

柔肝健脾方对肝郁脾虚证溃疡性结肠炎小鼠铁死亡的影响

黄 华¹, 孙薛亮², 季利江¹, 马俊杰^{3*}, 魏 巍⁴, 郭天威^{5*}

(1. 南京中医药大学常熟附属医院肛肠科, 江苏 常熟 215500; 2. 南京中医药大学附属苏州市中医医院肛肠科, 江苏 苏州 215000; 3. 南京中医药大学中医学院, 江苏 南京 210023; 4. 南京中医药大学常熟附属医院脾胃病科, 江苏 常熟 215500; 5. 南京中医药大学常熟附属医院病理科, 江苏 常熟 215500)

摘要: **目的** 探究柔肝健脾方对肝郁脾虚证溃疡性结肠炎 (UC) 小鼠的影响。**方法** 采用慢性束缚应激+过度疲劳+饮食失节方法诱导 C57BL/6J 小鼠形成肝郁脾虚证, 再予 3% DSS 诱导建立 UC 模型, 将小鼠随机分为空白组、模型组、柔肝健脾方组 (20 g/kg)、美沙拉嗪组 (200 mg/kg), 每组 6 只, 灌胃给予相应药物。观察小鼠体质量、粪便情况、疾病活动指数, HE 染色观察小鼠结肠组织病理学比较, ELISA 法检测血清 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平, 采用试剂盒检测小鼠结肠组织铁负荷、GSH、MDA 水平, RT-qPCR 和 Western blot 法检测小鼠结肠组织 GPX4、FTH1、ACSL4 mRNA 和蛋白表达。利用 TNF- α 诱导 NCM460 结肠细胞炎症, 加入柔肝健脾方含药血清和铁死亡诱导剂 RSL3 处理细胞, CCK-8 法检测细胞存活率, ELISA 法检测细胞上清液 IL-1 β 、IL-6 水平, 分析细胞中铁负荷、GSH、MDA 水平, 以及 GPX4、FTH1、ACSL4 mRNA 和蛋白表达。**结果** 与模型组比较, 柔肝健脾方组小鼠体质量增加 ($P<0.01$), 结肠长度延长 ($P<0.01$), 疾病活动指数、组织病理学评分、血清 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平、结肠组织 MDA 水平、铁水平、ACSL4 mRNA 和蛋白表达降低 ($P<0.01$), GSH 水平、GPX4、FTH1 mRNA 和蛋白表达升高 ($P<0.01$)。在 NCM460 细胞中, 柔肝健脾方可抑制 TNF- α 诱导的细胞上清 IL-1 β 、IL-6 水平及铁死亡水平 ($P<0.01$)。**结论** 柔肝健脾方可有效改善 DSS 诱导的溃疡性结肠炎小鼠结肠炎症以及 TNF- α 诱导的结肠细胞炎症, 其作用机制与调控细胞铁死亡有关。

关键词: 柔肝健脾方; 溃疡性结肠炎; 氧化应激; 铁死亡

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2025)06-1986-06

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2025.06.033

溃疡性结肠炎 (UC) 是一种原因未明的累及结直肠黏膜及黏膜下层的慢性非特异性炎症性疾病^[1]。该病程长、易复发, 严重影响患者健康和生活方式, 甚可增加结肠炎相关癌症风险^[2]。铁死亡是一种铁依赖性的新型细胞程序性死亡方式^[3], 是肿瘤疾病中细胞死亡的重要机制, 同时其也可调控非肿瘤性疾病炎症的发生发展。在 UC 病程中, 过量的自由铁可通过多种机制加重肠上皮细胞内的氧化活性, 过氧化氢和亚铁离子通过芬顿反应直接产生大量的活性氧 (ROS), 过量的 ROS 产生会导致细胞蛋白质、脂质和核酸的改变, 从而导致上皮细胞炎症加重和组织损伤^[4-6]。因此靶向调控铁死亡或成为 UC 治疗的潜在策略。

目前临床上 UC 的治疗药物虽可达到缓解疾病的作用,

但远期复发率高, 药物副作用较大^[7]。柔肝健脾方是江苏虞山医派^[8-9]治疗 UC 的代表方。临床研究表明, 柔肝健脾方可有效缓解轻中度 UC 患者的临床症状^[10]。然而, 其对 UC 的具体干预机制尚不清楚。基于铁死亡与 UC 病程进展的相关性, 本研究旨在确定柔肝健脾方是否可通过抑制铁死亡缓解 UC, 为其在 UC 中的临床运用提供理论依据。

1 材料

1.1 动物 6 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠, 体质量 20~22 g, 购自北京斯贝福实验动物科技有限公司, 饲养于南京中医药大学动物中心 [实验动物使用许可证号 SYXK (苏) 2018-0048] 适应性饲养 1 周, 饲养条件为温度 (23 $\pm$ 2) $^{\circ}$ C, 相对湿度 (55 $\pm$ 5)%, 12 h/12 h 光暗循环, 自由接触经消

