

艾灸通过 p53 调控 SLC7A11/GSH/GPX4 抗氧化轴对克罗恩病小鼠铁死亡的影响

杨翟璨, 周竞颖, 王璐瑶, 陆鹏徽, 刘密
(湖南中医药大学, 长沙 410208)

【摘要】 目的:观察艾灸“天枢”对克罗恩病(CD)小鼠肠道炎性损伤的影响,探讨肿瘤蛋白 p53 调控溶质载体家族 7 成员 11(SLC7A11)/谷胱甘肽(GSH)/谷胱甘肽过氧化物酶 4(GPX4)抗氧化轴对 CD 小鼠铁死亡的影响机制。方法:SPF 级 C57BL/6 野生型小鼠随机分为正常组、模型组、艾灸组,每组 10 只。模型组和艾灸组采用 2% 葡聚糖硫酸钠(DSS)溶液自由饮用制备 CD 小鼠模型。艾灸组予细艾条灸双侧“天枢”,施灸 30 min,每日干预 1 次,连续干预 14 d。记录小鼠体质量、粪便性状和粪便隐血情况,并在造模后与治疗 2 个时间点分别对小鼠进行疾病活动指数(DAI)评分测定;艾灸干预结束后,采用 HE 染色观察结肠病理损伤;ELISA 法检测血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素(IL)-1 β 和 IL-17 含量及结肠组织 4-羟基壬烯酸(4-HNE)、丙二醛(MDA)、GSH、亚铁离子(Fe^{2+})含量和超氧化物歧化酶(SOD)活力;免疫荧光染色法测定结肠组织活性氧(ROS)水平;Western blot 法检测结肠组织中 p53、SLC7A11、GPX4 蛋白表达水平。结果:模型组小鼠多处肠上皮断裂缺失、腺体排列混乱并可见大量炎性细胞浸润;艾灸组干预后,肠上皮连续性恢复,肠黏膜呈轻度肿胀,腺体排列较整齐,偶见少量炎性细胞散在分布。与正常组比较,模型组小鼠疾病症状明显,DAI 评分升高($P < 0.01$),血清 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-17 含量升高($P < 0.01$),结肠组织 4-HNE、MDA 和 Fe^{2+} 含量升高($P < 0.01$),GSH 及 SOD 含量降低($P < 0.01$),ROS 表达水平升高($P < 0.01$),p53 蛋白表达水平升高($P < 0.01$),SLC7A11、GPX4 蛋白表达水平降低($P < 0.01$);与模型组比较,艾灸组小鼠疾病症状缓解,DAI 评分降低($P < 0.01$),血清 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-17 含量降低($P < 0.01$),结肠组织 4-HNE、MDA 和 Fe^{2+} 含量降低($P < 0.01, P < 0.05$),GSH 及 SOD 含量升高($P < 0.01$),ROS 表达水平降低($P < 0.01$),p53 蛋白表达水平降低($P < 0.01$),SLC7A11、GPX4 蛋白表达水平升高($P < 0.05, P < 0.01$)。结论:艾灸“天枢”治疗 CD 小鼠“天枢”能够减轻肠道炎性反应,其机制可能是通过下调 p53 蛋白表达,增强 SLC7A11/GSH/GPX4 抗氧化轴活性,减少脂质过氧化物的产生,减轻结肠组织铁死亡,从而维持肠道铁稳态。

【关键词】 克罗恩病;艾灸;铁死亡;肿瘤蛋白 p53;天枢;溶质载体家族 7 成员 11

Effects of moxibustion on ferroptosis in Crohn's disease mice through p53-mediated regulation of the SLC7A11/GSH/GPX4 antioxidant axis

YANG Di-can, ZHOU Jing-ying, WANG Lu-yao, LU Peng-hui, LIU Mi (Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China)

【ABSTRACT】 **Objective** To observe the effects of moxibustion at the acupoint “Tianshu” (ST25) on intestinal inflammatory injury in Crohn's disease (CD) mice, and to investigate the mechanism by which the tumor protein p53 modulates the antioxidant axis of the solute carrier family 7 member 11 (SLC7A11)/glutathione (GSH)/glutathione peroxidase 4 (GPX4) and ferroptosis in CD mice. **Methods** SPF-grade C57BL/6 wild-type mice were randomly divided into normal, model, and moxibustion groups, with 10 mice in each group. In the model and moxibustion

【DOI】10.13702/j.1000-0607.20241163

引用格式:杨翟璨,周竞颖,王璐瑶,等.艾灸通过 p53 调控 SLC7A11/GSH/GPX4 抗氧化轴对克罗恩病小鼠铁死亡的影响[J].针刺研究,2025,50(12):1431-1439.

项目来源:国家自然科学基金项目(No.82474662,81774438);湖南省自然科学基金项目(No.2023JJ30457);长沙市自然科学基金项目(No.kq2208183);湖南省卫生健康高层次人才重大科研专项(No.R2023141);湖南省教育厅科学研究项目(No.23A0284);国家中医药管理局 2022 年青年岐黄学者培养项目(No.国中医药人教函〔2022〕256 号)

通信作者:刘密,E-mail:7417091@qq.com

groups, the 2% dextran sulfate sodium solution was used to induce CD mice model. The moxibustion group received indirect moxibustion with fine moxa sticks at bilateral ST25 for 30 min per session, once daily, for 14 consecutive days. The body mass, fecal properties, and fecal occult blood were recorded and the disease activity index (DAI) score was determined before and after treatment. At the end of the moxibustion intervention, colonic pathological damage was observed using HE staining. The serum contents of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin (IL)-1 β , and IL-17, and the contents of 4-hydroxynonenal (4-HNE), malondialdehyde (MDA), GSH, ferrous iron (Fe²⁺), and the activity of superoxide dismutase (SOD) of colon tissue were measured by ELISA. The reactive oxygen species (ROS) level in colon tissue was detected by immunofluorescence. The protein expression levels of p53, SLC7A11, and GPX4 in colon tissue were determined by Western blot. **Results** In the model group, the colon tissue exhibited extensive breaks and defects in the intestinal epithelium, disorganized glandular arrangement, and a large number of inflammatory cell infiltration. After the intervention in the moxibustion group, the intestinal epithelial continuity was restored, the intestinal mucosa was mildly swollen, the glands were more neatly arranged, and a small number of inflammatory cells were occasionally scattered of colon tissue. Compared with the normal group, mice in the model group had obvious disease symptoms, with elevated DAI score ($P<0.01$), increased serum contents of TNF- α , IL-1 β , and IL-17 ($P<0.01$), higher contents of 4-HNE, MDA, and Fe²⁺ ($P<0.01$) and reduced GSH contents and SOD activity ($P<0.01$) in colon tissue, increased expression level of ROS ($P<0.01$), and the protein expression of p53 was up-regulated ($P<0.01$), the protein expressions of SLC7A11 and GPX4 were down-regulated ($P<0.01$). Compared with the model group, mice in the moxibustion group showed alleviated disease symptoms with lower DAI score ($P<0.01$), decreased serum contents of TNF- α , IL-1 β , and IL-17 ($P<0.01$), reduced contents of 4-HNE, MDA, and Fe²⁺ ($P<0.01$, $P<0.05$) and increased GSH contents and SOD activity ($P<0.01$) in colon tissue, decreased expression level of ROS ($P<0.01$), and the protein expression of p53 was down-regulated ($P<0.01$), the protein expressions of SLC7A11 and GPX4 were up-regulated ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion** Moxibustion at ST25 reduced intestinal inflammation in CD mice, probably through down-regulating p53 protein expression, enhancing the SLC7A11/GSH/GPX4 antioxidant axis activity, and reducing lipid peroxidation and ferroptosis in colonic tissues, thus maintaining intestinal iron homeostasis.

