

## • 药理与临床 •

基于 S100A8/TLR4/NF- $\kappa$ B 通路研究雷公藤多苷对溃疡性结肠炎铁死亡的影响赵旦娅<sup>1</sup>, 钦丹萍<sup>2\*</sup>, 邵诗思<sup>3</sup>, 舒建龙<sup>3</sup>, 杨 强<sup>4</sup>, 黄 瑶<sup>3</sup>

1. 杭州市红十字会医院 (浙江省中西医结合医院、浙江中医药大学附属中西医结合医院), 浙江 杭州 310000

2. 浙江中医药大学附属第一医院, 浙江 杭州 310000

3. 浙江中医药大学第一临床医学院, 浙江 杭州 310000

4. 杭州市丁桥医院, 浙江 杭州 310021

**摘要:** 目的 研究 S100 钙结合蛋白 A8 (S100 calcium-binding protein A8, S100A8) 调控 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4)/核因子- $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B) 通路在溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 铁死亡中的作用以及雷公藤多苷 (*Tripterygium wilfordii* polycoride, TWP) 治疗 UC 的作用机制。方法 用脂多糖 (lipopolysaccharides, LPS) 和铁死亡抑制剂 ferrostatin-1 (Fer-1) 联合干预 THP-1 细胞, 检测炎症和铁死亡指标。构建 S100A8 敲减 (S100A8 knock-down, S100A8-KD) 细胞模型, LPS 干预后检测 TLR4/NF- $\kappa$ B 通路、炎症因子和铁死亡指标。构建 S100A8 敲除 (S100A8 knock-out, S100A8-KO) 小鼠模型, 葡聚糖硫酸钠 (dextran sodium sulfate, DSS) 诱导结肠炎症, 监测小鼠情况并检测相关指标。在细胞实验和野生型 (wild type, WT) 小鼠中评价 TWP 的药效。结果 细胞实验结果显示, Fer-1 干预、敲减 S100A8 及 TWP 干预均能增加 THP-1 细胞铁死亡后的细胞活力 ( $P < 0.05$ 、 $0.001$ ), 降低  $\text{Fe}^{2+}$ 、丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 水平 ( $P < 0.01$ 、 $0.001$ ), 降低前列腺素内过氧化物合酶 2 (prostaglandin-endoperoxide synthase 2, PTGS2)、铁蛋白重链 (ferritin heavy chain, FTH)、p53、TLR4、NF- $\kappa$ B、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ ) 表达 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ 、 $0.001$ ), 增加谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4)、溶质载体家族 7 成员 11 (solute carrier family 7 member 11, SLC7A11) 表达 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ 、 $0.001$ ), 并且 TWP 的作用呈剂量相关性。动物实验结果显示, 与 WT 模型组比较, S100A8-KO 模型组与 WT-TWP 组小鼠体重下降幅度、疾病活动指数 (disease activity index, DAI)、结肠长度缩短、结肠病理情况均明显改善 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ 、 $0.001$ ), PTGS2、FTH、p53、TLR4、NF- $\kappa$ B、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  表达降低 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ 、 $0.001$ ), GPX4、SLC7A11 表达增加 ( $P < 0.05$ 、 $0.001$ )。结论 TWP 能减轻 UC 肠道炎症反应, 其机制与调控 S100A8/TLR4/NF- $\kappa$ B 通路进而抑制结肠铁死亡有关。

**关键词:** 雷公藤多苷; 溃疡性结肠炎; S100A8; TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路; 铁死亡

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)10-3523-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.10.011

Effect of *Tripterygium wilfordii* polycoride on ferroptosis in ulcerative colitis based on S100A8/TLR4/NF- $\kappa$ B pathwayZHAO Danya<sup>1</sup>, QIN Danping<sup>2</sup>, SHAO Shisi<sup>3</sup>, SHU Jianlong<sup>3</sup>, YANG Qiang<sup>4</sup>, HUANG Yao<sup>3</sup>

1. Hangzhou Red Cross Hospital (Zhejiang Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine Affiliated Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine), Hangzhou 310000, China

2. The First Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310000, China

3. The First School of Clinical Medicine of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310000, China

4. Hangzhou Dingqiao Hospital, Hangzhou 310021, China

收稿日期: 2024-10-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81973617); 杭州市红十字会医院青年基金资助项目 (HHQN2024001); 浙江中医药大学研究生科学研究基金项目 (2022YKJ02)

作者简介: 赵旦娅 (1995—), 女, 博士, 从事中医药治疗消化系统疾病研究。Tel: (0571)56109761 E-mail: 909330049@qq.com

\*通信作者: 钦丹萍, 教授, 博士生导师, 从事中医药治疗与消化免疫学研究。E-mail: 10464520@qq.com

**Abstract: Objective** To investigate the effect of S100 calcium-binding protein A8 (S100A8) on regulating Toll-like receptor 4 (TLR4)/nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) pathway in ferroptosis associated with ulcerative colitis (UC), as well as the therapeutic mechanism of *Tripterygium wilfordii* polycoride (TWP) in treatment of UC. **Methods** THP-1 cells were treated with LPS and Fer-1 to detect inflammatory and ferroptosis-related indicators. An S100A8 knock-down (S100A8-KD) cell model was constructed, and after LPS intervention, TLR4/NF- $\kappa$ B pathway, inflammatory cytokines and ferroptosis-related indicators were detected. An S100A8 knock-out (S100A8-KO) mouse model was constructed, and colitis was induced by dextran sodium sulfate (DSS), the general condition of mice was monitored, and relevant indicators were detected. The therapeutic effects of TWP were evaluated in cell experiments and wild-type (WT) mice. **Results** The results of cell experiments showed that Fer-1 treatment, S100A8 knockdown and TWP intervention all increased cell viability after ferroptosis in THP-1 cells ( $P < 0.05, 0.001$ ), levels of  $\text{Fe}^{2+}$ , malondialdehyde (MDA) and reactive oxygen species (ROS) were decreased ( $P < 0.01, 0.001$ ), expressions of prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (PTGS2), ferritin heavy chain (FTH), p53, TLR4, NF- $\kappa$ B, tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) were reduced ( $P < 0.05, 0.01, 0.001$ ), expressions of glutathione peroxidase 4 (GPX4) and solute carrier family 7 member 11 (SLC7A11) were increased ( $P < 0.05, 0.01, 0.001$ ). Moreover, the effect of TWP was dose-dependent. The results of animal experiments showed that compared with WT model group, S100A8-KO model group and WT-TWP group exhibited significantly reduced body weight loss, disease activity index (DAI), colonic shortening, and improved colonic pathological conditions ( $P < 0.05, 0.01, 0.001$ ), expressions of PTGS2, FTH, p53, TLR4, NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  were decreased ( $P < 0.05, 0.01, 0.001$ ), while expressions of GPX4 and SLC7A11 were increased ( $P < 0.05, 0.001$ ). **Conclusion** TWP could alleviate intestinal inflammatory responses in UC, and its mechanism is related to the regulation of S100A8/TLR4/NF- $\kappa$ B pathway to inhibit colon ferroptosis.

**Key words:** *Tripterygium wilfordii* polycoride; ulcerative colitis; S100A8; TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway; ferroptosis

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 以肠道持续性炎症及肠黏膜屏障破坏为主要特征。课题组前期发现, 雷公藤多苷 (*Tripterygium wilfordii* polycoride, TWP) 具有抗炎及免疫调节作用, 能够缓解炎症性肠病 (inflammatory bowel disease, IBD) 患者的炎症活动<sup>[1]</sup>, 其作用机制与抑制 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4)/核因子- $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B) 通路、减少炎症因子表达有关<sup>[2]</sup>。前期研究还发现 S100 钙结合蛋白 A8 (S100 calcium-binding protein A8, S100A8) 是 UC 炎症活动的重要基因<sup>[3]</sup>, S100A8 通过调控 TLR4, 激活下游 NF- $\kappa$ B 信号通路, 介导神经系统炎症、胆管癌转移等多种疾病<sup>[4-7]</sup>。

铁死亡是一种铁依赖性的细胞死亡方式, 其特征是细胞内活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的积累和脂质过氧化<sup>[8]</sup>。谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4) 是铁死亡过程中的关键调节因子, 在细胞清除脂质过氧化物中发挥重要作用<sup>[9]</sup>。前列腺素内过氧化物合酶 2 (prostaglandin-endoperoxide synthase 2, PTGS2) 的表达与铁死亡的调节有关。铁蛋白轻链 (ferritin light chain, FTL) 参与铁的摄取和利用, 而铁蛋白重链 (ferritin heavy chain, FTH) 则涉及铁的储存和释放, 两者均与铁死亡中铁代谢的调控有关<sup>[10]</sup>。ROS 作为铁死亡的驱动因素之一, 可以由 p53 蛋白调节, p53 作为基因组卫士, 通过调节靶向溶质载体家族 7 成

