

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2023.15.012

艾灸“天枢”穴对溃疡性结肠炎模型大鼠结肠组织铁死亡及氧化损伤的影响

刘力¹, 卢云琼¹, 曹姚佳妮¹, 李红娜¹, 金悠悠², 孔谐和³,
樊晓鹏¹, 洪珏³, 马晓芃³, 张丹³✉

1. 上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院, 上海市虹口区甘河路110号, 200437; 2. 江苏省昆山市中医医院; 3. 上海市针灸经络研究所

[摘要] **目的** 探讨艾灸天枢穴治疗溃疡性结肠炎(UC)的可能作用机制。**方法** 将42只SD大鼠随机分为正常组9只和造模组33只。造模组采用自由饮用3.5%葡聚糖硫酸钠盐(DSS)溶液7天制备UC大鼠模型。32只造模成功, 将其随机分为模型组、艾灸组、铁死亡抑制剂组、溶媒对照组, 每组8只。正常组和模型组只做与干预组相同的抓取固定; 艾灸组取“天枢穴”(双侧)进行温和灸, 每次每穴10 min; 铁死亡抑制剂组采用浓度为6 mg/ml的铁死亡抑制剂利普司他丁-1(Liproxstatin-1)以10 mg/kg腹腔注射; 溶媒对照组给予5%二甲基亚砷(DMSO)1.67 ml/kg腹腔注射。各组均每日1次, 连续8天。干预后进行结肠大体形态损伤指数(CMDI)评分, HE染色观察大鼠结肠组织形态结构变化, 酶联免疫吸附测定法检测血清二胺氧化酶(DAO)表达, 微板法检测血清D-乳酸(D-LA)含量, TUNEL染色观察结肠细胞死亡情况, 免疫荧光法检测结肠组织活性氧(ROS)表达, 比色法检测结肠铁离子的含量, 免疫组织化学法检测结肠谷胱甘肽过氧化物酶4(GPX4)表达。**结果** 与正常组比较, 模型组与溶媒对照组大鼠结肠结构破坏严重, CMDI评分升高($P<0.01$), HE染色可见浅表性溃疡, 黏膜层破坏明显, 黏膜下层大量炎性细胞浸润和水肿, 结肠细胞死亡数增多, 血清DAO、D-LA及结肠组织铁离子、ROS含量均增多, 结肠组织GPX4蛋白表达减少($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与模型组比较, 艾灸组、铁死亡抑制剂组大鼠结肠黏膜、腺体有不同程度修复, 肠道炎症减轻, 细胞死亡数显著减少, CMDI评分明显降低, 血清DAO、D-LA及结肠组织ROS、铁离子含量均明显减少, 结肠组织GPX4蛋白表达增多($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。**结论** 艾灸“天枢穴”能降低结肠组织铁离子和ROS含量, 上调GPX4蛋白表达, 抑制铁死亡, 可能是其促进UC结肠黏膜愈合、治疗UC的作用机制之一。

[关键词] 溃疡性结肠炎; 艾灸; 天枢穴; 铁死亡; 氧化损伤

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是一种以腹痛、腹泻、黏液性血便等为主要临床表现的慢性非特异性肠道炎症性疾病, 以结直肠黏膜层及黏膜下层损伤为主, 并逐渐向全结肠蔓延, 可损及回盲部, 病程迁延反复、难以治愈^[1-2]。目前UC的发病原因及机制尚不明确, 可能与免疫功能紊乱、肠道菌群失调、肠黏膜炎症损伤等有关^[3]。铁死亡是一种非凋亡形式的细胞死亡, 表现为细胞内

铁离子累积、活性氧增多^[4]。研究发现, UC患者肠黏膜中铁死亡明显增加, 肠道炎症反应加重^[5]。结肠细胞异常铁死亡是黏膜损伤的重要机制, 肠道中的铁过载会导致严重的氧化应激, 并通过芬顿反应促进脂质过氧化, 从而导致UC的发病^[6]。因此, 重建细胞铁离子代谢稳态、降低脂质过氧化累积或是抑制细胞铁死亡、保护结肠黏膜而治疗UC的重要途径。课题组前期研究证实, 艾灸治疗UC不仅可以改善其临床症状和病理特征, 还可抑制炎症反应、促进黏膜溃疡修复^[7-9], 但作用机制尚未完全阐明。天枢穴为足阳明胃经腧穴, 具有升清降

基金项目: 国家自然科学基金(82104985); 上海市自然科学基金(19ZR1451600, 23ZR1460100); 上海市领军人才项目(060)

✉ 通讯作者: zhangdan_982@163.com

浊、通调脏腑的作用,在现代临床实践中,广泛用于治疗急、慢性胃炎,阑尾炎,急、慢性肠炎,可促进胃肠道恢复正常的生理功能^[10]。本研究拟观察艾灸天枢穴对 UC 结肠组织铁死亡的调节作用,从调控铁死亡角度探讨艾灸缓解结肠黏膜损伤、治疗 UC 的可能作用机制,为其临床应用提供科学依据。本研究通过上海市岳阳中西医结合医院实验室动物伦理委员会批准(伦理批号:YYLAC-2021-144)。

1 材料与方法

1.1 动物

清洁级健康雄性 SD 大鼠 42 只,体质量(160±20) g,由上海斯莱克实验动物有限公司提供,使用许可证号:SYXK(沪)2018-0040。饲养环境:12 h 昼夜节律交替,室内温度(20±2)℃,室内湿度 50%~70%,自由饮水、摄食。适应性饲养 3 天后开展实验。

