

黄芩汤对溃疡性结肠炎小鼠氧化应激及铁死亡相关指标 GSH-Px4, P53, SLC7A11 的影响

吴娜¹, 万治平², 曾娟¹, 刘慧莹³, 贺小平⁴, 董贤慧^{4*}

(1. 江西中医药大学附属医院, 南昌 330006; 2. 南昌市洪都中医院, 南昌 330006;
3. 江中药业股份有限公司, 南昌 330004; 4. 河北中医学院, 石家庄 050091)

[摘要] 目的:探讨黄芩汤治疗溃疡性结肠炎(UC)的可能作用机制。方法:采用葡聚糖硫酸钠进行造模,实验分正常组,模型组,黄芩汤低、中、高剂量组(4.55, 9.1, 18.2 g·kg⁻¹)5个组。造模同时给予灌胃给药,连续7 d,第8天实验结束时采集标本测量结肠长度、质量,计算结肠质量指数,苏木素-伊红(HE)染色观察病理变化,生化试剂检测小鼠血清铁离子,超氧化物歧化酶(SOD),还原型谷胱甘肽(GSH),过氧化氢酶(CAT),髓过氧化物酶(MPO)等含量,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测结肠中长链脂酰辅酶A合成酶4(ACSL4),谷胱甘肽过氧化物酶4(GSH-Px4),铁蛋白重链(FTH1)蛋白的表达。实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测结肠组织中肿瘤蛋白53(P53),胱氨酸/谷氨酸逆向转运蛋白溶质载体家族7成员11(SLC7A11)mRNA表达水平。结果:与正常组比较,模型组小鼠血清MPO,铁离子含量,ACSL4蛋白阳性表达及P53 mRNA表达均明显升高($P<0.05$),血清SOD, CAT, GSH含量, GSH-Px4, FTH1蛋白表达及SLC7A11 mRNA表达均显著降低($P<0.01$);与模型组比较,黄芩汤干预后,小鼠血清MPO,铁离子含量,ACSL4蛋白阳性表达及P53 mRNA表达均明显降低,血清SOD, CAT, GSH水平, GSH-Px4, FTH1蛋白表达及SLC7A11 mRNA表达均明显升高,且以高剂量组差异明显($P<0.05, P<0.01$)。小鼠一般状态、结肠长度、肠重指数及HE染色结果表明,黄芩汤可在不同程度上改善小鼠临床症状及病理组织学变化。结论:以上结果表明黄芩汤对溃疡性结肠炎小鼠有治疗作用,其作用机制可能与抑制氧化应激及细胞铁死亡相关。

[关键词] 黄芩汤; 溃疡性结肠炎; 铁死亡; 氧化应激

[中图分类号] R2-0; R22; R285.5; R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)08-0017-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20210505

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210226.1456.003.html>

[网络出版日期] 2021-2-26 16:34

Effect of Huangqintang on Oxidative Stress and Ferroptosis-related Indexes GSH-Px4, P53, SLC7A11 in Ulcerative Colitis Mice

WU Na¹, WAN Zhi-ping², ZENG Juan¹, LIU Hui-ying³, HE Xiao-ping⁴, DONG Xian-hui^{4*}

(1. *Affiliated Hospital of Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Nanchang 330006, China;*
2. *Nanchang Hongdu Hospital of TCM, Nanchang 330006, China;*
3. *Jiangzhong Pharmaceutical Co. Ltd., Nanchang 330004, China;*
4. *Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050091, China*)

[Abstract] **Objective:** To explore the possible mechanism of Huangqintang in treating ulcerative colitis (UC). **Method:** The animal model of UC was induced by dextran sodium sulfate (DSS). The

[收稿日期] 20201208(016)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81803935);第65批中国博士后面项目(2019M650984);河北省自然科学基金面上项目(H2019423095);河北省教育厅青年拔尖人才基金项目(BJ2018059);河北省中医药管理局项目(2017081);承德市科技计划项目(201601A022);河北省卫生计生委项目(20160008);江西省卫生健康委科技计划项目(20203425);江西省中医药科技计划一般项目(2020A0031)

[第一作者] 吴娜,博士,主治医师,讲师,从事中医药防治消化系统疾病研究工作研究, E-mail: wuna0791@163.com

[通信作者] *董贤慧,博士,副教授,硕士生导师,从事中医药防治老年性痴呆的发病机制研究, E-mail: dongxianhuij@126.com

experimental animals were divided into control group, model group, Huangqintang low dose ($4.55 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), medium dose ($9.1 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), and high dose ($18.2 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) groups. Intra-gastric administration was also given in the modeling process for 7 consecutive days. At the end of the 8th day, colon tissues were collected to measure colon length and mass, and calculate the colon mass index. Pathological changes were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. Serum iron content, superoxide dismutase (SOD), glutathione (GSH), catalase (CAT) and myeloperoxidase (MPO) were determined by biochemical assay. Western blot was used to detect the protein expression of glutathione peroxidase 4 (GSH-Px4), long-chain acyl-CoA synthetase 4 (ACSL4) and ferritin heavy chain 1 (FTH1). The mRNA expression levels of tumor protein 53 (P53) and solute carrier family 7 member 11 (SLC7A11) in colon tissues were detected by Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR). **Result:** The experimental studies showed that compared with normal group, serum MPO and iron content, ACSL4 protein level and relative P53 mRNA expression in the model group significantly increased ($P<0.05$), while serum SOD, CAT, GSH content, GSH-Px4, FTH1 relative protein expression level and relative SLC7A11 mRNA expression in the model group significantly decreased ($P<0.01$). Compared with model group, serum MPO and iron content, ACSL4 protein level and relative P53 mRNA expression significantly decreased ($P<0.05$), while serum SOD, CAT, GSH content, GSH-Px4, FTH1 relative protein expression level and relative SLC7A11 mRNA expression significantly increased ($P<0.05$) after the intervention of Huangqintang, and the effect was most significant in the high-dose group ($P<0.05$). The results of general condition, colon length, colon mass index and HE staining showed that Huangqintang could relieve clinical symptoms and histopathological changes in UC mice. **Conclusion:** These results indicated that Huangqintang had therapeutic effect on ulcerative colitis mice, and its mechanism might be related to inhibiting the oxidative stress and ferroptosis.

