

基于 NRF2/SLC7A11/GPX4 通路探讨白芍总苷调控铁死亡改善 2 型糖尿病大鼠肝损伤的作用及机制

王文佳¹,葛文¹,韩慧子¹,柯尊丽¹,田维毅^{1,2*},俞琦^{1,3*}

¹贵州中医药大学基础医学院,贵阳 550025;

²贵阳康养职业大学,贵阳 550081;³贵州护理职业技术学院,黔南布依族苗族自治州 551304

摘要:探讨白芍总苷(total glucosides from *Paeoniae Radix Alba*, TGP)调控核因子 E2 相关因子 2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2, NRF2)/溶质载体家族 7 成员 11(solute carrier family 7 member 11, SLC7A11)/谷胱甘肽过氧化物酶 4(glutathione peroxidase 4, GPX4)通路抑制肝细胞铁死亡改善 2 型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)大鼠肝损伤的作用及机制。采用 T2DM 模型大鼠为实验对象,将其随机分为模型组、二甲双胍组、TGP(50 mg/kg)组、TGP(100 mg/kg)组和 TGP(200 mg/kg)组,另设对照组,用药物或蒸馏水灌胃干预 4 周。检测空腹血糖(fasting blood glucose, FBG);计算肝脏指数;采用生化法检测谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)、甘油三酯(triglyceride, TG)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、低密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C);组织病理学评价肝损伤;比色法检测超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、谷胱甘肽(glutathione, GSH)和 Fe^{2+} ;Western blot 检测转铁蛋白受体 1(transferrin receptor 1, TFR1)、铁转运蛋白 1(ferroportin 1, FPN1)、NRF2、SLC7A11 和 GPX4 蛋白;RT-qPCR 检测相关基因表达。结果表明,与对照组比较,模型组大鼠 FBG、肝脏指数、ALT、AST、TG、TC、LDL-C 及 MDA 水平均显著升高($P < 0.01$),HDL-C、SOD 和 GSH 显著降低($P < 0.01$);肝脏组织出现脂质沉积及脂毒性炎症损伤;肝脏 Fe^{2+} 含量和 TFR1 表达升高($P < 0.01$),FPN1、NRF2、SLC7A11 和 GPX4 蛋白明显下调($P < 0.01$),*NRF2*、*SLC7A11*、*GPX4* mRNA 表达水平显著降低($P < 0.01$)。与模型组相比,TGP 高剂量能明显降低模型大鼠 FBG 水平($P < 0.05$);TGP 中、高剂量组大鼠肝脏指数、ALT、AST、TG、TC 和 LDL-C 水平均明显下降($P < 0.05$, $P < 0.01$),HDL-C 显著升高($P < 0.01$),肝脏病理损伤和脂肪变性不同程度减轻,MDA 表达明显下降($P < 0.01$),SOD 和 GSH 表达显著上升($P < 0.01$),NRF2、SLC7A11、GPX4 蛋白水平明显升高($P < 0.01$),TGP 高剂量能显著上调 *NRF2*、*SLC7A11* 和 *GPX4* 的 mRNA 表达($P < 0.01$);TGP 各剂量组 Fe^{2+} 含量均显著下降($P < 0.01$),FPN1 表达均显著升高($P < 0.01$),中、高剂量组 TFR1 显著下降($P < 0.01$)。TGP 具有改善 2 型糖尿病大鼠血糖水平及肝损伤作用,其机制可能与其激活肝脏 NRF2/SLC7A11/GPX4 通路抑制铁死亡有关。

关键词:白芍总苷;脂质过氧化;糖尿病肝损伤;NRF2/SLC7A11/GPX4 通路;铁死亡

中图分类号:R285.5

文献标志码:A

文章编号:1001-6880(2026)9-1881-10

DOI:10.16333/j.1001-6880.2026.9.002

CSTR:32307.14.1001-6880.2026.9.002

Total glucosides from *Paeoniae Radix Alba* ameliorate liver injury in type 2 diabetic rats by inhibiting ferroptosis via the NRF2/SLC7A11/GPX4 signaling pathway

WANG Wen-jia¹, GE Wen¹, HAN Hui-zi¹, KE Zun-li¹, TIAN Wei-yi^{1,2*}, YU Qi^{1,3*}

¹School of Basic Medical Sciences, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China; ²Guiyang Nursing Vocational University, Guiyang 550081, China;

³Guizhou Nursing Vocational College, Qiannan Buyi and Miao Autonomous Prefecture 551304, China

收稿日期:2026-02-02 接受日期:2026-05-28

基金项目:国家自然科学基金(82460858);贵州省科技计划项目(黔科合平台 KXJZ[2024]034);贵州中医药大学国家与省级科技创新人才团队培育项目(贵中医 TD 合字[2023]002 号)

* 通信作者 Tel:86-851-88308015; E-mail: tianweiyi@gzy.edu.cn, yuqi103@gzy.edu.cn

Abstract: This study aimed to investigate the protective effect of total glucosides from *Paeoniae Radix Alba* (TGP) against liver injury in rats with type 2 diabetes mellitus (T2DM) by regulating of the nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2)/solute carrier family 7 member 11 (SLC7A11)/glutathione peroxidase 4 (GPX4) signaling pathway to inhibit hepatocyte ferroptosis. Using T2DM model rats as experimental subjects, and the animals were randomly divided into control group, model group, metformin group, and TGP (50, 100, and 200 mg/kg) groups. They were treated with the corresponding drugs or distilled water by oral gavage for four weeks. Fasting blood glucose (FBG) and liver indexes were tested, and the biochemical method is used to detect alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), triglycerides (TG), total cholesterol (TC), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), and high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C). Histopathological changes were evaluated. Superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), glutathione (GSH), and Fe^{2+} levels were detected by colorimetric assay. The protein expressions of transferrin receptor 1 (TFR1), ferroportin 1 (FPN1), NRF2, SLC7A11, and GPX4 were assessed with Western blot, and their gene expressions were checked by RT-qPCR. Compared with the control group, the model group showed significantly elevated levels of FBG, liver index, ALT, AST, TG, TC, LDL-C and MDA ($P < 0.01$), and significantly decreased levels of HDL-C, SOD and GSH ($P < 0.01$). Lipid deposition and lipotoxic inflammatory injury were observed in liver tissue. The hepatic Fe^{2+} content and TFR1 expression were increased ($P < 0.01$), while the protein expressions of FPN1, NRF2, SLC7A11 and GPX4 were significantly down-regulated ($P < 0.01$), and the mRNA expression levels of *NRF2*, *SLC7A11* and *GPX4* were markedly reduced ($P < 0.01$). Compared with the model group, High-dose TGP markedly reduced FBG levels in model rats ($P < 0.05$). In the medium- and high-dose TGP groups, the liver index and levels of ALT, AST, TG, TC, and LDL-C were significantly decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), while HDL-C was notably increased ($P < 0.01$). Hepatic pathological injury and steatosis were alleviated to varying degrees; MDA expression was significantly decreased ($P < 0.01$), and SOD and GSH expressions were markedly elevated ($P < 0.01$). The protein levels of NRF2, SLC7A11, and GPX4 were significantly upregulated ($P < 0.01$). High-dose TGP significantly increased the mRNA expressions of *NRF2*, *SLC7A11*, and *GPX4* ($P < 0.01$). In all TGP-treated groups, Fe^{2+} content were significantly reduced ($P < 0.01$) and FPN1 expression was markedly increased ($P < 0.01$); TFR1 was significantly decreased in the medium- and high-dose groups ($P < 0.01$). TGP can improve hyperglycemia and liver injury in T2DM rats, and the mechanism may involve in activating the NRF2/SLC7A11/GPX4 signaling pathway and therefore to inhibit ferroptosis.