【KEYWORDS】 Crohn's disease; Moxibustion; Ferroptosis; Tumor protein p53; Tianshu (ST25); Solute carrier family 7 member 11

克罗恩病(CD)是一种慢性非特异性肠道炎性疾病。CD发生时,肠黏膜被大量炎性细胞与淋巴细胞浸润,导致肠上皮损伤,肠黏膜通透性增加,出现腹泻、便血、大便性状改变等消化道症状,可有溃疡面形成,全身症状及并发症加重^[1]。流行病学研究显示,当前我国CD的发病率约为0.15%,男女比例约为1.5:1,发病高峰为18~35岁,我国的发病率呈逐年显著增长趋势^[2-4]。目前,高达70%~80%的CD患者可能出现诸多并发症,最终不得不接受一次甚至多次外科手术治疗,严重影响了患者的生活质量^[5]。CD的病因病机复杂,多种环境因素刺激导致的肠道内稳态失衡引起的免疫异常和慢性炎症反应是CD的病理学基础^[6-8]。近年研究显示,铁死亡是CD的重要致病因素之一^[9],铁死亡能够激活机体炎症反应,加剧慢性炎症反应,肠道炎症反应也能激活铁死亡程序^[10]。因此抑制肠道铁死亡,减轻肠道炎症反应是治疗CD的研究重点之一^[11-12]。

艾灸是中医特色疗法,艾灸治疗CD的效应机制研究已从抑制免疫炎症反应、保护肠黏膜屏障、

抑制上皮-间质转化、调节肠道菌群等多方面展开^[13],在抑制CD的慢性肠道炎症反应、改善结肠组织损伤、系统性治疗CD等多方面优势凸显,近年来艾灸治疗CD在临床上已进行较为广泛的应用^[14-15]。现代研究认为,针灸可通过多环节、多靶点调控机体生理功能,以促使机体恢复免疫稳态、促进结肠黏膜修复、阻止结肠纤维化进程,从而有效控制肠道炎症反应^[16]。但是,艾灸通过铁死亡途径减轻肠道炎症反应治疗CD的具体机制还有待进一步研究。研究表明,肠道炎症反应时,受损的黏膜上皮细胞表达多种炎症因子,这些炎症因子影响肿瘤蛋白p53表达^[17-18],并通过溶质载体家族7成员11(SLC7A11)/谷胱甘肽(GSH)/谷胱甘肽过氧化物酶4(GPX4)抗氧化轴引发铁死亡^[19-21]。因此,本研究以CD模型小鼠为研究对象,以艾灸为干预手段,通过对比观察小鼠疾病症状、血清炎症因子及结肠组织中铁死亡通路相关蛋白表达,探讨艾灸通过p53调控SLC7A11/GSH/GPX4抗氧化轴影响肠道铁死亡的机制。

1 材料与amp;方法

1.1 实验动物及分组

SPF级C57BL/6野生型小鼠30只,6~8周龄,体质量20~25 g,均购自北京维通利华实验动物技术有限公司,实验动物使用许可证号:SYXK(京)2022-0052。所有小鼠均饲养于湖南中医药大学动物实验中心,期间自由摄食饮水,保持室温在22℃左右,湿度50%~70%,饲养环境固定12 h/12 h光照与黑暗交替循环并及时清理垫料。适应性喂养3 d后,按随机数表法分为正常组10只、造模组20只,造模组包含模型组10只,艾灸组10只。实验通过湖南中医药大学实验动物伦理委员会批准(编号:SLBH-202309180008)且符合相关伦理要求^[22]。实验过程严格按照中华人民共和国科学技术部颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》执行。

1.2 主要试剂与仪器

葡聚糖硫酸钠(DSS,北京拜尔迪),粪便隐血试剂盒(北京雷根),肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素(IL)-1 β 、IL-17、4-羟基壬烯酸(4-HNE)、丙二醛(MDA)、GSH检测试剂盒(厦门仑昌硕),亚铁离子(Fe²⁺)含量测定试剂盒(北京普利莱),超氧化物歧化酶(SOD)检测试剂盒(南京建成),活性氧(ROS)检测试剂盒(上海碧云天),HE染液(武汉赛维尔),SDS-PAGE预制胶套装(北京百奥思科),p53抗体、SLC7A11抗体、 β -actin抗体、山羊抗兔IgG(美国Affinity Bioscience),GPX4抗体(成都正能)。

电子天平(德国Sartorius),病理组织包埋机(武汉俊杰),石蜡病理切片机(上海徠卡),多功能酶标仪(美国Molecular Devices),电泳仪、电转仪、ChemiDoc MP化学发光成像系统(美国Bio-Rad),凝胶成像系统(美国UVP),激光共聚焦显微镜(德国Carl Zeiss),光学显微镜(日本Olympus),小动物呼吸机(深圳瑞沃德)。

1.3 模型制备

造模组小鼠予蒸馏水配置的2% DSS溶液自由饮用14 d,制备小鼠CD模型。正常组小鼠予蒸馏水自由饮用同等天数。造模结束后,每组随机抽取3只小鼠,剖腹取结肠,肉眼观察到出血、溃疡、水肿及鹅卵石样外观,通过HE染色,镜下观察到肠黏膜损伤、裂隙状溃疡及透壁性炎症反应可判断为成功建立CD模型^[21]。模型制备成功后,造模组按随机数表法分为模型组、艾灸组,每组7只。