[Key words] Huangqintang; ulcerative colitis; ferroptosis; oxidative stress

溃疡性结肠炎(UC)是一种慢性非特异性的肠道炎症,主要累及结肠和直肠,多呈反复发作,临床表现为腹痛、腹泻、里急后重、黏液脓血便等^[1]。因其治愈难度大、复发率高、较高癌变率等特点,被世界卫生组织列为现代社会最难治疗疾病之一。目前,在我国发病率呈上升趋势,其发病机制尚不十分清楚^[2-3]。铁死亡(ferroptosis)是最近研究发现的一种新型程序性细胞死亡方式,其在细胞形态结构、生物化学及遗传学表现上与其他类型的细胞死亡有所区别,其本质是铁离子依赖的脂质过氧化产物超量蓄积引起的以线粒体改变为主的氧化损伤^[4]。研究表明,铁死亡在多种疾病发生发展过程中有重要作用,尤其是在肿瘤、心血管系统、神经退行性疾病、炎症性肠病^[5-8]。

黄芩汤首见于《伤寒论》,有清热止痢、平肝敛阴、和中降逆的功效,为治疗里热下痢之祖方^[9]。课题组前期通过生物信息学筛选发现黄芩汤是治疗UC确有疗效的方剂,系统性评价发现与单纯运用西药相比,黄芩汤可提高临床有效率、降低患者炎症因子、免疫球蛋白水平,且安全可靠、不良反应少^[10]。现代研究证实,黄芩中主要成分黄芩苷在人

体内可直接整合铁离子,减少人体铁离子的沉积,黄芩素可抑制铁累积,降低脂质过氧化水平,其对铁死亡的抑制作用优于铁死亡抑制剂Ferrostatin-1^[11-12]。黄芩汤是临床治疗UC的经典方剂,其作用UC的机制是否与铁死亡相关目前尚不清楚。基于此,本实验拟从铁死亡的角度探讨黄芩汤对UC小鼠的影响及其作用机制,进一步明确其作用机制,为其临床运用提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 50只SPF级雄性BALB/C小鼠,体质量18~20 g,购自三峡大学实验动物中心,合格证号SCXK(鄂)2017-0012,本实验通过江西中医药大学伦理委员会审查,许可证号SYXK(赣)2017-0004。动物购进适应性饲养1周开始实验,小鼠饲养于SPF级动物实验室,温度22~24℃,湿度50%~60%,12 h明暗循环,饲料和饮用水消毒后由动物自由摄取。

1.2 试剂 葡聚糖硫酸钠(DSS,美国MP公司,货号SKU 021601109,相对分子质量3 600~5 000);血清铁,超氧化物歧化酶(SOD),还原型谷胱甘肽(GSH),过氧化氢酶(CAT),髓过氧化物酶(MPO)

测定试剂盒(南京建成生物工程研究所,货号分别为A039-1-1, A001-1-2, A006-1-1, A007-1-1, A044-1-1);苏木素(美国Sigma公司,货号H9627);伊红Y(水溶性,国药集团化学试剂有限公司,货号71014544);聚氰基丙烯酸正丁酯(BCA)蛋白浓度测定试剂盒(碧云天生物技术研究所,货号P0010);谷胱甘肽过氧化物酶4(GSH-Px4),长链脂酰辅酶A合成酶4(ACSL4)抗体(美国Abclonal公司,货号分别为A13309, A16848);铁蛋白重链(FTH1)抗体(美国Affinity公司,货号DF6278);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(杭州贤至生物有限公司,货号AB-P-R 001);辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗兔二抗(武汉博士德生物工程有限公司,货号BA1054);增强化学发光底物(ECL)底物液(北京普利莱基因技术有限公司,货号P1050);trizol(美国Ambion公司,货号15596-026)。

1.3 仪器 Multiskan MK3型全自动酶标仪(美国Thermo scientific公司);FlexStation 3型多功能酶标仪(美国Molecular Devices公司);C2500-R-230V型微型高速离心机(美国Labnet公司);BX53型生物显微镜(奥林巴斯);Leica RM 2016型轮转式切片机(德国徕卡公司);JK-6型生物组织摊烤片机(武汉俊杰电子有限公司);QuantStudio 6型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国ABI公司);DYY-7C型电泳仪,DY CZ-40型转膜仪(北京六一仪器厂)。

2 方法

2.1 黄芩汤药液制备 黄芩汤组方以黄芩、白芍、炙甘草、大枣均购自江西中医药大学附属医院,经江西中医药大学药学院张金莲教授鉴定,符合2020年版《中华人民共和国药典》规定标准。其中黄芩-白芍-炙甘草-大枣以3:2:2:2配伍,称取药材后加入药材总质量10倍体积的水浸润1 h后煎煮1 h,过滤药液后药渣加8倍体积的水继续煎煮1 h,合并2次滤液,浓缩成 $1\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 药液,放置 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。采用高效液相色谱法对其主要成分进行分析,其中黄芩苷质量分数为5.45%,芍药苷质量分数为0.65%,甘草酸质量分数为0.29%,汉黄芩苷质量分数为1.09%,黄芩素质量分数为0.12%,汉黄芩素质量分数为0.02%。