1.2 主要试剂与仪器

葡聚糖硫酸钠盐(DSS,批号:160110),美国 MP Biomedicals 公司;动物实验专用艾条(批号:HY-JJAT-02-02),南阳汉医艾绒有限责任公司;戊巴比妥钠(批号:57330),美国 Sigma 公司;利普司他丁-1(Liproxstatin-1,批号:S7699),美国 Selleck 公司;二甲基亚砜(DMSO,批号:ST038)、盐酸乙醇快速分化液(20×,批号:C0163L),中国碧云天生物科技有限公司;TUNEL 试剂盒(批号:11684817910),瑞士 Roche 公司;活性氧(ROS)高质荧光检测试剂盒(批号:GMS10016),上海杰美基因医药科技有限公司;亚铁离子比色法测试盒(批号:E-BC-K773-M),武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司;谷胱甘肽过氧化物酶 4(GPX4)抗体(批号:ab125066),美国 Abcam 公司;大鼠二胺氧化酶(DAO)ELISA 检测试剂盒(批号:YJ003420)、D 乳酸含量(D-LA)试剂盒(批号:ml254480V),上海酶联生物科技有限公司;Dako REAL EnVision 兔鼠通用二抗检测试剂盒(批号:GK500710),丹麦 Dako 公司;苏木素-伊红(HE)染色液(批号:D006),南京建成科技有限公司;无水乙醇(批号:1009218)、二甲苯(批号:10023418)、中性树胶(批号:0004160)、多聚甲醛(批号:80096618),国药集团化学试剂有限公司;OCT 冰冻切片包埋剂(批号:3801480),德国 Lecia 公司。

全自动组织脱水机(型号:ASP300S)、石蜡

包埋机(型号:EG 1160)、石蜡切片机(型号:RM 2235)、烤片机(型号:HI1210)、冰冻切片机(型号:CM1950),德国 Lecia 公司;台式通用冷冻离心机(型号:ST16R),美国 Thermo Fisher 公司;光学显微镜(型号:BX53)、荧光光源(型号:U-HGLGPS),日本 Olympus 公司;多功能酶标仪(型号:SynergyTMH4),美国 Bio Tek 公司。

1.3 模型制备方法

根据 SPSS 25.0 软件生成的随机数字表,将 42 只 SD 大鼠随机分为正常组 9 只和造模组 33 只。造模组采用自由饮用 3.5% DSS 溶液 7 天制备 UC 模型,之后予以 1% DSS 溶液进行低浓度维持^[11]。造模结束后,使用 SPSS 25.0 软件生成随机数字,然后选择“Select Cases”进行简单随机抽样法选取正常组和造模组各 1 只大鼠通过 HE 染色进行模型鉴定,观察结肠组织形态学变化,以造模大鼠结肠组织结构紊乱、杯状细胞缺失、黏膜上皮损伤、黏膜下层可见大量炎细胞浸润为造模成功^[12]。

1.4 分组及干预

造模后 32 只造模大鼠采用 SPSS 25.0 软件生成随机数字表分为模型组、艾灸组、铁死亡抑制剂组及溶媒对照组,每组 8 只。艾灸组大鼠抓取固定后,选取“天枢”穴(双侧)^[13]进行温和灸干预,每次每穴 10 min;铁死亡抑制剂组腹腔注射铁死亡抑制剂 Liproxstatin-1(浓度为 6 mg/ml) 10 mg/kg;溶媒对照组采用 5% 二甲基亚砜(DMSO) 1.67 ml/kg 腹腔注射;正常组和模型组只做与各干预组相同的抓取固定。各组均每日 1 次,连续 8 天。

1.5 样本采集与制备

干预结束后,各组大鼠禁食、不禁水 24 h,腹腔注射戊巴比妥钠(45 mg/kg)麻醉,沿着腹部中线切开腹部皮肤,使用无菌棉球钝性分离后充分暴露腹主动脉,取全血 5~8 ml,于离心管中静置至分层后,4℃、3000 r/min 离心 15 min(离心半径为 10 cm),取上清分装于 EP 管中,保存于-80℃冰箱中,用于血清 DAO、D-LA 含量检测。腹主动脉取血后,沿大鼠腹正中线剪开腹部皮肤,充分暴露直肠、结肠部分,自耻骨联合处至盲肠取下大鼠整个结肠,沿肠系膜纵轴剖开,取自上而下的 5~6 cm 结肠组织,用 4℃生理盐水冲洗,分为 3 段,1 段放入 4% 多聚甲醛溶液内固定用于石蜡包埋及石蜡切片;1 段采用 OCT 包埋用于 ROS 含量检测;1 段放入冻存管内保存于-80℃冰箱,用于结肠铁离子含量检测。

1.6 检测指标与方法

1.6.1 结肠组织形态学 将约 1 cm×1 cm 的结肠组织修剪后放入包埋框中,脱水,石蜡包埋,切片(厚度约 4 μm),于 41 ℃烤片台上烤片至蒸干水分,HE 染色,光学显微镜下观察各组大鼠结肠组织形态学变化。

1.6.2 结肠大体形态损伤指数 (CMDI) 大鼠处死后,肉眼观察大鼠结肠组织,对其进行结肠大体损伤评分,以反映疾病活动程度、溃疡形成及炎症损伤的严重程度。评分标准^[14]:结肠与其他组织无粘连为 0 分,结肠与其他组织剥离较易即轻度粘连为 1 分,结肠与其他组织重度粘连为 2 分;结肠局部充血、无溃疡为 1 分,结肠 1 处溃疡不伴出血和肠壁增厚为 2 分,结肠 1 处溃疡伴炎症为 3 分,结肠 2 处溃疡伴炎症为 4 分,结肠 >2 处溃疡伴炎症或炎症面积 >1 cm 为 5 分,结肠溃疡和(或)炎症面积 2 cm,病变范围每增加 1 cm,积分加 1 为 6~8 分。

1.6.3 血清 DAO、D-LA 含量检测 采用 ELISA 法检测大鼠血清 DAO 含量,采用微板法检测大鼠血清 D-LA 含量,检测均按照试剂盒说明严格操作。