收稿日期: 2024-03-13

基金项目: 江苏省中医药科技发展计划项目 (MS2021007, MS2023099); 苏州市科技局医疗卫生科技创新项目 (SKJY2021131); 苏州市科技局“科教兴卫”青年科技项目 (KJXW2023069); 常熟市科技局医学应用基础研究项目 (CY202340); 常熟市卫生青年骨干人才“全国导师制”项目 (2023); 南京中医药大学自然科学基金 (XZR2023076)

作者简介: 黄 华 (1988—), 女, 博士, 副主任中医师, 从事肛周良性病及炎症性肠病的中西医结合治疗研究。E-mail: fsyy01041@njucm.edu.cn

* **通信作者:** 郭天威 (1984—), 男, 硕士, 副主任医师, 从事胃肠道疾病的病理学基础研究。E-mail: 512xiaowei@163.com

马俊杰 (1982—), 男, 博士, 副教授, 副主任中医师, 从事中医经典流派研究。E-mail: 290407@njucm.edu.cn

网络出版日期: 2024-05-31

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1368.R.20240531.1456.002.html>.

毒的标准啮齿动物食物和水。本动物实验经南京中医药大学实验动物中心伦理委员会批准（伦理号 202207A022）。

1.2 细胞 人正常结肠上皮细胞 NCM460（货号 TCH-C450）购自苏州海星生物科技有限公司。

1.3 试剂与药物 柔肝健脾方组成为白芍 20 g、白术 15 g、绵茵陈 12 g、黄连 6 g、麦芽 12 g、煨木香 12 g、木瓜 10 g、薄荷梗（后下）3 g、薏苡仁 10 g、地榆 15 g、白及 12 g、仙鹤草 12 g、败酱草 12 g、生甘草 6 g，均购自南京中医药大学常熟附属医院中药房，并经医院孙宇副主任药师鉴定为正品。右旋糖酐硫酸钠盐（DSS，货号 02160110-CF）购自美国 MP Biomedicals 公司；美沙拉秦缓释颗粒（艾迪莎，批号 H20143164）购自上海爱的发制药有限公司；小鼠白介素-1 β （IL-1 β ）、小鼠白介素-6（IL-6）、小鼠肿瘤坏死因子- α （TNF- α ）、人 IL-1 β 、人 IL-6 酶联免疫吸附实验（ELISA）试剂盒、总 RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒、铁检测试剂盒、丙二醛（MDA）、谷胱甘肽（GSH）检测试剂盒（货号 ml098416、ml098430、ml002095、ml058059、ml028583、ml095837、ml002038、ml095093、ml094963、ml095263）购自上海酶联生物科技有限公司；RIPA 裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、ECL 化学发光显影液（货号 P0013C、P0009、P0018M）购自上海碧云天生物技术股份有限公司；谷胱甘肽过氧化物酶 4（GPX4）、铁蛋白重链多肽（FTH1）、长链酰基辅酶合成酶-4（ACSL4）抗体、苏木素-伊红（HE）染色试剂盒、CCK-8 检测试剂盒、铁死亡促进剂 RSL3（货号 ab125066、ab183781、ab205199、ab245880、ab228554、ab285437）购自英国 Abcam 公司；DMEM 培养基（货号 11965126）购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司；SYBR Green qPCR Mix（货号 A25780）购自美国 ABI 公司。

1.4 仪器 RM2016 病理切片机购自德国徕卡公司；Eclipse Ci 光学显微镜购自日本尼康公司；Cytation 3 酶标仪购自美国 BioTek 公司；Mini-PROTEAN Tetra 型电泳槽、Mini Trans Blot Cell 型转印槽、164-5070 型恒压电泳仪电均购自美国 Bio-Rad 公司；Rotor-Gene Q 型 RT-qPCR 仪购自德国 QIAGEN 公司；Dounce 组织匀浆器购自美国 Kimbie 公司；Varioskan™ LUX 多功能微孔板读数仪购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司；细胞培养箱购自德国 Binder 公司。

2 方法

2.1 造模、分组及给药 参考文献 [11-12] 报道，采用慢性束缚应激+过度疲劳+饮食失节方法建立 C57BL/6J 小鼠肝郁脾虚证模型。实验前全部小鼠进行预游泳，剔除游泳时间少于 10 min 的小鼠，将合格的造模小鼠每天上午 8:00 放置于束缚盒中 3 h 限制活动，每天下午 2:00 放置于温度为（22 $\pm$ 1）℃ 水中游泳 10 min，隔天喂食，连续 3 周，观察 1 周。将上述小鼠随机分为空白组、模型组、柔肝健脾方组、美沙拉嗪组，每组 6 只。除空白组外，其余各组小鼠给予含 3% DSS 的饮用水，连续 7 d，诱导肝郁脾虚证小鼠建立急性结肠炎模型。柔肝健脾方组小鼠灌胃给

予柔肝健脾方 20 g/kg，美沙拉嗪组灌胃给予美沙拉嗪 200 mg/kg，每天 1 次，连续 7 d。空白组和模型组小鼠灌胃给予等体积生理盐水。给药结束后处死所有小鼠，收集血液，取结肠组织测量长度后用于后续实验。

2.2 疾病活动指数评估 每天监测小鼠的体质量，记录粪便稠度以及便血情况。根据 Cooper 经典评分方法计算小鼠的疾病活动指数（DAI）评分，具体评分标准见表 1。