2.2 模型制备及分组 小鼠进行适应性喂养后,将DSS溶于蒸馏水配制成3%溶液,按随机数字表法将小鼠分为5组,分别为正常组、模型组、黄芩汤低、中、高剂量组,除正常组外,其余各组小鼠均自由饮

用DSS溶液7 d,其中每隔1 d更换1次新鲜的DSS溶液^[13]。造模同时给予灌胃,每日1次,其中黄芩汤高、中、低剂量组参考相关文献^[13]分别给予18.2, 9.1, 4.55 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 灌胃,其余组用等量蒸馏水灌胃,每日1次,连续给药7 d后处死动物获取样本进行检测。

2.3 一般情况评价及结肠质量、长度及肠重指数检测 每日给药前称取小鼠体质量并记录;观察小鼠的精神状态、运动、饮食、粪便性状等生理活动变化情况。实验结束时取肛门至回盲部结肠样本进行长度测量,沿纵面剖开并用磷酸盐缓冲液(PBS)将肠内容物冲洗干净,滤纸吸干,称质量并计算肠重指数 $[(\text{结肠质量}/\text{体质量})\times 100\%]$ 。

2.4 苏木素-伊红(HE)染色观察结肠组织病理学变化 截取肛门至回盲部结肠组织,选取病变最明显的部位置于10%中性甲醛中固定,石蜡包埋切片,采用HE染色法观察。在高倍镜下对切片随机挑选5个视野,观察结肠组织变化。

2.5 生化试剂检测血清SOD, GSH, CAT, MPO, 铁含量 用抗凝采血管收集全血0.5 mL,进行 $3\ 500\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min(离心半径8.5 cm),取上清液检测,血清铁测定试剂盒, SOD测试盒, GSH测定试剂盒, CAT测试盒及MPO测试盒对其进行检测,具体操作步骤按照试剂盒说明书进行。

2.6 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测结肠中GSH-Px4, FTH1, ACSL4蛋白的表达 提取结肠组织蛋白, BCA试剂盒进行定量。十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶蛋白电泳,转膜,室温封闭2 h后,加入相应一抗GSH-Px4(1:500), FTH1(1:500), ACSL4(1:500), GAPDH(1:1 000), $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。次日洗去多余一抗,加入相应的辣根过氧化物标记的二抗(1:5万),室温摇床孵育2 h。洗去多余二抗,滴加化学发光液发光,凝胶成像系统成像,用BandScan分析胶片灰度值。

2.7 Real-time PCR检测结肠组织中肿瘤蛋白53(P53), 胱氨酸/谷氨酸逆向转运蛋白溶质载体家族7成员11(SLC7A11)mRNA水平 取结肠组织约100 mg,加入trizol试剂进行RNA提取,反转录为cDNA后加入扩增反应体系,进行Real-time PCR检测,PCR反应条件为 $95\text{ }^{\circ}\text{C}\ 10\text{ min}, 95\text{ }^{\circ}\text{C}\ 15\text{ s}, 60\text{ }^{\circ}\text{C}\ 1\text{ min}, 40$ 个循环,检测基因相对表达水平,结果采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 计算。引物由武汉巴菲尔生物技术服务有限公司合成,序列见表1。

2.8 统计学分析 采用SPSS 19.0统计学软件进行

表1 PCR引物序列

Table 1 Primer sequence of PCR

引物	序列(5'-3')	长度/bp
P53	上游 GGACAGCTTTGAGGTTTCGTG	237
	下游 TCATTACAGTCCCGAACAT	
SLC7A11	上游 CCTGGCATTGAGCGCTACA	378
	下游 GCAAGGGGGATGGTTTTTTC	
GAPDH	上游 ATGGGTGTGAACCACGAGA	229
	下游 CAGGGATGATGTTCTGGGCA	

数据处理,计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,方差齐时组间比较采用LSD检验,方差不齐时组间比较采用Dunnett's T3检验,偏态分布用秩和检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对UC小鼠一般体征及结肠长度及肠重指数的影响 模型复制后,与正常组比较,模型组小鼠一般体征均出现不同程度改变,毛色欠光泽、活动频率降低、粪便在第2天开始出现性状改变,表现为部分小鼠粪便松散,至第4天开始出现脓血便。与模型组比较,使用中药黄芩汤后,小鼠上述症状得到改善。结肠长度及结肠肠重指数是反映UC严重程度的重要指标。与正常组小鼠比较,模型组小鼠的结肠长度显著缩短,肠重指数显著升高($P<0.01$),表明造模成功。在结肠长度方面,与模型组比较,黄芩汤中、高剂量组明显增加结肠长度($P<0.05$),黄芩汤中、高剂量组及高剂量组均明显降低肠重指数($P<0.05, P<0.01$)。见图1,表2。

3.2 对UC小鼠病理形态学影响 正常组小鼠结肠组织无充血水肿,无溃疡,黏膜上皮结构完整清晰,腺体排列整齐规则,未见炎性细胞浸润;与正常组比较,模型组小鼠可见结肠组织有明显溃疡,大片黏膜脱落、腺体结构破坏,大量炎性细胞浸润;与模型组比较,黄芩汤低、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,以黄芩汤中、高剂量组改善效果更为明显。