Key words: total glucosides from *Paeoniae Radix Alba*; lipid peroxidation; diabetic liver injury; NRF2/SLC7A11/GPX4 pathway; ferroptosis

糖尿病患病率在全球范围内呈持续攀升的态势, 2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 作为一种慢性代谢性疾病, 常引发严重并发症。长期高血糖、胰岛素抵抗促进外周脂肪分解, 大量游离脂肪酸进入肝脏, 诱导线粒体功能障碍与内质网应激, 启动肝细胞凋亡, 导致糖尿病肝病^[1]。T2DM 患者中肝脏损伤的发病率高达 65.04%^[2]。同时, 肝损伤减弱胰岛素对糖异生的抑制作用, 肝糖输出持续增加, 胰岛 β 细胞代偿性分泌过多胰岛素, 加剧肝脏脂质堆积与炎症反应, 形成恶性循环^[3]。因此, 改善糖尿病肝损伤对治疗 T2DM 极具意义。铁死亡是一种以脂质过氧化累积和铁代谢失衡为核心特征的新型程序性细胞死亡形式。研究表明, 糖尿病及其并发症的发生和发展中均有铁死亡的参与^[4], 这为调节铁死亡治疗 T2DM 及其肝损伤提供了新的视角。

中医药在糖尿病及其并发症的治疗中展现出独特的优势^[5,6]。白芍作为毛茛科植物芍药 (*Paeonia lactiflora* Pall.) 的干燥根, 在临床实践中被广泛应用

于治疗代谢性疾病、胃肠疾病、皮肤病、各类疼痛等^[7]。白芍总苷 (total glucosides from *Paeoniae Radix Alba*, TGP) 是白芍中提取的芍药苷、白芍苷、氧化芍药苷等苷类化合物, 具有免疫调节、抗氧化、抗炎、保肝、抗肿瘤等药理作用^[8]。临床及实验证明, 芍药苷可以通过抗氧化、抗炎和抗纤维化等, 减轻 T2DM 肾损伤及心肌损伤等并发症的发生和进展^[9,10]。同时, 调节脂质代谢、刺激胰岛素分泌和抗氧化等来增强胰岛素敏感性, 抑制异位脂质沉积, 逆转 db/db 小鼠肝功能异常和肝脂肪变性^[11], TGP 显示出治疗糖尿病肝病的潜在价值, 但其治疗机制需进一步阐明。实验表明, TGP 可通过多途径调节铁死亡, 如激活腺苷酸活化蛋白激酶通路调节铁死亡来缓解小鼠心肌肥厚^[12], 抑制 P53 乙酰化调节溶质载体家族 7 成员 11 (solute carrier family 7 member 11, SLC7A11)/谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4) 通路抑制铁死亡改善创伤性脑损伤^[13]。然而, TGP 通过调控铁死亡改善 T2DM 肝

损伤的具体分子机制尚缺乏报道。为此,本研究拟构建 T2DM 大鼠模型,基于铁死亡通路阐释 TGP 干预糖尿病大鼠肝损伤的潜在作用及机制。

1 材料与方法

1.1 药材与动物

白芍总苷胶囊(规格:0.3 g,宁波立华制药有限公司,生产批号 221111,有效期至 2025 年 10 月 31 日)。

60 只 SPF 级雄性 SD 大鼠,7~8 周龄,体重 180~220 g,购自北京华阜康生物科技股份有限公司,生产许可证号 SCXK(京)2019-0008。动物饲养于贵州中医药大学动物研究中心,22±2℃,相对湿度 60%±10%,昼夜交替光照,自由饮食,实验设计及开展符合贵州中医药大学动物实验福利伦理审查委员会的规定(动物伦理审查编号:20230254)。

1.2 试剂

盐酸二甲双胍片(规格:0.5 g,批号:ACN6231,中美上海施贵宝制药有限公司,有效期至 2026 年 1 月);链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)(批号:WX-BD4152V,西格玛奥德里奇上海贸易有限公司);甘油三酯(triglyceride, TG)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、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)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、微量还原型谷胱甘肽(glutathione, GSH)、谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)(批号:20241010、20241010、20241017、20241017、20241008、20241009、20241011、20241016、20241015,南京建成生物工程研究所);Fe²⁺含量检测试剂盒(批号:BC7415,北京索莱宝科技有限公司);HE 染液、油红 O 染液(批号:CR2407114、CR2410149,武汉赛维儿生物科技有限公司);GPX4 抗体、转铁蛋白受体 1(transferrin receptor 1, TFR1)抗体(批号:A1933、A5865,武汉爱博泰克生物科技有限公司);核因子红系 2 相关因子 2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2, NRF2)抗体(批号:AF7006,美国 Affinity 公司);SLC7A11 抗体、铁转运蛋白 1(ferroportin 1, FPN1)抗体(批号:32384-1-AP、26601-1-AP,武汉三鹰生物技术有限公司);总 RNA 提取试剂盒(批号:24031589,合肥白鲨生物科技有限公司)。

1.3 仪器

590 型血糖仪(江苏鱼跃医疗设备股份有限公司);CD1200 型全自动生化分析仪(美国 Sigma 公司);KZ-III-F 型高速低温组织研磨仪(武汉塞维尔科技有限公司);MK3 多功能酶标仪(美国 Thermo 公司);NP80 Touch 超微量分光光度计(德国 IM-PLIN 公司);QuantStudio TM3 实时荧光定量 PCR 仪(美国 Thermo Fisher 仪器有限公司);ChemiDoc™ 免染蛋白印迹系统(美国 Bio-Rad 公司);3-18K 高速台式冷冻离心机(德国 Sigma 公司);Cryostar NX50 切片机(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);Eclipse E100 光学显微镜(日本 Nikon 公司)。

