

# 黄芪-葛根配伍对 T2DM 胰岛素抵抗大鼠铁死亡的影响及机制研究<sup>Δ</sup>

魏爽<sup>1\*</sup>, 郝峰<sup>2</sup>, 章文春<sup>1</sup>, 赵张旻<sup>1</sup>, 李冀<sup>3</sup>, 韩东卫<sup>3</sup>, 邢欢<sup>1#</sup>(1. 江西中医药大学中医学院, 南昌 330004; 2. 江西中医药大学临床医学院, 南昌 330004; 3. 黑龙江中医药大学基础医学院, 哈尔滨 150040)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2025)01-0057-07  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2025.01.10



**摘要** 目的 探讨黄芪-葛根配伍对 2 型糖尿病(T2DM)胰岛素抵抗(IR)大鼠肝细胞铁死亡的影响及潜在机制。方法 将雄性 SD 大鼠 60 只分为对照组(12 只)与造模组(48 只),造模组大鼠以高脂饲料连续喂养 4 周后按 25 mg/kg 的剂量一次性尾静脉注射 1% 链脲佐菌素溶液以复制 T2DM IR 大鼠模型。将造模成功的大鼠随机分为模型组、黄芪-葛根配伍组[QG 组, 4.05 g/(kg·d)灌胃]、铁死亡抑制剂 ferrostatin-1 组(Fer-1 组, 5 mg/kg 隔日 1 次腹腔注射)、黄芪-葛根配伍+铁死亡诱导剂 erastin 组[QG+erastin 组, 4.05 g/(kg·d)灌胃+erastin 10 mg/(kg·d)腹腔注射]。干预 4 周后,检测各组大鼠血清空腹血糖(FBG)、空腹胰岛素(FINS)水平,并计算稳态模型胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)和胰岛素敏感指数的自然对数(IAI);检测血清总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、天冬氨酸转氨酶(AST)、丙氨酸转氨酶(ALT)水平,血清 Fe<sup>2+</sup>及 Fe 水平,肝脏组织中谷胱甘肽(GSH)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)水平以及烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADP<sup>+</sup>)/还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)和活性氧(ROS)水平;观察其肝脏组织病理形态,检测肝脏组织谷胱甘肽过氧化物酶 4(GPX4)、铁蛋白重链 1(FTH1)、长链脂酰辅酶 A 合成酶 3(ACSL3)、ACSL4、线粒体铁蛋白(FTMT)、胱氨酸/谷氨酸反向转运蛋白(xCT)的蛋白表达情况。**结果** 与对照组比较,模型组大鼠肝脏组织内肝细胞排列紊乱、肿胀,细胞核染色加深,可见较多炎症细胞浸润,大量肝细胞空泡及脂肪变性;FBG(给药后)、TC、TG、LDL-C、AST、ALT、FINS、MDA、ROS、Fe<sup>2+</sup>、Fe 水平及 HOMA-IR、NADP<sup>+</sup>/NADPH 和 ACSL4 蛋白的表达均显著升高或上调( $P < 0.01$ );HDL-C、GSH、SOD 水平,IAI 及 GPX4、FTH1、ACSL3、FTMT、xCT 蛋白的表达均显著降低或下调( $P < 0.01$ )。与模型组比较,QG 组和 Fer-1 组大鼠肝脏组织病理损伤及上述指标水平均有不同程度改善,且大部分指标的变化差异有统计学意义( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ )。与 QG 组比较,QG+erastin 组大鼠上述指标水平的改善均被显著逆转( $P < 0.01$ )。**结论** 黄芪-葛根配伍水煎液可降低 T2DM IR 大鼠 FBG 水平,减轻其 IR 程度和肝脏组织铁负荷,缓解其肝脏组织病理损伤,上述作用与其抑制铁死亡有关。

**关键词** 黄芪;葛根;配伍;铁死亡;2 型糖尿病;胰岛素抵抗

## Effect and mechanism of compatibility of Astragali Radix-Puerariae Lobatae Radix on ferroptosis in T2DM insulin resistance rats

WEI Shuang<sup>1</sup>, HAO Feng<sup>2</sup>, ZHANG Wenchun<sup>1</sup>, ZHAO Zhangyang<sup>1</sup>, LI Ji<sup>3</sup>, HAN Dongwei<sup>3</sup>, XING Huan<sup>1</sup>  
(1. College of Traditional Chinese Medicine, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China; 2. School of Clinical Medicine, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China; 3. School of Basic Medicine, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

**ABSTRACT** **OBJECTIVE** To explore the effect and potential mechanism of the compatibility of Astragali Radix-Puerariae Lobatae Radix on ferroptosis of liver cells in type 2 diabetes mellitus (T2DM) insulin resistance (IR) rats. **METHODS** Sixty male SD rats were randomly divided into control group (12 rats) and modeling group (48 rats). The modeling group was fed with a high-fat diet for 4 consecutive weeks and then given a one-time tail vein injection of 1% streptozotocin to establish T2DM IR model. The model rats were randomly divided into model group, the compatibility of Astragali Radix-Puerariae Lobatae Radix group [QG group, 4.05 g/(kg·d), intragastric administration], ferroptosis inhibitor ferrostatin-1 group [Fer-1 group, 5 mg/kg by intraperitoneal injection, once every other day], the compatibility of Astragali Radix-Puerariae Lobatae Radix+ferroptosis inducer erastin group [QG+erastin group, 4.05 g/(kg·d) by intragastric administration+erastin 10 mg/(kg·d), intraperitoneal injection]. After 4 weeks of intervention, serum fasting blood glucose (FBG) and fasting insulin (FINS) were measured in each group of rats, and homeostasis model assessment of insulin

<sup>Δ</sup> 基金项目 国家自然科学基金项目(No. 81904090, No. 81874426);江西省自然科学基金-基础研究计划项目(No. 20242BAB-20443);江西中医药大学博士科研启动基金项目(No. 2024BSZR027)

