

尹小溪,陈孜旋,袁漪,等. 地榆通过影响 PPARG 和 SLC7A11/GPX4 表达减轻溃疡性结肠炎小鼠损伤 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(7): 20-28.

Yin XX, Chen ZX, Yuan Y, et al. Sanguisorbae Radix alleviates damage in ulcerative colitis model mice based on PPARG and SLC7A11/GPX4 [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(7): 20-28.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.07.003

地榆通过影响 PPARG 和 SLC7A11/GPX4 表达减轻 溃疡性结肠炎小鼠损伤

尹小溪,陈孜旋,袁漪,马京男,王晶,吕添熠,佟苗苗*,李丽*

(河北医科大学药学院,石家庄 050017)

【摘要】目的 基于生物信息学探究地榆 (Sanguisorbae Radix, SR) 改善小鼠溃疡性结肠炎的机制。**方法** 利用 R 语言对高通量基因表达数据库 (GEO) 中 GSE92415 数据集进行溃疡性结肠炎 (UC) 差异表达基因筛选和加权基因共表达网络分析 (WGCNA), 并结合 FerrDb 数据库, 获得 UC 相关铁死亡特征基因。对特征基因进行蛋白互作分析 (PPI) 和相关性分析, 筛选 UC 铁死亡核心基因。构建葡聚糖硫酸钠 (DSS) 诱导的 UC 小鼠模型, 并灌胃给予 SR 水提物 9 d, 记录疾病活动指数 (DAI) 和结肠长度, 采用 HE 染色法观察结肠组织病理变化, 酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 检测小鼠结肠组织炎症因子肿瘤坏死因子 (TNF)- α 、白细胞介素-6 (IL-6), 生化试剂盒检测脂质过氧化因子丙二醛 (MDA)、谷胱甘肽 (GSH) 水平, 免疫荧光法检测结肠组织闭锁小带蛋白 1 (ZO-1) 表达, 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测结肠组织过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPARG)、溶质载体家族 7 成员 11 (SLC7A11) 和谷胱甘肽过氧化物酶 4 (GPX4) 蛋白表达。**结果** 通过生物信息学筛选得到 9 个 UC 相关铁死亡特征基因, 其中核心基因为 PPARG。相关性分析发现 PPARG 与铁死亡高度相关。结合生物信息学筛选结果, 探讨 SR 改善小鼠 UC 的机制, 实验结果发现, SR 可降低 UC 小鼠 DAI 值, 缓解结肠缩短, 改善肠道粘膜屏障功能, 对 TNF- α 、IL-6、MDA、GSH 水平有显著回调作用, 并可提高结肠组织 PPARG、SLC7A11 和 GPX4 蛋白表达。**结论** 铁死亡与 UC 密切相关, SR 可通过影响 PPARG 和 SLC7A11/GPX4 蛋白, 进而改善 UC 小鼠结肠上皮损伤和功能障碍, 为 UC 治疗策略提供了思路与方向。

【关键词】 生物信息学; 溃疡性结肠炎; 铁死亡; 核心基因; 地榆

【中图分类号】 R-33

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-7856 (2024) 07-0020-09

Sanguisorbae Radix alleviates damage in ulcerative colitis model mice based on PPARG and SLC7A11/GPX4

YIN Xiaoxi, CHEN Zixuan, YUAN Yi, MA Jingnan, WANG Jing, LYU Tianyi, TONG Miaomiao*, LI Li*

(College of Pharmacy, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

【Abstract】Objective To investigate the mechanism of Sanguisorbae Radix (SR) in the treatment of ulcerative colitis (UC). **Methods** Using the GSE92415 dataset from the Gene Expression Omnibus database, we analyzed

【基金项目】 国家自然科学基金资助项目 (82003913); 河北省高等学校科学技术研究项目 (BJK2024082); 河北省自然科学基金资助项目 (H2020206010); 河北省中医药管理局项目 (20211120, 2023131)。

【作者简介】 尹小溪 (2000—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 炎症性肠病。E-mail: yinx0126@163.com

【通信作者】 李丽 (1990—), 女, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 中药活性成分及中药生物技术研究。E-mail: 19001479@hebmu.edu.cn

佟苗苗 (1985—), 女, 讲师, 研究方向: 中药药效机制研究。E-mail: 18500965@hebmu.edu.cn

* 共同通信作者

differentially expressed genes and carried out weighted gene correlation network analysis and FerrDb analysis. Core genes were identified through protein-protein interaction (PPI) network and correlation analysis. UC mouse model induced by dextran sulfate sodium (DSS) was constructed and treated with SR via intragastric administration for 9 days. Disease activity index (DAI) and colon length were recorded. Pathological changes in colon tissue were observed using the HE staining. Levels of inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) were detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Lipid peroxidation factors such as malondialdehyde (MDA) and glutathione (GSH) were detected using biochemical test kits. Protein expression levels of zonula occludens protein-1 (ZO-1) tight junction protein, peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARG), solute carrier family 7 member 11 (SCL7A11), and glutathione peroxidase 4 (GPX4) were examined by Western blot or immunofluorescence labeling.

Results Nine differentially expressed genes associated with ferroptosis were screened and *PPARG* was identified as a key gene. Correlation analysis showed a strong correlation between *PPARG* and ferroptosis. Subsequently, the potential mechanism of SR in improving UC in mice was discussed according to the bioinformatics screening results. The experimental results demonstrated that SR significantly reduced the DAI, prevented colon shortening and improved intestinal mucosal barrier function in the colon. SR decreased TNF- α and IL-6 levels, MDA content and GSH levels in colon tissues. SR also enhanced the expression of PPARG, SCL7A11 and GPX4, which reversed the effect of DSS in mice with colitis.

Conclusions Ferroptosis is closely related to UC. SR can inhibit ferroptosis by regulating PPARG and SCL7A11/GPX4 expression, thereby improving colon epithelial injury and dysfunction in UC mice. This provides ideas and directions for UC treatment strategies.