员 11 (solute carrier family 7 membrane 11, SLC7A11) 来影响细胞的氧化还原状态和铁死亡<sup>[11-12]</sup>。

近年来, 研究相继证明 UC 炎症活动会受到铁死亡的干扰<sup>[13-16]</sup>。铁死亡具有免疫原性, 促进与炎症有关的一系列反应<sup>[17]</sup>, 并且炎症部位的细胞死亡损伤肠黏膜屏障, 进一步加重炎症反应<sup>[18]</sup>。TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路不仅与 UC 炎症活动有关, 也能促进铁死亡进程<sup>[19-21]</sup>, 但 S100A8 调控 TLR4/NF- $\kappa$ B 通路在 UC 铁死亡中扮演何种角色及 TWP 对此的干预作用仍未明确。基于此, 本研究通过慢病毒转染构建 S100A8 敲减 (S100A8 knockdown, S100A8-KD) 细胞模型以及采用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术构建 S100A8 敲除 (S100A8 knock-out, S100A8-KO) 小鼠, 探究 S100A8/TLR4/NF- $\kappa$ B 通路在 UC 铁死亡中的作用, 以及 TWP 在其中的调控效应, 有助于进一步阐明 UC 的发病机制, 为 UC 的治疗提供新的策略。

## 1 材料

### 1.1 细胞系

THP-1 细胞 (批号 CTCC-001-0044) 购自浙江美森细胞科技有限公司, 用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基, 置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养, 取处于对数生长期的细胞用于实验。

### 1.2 动物

C57BL/6 野生型 (wild type, WT) 小鼠购自上

海斯莱克实验动物有限公司, 生产许可证号 SCXK (沪) 2022-0004。S100A8-KO 小鼠购自南京集萃药康生物有限公司, 生产许可证号 SCXK (苏) 2023-0009。动物实验经浙江中医药大学动物伦理委员会批准 (批准号 IACUC-20210517-24)。

### 1.3 药品与试剂

葡聚糖硫酸钠 (dextran sodium sulfate, DSS, 相对分子质量  $3.6 \times 10^4 \sim 5 \times 10^4$ , 批号 S6132)、生理盐水 (批号 R22172)、RIPA 裂解液 (批号 R21237) 购自上海源叶生物科技有限公司; 硫唑嘌呤 (azathioprine, AZA, 50 mg/片, 批号 108114) 购自美国 Aspen 公司; 雷公藤多苷片 (10 mg/片, 批号 Z33020422, 国药准字 Z33020422) 购自浙江得恩德制药股份有限公司; 脂多糖 (lipopolysaccharides, LPS, 批号 L2654) 购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 铁死亡抑制剂 ferrostatin-1 (Fer-1, 批号 GC10380) 购自美国 GLP BIO 公司; TWP 原料粉由浙江得恩德制药股份有限公司赠送; AZA 对照品 (批号 YZ-100197, 质量分数为 99.9%) 购自中国食品药品检定研究院; 细胞亚铁比色法测试盒 (批号 E-BC-K881-M) 购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司; 嘌呤霉素 (货号 MA0318) 购自大连美仑生物技术有限公司; 细胞培养级二甲亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO, 批号 BL165B)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 检测试剂盒 (批号 BL904A)、4% 多聚甲醛固定液 (批号 BL539A)、活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 检测试剂盒 (批号 BL714A)、TBST 缓冲液 (pH 7.4, 批号 BL315B)、特超敏 ECL 化学发光底物 (批号 BL520B)、Tris-Glycine 电泳缓冲液粉末 (批号 BL603A)、电泳转移缓冲液 (批号 BL626A)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (批号 BL521A)、PBS 溶液 (批号 BL302A) 购自安徽白鲨生物科技有限公司; GPX4 抗体 (批号 ER1803-15)、FTH 抗体 (批号 R1601-9)、PTGS2 抗体 (批号 RT1159)、p53 抗体 (批号 EM1701-91)、SLC7A11 抗体 (批号 HA600097) 购自杭州华安生物技术有限公司; 10% PAGE 凝胶快速制备试剂盒 (批号 PG112)、12.5% PAGE 凝胶快速制备试剂盒 (批号 PG113)、无蛋白快速封闭液 (批号 PS108P)、速溶型蛋白上样缓冲液 (批号 LT101S) 购自上海雅酶生物医药科技有限公司; PVDF 膜 (批号 0000226276) 购自德国默克密理博有限公司; 双色蛋白 Maker (批号 1610374)、HRP 标记的山羊抗兔二抗 (批号 1706515) 购自美国伯乐公司; HRP 标记的

山羊抗鼠二抗 (批号 RS0001) 购自安诺伦生物科技有限公司; 肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 抗体 (批号 17590-1-AP)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体 (批号 10494-1-AP) 购自武汉三鹰生物技术有限公司; p-NF- $\kappa$ B p65 抗体 (批号 3033) 购自美国 CST 公司; TLR4 抗体 (批号 sc-293072) 购自美国 Santa Cruz 公司; NF- $\kappa$ B p65 抗体 (批号 ab16502)、S100A8 抗体 (批号 ab92331)、白细胞介素-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ ) 抗体 (批号 ab254360) 购自英国 Abcam 公司; SteadyPure RNA 提取试剂盒 (批号 AG21024) 购自湖南艾科瑞生物工程有限公司; 逆转录试剂盒 (批号 K1622)、PowerUp SYBR Green Reagent (批号 A25742) 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; RPMI 1640 培养基 (批号 C3001-0500) 购自上海逍鹏生物有限公司; CCK-8 试剂盒 (批号 CK001) 购自北京兰博利德有限公司。

### 1.4 仪器

Nanodrop one 型微量核酸蛋白分析仪、MK3 型酶标仪、BB150 型细胞培养箱、1300 系列 II 级 A2 型生物安全柜 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 846-x-070-280 型普通 PCR 仪 (德国耶拿公司); FluorChem Q 型蛋白扫描仪 (美国 Proteinsimple 公司); Axio Observer A1 型荧光倒置显微活细胞系统 (德国蔡司公司); lightcycler 480 II 型荧光定量 PCR、MagNA Lyser 型全自动组织匀浆机 (德国 ROCHE 公司); BIORUPTOR Plus 型管内超声仪 (美国 Sonics 公司); MD ImageXpress Micro 型高内涵细胞成像分析系统 (美国 MD 公司); HM340E 型切片机 (德国 Leica 公司); PowerPac Basic 型 WB 电泳仪 (美国伯乐公司)。

## 2 方法

### 2.1 S100A8-KD 慢病毒转染

根据 S100A8 基因的 mRNA 序列, 设计 1 条 shRNA 序列和 1 条对照序列, S100A8-KD 转染序列为 TCAACACTGATGGTGCAGTTA; 阴性对照病毒载体为 GV493, 购自上海吉凯基因公司。转染时细胞密度为  $1 \times 10^4$  个/mL, 感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 为 30, 转染 72 h 后, 在倒置荧光显微镜下观察细胞内绿色荧光蛋白的表达以评估转染效率, 转染效率约为 80%。随后用 2  $\mu$ g/mL 嘌呤霉素干预 48 h 以筛选成功转染的细胞, 通过 qRT-PCR 及 Western blotting 来验证病毒转染的效率, 转染成功的细胞用于后续实验。

## 2.2 细胞干预

LPS 是常用炎症刺激剂,研究表明 LPS 在体内和体外均可诱导铁死亡<sup>[1-2]</sup>,因此选择 LPS 作为铁死亡诱导剂。Fer-1 是高效的特异性铁死亡抑制剂,能有效抑制细胞铁死亡。将 1 g LPS 粉末溶于 1 mL PBS 中,充分混匀,以 10 μg/mL 的质量浓度干预细胞 24 h 诱导铁死亡。

## 2.3 CCK-8 实验检测细胞活力

称取 1 g TWP 原料粉末、1 g AZA 对照品粉末,分别溶于 1 mL DMSO 中,根据后续实验要求,用培养基稀释成相应质量浓度。取对数生长期的细胞以  $3 \times 10^5$  个/mL 接种至 96 孔板中,分别加入 LPS (10 μg/mL)、Fer-1 (4 μmol/L)、TWP (1、2、4 μg/mL) 或 AZA (1 μg/mL) 干预细胞 48 h 后,加入 10 μL CCK-8 试剂,继续培养 2 h。使用多模式酶标仪在 450 nm 处测定吸光度 (A) 值。