1.4 方法

1.4.1 动物分组、造模及给药

60 只 SD 大鼠适应性喂养,12 h 昼夜节律,3 d 后,第 1 次随机分组。对照(control, Con)组 8 只基础饲料喂养,造模组 52 只高脂高糖饮食喂养(配方为:62% 基础饲料,10% 猪油,15% 蔗糖,10% 蛋黄粉,2.5% 胆固醇,0.5% 胆酸钠)。4 周后,造模组大鼠腹腔注射 STZ(35 mg/kg)建立 T2DM 模型^[14],Con 组注射等体积的柠檬酸缓冲液(pH = 4.5)。72 h 后,造模大鼠尾静脉取血测随机血糖,14 d 内 3 次血糖值≥16.7 mmol/L 判定为 T2DM 模型成功,最终成模 40 只,成模率为 76.92%。第 2 次模型大鼠随机分为 5 组,每组 8 只,根据既往研究报道^[15],按大鼠与人的药物等效剂量比值(6.3)计算大鼠给药量,具体分为模型(model, Mod)组、二甲双胍(metformin, Met; 180 mg/kg)组、TGP 低剂量(low-dose TGP, TGP-L; 50 mg/kg)组、TGP 中剂量(medium-dose TGP, TGP-M; 100 mg/kg)组、TGP 高剂量(high-dose TGP, TGP-H; 200 mg/kg)组,Con 组和 Mod 组使用等量蒸馏水灌胃,每日 1 次,每日测定大鼠体质量 1 次,并根据大鼠体质量校正具体给药量,连续 4 周。期间,Mod 组大鼠继续高脂高糖饲料,Con 组基础饲料喂养。

1.4.2 样本采集

末次给药后所有实验大鼠禁食不禁水 24 h,期间 12 h 后检测空腹血糖值。随后腹腔注射戊巴比妥钠(30 mg/kg)麻醉,称体质量后,腹主动脉取血;称肝质量后部分肝脏样本 4% 多聚甲醛固定,部分肝脏液氮速冻,后存入-80℃冰箱备用。

1.4.3 指标检测

1.4.3.1 空腹血糖检测

分别于用药干预后 0、1、2、3、4 周,大鼠禁食

不禁水 12 h, 血糖仪尾静脉检测空腹血糖 (fasting blood glucose, FBG), 若血糖检测出现 HI 则记为 33.3 mmol/L。

1.4.3.2 肝质量、肝脏指数检测

4℃生理盐水漂洗肝脏后, 滤纸吸干水分, 称取肝质量, 计算肝脏指数。肝脏指数 = 肝质量/体质量 × 100%。

1.4.3.3 TC、TG、LDL-C、HDL-C、ALT、AST 水平测定

全血样品静置 2 h, 4℃以 3 000 r/min 离心 15 min, 收集上层血清, 用全自动生化分析仪检测血清样品中 TC、TG、LDL-C、HDL-C、ALT 及 AST 水平, 按照试剂盒说明书操作。分析大鼠血脂水平和肝功能情况。

1.4.3.4 HE 染色观察肝组织形态

4%多聚甲醛固定后的肝脏标本, 进行梯度乙醇脱水, 2 次二甲苯浸泡透明, 石蜡融滴包埋, 冷却后切片。脱腊后至于由高到低梯度乙醇中水化, 蒸馏水洗后, 入高清恒染预处理, 后浸入苏木素染液、伊红染液依次染色, 脱水后, 中性树胶封片。置于光学显微镜低倍和高倍镜下观察肝脏染色后的组织形态。

1.4.3.5 油红 O 染色观察肝组织形态

冷冻肝脏组织 4℃依次放入 15%、30% 蔗糖溶液内脱水, OCT 包埋后切片。冰冻切片固定后, 入油红染液浸染 2 次, 后 60% 异丙醇分化, 苏木素复染, 分化液分化, 后浸入返蓝液, 最后甘油明胶进行封片。观察肝细胞内脂滴情况。

1.4.3.6 比色法检测肝脏组织 MDA、SOD、GSH 氧化应激水平和 Fe²⁺ 含量

肝脏组织, 低温高速研磨后, 按照试剂盒说明书操作, 检测 MDA、SOD、GSH、Fe²⁺ 等水平, 检测大鼠的肝脏脂质过氧化及铁蓄积情况。

1.4.3.7 Western blot 检测铁死亡相关蛋白表达

取冻存的肝脏组织, 低温高速研磨, 裂解液裂解, 匀浆后用 BCA 法测定蛋白浓度。加上样缓冲液制备样品, 制胶, 上样, SDS-PAGE 电泳, 转移至 PVDF 膜, 用 TBST Buffer 稀释的 5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h, 按抗体说明书操作, 加入一抗 (NRF2, 1: 2 000; GPX4, 1: 5 000; SLC7A11, 1: 2 000; TFR1, 1: 2 000; FPN1, 1: 800), 4℃孵育过夜, 洗涤后加入二抗, 室温孵育 2 h, 洗涤后 ECL 发光液显影, 曝光拍照。ImageJ 1.6.0 软件计算各蛋白表达量, Graphpad prism 9.4.1 软件分析绘图。

1.4.3.8 RT-qPCR 检测铁死亡相关蛋白基因表达

提取大鼠肝组织总 RNA, 使用超微量分光光度计检测各样本 RNA 纯度。使用 DNase I 去除残留的基因组 DNA, 按照逆转录试剂盒说明书进行逆转录反应。扩增程序如下: 95℃预变性 1 min, 然后进行 45 个循环 (95℃变性 10 s, 55℃退火 30 s, 72℃延伸 10 s)。使用 QuantStudio 软件分析目的基因在各组的相对表达量, 以 2^{-ΔΔCt} 表示。目的基因引物序列从 NCBI 数据库获取, 使用 Primer Premier 软件设计引物, 由上海生工生物工程技术有限公司合成。具体引物序列见表 1。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因 Gene	引物序列 Primer sequence(5'→3')
<i>NRF2</i>	F: GCTGAAGTCTCTTAGACTCAAATCCC R: TGCTGCCACCGCCACTG
<i>SLC7A11</i>	F: CATCATCATCGGCACCGTCATC R: TCCACAGGCAGACCAGAACAC
<i>GPX4</i>	F: ATAAGAACGGCTGCGTGCTGAAG R: AGAGATAGCACGGCAGGTCCTTC
<i>β-actin</i>	F: GGGAATCGTGCGTGACATT R: GCGGCACTGGCCATCTC