【Keywords】 bioinformatics; ulcerative colitis; ferroptosis; core genes; Sanguisorbae Radix

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 是一种慢性炎症性疾病, 目前病因不明, 其发病率逐年增加, 被世界卫生组织列为现代难治性疾病之一^[1]。研究表明 UC 的发病机制可能涉及多种因素, 例如宿主遗传、免疫应答失调、环境因素和肠黏膜屏障受损^[2-3]。UC 的治疗药物包括激素、生物制剂和免疫抑制剂^[4-6], 但其多以缓解症状为主, 具有易复发、肾损伤、严重感染和静脉血栓栓塞^[4,7]等副作用。因此, UC 治疗新策略亟待开发。铁死亡是一种铁依赖性、非凋亡细胞死亡形式^[8]。近期研究发现, 铁死亡与多种肠道疾病有关, 包括肠缺血再灌注损伤、炎症性肠病和结直肠癌^[3], 抑制铁死亡可抑制肠上皮细胞死亡、脂质过氧化及炎症状态, 从而减少结肠病理损伤^[9-10]。因此, 抑制铁死亡有望成为预防和治疗肠道疾病的新方向。地榆 (Sanguisorba Radix, SR) 是蔷薇科植物地榆 *Sanguisorba officinalis* L. 或长叶地榆 *S. officinalis* L. var. *longifolia* (Bert.) Yü et Li 的干燥根, 始载于《神农本草经》, 具有止血凉血、清热解毒、收敛止泻功效, 多用于止血、烧烫伤、腹泻、痔疮^[11]、结肠癌^[12-13]、UC^[14]、白细胞减少等疾病治疗^[15]。现代研究发现, SR 化学成分主要包括鞣质、酚酸、皂苷等化合物^[16], 具有抗炎、抗菌、抗氧化、抗肿瘤等作用^[17-18]。近期报道, SR 提取物可通过抑制 PI3K-

AKT/NF- κ B/STAT3 通路、调节脂质代谢等改善 UC 小鼠的炎症反应及黏膜屏障损伤^[14,19]。然而, 关于地榆调节铁死亡治疗 UC 的机制尚未报道。GEO 数据库收录临床样本基因芯片数据, 从中筛选得到的差异表达基因能够更加准确地体现疾病特征和生物机制。综上, 本研究通过生物信息学方法, 利用 GEO 临床芯片数据筛选 UC 相关铁死亡的核心基因, 并探讨 SR 通过抑制铁死亡缓解 UC 的作用机制, 可为治疗 UC 提供潜在靶点, 为阐明中医药治疗价值提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

24 只 7 周龄 SPF 级 C57BL/6J 雄性小鼠购自斯贝福生物技术有限公司 (中国北京) [SCXK (京) 2019-0010], 体重 (20 $\pm$ 2) g。小鼠均饲养于河北医科大学实验动物中心 [SYXK (冀) 2020-002], 给予充足的饲料和清水, 饲养环境温度 (22 $\pm$ 1) $^{\circ}$ C, 相对湿度 45%~65%, 12 h/12 h 明暗交替。本文涉及的动物实验由河北医科大学动物伦理专业委员会批准 (No. IACUC-Hebmu-P2023153), 遵守实验动物 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

SR 饮片购自中国广西仙荣中药科技有限公司

(批号 20220701),经河北医科大学赵丽丽教授鉴定为蔷薇科植物地榆 *Sanguisoba officinalis* L. 的干燥根。SR 饮片粉碎,过 100 目筛,将 30.00 g 地榆粉末与 300 mL 水混合,加热回流 2 次,每次 2 h,冷却后合并两次滤液。将滤液浓缩至生药浓度 3 g/mL 备用。

DSS(大连美仑生物技术有限公司,批号 123894-06);便隐血 OB 试剂盒(珠海贝索生物技术有限公司,批号 B230101);磷酸盐缓冲液(PBS,批号 G0002-15);丙二醛(malondialdehyde,MDA)检测试剂盒(批号 G4300-96T);还原型谷胱甘肽(reduced glutathione,GSH)检测试剂盒(批号 GM1139)、anti-ZO-1(批号 GB111402-100)均购于赛维尔生物技术有限公司;SDS-PAGE 凝胶配置试剂盒(碧云天生物技术有限公司,批号 P0012A);anti-GPX4(批号 30388-1-AP)、anti-SLC7A11(批号 26864-1-AP)、anti- β -actin(批号 81115-1-RR)、anti-PPARG(批号 16643-1-AP)一抗和 HRP 标记的二抗(批号 SA00001-2)均购于武汉三鹰生物技术有限公司。

电子天平(赛多利斯科学仪器(北京)有限公司);台式高速冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);低温型组织研磨仪(武汉塞维尔生物科技有限公司);涡旋混匀仪(武汉塞维尔生物科技有限公司);脱色水平摇床(北京六一生物科技有限公司);酶标仪(北京六一生物科技有限公司);电泳系统(美国 Bio-Rad 公司);荧光显微镜 BX63(日本奥林巴斯)。

1.3 实验方法

1.3.1 生物信息学分析

(1)UC 差异表达基因筛选

在 GEO 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)中,获得 GSE92415 数据集,分为 Control 组及 UC 组,采用 R 语言“factoextra”进行主成分分析;“limma”包进行差异分析,筛选阈值为 $P < 0.05$ 和 $|\log_2FC| \geq 1$,获得 UC 相关差异表达基因;使用“ggplot2”包绘制火山图来可视化差异表达基因。

(2)铁死亡基因集获取和加权共表达网络分析

从 FerrDb 数据库(<http://www.zhounan.org/ferrdb/>)下载铁死亡相关基因。使用 R 语言中的“WGCNA”包构建 GSE92415 基因集的 WGCNA 网络。根据基因间的无标度拓扑拟合指数($R^2 = 0.85$)以及平均连接度,确定软阈值 $\beta = 8$ 。通过构建共表达网络绘制模块聚类树状图,使用 Pearson

法分析基因模块间的相关性,选择与临床表型相关性较高的模块与 UC 差异表达基因、铁死亡基因取交集,获取 UC 相关铁死亡的差异表达基因。

(3)UC 铁死亡核心基因筛选

使用 Cytoscape 软件建立上述交集基因的 PPI 网络,利用 Cytohubba 插件筛选与 UC 相关铁死亡的核心差异表达基因。

1.3.2 实验研究

(1)UC 模型建立及 SR 给药

将 C57BL/6J 小鼠随机分为 4 组:对照组、模型组、地榆低剂量组、地榆高剂量组,每组各 6 只。在开始实验之前,动物进行 7 d 的适应性饲养。对照组在整个实验期间接受等剂量生理盐水。模型组小鼠给予 3.5% (w/v) DSS 溶液,自由饮用 7 d,然后饮用正常水 2 d,诱导实验性结肠炎。治疗组在饮用 3.5% DSS 溶液的同时,分别灌胃 SR 水提物(生药质量浓度 1.5 g/kg 和 3.0 g/kg,以成人 70 kg、等效系数 9.1 为依据),每天 1 次,持续 9 d。实验结束后处死小鼠,测量结肠长度,清除结肠内残留粪便,取近肛门端 2 cm 结肠固定在 4% 多聚甲醛中过夜,石蜡包埋;剩余组织液氮保存。