表 1 DAI 评分标准

评分/分	体质量下降/%	粪便性状	粪便隐血/肉眼血便
0	<1	正常	正常
1	1~5	松软	隐血阳性
2	6~10	糊状	血便
3	>10	稀便	大量便血

2.3 HE 染色观察结肠组织形态 结肠组织经戊二醛固定后，全自动组织脱水浸蜡，石蜡包埋，切取 6 μ m 切片；常规脱蜡、水化、苏木素染色、返蓝、伊红染色、脱水封片；在光学显微镜下观察结肠组织病理变化并拍照保存，分析小鼠结肠组织炎性浸润情况。

2.4 ELISA 法检测血清 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平 取各组小鼠血液，在 4 ℃ 下 4 000 r/min 离心 10 min，吸出血清，于-80 ℃ 保存备用。按照相关试剂盒说明书操作，检测血清 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平。

2.5 CCK-8 法检测 NCM460 结肠细胞存活率 将 NCM460 结肠细胞加入含 10% 胎牛血清和青霉素-链霉素混合液的 DMEM 培养基中，在 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养，每 2 d 换液 1 次，待细胞密度达到 80%~85% 时，利用胰蛋白酶-EDTA 溶液消化，传代或进行后续实验。将 NCM460 结肠细胞按 2 $\times$ 10⁵/孔的密度接种于 6 孔板中，待细胞密度达 70%~80% 时加入 TNF- α （10 ng/mL）刺激 12 h，随后加入含柔肝健脾方小鼠血清（给药质量浓度分别 0、0.5、1、2、4、8、16 mg/mL）处理 24 h。铁死亡诱导剂组中加入 3 μ mol/L RSL3 培养 24 h，利用 CCK-8 法评估各组细胞存活率，将细胞（2 $\times$ 10³/孔）接种于 96 孔板中，并在 37 ℃ 下培养 2 h。每 24 h 检测 450 nm 波长处吸光度，持续 72 h。

2.6 结肠组织铁负荷、GSH、MDA 水平检测 取小鼠结肠组织，预冷 PBS 中清洗后放置于 Dounce 匀浆器上，加入一定体积测定缓冲液匀浆，匀浆液 12 000 r/min 离心 10 min，收集上清液，按照相关试剂盒说明书操作检测，利用多功能微孔板读数仪计算铁负荷。按照相关试剂盒说明书操作检测结肠组织 GSH、MDA 水平。取“2.5”项下 NCM460 结肠细胞，按上述操作检测细胞铁负荷、GSH、MDA 水平。

2.7 Western blot 法检测结肠组织 GPX4、FTH1、ACSL4 蛋白表达 利用 RIPA 裂解缓冲液制备结肠组织和细胞蛋白裂解物，通过 BCA 定量试剂盒测定总蛋白含量，取等质量蛋白进行变性，加入蛋白上样缓冲液后冻存备用。制备聚丙烯酰胺凝胶，上样，电泳，湿转法转移至 PVDF 膜，5% 脱脂奶粉溶液室温封闭 1 h，分别加入 GPX4、FTH1、

ACSL4、GAPDH 抗体（1：1 000），4 ℃ 孵育过夜，次日加入二抗（1：1 000）室温孵育 1 h，ECL 化学发光显影，使用 ZEISS 成像系统拍照保存，以 GAPDH 为内参，通过 Image J 软件计算蛋白相对表达量。

2.8 RT-qPCR 法检测结肠组织 *GPX4*、*ACSL4*、*FTH1* mRNA 表达 利用 TRIzol 试剂提取各细胞或组织总 RNA。

使用逆转录 PrimeScript 第一链 cDNA 合成试剂盒进行反转录得到 cDNA。使用 SYBR Green qPCR Mix 进荧光定量 PCR。PCR 体系为 20 μL，反应条件为 95 ℃ 30 s，95 ℃ 5 s，60 ℃ 30 s，共 40 个循环，引物序列见表 2。以 *GAPDH* 为内参，利用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算靶基因的相对表达量。