## 2.4 Fe<sup>2+</sup>水平的测定

收集细胞,按照比色法检测试剂盒说明书测定细胞中 Fe<sup>2+</sup>水平。

## 2.5 MDA 水平的测定

收集细胞,按照试剂盒说明书测定 MDA 水平。

## 2.6 ROS 水平的检测

收集细胞,按照 ROS 检测试剂盒说明书进行操作,加入 DCFH-DA 荧光探针 (5 μmol/L),在 37 °C 细胞培养箱中孵育 30 min, PBS 洗涤后,通过高内涵细胞成像分析系统观察荧光强度,使用 Image J 软件进行分析。

## 2.7 动物分组、造模及给药

9~12 周龄 S100A8-KO 小鼠 16 只, WT 小鼠 32 只,适应性喂养 1 周。设置 WT 对照组、S100A8-KO 对照组、WT 模型组、S100A8-KO 模型组、WT-TWP 组和 WT-AZA 组,每组 8 只。以成人临床等效剂量换算, TWP、AZA 剂量均为 9.1 mg/kg。WT 对照组和 S100A8-KO 对照组连续 7 d 自由饮用纯水,并连续 10 d 给生理盐水 (10 mL/kg); WT 模型组和 S100A8-KO 模型组连续 7 d 自由饮用 3% DSS 溶液,并连续 10 d 给生理盐水; WT-TWP 组和 WT-AZA 组连续 7 d 自由饮用 3% DSS 溶液,并连续 10 d 给相应药物。每日观察小鼠体质量、毛发、饮食、大便等一般情况,并进行疾病活动指数 (disease activity index, DAI) 评分。

## 2.8 结肠组织病理学观察

末次给药后,小鼠脱颈椎处死,解剖收集整个

结肠并测量长度,取结肠远端组织用于病理检查。

沿肠系膜纵轴剪开,用生理盐水冲洗后吸干,于 4% 多聚甲醛中室温固定 24 h,石蜡包埋后切成 4 μm 厚的切片,进行苏木素-伊红 (HE) 染色后,于显微镜下观察并拍照。

## 2.9 qRT-PCR 检测 GPX4、FTH、SLC7A11、p53、PTGS2、IL-1β、TNF-α、S100A8、TLR4、NF-κB p65 mRNA 表达

使用 SteadyPure RNA 提取试剂盒提取细胞及动物结肠组织总 RNA,微量核酸蛋白分析仪测定 RNA 浓度,逆转录试剂盒逆转录成 cDNA,使用 PowerUp SYBR Green Reagent 进行 qRT-PCR 分析。引物序列见表 1,引物由上海生工生物有限公司设

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

| 基因               | 种属 | 序列 (5'-3')                                                   |
|------------------|----|--------------------------------------------------------------|
| <i>GAPDH</i>     | 小鼠 | F: AAATGGTGAAGGTCGGTGTGAAC<br>R: CAACAATCTCCACTTTGCCACTG     |
| <i>GPX4</i>      | 小鼠 | F: CCCGATATGCTGAGTGTGGTTTAC<br>R: TTTCTTGATTACTTCCTGGCTCCTG  |
| <i>FTH</i>       | 小鼠 | F: CCATCAACCGCCAGATCAACC<br>R: CAAAGTTCTTCAGAGCCACATCATC     |
| <i>SLC7A11</i>   | 小鼠 | F: CCACCATCAGTGCGGAGGAG<br>R: GAAGCAGGAGAGGGCAACAAAG         |
| <i>p53</i>       | 小鼠 | F: TGAACCGCCGACCTATCCTTAC<br>R: GCACAAACACGAACCTCAAAGC       |
| <i>PTGS2</i>     | 小鼠 | F: GTGCCCTGGTCTGATGATGTATGC<br>R: TGAGTCTGCTGGTTTGAATAGTTG   |
| <i>IL-1β</i>     | 小鼠 | F: CACTACAGGCTCCGAGATGAACAAC<br>R: TGTCGTTGCTTGGTTCTCCTGTAC  |
| <i>TNF-α</i>     | 小鼠 | F: CGCTCTTCTGTCTACTGAATTCGG<br>R: GTGGTTTGTGAGTGTGAGGGTCTG   |
| <i>S100A8</i>    | 小鼠 | F: TCACCATGCCCTCTACAAGAATGAC<br>R: CCATCGCAAGGAACCTCCTCGAAG  |
| <i>TLR4</i>      | 小鼠 | F: GAGCCGGAAGGTTATTGTGGTAGTG<br>R: AGGACAATGAAGATGATGCCAGAGC |
| <i>NF-κB p65</i> | 小鼠 | F: AAATGGGAAACCGTATGACCTGTG<br>R: GTTGTAGCCTCGTGTCTTCTGTACG  |
| <i>β-actin</i>   | 人  | F: CTCCATCCTGGCCTCGTGT<br>R: GCTGTACCTTCACCGTTCC             |
| <i>GPX4</i>      | 人  | F: CCGCTGTGGAAGTGGATGAAGATC<br>R: CTTGTGCGATGAGGAAGTGTGGAGAG |
| <i>FTH</i>       | 人  | F: CCATCAACCGCCAGATCAACCTG<br>R: GTTTCTCAGCATGTTCCCTCTCCTC   |
| <i>SLC7A11</i>   | 人  | F: GGATTGGCTTCGTCATCACTCTG<br>R: TTCTCCGACATTATTCTAAACCACTG  |
| <i>p53</i>       | 人  | F: ATGAGCCGCTGAGGTTGG<br>R: CAGTGTGATGATGGTGAAGATGG          |
| <i>PTGS2</i>     | 人  | F: GGGTTGCTGGTGGTAGGAATGTTT<br>R: CTGGTATTTCATCTGCCTGCTCTGG  |
| <i>IL-1β</i>     | 人  | F: TACGAATCTCCGACCACCACTACAG<br>R: ACACCACTTGTTGCTCCATATCCTG |
| <i>TNF-α</i>     | 人  | F: AGCCCTGGTATGAGCCCATCTATC<br>R: TCCCAAAGTAGACCTGCCAGAC     |
| <i>S100A8</i>    | 人  | F: TTGCTAGAGACCGAGTGTCTCAG<br>R: GCCACGCCATCTTTATCACCAG      |
| <i>TLR4</i>      | 人  | F: ACCTGATGCTTCTTGCTGGC<br>R: GAGCTGAAATGGAGGCACCC           |
| <i>NF-κB p65</i> | 人  | F: TATTTGAAACACTGGAAGCACG<br>R: CCGGAAGAAAAGCTGTAAACAT       |

计并合成。采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算各基因相对表达量。

## 2.10 Western blotting 检测 PTGS2、GPX4、FTH、SLC7A11、p53、TLR4、NF- $\kappa$ B p65、p-NF- $\kappa$ B p65、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 蛋白表达

使用含 1 mmol/L PMSF 的 RIPA 缓冲液提取细胞和动物结肠组织中总蛋白，使用 BCA 试剂盒进行蛋白定量。蛋白上样量为 20  $\mu$ g，通过 10% 或 12% 的 SDS-PAGE 分离，随后转移到 PVDF 膜上，用无蛋白封闭液于室温封闭 15 min，分别加入 GAPDH (1:5 000)、PTGS2 (1:2 000)、GPX4 (1:2 000)、FTH (1:1 000)、SLC7A11 (1:2 000)、p53 (1:500)、TLR4 (1:1 000)、NF- $\kappa$ B p65 (1:5 000)、

p-NF- $\kappa$ B p65 (1:1 000)、TNF- $\alpha$  (1:1 000)、IL-1 $\beta$  (1:1 000) 一抗，4  $^{\circ}$ C 孵育过夜；TBST 洗涤 3 次后，加入二抗，室温孵育 1 h，最后使用 ECL 增强化学发光法曝光，Image J 软件进行灰度值分析。