(2)苏木精和伊红(HE)染色

将石蜡结肠组织切成 5 μ m 厚度,进行 HE 染色,使用光学显微镜观察并拍照。

(3)ELISA 法检测炎症因子和试剂盒检测脂质过氧化水平

取各组结肠组织适量,加入裂解液进行匀浆后,以 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 5 min,收集匀浆上清液;采用 BCA 蛋白检测试剂盒测定蛋白浓度;ELISA 法检测炎症因子 IL-6、TNF- α ,使用生化试剂盒检测脂质过氧化 MDA、GSH 水平。

(4)免疫荧光染色

脱蜡至水后的结肠组织切片放置在 0.5% Triton X-100 的 PBS 中,室温通透 10 min,PBS 漂洗,4 $^{\circ}$ C 下与 5% BSA 的 ZO-1 一抗孵育 12 h。PBS 洗涤 2 次,每次 3 min,二抗(1:1000)室温避光孵育 2 h,PBS 洗涤 2 次,每次 3 min。加入 DAPI 染核,室温避光孵育 5 min;去除 DAPI 工作液,用 PBS 洗涤 1 次,5 min;封片,于荧光显微镜下观察并采集图像。通过 Image J 软件分析荧光强度。

(5)Western blot 检测

取各组结肠组织,加入 1% PMSF 的 RIPA 裂解液进行匀浆,BCA 试剂盒进行蛋白质定量。用 10%

SDS-PAGE 分离蛋白质并转移到聚偏二氟乙烯膜上。用 5% 牛血清白蛋白封闭 2 h, 然后将膜与 anti-SLC7A11 (1 : 1000)、anti-GPX4 (1 : 1000)、anti-PPARG (1 : 1000) 和 anti-β-actin (1 : 3000) 在 4 ℃ 孵育 12 h。TBST 洗涤膜 3 次, 每次 5 min, 将膜与 HRP 偶联的二抗 (1 : 2000) 在室温下放置 2 h, 采用 ECL 显影, 使用 Image J 软件定量相对蛋白表达水平。

1.4 统计学方法

数据以平均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。使用 GraphPad Prism 8.0.1 分析软件进行统计分析。使用单因素方差分析比较各组间的差异。以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 生物信息学分析

2.1.1 UC 差异表达基因

GSE92415 基因集中, 有 21 个对照样本, 87 个 UC 样本。PCA 结果表明, Control 组和 UC 组中基因差异显著 (图 1A)。与 Control 组相比, UC 组中筛选出 299 个差异表达基因, 其中上调基因 193 个, 下调基因 106 个, 使用火山图对 UC 差异表达基因进行可视化, 见图 1B。

2.1.2 WGCNA 关键模块分析

当软阈值 $\beta = 8$ 时, 各基因模块的平均连接度更高 (图 2A)。通过动态树切割和层次聚类绘制基因共表达模块 (图 2B)。相关性分析显示结果显示, GSE92415 基因集聚集成 16 个共表达模块。其中

red 模块 (Pearson = 0.78, $P = 7e-23$)、turquoise 模块 (Pearson = 0.71, $P = 1e-17$)、blue 模块 (Pearson = 0.59, $P = 1e-11$) 3 个模块与临床表型和 UC 的进展高度相关 (图 2C)。因此, 选择以上 3 个模块基因进行后续分析。

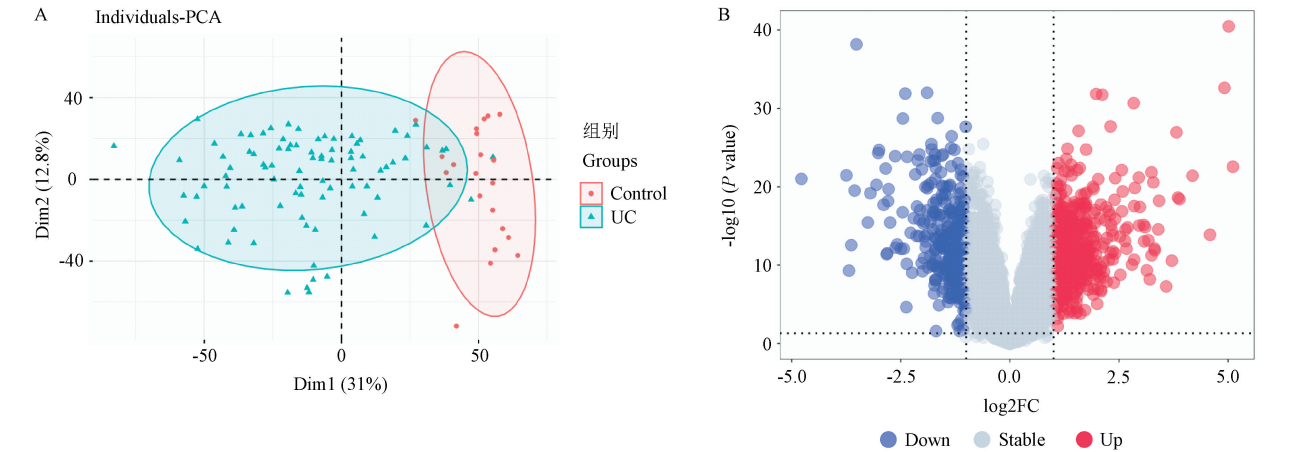
2.1.3 UC 铁死亡核心基因的筛选和相关性分析

采用 R 语言“Venn”包对 UC 差异表达基因、WGCNA 模块基因和铁死亡基因进行交集, 获得 9 个 UC 相关铁死亡特征基因 (*NOS2*、*ACSF2*、*PTGS2*、*TIMP1*、*IDO1*、*SLC16A1*、*PROK2*、*PPARG* 和 *LCN2*) (图 3A), 将 9 个基因进行蛋白质-蛋白质相互作用网络分析。通过 CytoHubba 插件筛选出 *PPARG* 是 9 个特征基因中的核心基因 (图 3B)。*PTGS2* 是铁死亡标志物, *TIMP1*、*IDO1*、*LCN2* 是铁死亡中的驱动基因, *PROK2*、*NOS2*、*ACSF2*、*SLC16A1* 是铁死亡中的抑制基因。相关性分析结果显示, 核心基因 *PPARG* 与 *TIMP1* 铁死亡正调控基因的表达呈负相关 ($r = -0.71, P < 0.01$), 与 *SLC16A1* 铁死亡负调控基因的表达呈正相关 ($r = 0.78, P < 0.01$) (图 3C), 说明 *PPARG* 可能是铁死亡的抑制基因。

