴汤3个剂量组中高剂量组改善效果更为明显。见图1。



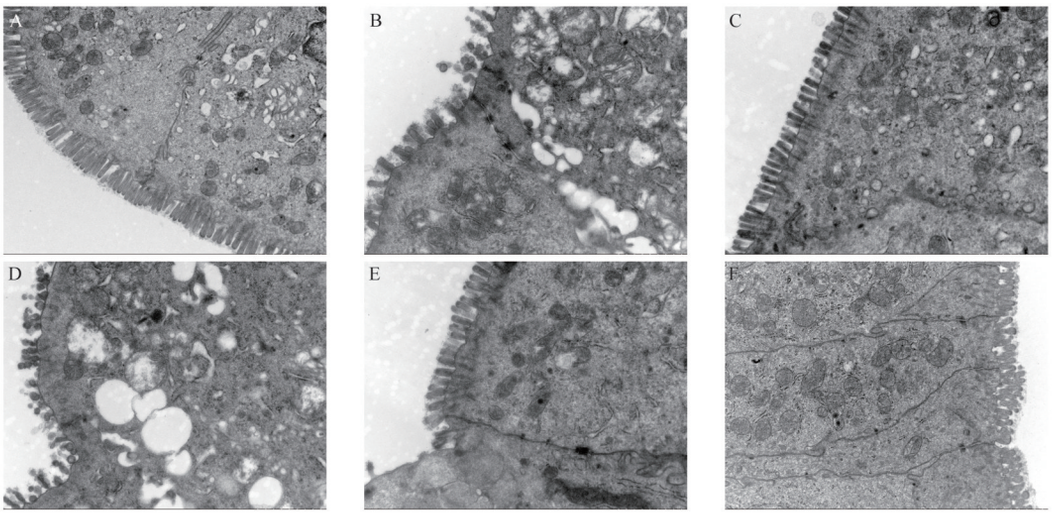
A：空白组；B：模型组；C：西药组；D：黄连厚朴汤低剂量组；E：黄连厚朴汤中剂量组；F：黄连厚朴汤高剂量组

图1　黄连厚朴汤对小鼠结肠组织病理形态的影响（H&E染色，×200）

Fig 1　Effects of HLHPD on colon tissue morphology of mice（H&E staining，×200）

2.5　结肠组织结构观察

空白对照组肠上皮细胞排列整齐、紧密，表面绒毛结构完整、排列整齐，上皮间紧密连接，细胞桥粒结构清晰；模型组肠上皮细胞表面绒毛稀疏、脱落、肿胀，上皮细胞间紧密连接结构松散，桥粒结构消失；与模型组比较，西药组和黄连厚朴汤低、中、高剂量组上皮细胞表面微绒毛排列、细胞间紧密连接结构和细胞桥粒结构均有不同程度的恢复。黄连厚朴汤3个剂量组中高剂量组改善效果更为明显。见图2。



A：空白组；B：. 模型组；C：西药组；D：黄连厚朴汤低剂量组；E：黄连厚朴汤中剂量组；F：. 黄连厚朴汤高剂量组

图2　黄连厚朴汤对小鼠结肠组织结构的影响（透射电镜，×15 000）

Fig 2　Effects of HLHPD on colon tissue structure of mice (Transmission electron microscopy, ×15 000)

2.6　各组小鼠结肠组织Nrf2、SLC7A11、GPX4蛋白表达的比较

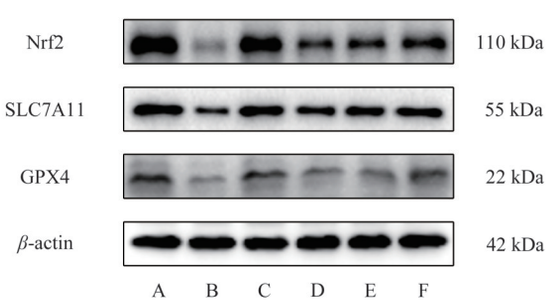
与空白组比较，模型组小鼠结肠组织中Nrf2、SLC7A11、GPX4蛋白表达显著降低（$P<0.01$）；给黄连厚朴汤后，各剂量组上述蛋白表达较模型组显著升高（$P<0.05$）；与西药组比较，黄连厚朴汤各剂量组SLC7A11蛋白表达降低（$P<0.05$），低、中剂量组Nrf2、GPX4蛋白表达降低（$P<0.05$），高剂量组无显著差异（$P>0.05$）。见表4、图3。

