

# 基于 P53/SAT1/ALOX15 信号通路探讨葛根芩连汤对棕榈酸诱导肝细胞胰岛素抵抗的作用机制

易思萍<sup>1</sup>, 罗涛<sup>1</sup>, 张香港<sup>1</sup>, 张秀荣<sup>1</sup>, 赵海平<sup>1\*</sup>, 章常华<sup>2\*</sup>

1. 江西中医药大学 研究生院, 江西中医药大学方-证研究中心, 江西省方-证研究重点实验室, 江西省中医经典名方(验方)开发与评价技术工程研究中心, 南昌市方-证对应免疫及代谢疾病防治重点实验室, 江西 南昌 330004
2. 南昌大学第一附属医院 血液净化中心, 江西 南昌 330031

**摘要:**目的 探讨葛根芩连汤(GQD)是否通过 P53/SAT1/ALOX15 信号通路调控铁死亡改善棕榈酸(PA)诱导的 AML-12 细胞胰岛素抵抗(IR)。方法 网络药理学筛选 GQD 干预 IR 的相关靶点, 构建蛋白质-蛋白质相互作用网络并进行基因本体论(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析。采用 PA 联合胰岛素处理 AML-12 细胞构建 IR 模型, 通过 CCK-8 法筛选 PA 最佳造模浓度; 模型验证阶段分为对照组、胰岛素组、PA 组、模型组, 试剂盒法检测细胞内葡萄糖水平, Western blotting 法检测蛋白激酶 B(Akt)、p-Akt、胰岛素受体底物 1(IRS-1)、p-IRS-1 蛋白表达水平验证模型成功。将 60 只大鼠随机分为空白(蒸馏水)组 30 只、GQD(生药 10 g·kg<sup>-1</sup>)组 20 只、盐酸吡格列酮(Pio, 阳性药, 2.7 mg·kg<sup>-1</sup>)组 10 只, 每组大鼠每天给药 2 次, 连续 ig 7 d, 第 8 天末次给药后 0.5 h 腹主动脉取血, 制得各组血清。干预实验分为对照组、模型组、Pio(10%含药血清)组和 GQD 含药血清高、中、低浓度(20%、15%、10%)组, 干预后, CCK-8 法检测细胞存活率; 培养上清液中葡萄糖消耗; 进行油红 O 染色; 试剂盒法检测细胞三酰甘油(TG)、总胆固醇(TC)、游离脂肪酸(FFA)、亚铁离子(Fe<sup>2+</sup>)、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽(GSH)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)水平, 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)法检测 *GPX4*、*SLC7A11*、*FTH1*、*LPCAT3*、*TFR1*、*P53*、*SAT1*、*ALOX15*、*ACSL4* 基因表达, Western blotting 法检测 *GPX4*、*SLC7A11*、*FTH1*、*P53*、*SAT1*、*ALOX15*、*ACSL4* 蛋白表达。结果 网络药理学分析显示, GQD 与 IR 的交集靶点主要富集于 P53 信号、脂质代谢和氧化应激等通路。CCK-8 结果表明, 200 μmol·L<sup>-1</sup> PA 为最佳造模浓度, 模型验证结果显示造模成功。GQD 干预后, 与模型组相比, GQD 各浓度组及 Pio 组细胞存活率均显著升高 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ 、 $0.001$ ); 细胞上清液葡萄糖消耗显著升高 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ); 油红 O 染色显示脂质沉积明显减少, TG、TC、FFA 水平显著降低 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ); Fe<sup>2+</sup>、MDA 水平显著降低 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ), GSH、GSH-Px 水平显著升高 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ); qRT-PCR 结果显示, *GPX4*、*SLC7A11*、*FTH1* 基因表达显著上调 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ), *TFR1*、*LPCAT3*、*P53*、*SAT1*、*ALOX15*、*ACSL4* 基因表达显著下调 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ); Western blotting 结果显示, *GPX4*、*SLC7A11*、*FTH1* 蛋白表达显著上调 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ), *P53*、*SAT1*、*ALOX15*、*ACSL4* 蛋白表达显著下调 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ )。结论 GQD 可改善 PA 诱导的肝细胞 IR, 其机制可能与调节脂质代谢、抑制肝细胞铁死亡、调控 P53/SAT1/ALOX15 信号通路相关基因及蛋白表达有关。

**关键词:** 葛根芩连汤; 网络药理学; 胰岛素抵抗; 铁死亡; P53/SAT1/ALOX15 通路

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2026)05-1529-15

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2026.05.006

## Exploring mechanism of Gegen Qinlian Decoction in alleviating insulin resistance in hepatocytes induced by palmitic acid based on P53/SAT1/ALOX15 signaling pathway

YI Siping<sup>1</sup>, LUO Tao<sup>1</sup>, ZHANG Xianggang<sup>1</sup>, ZHANG Xiurong<sup>1</sup>, ZHAO Haiping<sup>1</sup>, ZHANG Changhua<sup>2</sup>

1. Graduate School of Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Formula-Pattern Research Center, Jiangxi University of Chinese Medicine, Jiangxi Provincial Key Laboratory of Formula-Pattern Research, Jiangxi Provincial Engineering Research

收稿日期: 2026-01-14

基金项目: 赣鄱俊才-江西省主要学科学术和技术带头人培养项目(领军人才-学术类, 20232BCJ22022); 江西省教育厅科技项目(GJJ213111); 江西省中药药理重点实验室(2024SSY07111); 企业委托横向项目(横 20250106); 江西中医药大学校级项目(81525180)

作者简介: 易思萍(1997—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药药性、药理、量-效(毒)关系。E-mail: 1683591705@qq.com

\*通信作者: 赵海平(1974—), 男, 博士, 副教授, 硕士生导师, 研究方向为中药药性、药理、量-效(毒)关系。E-mail: cdzhp3690098@163.com  
章常华(1977—), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 从事中药及天然产物药理研究。E-mail: zhangch305@126.com

Center for the Development and Evaluation of Classical TCM Formulas (Proven Formulas), Nanchang Key Laboratory of Formula-Pattern Correspondence for the Prevention and Treatment of Immune and Metabolic Diseases, Nanchang 330004, China  
2. Blood Purification Center, Nanchang University First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330031, China