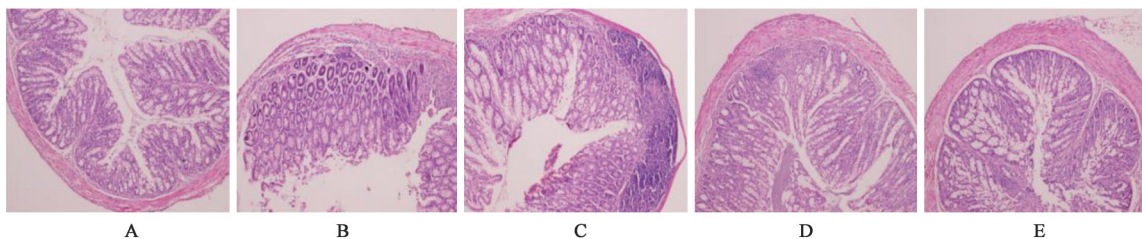
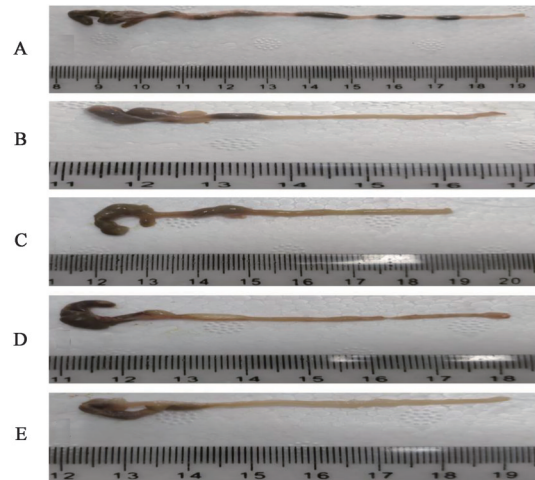


图2 黄芩汤对UC小鼠病理形态学影响(HE, $\times 100$)

Fig. 2 Effect of Huangqintang on pathomorphological of UC mice (HE, $\times 100$)



A. 正常组;B. 模型组;C. 黄芩汤低剂量组;D. 黄芩汤中剂量组;E. 黄芩汤高剂量组(图2,3同)

图1 黄芩汤对UC小鼠结肠长度的影响

Fig. 1 Effect of Huangqintang on colon length of UC mice

表2 黄芩汤对UC小鼠结肠长度及肠重指数的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 2 Effect of Huangqintang on colon length and intestinal weight index of UC mice ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	结肠长度/cm	肠重指数/%
正常		9.16 \pm 0.80	1.43 \pm 0.09
模型		4.93 \pm 0.46 ²⁾	1.85 \pm 0.18 ²⁾
黄芩汤	4.55	5.41 \pm 0.64	1.76 \pm 0.16
	9.1	5.61 \pm 0.35 ³⁾	1.69 \pm 0.15 ³⁾
	18.2	5.59 \pm 0.70 ³⁾	1.58 \pm 0.11 ⁴⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与模型组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$ (表3~5同)。

见图2。

3.3 对UC小鼠血清铁离子, SOD, GSH, CAT, MPO 水平的影响 对血清铁含量进行检测发现,与正常组比较,模型组小鼠血清铁含量显著升高($P<0.01$);与模型组比较,黄芩汤高剂量组血清铁含量显著降低($P<0.01$)。对氧化应激相关指标进行检测发现,与正常组比较,模型组小鼠血清中SOD, CAT, GSH水平显著降低, MPO水平显著升高($P<0.01$);与模型组比较,黄芩汤低剂量组明显降低MPO水平($P<$

0.05), 黄芩汤中剂量组明显升高 CAT 水平 ($P < 0.05$), 显著降低 MPO 水平 ($P < 0.01$), 黄芩汤高剂量

组明显升高 SOD, CAT, GSH 水平 ($P < 0.05$), 显著降低 MPO 水平 ($P < 0.01$)。见表 3。

表 3 黄芩汤对 UC 小鼠血清铁离子, SOD, GSH, CAT, MPO 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 3 Effect of Huangqintang on serum iron, SOD, GSH, CAT, MPO of UC mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	铁离子/mg·L ⁻¹	SOD/U·mL ⁻¹	GSH/mg·L ⁻¹	CAT/U·mL ⁻¹	MPO/U·L ⁻¹
正常		0.73±0.27	243.48±25.81	28.75±1.79	10.02±2.01	177.29±16.97
模型		5.38±0.86 ²⁾	140.37±29.72 ²⁾	14.21±4.81 ²⁾	5.17±0.98 ²⁾	383.79±35.61 ²⁾
黄芩汤	4.55	4.59±0.80	141.32±18.63	16.40±2.74	5.40±1.49	323.05±47.53 ³⁾
	9.1	5.23±1.04	161.09±21.26	16.78±2.73	7.42±1.25 ³⁾	260.44±35.07 ⁴⁾
	18.2	2.80±0.71 ⁴⁾	196.36±33.04 ⁴⁾	20.05±3.19 ³⁾	7.99±1.61 ³⁾	206.14±30.60 ⁴⁾

3.4 对 UC 小鼠 GSH-Px4, FTH1, ACSL4 蛋白表达的影响 与正常组比较, 模型组 GSH-Px4, FTH1 蛋白表达显著降低, ACSL4 蛋白表达显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 黄芩汤低、中、高剂量组显著升高 GSH-Px4 蛋白表达 ($P < 0.01$), 黄芩汤中、高剂量组显著升高 FTH1 蛋白 ($P < 0.01$), 黄芩汤低、中、高剂量组明显降低 ACSL4 蛋白表达 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见图 3, 表 4。