1.4 干预方法

根据《实验针灸学》^[23]及参考小鼠穴位定位标准^[24],选取“天枢”,并模拟人体腧穴骨度分寸法进行取穴。将艾灸组小鼠以2%异氟烷呼吸麻醉后,采取仰卧位置于手术单上,用自制伸缩夹将点燃的细艾条垂直悬挂在双侧“天枢”正上方约2~3 cm处,施灸30 min,期间适当掸灰,每日干预1次,连续干预14 d。正常组、模型组仅施以相同的呼吸麻醉,不做其他干预。

1.5 观察指标及检测方法

一般行为学观察及疾病活动指数(DAI)评分:每周记录小鼠体质量,检测粪便隐血情况,观察小鼠精神状态、活动度、肛周污秽程度;在治疗前后分别对小鼠进行DAI评分测定^[25]。DAI评分从小鼠体质量、粪便性状及粪便隐血情况进行评定。体质量下降分数(%)=[(初始体质量-造模后/干预后体质量)÷初始体质量]×100%。粪便隐血检测(邻联甲苯胺法)步骤:用木棒挑取少量粪便10~50 mg(绿豆大小),涂在消毒棉上,滴加O-tolidine Solution 2滴(约0.1 mL)于粪便不同位置,滴加氧化剂2滴(约0.1 mL),立即计时并观察颜色变化,于2 min内判读完毕。结果判定如下:加入试剂后2 min仍不显色为阴性;加入试剂10 s后,由浅蓝色渐变蓝色为阳性+;加入试剂后初呈浅蓝色,逐渐呈明显蓝褐色为阳性2+;加入试剂后立即呈现蓝黑褐色,并逐渐呈黑褐色为阳性3+;加入试剂后立即呈现蓝黑褐色为阳性4+。DAI评分(分)=(体质量下降分数得分+粪便性状得分+便血得分)/3。见表1。

表1 DAI评分标准

Table 1 DAI scoring criteria

体质量下降分数/%	粪便性状	粪便隐血	得分
0	正常	阴性	0
>0, ≤5	-	阳性+	1
>5, ≤10	松散	阳性2+	2
>10, ≤20	-	阳性3+	3
>20	水样便	阳性4+或肉眼血便	4

注:DAI为疾病活动指数。

取材方法:干预结束后第2天所有小鼠禁食不禁水24 h,麻醉小鼠摘眼球采血后,取回盲部至肛门段结肠,每组选取3只小鼠结肠分段保存于4%多聚甲醛溶液中固定,其余存于-80℃冰箱待检测。

HE染色观察结肠组织病理形态:取小鼠结肠组织,4%多聚甲醛进行固定,石蜡包埋,切为5 μm厚切片;石蜡切片脱蜡复水至纯水清洗,滴加苏木精染液染色,蒸馏水去浮色;滴加分化液分化,流动水冲洗;滴加伊红染液染色,蒸馏水去浮色;染色后石蜡切片依次浸泡80%、95%乙醇脱水;中性树胶和二甲苯混匀封片,将切片置于光学显微镜下观察结肠黏膜形态结构的改变。

ELISA法检测血清炎症因子含量:麻醉小鼠后,眼球动脉取血,静置1 h后,4℃低温离心15 min(3 000 r/min,离心半径8 cm),取上清液,根据ELISA试剂盒说明书制备标准品工作液,在微孔酶标板上设置标准孔、空白孔和样本孔,依次加入不同浓度的标准品和样本,将微孔板覆盖膜并在37℃恒温箱中孵育90 min,之后依次加入洗涤液、显色底物、终止液,用酶标仪在450 nm波长处测得吸光度值,并按照标准曲线计算血清TNF-α、IL-1β和IL-17含量。

ELISA法检测结肠组织4-HNE、MDA、GSH、Fe²⁺含量及SOD活力:取结肠组织,用预冷的0.9%氯化钠溶液混合制成10%组织匀浆液,将匀浆液4℃低温离心15 min(3 000 r/min,离心半径8 cm),取上清液。ELISA法检测4-HNE、MDA、GSH和Fe²⁺含量,步骤同前。根据SOD试剂盒说明书,制备SOD缓冲液、WST-8/酶工作液及反应启动液,在微孔酶标板上设置标准孔、空白孔和样本孔,依次加入不同浓度样本、缓冲液及工作液,加入反应启动工作液充分混匀,37℃孵育30 min,酶标仪在450 nm波长处测得吸光度值,并按照标准曲线计算SOD活力。

免疫荧光染色法检测结肠组织ROS表达水平:取4%多聚甲醛溶液固定的结肠组织,石蜡包埋,切为5 μm厚切片,贴在载玻片上,60℃烤片1 h,二甲苯、95%乙醇依次脱蜡水化,蒸馏水清洗。玻片置于修复缓冲液(pH9.0)中两次沸腾,自然冷却后将玻片于PBS中洗涤3次。3% BSA室温封闭30 min。滴加ROS检测试剂二氢乙啶,室温孵育1 h,PBS洗涤。滴加DAPI染液复染细胞核,避光室温孵育10 min,PBS洗涤,抗荧光淬灭封片剂封片。激光共聚焦显微镜观察荧光表达(蓝色激发波长405 nm,发射波长425~475 nm;红色激发波长561 nm,发射波长570~620 nm)。Image J软件计算ROS阳性荧光强度百分比,荧光强度百分比(%)=荧光阳性表达面积÷该区域总面积×100%。

Western blot法检测结肠组织p53、SLC7A11、

GPX4蛋白表达水平:取结肠组织,加入裂解缓冲液依次进行总蛋白提取,BCA法测定蛋白浓度,电泳分离蛋白质,转膜后5%脱脂牛奶室温封闭1 h,加入p53、SLC7A11、GPX4一抗(稀释比例1:1 000),4℃孵育过夜。洗涤3次后加入相应二抗(稀释比例1:2 000),室温孵育1 h。加入ECL发光液显影,凝胶成像分析系统采集条带图像。Image J软件计算灰度值,以β-actin为内参,以目的蛋白与内参蛋白条带灰度值的比值为p53、SLC7A11、GPX4蛋白的相对表达量。

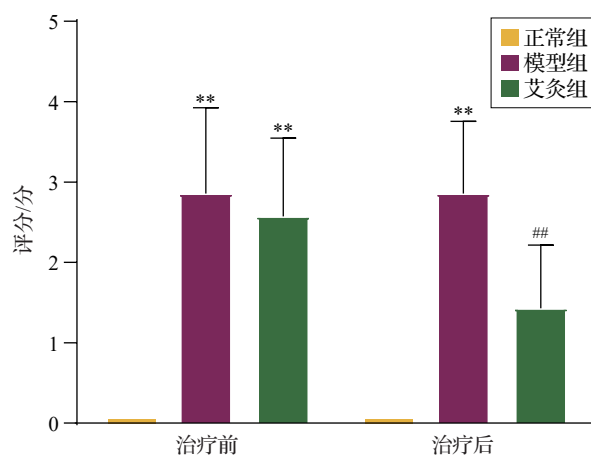
1.6 统计学方法

所有数据使用SPSS26.0软件进行统计学分析。计量资料均符合正态性分布,以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,方差齐者两两比较采用LSD检验,方差不齐者采用Dunnett's *t*3检验。以 $P\leq 0.05$ 为差异有统计学意义的标准。