**Abstract: Objective** To investigate the effect of Gegen Qinlian Decoction (GQD) on insulin resistance (IR) induced by palmitic acid (PA) in AML-12 cells by regulating ferroptosis through P53/SAT1/ALOX15 signaling pathway. **Methods** Network pharmacology was used to screen the relevant targets of GQD intervention in IR, and a protein-protein interaction network was constructed. Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analyses were performed. A model of IR was established by treating AML-12 cells with PA combined with insulin. The optimal concentration of PA for model establishment was screened by the CCK-8 method. In the model validation stage, the rats were randomly divided into the control group, insulin group, PA group, and model group. The intracellular glucose level was detected by the kit method, and the protein expression levels of Akt, p-Akt, insulin receptor substrate 1 (IRS-1), and p-IRS-1 were detected by Western blotting to verify the success of the model. Sixty rats were randomly divided into a control (distilled water) group (30 rats), a GQD ( $10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  crude drug) group (20 rats), and a pioglitazone hydrochloride (Pio, positive control,  $2.7 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) group (10 rats). Each group of rats was administered twice a day by intragastric administration for 7 consecutive days. Blood was collected from the abdominal aorta 0.5 h after the last administration on the 8th day to obtain the serum of each group. The intervention experiment was divided into the control group, the model group, the Pio (10% drug-containing serum) group, and the high, medium, and low concentration (20%, 15%, and 10%) GQD drug-containing serum groups. After intervention, the cell survival rate was detected by the CCK-8 method; the glucose consumption in the culture supernatant was measured; oil red O staining was performed; the levels of triglycerides (TG), total cholesterol (TC), free fatty acids (FFA), ferrous ions ( $\text{Fe}^{2+}$ ), malondialdehyde (MDA), glutathione (GSH), and glutathione peroxidase (GSH-Px) in the cells were detected by the kit method; the expression of *GPX4*, *SLC7A11*, *FTH1*, *LPCAT3*, *TFR1*, *P53*, *SAT1*, *ALOX15*, and *ACSL4* genes was detected by real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR); and the protein expression of *GPX4*, *SLC7A11*, *FTH1*, *P53*, *SAT1*, *ALOX15*, and *ACSL4* was detected by Western blotting. **Results** Network pharmacology analysis showed that the intersection targets of GQD and IR were mainly enriched in the P53 signaling, lipid metabolism, and oxidative stress pathways. The CCK-8 results indicated that  $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  PA was the optimal concentration for model establishment. The model validation results showed that the model was successfully established. After GQD intervention, compared with the model group, the cell survival rate in each concentration group of GQD and the Pio group was significantly increased ( $P < 0.05, 0.01, 0.001$ ); the glucose consumption in the cell supernatant was significantly increased ( $P < 0.05, 0.01$ ); oil red O staining showed that lipid deposition was significantly reduced, and the levels of TG, TC, and FFA were significantly decreased ( $P < 0.05, 0.01$ ); the levels of  $\text{Fe}^{2+}$  and MDA were significantly decreased ( $P < 0.05, 0.01$ ), and the levels of GSH and GSH-Px were significantly increased ( $P < 0.05, 0.01$ ); qRT-PCR results showed that the expression of *GPX4*, *SLC7A11*, and *FTH1* genes was significantly upregulated ( $P < 0.05, 0.01$ ), and the expression of *TFR1*, *LPCAT3*, *P53*, *SAT1*, *ALOX15*, and *ACSL4* genes was significantly downregulated ( $P < 0.05, 0.01$ ); Western blotting results showed that the protein expression of *GPX4*, *SLC7A11*, and *FTH1* was significantly upregulated ( $P < 0.05, 0.01$ ), and the protein expression of *P53*, *SAT1*, *ALOX15*, and *ACSL4* was significantly downregulated ( $P < 0.05, 0.01$ ). **Conclusion** GQD can improve PA-induced IR in hepatocytes, and its mechanism may be related to the regulation of lipid metabolism, inhibition of hepatocyte ferroptosis, and regulation of P53/SAT1/ALOX15 signaling pathway-related genes and protein expression.

**Key words:** Gegen Qinlian Decoction; network pharmacology; insulin resistance; iron death; P53/SAT1/ALOX15 pathway

胰岛素抵抗 (IR) 是 2 型糖尿病 (T2DM) 及其相关代谢性疾病的核心病理环节, 指机体靶组织对胰岛素敏感性下降, 导致葡萄糖摄取和利用效率降低<sup>[1]</sup>, 肝脏作为糖脂代谢关键器官, 其敏感性异常可引发糖脂代谢紊乱, 肝细胞脂质过度积累又可加剧 IR, 形成恶性循环<sup>[2]</sup>。棕榈酸 (PA) 常用于构建肝细胞 IR 模型, 通过诱导脂质积累、内质网应激等阻碍胰岛素信号传导<sup>[3-5]</sup>。铁死亡是与 IR 密切相

关的程序性细胞死亡形式, 其核心特征为铁依赖的脂质过氧化<sup>[6]</sup>, P53 作为铁死亡的关键双向调控因子, 可通过经典通路 [如调控精胺 N1-乙酰转移酶 1 (*SAT1*) /花生四烯酸 15-脂氧合酶 (*ALOX15*) 等靶基因] 精密调控铁代谢、脂质过氧化进程, 从而在细胞命运决定中扮演核心角色<sup>[7]</sup>。在神经及肝脏等多种疾病模型中, P53/SAT1/ALOX15 信号通路的激活被证实是驱动铁死亡的关键环节<sup>[8-9]</sup>。因此, 靶

向调控该通路以抑制铁死亡, 已成为改善代谢性疾病中肝细胞 IR 的潜在新策略。

葛根芩连汤(GQD)源自《伤寒论》, 由葛根、黄芩、黄连、甘草四味药组成, 传统用于治疗表证未解、里热下利之症<sup>[10]</sup>。现代药理及临床研究已将其应用拓展至 T2DM 等代谢性疾病的治疗, 并显示出良好的疗效<sup>[11-12]</sup>。网络药理学分析表明, GQD 具有“多成分-多靶点-多通路”的作用特点, 其活性成分(如葛根素、黄芩苷、小檗碱、甘草酸等)可通过调节胰岛素信号通路、AMP 活化蛋白激酶(AMPK)通路、炎症反应等途径改善 IR<sup>[13]</sup>。最新实验研究证实, GQD 能有效减轻 T2DM 模型中的肝脏损伤, 其机制与抑制铁死亡密切相关<sup>[14-16]</sup>。然而, 现有研究多集中于 GQD 通过核因子 E2 相关因子 2(Nrf2)等通路对抗铁死亡的宏观描述, 关于其是否以及如何通过干预 P53/SAT1/ALOX15 这一具体信号轴来抑制铁死亡, 进而改善肝细胞 IR, 目前尚缺乏直接和系统的证据。基于此, 本研究采用网络药理学结合实验验证的方法, 旨在系统揭示 GQD 改善肝细胞 IR 的作用机制及关键靶点, 重点探讨其是否通过抑制 P53/SAT1/ALOX15 通路减少铁死亡、改善肝细胞 IR, 为 GQD 防治 IR 奠定理论基础, 以期推动其现代临床应用的拓展。

## 1 材料

### 1.1 实验动物

60 只 SPF 级雄性 SD 大鼠, 体质量(200±10)g, 购自河南斯克贝斯生物科技股份有限公司, 实验动物生产许可证号 SCXK 豫 2020-0005, 经中山大学南昌研究院伦理委员会审查批准(批准号 SYSUNC-IACUC-20230002)。

### 1.2 细胞株

AML-12 细胞购自苏州海星生物科技有限公司, 批号 TCM-G709, 培养在含 10%胎牛血清(FBS)的 DMEM/F12 细胞培养基中, 放入 37 °C、5%CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中, 待细胞密度达 80%以上时, 用 0.25%胰酶消化细胞, 传代的频率为每次 1~2 d。

### 1.3 药物及主要试剂

葛根(批号 240701)、黄芩(批号 240501)、黄连(批号 240601)、甘草(批号 240801), 生产许可证号(赣 20150019), 所有药材均由江西百仁中药饮片有限公司提供, 经江西中医药大学药学院药理教研室邓可众教授鉴定, 其性状及质量均符合《中国药典》2025 年版中的相关规定, 参考本课题组前期报道方法

制备 GQD 水提液(生药 1 g·mL<sup>-1</sup>)<sup>[17]</sup>, 超高效液相色谱-质谱(UPLC-MS)法检测 GQD 含药血清中多个有效成分, 进行质控, 具体详见文献报道<sup>[18]</sup>。