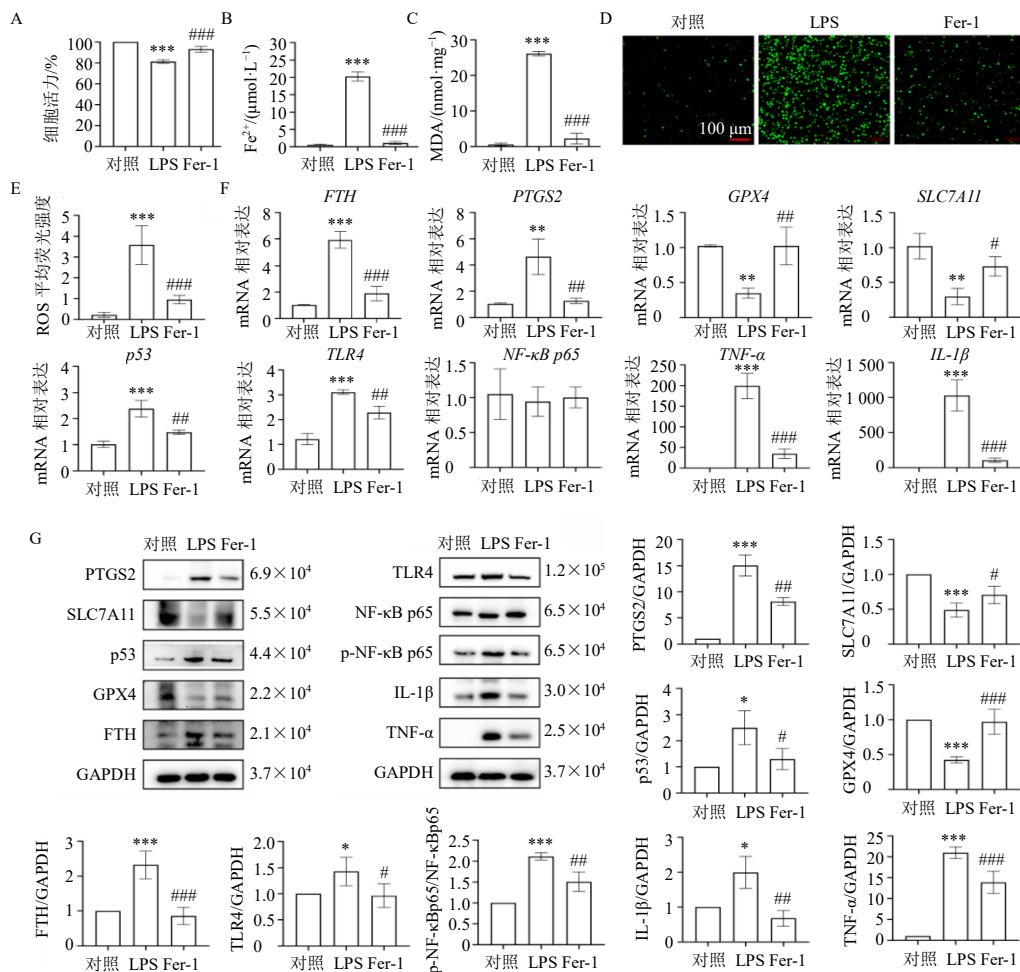
## 2.11 统计学分析

数据用  $\bar{x} \pm s$  表示，使用 GraphPad Prism 5.0 软件分析，通过单因素方差分析 (One Way ANOVA) 评估组间差异，使用 Tukey 进行显著差异检验。

## 3 结果

### 3.1 验证铁死亡与炎症的关系

Fer-1 (4  $\mu$ mol/L) 预处理细胞 12 h 后，加入 LPS (10  $\mu$ g/mL) 干预细胞 48 h。如图 1-A~E 所示，与



A-CCK-8 检测细胞活力；B- $Fe^{2+}$  水平；C-MDA 水平；D、E-ROS 荧光图片及统计分析；F、G-qRT-PCR 及 Western blotting 检测 PTGS2、FTH、p53、SLC7A11、GPX4、TLR4、NF- $\kappa$ B p65、p-NF- $\kappa$ B p65、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  mRNA 及蛋白表达；与对照组比较：\* $P$ <0.05 \*\* $P$ <0.01 \*\*\* $P$ <0.001；与 LPS 组比较：# $P$ <0.05 ## $P$ <0.01 ### $P$ <0.001。

A-cell viability detected by CCK-8; B- $Fe^{2+}$  level; C-MDA level; D, E-ROS fluorescence images and statistical analysis; F, G-mRNA and protein expression levels of PTGS2, FTH, p53, SLC7A11, GPX4, TLR4, NF- $\kappa$ B p65, p-NF- $\kappa$ B p65, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  detected by qRT-PCR and Western blotting; \* $P$ <0.05 \*\* $P$ <0.01 \*\*\* $P$ <0.001 vs control group; # $P$ <0.05 ## $P$ <0.01 ### $P$ <0.001 vs LPS group.

图 1 铁死亡抑制剂对 LPS 诱导的细胞铁死亡及炎症的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 1 Effect of Fer-1 on LPS-induced cell ferroptosis and inflammation ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

对照组比较, LPS 组细胞活力显著降低 ( $P < 0.001$ ),  $\text{Fe}^{2+}$ 、MDA、ROS 水平显著升高 ( $P < 0.001$ ); 与 LPS 组比较, LPS+Fer-1 组细胞活力显著升高 ( $P < 0.001$ ),  $\text{Fe}^{2+}$ 、MDA、ROS 水平显著降低 ( $P < 0.001$ )。如图 1-F、G 所示, 与对照组比较, LPS 组 FTH、PTGS2、p53、TLR4、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  mRNA 及蛋白表达水平显著升高 ( $P < 0.05$ 、0.01、0.001), p-NF- $\kappa$ B p65/NF- $\kappa$ B p65 值显著升高 ( $P < 0.001$ ), GPX4、SLC7A11 mRNA 及蛋白表达水平显著降低 ( $P < 0.01$ 、0.001); 与 LPS 组比较, LPS+Fer-1 组 FTH、PTGS2、p53、TLR4、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  mRNA 及蛋白表达水平显著降低 ( $P < 0.05$ 、0.01、0.001), p-NF- $\kappa$ B p65/NF- $\kappa$ B p65 值显著降低 ( $P < 0.01$ ), GPX4、SLC7A11 mRNA 及蛋白表达水平显著升高 ( $P < 0.05$ 、0.01、0.001)。提示铁死亡参与了 LPS 诱导的炎症反应, 其机制可能与 TLR4/NF- $\kappa$ B 通路有关。

### 3.2 验证 S100A8/TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路在 UC 铁死亡中的作用

**3.2.1** 细胞中敲减 S100A8 对铁死亡及炎症的影响 如图 2-A 所示, qRT-PCR 及 Western blotting 验证 S100A8 敲减成功。如图 2-B~F 所示, 与 LPS 对照组和 NC-KD+LPS 组相比, S100A8-KD+LPS 组细胞活力显著升高 ( $P < 0.001$ ),  $\text{Fe}^{2+}$ 、MDA 及 ROS 水平显著下降 ( $P < 0.001$ )。如图 2-G、H 所示, 与 LPS 对照组和 NC-KD+LPS 组相比, S100A8-KD+LPS 组 FTH、PTGS2、p53、TLR4、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  mRNA 及蛋白表达水平显著降低 ( $P < 0.05$ 、0.01、0.001), p-NF- $\kappa$ B p65/NF- $\kappa$ B p65 值显著降低 ( $P < 0.05$ 、0.01), GPX4、SLC7A11 mRNA 及蛋白表达水平显著升高 ( $P < 0.05$ 、0.01、0.001)。提示 S100A8 可能是 LPS 诱导细胞铁死亡的关键因子, 并通过 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路调节铁死亡。

**3.2.2** 动物中敲除 S100A8 对结肠铁死亡的影响 如图 3-A~F 所示, 与 WT 模型组比较, S100A8-KO 模型组小鼠体质量显著升高 ( $P < 0.05$ ), DAI 评分显著降低 ( $P < 0.001$ ), 结肠长度显著增加 ( $P < 0.01$ ), 结肠病理评分显著降低 ( $P < 0.01$ )。如图 3-G、H 所示, 与 WT 模型组比较, S100A8-KO 模型组小鼠结肠组织 FTH、PTGS2、p53、TLR4、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  mRNA 及蛋白表达水平显著降低 ( $P < 0.05$ 、0.01、0.001), p-NF- $\kappa$ B p65/NF- $\kappa$ B p65 值显著降低 ( $P < 0.05$ ), GPX4 mRNA 及蛋白表达水平显著升高 ( $P < 0.05$ 、0.001), SLC7A11 mRNA 表达水平显著

