

## 冬虫夏草介导 SLC7A11/GPX4/ACSL4 轴抑制铁死亡抵抗放射性直肠炎研究

窦 婷<sup>1,2#</sup>, 杨静雯<sup>2#</sup>, 杨 昊<sup>2\*</sup>, 孙利平<sup>2</sup>, 耿宏伟<sup>1</sup>, 贺介甫<sup>1</sup>

1. 内蒙古医科大学, 内蒙古 呼和浩特 010110

2. 北京大学肿瘤医院内蒙古医院(内蒙古医科大学附属肿瘤医院)放疗中心, 内蒙古医科大学放射物理与放射生物重点实验室, 内蒙古 呼和浩特 010020

**摘要:** 目的 探讨冬虫夏草治疗急性放射性直肠炎的疗效及可能的作用机制。方法 将 25 只小鼠随机分为 5 组: 对照组、模型组和冬虫夏草低、中、高剂量( $0.25, 0.50, 1.00 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )组, 每组 5 只, 除对照组外的 4 组小鼠予直线加速器 6-MV 的 X 射线行下腹部照射, 总剂量 12 Gy, 建立急性放射性直肠炎模型。照射后次日开始 ig 给药, 观察并记录各组小鼠状态、体质量变化情况; HE 染色观察各组小鼠肠道组织病理学改变; ELISA 法检测各组小鼠血清丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、 $\text{Fe}^{2+}$  以及炎症因子白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )水平; Western blotting 检测各组小鼠直肠组织中铁死亡相关蛋白: 长链酯酰辅酶 A 合成酶(ACSL4)、溶质载体家族 7 成员 11(SLC7A11)、谷胱甘肽过氧化物酶 4(GPX4)表达水平; 透射电镜观察各组小鼠直肠细胞中线粒体数量及形态结构的变化情况。结果 与对照组相比, 模型组小鼠精神萎靡, 体质量下降, 部分小鼠有肛门出血的症状; 与模型组比较, 冬虫夏草组小鼠症状普遍缓解。HE 染色结果显示模型组肠道上皮细胞坏死脱落, 黏膜层出现不同程度地出血水肿; 用药后, 肠道黏膜有所恢复, 病变程度明显好转。ELISA 结果显示, 与对照组相比, 模型组炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 、MDA、 $\text{Fe}^{2+}$  水平显著升高( $P < 0.001$ ), SOD 水平显著下降( $P < 0.001$ ); 治疗后, 与模型组相比, 冬虫夏草中、高剂量组 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 、MDA、 $\text{Fe}^{2+}$  含量显著下降, SOD 含量显著增高( $P < 0.001$ )。Western blotting 实验结果显示, 与对照组比较, 模型组 ACSL4 蛋白表达水平显著升高( $P < 0.05$ ), SLC7A11 及 GPX4 蛋白表达水平显著降低( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 冬虫夏草中、高剂量组 ACSL4 蛋白的表达水平显著降低( $P < 0.05$ ), 同时 SLC7A11、GPX4 蛋白表达水平显著升高。透射电镜结果发现, 模型组线粒体数量下降, 体积变小, 膜密度增加, 峰减少; 冬虫夏草治疗后各组线粒体结构损伤程度较模型组有所缓解。结论 冬虫夏草能缓解放射性直肠炎, 作用机制可能与调控 SLC7A11、GPX4、ACSL4 蛋白的表达, 同时抑制炎症因子, 增加机体的抗铁死亡能力相关。

**关键词:** 冬虫夏草; 急性放射性直肠炎; 铁死亡; 谷胱甘肽过氧化物酶 4(GPX4); 线粒体

**中图分类号:** R285.5      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1674-6376(2023)09-1882-07

**DOI:** 10.7501/j.issn.1674-6376.2023.09.007

## Study of *Cordyceps sinensis*-mediated SLC7A11/GPX4/ACSL4 inhibition of ferroptosis against radiotherapy-induced proctitis

DOU Ting<sup>1,2</sup>, YANG Jingwen<sup>2</sup>, YANG Hao<sup>2</sup>, SUN Liping<sup>2</sup>, GENG Hongwei<sup>1</sup>, HE Jiefu<sup>1</sup>

1. Inner Mongolia Medical University, Huhhot 010110, China

2. Department of Radiation Oncology, Peking University Cancer Hospital (Inner Mongolia Campus) & Affiliated Cancer Hospital of Inner Mongolia Medical University, Key Laboratory of Radiation Physics and Biology of Inner Mongolia Medical University, Inner Mongolia Autonomous Region, Huhhot 010020, China

**Abstract:** Objective To investigate the efficacy and possible mechanism of *Cordyceps sinensis* in the treatment of radiation proctitis.