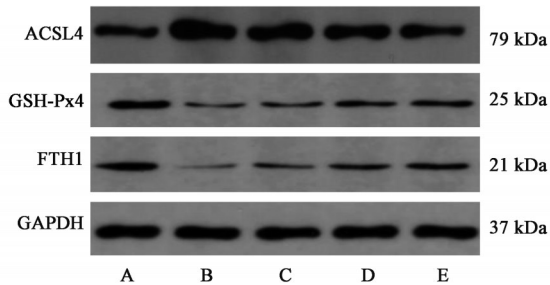


图 3 各组小鼠结肠组织 ACSL4, GSH-Px4, FTH1 蛋白表达电泳
Fig. 3 Electrophoresis of protein expression of ACSL4, GSH-Px4, FTH1 in colon tissue of mice in each group

表 4 黄芩汤对 UC 小鼠 GSH-Px4, FTH1, ACSL4 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Effect of Huangqintang on expression of GSH-Px4, FTH1 and ACSL4 proteins of UC mice ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	GSH-Px4 /GADPH	FTH1 /GADPH	ACSL4 /GADPH
正常		0.84±0.04	0.78±0.07	0.37±0.05
模型		0.32±0.05 ²⁾	0.30±0.06 ²⁾	0.79±0.10 ²⁾
黄芩汤	4.55	0.47±0.07 ⁴⁾	0.32±0.06	0.65±0.08 ³⁾
	9.1	0.55±0.05 ⁴⁾	0.50±0.07 ⁴⁾	0.60±0.08 ⁴⁾
	18.2	0.65±0.07 ⁴⁾	0.65±0.10 ⁴⁾	0.50±0.07 ⁴⁾

3.5 对 UC 小鼠 P53, SLC7A11 mRNA 表达的影响 与正常组比较, 模型组 P53 mRNA 表达显著升高, SLC7A11 mRNA 表达显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 黄芩汤低、中、高剂量组明显降低 P53 mRNA

表达, 明显升高 SLC7A11 mRNA 表达 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 5。

表 5 黄芩汤对 UC 小鼠 P53, SLC7A11 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 5 Effect of Huangqintang on expression of P53 and SLC7A11 mRNA of UC mice ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	P53	SLC7A11
正常		1.07±0.13	1.00±0.08
模型		4.09±0.34 ²⁾	0.36±0.05 ²⁾
黄芩汤	4.55	3.45±0.25 ³⁾	0.48±0.06 ³⁾
	9.1	2.64±0.35 ⁴⁾	0.63±0.05 ⁴⁾
	18.2	2.62±0.39 ⁴⁾	0.72±0.04 ⁴⁾

4 讨论

UC 是一种病因不明的炎症性疾病, 目前在我国发病率呈上升趋势, 越来越多的研究表明, 常规西药治疗效果不够理想, 而中药在这方面有着独特优势^[14]。UC 在中医学中常归属于“痢疾”“泄泻”“肠癖”“下利”等疾病范畴, 中医认为其发病与“湿热”“热毒”等相关, 病机主要为湿热蕴结肠道, 导致肠道传导失司、气机不通、气血壅滞、肠络受损而致下痢赤白脓血, 临床多治以清热利湿、凉血止痢^[15]。黄芩汤由黄芩、白芍、炙甘草、大枣 4 味中药组成, 药物组成精当, 方中以黄芩为君药, 苦寒坚阴而清里热; 白芍敛阴和营, 缓急止痛; 芍药相配, 酸苦相济, 调中存阴以止利, 为治热之要药; 炙甘草、大枣益气和中, 调补正气。诸药合用, 共奏清热止痢, 缓急止痛之功效。该方应用于治疗肠道疾病已有千余年历史, 临床疗效确切^[16]。现代药理研究表明, 黄芩汤治疗 UC 在调节免疫功能、抑制炎症反应、抗氧化应激、保护肠黏膜屏障等方面作用显著^[17-18]。

DSS 诱导的结肠炎小鼠是目前公认的与人类 UC 临床及组织学特征最为相符的一种动物模型, 因此本研究采用 3%DSS 进行造模^[19]。通过 HE 染

色可见,模型组与正常组比较,模型组小鼠可见结肠组织黏膜上皮细胞脱落,腺体结构紊乱,隐窝消失,有明显溃疡,黏膜及黏膜下层可见大量炎性细胞浸润,表明造模成功。通过对小鼠一般症状及结肠长度,结肠肠重指数,HE染色可知,黄芩汤可在不同程度上改善UC小鼠的临床症状及病理变化,且以中、高剂量组改善效果显著。氧化应激(OS)是体内氧化与抗氧化系统失衡,倾向于氧化,导致中性粒细胞炎性浸润,蛋白酶分泌增加,产生大量氧化中间产物,从而导致组织损伤^[20]。研究发现,OS可导致胃肠道黏膜层损伤及细菌入侵,进而刺激免疫反应,引发炎症性肠病的发生,与UC的发生发展关系密切^[21]。SOD,CAT,GSH是体内抗氧化系统中的重要组成成员,在哺乳动物中,SOD不仅能分解活性氧(ROS),还能在铜离子存在的情况下将其转化成过氧化氢(H₂O₂),而H₂O₂在CAT催化作用下转化为水^[22]。GSH可与谷胱甘肽还原酶、谷胱甘肽s-转移酶等在肠黏膜中形成抗氧化屏障,消除有害过氧化物,保护组织免受氧化应激反应,此外,当GSH被耗尽时,会导致GSH-Px4失活从而诱发铁死亡^[23]。MPO是一种血红素蛋白,常在UC患者炎症黏膜中表达升高,可促使癌变,在一定程度上与UC炎症程度相关^[24]。通过对小鼠血清SOD,CAT,GSH,MPO进行检测发现,与模型组比较,黄芩汤3组剂量均在一定程度上升高了血清中SOD,CAT,GSH水平,降低MPO表达,其中以黄芩汤中、高剂量组效果显著。以上结果表明,经黄芩汤治疗后,UC小鼠氧化损伤程度明显缓解,抗氧化能力有所恢复,黄芩汤可抑制UC小鼠的氧化应激反应。

