

柿叶提取物对H₂O₂诱导IEC-6细胞铁死亡的影响及机制研究^Δ

张雪侠^{1*}, 周敏², 周红艳³, 王莉飞⁴, 李华妮¹, 刘长河¹, 徐洪德², 张明利^{5#}(1. 河南省中西医结合医院中药研究所, 郑州 450004; 2. 郑州大学药学院, 郑州 450001; 3. 河南中西医结合医院检验科, 郑州 450004; 4. 郑州大学第二附属医院肾病科, 郑州 450014; 5. 河南省中西医结合医院肺病科, 郑州 450004)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2025)01-0064-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2025.01.11



摘要 目的 探讨柿叶(PL)提取物对过氧化氢(H₂O₂)诱导IEC-6细胞铁死亡的影响及潜在机制。方法 以IEC-6细胞为对象, 考察铁死亡抑制剂ferrostatin-1对H₂O₂诱导IEC-6细胞活力的影响; 将IEC-6细胞分为对照组、H₂O₂组、H₂O₂+PL 25 μg/mL组、H₂O₂+PL 50 μg/mL组, 检测其氧化应激指标[丙二醛(MDA)含量、超氧化物歧化酶(SOD)活性和活性氧(ROS)水平]、线粒体膜电位(MMP)以及核转录因子红系2相关因子2(Nrf2)、血红素氧合酶1(HO-1)、还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸/醌氧化还原酶1(NQO-1)、胱氨酸/谷氨酸反向转运体(xCT)、谷胱甘肽过氧化物酶4(GPX4)、铁蛋白重链(FTH)mRNA及蛋白的表达情况。结果 铁死亡抑制剂ferrostatin-1可显著升高H₂O₂诱导细胞的存活率($P < 0.01$)。与对照组比较, H₂O₂组细胞MDA含量和ROS水平, Nrf2、NQO-1 mRNA及Nrf2、HO-1蛋白的表达均显著升高或上调; SOD活性和MMP, xCT、GPX4、FTH mRNA及GPX4、FTH蛋白的表达均显著降低或下调($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。与H₂O₂组比较, H₂O₂+PL 25、50 μg/mL组细胞的氧化应激指标均有不同程度回调, MMP均显著升高, Nrf2、HO-1、NQO-1, xCT、GPX4、FTH mRNA及蛋白的表达均有不同程度上调, 部分指标组间比较差异有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。结论 PL提取物能减轻H₂O₂所导致的细胞线粒体膜损伤、ROS异常堆积, 上述作用可能与激活Nrf2/HO-1信号通路从而抑制铁死亡有关。

关键词 柿叶提取物; 溃疡性结肠炎; 铁死亡; Nrf2/HO-1信号通路

Effects and mechanism of persimmon leaf extract on IEC-6 cell ferroptosis induced by H₂O₂

ZHANG Xuexia¹, ZHOU Min², ZHOU Hongyan³, WANG Lifei⁴, LI Huani¹, LIU Changhe¹, XU Hongde², ZHANG Mingli⁵ (1. Institute of Chinese Medicine, Henan Integrative Medicine Hospital, Zhengzhou 450004, China; 2. School of Pharmacy, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China; 3. Dept. of Clinical Laboratory, Henan Integrative Medicine Hospital, Zhengzhou 450004, China; 4. Dept. of Nephropathy, Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450014, China; 5. Dept. of Pulmonary, Henan Integrative Medicine Hospital, Zhengzhou 450004, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To investigate the effects and potential mechanism of persimmon leaf (PL) extract against ferroptosis induced by H₂O₂ in IEC-6 cells. **METHODS** Using IEC-6 cells as object, the effects of ferroptosis inhibitor ferrostatin-1 on IEC-6 cell viability induced by H₂O₂ were investigated; IEC-6 cells were divided into control group, H₂O₂ group, H₂O₂+PL 25 μg/mL group and H₂O₂+PL 50 μg/mL group. The levels of oxidant stress indexes [content of malondialdehyde (MDA), activity of superoxide dismutase (SOD), and levels of reactive oxygen species (ROS)], mitochondrial membrane potential (MMP) as well as mRNA and protein expressions of nuclear factor-erythroid-2 related factor 2 (Nrf2), heme oxygenase-1 (HO-1), NADPH/quinone oxidoreductase-1 (NQO-1), cystine/glutamate anti-porter (xCT), glutathione peroxidase 4 (GPX4) and ferritin heavy chain (FTH) were detected. **RESULTS** Ferroptosis inhibitor ferrostatin-1 could significantly increase the survival rate of H₂O₂-induced cells ($P < 0.01$). Compared with the control group, MDA content, ROS level, mRNA expressions of Nrf2 and NQO-1 as well as protein expressions of Nrf2 and HO-1 were increased or up-regulated significantly, while SOD activity, MMP, mRNA expressions of xCT, GPX4 and FTH as well as protein expressions of GPX4 and FTH were decreased or down-regulated significantly ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). Compared with the H₂O₂ group, oxidative stress indexes of H₂O₂+PL 25, 50 μg/mL groups were reversed to different extents, MMP level was increased significantly, as well as mRNA and protein expressions of Nrf2, HO-1, NQO-1, xCT, GPX4 and FTH were up-regulated to different extents; there were statistical significances in some indexes between groups ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). **CONCLUSIONS** PL extract

Δ 基金项目 河南省自然科学基金项目(No.242300420426);河南省医学科技攻关计划项目(No.LHGJ20230676);河南省中西医结合医院基本科研业务费立项项目(No.2404041, No.2404049)

* 第一作者 助理研究员, 硕士。研究方向: 中药药理及药效物质基础。E-mail: 343499957@qq.com

通信作者 主任医师, 硕士。研究方向: 呼吸与消化系统疾病的中医治疗。E-mail: Zhang120@126.com

can alleviate mitochondrial membrane damage and abnormal accumulation of ROS caused by H₂O₂, which may be related to the inhibition of ferroptosis by activating the Nrf2/HO-1 signaling pathway.