**Method** Twenty-five mice were randomly divided into five groups: control group and model group with low, middle and high dose of *Cordyceps sinensis* ( $0.25, 0.50$ , and  $1.00 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), with five mice in each group. Four groups of mice except the control group were

收稿日期: 2023-05-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81860534); 内蒙古自治区科技计划项目(2019GG039/086, 2021GG0167); 内蒙古自然科学基金资助项目(2021MS08152/8154); 内蒙古自治区高等学校青年科技英才支持计划项目(NJYT22004); 内蒙古自治区卫生健康科技计划项目(202201356); 内蒙古医科大学青年创新基金项目(YKD2020QNCX057)

#共同第一作者: 窦 婷(1996—), 女, 硕士研究生, 研究方向为肿瘤放射治疗。E-mail: douting156@163.com

杨静雯(1992—), 女, 硕士, 主治医师, 研究方向为肿瘤放射治疗。E-mail: 1650587368@qq.com

\*通信作者: 杨 昊(1977—), 男, 硕士生导师, 主任医师、副教授, 研究方向为肿瘤放射治疗。E-mail: haoyang050201@163.com

irradiated by linear accelerator 6-MV X-ray on the lower abdomen with a total dose of 12 Gy to establish the model of acute radiation proctitis. The changes of morphology and body weight of mice in each group were observed and recorded. The intestinal histopathological changes of mice in each group were observed by HE staining. The contents of serum malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), Fe<sup>2+</sup> and inflammatory factors such as interleukin-6 (IL-6), interleukin-1β (IL-1β) and tumor necrosis factor-α (TNF-α) were detected by ELISA. Western blotting was used to detect the expression of iron death-related proteins: long-chain ester acyl-CoA synthetase (ACSL4), solute carrier family 7 member 11 (SLC7A11) and glutathione peroxidase 4 (GPX4), and the changes of mitochondrial number and morphology were observed by transmission electron microscope. **Results** Compared with control group, the mice in the model group were dispirited, their body weight decreased, and some mice had symptoms of anal bleeding, compared with model group, the symptoms in the treatment group were generally relieved, and the results of HE staining showed that the intestinal epithelial cells were necrotic and exfoliated, and the mucosal layer showed bleeding and edema in varying degrees. After treatment, the intestinal mucosa recovered and the degree of lesion improved significantly. The results of ELISA detection showed that compared with control group, the contents of MDA, Fe<sup>2+</sup> and inflammatory factors in the model group increased significantly ( $P < 0.001$ ), while the content of SOD decreased significantly ( $P < 0.001$ ). Compared with model group, the contents of MDA, Fe<sup>2+</sup> and inflammatory factors in the middle and high treatment groups of *Cordyceps sinensis* decreased significantly ( $P < 0.05, 0.01$ ), and the content of SOD increased significantly ( $P < 0.05, 0.01$ ). The results of Western blotting experiment showed that compared with model group, the expression level of ACSL4 protein in the middle and high treatment groups of *Cordyceps sinensis* decreased significantly, while the expression levels of SLC7A11 and GPX4 protein in the *Cordyceps sinensis* group were significantly higher than those in the model group. The results of transmission electron microscope showed that in the model group, the number of mitochondria decreased, the volume became smaller, the membrane density increased and the crest decreased. After treatment, the structural damage of mitochondria in each group was alleviated compared with that in the model group. **Conclusion** *Cordyceps sinensis* can alleviate the intestinal injury and inflammation caused by radiotherapy, which may be through regulating the expression of SLC7A11, GPX4, ACSL4 proteins, inhibiting inflammatory factors, increasing the anti-ferroptosis ability of the body, and protecting the intestinal tract.

**Key words:** *Cordyceps sinensis*; acute radiation proctitis; ferroptosis; glutathione peroxidase 4 (GPX4); mitochondrion

放射治疗在肿瘤治疗中占有重要的地位,放射治疗过程中不可避免地会对周围组织造成损伤<sup>[1]</sup>。肠道作为体内对放射线最敏感的器官之一,据估计,60%~80%的盆腔或腹部肿瘤患者在接受放疗后会出现不同程度的肠道损伤<sup>[2-4]</sup>,且因直肠的位置固定,对放疗的耐受性差,放疗易对其造成损伤。通常发生在放疗开始后1~2周内,多以恶心、呕吐、腹泻、排出黏液或血样便等症状为主,甚至可出现里急后重,如果患者不能耐受,则需要适当减少剂量甚至中断治疗,这将严重影响放疗的效果以及患者对放疗的依从性<sup>[5]</sup>。目前除了对症治疗外缺乏有效的治疗或预防手段,因此亟需明确急性放射性直肠炎的机制,以便临床医生寻找更合适的治疗方案,改善放射性直肠炎患者的临床症状。

铁死亡是一类具有独特的发生机制且能够被特异性识别的细胞死亡类型,参与多种疾病的发生发展。有研究表明,铁死亡参与炎症性肠病的发生,抑制铁死亡能减轻肠道的损伤<sup>[6]</sup>;Deng等<sup>[7]</sup>研究发现,在肠缺血再灌注损伤的小鼠模型中,谷胱甘肽过氧化物酶4(GPX4)含量下降,丙二醛(MDA)、Fe<sup>2+</sup>含量升高,证明铁死亡可能是诱导肠上皮细胞死亡的重要机制之一。结果显示,诱导铁死亡发生

的重要途径之一是氧化应激,放疗会产生大量的活性氧(ROS)和氧自由基,破坏体内的氧化-抗氧化平衡<sup>[8]</sup>,导致肠道细胞氧化损伤,发生炎症性改变。同时,细胞膜中的多不饱和脂肪酸磷脂易发生过氧化反应生成大量脂质过氧化产物如MDA<sup>[9]</sup>,破坏细胞膜的完整性,诱发铁死亡。因此推测铁死亡可能是放射性直肠炎的发病机制之一,抑制铁死亡可能成为放射性直肠炎的一个新的治疗靶点。