2 结果

2.1 一般行为学观察及DAI评分

正常组小鼠毛发顺滑,精神状态良好,行动活跃,正常饮水摄食,体质量递增,粪便无异常,未见疾病活动状态。治疗前,模型组和艾灸组小鼠毛发干枯,蜷缩聚集,反应迟钝,摄食量下降,可见笼盒内及小鼠肛周出现黏液脓血,大便疏松呈糊状,粪便隐血检测呈阳性,DAI评分均较正常组显著升高($P<0.01$)。艾灸干预后,与模型组比较,艾灸组小鼠自主活动及进食量均有所改善,体质量呈增长趋势,粪便稍软成条状,少见稀便或血便,DAI评分显著下降($P<0.01$)。见图1。



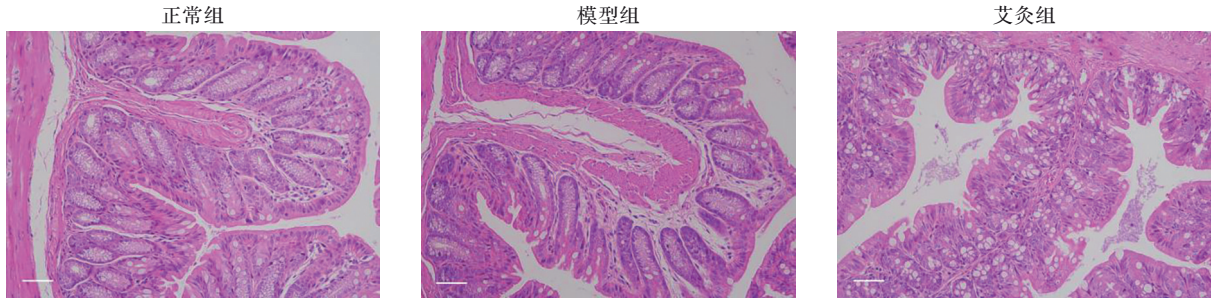
注:DAI为疾病活动指数。与同时点正常组相比,** $P<0.01$;与同时点模型组相比,## $P<0.01$ 。

图1 各组小鼠治疗前后DAI评分比较($\bar{x}\pm s$,7只鼠/组)
Fig. 1 Comparison of DAI score before and after treatment of mice in the 3 groups ($\bar{x}\pm s$, 7 mice/group)

2.2 结肠组织病理形态学观察

正常组小鼠结肠组织上皮细胞的边界清晰,细胞形态完整、排列整齐,细胞核明显。但在模型组中,结肠组织的结构完整性被破坏,腺体萎缩,排列

混乱,可见大量炎性细胞浸润及多处肠上皮断裂缺失。干预后,与模型组相比,艾灸组肠上皮连续性较好,肠黏膜呈轻度肿胀,腺体排列较整齐,偶见少量炎性细胞散在分布。见图2。



注:标尺=50 μm。

图2 各组小鼠结肠组织病理形态比较(HE染色)

Fig. 2 Comparison of pathological morphology of colon tissue of mice in the 3 groups (HE staining)

2.3 血清炎症因子TNF-α、IL-1β和IL-17含量

与正常组比较,模型组小鼠血清炎症因子TNF-α、IL-1β和IL-17含量显著升高($P<0.01$);与模型组比较,艾灸组小鼠血清炎症因子TNF-α、IL-1β和IL-17含量显著降低($P<0.01$)。见图3。

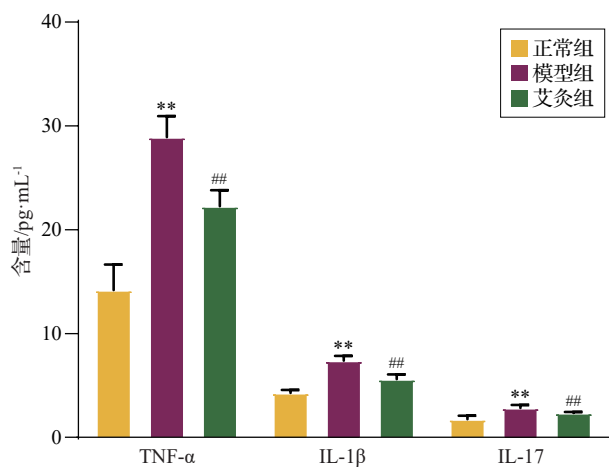
2.4 结肠组织中4-HNE、MDA、GSH、Fe²⁺含量及SOD活力

与正常组比较,模型组小鼠结肠组织中SOD活力和GSH含量显著降低($P<0.01$),4-HNE、MDA和Fe²⁺含量显著升高($P<0.01$);与模型组比较,艾灸组小鼠结肠组织中SOD活力和GSH含量显著升

高($P<0.01$),4-HNE、MDA和Fe²⁺含量显著降低($P<0.01, P<0.05$)。见图4。

2.5 结肠组织ROS表达水平

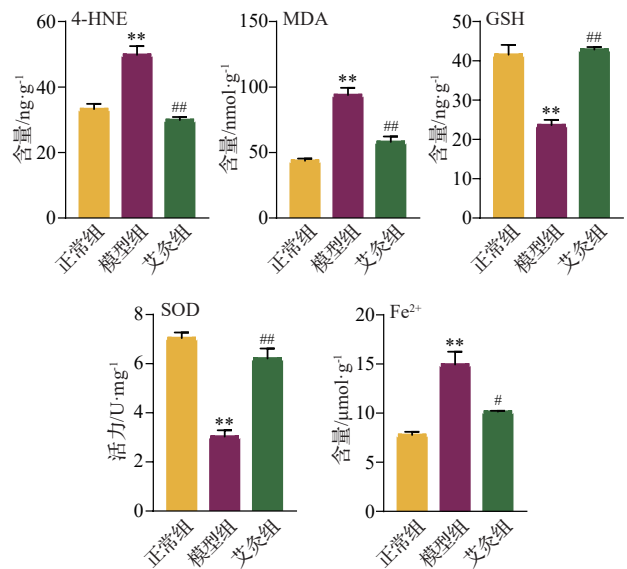
与正常组比较,模型组小鼠结肠组织中ROS表达水平显著升高($P<0.01$);与模型组比较,艾灸组小鼠结肠组织中ROS表达水平显著降低($P<0.01$)。见图5。