KEYWORDS persimmon leaf extract; ulcerative colitis; ferroptosis; Nrf2/HO-1 signaling pathway

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是炎症性肠病的主要类型之一,其发病率在全球范围内不断上升^[1]。长期以来,氧化应激被学界认为是UC的重要致病因素^[2]。在UC的发病过程中,肠道炎症反应的发生可促进细胞过度产生活性氧(reactive oxygen species, ROS),当ROS的生成超过机体的抗氧化缓冲能力时,会导致脂质过氧化物的发生,并进一步诱发铁死亡^[3]。可见,铁死亡主要由脂质过氧化累积所致,减轻机体氧化应激反应可有效抑制铁死亡。研究指出,无论是UC还是用于UC治疗的药物都会增加患者并发症(如结肠癌、皮肤癌、宫颈癌、骨骼疾病、焦虑抑郁等)的发生风险,若不及时治疗,这些并发症将导致不良的用药依从性、更高的医疗费用、更快的疾病进展,从而严重影响患者的生活质量^[3-4]。

柿叶(persimmon leaf, PL)提取物多年来被广泛用作炎症性疾病的治疗剂。研究显示,PL提取物具有抗炎、抗氧化的作用^[5],其主要活性成分鞣花素可通过降低丙二醛(malondialdehyde, MDA)和ROS水平、抑制铁死亡来减轻缺血再灌注或叶酸诱导的急性肾损伤^[6]。本课题组前期研究发现,PL提取物对UC具有保护作用^[7],但这种作用是否与氧化应激和铁死亡相关并不清楚。实验表明,过氧化氢(H₂O₂)可诱导细胞发生铁死亡^[8]。基于此,本研究拟以H₂O₂致铁死亡的IEC-6细胞(具隐窝样上皮细胞特征,是UC相关体外研究的常用细胞)作为体外模型,初步探讨PL提取物对该细胞模型的影响,以期为UC治疗新药的研发提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括Incubator CO₂-PU-90A型CO₂培养箱(上海博旅仪器有限公司)、Ti20型倒置荧光显微镜(日本Nikon公司)、EXL800型酶标仪(美国BioTek公司)、Navios型流式细胞仪(美国Beckman Coulter公司)、K5500Plus型实时聚合酶链反应(real-time PCR, RT-PCR)仪(北京凯奥科技发展有限公司)等。

1.2 主要药品与试剂

PL(产地安徽亳州,批号20210314)购自安徽亳州药材市场,由河南省中西医结合医院中药研究所刘长河副研究员鉴定为柿树科植物柿*Diospyros kaki* Thunb.的干燥叶。

铁死亡抑制剂ferrostatin-1(Fer-1)的对照品(批号HY100579,纯度99.96%)购自美国MedChemExpress公司;胎牛血清(fetal bovine serum, FBS;批号2181654CP)购自美国Gibco公司;MTT试剂、DMEM高糖培养基、胰蛋白酶、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)试剂盒、MDA试剂盒、线粒体膜电位JC-1试剂盒(批号分别为20210508、20210903、20210804、20210323、20210303、20210412)均购自北京索莱宝科技有限公司;PCR试剂盒购自凯杰生物工程(深圳)有限公司;Trizol试剂(批号20210316)购自北京康为世纪生物科技有限公司;Revert-Aid™ First Strand cDNA合成试剂盒(批号00780630)购自美国Thermo Fisher Scientific公司;ROS试剂盒(荧光探针法,批号D3861)购自美国Invitrogen公司;兔源胱氨酸/谷氨酸反向转运体(cystine/glutamate anti-porter, xCT)、谷胱甘肽过氧化物酶4(glutathione peroxidase 4, GPX4)抗体(批号分别为ab307601、ab125066)均购自英国Abcam公司;兔源核转录因子红系2相关因子2(nuclear factor-erythroid 2-related factor 2, Nrf2)、铁蛋白重链(ferritin heavy chain, FTH)抗体(批号分别为#AF0639、#DF6278)均购自美国Affinity公司;兔源还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸/醌氧化还原酶1(NADPH/quinone oxidoreductase-1, NQO-1)、血红素氧合酶1(heme oxygenase-1, HO-1)抗体(批号分别为GB11282、GB11549)均购自武汉赛维尔生物科技有限公司;兔源甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(批号10494-1)购自武汉三鹰生物科技有限公司;辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔免疫球蛋白G二抗(批号162607)购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司。

1.3 细胞

大鼠IEC-6细胞由北京协和医学院基础学院细胞库提供。

2 方法

2.1 药液的制备

PL提取物药液的制备参考本课题组前期已发表的文献[8]。

2.2 细胞培养与处理

将IEC-6细胞接种于含5%FBS的DMEM高糖培养基(以下简称“完全培养基”)中,在37℃、5%CO₂、饱和湿度条件(培养条件后同)下培养,每2~3d换液1次,待细胞生长至对数期进行后续实验。