表4　各组小鼠结肠组织Nrf2、SLC7A11、GPX4蛋白表达的比较（n=3，$\bar{x}\pm s$）

Tab 4 Comparison of Nrf2, SLC7A11, and GPX4 protein expressions in colon tissues of each group (n=3, $\bar{x}\pm s$)

组别	Nrf2/β-actin	SLC7A11/β-actin	GPX4/β-actin
空白组	1.06±0.18	1.17±0.05	1.03±0.04
模型组	0.29±0.07**	0.47±0.06**	0.23±0.12**
西药组	0.92±0.13$^{\#\#}$	1.02±0.12$^{\#\#}$	0.91±0.08$^{\#\#}$
黄连厚朴汤低剂量组	0.57±0.24$^{\triangle}$	0.69±0.03$^{\#\#\triangle\triangle}$	0.59±0.15$^{\#\#\triangle\triangle}$
黄连厚朴汤中剂量组	0.60±0.24$^{\#\triangle}$	0.81±0.05$^{\#\#\triangle\triangle}$	0.65±0.14$^{\#\#\triangle}$
黄连厚朴汤高剂量组	0.74±0.02$^{\#\#}$	0.85±0.06$^{\#\#\triangle}$	0.85±0.11$^{\#\#}$
F	7.983	38.481	18.669
P	0.002	<0.001	<0.001

注：与空白组相比，$^{**}P<0.01$；与模型组相比，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$；与西药组相比，$^{\triangle}P<0.05$，$^{\triangle\triangle}P<0.01$。



A：空白组；B：模型组；C：西药组；D：黄连厚朴汤低剂量组；E：黄连厚朴汤中剂量组；F：黄连厚朴汤高剂量组

图3　黄连厚朴汤对UC小鼠结肠组织Nrf2、SLC7A11、GPX4蛋白表达的影响

Fig 3　Effects of HLHPD on expressions of Nrf2, SLC7A11, and GPX4 proteins in colon of UC mice

3　讨论

UC作为一种全球性的难治性疾病，其在中国国内的发病率正逐年攀升，成了一个不容忽视的健康问题[11]。相较非UC人群，长期的结肠炎症反应导致全身性炎症反应或结肠炎性肿瘤的风险更高，其罹患结直肠癌的概率可达未患病者的2.4倍[12]。目前，溃疡性结肠炎的临床治疗方案主要包含以下几种药物：5-氨基水杨酸类、糖皮质激素以及免疫抑制剂等，其中柳氮磺吡啶和美沙拉嗪为指南一线用药[13]。然而，这些治疗方法虽在一定程度上缓解了病情，却也伴随着诸多挑战，如治疗效果的不稳定性、停药后易复发、副作用大以及耐药性的增加，这些均在一定程度上限制了其临床应用的广泛性和

持久性[14]。因此，探索更为有效、安全且可持续的治疗方案，对于改善UC患者的生存质量具有重要意义。中医药凭借其独特的优势在临床实践中积淀了深厚的经验基础，并得到了广泛的临床验证与认可[15]。黄连厚朴汤由黄连、厚朴两味中药组成，方中厚朴为君药，性温，味苦、辛；黄连为臣药，性寒，味苦；二者相互调和、佐制，是治疗寒热错杂的胃肠病症经典方剂[16]。

UC是一种慢性非特异性肠道炎症性疾病，炎症细胞因子的释放和中性粒细胞的分泌构成了其关键特征，也是临床评估的重要指标[17]。DSS诱导的结肠炎小鼠模型，因其与人类UC在临床及组织学特征上的高度一致性，且操作简单、成功率高、小鼠死亡率低，是研究UC的理想模型，因此本研究采用3%DSS建立UC小鼠模型[18,19]。陈迎春等[20]研究发现，UC患者血清促炎细胞因子TNF-α、IL-6、IL-1β水平均升高，且不同分期患者血清TNF-α、IL-6、IL-1β水平有显著差异。本研究结果显示，模型组UC小鼠血清中促炎细胞因子IL-6、IL-1β、TNF-α含量较空白组明显增高，给予黄连厚朴汤后，血清IL-6、IL-1β和TNF-α含量均明显降低。组织病理学研究结果显示，模型组结肠组织可见大量淋巴细胞浸润，炎性细胞浸润至黏膜下层，肌层可见肌纤维水样变性，细胞肿胀，胞质疏松淡染，表明造模成功。通过对比小鼠一般状态、DAI评分、H&E染色和透射电镜结果，可以得出黄连厚朴汤可改善UC小鼠体重减轻、腹泻、便血以及结肠病理损伤，且以高剂量组改善效果最为明显。氧化应激是机体内活性氧与内源性抗氧化系统失衡，当活性氧积聚，内源性抗氧防御机制无法及时清除时，会加剧脂质过氧化反应，甚至导致细胞死亡等[21]。SOD可清除机体超氧化物阴离子，具有抗氧化作用，含量降低会导致自由基积累；MDA是质子过氧化的最终产物，其水平可间接反映机体氧化应激程度；GSH是重要的非酶抗氧化剂，不仅可抵御氧化应激，还参与到细胞增殖、凋亡以及免疫调节等多种生理过程；SOD、MDA和GSH作为炎症与氧化应激生物标志物，对评估UC炎症程度和氧化应激水平意义重大[22]。本研究表明黄连厚朴汤可调节氧化因子和抗氧化因子平衡，抑制氧化应激反应，有效拮抗UC的发生和发展。