冬虫夏草 *Cordyceps sinensis* (BerK.) Sacc. 是我国珍贵的中药材,被誉为中药之王,与人参、鹿茸合称为“中华三大补品”,是一种十分珍贵的食品和药品。随着对冬虫夏草的深入研究,越来越多的成分被发现,如虫草多糖、虫草酸、麦角甾醇、核苷等化合物<sup>[10]</sup>,虫草多糖是其发挥药理学功效的主要成分,具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤、调节免疫系统作用,可治诸虚百损,对多系统多器官有滋补作用<sup>[11-13]</sup>。有研究证实,虫草多糖主要是通过降低细胞内谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)和超氧化物歧化酶(SOD)的活性,减少活性氧的产生,进而防止组织发生氧化损伤<sup>[14]</sup>,同时还可抑制多不饱和脂肪酸的过度氧化。但是关于冬虫夏草能否通过抑制谷胱甘肽(GSH)活性,阻断铁死亡发生,发挥抵抗射

线对肠道损伤的相关研究甚少。本研究基于体内实验探索冬虫夏草抑制铁死亡的发生从而治疗放射性直肠炎的具体机制,为临床针对性地预防或治疗放射性直肠炎提供新的思路。

## 1 材料

### 1.1 实验动物

25 只 6~8 周龄、体质量为(18±20)g 的雄性 SPF 级健康 C57 小鼠,购自斯贝福(北京)生物技术有限公司,实验动物生产许可证号为 SCXK(湘)2017-0006。小鼠标准环境饲养,自由饮水、进食。本实验经易生源基因科技(天津)有限公司动物伦理委员会批准(批号 YSY-2022181)。

### 1.2 实验药物与主要试剂

冬虫夏草药材购于北京同仁堂健康药业股份有限公司,产地为西藏,批号 2022509012,按《中国药典》2020 年版、《中药材及中药饮片药品检验补充检验方法和检验项目批准件》检验合格;经北京同仁堂健康药业股份有限公司质检部孙杨研究员鉴定为麦角菌科真菌冬虫夏草菌 *C. sinensis* (BerK.) Sacc. 寄生在蝙蝠蛾科昆虫幼虫上的子座和幼虫尸体的干燥复合体,含腺苷( $C_{10}H_{13}N_5O_4$ )0.024%。

取药材适量,净制后,采用粉碎机粉碎,将粉末过三号筛后,即得药材粉末,将药材粉末溶于磷酸缓冲盐溶液中,配制成高剂量的药物溶液,然后逐级稀释成中、低剂量的药物。

GPX4 抗体(批号 ab125066)、溶质载体家族 7 成员 11(SLC7A11)抗体(批号 ab307601)、乙酰辅酶 A 合成酶长链家族 4(ACSL4)抗体(批号 ab155282)、辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔二抗(批号 ab5038),购自 Abcam 公司。肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、IL-6、MDA、SOD ELISA 试剂盒购自江苏酶免实业有限公司;Fe $^{2+}$  试剂盒(批号 E-BC-K028-M)购自 Elabscience 公司。

### 1.3 主要仪器

HT7700 透射电子显微镜购自日本日立公司;AZH150 目方华膜铜网购自中国中镜科仪有限公司;高速冷冻离心机购自美国 Beckman Coulter 公司;全波长酶标仪购自美国 MD 公司;电泳检测系统购自美国 BioRad 公司;Leica EM UC7 超薄切片机购自德国徕卡公司。

## 2 方法

### 2.1 模型制备

25 只小鼠禁食 12 h 后,随机选取 5 只设为对照组,3% 戊巴比妥 1.5 mL·kg $^{-1}$  全麻后固定于有机玻璃

板上,除对照组外,其余 20 只小鼠予 6MV-X 线直线加速器进行照射,照射范围自耻骨联合至肛门,照射野面积 1 cm×1.3 cm,照射野区外以 2 cm 厚铅板屏蔽,放射源距皮肤 100 cm,照射剂量 12 Gy,造模方法参考文献报道<sup>[15-16]</sup>确定。照射完毕后,将苏醒后的小鼠,送回实验中心继续观察及饲养,对照组小鼠在造模期间置于相似的环境中,但不予以照射。

### 2.2 小鼠分组及给药

25 只雄性健康小鼠,自由饮水进食,饲养于 18~22 °C、明暗各 12 h 的清洁级动物实验室内,喂养 1 周后造模。随机分为对照组:未照射 + ig 0.9% 氯化钠溶液;模型组:12 Gy 照射 + ig 0.9% 氯化钠溶液;冬虫夏草高、中、低剂量组:12 Gy 照射 + 冬虫夏草 1.00、0.50、0.25 g·kg $^{-1}$ 。每天 ig 给药 1 次,连续 15 d。

### 2.3 小鼠状态观察与取材

造模结束后开始隔日称取动物体质量,观察动物的精神状态、排便情况、有无肛周脱毛、肛门出血和死亡等情况。

ig 结束后,小鼠眼内眦采血至 EP 管中,3 000×g 离心 5 min 取上清后 -80 °C 冰箱冻存。小鼠断颈处死,解剖留取肛门以上约 1 cm 直肠组织,沿肠系膜纵轴剪开,分成 3 部分后,分装到不同的 EP 管中,分别予以 -80 °C 冰箱冻存、组织固定液固定和 2.5% 戊二醛处理。