2.3 PL提取物毒性考察及药物干预浓度筛选

2.3.1 PL提取物毒性考察

取对数生长期的 IEC-6 细胞,按 1×10^5 个/mL 接种于 96 孔板中,每孔 100 μL ,培养。待细胞融合至 80% 左右时,将其分为空白对照组和 PL 提取物不同质量浓度组,每组设置 5 个复孔。对照组加入完全培养基 200 μL ,各药物组加入含不同质量浓度 PL 提取物(根据预实验结果设置,质量浓度分别为 25、50、100、200、400 $\mu\text{g}/\text{mL}$,以 PL 提取物质量计)的完全培养基 200 μL 。培养 24 h,每孔加入 0.5% MTT 溶液 20 μL ,避光反应 2 h;弃去培养基,每孔加入二甲基亚砜 150 μL ,振荡 5 min,使用酶标仪于 490 nm 波长处检测各孔的吸光度值,并计算细胞存活率(细胞存活率=实验组细胞的平均吸光度值/对照组细胞的平均吸光度值 \times 100%),以考察 PL 提取物对细胞活力的影响。

2.3.2 H_2O_2 作用浓度筛选

取对数生长期的 IEC-6 细胞,按 1×10^5 个/mL 接种于 96 孔板中,每孔 100 μL ,培养。待细胞融合至 80% 左右时,吸弃培养液,以磷酸盐缓冲液(PBS)清洗 1 次后,将其分为空白对照组和 H_2O_2 不同浓度组,每组设置 6 个复孔。对照组加入完全培养基 200 μL ,其余各组分别加入含不同浓度 H_2O_2 (参考相关文献^[10]设置,浓度分别为 30、40、50、60、70、80 $\mu\text{mol}/\text{L}$)的完全培养基 200 μL 。培养 24 h,按“2.3.1”项下方法检测各组细胞存活率,以筛选 H_2O_2 的作用浓度。

2.3.3 PL提取物干预浓度筛选

取对数生长期的 IEC-6 细胞,按 1×10^5 个/mL 接种于 96 孔板中,每孔 100 μL ,培养。待细胞融合至 80% 左右时,吸弃培养液,以 PBS 清洗 1 次后,将其分为空白对照组和 PL 提取物不同质量浓度组,每组设置 6 个复孔。对照组加入不含 H_2O_2 的完全培养基 200 μL ,其余各组分别加入含 H_2O_2 60 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 和 PL 提取物 25、50、100、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的完全培养基 200 μL (H_2O_2 和 PL 提取物干预浓度参考“2.3.2”“2.3.1”项下结果设置)。培养 24 h,按“2.3.1”项下 MTT 法检测细胞存活率,以进一步筛选后续实验 PL 提取物的干预浓度。

2.4 铁死亡抑制剂对 H_2O_2 诱导的 IEC-6 细胞活力的影响检测

取对数生长期的 IEC-6 细胞,按 1×10^5 个/mL 接种于 96 孔板中,每孔 100 μL ,培养。待细胞融合至 80% 左右时,吸弃培养液,以 PBS 清洗 1 次,将其分为空白对照组、Fer-1 组、 H_2O_2 组、 H_2O_2 +Fer-1 组,每组设置 6 个复孔。对照组加入完全培养基 200 μL ,Fer-1 组加入含 Fer-1 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的完全培养基 200 μL , H_2O_2 组加入含 H_2O_2 60 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的完全培养基 200 μL , H_2O_2 +Fer-1 组加入含 Fer-1

1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、 H_2O_2 60 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的完全培养基 200 μL (Fer-1 干预浓度参考相关文献^[10]设置, H_2O_2 干预浓度参考“2.3.2”项下结果设置)。培养 24 h,按“2.3.1”项下 MTT 法检测细胞存活率,以考察 H_2O_2 导致的 IEC-6 细胞损伤是否与铁死亡相关。

2.5 PL提取物对 H_2O_2 诱导的 IEC-6 细胞氧化应激的影响检测

取对数生长期的 IEC-6 细胞,按 1×10^5 个/mL 接种于 96 孔板中,每孔 100 μL 。待细胞贴壁后,将其分为对照组(Control 组)、 H_2O_2 组、 H_2O_2 +PL 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组、 H_2O_2 +PL 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组,每组设置 6 个复孔。Control 组加入完全培养基 200 μL , H_2O_2 组加入含 H_2O_2 60 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的完全培养基 200 μL , H_2O_2 +PL 25、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组分别加入含 H_2O_2 60 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 和 PL 提取物 25、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的完全培养基 200 μL (H_2O_2 、PL 提取物干预浓度分别参考“2.3.2”“2.3.3”项下结果设置)。培养 24 h,收集细胞上清液,按照相应试剂盒说明书方法操作,使用酶标仪检测其 MDA 含量和 SOD 活性。

按上述方法进行细胞分组、造模、处理。培养 24 h 后,收集各组细胞,加入 ROS 试剂盒中 BODIPYTM 581/591C11 试液(以无血清培养基稀释,终浓度为 2 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 1 mL,于 37 $^\circ\text{C}$ 下孵育 30 min;弃去上清液,细胞用 PBS 1 mL 清洗 2 次,加入胰蛋白酶 1 mL,消化 3 min 后,加入培养基 1 mL 终止消化。收集细胞悬液,于 4 $^\circ\text{C}$ 下以 10 000 r/min 离心 3 min,吸弃培养基,细胞用预冷的 PBS 1 mL 清洗 2 次后,再以预冷的 PBS 400 μL 稀释,使用流式细胞仪检测细胞内 ROS 水平。

2.6 PL提取物对 H_2O_2 诱导的 IEC-6 细胞线粒体膜电位的影响

按“2.5”项下方法进行细胞分组、造模、处理。培养 24 h 后,收集各组细胞,加入 JC-1 荧光探针试液(以二甲基亚砜为溶剂,终浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$),于 37 $^\circ\text{C}$ 下孵育 20 min;细胞用 PBS 轻柔洗涤 2 次后,再以 PBS 5 mL 稀释,使用倒置荧光显微镜观察细胞状态(JC-1 聚合物呈红色荧光,JC-1 单体呈绿色荧光),分析每张显微图的平均荧光强度并计算细胞线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential, MMP; MMP=红色平均荧光强度/绿色平均荧光强度),以反映各组细胞线粒体膜的去极化程度(MMP 与去极化程度成反比)。