\* 第一作者 副教授, 博士。研究方向: 方剂配伍。E-mail: 864031535@qq.com

# 通信作者 副教授, 博士。研究方向: 中医病因病机和基础。E-mail: xinghuan@jxutcm.edu.cn

resistance (HOMA-IR) and the natural logarithm of insulin action index (IAI) were calculated; the serum levels of total cholesterol (TC), triglyceride (TG), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), aspartate transaminase (AST) and alanine transaminase (ALT),  $Fe^{2+}$  and Fe content, glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD) levels, NADP<sup>+</sup>/NADPH ratio and reactive oxygen species (ROS) were determined. The pathological morphology of its liver tissue was observed; the protein expressions of glutathione peroxidase 4 (GPX4), ferritin heavy chain 1 (FTH1), long-chain acyl-CoA synthetase 3 (ACSL3), ACSL4, ferritin mitochondrial (FTMT), and cystine/glutamate antiporter (xCT) in the liver tissue of rats were detected. **RESULTS** Compared with control group, the liver cells in the model group of rats showed disordered arrangement, swelling, deepened nuclear staining, and more infiltration of inflammatory cells, as well as a large number of hepatocyte vacuoles and steatosis; FBG (after medication), the levels of TC, TG, LDL-C, AST, ALT, FINS, MDA and ROS, HOMA-IR,  $Fe^{2+}$  and Fe content, NADP<sup>+</sup>/NADPH ratio and protein expression of ACSL4 were significantly increased or up-regulated, while the levels of HDL-C, GSH and SOD, IAI, protein expressions of GPX4, FTH1, ACSL3, FTMT and xCT were significantly reduced or down-regulated ( $P < 0.01$ ). Compared with the model group, both QG group and Fer-1 group showed varying degrees of improvement in pathological damage of liver tissue and the levels of the above indicators, the differences in the changes of most indicators were statistically significant ( $P < 0.01$  or  $P < 0.05$ ). Compared with QG group, the improvement of the above indexes of QG+erastin group had been reversed significantly ( $P < 0.01$ ). **CONCLUSIONS** The compatibility decoction of Astragali Radix-Puerariae Lobatae Radix can reduce the level of FBG in T2DM IR rats, and alleviate IR degree, iron overload and pathological damage of liver tissue. The above effects are related to the inhibition of ferroptosis.

**KEYWORDS** Astragali Radix; Puerariae Lobatae Radix; compatibility; ferroptosis; type 2 diabetes mellitus; insulin resistance

2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)是一种由多种原因引起的以慢性高血糖为特点的代谢性疾病,该病具有较高的发病率,作为慢性非传染性疾病对人类健康的影响仅次于肿瘤和心血管疾病<sup>[1]</sup>。T2DM可诱发多种严重的并发症,甚至导致患者死亡<sup>[2-3]</sup>。胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)和胰岛 $\beta$ 细胞损伤为T2DM的主要病理机制。流行病学研究显示,IR作为T2DM发病的病理基础及关键环节贯穿于该病的始终<sup>[4]</sup>,因此积极改善IR是治疗T2DM的关键策略之一。

铁死亡是一种以铁依赖性的脂质过氧化物蓄积为特征的新型程序性细胞死亡方式<sup>[5]</sup>。铁过载和脂质过氧化物蓄积是铁死亡发生的启动子与介质,参与包括T2DM IR在内的多种铁过载相关疾病<sup>[6-7]</sup>。肝脏是储存铁的主要部位<sup>[8]</sup>,过量的铁参与氧化还原反应,可产生大量活性氧(reactive oxygen species, ROS),引发氧化应激、脂质过氧化和DNA损伤,从而破坏细胞膜成分,损伤肝细胞并促进细胞程序性死亡,发生铁死亡,继而降低胰岛素靶器官——肝脏对胰岛素的敏感性,诱发T2DM IR。由此可见,抑制铁死亡可能是缓解T2DM IR的有效手段。

尽管近年来适用于T2DM的化学药种类日益增多,但其存在明显的副作用(如低血糖风险、胃肠道反应、肝损害、药物依赖性及其继发性失效等),而具有多成分、多靶点、多途径特点的中药在T2DM(属消渴症范畴)治疗领域具有一定优势。黄芪-葛根配伍出自《证治汇补》之黄芪葛根汤,黄芪补气健脾、升阳举陷,葛根生津止渴,二者配伍,共奏健脾益气、生津止渴之功,临床多用于治疗消渴,疗效佳<sup>[9]</sup>。本课题组前期通过药效学研究证实,

黄芪-葛根配伍可显著减轻T2DM大鼠IR程度,降低大鼠空腹血糖(fasting blood glucose, FBG)水平,且黄芪、葛根以质量比2:1配伍时与降糖相关的主要成分分析出最多<sup>[10]</sup>。本研究通过建立T2DM IR大鼠模型,以黄芪葛根配伍水煎液、铁死亡抑制剂ferrostatin-1(Fer-1)及铁死亡诱导剂erastin为干预手段,进一步探讨黄芪-葛根配伍对T2DM IR大鼠肝组织铁死亡的影响及其潜在作用机制,以为黄芪-葛根配伍防治T2DM IR的临床应用提供科学依据。

## 1 材料

### 1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括ACCU-CHEK型血糖仪(罗氏诊断产品有限公司),BIOBASE-EL10A型自动酶标仪(山东博科生物产业有限公司),VE-180型垂直电泳槽、Tanon-5200型凝胶成像系统(上海天能科技有限公司),Mini Protean 3 Cell型电泳仪(美国Bio-Rad公司),TE77XP型电转仪(美国Hoefer公司),PCL20型全自动生化分析仪(深圳市活水床旁诊断仪器有限公司)。

### 1.2 主要药物与试剂

黄芪饮片(产地内蒙古,批号20221101)、葛根饮片(产地河南,批号20220321)均购自北京同仁堂药房;铁死亡抑制剂Fer-1、铁死亡诱导剂erastin(批号分别为132693、20230512,纯度分别为99.96%、99.75%)均购自美国MCE公司;链脲佐菌素(批号S-0130-5G)购自美国Sigma公司;高密度脂蛋白胆固醇(high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)测试盒,肝功能酶测定试剂盒[货号BC6,检测指标为丙氨酸转氨酶