升高 ( $P < 0.001$ )。提示 S100A8 敲除能抑制 DSS 诱导的肠道铁死亡, 减轻肠道炎症反应。

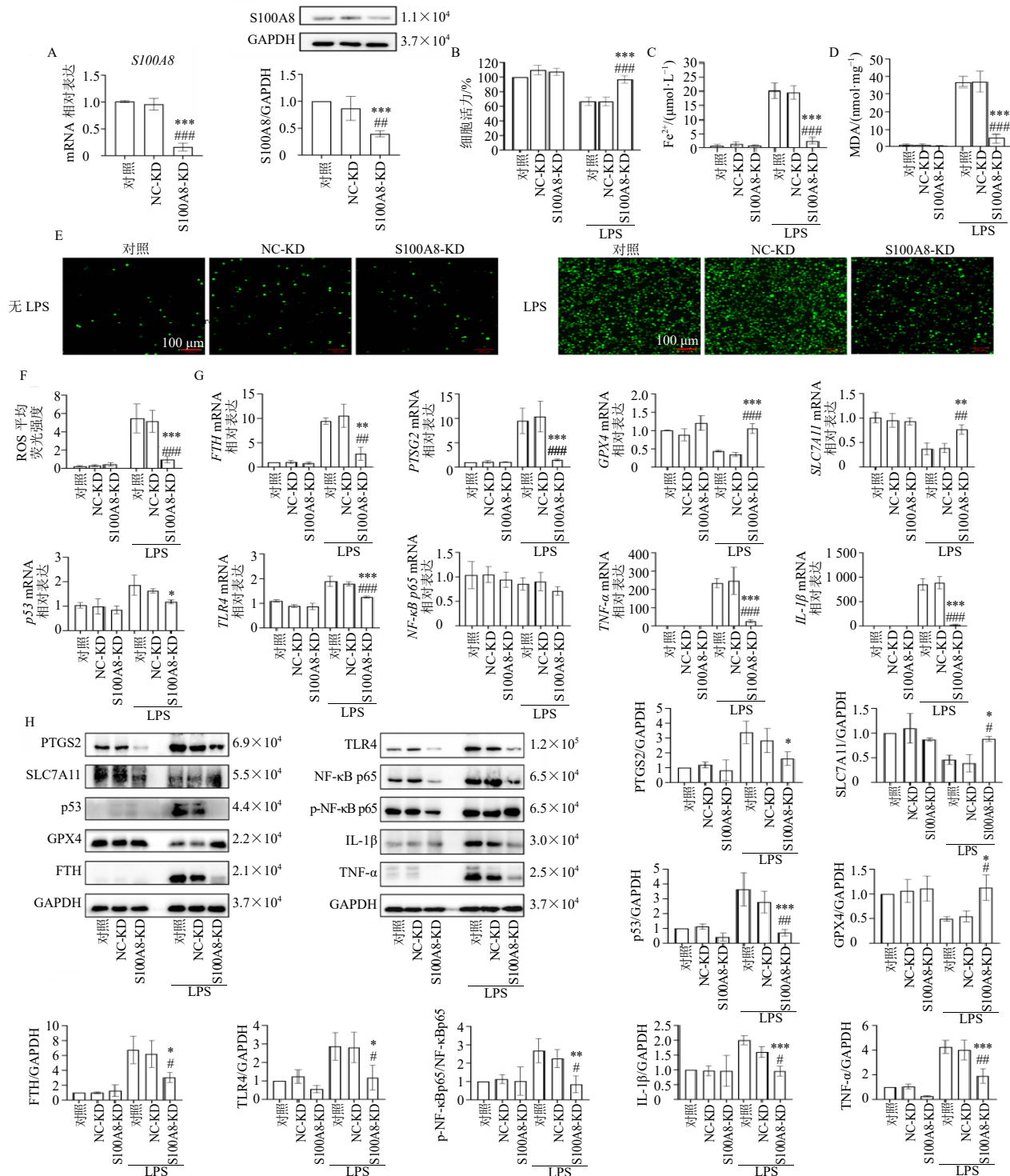
### 3.3 评估 TWP 对 UC 铁死亡的作用

**3.3.1** TWP 对细胞 S100A8/TLR4/NF- $\kappa$ B 通路及铁死亡的影响 如图 4-A~E 所示, 与对照组比较, LPS 组细胞活力显著下降 ( $P < 0.001$ ),  $\text{Fe}^{2+}$ 、MDA 及 ROS 水平显著升高 ( $P < 0.001$ ); TWP 干预后, 细胞活力逐渐增加 ( $P < 0.05$ ),  $\text{Fe}^{2+}$ 、MDA 及 ROS 水平逐渐降低 ( $P < 0.01$ 、0.001)。如图 4-F、G 所示, 与对照组比较, LPS 组 FTH、PTGS2、p53、TLR4、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  mRNA 及蛋白表达水平显著升高 ( $P < 0.05$ 、0.01、0.001), p-NF- $\kappa$ B p65/NF- $\kappa$ B p65 值显著升高 ( $P < 0.001$ ), GPX4、SLC7A11 mRNA 及蛋白表达水平显著降低 ( $P < 0.01$ 、0.001); TWP 干预后, FTH、PTGS2、p53、TLR4、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  mRNA 及蛋白表达水平降低 ( $P < 0.05$ 、0.01、0.001), p-NF- $\kappa$ B p65/NF- $\kappa$ B p65 值降低 ( $P < 0.001$ ), GPX4、SLC7A11 mRNA 及蛋白表达水平升高 ( $P < 0.05$ 、0.01、0.001), 且呈剂量相关性。以上结果提示 TWP 可能通过 S100A8/TLR4/NF- $\kappa$ B 通路抑制 LPS 诱导的 THP-1 细胞铁死亡, 从而减轻细胞炎症反应。

**3.3.2** TWP 对小鼠 S100A8/TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路及铁死亡的影响 如图 5-A~F 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠体质量显著下降 ( $P < 0.001$ ), DAI 评分显著升高 ( $P < 0.001$ ), 结肠长度显著缩短 ( $P < 0.001$ ), 结肠隐窝丢失, 炎性细胞浸润, 黏膜损伤明显, 病理评分显著升高 ( $P < 0.001$ ); 如图 5-G、H 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠结肠组织中 FTH、PTGS2、p53、TLR4、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  mRNA 及蛋白表达水平显著升高 ( $P < 0.01$ 、0.001), p-NF- $\kappa$ B p65/NF- $\kappa$ B p65 值显著升高 ( $P < 0.001$ ), GPX4、SLC7A11 mRNA 及蛋白表达水平显著降低 ( $P < 0.05$ 、0.001); TWP 干预能不同程度地改善以上指标 ( $P < 0.05$ 、0.01、0.001)。以上结果提示 TWP 能抑制 UC 小鼠结肠 S100A8/TLR4/NF- $\kappa$ B 通路, 减缓铁死亡进程, 从而缓解结肠炎症。

## 4 讨论

铁死亡目前被认为是 UC 肠上皮细胞死亡的重要因素<sup>[15]</sup>, 同时也是免疫细胞的重要死亡途径, 免疫细胞铁死亡促进与炎症有关的一系列反应<sup>[22-25]</sup>, 因此靶向铁死亡是治疗感染、控制炎症的一种潜在方式<sup>[26]</sup>。本研究证实了铁死亡与炎症的相关性。结果显示, LPS 诱导 THP-1 细胞炎症后, 细胞存活率



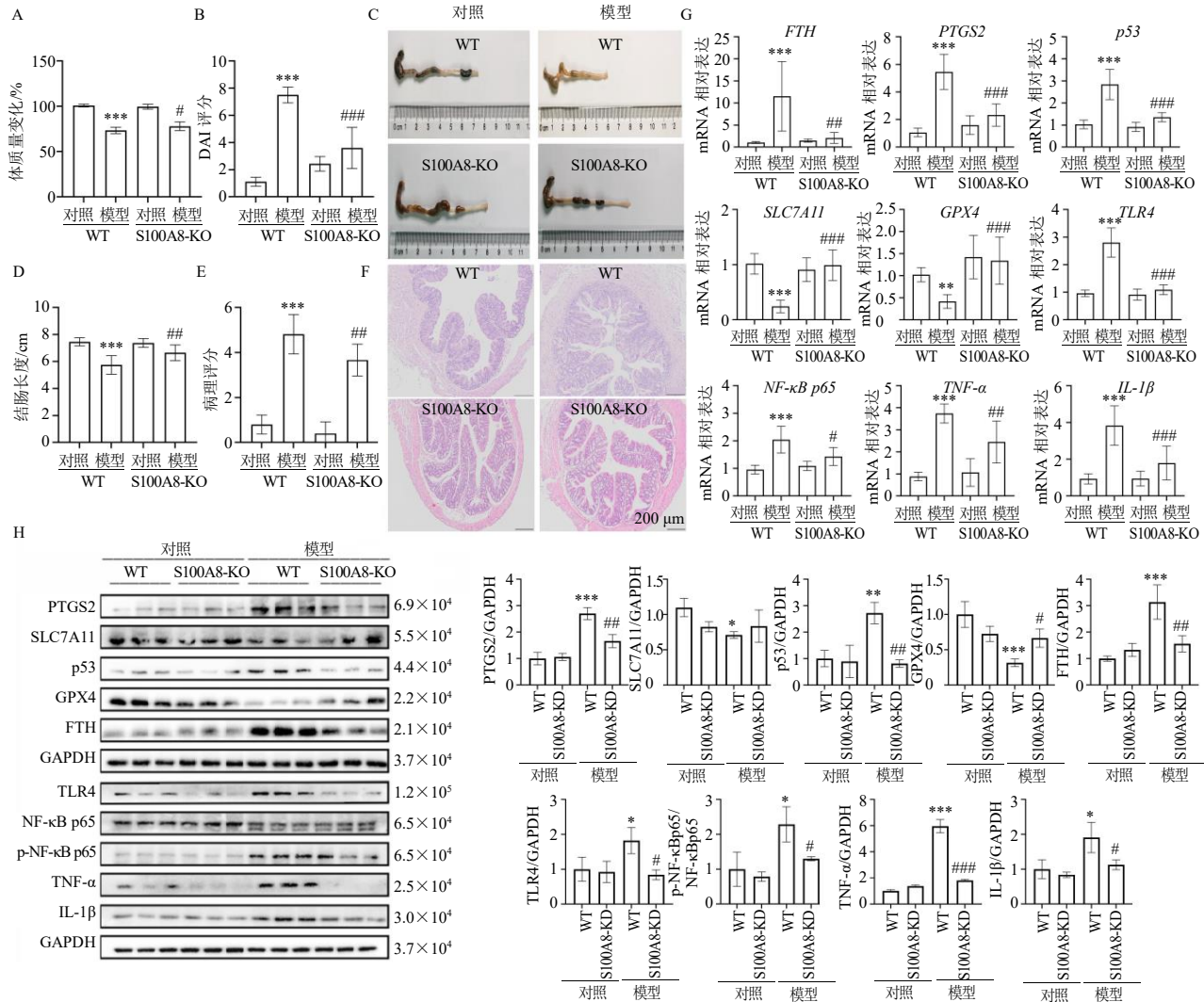
A-验证慢病毒转染的有效率; B-CCK-8 检测细胞活力; C- $Fe^{2+}$ 水平; D-MDA 水平; E、F-ROS 荧光图片及统计分析; G、H-qRT-PCR 及 Western blotting 检测 PTGS2、FTH、p53、SLC7A11、GPX4、TLR4、NF- $\kappa B$  p65、p-NF- $\kappa B$  p65、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  mRNA 及蛋白表达; 与 LPS 对照组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$ ; 与 NC-KD+LPS 组比较: # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$  ### $P < 0.001$ 。