2.7 PL提取物对 H_2O_2 诱导的 IEC-6 细胞中铁死亡相关 mRNA 表达的影响检测

采用定量 RT-PCR 法检测。按“2.5”项下方法进行细胞分组、造模、处理。培养 24 h 后,收集各组细胞,使用 Trizol 试剂提取其总 RNA,检测其浓度和纯度后,使用反转录试剂盒将其反转录为 cDNA,然后以此为模板

进行PCR扩增。PCR反应体系包括SYBR[®] Pre mix Ex Taq[™]酶(2×)10 μL、PCR正/反向引物各0.8 μL、cDNA模板2 μL和无菌水6.4 μL。PCR反应条件为:95 °C预变性2 min;95 °C变性2 s,60 °C退火10 s,共40个循环。以GAPDH为内参,采用2^{-ΔΔCt}法分析Nrf2、HO-1、NQO-1、xCT、GPX4、FTH mRNA的表达水平,结果以Control组为参照进行归一化处理。PCR引物由苏州金唯智生物科技有限公司设计、合成,具体序列及产物长度见表1。

表1 PCR引物序列及产物长度

| 基因 | 正向引物序列(5'→3') | 反向引物序列(5'→3') | 扩增产物长度bp |
|-------|-------------------------|-----------------------|----------|
| GAPDH | ATGACATCAAGAAGGTGGTG | CATACCAGGAAATGAGCTTG | 138 |
| Nrf2 | TCTTGGAGTAAGTCGAGAAGTGT | GTTGAACTGAGCGAAAAAGGC | 268 |
| HO-1 | AAGCCGAGAATGCTGAGTTCA | GCCGTGTAGATGGTACAAGGA | 104 |
| NQO-1 | AGGATGGGAGGTAAGTCAATC | AGGCGCTCTCTTATATGCTA | 236 |
| xCT | GGCACCCTCATCGGATCAG | CTCCACAGGCAGACCAGAAAA | 157 |
| GPX4 | GCCTGGATAAGTACAGGGGTT | CATGCAGATCGACTAGCTGAG | 263 |
| FTH | CAAGTGCGCCAGAATACCA | GCCACATCATCTCGGTCAAAA | 214 |

2.8 PL提取物对H₂O₂诱导的IEC-6细胞中铁死亡相关蛋白表达的影响检测

采用Western blot法检测。按“2.5”项下方法进行细胞分组、造模、处理。培养24 h后,收集各组细胞,用RIPA裂解液提取总蛋白,以BCA法测定蛋白浓度后加热变性。取变性蛋白适量,经12%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离并转移到聚偏二氟乙烯膜上,用5%脱脂牛奶封闭1 h;洗膜后,加入Nrf2、HO-1、NQO-1、xCT、GPX4、FTH、GAPDH一抗(稀释比例均为1:1 000),于4 °C下孵育过夜;洗膜后,加入相应二抗(稀释比例1:2 000),于室温下孵育2 h;使用化学发光试剂显色后置于凝胶成像仪下成像。以GAPDH为内参,使用Image J软件量化Nrf2、HO-1、NQO-1、xCT、GPX4、FTH蛋白的表达水平,结果以Control组为参照进行归一化处理。

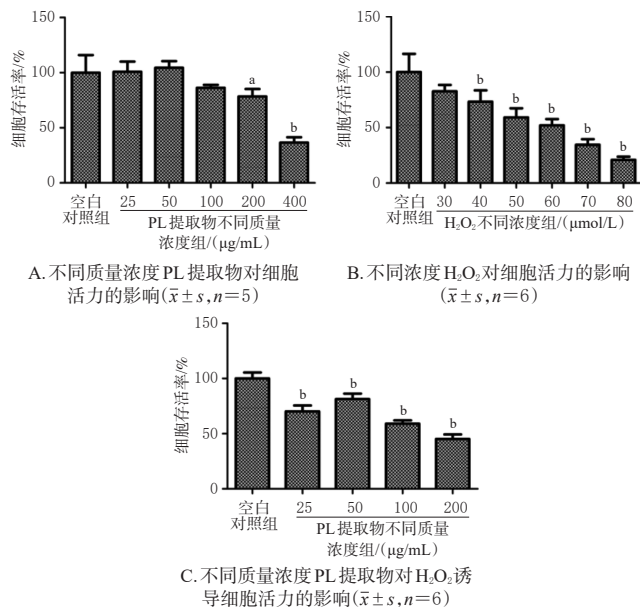
2.9 统计学方法

采用GraphPad Prism 9软件对数据进行统计分析并绘图。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用LSD-*t*检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 PL提取物毒性考察及药物干预浓度筛选结果

当PL提取物质量浓度为200、400 μg/mL时,细胞存活率(平均值分别为77.85%、36.60%)均较空白对照组显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$);当PL提取物质量浓度为25、50、100 μg/mL时,细胞存活率(平均值分别为100.77%、104.42%、86.25%)与空白对照组比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。结果见图1A。



a: 与对照组比较, $P<0.05$; b: 与对照组比较, $P<0.01$ 。

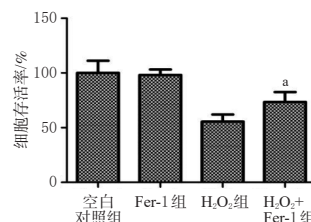
图1 PL提取物毒性考察及药物干预浓度筛选结果

当H₂O₂浓度分别为30、40、50、60、70、80 μmol/L时,细胞的平均存活率分别为82.68%、73.32%、59.16%、52.04%、34.55%、20.98%。为保证细胞有足够的活力进行后续实验,本研究选用60 μmol/L作为H₂O₂诱导浓度。结果见图1B。