(alanine transaminase, ALT)及天冬氨酸转氨酶(aspartate transaminase, AST)],空腹胰岛素(fasting insulin, FINS)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒,以及丙二醛(malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽(glutathione, GSH)试剂盒(批号分别为20230131、20230218、20230129、20230221、20230315、20230521、20221020、20221024、20220804)均购自南京建成科技有限公司;ROC试剂盒(批号MA0219)购自大连美仑生物技术有限公司;鼠源谷胱甘肽过氧化物酶4(glutathione peroxidase 4, GPX4)抗体、鼠源铁蛋白重链1(ferritin heavy chain 1, FTH1)抗体、鼠源长链脂酰辅酶A合成酶4(long-chain acyl-CoA synthetase 4, ACSL4)抗体、鼠源 $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)抗体(内参)、兔源线粒体铁蛋白(ferritin mitochondrial, FTMT)抗体、兔源胱氨酸/谷氨酸反向转运蛋白(cystine/glutamate anti-porter, xCT)抗体、兔源ACSL3抗体和辣根过氧化物酶标记的羊抗兔、羊抗鼠IgG二抗(货号分别为67763-1-Ig、68068-1-Ig、66617-1-Ig、66009-1-Ig、10727-1-AP、DF10202、20710-1-AP、SA00002-1、SA00002-2)均购自美国Proteintech公司;BCA蛋白定量试剂盒(批号20220820)购自北京兰杰柯科技有限公司;烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADP<sup>+</sup>)/还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)、Fe<sup>2+</sup>、Fe检测试剂盒(批号分别为20230531、20230521、20230531)均购自苏州格锐思生物科技有限公司。

### 1.3 实验动物与饲料

雄性SPF级SD大鼠60只,体重(160±20)g,由江西中医药大学实验动物科技中心提供,动物生产许可证号为SCXK(赣)2023-0001。大鼠架笼饲养,自然采光,实验室通风良好,温度、湿度适宜。实验饲料(普通饲料和高脂饲料)由江西中医药大学实验动物科技中心提供。本实验方案经江西中医药大学实验动物伦理委员会审核,编号为20230306030。

## 2 方法

### 2.1 实验药物及制备

依据黄芪葛根汤原方剂量、古今度量衡、2020年版《中国药典》(一部)所载黄芪参考用量及文献报道<sup>[1]</sup>,本实验参考成人日服黄芪30g、葛根15g的剂量,并依据《人和动物间按体表面积折算的等效剂量比值表》中人与大鼠体表面积换算系数(6.3),计算得到黄芪葛根配伍大鼠等效给药剂量为4.05g/(kg·d)(以生药总量计)。黄芪、葛根以质量比2:1配取后,加10倍量水,浸泡0.5h,武火快速煮沸后转文火煎煮30min,过滤;药渣按上述方法重复提取1次,过滤;合并2次滤液,蒸发浓缩,得质量浓度为0.405g/mL(以生药总量计)的黄芪-葛根水煎液,于4℃下保存,备用。

### 2.2 分组、造模与给药

取雄性SD大鼠60只,适应性饲养1周后,测量大鼠体重及FBG并据此分为对照组(12只)和造模组(48只)。造模组大鼠给予高脂饲料连续喂养4周后以25mg/kg的剂量一次性尾静脉注射1%链脲佐菌素溶液以复制T2DM IR大鼠模型;3d后,禁食、不禁水12h,检测大鼠FBG水平,若FBG≥11.7mmol/L表示T2DM IR大鼠模型复制成功<sup>[12]</sup>。对照组大鼠以基础饲料喂养4周后,一次性尾静脉注射等体积柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液。依据体重及FBG将造模成功的大鼠随机分为模型组、黄芪-葛根配伍组(QG组)、铁死亡抑制剂组(Fer-1组)、黄芪-葛根配伍+铁死亡诱导剂组(QG+erastin组),每组12只。对照组大鼠给予等体积生理盐水灌胃,自由饮水,基础饲料喂养,腹腔注射等体积生理盐水;模型组大鼠给予等体积生理盐水灌胃,自由饮水,高脂饲料喂养,腹腔注射等体积生理盐水;QG组大鼠按4.05g/(kg·d)的剂量灌胃黄芪葛根水煎液,同时以高脂饲料喂养,自由饮水,腹腔注射等体积生理盐水;Fer-1组大鼠灌胃等体积生理盐水,并腹腔注射Fer-15mg/kg<sup>[13-14]</sup>,隔日1次,同时以高脂饲料喂养,自由饮水;QG+erastin组大鼠按4.05g/(kg·d)的剂量灌胃黄芪-葛根水煎液,并腹腔注射erastin10mg/(kg·d)<sup>[15]</sup>,同时以高脂饲料喂养,自由饮水。灌胃及腹腔注射体积均为10mL/kg,连续干预4周。实验过程中共有14只大鼠死亡,其中模型组4只、QG组3只、Fer-1组2只、QG+erastin组5只。

### 2.3 大鼠一般情况观察

每天更换垫料前观察大鼠的一般状态,包括大鼠的毛色、精神状态、反应力,并记录大鼠的饮水量及尿量等。

### 2.4 大鼠血清、组织采集与留存

末次干预结束后,禁食、不禁水12h,麻醉大鼠,于腹主动脉取血。血样静置后于4℃下以3000r/min离心10min,分离血清,于-20℃下保存,备用。取血后,迅速打开大鼠腹腔,充分暴露肝脏组织,快速取出,剪取相同部位肝脏组织,洗净,吸干。一部分肝脏组织固定于多聚甲醛溶液中,待后续行苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色;剩余肝脏组织于-80℃下冻存,用于后续相关指标及蛋白检测。

### 2.5 大鼠FBG及生化指标检测

药物干预前及干预后使用血糖仪对各组大鼠尾尖采血,检测FBG水平;取“2.4”项下各组大鼠的血清样品,严格按照相应试剂盒说明书方法操作,使用微板法检测各组大鼠血清中TC、TG、HDL-C、LDL-C水平,使用全自动生化分析仪检测AST、ALT水平。