注:TNF-α为肿瘤坏死因子-α,IL-1β为白细胞介素1β,IL-17为白细胞介素17。与正常组相比,** $P<0.01$;与模型组相比,## $P<0.01$ 。

图3 各组小鼠血清TNF-α、IL-1β和IL-17含量比较($\bar{x}\pm s, 7$ 只鼠/组)

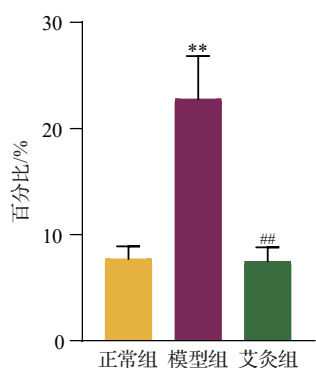
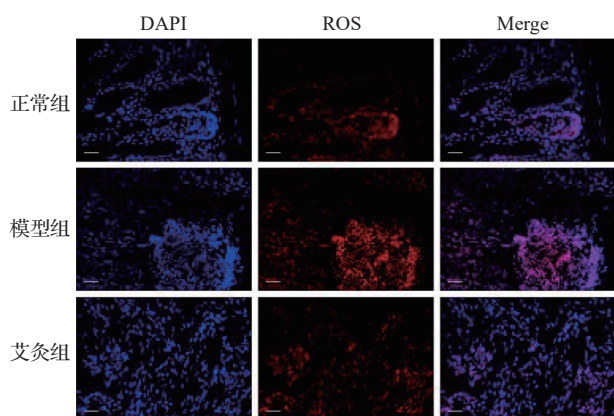
Fig. 3 Comparison of serum contents of TNF-α, IL-1β and IL-17 of mice in the 3 groups ($\bar{x}\pm s, 7$ mice/group)



注:4-HNE为4-羟基壬烯酸,MDA为丙二醛,GSH为谷胱甘肽,SOD为超氧化物歧化酶,Fe²⁺为亚铁离子。与正常组相比,** $P<0.01$;与模型组相比,## $P<0.01$ 。

图4 各组小鼠结肠组织中4-HNE、MDA、GSH、Fe²⁺含量及SOD活力比较($\bar{x}\pm s, 7$ 只鼠/组)

Fig. 4 Comparison of 4-HNE, MDA, GSH, Fe²⁺ contents and SOD activity in colon tissue of mice in the 3 groups ($\bar{x}\pm s, 7$ mice/group)



注:ROS为活性氧。蓝色荧光示细胞核,红色荧光示ROS阳性表达。标尺=25 μm。与正常组相比,** $P<0.01$;与模型组相比,## $P<0.01$ 。

图5 各组小鼠结肠组织中ROS表达水平比较(免疫荧光染色, $\bar{x}\pm s$, 3只鼠/组)

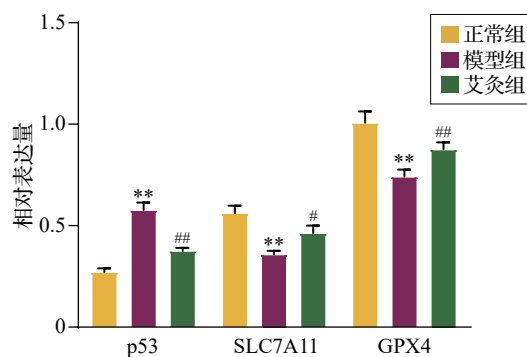
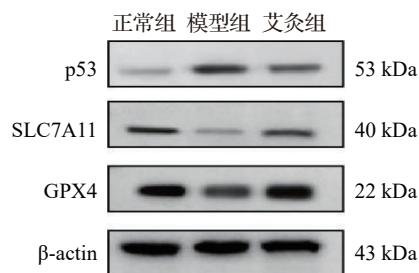
Fig. 5 Comparison of the expression level of ROS in colon tissue of mice in the 3 groups (immunofluorescence staining, $\bar{x}\pm s$, 3 mice/group)

2.6 结肠组织中 p53、SLC7A11、GPX4 蛋白表达水平

与正常组比较,模型组小鼠结肠组织中 p53 的蛋白表达水平显著升高 ($P<0.01$), SLC7A11、GPX4 的蛋白表达水平显著降低 ($P<0.01$);与模型组比较,艾灸组小鼠结肠组织中 p53 的蛋白表达水平显著降低 ($P<0.01$), SLC7A11、GPX4 的蛋白表达水平显著升高 ($P<0.05, P<0.01$)。见图 6。

3 讨论

目前尚未有根治 CD 的方法,临床上治疗该病的药物主要是抗 TNF 药物,然而疗效存在个体差异,且有不同程度的不良反应^[26]。针灸治疗腹痛、腹泻、便血等胃肠疾病历史悠久且疗效显著。一项临床研究^[27]采用隔药饼灸治疗 CD 患者,在中脘、气海、足三里、天枢、大肠俞、上巨虚等穴位进行隔药饼灸治疗,治疗后患者中近期有效率达 7.7%。一项



注:p53为肿瘤蛋白p53,SLC7A11为溶质载体家族7成员11,GPX4为谷胱甘肽过氧化物酶4。与正常组相比,** $P<0.01$;与模型组相比,# $P<0.05$,## $P<0.01$ 。

图6 各组小鼠结肠组织中p53、SLC7A11、GPX4蛋白表达量比较($\bar{x}\pm s$, 4只鼠/组)

Fig. 6 Comparison of p53, SLC7A11 and GPX4 protein expression levels in colon tissue of mice in the 3 groups ($\bar{x}\pm s$, 4 mice/group)

关于 CD 的临床研究与选穴规律研究^[28]表明,隔药饼灸是针灸治疗 CD 的主要方法之一,气海、天枢、中脘、足三里、上巨虚是临床常用穴。本研究基于当前实验条件和课题前期研究成果,选择“天枢”单穴干预,干预手段为纯艾条灸。天枢位于脐中旁开 2 寸,属足阳明胃经,同时又是大肠的募穴。中医理论认为,腹痛、腹泻等肠腑病症与大肠传导失司、小肠泌别清浊的功能失常有关,病位在肠,而“大肠、小肠皆属于胃”。因此,既属于足阳明胃经,又是大肠募穴的天枢是调治肠腑病症的首选穴。本研究显示,艾灸双侧“天枢”14 d 后,CD 小鼠 DAI 评分明显下降,同时结肠炎性细胞浸润、充血和水肿等病理情况得到改善,表明艾灸“天枢”可减轻 CD 的疾病活动性和结肠炎性损伤。