当PL提取物质量浓度为100、200 μg/mL时,随着药物质量浓度的增加,细胞存活率呈下降趋势;当PL提取物浓度为25、50 μg/mL时,随着药物浓度的增加,细胞存活率有所升高,提示上述质量浓度的PL提取物可抑制H₂O₂所导致的细胞存活率降低。因此,本研究选用25、50 μg/mL作为后续实验PL提取物的干预质量浓度。结果见图1C。

3.2 铁死亡抑制剂对H₂O₂诱导的IEC-6细胞活力的影响

当只加Fer-1时,细胞的平均存活率为98.19%,接近于空白对照组,提示此质量浓度的Fer-1对细胞几乎没有毒性;当在H₂O₂诱导的细胞中加入Fer-1后,细胞的存活率较H₂O₂组显著升高($P<0.01$)。由此可见,H₂O₂诱导的IEC-6细胞死亡可能与铁死亡相关。结果见图2。



a: 与H₂O₂组比较, $P<0.01$ 。

图2 铁抑制剂对H₂O₂诱导的IEC-6细胞活力的影响结果($\bar{x} \pm s, n=6$)

3.3 PL 提取物对 H₂O₂ 诱导的 IEC-6 细胞氧化应激的影响

与 Control 组比较, H₂O₂ 组细胞上清液中 SOD 活性显著降低, MDA 含量、ROS 水平均显著升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与 H₂O₂ 组比较, H₂O₂+PL 50 μg/mL 组细胞上清液中 SOD 活性显著升高, ROS 水平显著降低 ($P < 0.05$)。结果见表 2、图 3。

表 2 PL 提取物对 IEC-6 细胞氧化应激的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

| 组别 | MDA 含量/(nmol/10 000 个细胞) | SOD 活性/(U/10 000 个细胞) | ROS 水平/% |
|--|--------------------------|--------------------------|----------------------------|
| Control 组 | 0.42 ± 0.18 | 0.41 ± 0.09 | 24.06 ± 7.72 |
| H ₂ O ₂ 组 | 0.93 ± 0.14 ^a | 0.15 ± 0.05 ^a | 56.27 ± 8.14 ^a |
| H ₂ O ₂ +PL 25 μg/mL 组 | 0.70 ± 0.08 | 0.22 ± 0.52 | 44.97 ± 7.48 |
| H ₂ O ₂ +PL 50 μg/mL 组 | 0.64 ± 0.13 | 0.38 ± 0.04 ^c | 33.44 ± 10.36 ^c |

a: 与 Control 组比较, $P < 0.05$; b: 与 Control 组比较, $P < 0.01$; c: 与 H₂O₂ 组比较, $P < 0.05$ 。

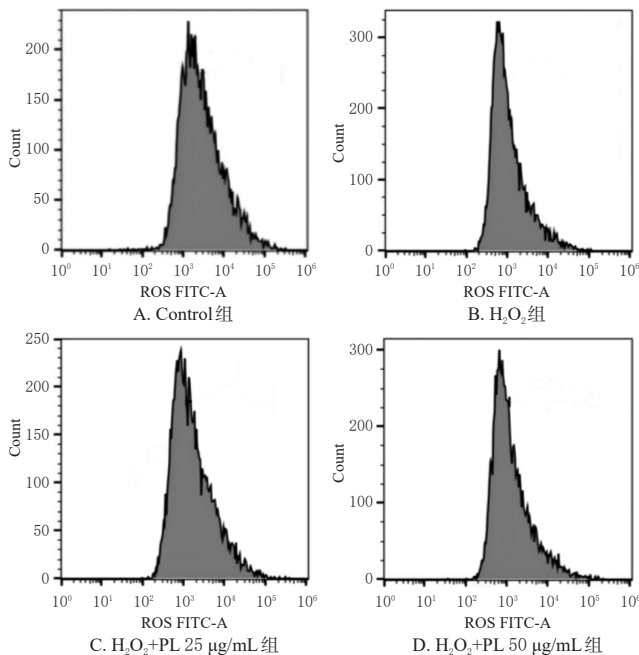


图 3 PL 提取物对 IEC-6 细胞中 ROS 水平影响的流式图

3.4 PL 提取物对 H₂O₂ 诱导的 IEC-6 细胞 MMP 的影响

与 Control 组 (MMP 为 2.01 ± 0.21) 比较, H₂O₂ 组细胞的红色荧光明显减弱, 绿色荧光明显增强, MMP (0.63 ± 0.15) 显著降低 ($P < 0.01$); 与 H₂O₂ 组比较, H₂O₂+PL 25, 50 μg/mL 组细胞的红色荧光有所增强, 绿色荧光有所减弱, MMP [1.17 ± 0.15, 1.63 ± 0.15] 均显著升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结果见图 4。