表 2 引物序列

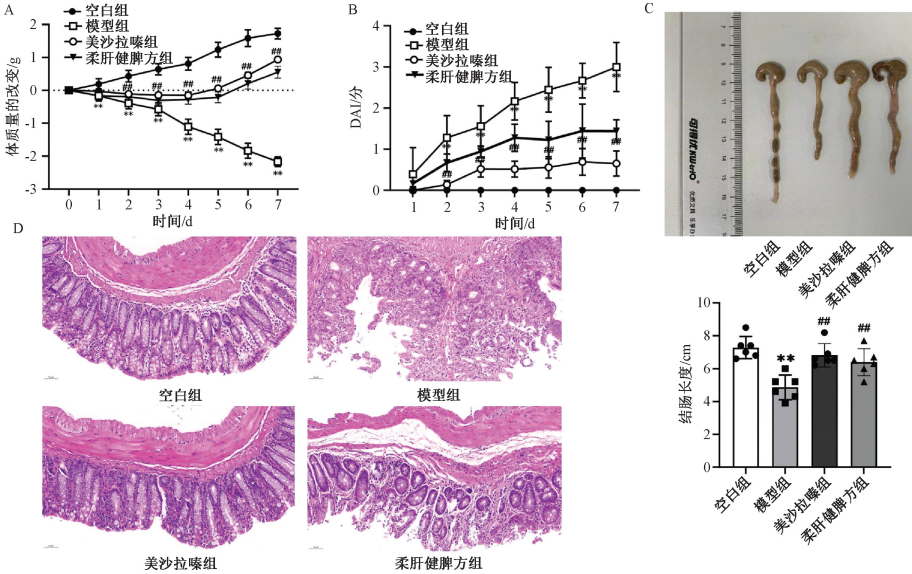
基因	种属	正向序列(5'→3')	反向序列(5'→3')
<i>GPX4</i>	小鼠	TATGCTGAGTGTGTTTACGAATC	ACATGTCAAACCTTGACGTTGTAGC
	人	AGGCAAGACCGAAGTAAATAAACTACAC	GCGAACTCTTTGATCTCTTCGTTA
<i>ACSL4</i>	小鼠	TTACCTATGGCTGTAGGATTGGAT	CAGTACAGTACAATCACCCCTTGCT
	人	TAGAAGCTGCACTGAAGAATTGTCT	AAGTTCTTCTACCCCTTTCTGTT
<i>FTH1</i>	小鼠	CCAAATACTTTCTCCACCAATCTC	CACGGTCTGGTTTCTTTATATCCT
	人	TCAAGAAACCAGACTGTGATGACT	AGTTTGTGCAGTTCCAGTAGTGAC
<i>GAPDH</i>	小鼠	TCGGAGTCAACGGATTTCGTT	TTCCCGTTCTCAGCCTTGAC
	人	AGATCCCTCCAAATCAAGTGG	GGCAGAGATGATGACCCTTTT

2.9 统计学分析 通过 GraphPad Prism 9.0 软件进行处理，计量资料以 ($\bar{x}\pm s$) 表示，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用 *t* 检验。*P*<0.05 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 柔肝健脾方对 DSS 诱导 UC 小鼠症状的影响 与空白组比较，模型组小鼠体质量降低（*P*<0.01），DAI 持续升高（*P*<0.01），具有典型的 UC 症状；与模型组比较，美沙

拉嗦组和柔肝健脾方组小鼠体质量升高（*P*<0.01），且 DAI 评分降低（*P*<0.01），见图 1A~1B。与空白组比较，模型组小鼠结肠长度缩短（*P*<0.01），黏膜层正常结构消失，表面有不同程度的缺损，杯状细胞数量减少，伴有炎性细胞浸润及纤维组织增生；与模型组比较，美沙拉嗦组与柔肝健脾方组小鼠结肠长度增加（*P*<0.01），肠黏膜损伤缺损改善，结肠腺体及隐窝结构基本完整，炎性细胞浸润减少，纤维组织增生减少，见图 1C~1D。



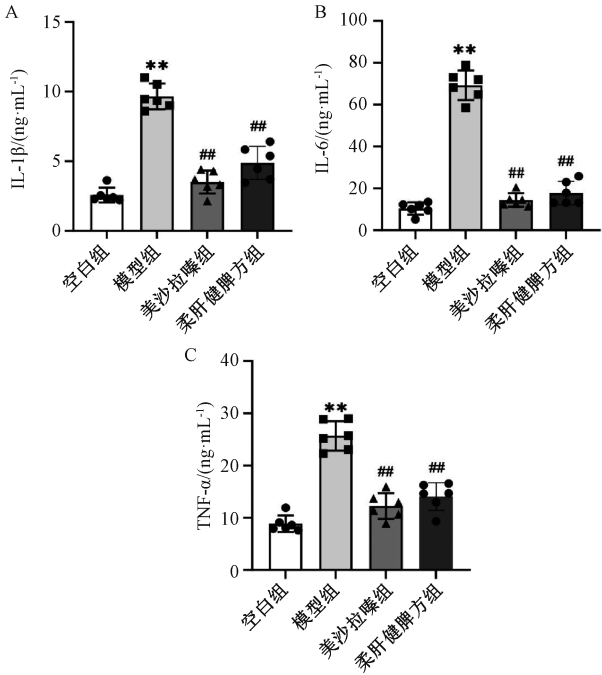
注：与空白组比较，** *P*<0.01；与模型组比较，### *P*<0.01。