AML-12 细胞专用培养基(海星生物科技有限公司, 批号 CM-0602); 胰岛素(Sigma 公司, 批号 I3536); 盐酸吡格列酮(Pio, 德源药业股份有限公司, 批号 2006015205); PA(上海麦克林生化科技股份有限公司, 批号 P799157); 氢氧化钠(西陇科学股份有限公司, 批号 240514A2); 脱脂奶粉(德国 BD 公司, 批号 232100); CCK-8 试剂盒(亚科因生物技术有限公司, 批号 BMU106-CN); 油红 O 染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司, 批号 G1262); 葡萄糖、三酰甘油(TG)、总胆固醇(TC)、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽(GSH)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)试剂盒(南京建成生物工程研究所有限公司, 批号 A154-1-1、A110-2-1、A111-2-1、A003-4-1、A006-2-1、A005-1-2); 游离脂肪酸(FFA)试剂盒(亚科因生物技术有限公司, 批号 KTB2230); Fe<sup>2+</sup>试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司, 批号 E-BC-K881-M); BCA 蛋白定量试剂盒(康为世纪生物科技股份有限公司, 批号 CW0014S); RNA 提取、逆转录、qPCR 试剂盒(思科捷生物技术有限公司, 批号 AC0202、AG0305、AH0105); SAT1 抗体(武汉三鹰生物技术有限公司, 批号 10708-1-AP); P53、ALOX15、谷胱甘肽过氧化物酶 4(GPX4)、溶质载体家族 7(SLC7A11)、铁蛋白重链 1(FTH1)、长链脂酰辅酶 A 合成酶 4(ACSL4)抗体(美国 Abcam, 批号 ab241566、ab244205、ab125066、ab307601、ab75973、ab155282);  $\beta$ -actin、Akt、p-Akt、胰岛素受体底物 1(IRS-1)、p-IRS-1 抗体(美国 Cell Signaling Technology, 批号 2970T、9272S、4060T、2382S、2381S)。

### 1.4 主要仪器

CLM-170B-8-CN 型二氧化碳培养箱(上海艺斯高公司); DMil 型倒置显微镜(德国 Leica 公司); SpectraMax 190 型多功能酶标仪(美国 Molecular Devices 公司); CFX 96 Touch 型实时荧光定量 PCR 仪、ChemiDoc XRS+型凝胶成像分析系统(美国 Bio-Rad 公司); 5430R 型高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司)。

## 2 方法

### 2.1 网络药理学分析

2.1.1 GQD 靶点筛选 利用 TCMSP (<https://www.>

tcmsp-e.com/#/database)、SwissTarget Prediction 以及 Similarity Ensemble Approach (SEA) 等在线数据库, 以口服生物利用度 (OB)  $\geq 30\%$  及类药性 (DL)  $\geq 0.18$  为筛选条件, 分别检索了葛根、黄芩、黄连及甘草 4 味药材的活性成分及其对应作用靶点, 随后借助 UniProt 数据库对上述化合物进行功能注释, 并将其对应到相应的靶基因信息。

**2.1.2 胰岛素抵抗靶点筛选** 以“insulin resistance”为检索词, 分别从 GeneCards (<http://www.genecards.org/>)、OMIM (<https://omim.org/>)、PioarmGKB (<http://www.Pioarmgkb.org/>)、TTD (<http://db.idrblab.net/ttd/>) 以及 DrugBank (<http://www.drugbank.com/>) 等数据库中系统检索, 将相关靶点进行韦恩图分析, 以筛选活性成分与疾病的交集靶点。

**2.1.3 蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络的构建** 将获得的交集靶点导入 STRING 在线数据库 (<https://cn.string-db.org/>), 设置物种为 *Homo sapiens*, 筛选条件为相互作用置信度分数  $> 0.7$ , 并去除所有孤立蛋白质节点, 以构建与药物干预相关的 PPI 网络。随后将该 PPI 网络以 TSV 格式下载后导入 Cytoscape 3.10.0 软件中, 利用其中的 CytoHubba 插件按照度值对节点进行排序和筛选, 从而挖掘关键靶点; 网络图中节点的大小及颜色深浅用于表征其度数值高低。

**2.1.4 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析** 使用 DAVID 数据库 (<https://davidbioinformatics.nih.gov>) 对共有靶点进行 GO 功能与 KEGG 通路富集分析, 以 *P* 值为筛选条件, 绘制 GO 前 10 项条形图和 KEGG 前 20 项气泡图并进行可视化展示。

## 2.2 细胞实验研究

**2.2.1 含药血清制备** 根据课题组前期方法<sup>[19]</sup>, 将 60 只大鼠适应性喂养 1 周后, 随机分为空白组 30 只、GQD 组 20 只、Pio (阳性药) 组 10 只, 各组均按  $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$  ig 给药, 其中, GQD 组大鼠给予上述 GQD 水提液 (生药  $10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), Pio 组大鼠按  $2.7 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  剂量 ig 给予 Pio 水溶液; 空白组大鼠按同等条件 ig 蒸馏水。每组大鼠按照每天 2 次, 连续 ig 7 d, 第 8 天末次给药后 0.5 h 腹主动脉取血, 制得各组合药血清, 临用时配制成高、中、低浓度。

**2.2.2 PA 联合胰岛素诱导 IR 模型的建立** PA 的溶解参照文献报道<sup>[20]</sup>方法进行, 采用 CCK-8 法确

定 PA 的安全作用浓度, 将  $100 \mu\text{L}$  的 AML-12 细胞悬液 ( $1 \times 10^4$  个) 接种于 96 孔培养板,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{ CO}_2$  培养箱培养 24 h, 给予不同浓度的 PA ( $25$ 、 $50$ 、 $75$ 、 $100$ 、 $150$ 、 $200$ 、 $250$ 、 $300 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 处理细胞, 每组 6 个复孔, 依次孵育 12、24、48 h, 对照组不加药, 空白组不接种细胞。加入  $100 \mu\text{L}$  含有 CCK-8 的基础培养基,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  孵育 60 min, 随后使用酶标仪在  $450 \text{ nm}$  波长读取吸光度 (*A*) 值, 计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

确定 PA 安全浓度范围后, 进行模型验证实验。将处于对数生长期的 AML-12 细胞按照  $1 \times 10^5$  个接种于 6 孔培养板, 每孔 2 mL, 分为对照组、胰岛素 ( $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )<sup>[20]</sup>组、PA ( $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 组、模型 (胰岛素  $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ <sup>[20]</sup>+PA  $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 组, 对照组不加药, 胰岛素刺激 12 h 后给予 PA, PA 干预 24 h 后, 通过试剂盒法检测细胞内葡萄糖消耗量以及 Western blotting 法检测 p-Akt 和 p-IRS-1 蛋白表达水平作为模型成功的评价指标。

使用 BCA 法测定蛋白浓度, 并严格参照葡萄糖试剂盒的操作说明对细胞进行处理。使用 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白; 按照 BCA 蛋白定量试剂盒的操作步骤测定蛋白浓度并计算上样量, 加入适量蛋白上样缓冲液, 煮沸使蛋白变性, 选择  $10\%$  的 SDS-PAGE 凝胶分离蛋白, 电泳时先以  $70 \text{ V}$  使上层胶跑至分层, 再以  $120 \text{ V}$  待溴酚蓝刚跑出时终止电泳; 随后  $300 \text{ mA}$ 、 $70 \text{ min}$  电转至膜上后, 用  $5\%$  脱脂牛奶摇床封闭 2 h, TBST 清洗膜后分别加入一抗 (Akt、p-Akt、IRS、p-IRS), 在  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  条件下摇床孵育过夜, 次日洗涤后加入二抗, 于室温孵育约 1 h。TBST 洗 3 次, 每次 10 min, 加入 ECL 化学发光试剂, 在凝胶成像系统中进行曝光成像, 采用 Image J 软件对目标条带与内参 ( $\beta$ -actin) 条带进行灰度分析, 计算目标蛋白的相对表达量。