铁死亡，作为一种特殊的细胞死亡机制，属于代谢性细胞死亡的范畴，其特征在于对铁元素的依赖性以及脂质过氧化损伤的累积[23]。铁死亡在2012年首次提出，鉴于其在多种疾病病理过程中的关键作用，以及作为疾病治疗潜在靶点的潜力，已经迅速成为科学研究的热点[24,25]。多项研究成果表明，铁死亡与UC的发生密切相关。Carrier等[26]研究证明，DSS诱导的溃疡性结肠炎大鼠摄入过量的铁剂会加重炎症评分，促进氧化应激和中性粒细胞浸润，其作用机制与激活核因子-κB信号通路有关。陈洁玲等[27]研究发现，在UC患者肠黏膜组织中的GPX4蛋白含量降低，通过抑制氧化应激、减轻铁死亡可有效促进黏膜愈合，改善溃疡性结肠炎，提高临床疗效。

研究表明，Nrf2/SLC7A11/GPX4信号通路在铁死亡的调控中扮演着至关重要的角色[28,29]。Nrf2是铁死亡调控中的关键因子，位于多个关键基因的上游，参与细胞内抗氧化反应、铁代谢、蛋白质稳态等过程，其下游靶基因包括*SLC7A11*和*GPX4*，这两个基因在维持细胞氧化还原稳态中发挥重要作用[30-33]。GPX4作为一种抗氧化防御酶，能清除生物膜中的脂质过氧化物，防止铁死亡的发生；SLC7A11在调节细胞氧化还原和铁稳态中具有关键功能，其表达降低可能导致铁死亡[34,35]。Nrf2的过表达可促进谷胱甘肽的生物合成，增加*SLC7A11*、*GPX4*和其他抗氧化基因的表达；谷胱甘肽的消耗会促使GPX4将过氧化脂质的过氧键转变为羟基，导致脂质过氧化物积累，进而引起GPX4失活[36]。值得注意的是，Xu等[37]研究发现，在UC患者和DSS诱导的UC小鼠的结肠组织中，均观察到了铁死亡的典型特征性改变，包括铁死亡的生物标志物前列腺素内过氧化物合酶2增加、GPX4减少、丙二醛水平的升高以及线粒体结构的典型破坏等。本研究结果显示，UC模型组小鼠的结肠组织中Nrf2、SLC7A11、GPX4蛋白表达较空白对照组显著降低；不同浓度黄连厚朴汤干预后，各中药药物组结肠组织中Nrf2、GPX4、SLC7A11蛋白表达升高，且以高剂量组效果显著，表明黄连厚朴汤可影响UC中铁死亡相关指标的表达。

综上所述，黄连厚朴汤能够改善UC大鼠炎症反应，促进结肠黏膜恢复，其作用机制可能与抑制铁死亡，调节Nrf2/SLC7A11/GPX4信号通路有关。

作者贡献度说明：

高猎防：设计实验、论文撰写；马俊远、郑梦晓：查阅文献、资料收集；谷娟、李静、胡晓凤：实验操作；刘晨、李琛祺、刘家宝：数据整理，统计分析；牛美兰：项目指导。

所有作者声明不存在利益冲突关系。

参考文献

1 Zong Y, Meng J, Mao T, et al. Repairing the intestinal mucosal barrier of traditional Chinese medicine for ulcerative colitis: A review[J]. Front Pharmacol, 2023, 14: 1273407.