### 2.4 HE 染色

肠道组织石蜡切片(厚度 4 μm)后 HE 染色,脱水封片,应用正置显微镜观察各组肠道组织的病理学变化。

### 2.5 ELISA 法检测各组血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 、MDA、SOD、Fe $^{2+}$ 水平

血清样本常温静置 30 min,按照试剂盒说明书测定血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 、MDA、SOD、Fe $^{2+}$  的水平。

### 2.6 Western blotting 实验

直肠组织经过 RIPA 裂解液裂解后,取上清;提取蛋白后按照蛋白浓度检测试剂盒的说明操作。对已获得的各组蛋白质按照常规操作方法进行电泳、转膜,分别加入特异性一抗(GPX4、SLC7A11、ACSL4),在 4 °C 反应 24 h,再加入二抗(辣根过氧化物酶标记山羊抗兔)孵育 1 h 后,用 ECL 显色。利用图像分析系统扫描,用 β-actin 作为内参。

### 2.7 透射电镜

直肠组织样品置于 2.5% 戊二醛中固定 2~4 h,

磷酸漂洗液漂洗3次,1%锇酸4℃固定2 h;ddH<sub>2</sub>O漂洗3次后乙醇梯度脱水,环氧丙烷过渡,812树脂梯度渗透后包埋,60℃聚合;包埋块用Leica UC7型超薄切片机进行半薄定位及超薄切片,醋酸双氧铀和柠檬酸铅双染色切片,用透射电镜观察组织超微结构。

## 2.8 统计学分析

采用SPSS 20.0软件进行分析,定量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组均数比较采用方差齐性检验和单因素方差分析。

## 3 结果

### 3.1 一般情况观察

在实验期间,对照组小鼠摄食、饮水、精神状态及排便情况无明显异常;从造模后3天开始,模型组小鼠出现脱毛、精神萎靡、摄食饮水减少、腹泻、便血、体质量显著减轻症状( $P<0.001$ );与模型组相比,冬虫夏草组小鼠状态有所好转,各组动物精神状态良好,饮食尚可,中、高剂量组体质量均显著增加( $P<0.05$ ),见表1;腹泻便血症状改善,且药物浓度越高治疗效果越好。

### 3.2 HE染色观察肠道组织病理学改变

HE染色结果显示(图1),对照组绒毛密集,无脱落情况,隐窝结构正常,组织无出血及溃疡,形态规则,无炎性细胞浸润;模型组小鼠肠道组织可见肠上皮结构不完整,细胞变性脱落,隐窝形成微脓肿,肠黏膜变薄、绒毛缩短,毛细血管扩张,肠壁黏膜充血水肿、局部或弥漫性溃疡;与模型组比较,冬虫夏草治疗后,肠道部分上皮细胞再生,绒毛和黏

膜的凝固性坏死减少,黏膜结构较为完整,炎性细胞浸润减少,病变程度显著减轻,且缓解程度呈剂量相关性,说明冬虫夏草可改善急性放射性直肠炎小鼠肠道黏膜组织病理损伤。

### 3.3 各组小鼠血清TNF-α、IL-6、IL-1β、MDA、SOD、Fe<sup>2+</sup>水平比较

结果显示,与对照组相比,模型组炎症因子TNF-α、IL-6、IL-1β、MDA、Fe<sup>2+</sup>水平显著升高( $P<0.001$ ),SOD活性显著下降( $P<0.001$ );治疗后,与模型组相比,冬虫夏草中、高剂量组TNF-α、IL-6、IL-1β、MDA、Fe<sup>2+</sup>水平显著下降,SOD活性显著增高( $P<0.001$ ),且作用呈剂量相关性。结果见表2。结果表明,照射后,小鼠体内促炎因子水平增加,抗氧化能力下降,Fe<sup>2+</sup>含量增加;使用较高浓度冬虫夏草治疗后,炎症因子释放明显减少,机体抗氧化能力增强,进而促进铁代谢,减少Fe<sup>2+</sup>在体内的堆积。

### 3.4 各组小鼠直肠组织铁死亡相关蛋白表达

模型组ACSL4蛋白表达水平显著高于对照组( $P<0.05$ ),SLC7A11及GPX4蛋白表达水平显著低于对照组( $P<0.05$ )。冬虫夏草治疗后,中、高剂量组ACSL4蛋白的表达水平低于模型组( $P<0.05$ ),SLC7A11及GPX4蛋白表达水平显著高于模型组( $P<0.05$ ),作用呈现剂量相关性。结果见图2。

### 3.5 直肠组织线粒体数量及形态结构比较

对照组小鼠直肠组织细胞外形圆整,大小正常,膜上绒毛丰富,线粒体细胞器形态正常;模型组线粒体萎缩变小,数量减少,线粒体嵴减少甚至消

表1 各组小鼠体质量变化( $\bar{x}\pm s, n=5$ )

Table 1 Changes of body weight of mice in each group ( $\bar{x}\pm s, n=5$ )