A-verify efficiency of lentiviral transduction; B-cell viability detected by CCK-8; C- $Fe^{2+}$  level; D-MDA level; E, F-ROS fluorescence images and statistical analysis; G, H-mRNA and protein expression levels of PTGS2, FTH, p53, SLC7A11, GPX4, TLR4, NF- $\kappa B$  p65, p-NF- $\kappa B$  p65, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  detected by qRT-PCR and Western blotting; \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$  vs LPS control group; # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$  ### $P < 0.001$  vs NC-KD + LPS group.

图 2 细胞内敲减 S100A8 对细胞铁死亡及炎症的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 2 Effect of intracellular knockdown of S100A8 on ferroptosis and inflammation in cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )





A-小鼠体重变化; B-小鼠 DAI 评分; C、D-小鼠结肠长度典型图片及统计分析; E、F-结肠 HE 染色及病理评分; G、H-qRT-PCR 及 Western blotting 检测 PTGS2、FTH、p53、SLC7A11、GPX4、TLR4、NF-κB p65、p-NF-κB p65、TNF-α、IL-1β mRNA 及蛋白表达; 与 WT 对照组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$ ; 与 WT 模型组比较: # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$  ### $P < 0.001$ 。

A-changes in body weight of mice; B-DAI score of mice; C, D-representative images and statistical analysis of colon length in mice; E, F-HE staining and pathological scoring of colon; G, H-mRNA and protein expression levels of PTGS2, FTH, p53, SLC7A11, GPX4, TLR4, NF-κB p65, p-NF-κB p65, TNF-α and IL-1β detected by qRT-PCR and Western blotting; \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$  vs WT control group; # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$  ### $P < 0.001$  vs WT model group.

图 3 S100A8 敲除对 DSS 诱导的小鼠结肠铁死亡及炎症的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

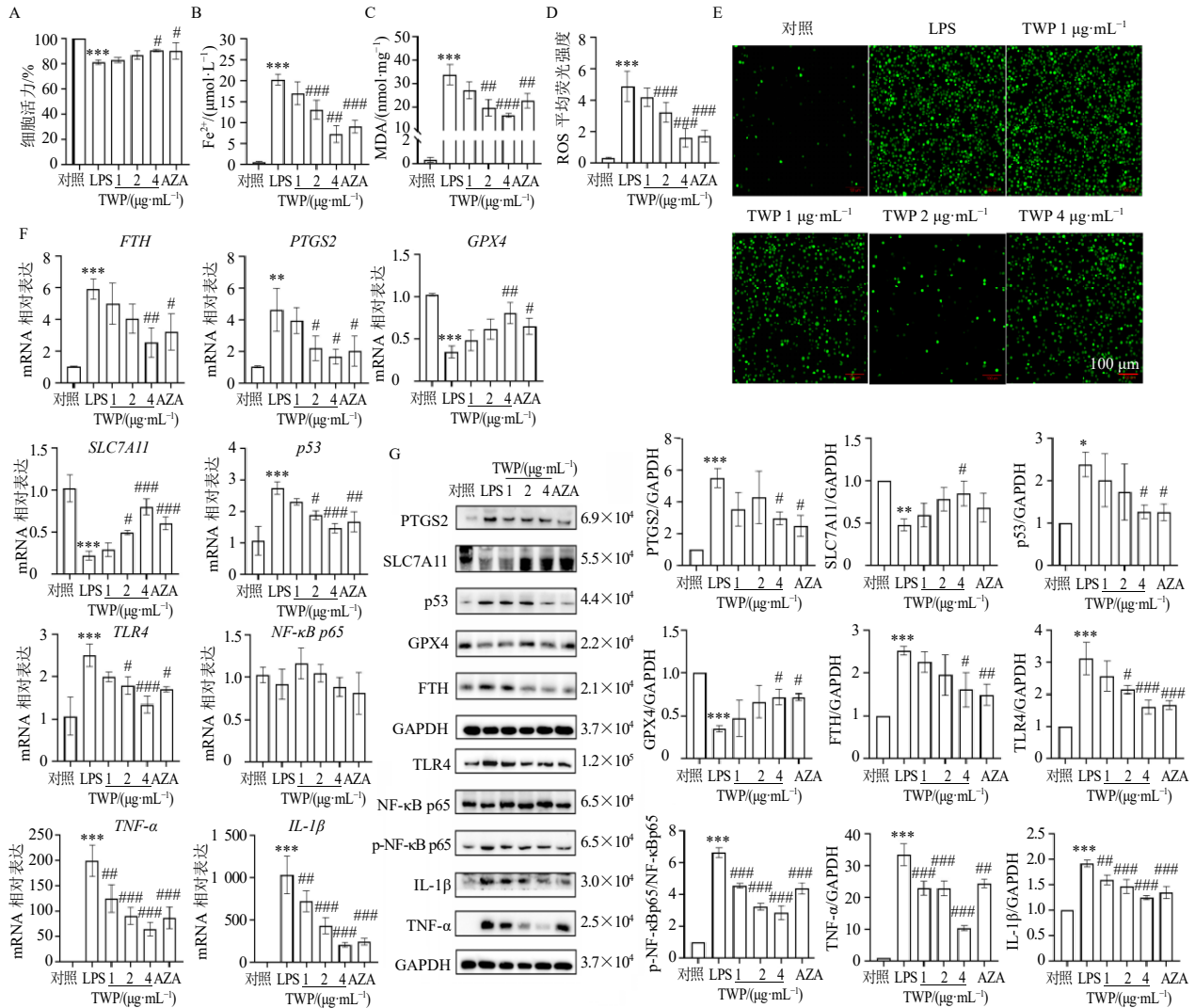
Fig. 3 Effect of S100A8 knockout on ferroptosis and inflammation in colon of DSS-induced mice ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

下降, 细胞内  $\text{Fe}^{2+}$ 、MDA 及 ROS 水平增加, 铁死亡相关基因也发生了相应改变 (PTGS2、FTH、p53 表达升高, GPX4、SLC7A11 表达降低), TNF-α、IL-1β 等炎症因子表达增加, 而以上情况均被 Fer-1 所抑制, 说明 THP-1 细胞铁死亡诱导炎症反应。

前期研究已发现 S100A8 是 UC 炎症及 TWP 治疗的共同靶基因。S100A8 属于 S100 家族的  $\text{Ca}^{2+}$  结合蛋白, 在单核细胞、中性粒细胞等多种髓系细胞中表达<sup>[27-29]</sup>。S100A8 与 UC 关系密切, S100A8 的

异二聚体称为钙卫蛋白, 临床上是 UC 的诊断标志物<sup>[30]</sup>。最新研究发现 S100A8 敲低能改善 erastin 诱导的细胞活力下降, 降低 PTGS2 表达, 增加 GPX4 表达, 抑制细胞的过度自噬, 说明 S100A8 能调节细胞自噬依赖性铁死亡过程<sup>[31]</sup>。因此 S100A8 与铁死亡存在密切联系, 但是通过何种途径调节铁死亡仍不清楚。S100A8 在 THP-1 细胞中以内溶酶体途径分泌<sup>[32]</sup>, 与 TLR4 结合后触发炎症信号通路<sup>[33]</sup>。多项研究证实, S100A8 调控 TLR4/NF-κB 通路, 介





A-CCK-8 检测细胞活力; B- $\text{Fe}^{2+}$  水平; C-MDA 水平; D、E-ROS 荧光图片及统计分析; F、G-qRT-PCR 及 Western blotting 检测 PTGS2、FTH、p53、SLC7A11、GPX4、TLR4、NF- $\kappa$ B p65、p-NF- $\kappa$ B p65、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  mRNA 及蛋白表达; 与对照组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$ ; 与 LPS 组比较: # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$  ### $P < 0.001$ 。

A-cell viability detected by CCK-8; B- $\text{Fe}^{2+}$  level; C-MDA level; D, E-ROS fluorescence images and statistical analysis; F, G-mRNA and protein expression levels of PTGS2, FTH, p53, SLC7A11, GPX4, TLR4, NF- $\kappa$ B p65, p-NF- $\kappa$ B p65, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  detected by qRT-PCR and Western blotting; \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$  vs control group; # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$  ### $P < 0.001$  vs LPS group.