**2.2.3 CCK-8 法筛选给药浓度** 将  $100 \mu\text{L}$  的细胞悬液 ( $1 \times 10^4$  个) 接种于 96 孔培养板,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{ CO}_2$  培养箱培养 24 h; 分别用不同浓度的 GQD 含药血清 ( $10\%$ 、 $15\%$ 、 $20\%$ 、 $25\%$ 、 $30\%$ )、Pio 含药血清 ( $10\%$ 、 $15\%$ 、 $20\%$ 、 $25\%$ 、 $30\%$ ) 处理 24 h。

**2.2.4 CCK-8 法检测 GQD 含药血清对细胞存活率的影响** 将  $100 \mu\text{L}$  的细胞悬液 ( $1 \times 10^4$  个) 接种于 96 孔培养板,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{ CO}_2$  培养箱培养 24 h, 分为对照组 (给予空白血清)、模型 ( $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  胰

胰岛素刺激 12 h 后, 给予 200  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  PA 处理 24 h) 组和 GQD 含药血清高、中、低浓度 (20%、15%、10%) 组 (100  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$  胰岛素刺激 12 h 后, 给予 200  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  PA 和含药血清处理 24 h), 每组 6 个复孔, 孵育 24 h, 加入 100  $\mu\text{L}$  含有 CCK-8 的基础培养基, 37  $^{\circ}\text{C}$ 、孵育 60 min, 随后使用酶标仪在 450 nm 波长读取吸光度 ( $A$ ) 值, 计算细胞存活率。

**2.2.5 油红 O 染色** 将处于生长对数期的 AML-12 细胞按照每孔  $1\times 10^5$  个种于 6 孔培养板, 每孔 2 mL, 培养约 12 h 待其充分贴壁后, 分为对照组 (给予空白血清)、模型 (100  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$  胰岛素刺激 12 h 后, 给予 200  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  PA 和空白血清处理 24 h) 组、Pio (10% 含药血清) 组和 GQD 含药血清高、中、低浓度 (20%、15%、10%) 组, Pio 和 GQD 含药血清组均用 100  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$  胰岛素刺激 12 h 后, 给予 200  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  PA 和含药血清处理 24 h, 药物干预 24 h 后, 吸弃旧液, PBS 洗 2 次, 加油红 O 固定液固定 30 min, 弃去固定液, 蒸馏水洗 2 次, 弃去后加入新配制好的油红 O 染色液, 避光浸染 20 min。弃去染色液, 蒸馏水清洗 4 次, 直到无多余染色脱出, 先加入适量蒸馏水覆盖细胞, 在显微镜下进行观察并拍照留存图像。随后弃去上清, 加入异丙醇反复吹打使细胞内脂滴充分溶解, 轻轻混匀后, 使用酶标仪在 510 nm 波长处读取吸光度 ( $A$ ) 值。

**2.2.6 葡萄糖消耗量检测** 根据“2.2.5”项方法进行细胞、接种及加药, 药物干预 24 h 后, 收取上清液, 严格按照葡萄糖测定试剂盒测定葡萄糖消耗量。

**2.2.7 生化指标检测** 根据“2.2.5”项方法进行细胞、接种及加药, 药物干预 24 h 后, 采用 BCA 法测定蛋白含量, 并严格参照 TG、TC、FFA、 $\text{Fe}^{2+}$ 、MDA、GSH 及 GSH-Px 等试剂盒的操作说明对细胞进行相应处理。

**2.2.8 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 法检测细胞 GPX4、SLC7A11、FTH1、溶血卵磷脂酰基转移酶 3 (LPCAT3)、转铁蛋白受体 1 (TFRI)、ACSL4、P53、SAT1、ALOX15 mRNA 表达** 根据“2.2.5”项方法进行细胞接种及加药, 药物干预 24 h 后, 根据试剂盒说明, 提取各组细胞总 RNA, 检测各组 RNA 浓度并逆转录合成 cDNA, 随后进行 qRT-PCR 检测, 以 GAPDH 作为内参基因。扩增循环方案如下: 95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 30 s, 95  $^{\circ}\text{C}$  变性 10 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s, 40 个循环, 扩增结束后, 根据目的基因与内

参的  $C_t$  值采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  方法计算相对表达量, 所用引物由北京鼎国兴盛有限公司负责设计与合成, 其具体序列见表 1。

表 1 基因引物序列

Table 1 Gene primer sequences

引物名称	序列 (5'→3')
GPX4	F-GCCTGGATAAGTACAGGGGTT R-CATGCAGATCGACTAGCTGAG
SLC7A11	F-GTGGAACTGCTCGTAATACGC R-CGTGCTATTTAGGACCATCACC
FTH1	F-GCTGGGGAATTTGCACTCCAT R-CTGTCGGTATTTCTGGGCCTC
LPCAT3	F-CTACCCGTTGGCTCTGTTTTAC R-TGAAGCACGACACATAGCAAG
TFRI	F-GTGAAACTGGCTGAAACGGAG R-GGTCTGCCAATATAAGCGAGA
ACSL4	F-CCTGAGGGGCTTGAAATTCAC R-GTTGGTCTACTTGGAGGAACG
P53	F-CTCTCCCCCGCAAAGAAAAA R-CGGAACATCTCGAAGCGTTTA
SAT1	F-GAGAACACCCCTTCTACCACT R-GCCTCTGTAATCACTCATCACGA
ALOX15	F-CTGTTACCGATGGGTTTCAGGG R-CGAAATCGCTGGTCTACAGGG
GAPDH	F-GGTGAAGGTCGGTGTGAACG R-CTCGTCTCTGGAAGATGGTG

**2.2.9 Western blotting 检测 AML-12 细胞中 P53/SAT1/ALOX15 信号通路相关蛋白表达** 根据“2.2.5”项方法进行细胞接种及加药, 药物干预 24 h 后, 按照“2.2.3”项下的 Western blotting 法分别对 P53、SAT1、ALOX15、ACSL4、GPX4、SLC7A11、FTH1 的蛋白水平进行检测。

**2.2.10 统计学分析** 实验结果采用  $\bar{x}\pm s$  表示, 采用 GraPioPad Prism 8.0 软件对数据进行分析与可视化构建, 通过单因素方差分析比较组间差异, 通过 Tukey 检验进行显著性分析。

### 3 结果

#### 3.1 网络药理学结果

**3.1.1 GQD 治疗 IR 的靶点及网络分析** 如图 1 所示, 获得 GQD 活性成分 139 个, 对应药物靶点 504 个; 从 GeneCards、OMIM、PioarmGKB、TTD 及 DrugBank 等数据库中共获得与 IR 疾病相关的基因 2 984 个。将药物作用靶点与疾病相关基因取交集分析, 得到 284 个共同靶点, 并据此绘制韦恩图。随后, 将这些交集靶点及其对应的活性成分和疾病信息