组别	剂量/ (g·kg <sup>-1</sup> )	体质量/g						
		造模前5 d	造模当天	造模后3 d	造模后6 d	造模后9 d	造模后12 d	造模后14 d
对照	—	18.52±0.45	20.32±0.44	21.96±0.41	23.80±0.41	25.26±0.40	26.68±0.37	28.26±0.40
模型	—	18.64±0.34	20.64±0.29	19.86±0.21 <sup>###</sup>	20.84±0.27 <sup>###</sup>	22.88±0.29 <sup>###</sup>	21.30±0.54 <sup>###</sup>	21.54±0.30 <sup>###</sup>
冬虫夏草	0.25	18.54±0.42	20.54±0.36	20.42±0.63	20.68±0.98	21.36±1.20	21.60±1.21	22.12±1.32
	0.50	18.68±0.38	20.68±0.30	21.70±0.33 <sup>*</sup>	22.56±0.34 <sup>*</sup>	23.44±0.21 <sup>*</sup>	24.36±0.23 <sup>*</sup>	25.20±0.50 <sup>*</sup>
	1.00	18.84±0.30	20.84±0.21	21.42±0.29 <sup>*</sup>	22.60±0.19 <sup>*</sup>	23.82±0.26 <sup>*</sup>	25.04±0.31 <sup>*</sup>	26.26±0.37 <sup>*</sup>

与对照组比较:<sup>###</sup> $P<0.001$ ;与模型组比较:<sup>\*</sup> $P<0.05$

<sup>###</sup> $P<vs$  control group; <sup>\*</sup> $P<0.05$  vs model group

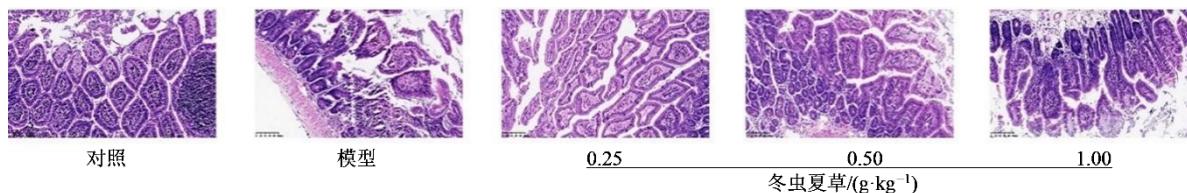


图1 HE染色观察各组小鼠肠道病理学改变( $\times 20$ )

Fig. 1 Observation pathological changes of intestinal tract by HE staining ( $\times 20$ )

表2 各组小鼠血清中IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6、SOD、MDA、Fe $^{2+}$ 水平( $\bar{x}\pm s$ , n=5)Table 2 Levels of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, SOD, MDA, and Fe $^{2+}$  in serum of mice in each group ( $\bar{x}\pm s$ , n=5)

组别	剂量/(g·kg $^{-1}$ )	IL-1 $\beta$ /(pg·mL $^{-1}$ )	TNF- $\alpha$ /(pg·mL $^{-1}$ )	IL-6/(pg·mL $^{-1}$ )	SOD/(U·mg $^{-1}$ )	MDA/(nmol·mg $^{-1}$ )	Fe $^{2+}$ /(μmol·L $^{-1}$ )
对照	—	85.989±1.571	70.450±2.465	19.389±0.330	26.645±0.699	8.756±0.291	0.823±0.022
模型	—	307.569±2.547 <sup>###</sup>	379.794±5.409 <sup>###</sup>	65.029±0.754 <sup>###</sup>	16.096±0.548 <sup>###</sup>	22.298±0.506 <sup>###</sup>	3.986±0.015 <sup>###</sup>
冬虫夏草	0.25	263.952±4.227 <sup>***</sup>	306.054±14.782 <sup>***</sup>	49.523±0.441 <sup>***</sup>	17.903±0.401	19.259±0.403 <sup>***</sup>	3.037±0.060
	0.50	176.151±1.752 <sup>***</sup>	195.279±5.472 <sup>***</sup>	33.841±0.325 <sup>***</sup>	20.269±0.221 <sup>***</sup>	16.636±0.310 <sup>***</sup>	2.283±0.019 <sup>***</sup>
	1.00	122.180±0.953 <sup>***</sup>	133.609±6.726 <sup>***</sup>	26.870±0.587 <sup>***</sup>	22.647±0.375 <sup>***</sup>	13.777±0.838 <sup>***</sup>	1.773±0.046 <sup>***</sup>

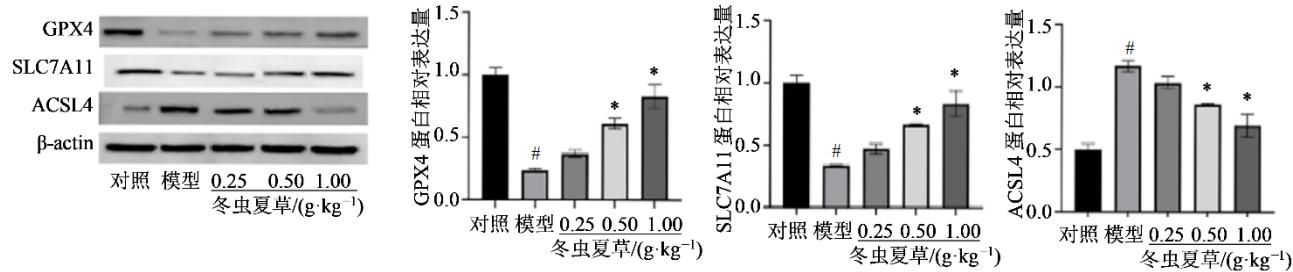
与对照组比较:<sup>###</sup>P<0.001;与模型组比较:<sup>\*\*\*</sup>P<0.001<sup>###</sup>P<0.001 vs control group; <sup>\*\*\*</sup>P<0.001 vs model group与对照组比较:<sup>#</sup>P<0.05;与模型组比较:<sup>\*</sup>P<0.05<sup>#</sup>P<0.05 vs control group; <sup>\*</sup>P<0.05 vs model group