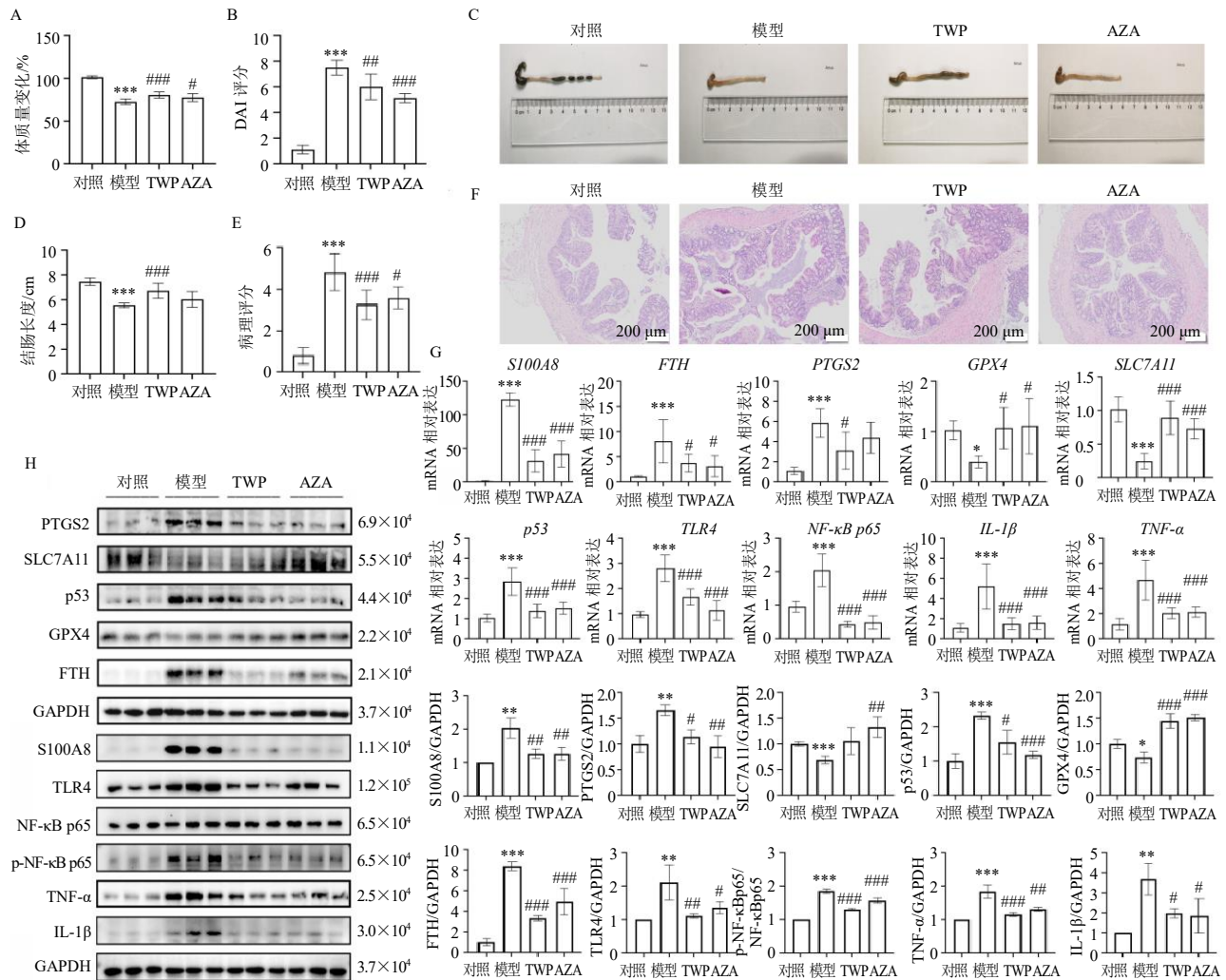
图 4 TWP 对 LPS 诱导的细胞铁死亡及炎症的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 4 Effect of TWP on LPS-induced cell ferroptosis and inflammation ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

导多种疾病<sup>[34-36]</sup>。TLR4 信号通路调节多种细胞死亡过程,也是 UC 炎症的主要通路之一。研究发现 TLR4/NF- $\kappa$ B 通路激活抑制 SLC7A11 和 GPX4 的表达,诱导铁死亡<sup>[21]</sup>,加重肠道炎症<sup>[37]</sup>,因此抑制 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路可以在细胞水平发挥抗炎和抗铁死亡的作用<sup>[21]</sup>。本研究结果表明,S100A8 敲减后增加铁死亡后的细胞活力,抑制 TLR4/NF- $\kappa$ B 通路,降低铁死亡相关指标,抑制炎症因子。进一步研究发现,DSS 诱导 S100A8-KO 小鼠后,TLR4/NF- $\kappa$ B 通路未被明显激活,铁死亡受到抑制,

最终肠道炎症反应减轻。以上结果表明,S100A8 可能通过 TLR4/NF- $\kappa$ B 通路,调控铁死亡,参与 UC 肠道炎症。

TWP 富含生物碱、二萜和三萜<sup>[38-39]</sup>等多种活性成分,具有抗炎和免疫抑制特性,在炎症和自身免疫性疾病的动物模型中调节多种炎症介质<sup>[40-43]</sup>。既往研究发现,TWP 能抑制 TLR4/NF- $\kappa$ B 通路,减少炎症因子表达,缓解肠道炎症<sup>[2]</sup>。本研究发现 TWP 干预显著降低 UC 小鼠结肠中 PTGS2、FTH、p53 表达,增加 GPX4、SLC7A11 表达。此外,TWP 对



A-小鼠体重变化; B-小鼠 DAI 评分; C、D-小鼠结肠长度典型图片及统计分析; E、F-结肠 HE 染色及病理评分; G、H-qRT-PCR 及 Western blotting 检测 PTGS2、FTH、p53、SLC7A11、GPX4、TLR4、NF-κB p65、p-NF-κB p65、TNF-α、IL-1β mRNA 及蛋白表达; 与对照组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$ ; 与模型组比较: # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$  ### $P < 0.001$ 。

A-changes in body weight of mice; B-DAI score of mice; C, D-representative images and statistical analysis of colon length in mice; E, F-HE staining and pathological scoring of colon; G, H-mRNA and protein expression levels of PTGS2, FTH, p53, SLC7A11, GPX4, TLR4, NF-κB p65, p-NF-κB p65, TNF-α, IL-1β detected by qRT-PCR and Western blotting; \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$  vs control group; # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$  ### $P < 0.001$  vs model group.