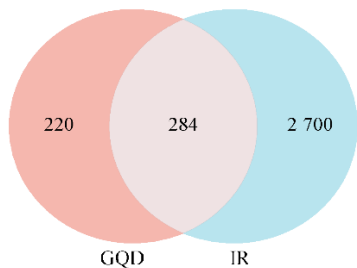
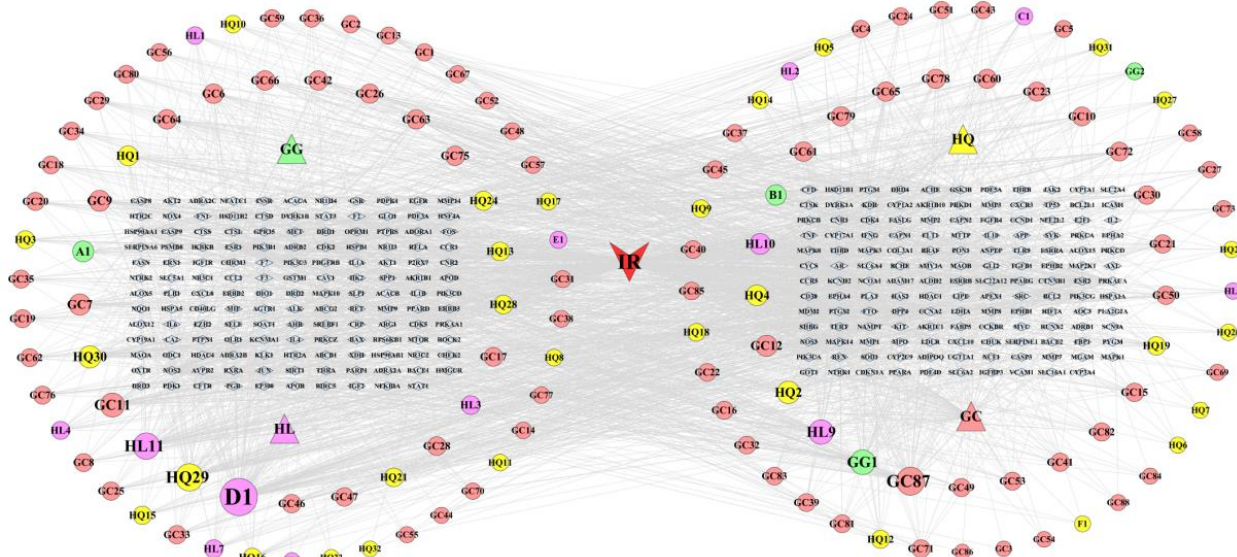


图 1 GQD 与 IR 共同靶点韦恩图

Fig. 1 Wayne diagram of common target of GQD and IR



GG-葛根; HQ-黄芩; HL-黄连; GC-甘草。

GG-*Pueraria lobate*; HQ-*Scutellaria baicalensis*; HL-*Coptis chinensis*; GC-*Glycyrrhiza uralensis*.

图 2 “成分-靶点-疾病”网络图

Fig. 2 “Component-Target-Disease” network diagram

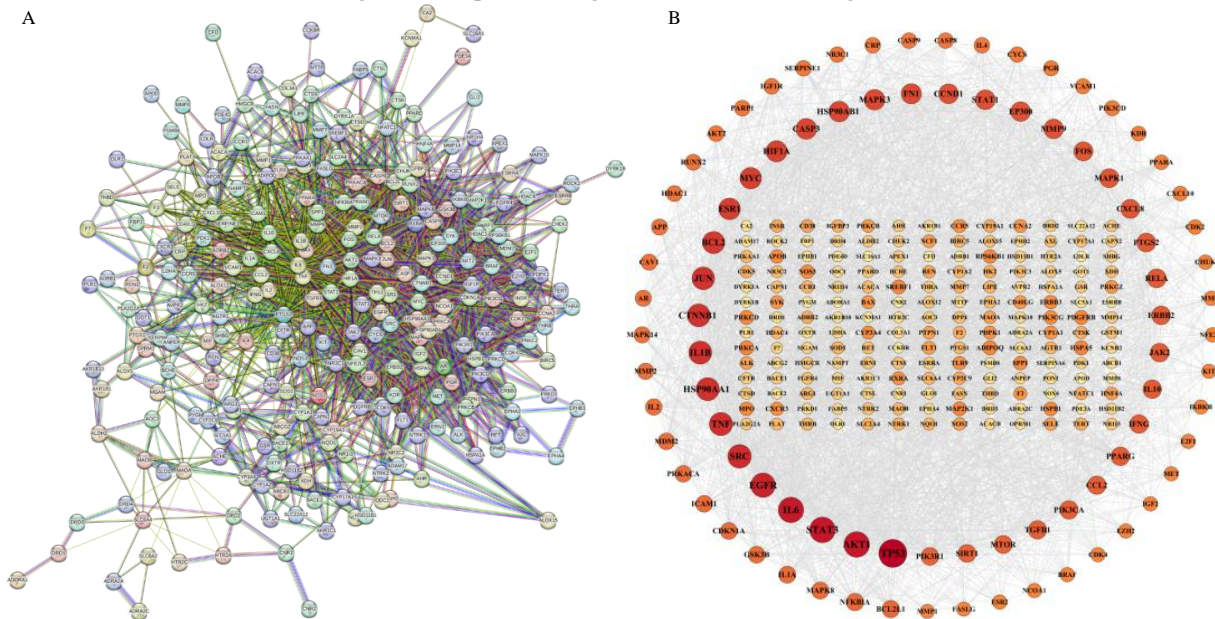


图 3 PPI 网络图 (A) 及拓扑分析 (B)

Fig. 3 PPI network diagram (A) and topological analysis (B)

导入 Cytoscape 3.10.0 软件进行可视化, 构建“成分-靶点-疾病”关联网络。网络拓扑分析结果显示, 该网络共包含 423 个节点和 2 388 条连接边, 见图 2。

3.1.2 PPI 网络构建与关键靶点筛选 将筛选得到的 284 个交集靶点导入 STRING 数据库进行 PPI, 构建 PPI 网络, 该 PPI 网络共包含 118 个节点和 2 219 条连接关系。随后, 利用 Cytoscape 中的 CytoHubba 插件, 以度值为指标对网络进行拓扑分析并筛选核心靶点, 结果见图 3。

**3.1.3 GO 功能与 KEGG 通路富集分析** 在 DAVID 平台上对候选作用靶点进行 GO 功能富集分析, 共获得 1 485 个显著富集条目, 其中生物学过程 (BP) 1 089 项、细胞组分 (CC) 121 项、分子功能 (MF) 275 项。为进一步阐明 GQD 干预 IR 的相关信号转导机制, 对同一靶点集开展 KEGG 通路富集分析,

共鉴定出 203 条显著通路; 随后依据  $P$  值大小对通路进行排序, 选取前 20 条绘制气泡图进行可视化展示, 综合靶点分布与 KEGG 通路富集结果提示, P53 信号通路可能成为 GQD 干预 IR 的关键机制之一, 其在 IR 的发生发展中具有重要作用, 见图 4。