## 2.6 大鼠FINS及IR相关指标检测

取“2.4”项下各组大鼠的血清样品,按照相应试剂盒说明书要求,采用ELISA法检测血清中FINS水平,并按下式计算稳态模型胰岛素抵抗指数(homeostasis model assessment of insulin resistance, HOMA-IR)和胰岛素敏感性指数(insulin sensitivity index, ISI): $HOMA-IR = FBG \times FINS / 22.5^{[6]}$ ;  $ISI = 1 / (FBG \times FINS)$ [因ISI值为非正态分布,故以其计算结果的自然对数(insulin action index, IAI)表示并分析]<sup>[17]</sup>。

## 2.7 大鼠肝脏组织中脂质过氧化、内源性抗氧化活性指标及Fe<sup>2+</sup>、Fe水平检测

取“2.4”项下各组大鼠冻存的肝脏组织样品,按照相应试剂盒说明书要求,以羟胺法检测各组大鼠肝脏组织中SOD、MDA水平,以比色法检测GSH水平,以亚铁嗉比色法检测Fe<sup>2+</sup>、Fe水平,以微板法检测NADP<sup>+</sup>/NADPH水平,使用流式细胞仪检测大鼠ROS水平。

## 2.8 大鼠肝脏组织病理形态学观察

取“2.4”项下各组大鼠经固定(48 h)的肝脏组织,用水冲洗,经乙醇脱水后,包埋、切片;取切片,进行HE染色后,脱水封片,使用显微镜观察大鼠肝脏组织病理形态并拍照<sup>[18]</sup>。

## 2.9 大鼠肝脏组织铁死亡相关蛋白表达水平检测

采用Western blot法检测。取“2.4”项下各组大鼠冻存的肝脏组织样品,提取总蛋白后,以BCA法测定蛋白浓度,并将蛋白煮沸变性;配制分离胶、上样、电泳、转膜、洗膜、封闭;分别加入GPX4、FTH1、ACSL3、ACSL4、FTMT、xCT一抗(稀释度均为1:2 000)及内参β-actin一抗(稀释度为1:10 000),4℃孵育过夜;洗膜、加入相应二抗(稀释度均为1:10 000),于室温下孵育60 min;以TBST洗膜,加入ECL化学发光试剂进行显色,置于凝胶成像系统成像,采用Image J软件进行灰度值检测和数据分析,以目的蛋白与内参β-actin的灰度值比值表示目的蛋白的表达水平。

## 2.10 统计学方法

使用SPSS 25.0软件对数据进行统计分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析,进一步两两比较使用LSD-*t*检验。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

## 3 结果

### 3.1 各组大鼠一般情况比较

对照组大鼠反应灵敏、活跃,毛发柔顺光泽,日排尿量、饮水量均正常;与对照组比较,模型组大鼠精神状态欠佳,消瘦,毛发干枯晦暗,部分见脱毛、尾部溃烂症状,反应迟缓,活动减少,喜聚群,日排尿量、饮水量均显著增加( $P < 0.05$ )。与模型组比较,各给药组大鼠上述表现均有不同程度减轻,日排尿量、饮水量均显著降低( $P < 0.05$ )。

### 3.2 各组大鼠FBG及生化指标比较

给药前,与对照组比较,其余各组大鼠FBG水平均显著升高( $P < 0.01$ )。给药后,与对照组比较,模型组大鼠FBG、TC、TG、LDL-C、AST、ALT水平均显著升高,HDL-C水平显著降低( $P < 0.01$ )。与模型组比较,QG组和Fer-1组大鼠FBG、TC、TG、LDL-C、ALT水平均显著降低,HDL-C水平均显著升高( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ),QG组AST水平显著降低( $P < 0.05$ )。与QG组比较,QG+erastin组大鼠FBG、ALT、AST、TC、TG、LDL-C水平均显著升高,HDL-C水平显著降低( $P < 0.01$ )。结果见表1。

### 3.3 各组大鼠FINS及IR相关指标比较

与对照组比较,模型组大鼠FINS水平、HOMA-IR均显著升高,IAI显著降低( $P < 0.01$ )。与模型组比较,QG组和Fer-1组大鼠FINS水平、HOMA-IR均显著降低,IAI均显著升高( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。与QG组比较,QG+erastin组大鼠FINS水平、HOMA-IR均显著升高,IAI显著降低( $P < 0.01$ )。结果见表2。

### 3.4 各组大鼠脂质过氧化、内源性抗氧化活性指标及Fe<sup>2+</sup>、Fe水平比较

与对照组比较,模型组大鼠GSH、SOD水平均显著降低,MDA、ROS、Fe<sup>2+</sup>、Fe水平和NADP<sup>+</sup>/NADPH均显著升高( $P < 0.01$ )。与模型组比较,QG组与Fer-1组大鼠GSH、SOD水平均显著升高,MDA、ROS、Fe<sup>2+</sup>、Fe水平和NADPH/NADP<sup>+</sup>均显著降低( $P < 0.01$ )。与QG组比较,QG+erastin组大鼠GSH、SOD水平均显著降低,MDA、ROS、Fe<sup>2+</sup>、Fe水平和NADP<sup>+</sup>/NADPH均显著升高( $P < 0.01$ )。结果见表3。