1.5 统计学分析

实验数据使用 GraphPad Prism 9.4.1 软件统计分析。正态分布的计量资料采用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示; 多组间比较首先进行正态性检验和方差齐性检验; 若满足正态性和方差齐性, 采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD 检验; 若方差不齐但满足正态性, 采用 Welch's ANOVA; 若不满足正态性, 采用 Kruskal-Wallis H 检验, 两两比较采用 Dunn's 检验。P < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 TGP 对 T2DM 大鼠空腹血糖的影响

如图 1 所示, 与 Con 组相比, Mod 组大鼠 FBG 明显升高 (P < 0.01)。与 Mod 组相比, 用药第 3 周后 Met 组 FBG 显著降低 (P < 0.01); 第 4 周后 TGP-H 组 FBG 明显降低 (P < 0.05), TGP-M 组 FBG 也有下降趋势。提示高剂量 TGP 具有降糖作用。

2.2 TGP 对 T2DM 大鼠肝脏指数、ALT 及 AST 的影响

如图 2 所示, 与 Con 组相比, Mod 组大鼠肝脏指数、ALT 及 AST 均显著升高 (P < 0.01), 说明 Mod 大鼠肝脏有损伤。与 Mod 组相比, 药物干预后 Met

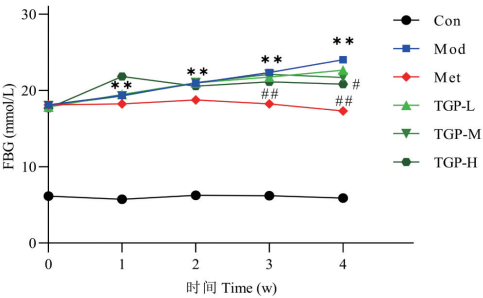


图1 各组大鼠药物干预4周FBG水平($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 1 FBG in rats after four weeks of drug intervention($\bar{x} \pm s, n = 8$)

注:与Con组比较,** $P < 0.01$;与Mod组比较,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$,下同。Note:Compared with Con group,** $P < 0.01$; Compared with Mod group,# $P < 0.05$, ## $P < 0.01$,the same below.

组、TGP-M组、TGP-H组大鼠肝脏指数、ALT和AST均显著降低($P < 0.01$),TGP-L能改善Mod大鼠肝功能,但肝脏指数无明显改变。

2.3 TGP对T2DM大鼠TG、TC、LDL-C和HDL-C的影响

如图3所示,与Con组相比,Mod组大鼠TG、TC和LDL-C水平均显著升高($P < 0.01$),HDL-C水平显著降低($P < 0.01$),说明Mod大鼠脂质代谢紊乱。与Mod组相比,Met组、TGP-M组和TGP-H组的TG、TC、LDL-C均显著下降($P < 0.05, P < 0.01$),HDL-C水平显著升高($P < 0.01$),TGP-L组TG、TC明显降低,HDL-C明显升高($P < 0.01$),LDL-C水平无明显变化($P > 0.05$)。提示中、高剂量TGP可改善T2DM大鼠血脂水平。

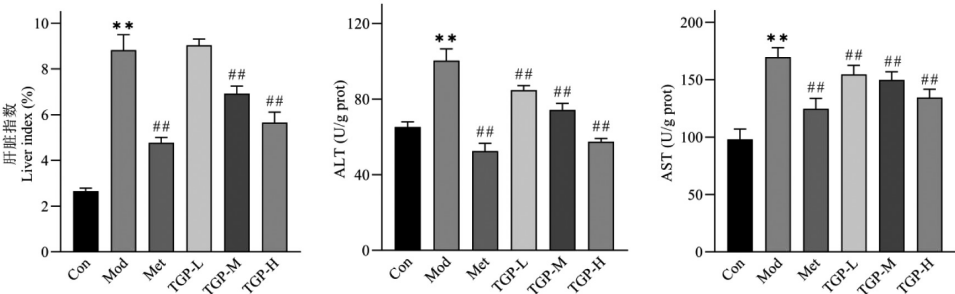


图2 各组大鼠肝脏指数、ALT及AST的变化($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 2 Changes in liver index,ALT and AST liver function in each group of rats($\bar{x} \pm s, n = 8$)

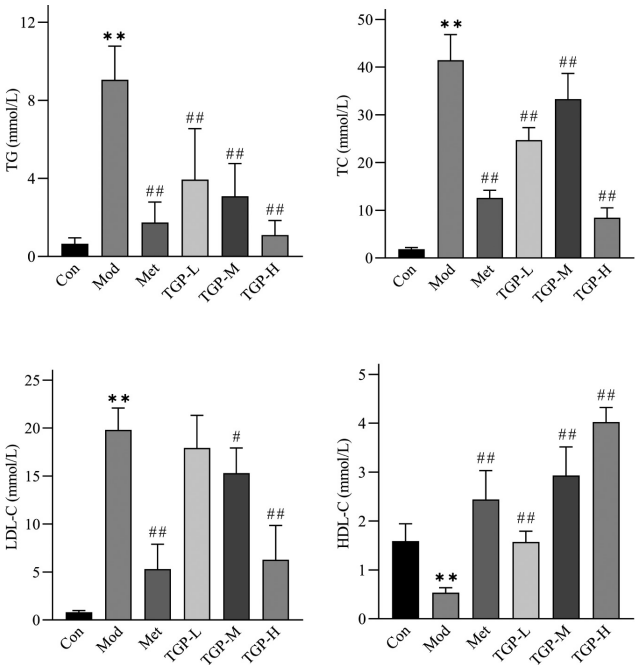


图3 各组大鼠血清中TG、TC、LDL-C、HDL-C表达水平($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 3 Expression levels of TG,TC,LDL-C and HDL-C in serum from rats in each group($\bar{x} \pm s, n = 8$)

2.4 TGP 对 T2DM 大鼠肝脏组织病理变化的影响

如图 4、图 5 所示,与 Con 组相比,Mod 组大鼠肝细胞排列紊乱,细胞内和细胞间隙呈现弥漫性脂滴空泡,汇管区混合性炎症细胞浸润;肝组织镜下可见大量圆形、大小不等的亮色脂滴,呈弥漫性分布,