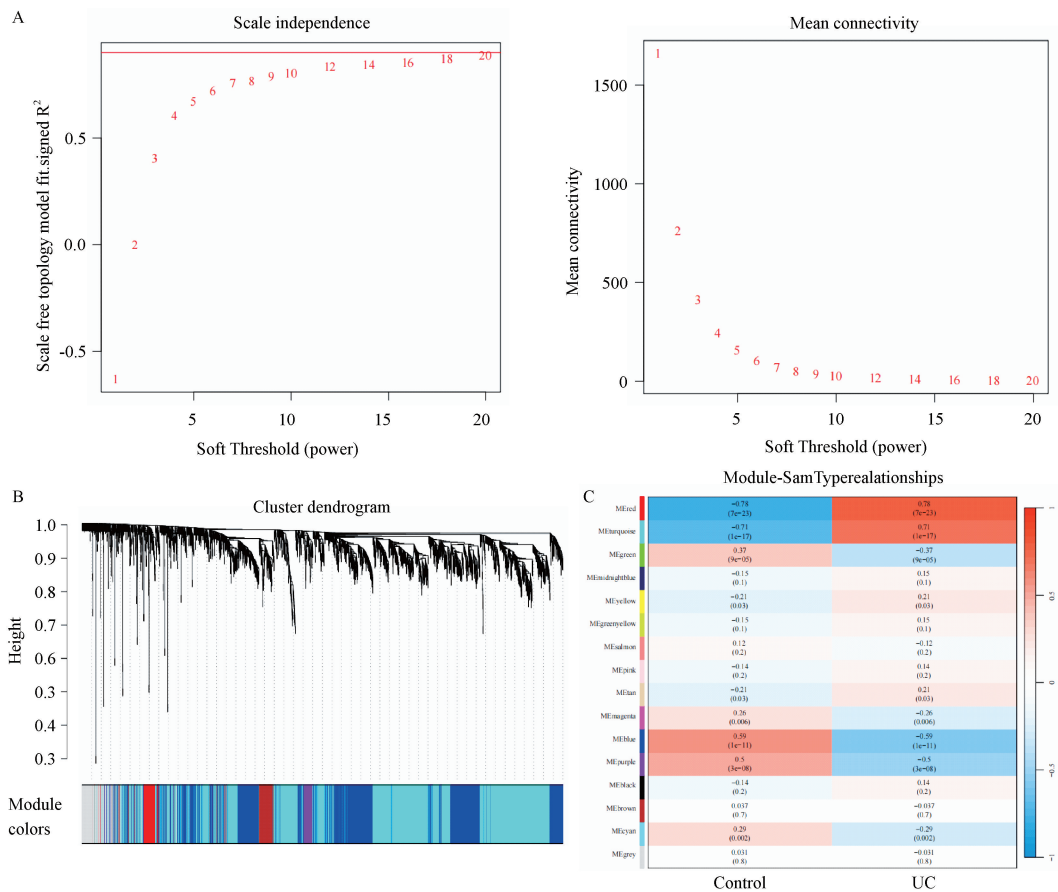
2.2 动物实验

2.2.1 SR 改善 UC 小鼠 DAI 值、结肠长度和组织病理变化

与对照组相比, 模型组小鼠 DAI 值升高, 结肠缩短 ($P < 0.001$); 与模型组相比, SR 低、高剂量组小鼠 DAI 值降低, 结肠长度增加 ($P < 0.01, P < 0.05$)。HE 结果显示, 对照组结肠黏膜上皮完整, 结构边缘清晰, 腺体整齐规则, 未见炎性细胞浸润。



注:A:PCA 图;B:UC 差异表达基因火山图。
Figure 1 UC 差异表达基因的筛选
Note. A, PCA map. B, Visual volcano map of UC differential genes.
Figure 1 Screening of UC differential genes

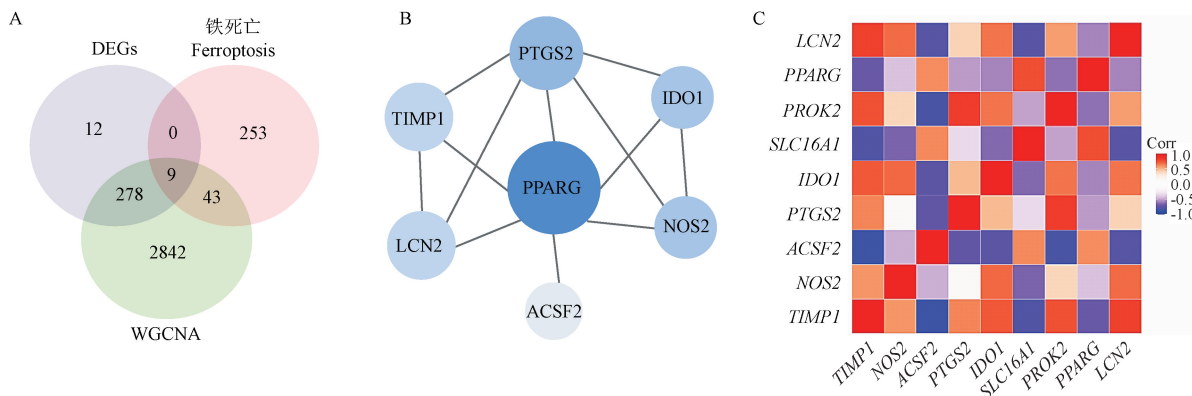


注:A:软阈值筛选结果;B:基因聚类树状图与共表达模块;C:基因模块与临床特征相关性热图。

图2 WGCNA 分析

Note. A, Analysis of independence and connectivity for various soft-thresholding powers. B, Clustering dendrograms of gene modules. C, Relationship with module eigengenes.