表1 各组大鼠FBG、AST、ALT、TC、TG、LDL-C、HDL-C水平比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	FBG/(mmol/L)		TC/(mmol/L)	TG/(mmol/L)	LDL-C/(mmol/L)	HDL-C/(mmol/L)	AST/(U/L)	ALT/(U/L)
		给药前	给药后						
对照组	12	5.18 ± 0.21	5.03 ± 0.69	1.56 ± 0.10	0.54 ± 0.12	0.67 ± 0.06	2.54 ± 0.12	50.54 ± 5.45	36.42 ± 10.82
模型组	8	22.68 ± 4.29 <sup>a</sup>	23.63 ± 4.23 <sup>a</sup>	3.22 ± 0.28 <sup>a</sup>	2.27 ± 0.25 <sup>a</sup>	1.49 ± 0.20 <sup>a</sup>	1.07 ± 0.16 <sup>a</sup>	142.84 ± 18.15 <sup>a</sup>	156.93 ± 16.97 <sup>a</sup>
QG组	9	23.23 ± 4.82 <sup>a</sup>	12.88 ± 2.80 <sup>b</sup>	2.20 ± 0.17 <sup>b</sup>	1.31 ± 0.15 <sup>b</sup>	0.99 ± 0.14 <sup>b</sup>	2.00 ± 0.06 <sup>b</sup>	86.12 ± 14.21 <sup>c</sup>	74.37 ± 14.98 <sup>b</sup>
Fer-1组	10	23.31 ± 2.25 <sup>a</sup>	12.72 ± 2.55 <sup>b</sup>	2.17 ± 0.29 <sup>b</sup>	1.30 ± 0.11 <sup>b</sup>	1.00 ± 0.06 <sup>b</sup>	1.97 ± 0.11 <sup>b</sup>	116.01 ± 9.91	107.04 ± 9.28 <sup>b</sup>
QG+erastin组	7	23.60 ± 3.50 <sup>a</sup>	23.54 ± 2.83 <sup>a</sup>	3.38 ± 0.33 <sup>a</sup>	2.76 ± 0.40 <sup>a</sup>	1.46 ± 0.17 <sup>a</sup>	1.09 ± 0.20 <sup>a</sup>	158.65 ± 28.11 <sup>d</sup>	163.36 ± 8.16 <sup>a</sup>

a:与对照组比较, $P < 0.01$ ;b:与模型组比较, $P < 0.01$ ;c:与模型组比较, $P < 0.05$ ;d:与QG组比较, $P < 0.01$ 。

表2 各组大鼠FINS水平和HOMA-IR、IAI比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	FINS/(mIU/L)	HOMA-IR	IAI
对照组	12	10.60±0.88	2.30±0.15	-3.94±0.06
模型组	8	17.12±2.04 <sup>a</sup>	16.75±3.95 <sup>a</sup>	-5.91±0.22 <sup>a</sup>
QG组	9	12.51±1.53 <sup>b</sup>	7.34±2.26 <sup>c</sup>	-4.01±0.54 <sup>c</sup>
Fer-1组	10	12.11±1.28 <sup>b</sup>	6.26±2.38 <sup>c</sup>	-4.04±0.41 <sup>c</sup>
QG+erastin组	7	17.86±1.27 <sup>d</sup>	17.05±2.47 <sup>d</sup>	-5.94±0.16 <sup>d</sup>

a: 与对照组比较,  $P < 0.01$ ; b: 与模型组比较,  $P < 0.05$ ; c: 与模型组比较,  $P < 0.01$ ; d: 与QG组比较,  $P < 0.01$ 。

### 3.5 各组大鼠肝脏组织病理学比较

对照组大鼠肝脏组织内细胞形态正常, 细胞排列整齐, 肝小叶结构清晰, 未见明显炎症细胞浸润、肝细胞空泡和脂肪变性, 胞质含粉红色嗜酸性颗粒。与对照组比较, 模型组大鼠肝脏组织内肝细胞排列紊乱、肿胀, 细胞核染色加深, 可见较多炎症细胞浸润和大量肝细胞空泡、脂肪变性。与模型组比较, QG组与Fer-1组大鼠肝脏组织的病理损伤均有不同程度改善。与QG组比较, QG+erastin组大鼠肝脏组织的病理损伤未见明显改善, 且肝细胞肿胀严重, 可见较多炎症细胞浸润和大量肝细胞空泡、脂肪变性。结果见图1。

### 3.6 各组大鼠肝脏组织中Fe死亡相关蛋白表达比较

与对照组比较, 模型组大鼠肝脏组织中GPX4、FTH1、FTMT、xCT、ACSL3T蛋白表达均显著下调, ACSL4蛋白表达显著上调( $P < 0.01$ )。与模型组比较, QG组和Fer-1组大鼠肝脏组织中GPX4、FTH1、FTMT、xCT、ACSL3蛋白表达均显著上调, ACSL4蛋白表达均显著下调( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。与QG组比较, QG+erastin组大鼠肝脏组织中GPX4、FTH1、FTMT、xCT、ACSL3蛋白表达均显著下调, ACSL4蛋白表达显著上调( $P < 0.01$ )。结果见表4、图2。

## 4 讨论

目前, 我国现有糖尿病患者数量居世界首位, 且全世界每年因该病及其并发症死亡的人数居高不下<sup>[1]</sup>, 其中90%以上为T2DM患者<sup>[19]</sup>。在T2DM胰岛β细胞功能障碍和IR这两大主要病理表现中, IR是关键环节之一, 参与了T2DM的发生, 并贯穿整个病程。有学者提出,

治疗T2DM时, 若仅改善胰岛β细胞功能而未对IR进行干预则效果欠佳<sup>[2]</sup>。可见, 积极改善IR是治疗T2DM的关键策略, 具有重要的临床意义。

T2DM及IR属中医学“消渴”范畴, 脾气虚乃消渴发生的内在因素, 健脾益气升阳为主要治法<sup>[20]</sup>。黄芪与葛根配伍, 辛甘而温, 有健脾益气、升清止渴之功, 可用于属“消渴”范畴之T2DM及IR。本研究结果显示, 黄芪-葛根配伍可显著降低T2DM IR大鼠血清FBG、TC、TG、LDL-C、AST、ALT、FINS水平及HOMA-IR, 升高HDL-C水平和IAI, 表明该配伍确有降血糖、减轻IR、治疗T2DM之功效。