周围可见炎细胞浸润,部分区域重叠,提示脂质沉积,并有脂毒性炎症。与 Mod 组相比,Met 组、TGP-M 组和 TGP-H 组肝细胞脂滴空泡数、脂肪沉积均有所减轻,细胞呈规律分布。TGP-L 组肝组织病理形态与 Mod 组近似,改善不明显。

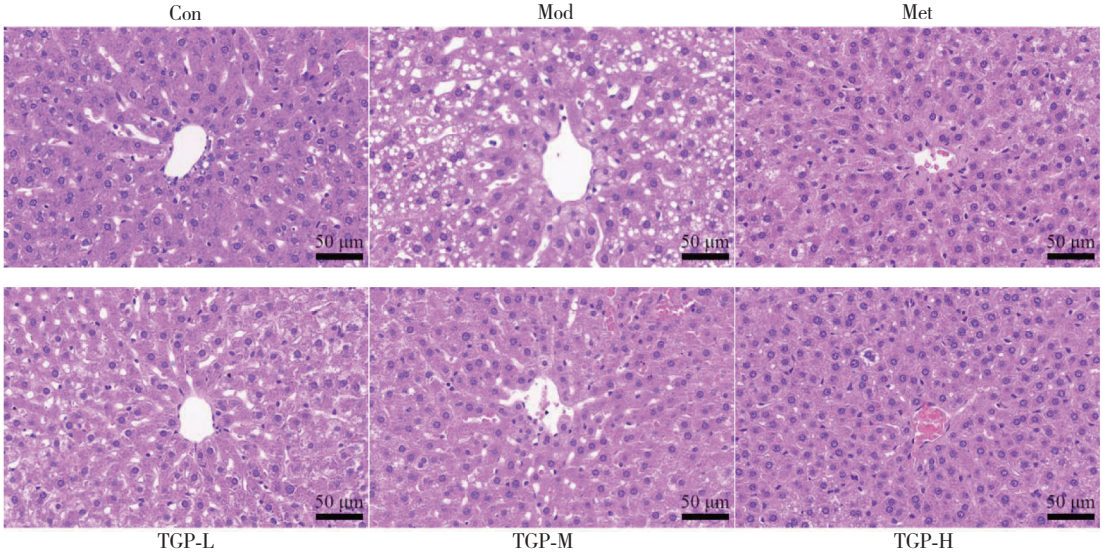


图 4 各组大鼠肝脏组织病理变化 (HE, ×400)

Fig. 4 Histopathological changes in liver tissue from rats in each group (HE, ×400)

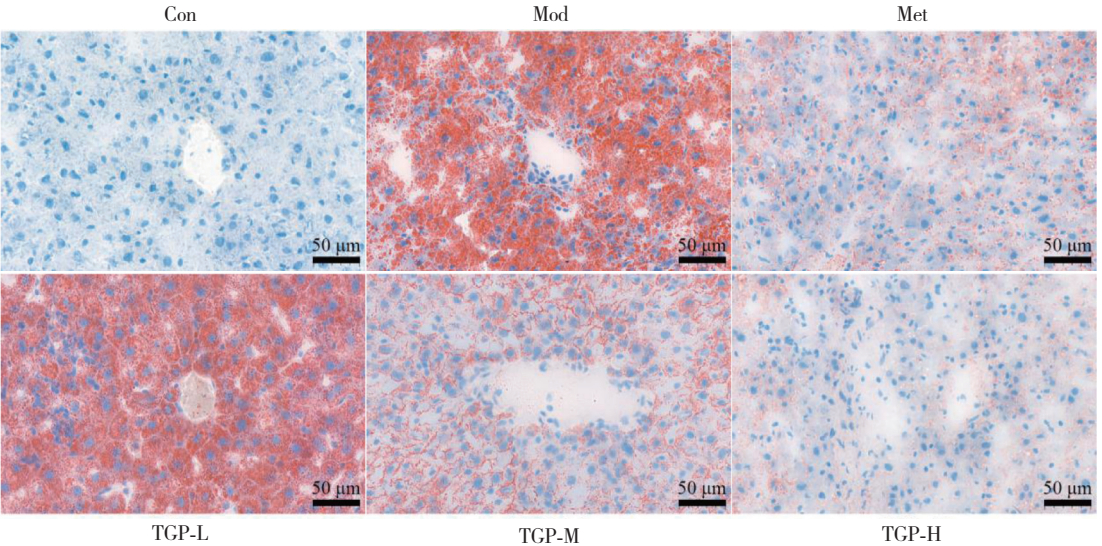


图 5 各组大鼠肝脏组织脂质沉积情况 (油红 O, ×400)

Fig. 5 Lipid deposition in liver tissue of rats across different groups (Oil Red O, ×400)

2.5 TGP 对 T2DM 大鼠 MDA、SOD 和 GSH 的影响

如图 6 所示,与 Con 组相比,Mod 组大鼠肝脏 MDA 含量水平显著升高 ($P < 0.01$),SOD、GSH 活性降低明显 ($P < 0.01$)。与 Mod 组相比,Met 组、TGP-M 组和 TGP-H 组 MDA 显著下降 ($P < 0.01$),

SOD、GSH 升高显著 ($P < 0.01$)。TGP-L 组各指标无明显差异 ($P > 0.05$)。提示 TGP 可降低 Mod 大鼠脂质过氧。

2.6 TGP 对 T2DM 大鼠肝脏组织铁代谢的影响

如图 7 所示,与 Con 组相比,Mod 组大鼠肝脏组

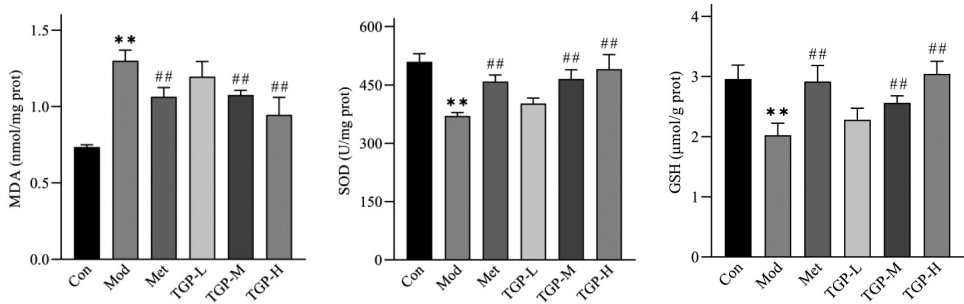


图 6 各组大鼠肝脏组织中 MDA、SOD 和 GSH 的表达水平($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 6 Levels of MDA, SOD and GSH in liver tissue from rats in each group($\bar{x} \pm s, n = 8$)