1.6.4 结肠细胞死亡情况 取约 1 cm×1 cm 的结肠组织,脱水后,石蜡包埋结肠组织并切片(厚度约 4 μm),于 41 ℃烤片台上烤片至蒸干水分,采用 TUNEL 染色观察,严格按照试剂盒说明操作。每个结肠石蜡切片组织于光镜下随机选取 3 个不同视野进行拍照,使用 Image-pro plus 6.0 软件进行半定量分析,取阳性目标的积分光密度 (IOD) 进行统计。

1.6.5 结肠组织 ROS 检测 应用荧光法检测。OCT 包埋的结肠组织进行冰冻切片,组织切片厚度 10 μm。检测严格按照试剂盒说明操作。在荧光显微镜下,每个组织随机取 3 个不同视野进行拍照;使用 ImageJ 1.53 软件对检测结果进行半定量分析,取阳性目标的平均光密度(AOD)进行统计。

1.6.6 结肠组织铁离子含量测定 取各组大鼠 0.1 g 新鲜结肠组织块,采用亚铁离子比色法测试盒检测大鼠结肠铁离子含量,实验方法严格按照试剂盒操作说明书进行。在酶标仪 593 nm 处测定 OD 值,根据标准品拟合曲线计算样本铁离子含量。

1.6.7 结肠组织 GPX4 蛋白表达检测 采用免疫组化法。大鼠结肠组织脱水后(方法同结肠组织形态学观察),用石蜡包埋结肠组织并切片(厚度约 4 μm),于 41 ℃烤片台上烤片至蒸干水分,常规脱

蜡至水,PBS 洗;热抗原修复,PBS 洗;内源性过氧化物酶活性灭活,双蒸水洗;5%BSA 室温封闭 30 min;滴加一抗(1:100),4 ℃冰箱过夜;37 ℃恒温烤箱复温,PBS 洗;滴加二抗(试剂盒中已稀释),37 ℃恒温烤箱孵育;DAB 显色;苏木素复染,流水冲洗;1%盐酸乙醇分化,自来水冲洗返蓝;依次经过梯度酒精;二甲苯透明;封片,晾干后观察。每个组织于光镜下随机选取 3 个不同视野进行拍照,使用 Image-pro plus 6.0 软件进行半定量分析,取阳性目标的 IOD 进行统计。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 25.0 软件进行统计学分析。计量资料进行正态性检验,当数据符合正态分布时用均数±标准差表示,各组方差齐时采用单因素方差分析,并应用最小显著差法(LSD)进行组间差异性比较,方差不齐时采用 Brown-Forsythe 检验,用 Games-Howell 比较组间差异性;当数据为偏态分布时采用中位数(四分位数)[$M(P_{25}, P_{75})$]表示,组间比较采用 Kruskal-Wallis 秩和检验。以 $\alpha=0.05$ 为检验水准。

2 结果

实验过程中因操作不当致艾灸组 1 只大鼠死亡。

2.1 各组大鼠 CMDI 评分及血清 DAO、D-LA 含量比较

表 1 示,与正常组比较,模型组、溶媒对照组大鼠 CMDI 评分及血清 DAO、D-LA 含量明显升高($P<0.01$);与模型组比较,艾灸组、铁死亡抑制剂组大鼠 CMDI 评分及血清 DAO、D-LA 含量明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),溶媒对照组 CMDI 评分及血清 DAO、D-LA 含量差异无统计学意义($P>0.05$);与溶媒对照组比较,艾灸组、铁死亡抑制剂组大鼠 CMDI 评分及血清 DAO、D-LA 含量明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与铁死亡抑制剂组比较,艾灸组 CMDI 评分及血清 DAO、D-LA 含量差异无统计学意义($P>0.05$)。

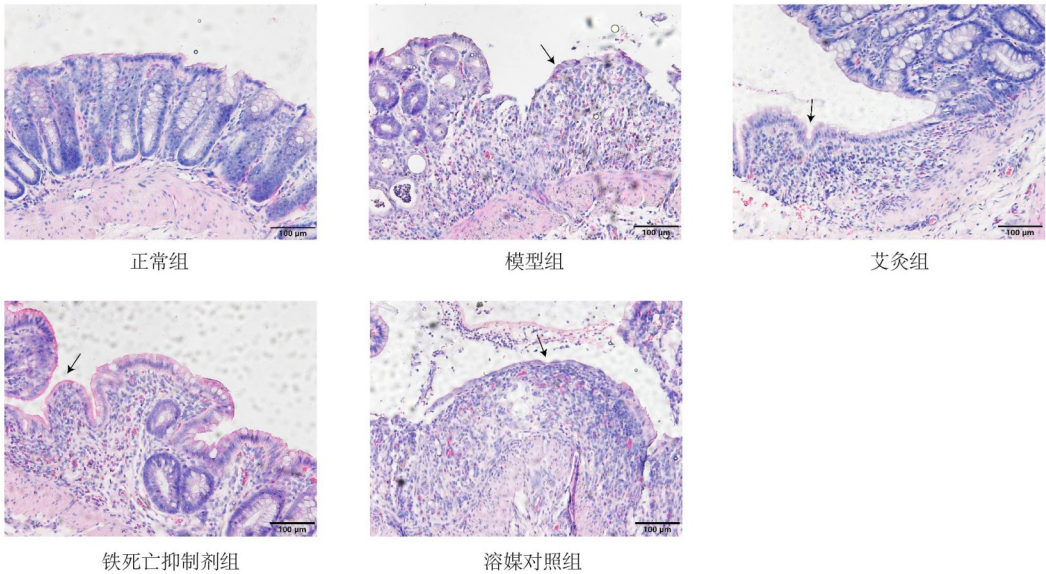
2.2 各组大鼠结肠组织形态学结果

图 1 示,正常组大鼠结肠黏膜上皮细胞完好,黏膜结构清晰,腺体排列规整,未见炎性细胞浸润、溃疡、充血、水肿等病理表现。模型组大鼠结肠组织损伤严重,可见连续性浅表溃疡形成,黏膜结构破坏明显,局部黏膜上皮细胞缺损,腺体排列紊乱且坏死萎缩,黏膜固有层、黏膜下层大量炎性细胞浸润。艾灸组及铁死亡抑制剂组大鼠结肠组织