以铁过载及脂质过氧化物蓄积为特征的铁死亡可诱发包括T2DM及IR在内的大量疾病<sup>[21]</sup>, 而胰岛素靶器官肝脏是最有可能被铁过载累及的器官之一<sup>[8]</sup>。研究指出, 抑制肝细胞铁死亡的发生可能是缓解和治疗T2DM IR的有效手段。铁水平是铁死亡发生的重要条件, 且在机体铁稳态中, FTH1具有重要的铁储存作用, 当该蛋白表达减少, 可使细胞内Fe<sup>2+</sup>水平上升, 诱发芬顿反应, 使ROS大量蓄积, 从而促进氧化应激发生<sup>[22]</sup>; ACSL4是铁死亡过程中的必需因子, 其表达产物在灭活GPX4、促进铁死亡的进展中扮演着重要角色<sup>[6]</sup>; 多不饱和脂肪酸可促进铁死亡, ACSL3可将单不饱和脂肪酸催化为单不饱和脂肪酸乙酰辅酶A, 进而与多不饱和脂肪酸拮抗脂质过氧化的不良效应; NADP<sup>+</sup>/NADPH可反映肝脏组织脂质过氧化水平; GPX4具有抑制脂质过氧化、清除脂质过氧化物、维持细胞内氧化还原稳态的作用, 其表达下调通常被认为是铁死亡发生的关键; xCT在GSH的合成、细胞内GSH含量的维持、抑制细胞氧化应激损伤方面具有重要作用, 是细胞抵抗铁死亡的重要因素<sup>[23-24]</sup>; FTMT在维持细胞铁稳态和防止ROS生成的过程中起着重要作用, 可通过减少细胞氧化应激和ROS使线粒体铁依赖性氧化损伤减少<sup>[25]</sup>, 在保护线粒体免受铁过量引起的铁死亡损伤方面发挥重要作用<sup>[26]</sup>。本研究结果显示, 与对照组比较, 模型组大鼠肝脏组织中FTH1蛋白的表达显

表3 各组大鼠GSH、SOD、MDA、ROS、Fe<sup>2+</sup>、Fe水平和NADP<sup>+</sup>/NADPH比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	GSH/(μmol/g)	SOD/(U/mg)	MDA/(nmol/mg)	ROS	Fe <sup>2+</sup> /(nmol/g)	Fe/(nmol/g)	NADP <sup>+</sup> /NADPH
对照组	12	5.57±0.21	68.51±4.10	1.00±0.14	127 236.33±2 605.27	552.36±19.57	327.06±8.546	2.64±0.16
模型组	8	3.09±0.16 <sup>c</sup>	43.68±1.72 <sup>a</sup>	2.16±0.15 <sup>a</sup>	296 324.67±3 794.73 <sup>a</sup>	739.57±17.19 <sup>a</sup>	529.47±13.39 <sup>a</sup>	3.93±0.61 <sup>a</sup>
QG组	9	4.24±0.31 <sup>b</sup>	58.55±4.69 <sup>b</sup>	1.52±0.11 <sup>b</sup>	149 370.83±6 101.37 <sup>b</sup>	646.92±26.94 <sup>b</sup>	445.61±21.56 <sup>b</sup>	2.76±0.34 <sup>b</sup>
Fer-1组	10	4.12±0.04 <sup>b</sup>	54.25±1.50 <sup>b</sup>	1.60±0.07 <sup>b</sup>	140 719.00±5 288.32 <sup>b</sup>	653.79±19.61 <sup>b</sup>	471.54±27.41 <sup>b</sup>	2.77±0.31 <sup>b</sup>
QG+erastin组	7	2.92±0.11 <sup>c</sup>	40.68±2.11 <sup>c</sup>	2.10±0.09 <sup>c</sup>	250 652.83±17 694.73 <sup>c</sup>	735.46±19.15 <sup>c</sup>	527.04±21.76 <sup>c</sup>	3.79±0.26 <sup>c</sup>

a: 与对照组比较,  $P < 0.01$ ; b: 与模型组比较,  $P < 0.01$ ; c: 与QG组比较,  $P < 0.01$ 。

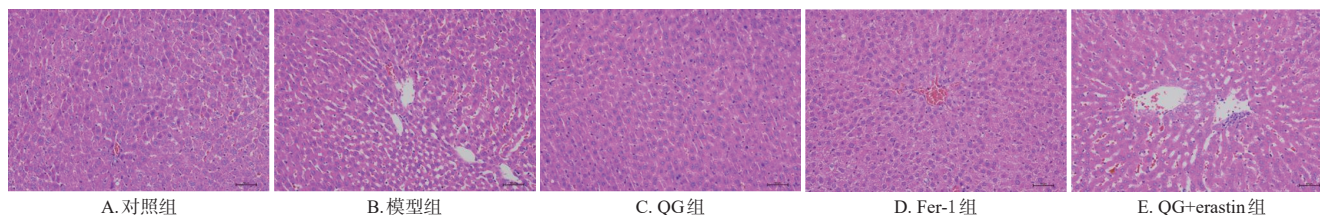
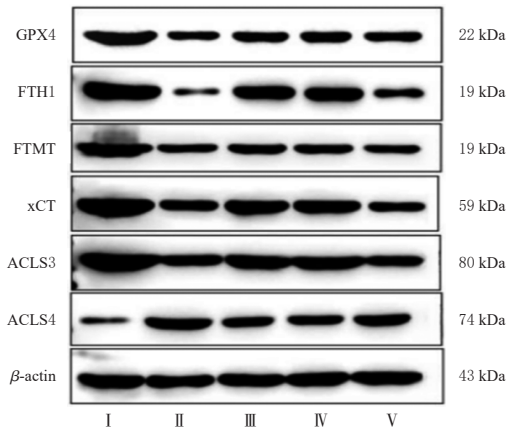


图1 各组大鼠肝脏组织病理学显微图(HE染色, ×200)

表4 各组大鼠肝脏组织中GPX4、FTH1、FTMT、xCT、ACSL3、ACSL4蛋白表达比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	GPX4/	FTH1/	FTMT/	xCT/	ACSL3/	ACSL4/
		$\beta$ -actin	$\beta$ -actin	$\beta$ -actin	$\beta$ -actin	$\beta$ -actin	$\beta$ -actin
对照组	12	1.20±0.16	1.16±0.02	1.17±0.06	1.25±0.15	1.29±0.05	0.26±0.10
模型组	8	0.48±0.02 <sup>a</sup>	0.35±0.16 <sup>a</sup>	0.31±0.11 <sup>a</sup>	0.54±0.05 <sup>a</sup>	0.46±0.06 <sup>a</sup>	1.10±0.05 <sup>a</sup>
QG组	9	0.82±0.09 <sup>b</sup>	0.73±0.04 <sup>b</sup>	0.73±0.09 <sup>b</sup>	0.75±0.09 <sup>b</sup>	0.76±0.07 <sup>b</sup>	0.57±0.08 <sup>b</sup>
Fer-1组	10	0.84±0.06 <sup>b</sup>	0.75±0.05 <sup>b</sup>	0.68±0.18 <sup>b</sup>	0.71±0.06 <sup>b</sup>	0.80±0.02 <sup>b</sup>	0.52±0.04 <sup>b</sup>
QG+erastin组	7	0.57±0.11 <sup>d</sup>	0.33±0.09 <sup>d</sup>	0.32±0.12 <sup>d</sup>	0.43±0.05 <sup>d</sup>	0.37±0.05 <sup>d</sup>	0.97±0.15 <sup>d</sup>