Figure 2 WGCNA analysis



注:A:UC 中差异表达铁死亡特征基因;B:核心基因筛选;C:Spearman 相关性分析。

图3 核心基因筛选和相关性热图

Note. A, Differential expression of iron death characteristic genes in UC. B, Core gene screening. C, Spearman correlation analysis.

Figure 3 Core gene screening and correlation heatmap

模型组结肠粘膜和粘膜下层出现大量的炎性细胞浸润,腺体萎缩破坏,杯状细胞丢失,固有层结构损伤明显。SR 给药组结肠黏膜、黏膜下层炎性减少,结构逐渐清晰,随着剂量增加,水肿、糜烂、溃疡明显减轻,见图 4。以上结果表明 SR 可一定程度逆转 UC 小鼠的肠道炎症和病理损伤。

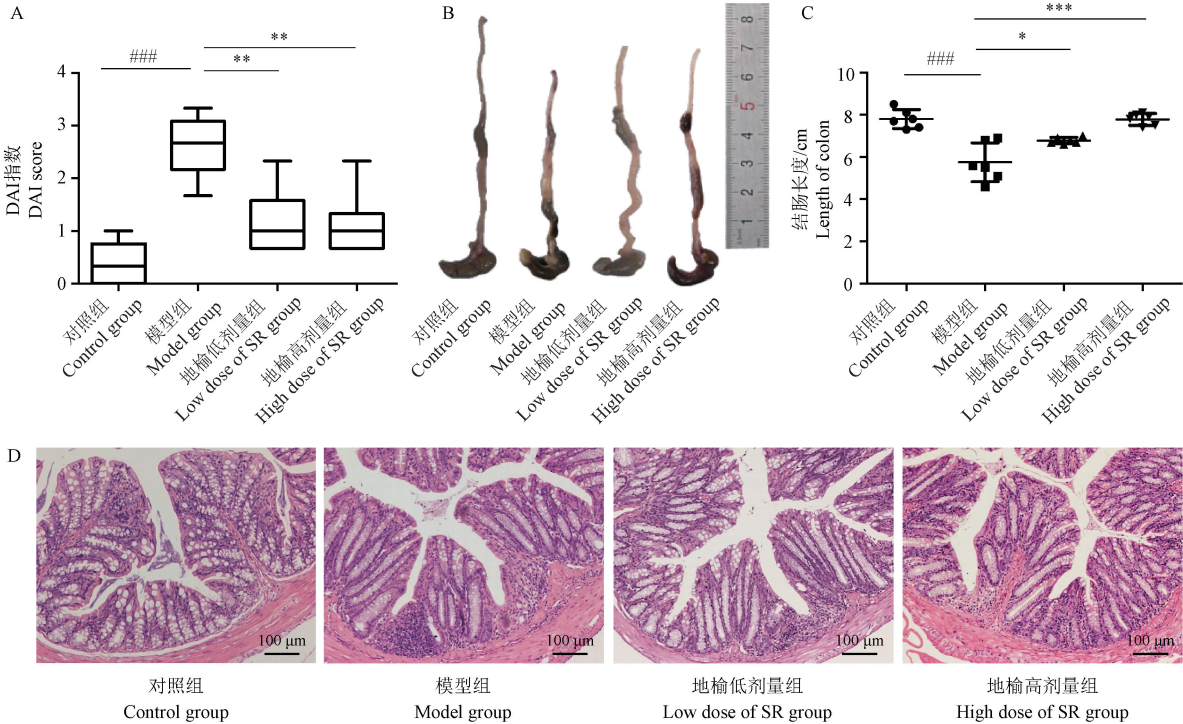
2.2.2 SR 调节 UC 小鼠结肠组织炎症、脂质过氧化水平和肠上皮屏障功能障碍

与对照组相比,模型组小鼠结肠组织 TNF- α 、IL-6 水平显著较高($P<0.001$);MDA 含量显著增加($P<0.01$),GSH 活性显著下降($P<0.01$);与模型组相比,SR 各组 TNF- α 、IL-6 水平显著较低($P<0.01$),MDA 含量下降($P<0.05$),GSH 活性明显升高($P<0.05$,图 5)。免疫荧光结果显示,模型组 ZO-

1 的蛋白荧光表达强度降低,SR 给药后 ZO-1 的蛋白荧光表达强度明显高于模型组($P<0.001$,图 6)。以上结果说明 SR 可以降低 UC 肠道炎症因子水平,调节脂质过氧化水平并改善其肠上皮屏障功能。

2.2.3 SR 增加 UC 小鼠结肠组织中 PPARG、SLC7A11 及 GPX4 的表达

Western blot 结果(图 7)显示,与对照组比较,模型组中 PPARG、SLC7A11 和 GPX4 蛋白表达明显

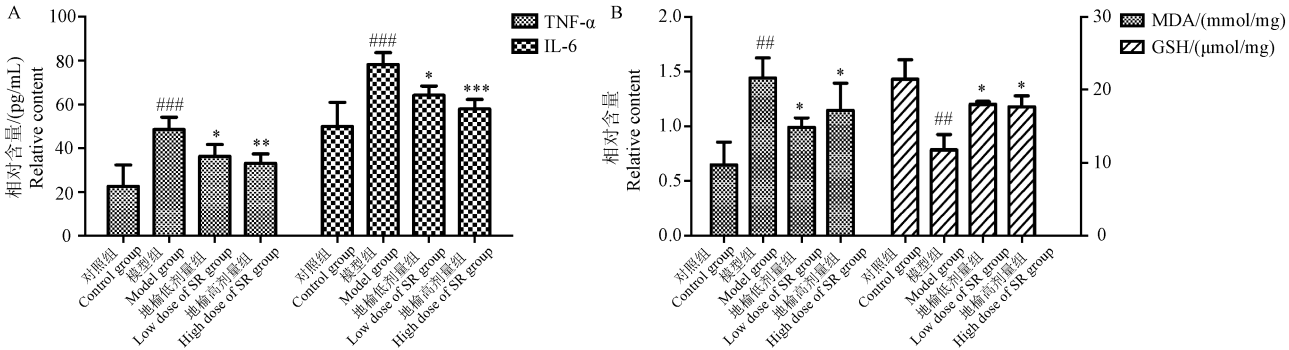


注:A;DAI 指数;B:结肠长度示例图;C:结肠长度;D:HE 染色。与对照组相比,### $P<0.001$;与模型组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$ 。