表 1 各组大鼠结肠 CMDI 评分及血清 DAO、D-LA 含量比较

Table 1 Comparison of colonic CMDI scores and serum DAO and D-LA contents of rats in each group [$M(P_{25}, P_{75})/\bar{x}\pm s$]				
组别	鼠数	CMDI 评分/分	D-LA/ $\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$	DAO/ $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$
正常组	8	0.00 (0.00, 0.00)	35.24±4.01	9.03±1.90
模型组	8	3.00 (2.25, 3.75) ^{a)}	52.26±7.06 ^{a)}	16.47±2.19 ^{a)}
溶媒对照组	8	3.00 (2.00, 3.75) ^{a)}	51.17±4.38 ^{a)}	14.80±1.24 ^{a)}
艾灸组	7	2.00 (1.00, 2.00) ^{b) d)}	45.46±4.64 ^{c) d)}	11.76±2.24 ^{c) e)}
铁死亡抑制剂组	8	2.00 (2.00, 2.75) ^{b) d)}	44.99±4.77 ^{c) d)}	11.22±2.00 ^{c) e)}

注：CMDI，大体形态损伤指数；D-LA，D 乳酸含量；DAO，二胺氧化酶。
a) 与正常组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ ；c) 与模型组比较， $P<0.01$ ；d) 与溶媒对照组比较， $P<0.01$ ；e) 与溶媒对照组比较， $P<0.05$ 。



注：模型组与溶媒对照组黑色箭头指示为黏膜上皮损伤后形成溃疡；艾灸组与铁死亡抑制剂组黑色箭头为愈合性溃疡。

图 1 各组大鼠结肠组织病理学形态 (HE 染色, ×200)

Figure 1 Histopathological morphology of rats colon in each group

损伤较模型组均有不同程度的改善，艾灸组大鼠结肠组织可见愈合性溃疡，黏膜上皮细胞重新覆盖，可见杯状细胞及腺体修复，腺体排列尚规则，伴少量炎性细胞浸润；铁死亡抑制剂组大鼠结肠组织损伤部分修复，腺体排列欠规则，黏膜固有层及下层可见炎性细胞浸润，伴轻度充血、水肿；溶媒对照组大鼠结肠组织损伤程度及炎症反应表现与模型组相似。

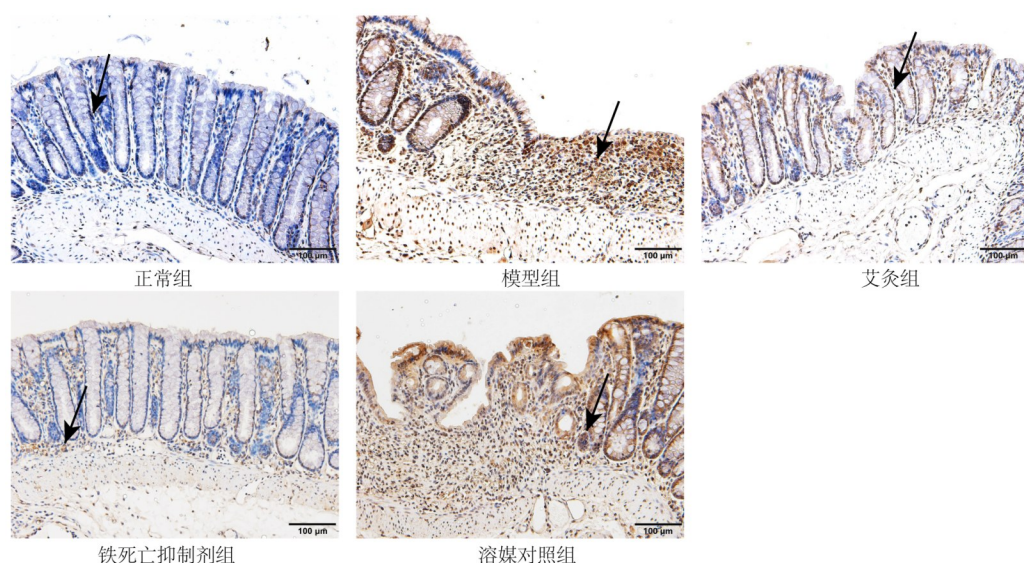
2.3 各组大鼠结肠细胞死亡情况比较

大鼠结肠死亡细胞呈棕褐色。图 2 示，正常组棕褐色表达较少，模型组与溶媒对照组棕褐色表达增多，艾灸组与铁死亡抑制剂组棕褐色较模型组与溶媒对照组表达减少。表 2 示，与正常组比较，模型组、溶媒对照组大鼠结肠细胞死亡数明显增多 ($P<0.01$)；与模型组比较，艾灸组、铁死亡抑制剂组大鼠结肠细胞死亡数明显减少 ($P<0.01$)，

溶媒对照组大鼠结肠细胞死亡数无明显减少 ($P>0.05$)；与溶媒对照组比较，艾灸组、铁死亡抑制剂组大鼠结肠细胞死亡数减少 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)；艾灸组、铁死亡抑制剂组组间差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

2.4 各组大鼠结肠组织 ROS 表达、铁离子含量、GPX4 蛋白表达比较

DAPI 核染图片，绿色荧光为结肠组织中 ROS 表达。图 3 示，正常组绿色荧光表达较少，模型组与溶媒对照组绿色荧光表达增加，艾灸组与铁死亡抑制剂组绿色荧光较模型组与溶媒对照组表达减少，但铁死亡抑制剂组绿色荧光表达略多于艾灸组。光学显微镜下可见大鼠结肠 GPX4 蛋白阳性表达呈棕褐色。免疫组化图中棕褐色为 GPX4 蛋白表达。图 4 示，正常组棕褐色表达较多，模型组与溶媒对照组棕褐色表达减少，艾灸组与铁死亡抑制剂