a:与对照组比较, $P<0.01$ ;b:与模型组比较, $P<0.01$ ;c:与模型组比较, $P<0.05$ ;d:与QG组比较, $P<0.01$ 。



I:对照组;II:模型组;III:QG组;IV:Fer-1组;V:QG+erastin组。

图2 各组大鼠肝脏组织中铁死亡相关蛋白表达电泳图

著降低,血清 $Fe^{2+}$ 及Fe水平均显著升高,提示模型组大鼠肝组织中出现明显的铁过载;经黄芪-葛根配伍水煎液或Fer-1干预后,大鼠肝脏组织中FTH1蛋白的表达上调,血清 $Fe^{2+}$ 及Fe水平均显著降低,说明黄芪-葛根配伍可有效缓解T2DM IR大鼠肝组织中的铁负荷。本研究结果还显示,与对照组比较,模型组大鼠肝脏组织中ROS、MDA、ACSL4的表达及 $NADP^+/NADPH$ 均显著升高,GSH、SOD及ACSL3表达显著降低,提示模型组大鼠肝脏组织氧化应激反应增强,存在较高水平的脂质过氧化和明显的氧化损伤;经黄芪-葛根配伍水煎液或Fer-1干预后,大鼠肝脏组织中ROS、MDA、ACSL4的表达及 $NADP^+/NADPH$ 均显著降低,SOD、GSH及ACSL3的表达均显著升高,提示黄芪-葛根配伍水煎液可有效减轻T2DM IR大鼠氧化应激损伤,拮抗脂质过氧化及出现的不良效应。此外,本研究结果还显示,与对照组大鼠比较,模型组大鼠肝脏组织中GPX4、xCT、FTMT的表达均显著降低,提示模型组大鼠发生铁死亡;经黄芪-葛根配伍水煎液或Fer-1干预后,GPX4、xCT、FTMT表达显著升高,提示黄芪-葛根配伍水煎液可抑制T2DM IR大鼠体内铁死亡的发生。为了进一步验证铁死亡在黄芪-葛根配伍水煎液改善T2DM大鼠IR中的作用,本研究在黄芪-葛根配伍水煎液的基础上加用了铁死亡激活剂erastin,结果显示,erastin可显著逆转该水煎液对T2DM IR大鼠各定量指标的改善作用,提示其改善T2DM IR的作用可能是通过抑制铁死亡实现的。

综上所述,黄芪-葛根配伍水煎液可降低T2DM IR大鼠的FBG水平,减轻其IR程度和肝脏组织铁负荷,缓解大鼠肝脏组织病理损伤,上述作用与其抑制铁死亡有关。但本研究并未通过体外实验以进一步证实铁死亡与肝脏组织损伤之间的具体联系,尚待进一步探索,以明确其作用机制。

### 参考文献

- [1] NIU J M, XU G Y, JIANG S, et al. *In vitro* antioxidant activities and anti-diabetic effect of a polysaccharide from *Schisandra sphenanthera* in rats with type 2 diabetes[J]. *Int J Biol Macromol*, 2017, 94(Pt A): 154-160.
- [2] AZMI S, PETROPOULOS I N, FERDOUSI M, et al. An update on the diagnosis and treatment of diabetic somatic and autonomic neuropathy[J]. *F1000Res*, 2019, 8: 186.
- [3] 张洪敏, 曹世杰, 邱峰, 等. 葛根和葛根素治疗糖尿病及并发症的研究进展[J]. *天津中医药大学学报*, 2019, 38(6): 607-615.
- [4] ZHANG H M, CAO S J, QIU F, et al. Research progress on treatment of diabetes mellitus and complications by *Puerariae Lobata Radix* and *Puerarin*[J]. *J Tianjin Univ Tradit Chin Med*, 2019, 38(6): 607-615.
- [5] ATEFI M, PISHDAD G R, FAGHIH S. The effects of canola and olive oils on insulin resistance, inflammation and oxidative stress in women with type 2 diabetes: a randomized and controlled trial[J]. *J Diabetes Metab Disord*, 2018, 17(2): 85-91.
- [6] 杨红, 任鹏艳, 陈永鑫, 等. 1,8-桉叶油素对2型糖尿病胰岛 $\beta$ 细胞铁死亡的干预作用及机制[J]. *中国药房*, 2024, 35(3): 290-295.
- [7] YANG H, REN P Y, CHEN Y X, et al. Interventional effect and mechanism of 1, 8-cineole on pancreatic  $\beta$  cell ferroptosis induced by type 2 diabetes[J]. *China Pharm*, 2024, 35(3): 290-295.
- [8] STRZYZ P. Iron expulsion by exosomes drives ferroptosis resistance[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21(1): 4-5.
- [9] 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.
- [10] GAMMELLA E, RECALCATI S, RYBINSKA I, et al. Iron-induced damage in cardiomyopathy: oxidative-dependent and independent mechanisms[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2015, 2015: 230182.
- [11] 王凌, 刘海英, 刘芳洁. 黄芪葛根汤治疗老年糖尿病疗效观察及对胰岛素抵抗的影响[J]. *新中医*, 2019, 51(9): 118-121.
- [12] WANG L, LIU H Y, LIU F J. Observation of Huangqi gegen decoction for senile diabetes and its effect on insulin resistance[J]. *New Chin Med*, 2019, 51(9): 118-121.
- [13] 魏爽, 李冀, 韩东卫, 等. 基于网络药理学探讨黄芪-葛根药对对T2DM模型大鼠PI3K/Akt/FoxO1信号通路的调