织的 Fe^{2+} 水平、TFR1 蛋白表达显著升高 ($P < 0.01$), FPN1 表达明显下降 ($P < 0.01$), 说明 T2DM 大鼠肝脏组织 Fe^{2+} 代谢异常, 呈现铁蓄积现象。与 Mod 组比较, 各用药组 Fe^{2+} 含量均显著降低 ($P <$

0.01), Met 组、TGP-M 组和 TGP-H 组 TFR1 蛋白表达显著下降 ($P < 0.01$), 各用药组 FPN1 表达水平显著上升 ($P < 0.01$), 提示 TGP 可改善铁代谢紊乱, 并减少肝细胞中铁蓄积。

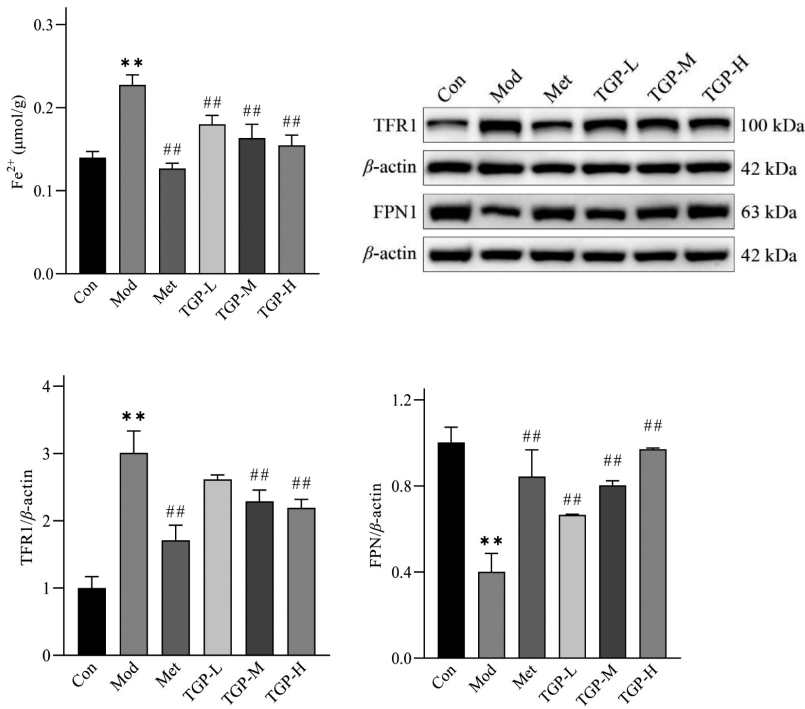


图 7 各组大鼠肝脏组织中铁的代谢情况($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 Iron metabolism in the liver tissues of rats from each group($\bar{x} \pm s, n = 3$)

2.7 TGP 对 T2DM 大鼠肝脏组织中铁死亡相关蛋白表达的影响

如图 8 所示, 与 Con 组相比, Mod 组大鼠肝组织 NRF2、SLC7A11 和 GPX4 蛋白表达均显著下降 ($P < 0.01$)。与 Mod 组比较, Met 组、TGP-M 组和 TGP-H 组 NRF2、SLC7A11、GPX4 蛋白表达水平均明显上升 ($P < 0.05, P < 0.01$); TGP-L 组 SLC7A11 蛋白水平上升 ($P < 0.01$), NRF2、GPX4 蛋白无明显差异。提

示 TGP 可调节铁死亡相关蛋白的表达。

2.8 TGP 对 T2DM 大鼠肝脏组织中铁死亡关键基因表达的影响

如图 9 所示, 与 Con 组相比, Mod 组大鼠肝脏组织的 NRF2、SLC7A11、GPX4 mRNA 表达水平下调明显 ($P < 0.01$)。与 Mod 组相比, Met 组、TGP-H 组 NRF2、SLC7A11、GPX4 mRNA 上调明显 ($P < 0.05, P < 0.01$), TGP-L 组和 TGP-M 组上述基因表达亦有

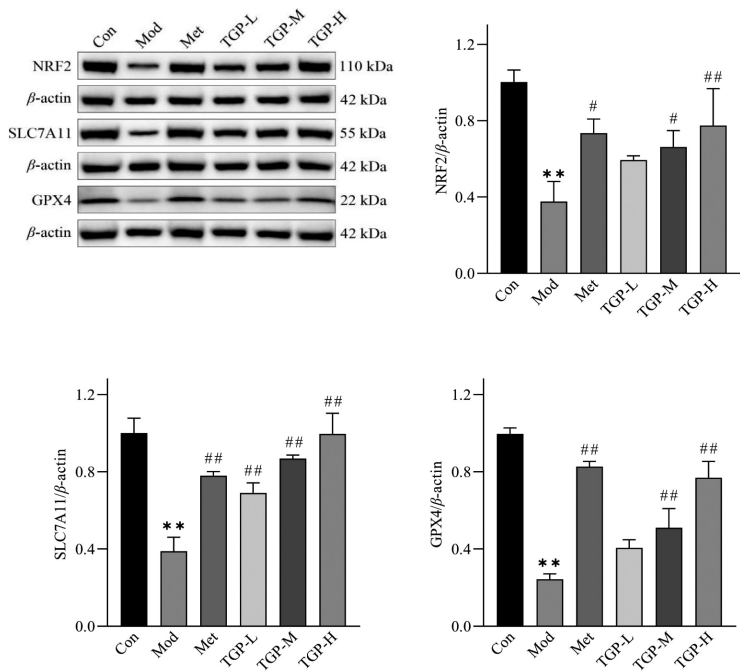


图 8 各组大鼠肝脏组织中铁死亡相关蛋白表达 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 8 Expression of ferroptosis-related proteins in liver tissue from rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

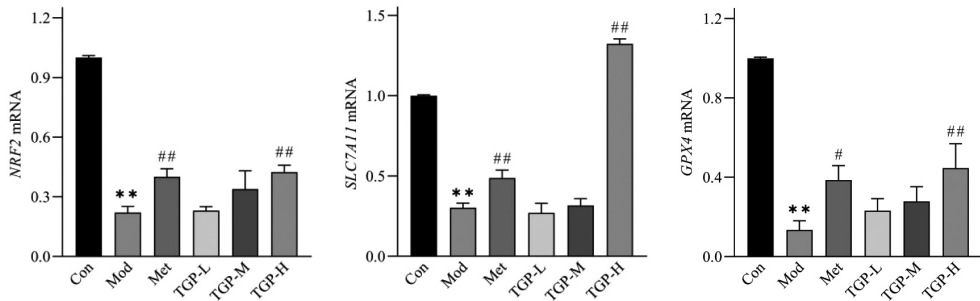


图 9 各组大鼠肝脏组织中铁死亡关键基因表达 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 9 Expression of key ferroptosis-related genes in liver tissues of rats from each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