注：黑色箭头指示为结肠死亡细胞。

图2 各组大鼠结肠组织病理学形态（免疫组化，×200）

Figure 2 Histopathological morphology of rat colon in each group

表2 各组大鼠结肠细胞死亡及结肠组织 ROS 表达、铁离子含量、GPX4 蛋白表达比较

Table 2 Comparison of colonic cell death and ROS expression, Fe ions content, and GPX4 protein expression in colonic tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	细胞死亡数/IOD	ROS/AOD	铁离子含量/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	GPX4/IOD
正常组	8	24143.75±9018.30	67.82±25.56	52.28±25.84	31081.62±8325.90
模型组	8	65551.91±8248.05 ^{a)}	150.40±10.66 ^{a)}	187.63±54.89 ^{a)}	15699.35±6433.29 ^{a)}
溶媒对照组	8	42932.90±16982.57 ^{a)}	132.39±25.67 ^{a)}	179.11±36.50 ^{a)}	14070.49±9454.76 ^{a)}
艾灸组	7	20290.46±10901.92 ^{b) d)}	74.53±8.04 ^{b) d)}	74.57±38.12 ^{b) d)}	29968.62±9326.80 ^{c) d)}
铁死亡抑制剂组	8	27798.49±15954.73 ^{b) e)}	86.03±24.58 ^{b) e)}	77.41±16.43 ^{b) d)}	26708.57±8094.82 ^{b) e)}

注：ROS，活性氧；GPX4，谷胱甘肽过氧化物酶4。

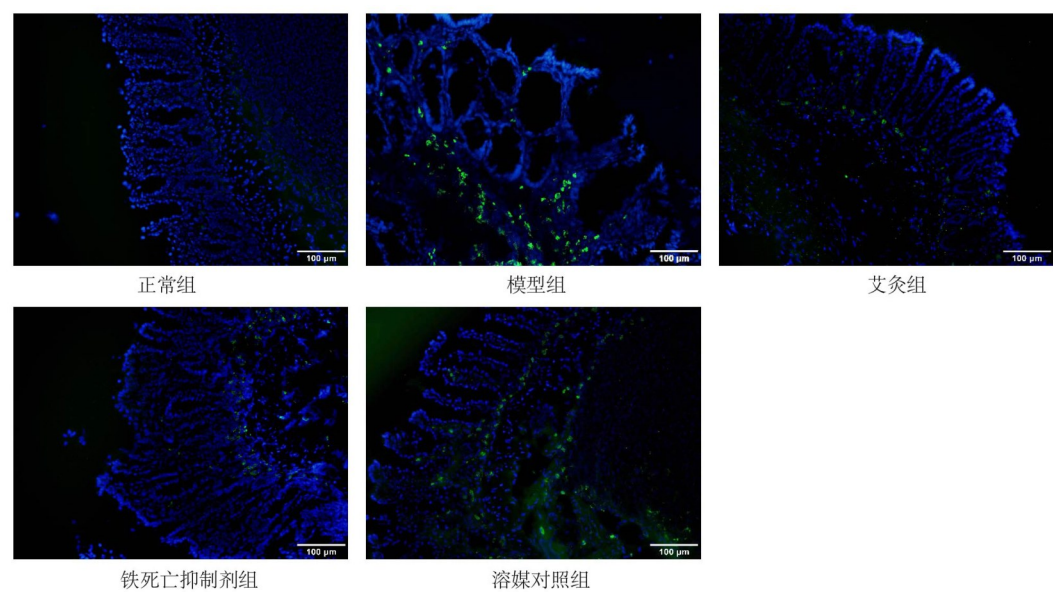
a) 与正常组比较， $P < 0.01$ ；b) 与模型组比较， $P < 0.01$ ；c) 与模型组比较， $P < 0.05$ ；d) 与溶媒对照组比较， $P < 0.01$ ；e) 与溶媒对照组比较， $P < 0.05$ 。

组棕褐色较模型组与溶媒对照组表达增多。表2示，与正常组比较，模型组、溶媒对照组大鼠结肠组织 ROS 表达、铁离子含量明显增多，GPX4 蛋白表达明显减少 ($P < 0.01$)；与模型组比较，艾灸组、铁死亡抑制剂组大鼠结肠组织 ROS 表达、铁离子含量明显减少，GPX4 蛋白表达增多 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)，溶媒对照组各指标差异无统计学意义 ($P > 0.05$)；与溶媒对照组比较，艾灸组、铁死亡抑制剂组大鼠结肠组织中 ROS 表达、铁离子含量明显减少，GPX4 蛋白表达增多 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)；与铁死亡抑制剂组比较，艾灸组各指标差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3 讨论

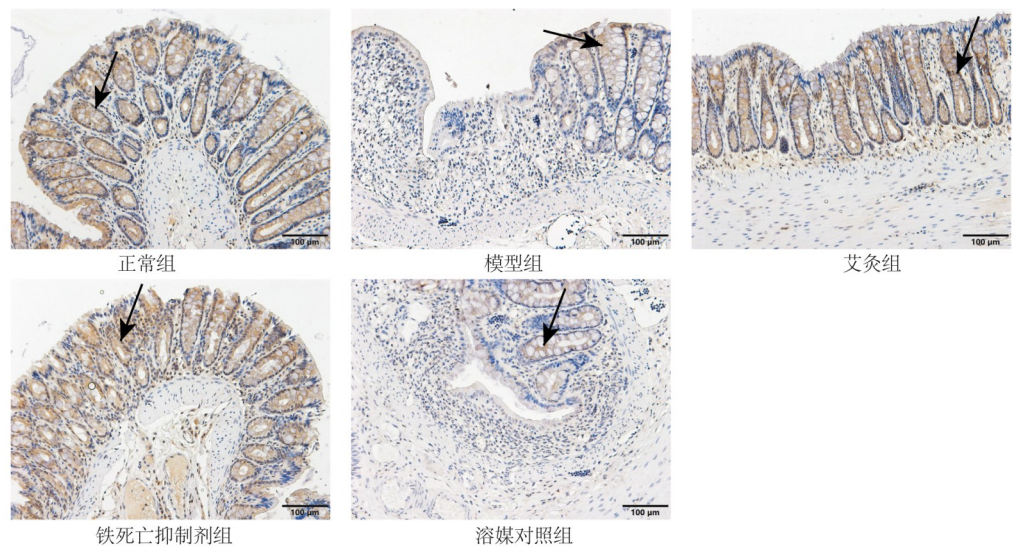
UC 属中医“肠澼”“痢疾”“泄泻”等范畴，病位主要在肠，与肝、脾、肺、肾的关系密切，属