图 4 SR 对 UC 小鼠 DAI 值、结肠长度和结肠病理变化的影响

Note. A, DAI score. B, Colon length graph example. C, Length of colon. D, HE staining. Compared with control group, ### $P<0.001$. Compared with model group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

Figure 4 Effect of SR on DAI, colon length and pathological changes of colon in UC mouse

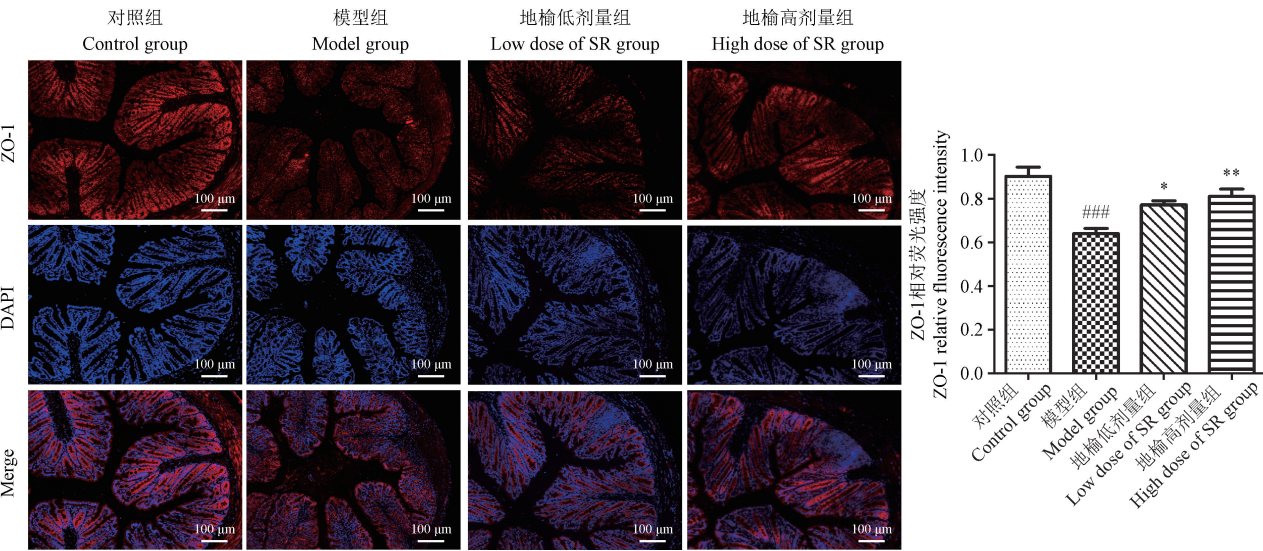


注:与对照组相比,## $P<0.01$,### $P<0.001$;与模型组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$ 。

图 5 SR 对 UC 小鼠结肠组织炎症和脂质过氧化水平的影响

Note. Compared with control group, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$. Compared with model group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

Figure 5 Effect of SR on contents of inflammatory cytokines and lipid peroxidation level in colon of UC mouse

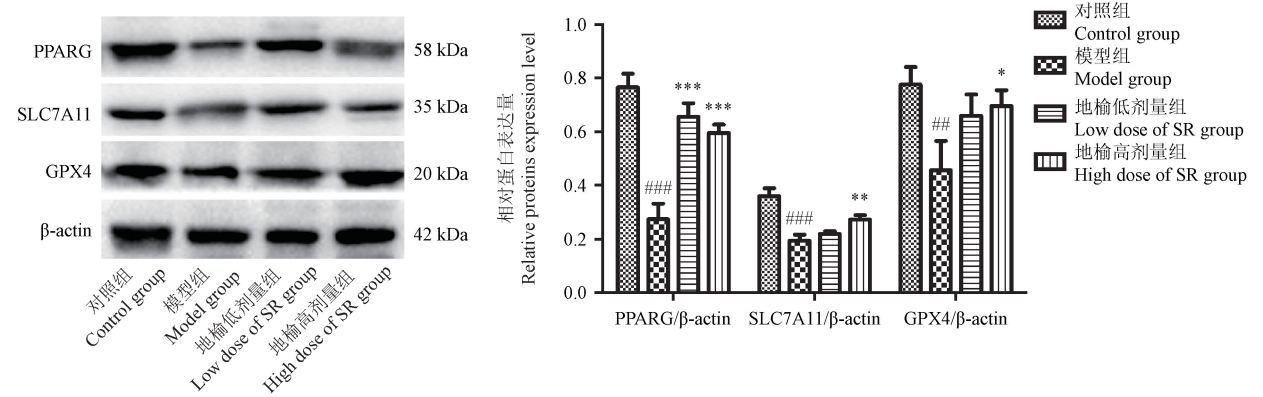


注:与对照组相比,^{###} $P<0.001$;与模型组相比,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$ 。

图 6 SR 对 UC 小鼠肠上皮屏障功能影响

Note. Compared with control group, ^{###} $P<0.001$. Compared with model group, ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$.

Figure 6 Effect of SR on contents of epithelial barrier function in colon of UC mouse



注:与对照组相比,^{##} $P<0.01$,^{###} $P<0.001$;与模型组相比,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$,^{***} $P<0.001$ 。

图 7 SR 对 UC 小鼠结肠组织 PPARG、SLC7A11 和 GPX4 表达影响

Note. Compared with control group, ^{##} $P<0.01$, ^{###} $P<0.001$. Compared with model group, ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$, ^{***} $P<0.001$.