图 1 各组小鼠 UC 症状表型特征比较（HE，×20， $\bar{x}\pm s$ ，*n*=6）

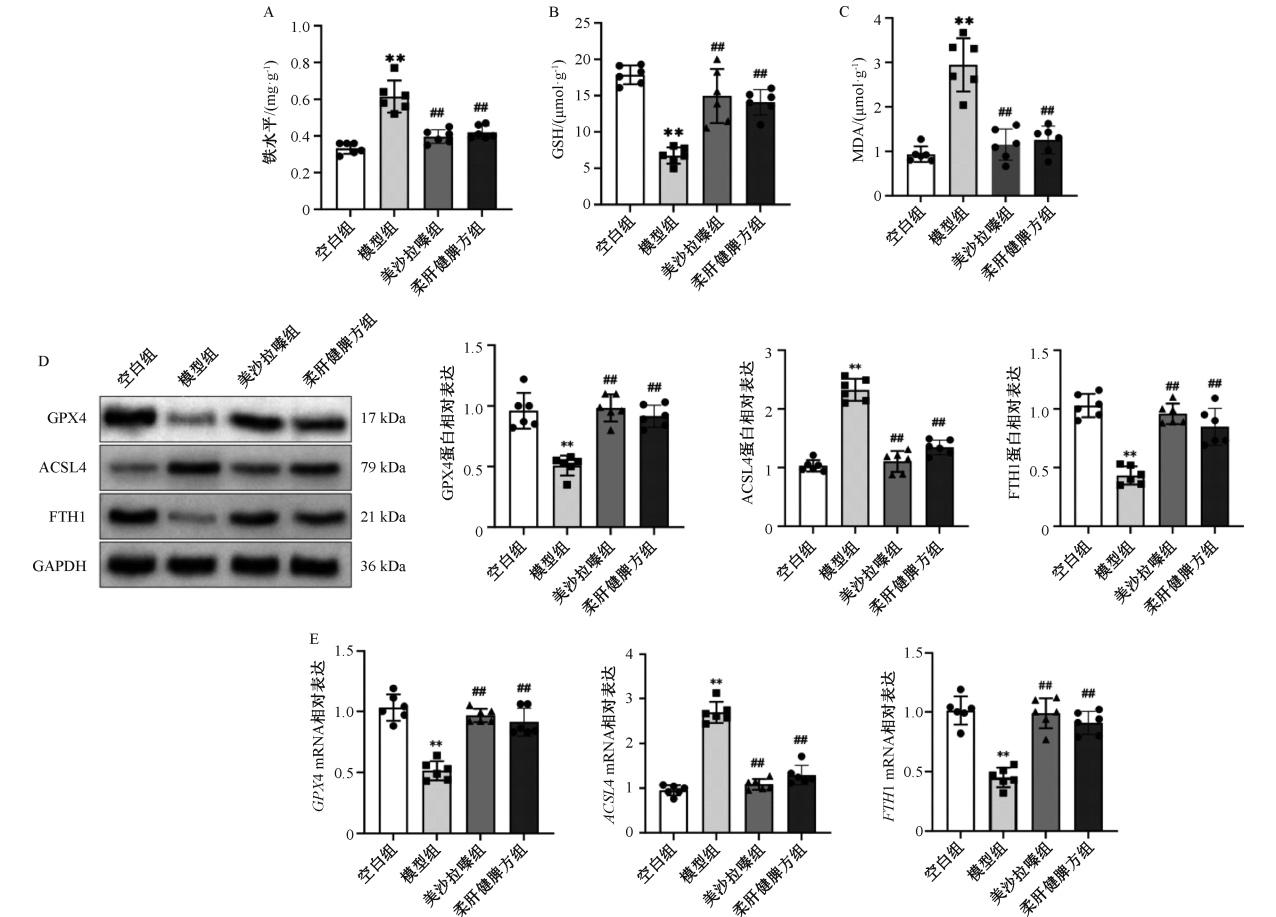
3.2 柔肝健脾方对 UC 小鼠血清 IL-1β、IL-6、TNF-α 水平的影响 与空白组比较，模型组小鼠血清 IL-1β、IL-6、TNF-α 水平升高（*P*<0.01）；与模型组比较，美沙拉嗦组和柔肝健脾方组小鼠血清 IL-1β、IL-6、TNF-α 水平降低（*P*<0.01），见图 2。

3.3 柔肝健脾方对 DSS 诱导 UC 小鼠结肠组织铁、MDA、GSH 水平及 *GPX4*、*FTH1*、*ACSL4* mRNA 和蛋白表达的影

响 与空白组比较，模型组小鼠结肠组织铁水平升高（*P*<0.01），GSH、MDA 水平降低（*P*<0.01）；与模型组比较，柔肝健脾方组和美沙拉嗦组小鼠结肠组织铁水平升高（*P*<0.01），GSH、MDA 水平降低（*P*<0.01），见图 3A~3C。与空白组比较，模型组小鼠结肠组织 *GPX4*、*FTH1* mRNA 和蛋白表达降低（*P*<0.01），*ACSL4* mRNA 和蛋白表达升高（*P*<0.01）；与模型组比较，柔肝健脾方组和美沙拉嗦



注：与空白组比较，** $P<0.01$ ；与模型组比较，## $P<0.01$ 。
图 2 各组小鼠血清 IL-1β、IL-6、TNF-α 水平比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)



注：与空白组比较，** $P<0.01$ ；与模型组比较，## $P<0.01$ 。

图 3 各组小鼠结肠组织铁、MDA、GSH 水平及 GPX4、FTH1、ACSL4 mRNA 和蛋白表达比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组小鼠结肠组织 GPX4、FTH1 mRNA 和蛋白表达升高 ($P<0.01$), ACSL4 mRNA 和蛋白表达降低 ($P<0.01$), 见图 3D~3E。