图 5 TWP 对 DSS 诱导的小鼠结肠铁死亡及炎症的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Fig. 5 Effect of TWP on ferroptosis and inflammation in colon of DSS-induced mice ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

LPS 诱导的 THP-1 细胞铁死亡有明显的抑制作用, 降低细胞内  $\text{Fe}^{2+}$ 、MDA 及 ROS 水平, 减少 PTGS2、p53、FTH 表达, 增加 GPX4、SLC7A11 表达。表明 TWP 通过抑制 S100A8/TLR4/NF-κB 通路调控 UC 铁死亡, 进而缓解肠道炎症。

综上, 铁死亡与炎症关系密切, 抑制铁死亡能减轻炎症反应。并且 S100A8 是 UC 铁死亡的重要调节因子, S100A8/TLR4/NF-κB 通路是参与铁死亡并引发肠道炎症的主要通路之一; TWP 通过调控

S100A8/TLR4/NF-κB 通路抑制铁死亡进程, 减轻 UC 肠道炎症反应。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] 钦丹萍, 王耀东, 倪桂宝, 等. 雷公藤多苷抑制炎症性肠病炎症活动的临床研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 2018, 38(7): 779-785.
- [2] 钦丹萍, 周毅骏, 孙佩娜, 等. 雷公藤多苷对溃疡性结肠炎大鼠 TLR4/MyD88 非依赖信号通路的作用研究

- [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(6): 1093-1099.
- [3] 杨强, 赵旦娅, 钦丹萍. 生物信息学及实验验证 S100A8 为溃疡性结肠炎的致炎基因 [J]. 中国免疫学杂志, 2024, 40(11): 2241-2246.
- [4] Yang J, Xiang Z J, Zhang J, *et al.* miR-24 alleviates MI/RI by blocking the S100A8/TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B pathway [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2021, 78(6): 847-857.
- [5] Vogl T, Tenbrock K, Ludwig S, *et al.* Mrp8 and Mrp14 are endogenous activators of Toll-like receptor 4, promoting lethal, endotoxin-induced shock [J]. *Nat Med*, 2007, 13(9): 1042-1049.
- [6] Lu S M, Yu C J, Liu Y H, *et al.* S100A8 contributes to postoperative cognitive dysfunction in mice undergoing tibial fracture surgery by activating the TLR4/MyD88 pathway [J]. *Brain Behav Immun*, 2015, 44: 221-234.
- [7] Pan S G, Hu Y, Hu M J, *et al.* S100A8 facilitates cholangiocarcinoma metastasis via upregulation of VEGF through TLR4/NF- $\kappa$ B pathway activation [J]. *Int J Oncol*, 2020, 56(1): 101-112.
- [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] Xue Q, Yan D, Chen X, *et al.* Copper-dependent autophagic degradation of GPX4 drives ferroptosis [J]. *Autophagy*, 2023, 19(7): 1982-1996.
- [10] 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.
- [11] Chu B, Kon N, Chen D L, *et al.* ALOX12 is required for p53-mediated tumour suppression through a distinct ferroptosis pathway [J]. *Nat Cell Biol*, 2019, 21(5): 579-591.
- [12] 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.
- [13] Wang S J, Liu W, Wang J, *et al.* Curculigoside inhibits ferroptosis in ulcerative colitis through the induction of GPX4 [J]. *Life Sci*, 2020, 259: 118356.
- [14] Huang J K, Zhang J Q, Ma J X, *et al.* Inhibiting ferroptosis: A novel approach for ulcerative colitis therapeutics [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 9678625.
- [15] 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.
- [16] Chen Y R, Zhang P, Chen W R, *et al.* Ferroptosis mediated DSS-induced ulcerative colitis associated with Nrf2/HO-1 signaling pathway [J]. *Immunol Lett*, 2020, 225: 9-15.
- [17] Kim H, Villareal L B, Liu Z L, *et al.* Transferrin receptor-mediated iron uptake promotes colon tumorigenesis [J]. *Adv Sci*, 2023, 10(10): e2207693.
- [18] Gao W H, Zhang T, Wu H. Emerging pathological engagement of ferroptosis in gut diseases [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 4246255.
- [19] Zhu K Y, Zhu X, Sun S H, *et al.* Inhibition of TLR4 prevents hippocampal hypoxic-ischemic injury by regulating ferroptosis in neonatal rats [J]. *Exp Neurol*, 2021, 345: 113828.
- [20] Chen X Q, Xu S D, Zhao C X, *et al.* Role of TLR4/NADPH oxidase 4 pathway in promoting cell death through autophagy and ferroptosis during heart failure [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 516(1): 37-43.
- [21] Chen D D, Geng Y, Deng Z W, *et al.* Inhibition of TLR4 alleviates heat stroke-induced cardiomyocyte injury by down-regulating inflammation and ferroptosis [J]. *Molecules*, 2023, 28(5): 2297.
- [22] Martin-Sanchez D, Ruiz-Andres O, Poveda J, *et al.* Ferroptosis, but not necroptosis, is important in nephrotoxic folic acid-induced AKI [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2017, 28(1): 218-229.
- [23] Proneth B, Conrad M. Ferroptosis and necroinflammation, a yet poorly explored link [J]. *Cell Death Differ*, 2019, 26(1): 14-24.
- [24] Kim E H, Wong S W, Martinez J. Programmed Necrosis and Disease: We interrupt your regular programming to bring you necroinflammation [J]. *Cell Death Differ*, 2019, 26(1): 25-40.
- [25] Peng J J, Song W T, Yao F, *et al.* Involvement of regulated necrosis in blinding diseases: Focus on necroptosis and ferroptosis [J]. *Exp Eye Res*, 2020, 191: 107922.
- [26] Mu Q D, Chen L Y, Gao X T, *et al.* The role of iron homeostasis in remodeling immune function and regulating inflammatory disease [J]. *Sci Bull*, 2021, 66(17): 1806-1816.
- [27] Wang S W, Song R, Wang Z Y, *et al.* S100A8/A9 in inflammation [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 1298.
- [28] Strupat K, Rogniaux H, Van Dorsselaer A, *et al.* Calcium-induced noncovalently linked tetramers of MRP8 and MRP14 are confirmed by electrospray ionization-mass analysis [J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2000, 11(9): 780-788.
- [29] Abtin A, Eckhart L, Gläser R, *et al.* The antimicrobial heterodimer S100A8/S100A9 (calprotectin) is upregulated by bacterial flagellin in human epidermal keratinocytes [J]. *J Invest Dermatol*, 2010, 130(10): 2423-2430.
- [30] Jukic A, Bakiri L, Wagner E F, *et al.* Calprotectin: From biomarker to biological function [J]. *Gut*, 2021, 70(10): 1978-1988.

- [31] Tao Q K, Qiu X C, Li C J, *et al.* S100A8 regulates autophagy-dependent ferroptosis in microglia after experimental subarachnoid hemorrhage [J]. *Exp Neurol*, 2022, 357: 114171.
- [32] Chakraborty P, Bjork P, Källberg E, *et al.* Vesicular location and transport of S100A8 and S100A9 proteins in monocytoid cells [J]. *PLoS One*, 2015, 10(12): e0145217.
- [33] Xia C, Braunstein Z, Toomey A C, *et al.* S100 proteins As an important regulator of macrophage inflammation [J]. *Front Immunol*, 2018, 8: 1908.
- [34] Chakraborty D, Zenker S, Rossaint J, *et al.* Alarmin S100A8 activates alveolar epithelial cells in the context of acute lung injury in a TLR4-dependent manner [J]. *Front Immunol*, 2017, 8: 1493.
- [35] Lee J S, Lee N R, Kashif A, *et al.* S100A8 and S100A9 promote apoptosis of chronic eosinophilic leukemia cells [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 1258.
- [36] Liu Y, Kong X H, You Y, *et al.* S100A8-mediated NLRP3 inflammasome-dependent pyroptosis in macrophages facilitates liver fibrosis progression [J]. *Cells*, 2022, 11(22): 3579.
- [37] Ye Y R, Jiang M Z, Hong X Y, *et al.* Quercetin alleviates deoxynivalenol-induced intestinal damage by suppressing inflammation and ferroptosis in mice [J]. *J Agric Food Chem*, 2023, 71(28): 10761-10772.
- [38] Lv H W, Jiang L P, Zhu M D, *et al.* The genus *Tripterygium*: A phytochemistry and pharmacological review [J]. *Fitoterapia*, 2019, 137: 104190.
- [39] 章欣怡, 辛贵忠, 刘建群, 等. 基于 UPLC-QTOF/MS 技术鉴定雷公藤多苷片中的化学成分 [J]. *中医药学报*, 2020, 48(9): 12-20.
- [40] Shan P N, Lu Z Y, Ye L H, *et al.* Effect of *Tripterygium wilfordii* polyglycoside on experimental prostatitis caused by *Ureaplasma urealyticum* in rats [J]. *Med Sci Monit*, 2016, 22: 3722-3726.
- [41] 崔东晓, 乐世俊, 徐顶巧, 等. 雷公藤多苷及其主要活性成分抑制类风湿性关节炎的作用机制研究进展 [J]. *中草药*, 2023, 54(20): 6913-6921.
- [42] Wang Y, Han M, Li Y T, *et al.* Efficacy and safety of *Tripterygium wilfordii* polyglycosides for diabetic kidney disease: An overview of systematic reviews and meta-analyses [J]. *Syst Rev*, 2022, 11(1): 226.
- [43] Zhang C, Ju J Y, Wu X H, *et al.* *Tripterygium wilfordii* polyglycoside ameliorated TNBS-induced colitis in rats via regulating Th17/Treg balance in intestinal mucosa [J]. *J Inflamm Res*, 2021, 14: 1243-1255.

[责任编辑 李亚楠]