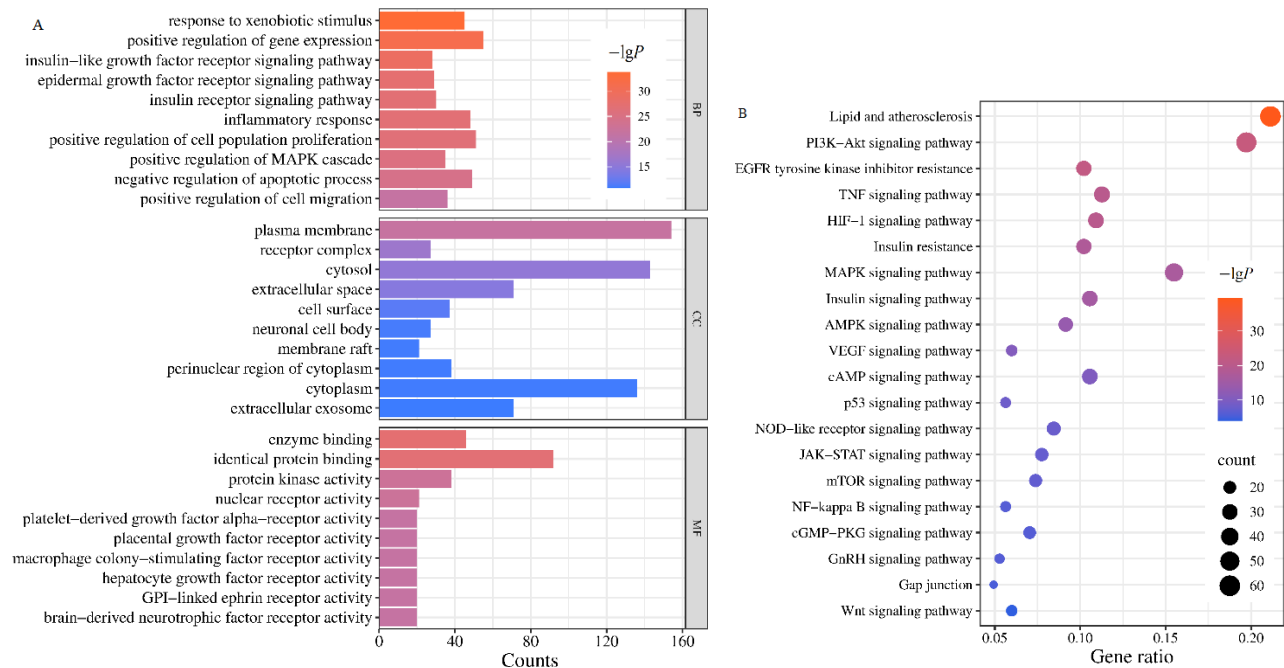


图 4 GO 富集分析 (A) 与 KEGG 通路富集分析 (B) 气泡图

Fig. 4 GO enrichment analysis (A) and KEGG pathway enrichment analysis (B) bubble map

## 3.2 细胞实验结果

**3.2.1 PA 联合胰岛素诱导肝细胞 IR 模型的建立** 采用 CCK-8 法检测发现, 与对照组相比, PA 浓度  $\geq 250 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时, AML-12 细胞存活率显著降低 ( $P < 0.01$ ), 且呈时间相关性。综合考虑, 确定

$200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  PA 处理 24 h 为最佳造模条件, 此时细胞存活率  $> 80\%$ , 见表 2。

如图 5-A 所示, 与对照组相比, 胰岛素组葡萄糖消耗量显著升高 ( $P < 0.001$ ), 提示单纯胰岛素刺激可诱导细胞代谢响应; 与胰岛素组比较, PA 组

表 2 PA 对 AML-12 细胞存活率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Table 2 Effect of PA on survival rate of AML-12 cells ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	浓度/ ( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	细胞存活率/%		
		12 h	24 h	48 h
对照	—	98.04 $\pm$ 0.89	98.27 $\pm$ 0.08	95.80 $\pm$ 1.16
PA	25	97.12 $\pm$ 2.21	96.01 $\pm$ 0.63	95.67 $\pm$ 0.78
	50	94.19 $\pm$ 1.98	98.42 $\pm$ 0.44	94.88 $\pm$ 0.64
	75	93.68 $\pm$ 3.02	97.28 $\pm$ 0.54	93.54 $\pm$ 1.19
	100	96.38 $\pm$ 0.30	92.53 $\pm$ 0.28	89.18 $\pm$ 0.63
	150	93.81 $\pm$ 0.74	90.17 $\pm$ 2.76	87.79 $\pm$ 1.12*
	200	85.81 $\pm$ 3.18	90.34 $\pm$ 1.16*	84.66 $\pm$ 0.35**
	250	74.93 $\pm$ 0.42**	69.23 $\pm$ 1.95**	75.33 $\pm$ 1.81**
300	68.19 $\pm$ 2.23**	59.73 $\pm$ 2.10**	59.55 $\pm$ 4.56**	

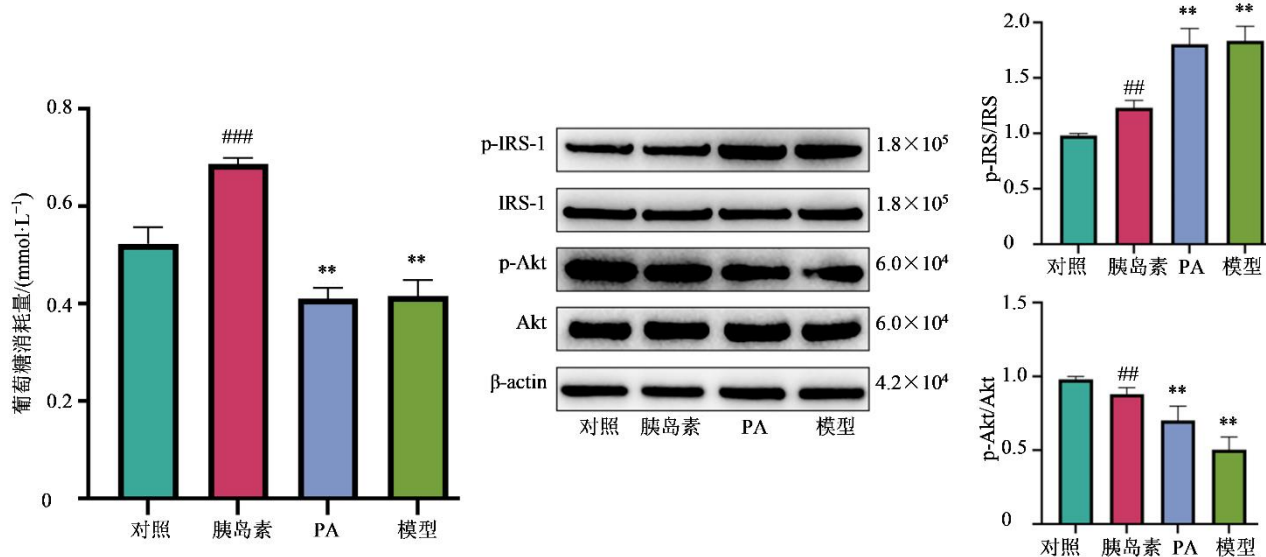
与对照组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$ 。

\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  vs control group.