肠上皮细胞的死亡被认为是UC发生发展的关键,铁死亡则被认为是导致肠上皮细胞死亡的重要因素,其形态特征主要表现为细胞核膜完整、线粒体萎缩、线粒体膜密度增加及线粒体嵴缩小或消失;生物化学方面表现为铁离子水平升高、细胞内合成GSH原料减少,GSH-Px4活性降低、脂质ROS增多、脂质代谢产物的堆积等;遗传学方面,其具体作用机制尚不明确,研究认为其与铁代谢,OS脂质代谢异常等多方面关系密切^[4]。早在2000年曾有研究报道,使用铁螯合剂可以缓解UC患者临床症状、改善患者内镜下表现,而对UC患者及UC小鼠使用铁补充剂则加重UC症状^[25-29]。最新多项研究表明,在DSS诱导的UC模型中,运用铁死亡抑制剂(Ferrostatin-1和Liproxstatin-1)后,UC小鼠体质量、结肠长度显著增加,铁死亡的相关指标(GSH-Px4,

FTH1,ACSL4,ROS等)发生显著改变,表明铁死亡与UC之前存在着密切联系^[5,30-31]。铁蛋白是一种铁储存蛋白复合物,包括铁蛋白轻链和FTH1,过量的铁储存在铁蛋白中。FTH具有铁氧化酶活性,可以催化亚铁形式转化为三价铁离子形式,从而降低游离铁的含量,维持细胞内铁稳态^[32]。GSH-Px4是一种重要的抗氧化酶,可通过减少脂质过氧化作用以抑制细胞发生铁死亡,GSH-Px4的下调被认为是铁死亡的关键特征^[33]。ACSL4可催化花生四烯酸和肾上腺酸合成为花生四烯酰CoA和肾上腺酰CoA,参与磷脂酰乙醇胺或磷脂酰肌醇等带负电膜磷脂的合成,是铁死亡过程中的重要组成部分,其在细胞发生铁死亡时常表达上调^[34-35]。SLC7A11是机体抗氧化体系胱氨酸谷氨酸转运受体(systemXc⁻)的重要组成部分,正常情况下,systemXc⁻可将胞外的胱氨酸转运至细胞内,参与谷胱甘肽的合成,帮助机体清除多余的ROS,阻断systemXc⁻可导致GSH合成受阻,损害细胞抗氧化能力,进而导致铁死亡的产生^[36]。研究表明P53可抑制SLC7A11转录,从而阻断systemXc⁻介导细胞发生铁死亡^[37]。

课题组采用生化法对小鼠血清铁离子含量进行检测发现,与正常组比较,模型组小鼠体内铁离子含量增加,差异显著。与模型组比较,使用高剂量黄芩汤治疗后小鼠体内铁离子含量显著降低。采用Western blot及Real-time PCR对铁死亡相关蛋白及mRNA表达进行检测发现,与正常组比较,模型组ACSL4蛋白及P53 mRNA表达量升高,GSH-Px4,FTH1蛋白及SLC7A11 mRNA表达量降低。与模型组比较,经过黄芩汤治疗后,ACSL4蛋白及P53 mRNA表达量降低,GSH-Px4,FTH1蛋白及SLC7A11 mRNA表达量升高,且以高剂量组效果显著,表明黄芩汤可影响UC中铁死亡相关指标的表达。通过对氧化应激相关指标检测发现,黄芩汤可抑制UC小鼠的氧化应激反应。由此推测,黄芩汤治疗UC的作用机制可能与抑制细胞铁死亡的发生相关。

综上所述,本研究从铁死亡角度进行探讨,对铁死亡相关指标进行检测发现,黄芩汤作用UC的机制可能与抑制UC小鼠的氧化应激反应及铁死亡相关,进一步揭示了黄芩汤作用UC的机制,同时揭示并丰富了中医“湿热内蕴”治则治疗UC的作用机制。这些研究结果为黄芩汤的进一步研究开发利用提供了重要的参考。