3.4 柔肝健脾方对 TNF-α 诱导的 NCM460 细胞 IL-1β、IL-6 水平的影响 与 0 mg/mL 柔肝健脾方组比较, 16 mg/mL 柔肝健脾方组 NCM460 细胞存活率降低 ($P<0.01$), 见图 4A。与 0 ng/mL TNF-α 组比较, 10 ng/mL TNF-α 组 NCM460 细胞存活率降低 ($P<0.01$); 与 10 ng/mL TNF-α 组比较, 10 ng/mL TNF-α+4、8 mg/mL 柔肝健脾方组 NCM460 细胞存活率升高 ($P<0.01$), 见图 4B。因此, 后续研究选择 8 mg/mL 柔肝健脾方。与 0 ng/mL TNF-α 组比较, 10 ng/mL TNF-α 组 NCM460 细胞 IL-1β、IL-6 水平升高 ($P<0.01$); 与 10 ng/mL TNF-α 组比较, 10 ng/mL TNF-α+8 mg/mL 柔肝健脾方组 NCM460 细胞 IL-1β、IL-6 水平降低 ($P<0.01$), 见图 4C~4D, 提示柔肝健脾方可减轻 TNF-α 诱导的体外炎症。

3.5 柔肝健脾方对 TNF-α 诱导的 NCM460 细胞铁、MDA、GSH 水平及 ACSL4、GPX4、FTH mRNA 和蛋白表达的影响 与 0 ng/mL TNF-α 组比较, 10 ng/mL TNF-α 组 NCM460 细胞铁水平、MDA 水平、ACSL4 mRNA 和蛋白表达升高 ($P<0.01$), GSH 水平、GPX4、FTH1 mRNA 和蛋白表达降低 ($P<0.01$); 与 10 ng/mL TNF-α 组比较, TNF-

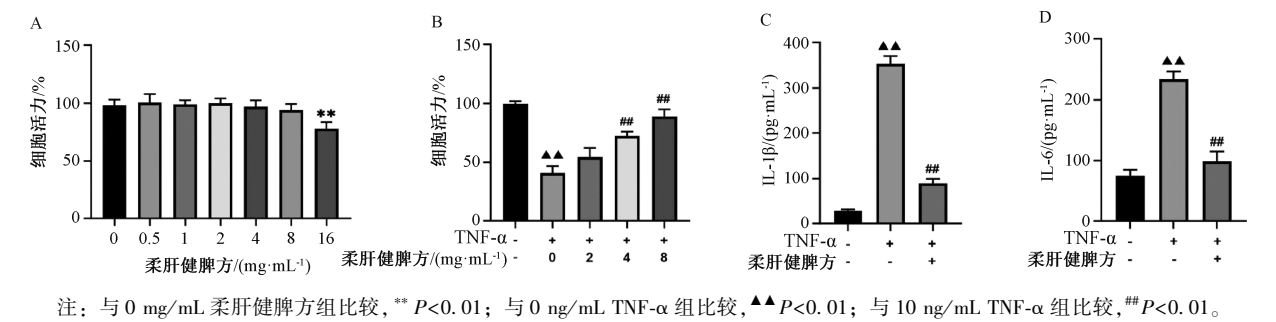


图 4 各组细胞存活率及 IL-1β、IL-6 水平比较 ($\bar{x}\pm s$, *n*=6)

脾方组 NCM460 细胞铁、MDA 水平、ACLS4 mRNA 和蛋白表达降低 (*P*<0.01)，GSH 水平、GPX4、FTH mRNA 和蛋白表达升高 (*P*<0.01)；与 TNF-α+柔肝健脾方组比较，

TNF-α+柔肝健脾方+RSL3 组 NCM460 细胞铁、MDA 水平、ACLS4 mRNA 和蛋白表达升高 (*P*<0.01)，GSH 水平、GPX4、FTH mRNA 和蛋白表达降低 (*P*<0.01)，见图 5。