2 Jadhav A, Jagtap S, Vyavahare S, et al. Reviewing the potential of probiotics, prebiotics and synbiotics: Advancements in treatment of ulcerative colitis[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2023, 13: 1268041.

3 Guo M, Wang X. Pathological mechanism and targeted drugs of ulcerative colitis: A review[J]. Medicine (Baltimore), 2023, 102(37): e35020.

4 中国中西医结合学会.溃疡性结肠炎中西医结合诊疗专家共识[J].中国中西医结合杂志, 2023, 43(1): 5-11.
Chinese Association of Integrative Medicine. Experts consensus on diagnosis and treatment of ulcerative colitis by integrative medicine[J]. Chin J Integr Tradit West Med, 2023, 43(1): 5-11.

5 葛美娜, 班光国, 朱小静, 等.吕志杰教授求索《神农本草经》与经方对厚朴的发挥运用[J].河北中医药学报, 2024, 39(3): 66-68.
Ge MN, Ban GG, Zhu XJ, et al. Professor Lv ZJ explored the use of Houpo in *Shennong's Classic of Materia Medica* [J]. J Hebei Tradit Chin Med Pharmacol, 2024, 39(3): 66-68.

6 钟耀欣.解读《神农本草经》[J].开卷有益—求医问药, 2015, (4): 48-49.
Zhong YX. Tnterpretation of *Shennong's Classic of Materia Medica*[J]. J Benefic Readings Drug Inf Med Advices, 2015, (4): 48-49.

7 Jiang X, Stockwell BR, Conrad M. Ferroptosis: Mechanisms, biology and role in disease[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2021, 22(4): 266-282.

8 Zhou S, Yang W, Zeng L, et al. Emodin alleviates joint inflammation and bone erosion in rats with collagen-induced arthritis by inhibiting ferroptosis and degrading matrix metalloproteinases[J]. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao, 2023, 43(10): 1776-1781.

9 Lai K, Song C, Gao M, et al. Uridine alleviates sepsis-induced acute lung injury by inhibiting ferroptosis of macrophage[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(6): 5093.

10 Jing M, Wang Y, Xu L. Andrographolide derivative AL-1 ameliorates dextran sodium sulfate-induced murine colitis by inhibiting NF-κB and MAPK signaling pathways[J]. Oxid Med Cell Longev, 2019, 2019: 6138723.

11 Buie MJ, Quan J, Windsor JW, et al. Global hospitalization trends for Crohn's disease and ulcerative colitis in the 21st century: A systematic review with temporal analyses[J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2023, 21(9): 2211-2221.

12 Le Berre C, Ananthakrishnan AN, Danese S, et al. Ulcerative colitis and Crohn's disease have similar burden and goals for treatment[J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2020, 18(1): 14-23.

13 Rossier L, Matter C. Overview and update on treatment in ulcerative colitis[J]. Ther Umsch, 2023, 80(9): 386-392.

14 Zhang J, Deng J, Wang N, et al. Quality of reporting of integrative Chinese and Western medicine intervention in randomized controlled trials of ulcerative colitis: A review[J]. Syst Rev, 2023, 12(1): 228.

15 Liu Y, Li BG, Su YH, et al. Potential activity of traditional Chinese medicine against ulcerative colitis: A review[J]. J Ethnopharmacol, 2022, 289: 115084.

16 赵东云.基于成分、药效探讨黄连-厚朴配伍作用机理[D].合肥:安徽中医药大学, 2023.
Zhao DY. To study the compatibility mechanism of *Coptidis* and *Magnolia officinalis* based on composition and pharmacodynamics[D]. Hefei: Anhui University of Chinese Medicine, 2023.

17 Gao C, Zhou Y, Chen Z, et al. Turmeric-derived nanovesicles as novel nanobiologics for targeted therapy of ulcerative colitis[J]. Theranostics, 2022, 12(12): 5596-5614.

18 Gancarcikova S, Lauko S, Hrckova G, et al. Innovative animal model of DSS-induced ulcerative colitis in pseudo germ-free mice[J]. Cells, 2020, 9(12): 2571.

19 Zhou Z, He W, Tian H, et al. Thyme (*Thymus vulgaris* L.) polyphenols ameliorate DSS-induced ulcerative colitis of mice by mitigating intestinal barrier damage, regulating gut microbiota, and suppressing TLR4/NF-κB-NLRP3 inflammasome pathways [J]. Food Funct, 2023, 14(2): 1113-1132.