铁死亡是一种区别于细胞凋亡、坏死和自噬的铁依赖性细胞程序性死亡^[29]。其显著特征为 Fe^{2+} 蓄积、脂质过氧化、GSH 耗竭和 GPX4 失活及线粒体嵴的减少或消失^[30]。病理情况下,过量 Fe^{2+} 在细胞内集聚,发生哈伯-韦斯反应和芬顿反应,产生大量 ROS,降低 SOD 活性,使多不饱和脂肪酸的磷脂发

生过氧化反应,脂质过氧化生成4-HNE和MDA,使细胞膜结构遭到破坏,细胞最终走向铁死亡^[31]。本研究中,模型组小鼠结肠4-HNE、MDA和Fe²⁺含量升高,SOD活性降低,ROS水平升高,提示模型鼠发生铁死亡,其会降低小鼠体内抗氧化酶SOD的活性,使氧化应激产物MDA含量增加,ROS水平上升,进而加剧脂质过氧化损伤。

p53是一种肿瘤抑制因子,参与促进铁依赖性细胞死亡^[32-33]。有研究表明,p53可以通过上调转铁蛋白调节铁稳态,并可以抑制SLC7A11蛋白表达^[34]。SLC7A11是一种参与胱氨酸摄取的膜转运蛋白,是胱氨酸/谷氨酸逆向转运体(System Xc-)的重要组成部分^[35]。System Xc-/SLC7A11/GSH/GPX4轴是细胞内重要的抗氧化防御体系,参与维持细胞内氧化还原平衡,保护细胞免受氧化应激损伤,防止铁死亡期间的脂质过氧化,可以促进胞内重要的自由基清除剂还原性型GSH的合成^[36-37]。而GSH是许多抗氧化酶的辅助因子,包括GPX4。有研究^[38-40]表明,GPX4参与铁死亡过程,GPX4利用GSH将磷脂氢过氧化物转化为脂醇并抑制铁死亡。GSH/GPX4作为该轴的下游,是铁死亡重要的调控靶点。GSH的耗尽将引起GPX4失活,造成ROS积累,增加细胞内脂质过氧化物,诱导铁死亡^[41]。本实验中,与模型组比较,艾灸组小鼠干预后,结肠组织p53的蛋白表达量降低,SLC7A11、GPX4的蛋白表达量升高,GSH含量升高,同时Fe²⁺含量降低。提示艾灸对小鼠结肠的治疗作用可能与p53调控SLC7A11/GSH/GPX4轴参与结肠上皮细胞铁稳态有关。

有研究^[42-45]表明,铁死亡过程也具有免疫原性,并在多方面影响炎症反应,铁蓄积可激活炎症细胞,增加炎症反应相关标志物如TNF- α 、IL-1 β 和IL-17等,加剧炎症反应,而炎症反应又能反向导致铁蓄积引发铁死亡。本实验中,模型组小鼠ROS、Fe²⁺水平升高,脂质过氧化物4-HNE、MDA含量显著提高,同时TNF- α 、IL-1 β 和IL-17含量提高,提示铁蓄积作为细胞铁死亡与炎症反应发展过程中的关键交叉点,使得两者相互作用,形成恶性循环。而艾灸可减少炎症因子表达,抑制铁死亡和炎症反应。

本实验初步验证了艾灸抑制Fe²⁺和ROS蓄积导致的铁死亡改善CD小鼠肠道炎症反应的效应。由于干预周期、选穴部位、干预手段与临床运用存在差异,且设置实验组数较少,样本量相对较小,实验结果仅能说明艾灸对CD小鼠的改善情况,因此

存在一定局限性。通过对现有研究的比较显示,铁死亡的发生机制虽然已经足够详细,但铁死亡诱导CD的发生机制还不够完善,在临床实践方面也比较欠缺。本研究仅作为艾灸治疗CD的初步探索研究,对于艾灸的长期应用效果还需进一步临床观察研究,期望在未来能为治疗CD提供更好的治疗方案。

本实验表明,艾灸“天枢”可改善CD小鼠便血、体质量下降等疾病症状,降低DAI评分及血清相关炎症因子,其机制可能是通过下调p53蛋白表达,增强SLC7A11/GSH/GPX4抗氧化轴活性,减少Fe²⁺、ROS的蓄积,减少脂质过氧化物4-HNE、MDA的产生,维持结肠细胞内的铁稳态,缓解和改善肠道炎症反应,从而对CD小鼠具有一定治疗效果。下一步研究应设置GPX4抑制剂组,通过干预下游关键分子控制变量,进一步探索该通路在肠道铁死亡中的作用机制。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突。

参考文献

- [1] 吴开春,梁洁,冉志华,等.炎症性肠病诊断与治疗的共识意见(2018年·北京)[J].中国实用内科杂志,2018,38(9):796-813. WU K C, LIANG J, RAN Z H, et al. Chinese consensus on diagnosis and treatment of inflammatory bowel disease (Beijing, 2018) (in Chinese)[J]. Chinese Journal of Practical Internal Medicine, 2018, 38(9): 796-813.
- [2] QIU Y, CHEN B L, MAO R, et al. Systematic review with meta-analysis: loss of response and requirement of anti-TNF α dose intensification in Crohn's disease [J]. J Gastroenterol, 2017, 52(5): 535-554.
- [3] MAK W Y, ZHAO M, NG S C, et al. The epidemiology of inflammatory bowel disease: east meets west [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2020, 35(3): 380-389.
- [4] 李学锋,彭霞,周明欢.我国炎症性肠病流行病学研究进展[J].现代消化及介入诊疗,2020,25(9):1265-1267. LI X F, PENG X, ZHOU M H. Progress in epidemiology of inflammatory bowel disease in China (in Chinese)[J]. Modern Digestion & Intervention, 2020, 25(9): 1265-1267.
- [5] 李冠炜,任建安.重视我国克罗恩病流行病学研究[J].肠外与肠内营养,2017,24(3):135-137. LI G W, REN J A. Attach importance to the epidemiological study of Crohn's disease in China (in Chinese)[J]. Parenteral & Enteral Nutrition, 2017, 24(3): 135-137.
- [6] 何灏龙,张国山,肖山峰,等.艾灸“天枢”“上巨虚”对克罗恩病大鼠肠道菌群及血清炎症因子的影响[J].中华中医药杂志,2023,38(11):5214-5219. HE H L, ZHANG G S, XIAO S F, et al. Effects of moxibustion at “Tianshu” (ST25) and “Shangjuxu” (ST37) on intestinal flora and serum inflammatory factors in rats with