【利益冲突】 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] UNGARO R, MEHANDRU S, ALLEN P B, et al. Ulcerative colitis [J]. *Lancet*, 2017, 29, 389(10080): 1756-1770.
- [2] 高艳奎, 申睿, 朱向东, 等. 中医药治疗溃疡性结肠炎作用机制研究进展[J]. *中医药学报*, 2020, 48(2): 75-80.
- [3] KUCHARZIK T, KOLETZKO S, KANNENGIESSER K, et al. Ulcerative Colitis-Diagnostic and Therapeutic Algorithms [J]. *Dtsch Arztebl Int*, 2020, 117(33/34): 564-574.
- [4] 梅胜兰, 夏中元, 孟庆涛, 等. 细胞铁死亡发生机制的研究进展[J]. *医学综述*, 2020, 26(21): 4207-4211, 4218.
- [5] 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.
- [6] BEBBER C M, MÜLLER F, PRIETO CLEMENTE L, et al. Ferroptosis in cancer cell biology [J]. *Cancers (Basel)*, 2020, 12(1): 164.
- [7] QIU Y, CAO Y, CAO W, et al. The application of ferroptosis in diseases [J]. *Pharmacol Res*, 2020, doi: 10.1016/j.phrs.2020.104919.
- [8] SUN Y, CHEN P, ZHAI B, et al. The emerging role of ferroptosis in inflammation [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, doi: 10.1016/j.biopha.2020.110108.
- [9] 苏敏敏, 惠建萍, 刘越洋, 等. 黄芩汤治疗溃疡性结肠炎的作用机制研究进展[J]. *云南中医学院学报*, 2019, 42(6): 94-98.
- [10] 吴娜, 毛祥坤, 万治平, 等. 溃疡性结肠炎活动期关键基因与治疗中药的生信分析及系统评价[J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(11): 2677-2686.
- [11] 季小添, 李海珊, 李伟荣, 等. 基于黄芩苷药理研究进展探讨其对出血性脑损伤可能的保护作用及机制[J]. *中药新药与临床药理*, 2020, 31(12): 1508-1515.
- [12] 徐文慧, 李沧海, 姜廷良. 铁死亡通路与中药干预机制研究进展[J]. *中国中药杂志*, 2018, 43(20): 4019-4026.
- [13] 徐航宇. 黄芩汤对溃疡性结肠炎小鼠肠道菌群的影响及肠黏膜屏障的保护作用机制研究[D]. 北京: 中国中医科学院, 2018.
- [14] CURKOVIC I, EGBRING M, KULLAK-UBLICK G A. Risks of inflammatory bowel disease treatment with glucocorticosteroids and aminosalicylates [J]. *Dig Dis*, 2013, 31(3/4): 368.
- [15] 张声声, 沈洪, 郑凯, 等. 溃疡性结肠炎中医诊疗专家共识意见(2017) [J]. *中华中医药杂志*, 2017, 32(8): 3585.
- [16] 宋红新, 马旭冉, 王敦方, 等. 基于网络药理学的黄芩汤治疗溃疡性结肠炎的潜在机制研究[J]. *药学学报*, 2020, 55(2): 247-255.
- [17] 庄帅星. 黄芩汤调控 Nrf2 通路对溃疡性结肠炎的抗氧化应激作用机制研究[D]. 北京: 中国中医科学院, 2016.
- [18] 吴娜, 万治平, 韩玲, 等. 黄芩汤对溃疡性结肠炎小鼠 NLRP3/caspase-1 细胞焦亡通路的影响[J]. *中国中药杂志*, 2020, doi: 10.19540/j.cnki.cjmm.20201117.402.
- [19] CHASSAING B, AITKEN J D, MALLESHAPPA M, et al. Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice [J]. *Curr Protoc Immunol*, 2014, doi: 10.1002/0471142735.im1525s104.
- [20] GORRINI C, HARRIS I S, MAK T W. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2013, 12(12): 931-947.
- [21] TIAN T, WANG Z, ZHANG J. Pathomechanisms of oxidative stress in inflammatory bowel disease and potential antioxidant therapies [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, doi: 10.1155/2017/4535194.
- [22] BORGSTAHL G E O, OBERLEY-DEEGAN R E. Superoxide dismutases (SODs) and SOD mimetics [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2018, 7(11): 156.
- [23] URSINI F, MAIORINO M. Lipid peroxidation and ferroptosis: the role of GSH and GPx4 [J]. *Free Radic Biol Med*, 2020, 152: 175-185.
- [24] O'NEILL S, BRAULT J, STASIA M J, et al. Genetic disorders coupled to ROS deficiency [J]. *Redox Biol*, 2015, 6: 135-156.
- [25] MILLAR A D, RAMPTON D S, BLAKE D R. Effects of iron and iron chelation in vitro on mucosal oxidant activity in ulcerative colitis [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2000, 14(9): 1163-1168.
- [26] MINAIYAN M, MOSTAGHEL E, MAHZOUNI P. Preventive therapy of experimental colitis with selected iron chelators and anti-oxidants [J]. *Int J Prev Med*, 2012, 3(Suppl 1): S162-S169.
- [27] CARRIER J, AGHDASSI E, PLATT I, et al. Effect of oral iron supplementation on oxidative stress and colonic inflammation in rats with induced colitis [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2001, 15(12): 1989-1999.
- [28] SERIL D N, LIAO J, HO K L, et al. Dietary iron supplementation enhances DSS-induced colitis and associated colorectal carcinoma development in mice [J]. *Dig Dis Sci*, 2002, 47(6): 1266-1278.
- [29] KOBAYASHI Y, OHFUJI S, KONDO K, et al. Japanese case-control study group for ulcerative