3.5 PL 提取物对 H₂O₂ 诱导的 IEC-6 细胞中铁死亡相关 mRNA 及蛋白表达的影响

与 Control 组比较, H₂O₂ 组细胞中 Nrf2、NQO-1 mRNA 及 Nrf2、HO-1 蛋白的表达均显著上调, xCT、

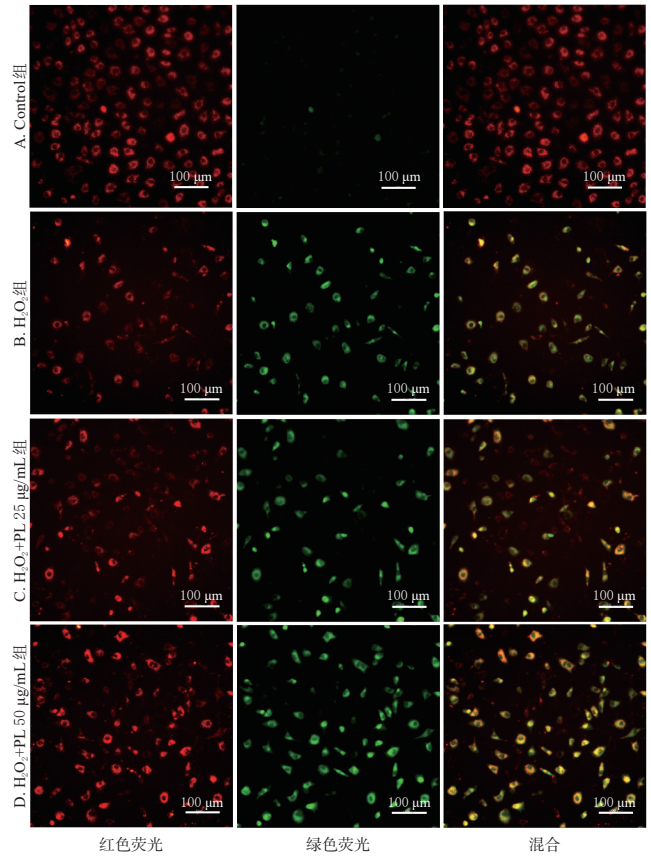


图 4 PL 提取物对 IEC-6 细胞 MMP 影响的荧光显微图

GPX4、FTH mRNA 及 GPX4、FTH 蛋白的表达均显著下调 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与 H₂O₂ 组比较, 各药物组细胞中 Nrf2、HO-1、NQO-1、xCT、GPX4、FTH mRNA 及蛋白的表达均有不同程度上调, 部分指标组间比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。结果见表 3、表 4、图 5。

表 3 PL 提取物对 H₂O₂ 诱导的 IEC-6 细胞中铁死亡相关 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

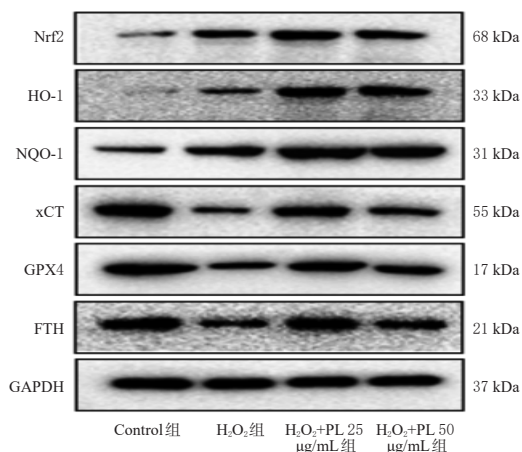
| 组别 | Nrf2 mRNA | HO-1 mRNA | NQO-1 mRNA | xCT mRNA | GPX4 mRNA | FTH mRNA |
|--|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Control 组 | 1.00 ± 0.15 | 1.03 ± 0.27 | 1.00 ± 0.14 | 1.01 ± 0.16 | 1.00 ± 0.05 | 1.00 ± 0.10 |
| H ₂ O ₂ 组 | 2.17 ± 0.77 ^a | 2.14 ± 0.92 | 1.58 ± 0.72 ^a | 0.43 ± 0.20 ^a | 0.58 ± 0.10 ^a | 0.32 ± 0.25 ^a |
| H ₂ O ₂ +PL 25 μg/mL 组 | 2.49 ± 0.51 ^c | 2.21 ± 0.60 | 1.94 ± 0.82 | 0.53 ± 0.21 | 0.72 ± 0.08 ^b | 0.42 ± 0.21 |
| H ₂ O ₂ +PL 50 μg/mL 组 | 3.08 ± 0.60 ^d | 2.85 ± 0.45 ^c | 2.02 ± 0.79 | 0.71 ± 0.17 ^c | 0.94 ± 0.19 ^b | 0.47 ± 0.23 |

a: 与 Control 组比较, $P < 0.01$; b: 与 Control 组比较, $P < 0.05$; c: 与 H₂O₂ 组比较, $P < 0.05$; d: 与 H₂O₂ 组比较, $P < 0.01$ 。

表 4 PL 提取物对 H₂O₂ 诱导的 IEC-6 细胞中铁死亡相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

| 组别 | Nrf2/ GAPDH | HO-1/ GAPDH | NQO-1/ GAPDH | xCT/ GAPDH | GPX4/ GAPDH | FTH/ GAPDH |
|--|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Control 组 | 0.98 ± 0.08 | 0.99 ± 0.18 | 1.04 ± 0.33 | 0.98 ± 0.04 | 1.00 ± 0.12 | 0.98 ± 0.12 |
| H ₂ O ₂ 组 | 1.63 ± 0.19 ^a | 2.28 ± 0.19 ^a | 1.28 ± 0.08 | 0.49 ± 0.25 | 0.57 ± 0.14 ^b | 0.66 ± 0.12 ^b |
| H ₂ O ₂ +PL 25 μg/mL 组 | 1.77 ± 0.25 | 2.59 ± 0.42 | 1.42 ± 0.20 | 0.75 ± 0.16 | 0.61 ± 0.17 | 0.80 ± 0.12 |
| H ₂ O ₂ +PL 50 μg/mL 组 | 2.48 ± 0.24 ^c | 3.16 ± 0.33 ^d | 1.70 ± 0.23 ^d | 0.95 ± 0.11 ^d | 0.79 ± 0.14 | 0.86 ± 0.11 |

a: 与 Control 组比较, $P < 0.01$; b: 与 Control 组比较, $P < 0.05$; c: 与 H₂O₂ 组比较, $P < 0.01$; d: 与 H₂O₂ 组比较, $P < 0.01$ 。