- Crohn disease (in Chinese) [J]. *China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy*, 2023, 38(11): 5214-5219.
- [7] 尹娟, 胡彤, 徐丽娟, 等. 活动期克罗恩病患者外周血高表达的 hsa_circRNA_103124 调控巨噬细胞分化、焦亡和炎症的机制 [J]. *中华医学杂志*, 2023, 103(43): 3478-3486.
YIN J, HU T, XU L J, et al. The mechanism by which hsa_circRNA_103124 highly expressed in peripheral blood of patients with active Crohn's disease regulates macrophage differentiation, pyroptosis and inflammation (in Chinese) [J]. *National Medical Journal of China*, 2023, 103(43): 3478-3486.
- [8] 夏冰, 邓长生, Pena A S. 克罗恩病的第一个易感基因, NOD2(CARD15) [J]. *中华消化杂志*, 2002, 22(5): 307-308.
XIA B, DENG C S, PENA A S. The first susceptibility gene of Crohn's disease, NOD2 (CARD15) (in Chinese) [J]. *Chinese Journal of Digestion*, 2002, 22(5): 307-308.
- [9] 商铭溶, 赵亚男, 张旭阳, 等. 中医药干预铁死亡治疗炎症性肠病的研究进展 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2024, 30(11): 245-254.
SHANG M R, ZHAO Y N, ZHANG X Y, et al. Traditional Chinese medicine intervention for ferroptosis in treatment of inflammatory bowel disease: a review (in Chinese) [J]. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*, 2024, 30(11): 245-254.
- [10] MAREI H E, ALTHANI A, AFIFI N, et al. p53 signaling in cancer progression and therapy [J]. *Cancer Cell Int*, 2021, 21(1): 703.
- [11] 尹园缘, 宾东华, 程扬, 等. 基于 p38 MAPK 通路探究参苓白术散对克罗恩病大鼠肠道炎症反应的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2023, 29(19): 9-17.
YIN Y Y, BIN D H, CHENG Y, et al. Shenling Baizhusan alleviates intestinal inflammation in rat model of Crohn's disease via p38 MAPK pathway (in Chinese) [J]. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*, 2023, 29(19): 9-17.
- [12] GAO Y, ZHANG Z Z, DU J, et al. Xue-Jie-San restricts ferroptosis in Crohn's disease via inhibiting FGL1/NF- κ B/STAT3 positive feedback loop [J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1148770.
- [13] 韩冬, 刘慧荣, 吴焕淦, 等. 针灸治疗克罗恩病的机制研究进展及思考 [J]. *针刺研究*, 2023, 48(2): 139-146.
HAN D, LIU H R, WU H G, et al. Progression and reflection on the mechanism study of acupuncture and moxibustion in treatment of Crohn's disease (in Chinese) [J]. *Acupuncture Research*, 2023, 48(2): 139-146.
- [14] 包春辉, 吴璐一, 吴焕淦, 等. 针灸治疗活动期克罗恩病: 随机对照研究 [J]. *中国针灸*, 2016, 36(7): 683-688.
BAO C H, WU L Y, WU H G, et al. Active Crohn's disease treated with acupuncture and moxibustion: a randomized controlled trial (in Chinese) [J]. *Chinese Acupuncture & Moxibustion*, 2016, 36(7): 683-688.
- [15] BAO C H, ZHAO J M, LIU H R, et al. Randomized controlled trial: moxibustion and acupuncture for the treatment of Crohn's disease [J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(31): 11000-11011.
- [16] 贾文睿, 刘清国, 魏玮, 等. 针灸治疗溃疡性结肠炎的作用机理研究进展 [J]. *环球中医药*, 2021, 14(10): 1912-1916.
JIA W R, LIU Q G, WEI W, et al. Progress of research on mechanism of acupuncture and moxibustion treating ulcerative colitis (in Chinese) [J]. *Global Traditional Chinese Medicine*, 2021, 14(10): 1912-1916.
- [17] 白菊萍, 徐星榕, 边芸. P16, P53 及 Ki67 在子宫颈鳞状细胞癌 (SCC), 宫颈上皮内瘤变 (CIN) 及慢性炎症中表达水平及临床意义 [J]. *中国妇产科临床杂志*, 2022, 23(5): 474-476.
BAI J P, XU X R, BIAN Y. Expression levels and clinical significance of P16, P53 and Ki67 in cervical squamous cell carcinoma, cervical intraepithelial neoplasia and chronic cervicitis (in Chinese) [J]. *Chinese Journal of Clinical Obstetrics and Gynecology*, 2022, 23(5): 474-476.
- [18] 张暄琳, 李毅, 刘丽, 等. 炎症因子对人颗粒细胞凋亡调控基因 P53、Ba_x、Casepase-3、Bcl-2、Survivin 表达的影响 [J]. *实用妇产科杂志*, 2016, 32(7): 519-522.
ZHANG X L, LI Y, LIU L, et al. Effect of inflammatory markers on the expression of P53, Ba_x, Casepase-3, Bcl-2 and Survivin in human granulosa cells (in Chinese) [J]. *Journal of Practical Obstetrics and Gynecology*, 2016, 32(7): 519-522.
- [19] 何信用, 王俊岩, 宋囡, 等. 二陈汤合桃红四物汤调控 p53/SLC7A11 介导的氧化损伤及铁死亡抗动脉粥样硬化的作用及机制研究 [J]. *中华中医药杂志*, 2020, 35(5): 2344-2348.
HE X Y, WANG J Y, SONG N, et al. Effects and mechanism of Erchen Decoction and Taohong Siwu Decoction on the regulation of p53/SLC7A11 mediated oxidative damage and ferroptosis on atherosclerosis (in Chinese) [J]. *China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy*, 2020, 35(5): 2344-2348.
- [20] 鲍慧中, 朱丽娟, 刘雪枫, 等. 细辛通过上调 p53 介导铁死亡致大鼠肝损伤的作用机制研究 [J]. *中草药*, 2023, 54(2): 593-600.
BAO H Z, ZHU L J, LIU X F, et al. Study on mechanism of asari radix et rhizoma induced hepatic injury in rats by up-regulating p53 expression mediated ferroptosis (in Chinese) [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2023, 54(2): 593-600.
- [21] 苑小龙, 魏征, 张俊萍, 等. 黄芩苷通过 p53 介导的 SLC7A11 下调诱导胃癌细胞铁死亡 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2023, 29(6): 71-78.
YUAN X L, WEI Z, ZHANG J P, et al. Baicalin induces ferroptosis in gastric cancer cells via p53-mediated SLC7A11 down-regulation (in Chinese) [J]. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*, 2023, 29(6): 71-78.
- [22] 《针刺研究》编辑部. 《针刺研究》实验动物福利伦理审查清单 [J]. *针刺研究*, 2024, 49(2): 220.
Editorial Board of *Acupuncture Research*. List of ethical reviews for experimental animal welfare in *Acupuncture Research* (in Chinese) [J]. *Acupuncture Research*, 2024, 49(2): 220.
- [23] 郭义. 实验针灸学 [M]. 5 版. 北京: 中国中医药出版社, 2021.