本虚标实^[15]。本病多由脾胃虚弱、外感湿热、饮食不节或情志失调所致，以外感和内伤为其诱因，致湿浊留滞肠道，血络受损，遂致本病。治疗应标本兼顾，以运脾化湿止泻、温肾健脾益气为主。艾灸作为中医特色疗法已在 UC 的诊治过程中得到广泛应用。研究证实，艾灸治疗 UC 的临床疗效肯定，能够明显降低 UC 患者疾病活动指数，提高生活质量，改善黏膜损伤^[16-17]。天枢穴位于腹部，属足阳明胃经腧穴，大肠经之募穴。《千金要方》记载：“大便泄数，并灸天枢。”UC 病位在肠，胃与大肠相通，同气相求，故胃经穴位对肠腑病有较好的治疗作用，天枢穴同时是募穴，体现了针灸腑病多取募穴和“经脉所过，主治所及”的特点。天枢穴是人体气机升降之枢纽，对肠腑疾病具有双向良性调节作用，广泛用于治疗肠道疾病，如腹痛、便秘和腹泻，也是动物实验研究中针灸干预 UC 的常



注：ROS，活性氧。

图3 各组大鼠结肠组织ROS表达（免疫荧光，×200）
Figure 3 Expression of ROS in colon tissue of rats in each group



注：黑色箭头指示为GPX4蛋白阳性表达；GPX4，谷胱甘肽过氧化物酶4。

图4 各组大鼠结肠组织GPX4蛋白表达（免疫组化，×200）
Figure 4 Expression of GPX4 protein in colon tissue of rats in each group

用腧穴^[18-19]。本研究结果显示，与正常组比较，模型组、溶媒对照组大鼠CMDI评分明显升高，结肠结构破坏严重，可见明显炎性损伤。经过艾灸和铁死亡抑制剂干预后，大鼠CMDI评分明显降低，结肠损伤均有改善，肠道炎症减轻，提示艾灸和铁死亡抑制剂干预对UC大鼠结肠损伤有较好的改善作用，而溶媒对照组则无明显作用。

铁死亡作为一种非凋亡形式的细胞死亡，其特征是铁依赖的脂质过氧化物增多，ROS积累，引发

脂质过氧化反应^[20]。铁死亡在炎症反应中具有重要作用，可释放损伤相关分子模式（DAMP）并诱导炎症反应，且研究提示几种作为铁死亡抑制剂的抗氧化剂显示出抗炎作用^[21]。研究表明，铁死亡是结肠反复损伤、UC致病的重要机制^[22]。结肠细胞中有几种抗氧化系统，其中抗氧化酶如GPX4等在UC病理条件下通常处于失调状态，在UC动物模型中可观察到GPX4失活，肠道内脂质氧化物累积，从而发生氧化应激反应，造成脂质、DNA、蛋

白质等大分子损伤,引起肠黏膜屏障的破坏^[23]。DAO是肠黏膜上皮细胞产生的细胞内酶,当肠黏膜受损时DAO便被释放入血;D-LA是细菌发酵的产物,肠黏膜通透性增加时,肠道中细菌产生大量D-LA,使得血清中D-LA含量增加^[24]。本研究显示,模型组较正常大鼠血清DAO、D-LA含量上调,提示UC大鼠肠黏膜受损;艾灸组与铁死亡抑制剂组大鼠较模型组及溶媒对照组大鼠血清DAO、D-LA含量下调,提示艾灸及铁死亡抑制剂Liproxstatin-1均能促进UC大鼠黏膜愈合,调节黏膜通透性和屏障功能,改善结肠损伤,而DMSO对大鼠血清DAO、D-LA含量无明显影响。

另有研究提示,铁死亡与UC结肠氧化损伤有关,对UC患者^[25]和UC模型小鼠^[26]使用铁补充剂会导致肠道铁超载,活性氧增加,扰乱肠道菌群,加重UC症状。谷胱甘肽(GSH)消耗和GPX4失活为铁死亡的重要标志,在UC动物模型中可观察到GSH消耗和GPX4失活,抗氧化能力减弱,加重氧化应激而损伤肠道^[27]。游离铁离子在体内主要通过芬顿反应生成具有强氧化作用的羟自由基,因而铁离子被认为是最重要的氧化还原反应催化剂之一,当细胞内铁稳态被打破后,过量的铁离子通过芬顿反应将过氧化氢和脂质过氧化物转化为ROS,增加铁死亡发生的风险^[28]。在本研究中,模型组大鼠较正常组结肠组织铁离子含量明显增高,细胞死亡增多,ROS表达亦明显增加,GPX4蛋白表达下降,提示随着铁离子含量增加,GPX4抗氧化活性降低,导致细胞内大量ROS累积,促使结肠细胞铁死亡,造成肠黏膜损伤和结肠炎。研究显示,在DSS诱导的UC模型中,运用铁死亡抑制剂后,UC模型小鼠体质量、结肠长度明显增加,铁死亡相关指标也发生显著改善^[29],这与本研究结果一致。本实验以铁死亡抑制剂Liproxstatin-1为对照,观察到艾灸组在降低铁离子、ROS含量及结肠细胞死亡数,减轻氧化损伤,抑制铁死亡,改善大鼠结肠病理损伤方面与Liproxstatin-1具有相似的作用,而DMSO对其无明显影响。