I : Control组; II : H₂O₂组; III : H₂O₂+PL 25 μg/mL组; IV : H₂O₂+PL 50 μg/mL组。

图5 PL 提取物对 H₂O₂ 诱导的 IEC-6 细胞中铁死亡相关蛋白表达影响的电泳图

4 讨论

中药因作用靶点多、价格低的优势,在慢性疾病治疗领域得到了越来越多的关注和应用。研究指出,PL 提取物可通过调节 Jun 激酶途径来抑制 T 细胞的活化,从而改善小鼠的特异性皮炎^[11];其可提高大鼠口腔溃疡组织中 SOD 活性并降低 MDA 含量,减轻口腔黏膜下层的炎症细胞浸润,对醋酸诱导的口腔溃疡有一定的改善作用,上述作用可能是通过抗炎和抗氧化而实现的^[9];此外,PL 提取物可通过活化 Nrf2/HO-1 信号通路来发挥抗氧化作用,从而减缓阿尔茨海默病的进程^[12]。研究表明,PL 提取物中的黄酮类成分金丝桃苷不仅可直接清除细胞内的 ROS、螯合金属离子,而且可增加 GPX4、SOD、HO-1 等抗氧化酶的生物活性^[13]。可见,PL 提取物具有一定的抗炎、抗氧化作用。

铁死亡与人体生理、病理进程密切相关,特别是在炎症性、神经性、代谢异常等疾病的发生及发展过程中发挥了重要作用^[14]。早有研究表明,使用铁螯合剂可以缓解 UC 患者的临床症状,而使用铁剂则可能加重相关症状^[15]。随后,有学者指出,过量的铁会加重肠道炎症,且人群的高膳食铁摄入量可促进 UC 的发展^[16-17]。此外有学者发现,UC 患者结肠黏膜中 ROS 的增加与疾病活动度成正比,而铁螯合剂可减少 ROS 的生成,并改善 UC 的结肠症状^[18]。由此可见,铁死亡与 UC 的发生发展密切相关,抑制铁死亡的发生可能对治疗 UC 有益。

氧化应激长期被认为是 UC 的重要致病因素。ROS 由细胞线粒体产生,正常情况下具有杀菌作用;但在 UC 的发病过程中,肠道炎症反应的发生可促进细胞过度生成 ROS,超过机体抗氧化缓冲能力,从而引发脂质过氧化、肠道黏膜屏障损伤和炎症反应^[19]。SOD、MDA 是氧化应激的重要指标。其中,MDA 是 ROS 诱导脂质过氧

化反应的产物之一,也是机体组织氧化损伤的重要指标,MDA 水平越高,表明机体组织损伤越严重;SOD 是一种抗氧化酶,能够清除氧自由基,若机体对氧自由基的抑制作用减弱,可导致氧自由基在体内过量积累,从而增加细胞膜的通透性,使体内炎症因子水平升高^[20]。本研究结果表明,在 50 μg/mL PL 提取物的作用下,IEC-6 细胞氧化应激模型的 ROS 水平显著降低,SOD 活性显著升高,提示 PL 提取物可抑制 H₂O₂ 诱导的 IEC-6 细胞的氧化应激损伤。

肠道内抗氧化防御系统的过度损伤与 UC 的发病机制密切相关,Nrf2/HO-1 信号通路是体内对抗氧化应激的主要防御机制之一,可影响疾病的转归^[21]。近年研究表明,UC 患者体内 Nrf2 蛋白的表达水平显著低于对照组,但 UC 相关结肠癌患者体内 Nrf2 蛋白的表达水平显著高于对照组^[21];此外,有研究显示,与健康对照组比较,磷酸化的 Nrf2 蛋白在中/重度 UC 患者体内呈高表达,但非磷酸化的 Nrf2 蛋白在中/重度 UC 患者体内的表达则明显下调^[22]。上述研究表明,Nrf2 蛋白的表达水平及表达形式与疾病进程有关。现有研究表明,中医药治疗 UC 的作用可能与调节线粒体的生物发生、动力学平衡等有关^[23]。ROS 主要在线粒体中产生,适量的 ROS 可维持体内各通路的信号转导,而过量的 ROS 则可能造成 MMP 降低,从而导致线粒体功能障碍^[24]。本研究结果表明,PL 提取物可显著提高 H₂O₂ 诱导的 IEC-6 细胞的 MMP,抑制线粒体去极化的发生;同时,PL 提取物可激活 Nrf2 蛋白,上调下游 HO-1、NQO-1、xCT、GPX4、FTH 蛋白及 mRNA 的表达,从而发挥抗氧化应激和抑制铁死亡的作用。

综上所述,PL 提取物能减轻 H₂O₂ 所导致的细胞线粒体膜损伤、ROS 异常堆积,上述作用可能与激活 Nrf2/HO-1 信号通路从而抑制铁死亡有关。

参考文献

- [1] KOJIMA K, TAKADA J, OTANI K, et al. Duodenitis associated with ulcerative colitis and pouchitis after total colectomy successfully treated with upadacitinib: a case report[J]. DEN Open, 2025, 5(1): e415.
- [2] ZHAO X D, CHEN X C, YUE C C. Rutin ameliorates inflammation and oxidative stress in ulcerative colitis by inhibiting NLRP3 inflammasome signaling pathway[J]. Cell Biochem Biophys, 2024, 82(4): 3715-3726.
- [3] MIKOCKA-WALUS A, KNOWLES S R, KEEFER L, et al. Controversies revisited: a systematic review of the comorbidity of depression and anxiety with inflammatory bowel diseases[J]. Inflamm Bowel Dis, 2016, 22(3): 752-762.
- [4] LEES B F, ERICKSON B K, HUH W K. Cervical cancer