上升趋势,与 Western blot 检测结果相符合。

3 讨论与结论

T2DM 患者临证饮水多、饮食多、小便多,而体重减轻,据证归属中医“消渴”病范畴。《素问·奇病论》曰:“此人必数食甘美而多肥也,肥者,令人内热……转为消渴。”油腻及甜食均有呆滞之弊,阻碍脾胃运化,水湿内停,日久蕴热,耗伤津液,终致肺燥、胃热、肾虚,出现“三多一少”表现。消渴日久,肾阴亏损,《临证指南医案·肝风》言:“肝……全赖肾水以涵之”肾水不能涵养肝木,肝火内生,可致肝木受损。治宜养阴清热,选用清养之品。白芍味苦,酸,性微寒,归肝、脾经。《药品化义》云:“白芍药微苦能补阴,略酸能收敛。因酸走肝……酸以抑肝。”

白芍具有清肝柔肝、养血敛阴之功,以白芍为主药的芍药甘草汤现被《糖尿病周围神经病变中西医结合防治指南(2025)》列为推荐用方^[16]。TGP 是白芍的药效物质基础^[8]。研究表明,TGP 能改善非酒精性脂肪肝大鼠糖脂代谢异常、拮抗胰岛素抵抗,下调 apelin、visfatin 等脂肪因子的表达,降低血脂,改善肝功能^[17]。铁死亡与多种脏器损伤密切相关,肝脏是铁代谢的主要器官,通过抑制铁死亡可治疗非酒精性脂肪肝及 T2DM 肾脏损伤^[18,19],但具体机制需进一步揭示。

本研究观察了 TGP 对 T2DM 大鼠的干预作用。TGP 有一定降糖作用,中、高剂量显著降低 T2DM 大鼠肝脏指数、ALT 和 AST 水平,改善肝功能异常。

同时,中、高剂量 TGP 可明显下调 T2DM 大鼠的 TG、TC、LDL-C 水平,升高 HDL-C 水平。病理切片亦观察到高糖代谢所致的肝脏病理损伤和脂质沉积显著减轻。实验结果提示中、高剂量 TGP 可改善 T2DM 症状及其导致的肝损伤。

为了进一步探讨 TGP 改善 T2DM 大鼠肝损伤的作用机制,本项目检测了各组大鼠肝脏脂质过氧化、铁死亡相关指标。脂质过氧化是肝损伤的常见因素之一,MDA 作为脂质过氧化的关键产物,可用于评估氧化应激水平。不饱和脂肪酸在脂氧合酶和铁离子介导的 Fenton 反应下发生脂质过氧化,产生 MDA,导致细胞死亡。抗氧化酶 SOD 可催化超氧阴离子转化为无害的过氧化氢和氧气,减轻氧化损伤。由谷氨酸、半胱氨酸和甘氨酸组成的小肽 GSH,直接参与还原反应,激活 GPX4 活性以抑制脂质过氧化。 Fe^{2+} 可将过氧化氢转化为羟基自由基,驱动脂质过氧化,促进铁死亡,而 GSH 耗竭、脂质过氧化和铁离子堆积是铁死亡的核心机制^[20]。本研究,中、高剂量 TGP 干预后,MDA、SOD、GSH 及 Fe^{2+} 均出现异常,提示 T2DM 大鼠肝脏存在脂质过氧化和铁代谢失衡。TGP 干预后,MDA、 Fe^{2+} 水平下降显著,SOD 和 GSH 水平回升,表明 TGP 可增强 T2DM 大鼠的抗氧化能力,缓解脂质过氧和铁超载情况。为验证 TGP 是否抑制铁蓄积进程,本研究检测了细胞铁代谢中的两个关键膜蛋白 TFR1 和 FPN1。TFR1 位于细胞膜,可与携带铁离子的转铁蛋白结合,通过受体介导的内吞作用将铁运入细胞内,为铁代谢的“入口”。FPN1 主要分布在巨噬细胞、肝细胞和肠上皮细胞等,负责将回收或吸收的铁从细胞内向胞外输出,为铁代谢的“出口”,两者协同调控细胞内的铁稳态^[21]。TGP 干预后,TFR1 下降,FPN1 上升,两者比值降低,提示铁离子出多进少,有助于清除多余铁离子,缓解铁蓄积。TGP 可能潜在抑制了铁死亡的发生。

NRF2/SLC7A11/GPX4 是影响铁死亡的核心通路^[22]。脂质过氧化时,转录因子 NRF2 被激活,多种抗氧化基因的表达增加,细胞的抗氧化能力增强,从而间接抑制了铁死亡。同时,NRF2 激活后促进 SLC7A11 的表达,作为 System Xc-胱氨酸/谷氨酸反向转运体的重要组成,SLC7A11 负责将细胞外的胱氨酸转运入细胞内,同时排出谷氨酸;胱氨酸是 GSH 合成的关键前体,因此 SLC7A11 的表达或活性降低会导致胱氨酸摄取减少、GSH 耗竭,GPX4 失

活,脂质过氧化物积累,触发铁死亡。多种疾病如肝损伤、神经退行性疾病和癌症等均与它们异常相关^[23]。本实验结果显示,TGP 高剂量组大鼠肝脏 NRF2、SLC7A11、GPX4 蛋白及基因表达水平均显著升高,提示该通路可能是 TGP 抑制铁死亡发挥作用的潜在靶点。

实验中发现 TGP 低剂量对检测指标的改善作用不一致,如:低剂量 TGP 可改善肝功能,但对肝脏指数及肝组织病理形态改善不明显;低剂量 TGP 能显著上调 SLC7A11 和 FPN1 表达并降低 Fe^{2+} 含量,但对 TFR1 未见明显影响,对 NRF2/SLC7A11/GPX4 通路的其他蛋白分子调控作用亦不显著。分析其原因可能由于低剂量 TGP 不能充分激活 NRF2/SLC7A11/GPX4 通路并抑制铁死亡,因此其肝保护作用可能与其他机制有关,后续的实验应进一步研究阐明。