图2 Western blotting检测各组中GPX4、ACSL4、SLC7A11的蛋白表达水平

Fig. 2 Expression levels of GPX4, ACSL4, and SLC7A11 in each group detected by Western blotting

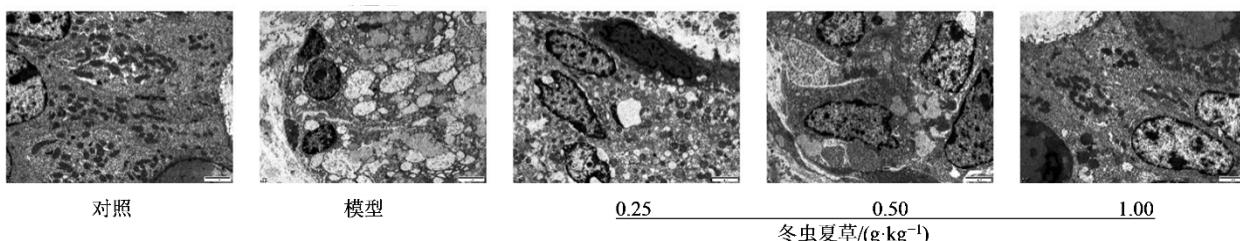
失、膜密度增加,线粒体结构肿胀是典型的铁死亡特征性表型;而经冬虫夏草治疗后,线粒体数量、体积均上升,线粒体嵴增加,结构清晰,且随着药物浓度的增加,线粒体的改善更加显著,见图3。

#### 4 讨论

急性放射性直肠炎是下腹部放疗后最常见的肠道并发症,超过半数的患者在治疗中后期出现肛门疼痛、腹泻、便秘(少见)、黏液便或血样便,严重者可有里急后重等临床症状。其病理改变主要表现为肠道黏膜变薄,上皮充血水肿并伴有炎症细胞浸润和毛细血管扩张,如果照射剂量大且持久,黏膜可出现分布与深浅不一的溃疡,严重阻碍患者原发恶性肿瘤的治疗计划,甚至对患者预后产生不良影响。中医学将急性放射肠炎归属于“痢疾”“泄泻”“便血”等范畴,其机制多因脾气虚弱、运化失

常、水谷不化所致腹泻为主,故中医学认为治疗上应当给予扶正祛邪、补精益气、调理脾胃的策略<sup>[17]</sup>。目前临幊上主要以对症治疗为主,尚无有效的治疗手段,因此探索一种高效的治疗方案极为重要。

冬虫夏草距今有3 000多年的历史,在中国古代中医药典籍中均有记载。已有大量研究证实冬虫夏草在肺脏、肾脏疾病以及肿瘤治疗等方面具有显著疗效。研究表明冬虫夏草通过抑制炎症因子的释放和抗氧化作用治疗慢性阻塞性肺病<sup>[18]</sup>;冬虫夏草通过减少体内ROS、MDA水平以及炎症因子TNF- $\alpha$ 、IL-6和IL-1 $\beta$ 的含量,抑制细胞凋亡以抵抗顺铂对肾脏的损伤作用<sup>[19]</sup>;Zhou等<sup>[20]</sup>研究发现,冬虫夏草通过促进抗氧化物如SOD、GSH的表达,降低ROS、MDA的含量,缓解氧化损伤,改善慢性肾脏病的肾脏损伤。

图3 各组直肠组织细胞线粒体数量及形态结构( $\times 2500$ )Fig. 3 Observation of number and morphology of mitochondria ( $\times 2500$ )

为了研究冬虫夏草治疗的具体机制,构建了急性放射性直肠炎的小鼠模型,并给予不同浓度的冬虫夏草治疗。实验结果发现,放疗后小鼠精神状态欠佳,大便稀溏甚至出现血便,肠黏膜变薄,毛细血管扩张,黏膜充血水肿,隐窝和上皮细胞坏死脱落,大量中性粒细胞和巨噬细胞等炎性细胞浸润,伴有隐窝脓肿形成。用ELISA试剂盒检测各组血清炎症因子和 $\text{Fe}^{2+}$ 的含量,结果表明模型组炎症因子TNF- $\alpha$ 、IL-6和IL-1 $\beta$ 含量显著增加,肠道发生炎症性改变,放疗后血清 $\text{Fe}^{2+}$ 含量明显增加;Western blotting检测结果示模型组铁死亡核心调控因子GPX4、SLC7A11表达下降,ACSL4表达水平升高;透射电镜观察到模型组小鼠肠道出现典型的铁死亡表现:肠道细胞膜断裂或起泡,线粒体变小,数量减少并伴有嵴减少或消失,双层膜通透性增加。然而当给予冬虫夏草治疗后,上述表现有明显的改善,促炎因子的含量减少, $\text{Fe}^{2+}$ 含量减少,GPX4、SLC7A11表达量升高,ACSL4表达水平降低,且随着药物浓度的提升,治疗效果也越来越显著。因此推测冬虫夏草通过SLC7A11/GPX4/ACSL4轴抑制铁死亡的发生,同时抑制炎症因子来抵抗照射对肠道的损伤作用。