20 陈迎春, 陈明, 李艺琳.肠炎宁颗粒联合美沙拉嗪对溃疡性结肠炎患者肠道菌群、炎症因子和UCEIS的影响[J].中南医学科学杂志, 2024, 52(3): 460-462.
Chen YC, Chen M, Li YL. The effect of changyanning granules combined with mesalazine treatment on intestinal microflora, inflammatory factors, and UCEIS score in patients with ulcerative colitis[J]. Med Sci J Cent South China, 2024, 52(3): 460-462.

21 陈博, 孙夕童, 董新茜, 等.氧化应激在溃疡性结肠炎中的作用及中医药防治研究进展[J].中国实验方剂学杂志, 2023, 29(16): 264-273.
Chen B, Sun XT, Dong XQ, et al. Role of oxidative

stress in ulcerative colitis and traditional Chinese medicine prevention and treatment: A review[J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2023, 29(16): 264-273.

22 Li W, Wang Y, Zhang Y, et al. Lizhong decoction ameliorates ulcerative colitis by inhibiting ferroptosis of enterocytes *via* the Nrf2/SLC7A11/GPX4 pathway[J]. J Ethnopharmacol, 2024, 326: 117966.

23 Liu J, Kang R, Tang D. Signaling pathways and defense mechanisms of ferroptosis[J]. FEBS J, 2022, 289(22): 7038-7050.

24 Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, et al. Ferroptosis: An iron-dependent form of nonapoptotic cell death[J]. Cell, 2012, 149(5): 1060-1072.

25 Long D, Mao C, Huang Y, et al. Ferroptosis in ulcerative colitis: Potential mechanisms and promising therapeutic targets[J]. Biomed Pharmacother, 2024, 175: 116722.

26 Carrier JC, Aghdassi E, Jeejeebhoy K, et al. Exacerbation of dextran sulfate sodium-induced colitis by dietary iron supplementation: Role of NF-kappaB[J]. Int J Colorectal Dis, 2006, 21(4): 381-387.

27 陈洁玲, 沈杰, 刘国正. "益气解毒化瘀方"联合常规西药治疗溃疡性结肠炎30例临床研究[J]. 江苏中医药, 2021, 53(3): 34-37.
Chen JL, Shen J, Liu GZ. Clinical study on 30 cases of ulcerative colitis treated by Yiqi Jiedu Huayu prescription combined with conventional Western medicine[J]. Jiangsu J Tradit Chin Med, 2021, 53(3): 34-37.

28 Liu H, Zhang TA, Zhang WY, et al. Rhein attenuates cerebral ischemia-reperfusion injury *via* inhibition of ferroptosis through NRF2/SLC7A11/GPX4 pathway[J]. Exp Neurol, 2023, 369: 114541.

29 Bian W, Wei L, Wang K. Carthamin yellow alleviates dextran sodium sulfate-induced ulcerative colitis by repairing the intestinal barrier and activating the Nrf2/GPX4 axis[J]. Int Immunopharmacol, 2024, 141: 113020.

30 Peng S, Shen L, Yu X, et al. The role of Nrf2 in the pathogenesis and treatment of ulcerative colitis[J]. Front Immunol, 2023, 14: 1200111.

31 Piotrowska M, Swierczynski M, Fichna J, et al. The Nrf2 in the pathophysiology of the intestine: Molecular mechanisms and therapeutic implications for inflammatory bowel diseases[J]. Pharmacol Res, 2021, 163: 105243.

32 Kajarabille N, Latunde-Dada GO. Programmed cell-death by ferroptosis: Antioxidants as mitigators[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(19): 4968.

33 Cui C, Yang F, Li Q. Post-translational modification of GPX4 is a promising target for treating ferroptosis-related diseases[J]. Front Mol Biosci, 2022, 9: 901565.

34 Liu M, Kong XY, Yao Y, et al. The critical role and molecular mechanisms of ferroptosis in antioxidant systems: A narrative review[J]. Ann Transl Med, 2022, 10(6): 368.

35 Chen X, Li J, Kang R, et al. Ferroptosis: Machinery and regulation[J]. Autophagy, 2021, 17(9): 2054-2081.

36 Liu H, Johnston LJ, Wang F, et al. Triggers for the Nrf2/ARE signaling pathway and its nutritional regulation: Potential therapeutic applications of ulcerative colitis[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(21): 11411.

37 Xu M, Tao J, Yang Y, et al. Ferroptosis involves in intestinal epithelial cell death in ulcerative colitis[J]. Cell Death Dis, 2020, 11(2): 86.

[**本文编辑**] 宋睿璞 朱金月