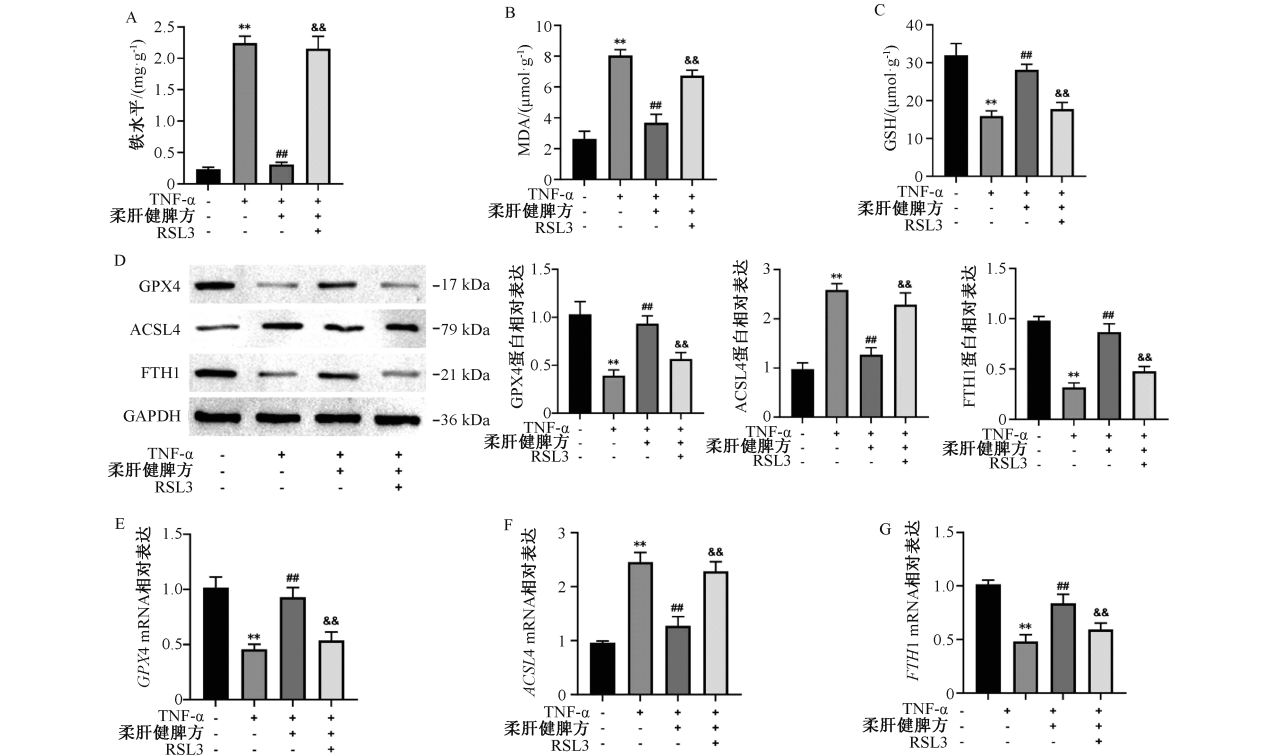


图 5 各组细胞铁、MDA、GSH 水平与 ACLS4、GPX4、FTH mRNA 和蛋白表达比较 ($\bar{x}\pm s$, *n*=6)

3.6 柔肝健脾方通过调控铁死亡对 TNF-α 诱导的细胞炎症反应的影响 与 0 ng/mL TNF-α 组比较，10 ng/mL TNF-α 组 NCM460 细胞上清 IL-1β、IL-6 水平升高 (*P*<0.01)；与 10 ng/mL TNF-α 组比较，TNF-α+柔肝健脾方组 NCM460 细胞上清 IL-1β、IL-6 水平降低 (*P*<0.01)；与 TNF-α+柔肝健脾方组比较，TNF-α+柔肝健脾方+RSL3 组 NCM460 细胞上清 IL-1β、IL-6 水平升高 (*P*<0.01)，见图 6。

4 讨论

中医学将 UC 归属于“大瘕泄”“痢疾”“肠癖”等范畴，本病多由禀赋不足、饮食失节、感受外邪等引起，病位在大肠，与肝脾关系密切。UC 患者病程反复以肝郁脾虚证型最为多见^[13-14]，治法当遵循标本兼治，拟柔肝健脾以治本，清浊排脓以治标。柔肝健脾方为虞山医派治疗 UC 代

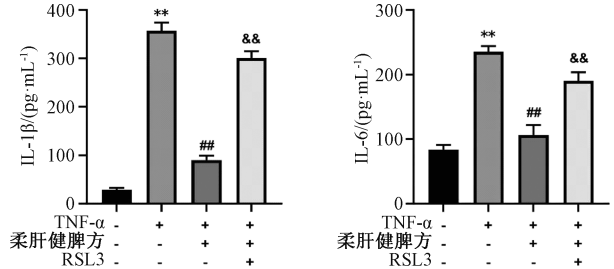


图 6 各组细胞上清 IL-1β、IL-6 水平比较 ($\bar{x}\pm s$, *n*=6)

表方，方中白芍养肝血敛肝阴、柔肝气和中枢，茵陈调肝不劫肝阴，生麦芽、薄荷梗疏肝防破肝气。在顾护脾胃方

面，运用白术健益脾气，尚加入白芍、甘草、生木瓜等，酸甘化阴、敛木扶土，取芍药甘草汤肝脾阴共调之意。针对 UC 多伴腹痛、便溏、黏液脓血便诸症，加用木香、川连配伍取香连丸清热化湿，行气止泻之意。薏苡仁、败酱草健脾止泻、解毒排脓。地榆、白及、仙鹤草凉血止血、解毒敛疮，仙鹤草收敛止血兼可补虚。全方标本兼顾，病证结合，共奏柔肝健脾止泻、清热化湿敛疮之功。

本研究结果显示，柔肝健脾方降低了 UC 小鼠 DAI 评分和炎症水平。进一步研究发现柔肝健脾方可降低 UC 小鼠结肠中铁水平并调控铁死亡关键蛋白 ACSL4、GPX4、FTH1 表达，作用效果与阳性药美沙拉嗪相似。ACSL4 是调控铁死亡的关键基因之一，可催化细胞内游离的多不饱和脂肪酸生成最终经过芬顿反应生成 ROS 诱导细胞发生铁死亡^[15-16]。抑制 ACSL4 的表达已被证明可以抑制铁死亡的发生^[17]。FTH1 可通过抑制细胞内铁蛋白的降解来干预二价亚铁离子的形成从而抑制铁死亡的发生^[18]。而 GPX4 具有清除 ROS 的功能，通过清除细胞内过度积累的 ROS 可抑制铁死亡的发生^[19-20]。体外实验发现，铁死亡促进剂 RSL3 抑制了柔肝健脾方对 NCM460 细胞中 ACSL4、GPX4、FTH1 表达以及炎症水平的调节作用。以上结果证明柔肝健脾方可通过影响铁死亡来改善肠道炎症和 UC 病症。