综上所述,艾灸“天枢穴”能降低UC模型大鼠结肠组织铁离子和ROS含量,上调GPX4表达,进而减轻氧化损伤,抑制铁死亡,这可能是其促进结肠黏膜愈合的作用机制之一。本研究的局限性:本实验采用了铁死亡抑制剂作为阳性对照,间接证实了艾灸具有与其相似的作用,后期实验可补充设计在铁死亡激动剂基础上进行艾灸干预,从而直接

证实艾灸通过调节铁死亡改善UC结肠黏膜损伤和抑制炎症反应。

参考文献

- [1]SEGAL JP, LEBLANC JF, HART AL. Ulcerative colitis: an update[J]. Clin Med (Lond), 2021, 21(2):135-139.
- [2]KUCHARZIK T, KOLETZKO S, KANNENGIESSER K, et al. Ulcerative colitis-diagnostic and therapeutic algorithms [J]. Dtsch Arztebl Int, 2020, 117 (33-34): 564-574.
- [3]PORTER RJ, KALLA R, HO GT. Ulcerative colitis: recent advances in the understanding of disease pathogenesis [J]. F1000Res, 2020, 9: F1000 Faculty Rev-294. doi: 10.12688/f1000research.20805.1.
- [4]LIANG D, MINIKES AM, JIANG X. Ferroptosis at the intersection of lipid metabolism and cellular signaling [J]. Mol Cell, 2022, 82(12): 2215-2227.
- [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]GAO W, ZHANG T, WU H. Emerging pathological engagement of ferroptosis in gut diseases[J]. Oxid Med Cell Longev, 2021, 2021: 4246255. doi: 10.1155/2021/4246255.
- [7]QI Q, ZHONG R, LIU YN, et al. Mechanism of electroacupuncture and herb-partitioned moxibustion on ulcerative colitis animal model: a study based on proteomics [J]. World J Gastroenterol, 2022, 28(28): 3644-3665.
- [8]ZHANG N, ZHANG Q, XIE L, et al. Electroacupuncture and moxibustion regulate hippocampus glia and mitochondria activation in DSS-induced colitis mice [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2020, 2020: 2530253. doi: 10.1155/2020/2530253.
- [9]SHEN Y, CUI Y, SHI Z, et al. Investigating the influence of moxibustion on colonic mucosal barrier in rats with dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis [J]. J Acupunct Tuina Sci, 2022, 20(1): 1-11.
- [10]邵佳凯,石广霞,王宇,等. 天枢穴刺灸方法与其临床主治疾病关系的研究[J]. 中华中医药杂志,2020,35(8):4197-4200.
- [11]WIRTZ S, POPP V, KINDERMANN M, et al. Chemically induced mouse models of acute and chronic intestinal inflammation [J]. Nat Protoc, 2017, 12(7): 1295-1309.
- [12]CHASSAING B, AITKEN JD, MALLESHPA M, et al. Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice [J]. Curr Protoc Immunol, 2014, 104: 15.25.1-15.25.14. doi: 10.1002/0471142735.im1525s104.

- [13]余曙光,郭义. 实验针灸学[M]. 上海:上海科学技术出版社, 2014:146-147.
- [14]BELL CJ, GALL DG, WALLACE JL. Disruption of colonic electrolyte transport in experimental colitis [J]. *Am J Physiol*, 1995, 268(4 Pt 1): G622-G630.
- [15]牛少娟,张晓艳,丁晓坤,等. 溃疡性结肠炎病因病机述评[J]. *河南中医*, 2019, 39(5): 799-801.
- [16]L XY, Y G, W LJ, et al. Regulatory effects of moxibustion on ubiquitin and NLRP3 proteins in colon of ulcerative colitis rats [J]. *J Acupunct Tuina Sci*, 2020, 18(2): 96-104.
- [17]顾沐恩,赵继梦,吴焕淦,等. 隔姜灸天枢穴对UC大鼠结肠组织的miRNA表达谱的影响[J]. *上海针灸杂志*, 2020, 39(6): 766-774.
- [18]杨玲,黄艳,黄任佳,等. 艾灸预处理天枢穴对溃疡性结肠炎大鼠结肠TLR4/TRIF信号通路调节作用的研究[J]. *上海针灸杂志*, 2019, 38(8): 819-826.
- [19]HUANG Y, MA Z, CUI YH, et al. Effects of herb-partitioned moxibustion on the miRNA expression profiles in colon from rats with DSS-induced ulcerative colitis [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2017, 2017: 1767301. doi:10.1155/2017/1767301.
- [20]TANG D, CHEN X, KANG R, et al. Ferroptosis: molecular mechanisms and health implications [J]. *Cell Res*, 2021, 31(2): 107-125.
- [21]SUN Y, CHEN P, ZHAI B, et al. The emerging role of ferroptosis in inflammation [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 127: 110108. doi: 10.1016/j.biopha. 2020. 110108.
- [22]XU S, HE Y, LIN L, et al. The emerging role of ferroptosis in intestinal disease [J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(4): 289.
- [23]耿子翔,聂小丽,刘鹏,等. 电针对卵巢早衰小鼠铁死亡的影响[J]. *上海针灸杂志*, 2023, 42(2): 175-181.
- [24]CAI J, CHEN H, WENG M, et al. Diagnostic and clinical significance of serum levels of D-lactate and diamine oxidase in patients with crohn's disease [J]. *Gastroenterol Res Pract*, 2019, 2019: 8536952. doi: 10.1155/2019/8536952.
- [25]KOBAYASHI Y, OHFUJI S, KONDO K, et al. 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.
- [26]MOON S, KIM M, KIM Y, et al. Supplementation with high or low iron reduces colitis severity in an AOM/DSS mouse model [J]. *Nutrients*, 2022, 14(10): 2033.
- [27]TANG B, ZHU J, FANG S, et al. Pharmacological inhibition of MELK restricts ferroptosis and the inflammatory response in colitis and colitis-propelled carcinogenesis [J]. *Free Radic Biol Med*, 2021, 172: 312-329. doi: 10.1016/j.freeradbiomed. 2021. 06. 012.
- [28]GAO G, LI J, ZHANG Y, et al. Cellular iron metabolism and regulation [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1173: 21-32. doi:10.1007/978-981-13-9589-5.
- [29]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. doi: 10.1016/j.imlet. 2020. 06. 005.