- screening: evidence behind the guidelines[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2016, 214(4):438-443.
- [5] 王莲,肖继椿,田垚,等. 柿叶黄酮通过激活自噬与抗氧化应激协同作用改善NAFLD大鼠肝脏脂肪变性[J]. *天津医药*, 2023, 51(11):1211-1216.
WANG L, XIAO J C, TIAN Y, et al. Study of persimmon leaf flavonoids ameliorates liver steatosis by activating autophagy and antioxidant stress in NAFLD rats[J]. *Tianjin Med J*, 2023, 51(11):1211-1216.
- [6] WANG Y, QUAN F, CAO Q H, et al. Quercetin alleviates acute kidney injury by inhibiting ferroptosis[J]. *J Adv Res*, 2021, 28:231-243.
- [7] 张雪侠,刘方洲,梁瑞峰,等. 柿叶提取物通过TLR4/NLRP3炎症信号通路和肠道菌群治疗溃疡性结肠炎的机制研究[J]. *中国新药杂志*, 2023, 32(15):1561-1569.
ZHANG X X, LIU F Z, LIANG R F, et al. Mechanism on persimmon leaf extract in the treatment of ulcerative colitis through TLR4/NLRP3 inflammatory signal pathway and intestinal flora[J]. *Chin J New Drugs*, 2023, 32(15):1561-1569.
- [8] LU S, WANG X Z, HE C, et al. ATF3 contributes to brucine-triggered glioma cell ferroptosis via promotion of hydrogen peroxide and iron[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2021, 42(10):1690-1702.
- [9] 王幼琳. 天麻素通过干预过氧化氢诱导铁死亡而延缓PC12细胞衰老的初步分子机制研究[D]. 合肥:安徽中医药大学, 2021.
WANG Y L. Preliminary molecular mechanism of gastrodin delaying the aging of PC12 cells by interfering with iron death induced by hydrogen peroxide[D]. Hefei: Anhui University of Chinese Medicine, 2021.
- [10] JIANG T, CHU J, CHEN H, et al. Gastrodin inhibits H₂O₂-induced ferroptosis through its antioxidative effect in rat glioma cell line C6[J]. *Biol Pharm Bull*, 2020, 43(3):480-487.
- [11] LEE H S, KIM E N, KIM G R, et al. Persimmon leaf extract protects mice from atopic dermatitis by inhibiting T cell activation via regulation of the JNK pathway[J]. *Phytother Res*, 2021, 35(5):2545-2556.
- [12] 吴小凡,马斌,侯训尧,等. 柿叶提取物对HEK293-APPsw转基因细胞模型的抗氧化作用及对Nrf2/HO-1途径的影响[J]. *中国免疫学杂志*, 2017, 33(6):854-858.
WU X F, MA B, HOU X Y, et al. Antioxidant effect of persimmon leaf extract to HEK293-APPsw transgenic cells and effect to Nrf2/HO-1 pathway[J]. *Chin J Immunol*, 2017, 33(6):854-858.
- [13] XING H Y, CAI Y Q, WANG X F, et al. The cytoprotective effect of hyperoside against oxidative stress is mediated by the Nrf2-ARE signaling pathway through GSK-3 β inactivation[J]. *PLoS One*, 2015, 10(12):e0145183.
- [14] DEVOS D, MOREAU C, KYHENG M, et al. A ferroptosis-based panel of prognostic biomarkers for amyotrophic lateral sclerosis[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1):2918.
- [15] SERIL D N, LIAO J, HO K L K, 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.
- [16] CARRIER J C, AGHDASSI E, JEEJEEBHOY K, et al. Exacerbation of dextran sulfate sodium-induced colitis by dietary iron supplementation: role of NF-kappaB[J]. *Int J Colorectal Dis*, 2006, 21(4):381-387.
- [17] 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.
- [18] 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.
- [19] KUCHARZIK T, KOLETZKO S, KANNENGIESSER K, et al. Ulcerative colitis: diagnostic and therapeutic algorithms[J]. *Dtsch Arztebl Int*, 2020, 117(33/34):564-574.
- [20] BALMUS I M, CIOBICA A, TRIFAN A, et al. The implications of oxidative stress and antioxidant therapies in inflammatory bowel disease: clinical aspects and animal models[J]. *Saudi J Gastroenterol*, 2016, 22(1):3-17.
- [21] MYERS J N, SCHÄFFER M W, KOROLKOVA O Y, et al. Implications of the colonic deposition of free hemoglobin- α chain: a previously unknown tissue by-product in inflammatory bowel disease[J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2014, 20(9):1530-1547.
- [22] SABZEVARY-GHAHFAROKHI M, SHOHAN M, SHIRZAD H, et al. The regulatory role of Nrf2 in antioxidants phase 2 enzymes and IL-17A expression in patients with ulcerative colitis[J]. *Pathol Res Pract*, 2018, 214(8):1149-1155.
- [23] ZHANG D D, ZHOU X T, ZHANG K, et al. Glucomanan from *Aloe Vera* Gel maintains intestinal barrier integrity via mitigating anoikis mediated by Nrf2-mitochondria axis[J]. *Int J Biol Macromol*, 2023, 235:123803.
- [24] DANNE C, MICHAUDEL C, SKERNISKYTE J, et al. CARD9 in neutrophils protects from colitis and controls mitochondrial metabolism and cell survival[J]. *Gut*, 2023, 72(6):1081-1092.

(收稿日期:2024-06-19 修回日期:2024-11-08)

(编辑:张元媛)