综上所述，本研究阐明了柔肝健脾方可通过调节铁死亡水平参与 UC 疾病进展，为其在 UC 的临床运用提供了理论支持，后续将对该方调节铁死亡水平的分子作用机制展开进一步研究，为其临床转化提供更多基础数据。

参考文献：

[1] Du L, Ha C. Epidemiology and pathogenesis of ulcerative colitis[J]. *Gastroenterol Clin North Am*, 2020, 49 (4) : 643-654.

[2] Plevris N, Lees C W. Disease monitoring in inflammatory bowel disease: evolving principles and possibilities[J]. *Gastroenterology*, 2022, 162(5) : 1456-1475.

[3] Lei G, Zhuang L, Gan B Y. Targeting ferroptosis as a vulnerability in cancers[J]. *Nat Rev Cancer*, 2022, 22(7) : 381-396.

[4] Deng L Y, He S S, Li Y, *et al.* Identification of lipocalin 2 as a potential ferroptosis-related gene in ulcerative colitis[J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2023, 29(9) : 1446-1457.

[5] Chen Y J, Yan W Y, Chen Y Q, *et al.* SLC6A14 facilitates epithelial cell ferroptosis *via* the C/EBP β -PAK6 axis in ulcerative colitis[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2022, 79(11) : 563.

[6] Luo L X, Zhang S Z, Guo N Q, *et al.* ACSF2-mediated

ferroptosis is involved in ulcerative colitis[J]. *Life Sci*, 2023, 313 : 121272.

[7] 中国中西医结合学会. 溃疡性结肠炎中西医结合诊疗专家共识[J]. 中国中西医结合杂志, 2023, 43(1) : 5-11.

[8] 马俊杰. 虞山医派先贤理论古法今用举隅[J]. 中华中医药杂志, 2023, 38(1) : 411-414.

[9] 马俊杰, 张以来, 陶 镠, 陶君仁临证思想探析[J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(6) : 1904-1906.

[10] 黄 华, 马俊杰, 华秋雯, 等. 柔肝健脾法联合美沙拉嗪灌肠液治疗远端型溃疡性结肠炎肝郁脾虚证的临床研究[J]. 国际中医中药杂志, 2024, 46(4) : 444-450.

[11] 张旭飞, 罗运凤, 高 洁, 等. 痛泻要方对肝郁脾虚证溃疡性结肠炎大鼠脂质代谢及自噬的影响[J]. 中成药, 2022, 44(3) : 739-746.

[12] 裴文婧, 谢春娥, 李军祥, 等. 痛泻安肠方对腹泻型肠易激综合征小鼠内脏高敏及肠道菌群的影响[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2023, 31(1) : 37-44.

[13] 冀二锋, 刘佃温. 疏肝健脾活血方治疗慢性溃疡性结肠炎的疗效及对中医证候积分、Mayo 评分的影响[J]. 辽宁中医杂志, 2023, 50(4) : 83-86.

[14] 张旭飞, 蒋志滨, 高 洁, 等. 基于 5-HT 信号系统探讨痛泻要方治疗肝郁脾虚型溃疡性结肠炎的作用机制[J]. 中医学报, 2021, 36(10) : 2116-2121.

[15] Doll S, Proneth B, Tyurina Y Y, *et al.* ACSL4 dictates ferroptosis sensitivity by shaping cellular lipid composition[J]. *Nat Chem Biol*, 2017, 13(1) : 91-98.

[16] Cui J T, Wang Y K, Tian X T, *et al.* LPCAT3 is transcriptionally regulated by YAP/ZEB/EP300 and collaborates with ACSL4 and YAP to determine ferroptosis sensitivity[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2023, 39(7-9) : 491-511.

[17] Liao P, Wang W M, Wang W C, *et al.* CD8⁺T cells and fatty acids orchestrate tumor ferroptosis and immunity *via* ACSL4[J]. *Cancer Cell*, 2022, 40(4) : 365-378.

[18] Fang Y Y, Chen X C, Tan Q Y, *et al.* Inhibiting ferroptosis through disrupting the NCOA4-FTH1 interaction: a new mechanism of action[J]. *ACS Central Science*, 2021, 7(6) : 980-989.

[19] Liang D G, Feng Y, Zandkarimi F, *et al.* Ferroptosis surveillance independent of GPX4 and differentially regulated by sex hormones[J]. *Cell*, 2023, 186(13) : 2748-2764.

[20] Bi Y G, Liu S L, Qin X, *et al.* FUNDC1 interacts with GPx4 to govern hepatic ferroptosis and fibrotic injury through a mitophagy-dependent manner[J]. *J Adv Res*, 2024, 55 : 45-60.