Figure 7 Effect of SR on PPARG, SLC7A11 and GPX4 proteins in colon of UC mouse

降低 ($P<0.01$), 与模型组比较, SR 各剂量组中 PPARG、SLC7A11 和 GPX4 蛋白表达明显升高 ($P<0.05$)。以上结果表明, SR 对 UC 小鼠肠道铁死亡相关蛋白 PPARG、SCL7A11、GPX4 具有调节作用。

3 讨论

UC 是一种复杂的慢性肠道疾病,主要累及结肠黏膜及其下层,便血和腹泻是其最常见的临床症状,约 15% 的患者最终会发展为重症^[20]。目前, UC 的病因和机制仍然不明确,但免疫反应、肠上皮屏障受损、菌群失调及细胞凋亡等被认为是 UC 的主要发病机制^[10,21-22]。研究表明,铁死亡主要特征

包括铁沉积、脂质过氧化积累、GSH 耗竭及 GPX4 失活等,这些与 UC 的发病机制有关^[9,23]。膳食中铁补充可能加剧 DSS 诱导的小鼠结肠炎,而一些铁螯合剂和抗氧化剂则可减轻 UC 临床症状^[24],另外,抑制铁死亡也可有效改善 DSS 诱导的 UC 炎症^[10]。以上研究说明铁死亡在 UC 疾病进程中有重要调节作用。SR 使用历史悠久,在 UC 治疗中的作用已被明确,但其对 UC 铁死亡的影响和作用机制鲜有报道。因此,本研究首先利用生物信息学筛选 UC 中调控铁死亡的核心基因,并基于此探讨了 SR 影响核心基因及铁死亡相关蛋白表达,从而缓解 UC 的可能分子机制。

实验发现,SR 可降低结肠组织炎症因子水平,改变组织病理变化,缓解小鼠 UC 症状,显示出良好的治疗作用。临床研究指出,UC 患者肠道紧密连接蛋白表达改变,肠道屏障完整性丧失,使肠腔中共生菌群和病原微生物转移至肠道固有层,最终诱发肠道炎症^[25-26]。因此本研究进一步对肠道紧密连接蛋白进行了检测,发现 SR 可提高紧密连接蛋白 ZO-1 的表达,进而维持肠黏膜屏障功能。

脂质过氧化是铁死亡的关键迹象,MDA、ROS 等脂质过氧化物会引起细胞膜流动性和通透性的变化,最终导致细胞结构和功能发生变化,诱导铁死亡^[27],GPX4 及其辅助因子 GSH 是消除脂质过氧化产物抑制铁死亡的主要途径^[28-29]。因此,测定 MDA 和 GSH 有利于铁死亡的判断。本研究中,UC 小鼠结肠组织中 MDA 含量的增加以及 GSH 水平的降低证明了脂质过氧化紊乱的存在,这与其他研究的结论一致^[9,30]。SR 治疗逆转了 MDA 和 GSH 水平,表明 SR 可能通过抑制脂质过氧化途径影响 UC 的铁死亡。

在铁死亡中,SLC7A11 和 GPX4 是其主要抗氧化靶标^[31]。SLC7A11 可将胞外的胱氨酸引入细胞,还原为半胱氨酸,随后用于 GSH 的合成,以进行抗氧化防御。然而,细胞中持续氧化应激或半胱氨酸不足可能导致 GSH 的消耗和 GPX4 失活^[32],增强 GPX4 和 SLC7A11 表达可增强细胞铁死亡过程中的抗氧化能力^[33]。PPARG 是一种配体激活的转录因子。它调节多个基因的表达,对脂质和葡萄糖代谢至关重要^[34]。近期研究表明,在神经组织中,激活 PPARG 能促进 GPX4 表达,从而预防脑出血所致神经元铁死亡^[35-36]。在本研究中,PPI 网络分析结果表明,PPARG 在 UC 铁死亡相关蛋白相互作用中,处于重要地位。Pearson 相关性结果提示了 PPARG 很可能抑制铁死亡进程。为明确 SR 抑制 UC 小鼠铁死亡的分子机制,本研究采用 Western blot 法分析了结肠组织中 PPARG、SLC7A11 和 GPX4 的表达。我们观察到与模型组相比,SR 可提高 UC 小鼠结肠组织中 PPARG、SLC7A11 和 GPX4 的表达,与我们分析结果相一致。进一步揭示了 PPARG 在 UC 中的作用以及 SR 可能通过调节 PPARG、SLC7A11 和 GPX4 而影响铁死亡发挥 UC 治疗作用的机制。

综上,本研究通过生物信息学筛选出 *PPARG* 与 UC 铁死亡的关系,提示 PPARG 可能是 UC 潜在的

治疗靶点。同时,阐明了 SR 可能通过降低 UC 结肠炎症,改善肠上皮屏障功能,降低脂质氧化水平,影响 PPARG 和 SLC7A11/GPX4 通路,从而缓解 UC 小鼠症状的机制。本研究为 UC 治疗提供了思路,为 SR 后续开发探索提供了理论依据。

参考文献:

- [1] KOBAYASHI T, SIEGMUND B, LE BERRE C, et al. Ulcerative colitis [J]. Nat Rev Dis Primers, 2020, 6: 1-20.
- [2] UNGARO R, MEHANDRU S, ALLEN P B, et al. Ulcerative colitis [J]. Lancet, 2017, 389(10080): 1756-1770.
- [3] XU S, HE Y, LIN L, et al. The emerging role of ferroptosis in intestinal disease [J]. Cell Death Dis, 2021, 12(4): 289.
- [4] SANDBORN W J, PANÉS J, SANDS B E, et al. Venous thromboembolic events in the tofacitinib ulcerative colitis clinical development programme [J]. Aliment Pharmacol Ther, 2019, 50(10): 1068-1076.
- [5] SEGAL J P, LEBLANC J F, HART A L. Ulcerative colitis: an update [J]. Clin Med, 2021, 21(2): 135-139.
- [6] FEAGAN B G, RUTGEERTS P, SANDS B E, et al. Vedolizumab as induction and maintenance therapy for ulcerative colitis [J]. N Engl J Med, 2013, 369(8): 699-710.
- [7] LAMB C A, KENNEDY N A, RAINE T, et al. British Society of Gastroenterology consensus guidelines on the management of inflammatory bowel disease in adults [J]. Gut, 2019, 68(Suppl 3): s1-s106.
- [8] DIXON S J, LEMBERG K M, LAMPRECHT M R, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death [J]. Cell, 2012, 149(5): 1060-1072.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] 王英英, 朱洁, 鲁兰, 等. 中药地榆的成分以及其药理作用研究进展 [J]. 四川中医, 2022, 40(8): 216-223.
WANG Y Y, ZHU J, LU L, et al. Advances in the study of components and pharmacological effects of traditional Chinese medicine *Sanguisorba officinalis* L [J]. J Sichuan Tradit Chin Med, 2022, 40(8): 216-223.
- [12] ZHANG W, SANG S, PENG C, et al. Network pharmacology and transcriptomic sequencing analyses reveal the molecular mechanism of *Sanguisorba officinalis* against colorectal cancer [J]. Front Oncol, 2022, 12: 807718.
- [13] ZHANG W, PENG C, YAN J, et al. *Sanguisorba officinalis* L. suppresses 5-fluorouracil-sensitive and-resistant colorectal cancer growth and metastasis via inhibition of the Wnt/ β -catenin pathway [J]. Phytomedicine, 2022, 94: 153844.
- [14] YU T, WU L, ZHANG T, et al. Insights into Q-markers and molecular mechanism of *Sanguisorba* saponins in treating ulcerative colitis based on lipid metabolism regulation [J].