- GUO Y. Experimental acupuncture (in Chinese) [M]. 5th edition. Beijing: China Press of Traditional Chinese Medicine, 2021.
- [24] 中国针灸学会. 实验动物常用穴位名称与定位 第3部分: 小鼠[J]. 针刺研究, 2021, 46(5):445-446.
China Association of Acupuncture-Moxibustion. Nomenclature and location of acupuncture points for laboratory animals. Part 3: mice (in Chinese) [J]. Acupuncture Research, 2021, 46(5):445-446.
- [25] CHASSAING B, AITKEN J D, MALLESHAPPA M, et al. Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice[J]. *Curr Protoc Immunol*, 2014, 104: 15.25.1-15.25.14.
- [26] D' HAENS G R, VAN DEVENTER S. 25 years of anti-TNF treatment for inflammatory bowel disease: lessons from the past and a look to the future[J]. *Gut*, 2021, 70(7): 1396-1405.
- [27] 吴焕淦, 张琳珊. 隔药饼灸治疗克隆氏病研究[J]. 现代康复, 2000, 4(3): 397.
WU H G, ZHANG L S. Clinical study of herbs-partition moxibustion on Crohn's disease (in Chinese) [J]. *Modern Rehabilitation*, 2000, 4(3): 397.
- [28] 朱笑吉, 吴璐一, 郑寒丹, 等. 近20年针灸治疗克罗恩病的临床研究与选穴规律[J]. 世界中医药, 2023, 18(4): 482-490.
ZHU X J, WU L Y, ZHENG H D, et al. Clinical research on the treatment of Crohn's disease by acupuncture and moxibustion in recent two decades years and acupoint selection rules (in Chinese) [J]. *World Chinese Medicine*, 2023, 18(4): 482-490.
- [29] LI J, CAO F, YIN H L, et al. Ferroptosis: past, present and future[J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(2): 88.
- [30] XIE Z X, HOU H D, LUO D, et al. ROS-dependent lipid peroxidation and reliant antioxidant ferroptosis-suppressor-protein 1 in rheumatoid arthritis: a covert clue for potential therapy[J]. *Inflammation*, 2021, 44(1): 35-47.
- [31] YU H C, YANG C C, JIAN L, et al. Sulfasalazine-induced ferroptosis in breast cancer cells is reduced by the inhibitory effect of estrogen receptor on the transferrin receptor [J]. *Oncol Rep*, 2019, 42(2): 826-838.
- [32] ZHU L J, CHEN D Z, ZHU Y, et al. GPX4-regulated ferroptosis mediates S100-induced experimental autoimmune hepatitis associated with the Nrf2/HO-1 signaling pathway [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 6551069.
- [33] 徐寒莹, 张艺缤, 张冬梅, 等. 铁死亡机制与中医药干预脑卒中后神经细胞铁死亡的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(20): 232-240.
XU H Y, ZHANG Y B, ZHANG D M, et al. Mechanism of ferroptosis and traditional Chinese medicine intervention on neuronal cell ferroptosis after stroke: a review (in Chinese) [J]. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*, 2022, 28(20): 232-240.
- [34] JIANG L, KON N, LI T Y, et al. Ferroptosis as a p53-mediated activity during tumour suppression [J]. *Nature*, 2015, 520(7545): 57-62.
- [35] JIANG X J, STOCKWELL B R, CONRAD M. Ferroptosis: mechanisms, biology and role in disease [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2021, 22(4): 266-282.
- [36] DA SILVA T N X, ANGELI J P F, INGOLD I. GPX4: old lessons, new features [J]. *Biochem Soc Trans*, 2022, 50(3): 1205-1213.
- [37] CHEN L L, WANG W J. p53 regulates lipid metabolism in cancer [J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 192: 45-54.
- [38] LU H Y, XIAO H, DAI M Y, et al. Britanin relieves ferroptosis-mediated myocardial ischaemia/reperfusion damage by upregulating GPX4 through activation of AMPK/GSK3 β /Nrf2 signalling [J]. *Pharm Biol*, 2022, 60(1): 38-45.
- [39] PARKER J L, DEME J C, KOLOKOURIS D, et al. Molecular basis for redox control by the human cystine/glutamate antiporter system xc [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 7147.
- [40] MIAO Y, CHEN Y W, XUE F, et al. Contribution of ferroptosis and GPX4's dual functions to osteoarthritis progression [J]. *EBioMedicine*, 2022, 76: 103847.
- [41] XU S J, WU B X, ZHONG B Y, et al. Naringenin alleviates myocardial ischemia/reperfusion injury by regulating the nuclear factor-erythroid factor 2-related factor 2 (Nrf2)/System xc-/glutathione peroxidase 4 (GPX4) axis to inhibit ferroptosis [J]. *Bioengineered*, 2021, 12(2): 10924-10934.
- [42] 方晓苓, 石建华, 王金海, 等. 铁死亡与炎症的关系 [J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2023, 32(2): 196-201.
FANG X L, SHI J H, WANG J H, et al. The relationship between ferroptosis and inflammation (in Chinese) [J]. *Chinese Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 2023, 32(2): 196-201.
- [43] 彭传玉, 王天城, 蔡荣林, 等. 艾灸调控铁死亡-脂质代谢通路改善类风湿性关节炎大鼠滑膜炎性损伤的机制研究 [J]. 针刺研究, 2024, 49(12): 1296-1302, 1309.
PENG C Y, WANG T C, CAI R L, et al. Study on the mechanism of moxibustion regulating ferroptosis-lipid metabolism pathway to improve synovitis inflammatory injury in rheumatoid arthritis rats (in Chinese) [J]. *Acupuncture Research*, 2024, 49(12): 1296-1302, 1309.
- [44] 唐文诚, 何清, 李俊峰, 等. 川芎嗪通过抑制炎症反应和铁死亡减轻对乙酰氨基酚所致肝损伤 [J]. 世界中医药, 2023, 18(24): 3512-3517.
TANG W C, HE Q, LI J F, et al. Ligustrazine alleviates acetaminophen-induced liver injury by inhibiting inflammatory response and ferroptosis (in Chinese) [J]. *World Chinese Medicine*, 2023, 18(24): 3512-3517.
- [45] PANDUR E, VARGA E, TAMÁSI K, et al. Effect of inflammatory mediators lipopolysaccharide and lipoteichoic acid on iron metabolism of differentiated SH-SY5Y cells alters in the presence of BV-2 microglia [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 20(1): 17.

收稿日期:2024-11-12 修回日期:2025-01-04

网络首发:2025-09-22

编辑:李天娇