和模型组葡萄糖消耗量显著降低 ( $P < 0.01$ ), 表明 PA 处理可显著抑制胰岛素介导的葡萄糖代谢效应, 为 IR 模型构建提供了功能学依据。

Western blotting 结果 (图 5-B) 显示, 与对照组相比, 胰岛素组细胞内 p-IRS-1/IRS-1 值显著升高 ( $P < 0.01$ ), 而 p-Akt/Akt 值显著降低 ( $P < 0.01$ ); PA 组及模型组的 p-IRS-1/IRS-1 值均显著高于胰岛

素组 ( $P < 0.01$ ), 且 2 组 p-Akt/Akt 值均显著低于对照组及胰岛素组 ( $P < 0.01$ ), 其中模型组 p-Akt/Akt 值下降更为明显, 表明单纯胰岛素刺激可激活 IRS-1/Akt 通路, 而给予胰岛素刺激再给予 PA 处理后, 可更显著抑制 Akt 的磷酸化, 综合葡萄糖释放及信号通路蛋白表达结果, 本研究成功构建了 PA 联合胰岛素诱导的肝细胞 IR 模型。



与对照组比较: <sup>##</sup> $P < 0.01$  <sup>###</sup> $P < 0.001$ ; 与胰岛素组比较: <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ .  
<sup>##</sup> $P < 0.01$  <sup>###</sup> $P < 0.001$  vs control group; <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  vs insulin group.

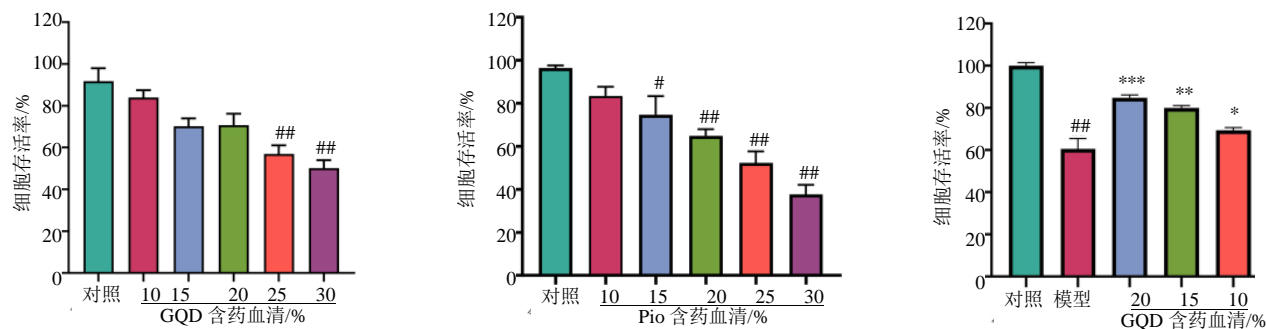
图 5 PA 联合胰岛素诱导肝细胞 IR 模型的构建与验证 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Fig. 5 Construction and verification of hepatocyte IR model induced by PA combined with insulin ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

3.2.2 各组药物对细胞活性的影响 与对照组相比, GQD 含药血清在 10%、15%、20%浓度下对细胞活力无显著影响, 而 25%及以上浓度则显著降低存活率 ( $P < 0.01$ ); Pio 含药血清在 15%及以上浓度时即显著抑制细胞活力 ( $P < 0.05, 0.01$ ), 基于上述结果, 本研究选取 20%、15%、10%作为 GQD 含药

血清的高、中、低浓度组, 选取 10%作为 Pio 的给药浓度进行后续干预实验。

与对照组相比, 模型组细胞存活率显著降低 ( $P < 0.01$ ); 与模型组相比, 各浓度 GQD 含药血清干预后, 细胞存活率均显著升高 ( $P < 0.05, 0.01, 0.001$ ), 且呈一定浓度相关性, 提示 GQD 含药血清具有细胞保



与对照组比较: <sup>#</sup> $P < 0.05$  <sup>##</sup> $P < 0.01$ ; 与模型组比较: <sup>\*</sup> $P < 0.05$  <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  <sup>\*\*\*</sup> $P < 0.001$ .  
<sup>#</sup> $P < 0.05$  <sup>##</sup> $P < 0.01$  vs control group; <sup>\*</sup> $P < 0.05$  <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  <sup>\*\*\*</sup> $P < 0.001$  vs model group.

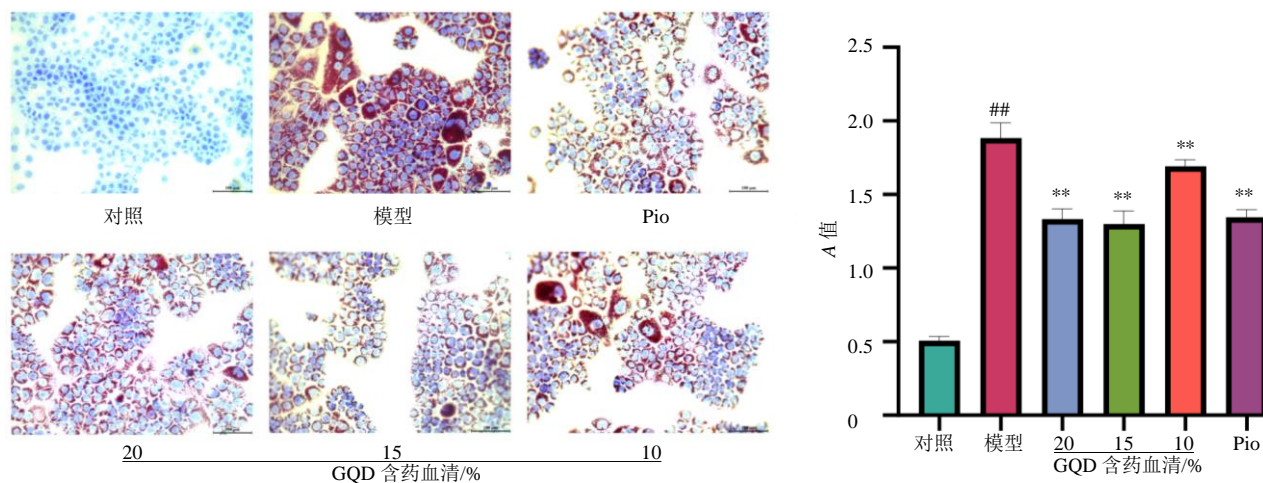
图 6 GQD、Pio 含药血清对 AML-12 细胞存活率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Fig. 6 Effects of GQD, Pio containing serum on survival rate of AML-12 cells ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

护作用。

**3.2.3 油红 O 染色** 油红 O 染色结果显示, 对照组细胞内几乎无脂滴沉积, 染色呈浅淡蓝色; 模型组细胞内可见大量红染脂滴聚集, 脂滴体积大且分布密集, 提示 PA 联合胰岛素成功诱导肝细胞脂肪变性。与模型组相比, Pio 组及 10%、15%、20% GQD 含药血清组细胞内脂滴数量及体积均明显减少, 染色程度显著减轻, 其中 15%

GQD 含药血清组脂滴改善效果与 Pio 组相近。油红 O 萃取后 A 值定量分析进一步证实, 与对照组相比, 模型组细胞内脂质含量显著升高 ( $P < 0.01$ ); 与模型组相比, 各浓度 GQD 含药血清及 Pio 干预后, 细胞内脂质含量均显著降低 ( $P < 0.01$ ), 且呈一定浓度相关性, 提示 GQD 含药血清可有效抑制 PA 诱导的肝细胞脂质沉积, 改善脂肪变性。见图 7。

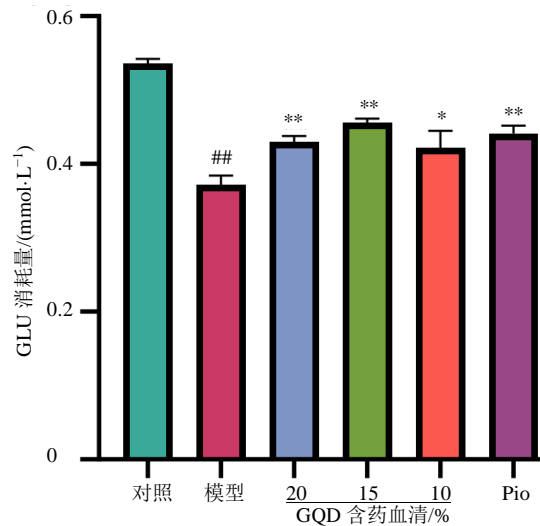


与对照组比较: ## $P < 0.01$ ; 与模型组比较: \*\* $P < 0.01$ 。  
## $P < 0.01$  vs control group; \*\* $P < 0.01$  vs model group.