本研究在白芍清养结合改善消渴的功效基础上,进一步证实了 TGP 能有效改善 T2DM 糖脂代谢紊乱及肝脏损伤,这与国医大师杨震治疗慢病经验一致^[24]。其分子机制可能与 TGP 激活 NRF2/SLC7A11/GPX4 信号通路,改善脂质过氧化,抑制铁死亡,纠正铁代谢异常有关。但研究还存在一定局限性。机制验证方面,虽检测了通路关键蛋白,但未采用基因沉默或特异性抑制剂进行反向验证,同时缺乏透射电镜观察铁死亡标准证据及细胞验证,机制深度有待加强;剂量研究方面,低剂量组呈现部分改善但未达全面疗效,缺乏剂量-效应曲线的系统分析,无法明确其量效关系。课题组后续将进行深入探讨,为临床应用 TGP 联合用药治疗 T2DM 及其并发症提供实验依据。

数据可用性声明: 本篇论文的关联数据可在 ScienceDB 数据库 (<https://doi.org/10.57760/sciencedb.nprd.000cq>) 中访问获取。

参考文献

- 1 Cusi K, Abdelmalek MF, Apovian CM, et al. Metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease (MASLD) in people with diabetes: the need for screening and early intervention. a consensus report of the American diabetes association [J]. *Diabetes Care*, 2025, 48: 1057-1082.
- 2 Cho EL, Ang CZ, Quek J, et al. Global prevalence of non-alcoholic fatty liver disease in type 2 diabetes mellitus: an updated systematic review and meta-analysis [J]. *Gut*, 2023, 72: 2138-2148.

- 3 Younossi ZM, Golabi P, Price JK, et al. The global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis among patients with type 2 diabetes[J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2024, 22: 1999-2010.
- 4 Yu HY, Fu L, Zhang C, et al. Targeting ferroptosis with natural products to treat diabetes and its complications: opportunities and challenges [J]. Phytother Res, 2025, 39: 5695-5716.
- 5 Zhang F, Wang M, Chen JH, et al. Overview of research on the efficacy evaluation of traditional Chinese medicine in the treatment of type 2 diabetes mellitus[J]. J Sichuan Tradit Chin Med(四川中医), 2025, 43: 201-207.
- 6 Meng XL, Liu XQ, Tan JY, et al. From Xiaoke to diabetes mellitus: a review of the research progress in traditional Chinese medicine for diabetes mellitus treatment[J]. Chin Med, 2023, 18: 75.
- 7 Yao ZX, Yuan ZY, Guo MZ, et al. Research progress on the pharmacological effects and clinical applications of Paeoniae Radix Alba and its herb pairs[J]. J Anhui Univ Chin Med(安徽中医药大学学报), 2024, 43: 109-112.
- 8 Wang HG, Yu WC, Wang T, et al. Therapeutic potential and pharmacological insights of total glucosides of paeony in dermatologic diseases: a comprehensive review[J]. Front Pharmacol, 2025, 15: 1423717.
- 9 Zhang XE, Pang YB, Bo Q, et al. Protective effect of paeoniflorin in diabetic nephropathy: A preclinical systematic review revealing the mechanism of action [J]. PLoS One, 2023, 18: e0282275.
- 10 Wei WJ, Li CY, Zhang BY, et al. Total Glucosides of paeony ameliorate myocardial injury in chronic heart failure rats by suppressing PARP-1[J]. J Cardiovasc Transl Res, 2024, 17: 388-402.
- 11 Wang AL, Gong YJ, Pei ZX, et al. Paeoniflorin ameliorates diabetic liver injury by targeting the TXNIP-mediated NLRP3 inflammasome in db/db mice [J]. Int Immunopharmacol, 2022, 109: 108792.
- 12 Wang YWQ, Lin S, Liu JN, et al. Paeoniflorin mitigates myocardial hypertrophy by regulating mitophagy and ferroptosis mediated by mitochondria-associated AMPK-Parkin-ACSL4 pathway[J]. Free Radic Biol Med, 2026, 245: 98-114.
- 13 Zhi SM, Cui Y, Liu Y, et al. Paeoniflorin suppresses ferroptosis after traumatic brain injury by antagonizing P53 acetylation[J]. Phytomedicine, 2024, 133: 155940.
- 14 Sun XJ, Wu AN, Hou N, et al. Effects of aerobic exercise and resveratrol on inflammation and apoptosis of renal tissue in diabetic kidney disease rats[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2024, 36: 946-953.
- 15 Sheng LT, Shen MJ, Shao DY. Total Glycosides of paeony activates PI3K/Akt pathway to alleviate cardiomyocyte hypertrophy induced by AngII[J]. Cell Biochem Biophys, 2025, 83: 2059-2066.
- 16 Shi PY, Ni Q, Pang Q. Guidelines for the integrated traditional Chinese and Western medicine prevention and treatment of diabetic peripheral neuropathy[J]. Chin J Integr Med Cardio-Cerebrovasc Dis(中西医结合心脑血管病杂志), 2025, 23: 2881-2888.
- 17 Sun ZJ, Ye YM, Wang GX. Study on the mechanism of total glucosides of paeony against non-alcoholic fatty liver disease *in vitro*[J]. World Sci Technol Mod Tradit Chin Med(世界科学技术-中医药现代化), 2022, 24: 2748-2754.
- 18 Yao F, Wang GC, Ning F, et al. Targeting ferroptosis: new insights and therapeutic advances in MAFLD complicating T2DM[J]. Front Biosci(Landmark Ed), 2025, 30: 39735.
- 19 Wu QR, Huang FJ. Targeting ferroptosis as a prospective therapeutic approach for diabetic nephropathy[J]. Ann Med, 2024, 56: 2346543.
- 20 Bayır H, Dixon SJ, Tyurina YY, et al. Ferroptotic mechanisms and therapeutic targeting of iron metabolism and lipid peroxidation in the kidney[J]. Nat Rev Nephrol, 2023, 19: 315-336.
- 21 Zaugg J, Pujol Giménez J, Cabra RS, et al. New insights into the physiology of iron transport: an interdisciplinary approach [J]. Chimia (Aarau), 2022, 76: 996-1004.
- 22 Cui MJ, Xu QM, Duan LX, et al. Vaccarin ameliorates renal fibrosis by inhibiting ferroptosis via NRF2/SLC7A11/GPX4 signaling pathway[J]. Drug Des Devel Ther, 2025, 19: 1609-1626.
- 23 Ru Q, Li YS, Chen L, et al. Iron homeostasis and ferroptosis in human diseases: mechanisms and therapeutic prospects [J]. Signal Transduct Target Ther, 2024, 9: 271.
- 24 Li Y, Xie YJ, Hao JM. Experience of master of Chinese Medicine Yang Zhen in treating chronic liver disease based on the theory of yin deficiency and ministerial fire[J]. Chin J Integr Tradit West Med Liver Dis(中西医结合肝病杂志), 2024, 34: 641-642.