铁死亡作为一种新型的细胞死亡类型,主要是以 $\text{Fe}^{2+}$ 累积,脂质尤其是多不饱和脂肪酸过氧化增多为核心的一种细胞死亡形式<sup>[21-22]</sup>,表现为细胞膜起泡、线粒体变小,双层膜密度增加,线粒体嵴减少或消失<sup>[23]</sup>。研究表明铁死亡参与多种结直肠疾病的发生,但其对疾病进展的影响各不相同<sup>[24]</sup>。Xia等<sup>[25]</sup>研究表明,在结直肠肿瘤中,铁死亡调控因子GPX4、SLC7A11表达上调,ACSL4下调,抑制铁死亡,进而促进肿瘤细胞增殖;然而在溃疡性结肠炎中,铁死亡是导致肠上皮细胞死亡的原因之一,因此抑制铁死亡可能成为治疗溃疡性结肠炎的新思路<sup>[26]</sup>。虽然本实验结果显示冬虫夏草对铁死亡有明显抑制作用,但是有关作用机制的研究甚少,需要进一步探讨。

GPX4是一种抗氧化蛋白,可以催化过氧化氢、脂质过氧化物分解,从而保护细胞免受氧化损伤,被认为是调控铁死亡的核心因子<sup>[22]</sup>,因此可作为判断铁死亡的重要指标。SLC7A11主要用于合成胞内抗氧化剂蛋白GSH,可协同GPX4发挥抗氧化作用<sup>[27]</sup>,是铁死亡的重要调节因子之一,Lang等<sup>[28]</sup>研究表明放疗可抑制SLC7A11蛋白的表达,减弱GPX4的抗氧化作用,触发铁死亡。研究证实,ACSL4是长链酰基酰基CoA合成酶ACSL家族的成员,参与脂肪酸代谢,可催化脂质过氧化物的生

成,是铁死亡的关键预测因子<sup>[29]</sup>。Li等<sup>[30]</sup>的研究表明,黄芩素通过GPX4/ACSL4/ACSL3轴抑制铁死亡,从而改善脑缺血再灌注损伤。本实验结果表明,照射后SLC7A11较对照组表达水平明显下降,同时抑制GPX4的表达量,ACSL4的表达水平升高, $\text{Fe}^{2+}$ 含量增加,进而导致细胞膜发生脂质过氧化,诱发铁死亡。但当治疗后,且随着药物浓度的增加,SLC7A11表达量显著增高,GPX4的表达也随之升高,抑制ACSL7的表达,促进脂肪酸代谢,同时 $\text{Fe}^{2+}$ 的含量也明显减少,抑制铁死亡的发生。综上,冬虫夏草可能通过影响SLC7A11/GPX4/ACSL4通路抑制铁死亡的发生,从而对放射性直肠炎起到治疗作用,在此过程中同时观察到炎症因子释放减少。

本研究结果表明,下腹部照射诱发肠道细胞铁死亡并导致炎性因子含量增加,这可能是放射性直肠炎发生发展的重要机制之一,而冬虫夏草可能通过SLC7A11/GPX4/ACSL4轴抑制铁死亡的同时也抑制炎症因子的释放,从而起到对肠道的保护作用。

#### 利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] Allen C, Her S, Jaffray D A. Radiotherapy for cancer: Present and future [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2017, 109: 1-2.
- [2] Kavanagh B D, Pan C C, Dawson L A, et al. Radiation dose-volume effects in the stomach and small bowel [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2010, 76(3 Suppl): S101-S107.
- [3] Jang H, Lee J, Park S, et al. Baicalein mitigates radiation-induced enteritis by improving endothelial dysfunction [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 892.
- [4] Nguyen N P, Antoine J E, Dutta S, et al. Current concepts in radiation enteritis and implications for future clinical trials [J]. *Cancer*, 2002, 95(5): 1151-1163.
- [5] Qin Q Y, Huang Q S, Zhong Q H, et al. Clinical risk factors for late intestinal toxicity after radiotherapy: A systematic review protocol [J]. *Syst Rev*, 2013, 2: 39.
- [6] Zhang X L, Ma Y M, Lv G Q, et al. Ferroptosis as a therapeutic target for inflammation-related intestinal diseases [J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1095366.
- [7] Deng F, Zhao B C, Yang X, et al. The gut microbiota metabolite capsate promotes Gpx4 expression by activating TRPV1 to inhibit intestinal ischemia reperfusion-induced ferroptosis [J]. *Gut Microbes*, 2021, 13(1): 1-21.
- [8] Farhood B, Goradel N H, Mortezaee K, et al. Intercellular communications-redox interactions in radiation toxicity;