Phytomedicine, 2023, 116: 154870.

[15] LONG W, LIU S, LI X X, et al. Whole transcriptome sequencing and integrated network analysis elucidates the effects of 3, 8-Di-O-methylellagic acid 2-O-glucoside derived from *Sanguisorba officinalis* L., a novel differentiation inducer on erythroleukemia cells [J]. Pharmacol Res, 2021, 166: 105491.

[16] LACHOWICZ S, OSZMIANSKI J, RAPAK A, et al. Profile and content of phenolic compounds in leaves, flowers, roots, and stalks of *Sanguisorba officinalis* L. determined with the LC-DAD-ESI-QTOF-MS/MS analysis and their *in vitro* antioxidant, antidiabetic, antiproliferative potency [J]. Pharmaceuticals, 2020, 13(8): 191.

[17] ZHU H L, CHEN G, CHEN S N, et al. Characterization of polyphenolic constituents from *Sanguisorba officinalis* L. and its antibacterial activity [J]. Eur Food Res Technol, 2019, 245(7): 1487-1498.

[18] SONG J, ZENG J, ZHENG S, et al. *Sanguisorba officinalis* L. promotes diabetic wound healing in rats through inflammation response mediated by macrophage [J]. Phytother Res, 2023, 37(9): 4265-4281.

[19] LI C, GONG L, JIANG Y, et al. *Sanguisorba officinalis* ethyl acetate extract attenuates ulcerative colitis through inhibiting PI3K-AKT/NF- κ B/STAT3 pathway uncovered by single-cell RNA sequencing [J]. Phytomedicine, 2023, 120: 155052.

[20] DIGNASS A, LINDSAY J O, STURM A, et al. Second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis part 2: current management [J]. J Crohns Colitis, 2012, 6(10): 991-1030.

[21] WAN Y, YANG L, JIANG S, et al. Excessive apoptosis in ulcerative colitis: crosstalk between apoptosis, ROS, ER stress, and intestinal homeostasis [J]. Inflamm Bowel Dis, 2022, 28(4): 639-648.

[22] CUI L, GUAN X, DING W, et al. *Scutellaria baicalensis* Georgi polysaccharide ameliorates DSS-induced ulcerative colitis by improving intestinal barrier function and modulating gut microbiota [J]. Int J Biol Macromol, 2021, 166: 1035-1045.

[23] LIU R, ZHOU Y, CAO Y. CircRNA and ferroptosis in human disease: Insights for new treatments [J]. Animal Model Exp Med, 2023, 6(6): 508-517.

[24] 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.

[25] VERMEIRE S. Combination biologic therapy for ulcerative colitis [J]. Lancet Gastroenterol Hepatol, 2023, 8(4): 288-290.

[26] 李婷, 邹秋萍, 毛泽伟, 等. 三点金中黄酮类化合物对溃疡性结肠炎小鼠的干预作用及其对肠道菌群的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(4): 29-38.

LI T, ZOU Q P, MAO Z W, et al. Therapeutic effect of flavonoids from *Desmodium triflorum* on an ulcerative colitis mouse model and the influence on intestinal flora [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(4): 29-38.

[27] STOCKWELL B R, FRIEDMANN ANGELI J P, BAYIR H, et al. Ferroptosis: a regulated cell death nexus linking metabolism, redox biology, and disease [J]. Cell, 2017, 171(2): 273-285.

[28] IMAI H, MATSUOKA M, KUMAGAI T, et al. Lipid peroxidation-dependent cell death regulated by GPx4 and ferroptosis [J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2017, 403: 143-170.

[29] WANG S, LIU W, WANG J, et al. Curculigoside inhibits ferroptosis in ulcerative colitis through the induction of GPX4 [J]. Life Sci, 2020, 259: 118356.

[30] DONG S, LU Y, PENG G, et al. Furin inhibits epithelial cell injury and alleviates experimental colitis by activating the Nrf2-Gpx4 signaling pathway [J]. Dig Liver Dis, 2021, 53(10): 1276-1285.

[31] 刘玉倩, 杨雯茜, 王海涛. GSH/GPx4 介导的铁死亡通路在有氧运动预防自然衰老小鼠模型肝过氧化损伤中的作用 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(12): 1581-1587.

LIU Y Q, YANG W Q, WANG H T. Role of the ferroptosis pathway mediated by GSH/GPx4 in preventing hepatocyte peroxidative injury following aerobic exercise in an elderly mouse model [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(12): 1581-1587.

[32] LEI G, ZHANG Y, HONG T, et al. Ferroptosis as a mechanism to mediate p53 function in tumor radiosensitivity [J]. Oncogene, 2021, 40(20): 3533-3547.

[33] WANG H, AN P, XIE E, et al. Characterization of ferroptosis in murine models of hemochromatosis [J]. Hepatology, 2017, 66(2): 449-465.

[34] CAI W, YANG T, LIU H, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ): a master gatekeeper in CNS injury and repair [J]. Prog Neurobiol, 2018, 163/164: 27-58.

[35] BAI X, ZHENG E, TONG L, et al. Angong Niuhuang Wan inhibit ferroptosis on ischemic and hemorrhagic stroke by activating PPAR γ /AKT/GPX4 pathway [J]. J Ethnopharmacol, 2024, 321: 117438.

[36] DUAN C, JIAO D, WANG H, et al. Activation of the PPAR γ prevents ferroptosis-induced neuronal loss in response to intracerebral hemorrhage through synergistic actions with the Nrf2 [J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 869300.

[收稿日期] 2024-02-07