- colitis. association between dietary iron and zinc intake and development of ulcerative colitis: a case-control study in Japan[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2019, 34(10):1703-1710.
- [30] CHEN Y, ZHANG P, CHEN W, et al. Ferroptosis mediated DSS-induced ulcerative colitis associated with Nrf2/HO-1 signaling pathway[J]. Immunol Lett, 2020, 225:9-15.
- [31] WANG S, LIU W, WANG J, et al. Curculigoside inhibits ferroptosis in ulcerative colitis through the induction of GPX4[J]. Life Sci, 2020, doi: 10. 1016/j. lfs. 2020. 118356.
- [32] XIE Y, HOU W, SONG X, et al. Ferroptosis: process and function [J]. Cell Death Differ, 2016, 23 (3) : 369-379.
- [33] ALIM I, CAULFIELD J T, CHEN Y, et al. Selenium drives a transcriptional adaptive program to block ferroptosis and treat stroke [J]. Cell, 2019, 177 (5) : 1262-1279.
- [34] DOLL S, PRONETH B, TYURINA Y Y, et al. ACSL4 dictates ferroptosis sensitivity by shaping cellular lipid composition[J]. Nat Chem Biol, 2017, 13(1):91-98.
- [35] 兰斌, 龚盛强, 成绍武, 等. 铁死亡的机制及其在相关疾病中的意义[J]. 基础医学与临床, 2018, 38(9): 1337-1341.
- [36] KOPPULA P, ZHANG Y, ZHUANG L, et al. Amino acid transporter SLC7A11/xCT at the crossroads of regulating redox homeostasis and nutrient dependency of cancer [J]. Cancer Commun (Lond), 2018, 38(1):12.
- [37] 殷贤青, 刘容容. 铁死亡的发生机制及其在血液系统肿瘤中的研究进展[J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(11):120-125.

[责任编辑 周冰冰]

·书讯·

浅析妇产科围手术期的预防护理工作体会 ——评《妇产科手册》

妇产科是我国临床医疗核心科室之一,主要负责女性生殖疾病治疗、女性妊娠、分娩时期的护理工作及高危产妇的妊娠、难产现象的防治及妇科保健工作等,在保障女性生殖健康记忆、妇科疾病康复诊疗等方面具有不可替代的作用。

《妇产科手册》作者郑勤田,刘慧姝,由人民卫生出版社于2016年8月出版。该书对国内外妇产科诊疗护理工作进行了大量案例跟踪研究,并对我国妇产科临床诊疗的热点问题,进行深入分析与探讨。该书在原英文版的基础上,增设了许多国内临床案例,使之可以更好地适应中国妇产科临床诊疗项目需求。全书的每一个章节均包含了国内妇产科临床诊疗实情及妇产科相关诊疗医师的宝贵经验,并与国外经典案例进行对比,指明差异点,有助于读者更清晰地了解案例研究问题。该书内容框架的建立充分考虑了妇产科的工作特征,对常见病症进行集中概括,其内容客观真实地反映了国内妇产科专业诊疗的中心,将研究点落在了妇产科感染预防与护理工作中,有助于医师的日常学习。为了提升该书的实际阅读性,作者添加了近百幅彩色的妇产科临床诊疗图片。该书内容庞大,涉及到很多妇产科疾病的诊疗及护理防治环节,以诊断和防治工作为主线,贯穿整个妇产科诊疗工作,并以大量的图表数据为理论支撑,护理技巧精确到了每一个环节,具有鲜明的实用性。《妇产科手册》一书不仅对广大妇产科医护工作者的日常护理诊疗工作具有重要指导作用,还能帮助读者了解当前国际妇产科诊疗护理防护工作的研究进展和实际应用情况,对于促进我国妇产科诊疗标准化应用实践具有重要的参考价值。

妇产科围手术期是指妇产科临床诊疗手术的整体过程,一般可以进一步细分为术前、术中和术后。从病人同意进行手术诊疗开始,到整个手术诊疗和后续康复过程结束,都可以看做是妇产科围手术期。有效提高妇产科围手术期预防护理工作,是当前产科工作的重要改革内容。本文主要以产科问题为切入点,结合《妇产科手册》一书所归纳的产科诊疗护理知识,对未来我国妇产科围手术期预防护理工作提升要点进行简要探讨。为有序提升妇产科诊疗护理质量,降低患者感染风险率,从以下几个方面的工作入手:第一是加强患者住院指导。患者在刚入院时,由于医院自身的陌生感以及健康焦虑,有可能导致患者产生恐惧情绪,一时难以接受诊疗。对此,相关诊疗医师应该积极与患者进行沟通,并向其详细介绍疾病情况及手术治疗等相关规则和注意事项,提高患者对疾病的认知程度,缓解患者的不良情绪,确保患者心情舒畅。第二是明确检查项目。妇产科相关诊疗医师应该提高自身医疗水平,明确患者检查项目,并指导患者顺利完成检查,保证患者处于良好的手术状态中。第三是提高抗感染的预防与诊疗水平。相比较其他科室,产科患者更容易受到细菌感染,在手术和分娩时产生的身体微环境变化也会引起菌群失调从而引发炎症或者感染情况。因此,医护人员需要合理使用抗生素类药物,确保手术环境与手术技能的准确性,降低患者感染风险;第四是积极做好患者并发症的预防工作。妇产科围术期的常规并发症一般有腹胀、咳嗽和伤口感染等。针对不同并发症应进行不同治疗干预,提高诊疗针对性。此外,有关医护人员还需要在患者手术前注意患者是否有贫血低蛋白等障碍性疾病,在手术过程中严格按照无菌操作规范,缝合伤口时需提前做好止血操作,减少患者组织细胞坏死、外部特殊感染情况。

妇产科作为我国临床诊疗重要科室,无论生产还是疾病诊疗都需要手术进行。这就对相关医护工作者的妇产科围手术期工作提出了更高要求。由于产科手术的特殊性,在患者手术期间发生感染的可能性较高,严重阻碍患者康复进程,危害患者健康,所以需要积极对妇产科围术期患者进行诊疗干预,预防患者感染情况。《妇产科手册》一书从不同层面和不同角度,论述了当前妇产科临床诊疗的实际操作,有助于当前医护工作者技能提升,具有切实的应用意义。

(作者曾旭,湖南省妇幼保健院,长沙 410008)