Effects of Moxibustion at “Tianshu” (ST25) on Ferroptosis and Oxidative Damage in Colon Tissue of Ulcerative Colitis Model Rats

LIU Li¹, LU Yunqiong¹, CAO Yaojian¹, LI Hongna¹, JIN Youyou², KONG Xiehe³, FAN Xiaopeng¹, HONG Jue³, MA Xiaopeng³, ZHANG Dan³

1. Yueyang Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai, 200437; 2. Kunshan Hospital of Chinese Medicine, Jiangsu; 3. Shanghai Research Institute of Acupuncture and Meridian

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of moxibustion at tianshu (ST 25) in treating ulcerative colitis (UC). **Methods** Forty-two SD rats were randomly divided into normal (n=9) and modeling group (n=33). UC model was prepared by freely drinking of 3.5% dextran sulfate sodium salt (DSS) solution for 7 days in the modeling group. Thirty-two successfully modeled rats were randomly divided into model group, moxibustion group, ferroptosis inhibitor group, and vehicle control group, with eight rats in each group. The normal and model groups only did the same grasping fixation as the intervention groups; the moxibustion group was treated with mild moxibustion at the bilateral tianshu (ST 25) for 10 min each time; the ferroptosis inhibitor group was intervened with 6 mg/ml of ferroptosis inhibitor liproxstatin-1 by intraperitoneal injection(10 mg/kg); and the vehicle group was given 1.67 ml/kg of 5% dimethyl sulfoxide (DMSO) intraperitoneally. Each group was treated once a day for 8 days. After the interven-

tion, the Colon Gross Morphological Damage Index (CMDI) score was evaluated. HE staining was used to observe the morphological and structural changes of rat colon tissue. The serum diamine oxidase (DAO) expression was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), while the content of D-lactic acid (D-LA) in the serum was determined by the microplate method. The colonic cell death was observed by TUNEL staining, and the expression of reactive oxygen species (ROS) in the colon was detected by immunofluorescence. The content of colonic Fe ions was tested by the colorimetric method, and the expression of glutathione peroxidase 4 (GPX4) in the colon was detected by immunohistochemistry. **Results** Compared to those in the normal group, the colonic tissue damage of rats in the model group and vehicle control group was serious, with an increased CMDI score ($P < 0.01$); visible superficial ulcers, obvious destruction of the mucosal layer, and a large number of inflammatory cells infiltrating the submucosal layer alongside edema were found; the colonic cell death, serum DAO, D-LA and colon tissue Fe ion and ROS contents all increased, while GPX4 protein expression in the colon tissue decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared to those in the model group, the colonic mucosa and glands of rats were repaired to varying degrees, and the intestinal inflammation was alleviated in the moxibustion and ferroptosis inhibitor groups, with decreased cell death, CMDI score, serum DAO and D-LA concentrations, colonic Fe ions and ROS contents, and increased GPX4 protein expression ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** Moxibustion at tianshu (ST 25) can reduce the content of colonic Fe ions and ROS, upregulate GPX4 expression, and inhibit ferroptosis in UC rats, which may explain how it promotes colonic mucosal healing and treat UC.

Keywords ulcerative colitis; moxibustion; tianshu (ST 25); ferroptosis; oxidative damage

(收稿日期: 2023-02-13; 修回日期: 2023-05-13)

[编辑: 王利芬]

(上接第 1575 页)

Effects of *Shenfu Huang Formula* (参附黄配方) on Oxidative Damage of Cerebral Cortex in Septic Sepsis Model Mice

WANG Yuchen¹, WANG Xuerui², XU Xiaolong², LI Zhenxuan², BAI Yunjing², LIU Qingquan²

1. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing, 100029; 2. Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University

ABSTRACT **Objective** To investigate the effect and mechanism of *Shenfu Huang Formula* (参附黄配方, SF) on neuron injury in sepsis. **Methods** C57BL/6J mice were randomly divided into sham operation group, sepsis group and SF group, with 26 mice in each group. After anesthesia in the sham operation group, the cecum was left free, without ligation and needling. Cecal ligation and perforation (CLP) was used to induce sepsis model in the sepsis group and SF group. Four hours after modeling, the SF group was given 2.5 g/(kg·d) of SF by gavage, every 12 hours, twice a day for three days, while the sepsis group and the sham operation group were given 0.5 ml of normal saline by gavage in the same administration way. Seventy-two hours after modeling, Nissl staining was used to observe the changes in the number of neurons in the prefrontal cortex of the brain, and dihydroethidium staining was used to detect active oxygen content in the cerebral cortex tissue; 8-Hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) immunofluorescence staining was used to evaluate the oxidative DNA damage in cerebral cortex. **Results** Compared to those of the sham operation group, the number of neurons in the prefrontal cortex of the sepsis group were reduced, while the content of reactive oxygen species increased, and the expression of 8-OHdG increased ($P < 0.05$). Compared to those of the sepsis group, the number of neurons in the SF group increased, while the content of reactive oxygen species were inhibited, and the expression of 8-OHdG decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** SF has a protective effect on the damage of prefrontal cortex neurons in CLP mice, and its mechanism may be related to the reduction of oxidative stress and oxidative DNA damage.

Keywords sepsis; cerebral cortex; oxidative stress; oxidative DNA damage; *Shenfu Huang Formula* (参附黄配方)

(收稿日期: 2023-01-29; 修回日期: 2023-03-14)

[编辑: 王利芬]