- potential targets for radiation mitigation [J]. *J Cell Commun Signal*, 2019, 13(1): 3-16.
- [9] Zhang X H, Li X, Zheng C Y, et al. Ferroptosis, a new form of cell death defined after radiation exposure [J]. *Int J Radiat Biol*, 2022, 98(7): 1201-1209.
- [10] Xu J, Huang Y, Chen X X, et al. The mechanisms of pharmacological activities of *Ophiocordyceps sinensis* fungi [J]. *Phytother Res*, 2016, 30(10): 1572-1583.
- [11] Wu D T, Meng L Z, Wang L Y, et al. Chain conformation and immunomodulatory activity of a hyperbranched polysaccharide from *Cordyceps sinensis* [J]. *Carbohydr Polym*, 2014, 110: 405-414.
- [12] Lee E J, Jang K H, Im S Y, et al. Physico-chemical properties and cytotoxic potential of *Cordyceps sinensis* metabolites [J]. *Nat Prod Res*, 2015, 29(5): 455-459.
- [13] Zheng L, Hao L, Ma H, et al. Production and *in vivo* antioxidant activity of Zn, Ge, Se-enriched mycelia by *Cordyceps sinensis* SU-01 [J]. *Curr Microbiol*, 2014, 69(3): 270-276.
- [14] 赵秋蓉, 李建平, 吴迪, 等. 冬虫夏草中多糖提取、纯化及抗氧化性能的研究 [J]. 中国农学通报, 2012, 28(15): 238-242.  
Zhao Q R, Li J P, Wu D, et al. Studies on the extraction, purification of the polysaccharides in *Cordyceps sinensis* and its autoxidation [J]. *Chin Agric Sci Bull*, 2012, 28(15): 238-242.
- [15] Li Z, Gao Y, Du L, et al. Anti-inflammatory and anti-apoptotic effects of Shaoyao decoction on X-ray radiation-induced enteritis of C57BL/6 mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 292: 115158.
- [16] Lu W, Xie Y, Huang B, et al. Platelet-derived growth factor C signaling is a potential therapeutic target for radiation proctopathy [J]. *Sci Translat Med*, 2021, 13(582): eabc2344.
- [17] 谢梦达. 运用《伤寒论》火逆理论干预急性放射性直肠炎的临床研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2016.  
Xie M D. Clinical study on the intervention of acute radiation proctitis with the theory of fire inversion in Treatise on Febrile Diseases [D]. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine, 2016.
- [18] Sun X, Feng X L, Zheng D D, et al. Ergosterol attenuates cigarette smoke extract-induced COPD by modulating inflammation, oxidative stress and apoptosis *in vitro* and *in vivo* [J]. *Clin Sci*, 2019, 133(13): 1523-1536.
- [19] 单娟萍, 官继超, 董志超, 等. 冬虫夏草通过抗氧化抗炎抑制细胞凋亡改善顺铂肾损伤 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2019, 20(6): 474-477, 565.
- Shan J P, Guan J C, Dong Z C, et al. *Cordyceps sinensis* ameliorates cisplatin-induced nephrotoxicity in mice through inhibition of oxidative stress, inflammation, and apoptosis [J]. *Chin J Integr Tradit West Nephrol*, 2019, 20(6): 474-477, 565.
- [20] Zhou S B, He Y F, Zhang W P, et al. *Ophiocordyceps lanpingensis* polysaccharides alleviate chronic kidney disease through MAPK/NF- $\kappa$ B pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 276: 114189.
- [21] 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.
- [22] Yang W S, SriRamaratnam R, Welsch M E, et al. Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4 [J]. *Cell*, 2014, 156(1/2): 317-331.
- [23] 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.
- [24] 熊寰, 朱亿豪, 胡志乔, 等. 铁死亡在结直肠疾病中的研究进展 [J]. 中华结直肠疾病电子杂志, 2021, 10(1): 86-89.  
Xiong H, Zhu Y H, Hu Z Q, et al. Research progress of ferroptosis in colorectal diseases [J]. *Chin J Colorectal Dis Electr Ed*, 2021, 10(1): 86-89.
- [25] Xia Y, Liu S Z, Li C L, et al. Discovery of a novel ferroptosis inducer-talaroconvolutin A-killing colorectal cancer cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(11): 988.
- [26] Xu M Y, Tao J, Yang Y D, et al. Ferroptosis involves in intestinal epithelial cell death in ulcerative colitis [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(2): 86.
- [27] Bridges R J, Natale N R, Patel S A. System xc<sup>-</sup> cystine/glutamate antiporter: An update on molecular pharmacology and roles within the CNS [J]. *Br J Pharmacol*, 2012, 165(1): 20-34.
- [28] Lang X T, Green M D, Wang W M, et al. Radiotherapy and immunotherapy promote tumoral lipid oxidation and ferroptosis via synergistic repression of SLC7A11 [J]. *Cancer Discov*, 2019, 9(12): 1673-1685.
- [29] 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.
- [30] Li M, Meng Z L, Yu S C, et al. Baicalein ameliorates cerebral ischemia-reperfusion injury by inhibiting ferroptosis via regulating GPX4/ACSL4/ACSL3 axis [J]. *Chem Biol Interact*, 2022, 366: 110137.

[责任编辑 兰新新]