- 节作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(5): 157-168.
- WEI S, LI J, HAN D W, et al. Regulatory effect of herbal pair *Astragali Radix*-*Puerariae Lobatae Radix* on PI3K/Akt/FoxO1 signaling pathway in rats with T2DM based on network pharmacology[J]. *Chin J Exp Tradit Med Formulae*, 2022, 28(5): 157-168.
- [11] 吕忠宽, 刘昱昭, 吴镇, 等. 不同剂量黄芪对糖尿病大鼠肾脏氧化应激的抑制作用[J]. 上海中医药杂志, 2015, 49(10): 68-71.
- LYU Z K, LIU Y Z, WU Z, et al. Inhibitory effects of different doses of *Astragalus membranaceus* on oxidative stress in the kidneys of diabetic rats[J]. *Shanghai J Tradit Chin Med*, 2015, 49(10): 68-71.
- [12] 李雨庭. 黄连温胆汤中黄连最佳剂量对T2DM大鼠肝脏脂代谢PPARa-LXRa-ABCA1信号通路的影响[D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2018.
- LI Y T. The mechanism of the optimal dose of Huanglian in Huanglian wendan decoction through the liver lipid metabolism signal pathway PPARa-LXRa-ABCA1 in T2DM rats[D]. Harbin: Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, 2018.
- [13] HAN P, WANG X, ZHOU T Q, et al. Inhibition of ferroptosis attenuates oligospermia in male Nrf2 knockout mice [J]. *Free Radic Biol Med*, 2022, 193(Pt 1): 421-429.
- [14] 张崧, 刘雪琪, 姜玲, 等. 肌肽对链脉佐菌素诱导的糖尿病小鼠肾脏铁死亡和炎症的影响[J]. 安徽医科大学学报, 2023, 58(8): 1322-1328.
- ZHANG S, LIU X Q, JIANG L, et al. Effects of carnosine on ferroptosis and inflammatory responses in STZ-induced diabetic mice[J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2023, 58(8): 1322-1328.
- [15] HUO H, ZHOU Z, QIN J, et al. Erastin disrupts mitochondrial permeability transition pore (mPTP) and induces apoptotic death of colorectal cancer cells[J]. *PLoS One*, 2016, 11(5): e0154605.
- [16] MATTHEWS D R, HOSKER J P, RUDENSKI A S, et al. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man[J]. *Diabetologia*, 1985, 28(7): 412-419.
- [17] 周吉好, 刘东海. 对《检测人群胰岛素敏感性的一项新指数》一文的商榷及原文作者答复[J]. 中华内科杂志, 1995, 34(9): 644-645.
- ZHOU J H, LIU D H. Discussion on the article *A New Index for Detecting Population Insulin Sensitivity* and the author's response to the original text[J]. *Chin J Int Med*, 1995, 34(9): 644-645.
- [18] 安冬, 梁永林, 高艳奎, 等. 大黄糖络丸对2型糖尿病大鼠肝损伤的影响及机制[J]. 中国临床药理学杂志, 2024, 40(9): 1282-1286.
- AN D, LIANG Y L, GAO Y K, et al. Effects and mechanism of rhubarb Tangluo pill on liver injury in type 2 diabetic rats[J]. *Chin J Clin Pharmacol*, 2024, 40(9): 1282-1286.
- [19] 杨春, 刘仲栋, 宋轶, 等. 中医药调节肠道菌群干预2型糖尿病的研究进展[J]. 山西中医药大学学报, 2021, 22(4): 298-301.
- YANG C, LIU Z D, SONG Y, et al. Research progress of traditional Chinese medicine regulating intestinal flora in prevention of type 2 diabetes[J]. *J Shanxi Univ Chin Med*, 2021, 22(4): 298-301.
- [20] 姜立娟. 经典名方玉液汤通过PI3K/AKT信号途径改善2型糖尿病胰岛素抵抗的作用及机制研究[D]. 长春: 长春中医药大学, 2021.
- JIANG L J. Study on the effect and mechanism of Yuye decoction on insulin resistance of type 2 diabetes mellitus through PI3K/AKT signaling pathway[D]. Changchun: Changchun University of Chinese Medicine, 2021.
- [21] 牛书妍. 运动预防胰岛素抵抗形成中对骨骼肌线粒体自噬信号通路PINK1/Parkin的影响研究[D]. 上海: 上海师范大学, 2022.
- NIU S Y. Study on the effect of exercise on the skeletal muscle mitochondrial autophagy signaling pathway PINK1/Parkin in preventing insulin resistance formation [D]. Shanghai: Shanghai Normal University, 2022.
- [22] ASPERTI M, BELLINI S, GRILLO E, et al. H-ferritin suppression and pronounced mitochondrial respiration make hepatocellular carcinoma cells sensitive to RSL3-induced ferroptosis[J]. *Free Radic Biol Med*, 2021, 169: 294-303.
- [23] ZOU Y L, PALTE M J, DEIK A A, et al. A GPX4-dependent cancer cell state underlies the clear-cell morphology and confers sensitivity to ferroptosis[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 1617.
- [24] 张嘉诚, 董可帅, 余佳, 等. SHC4对erastin诱导肝癌细胞铁死亡的调控作用及机制[J]. 武汉大学学报(医学版), 2024, 45(2): 180-184.
- ZHANG J C, DONG K S, YU J, et al. Regulatory effect and mechanism of SHC4 on erastin-induced ferroptosis in hepatocellular carcinoma cells[J]. *Med J Wuhan Univ*, 2024, 45(2): 180-184.
- [25] WANG P N, CUI Y M, REN Q Q, et al. Mitochondrial ferritin attenuates cerebral ischaemia/reperfusion injury by inhibiting ferroptosis[J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(5): 447.
- [26] 常宇宸, 李京波. 心肌梗死中铁死亡标志物研究进展[J]. 诊断学理论与实践, 2023, 22(2): 197-202.
- CHANG Y C, LI J B. Advances in biological markers of ferroptosis in myocardial infarction[J]. *J Diagn Concepts Pract*, 2023, 22(2): 197-202.

(收稿日期: 2024-02-29 修回日期: 2024-11-12)

(编辑: 舒安琴)