图 7 GQD 含药血清对 PA 诱导的 AML-12 细胞脂肪变性的影响 (油红 O 染色,  $\times 200$ ,  $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

Fig. 7 Effect of GQD-containing serum on PA-induced steatosis in AML-12 cells (oil red O staining,  $\times 200$ ,  $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

**3.2.4 GQD 对 IR 肝细胞葡萄糖消耗的影响** 与对照组比较, 模型组的葡萄糖消耗量显著降低 ( $P < 0.01$ ), 提示 IR 模型建立成功; 与模型组相比, GQD 各浓度组细胞葡萄糖消耗量均升高 ( $P < 0.05$ ), 其中中浓度组效果最好, 提示 GQD 增加了 AML-12 细胞的糖代谢能力, 且与 Pio 组相比无统计学差异, 结果见图 8。提示 GQD 含药血清可有效改善 PA 诱导的肝细胞 IR, 逆转葡萄糖代谢异常。



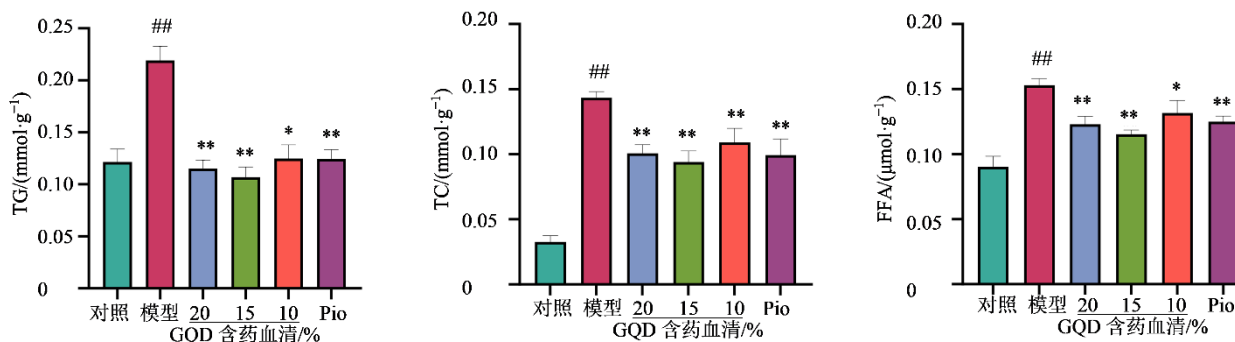
与对照组比较: ## $P < 0.01$ ; 与模型组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$ 。  
## $P < 0.01$  vs control group; \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  vs model group.

图 8 GQD 对 AML-12 细胞葡萄糖消耗量的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )

Fig. 8 Effect of GQD on glucose consumption in AML-12 cells ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )

**3.2.5 GQD 对 IR 肝细胞脂质积累的影响** 与对照组相比, 模型组 TG、TC、FFA 水平均显著升高 ( $P < 0.01$ ); 与模型组相比, 10%、15%、20% GQD 含药血清干预后, TG、TC 及 FFA 水平均显著降低 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ), 且呈一定浓度相关性, Pio 组也表现出类似的降脂效应 ( $P < 0.01$ )。结果表明, GQD 含药血清可有效改善 PA 诱导的肝细胞脂质代谢紊乱, 抑制脂质异常积累。见图 9。

**3.2.6 GQD 对 IR 肝细胞铁死亡相关指标的影响** 与对照组相比, 模型组  $Fe^{2+}$  及 MDA 水平显著升高 ( $P < 0.01$ ), 而 GSH 及 GSH-Px 水平显著降低 ( $P <$



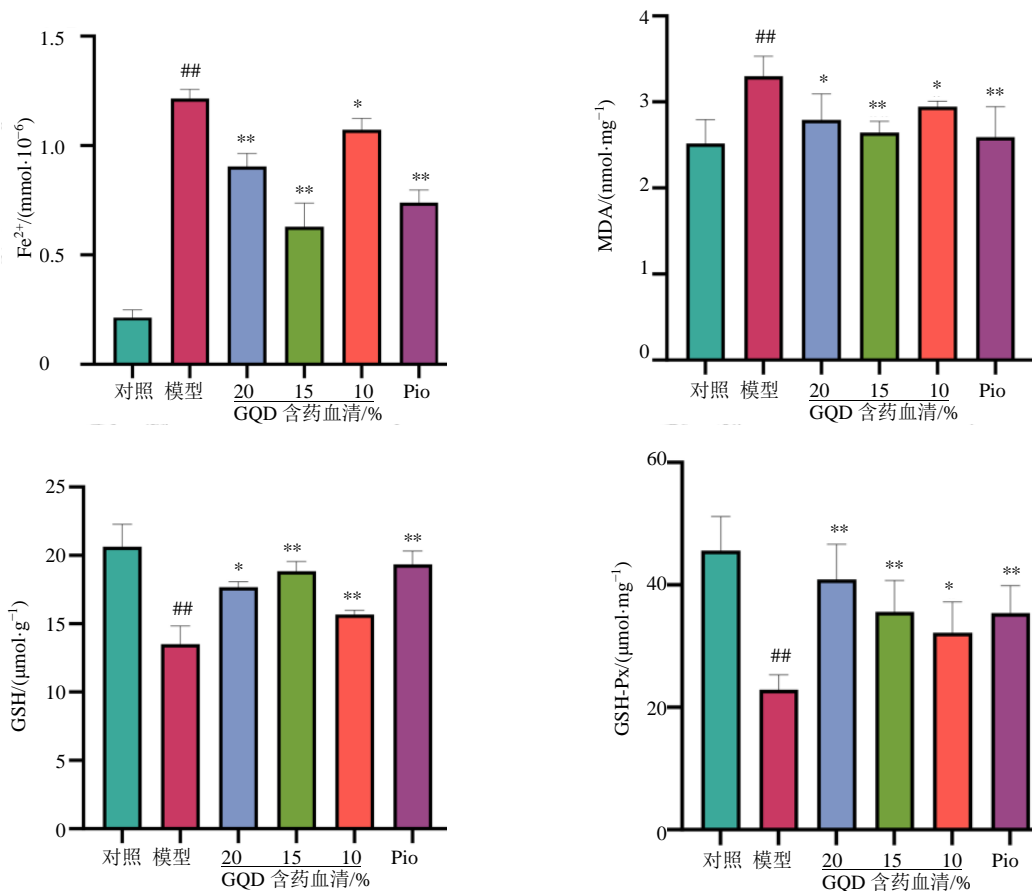
与对照组比较: <sup>##</sup>*P*<0.01; 与模型组比较: <sup>\*</sup>*P*<0.05 <sup>\*\*</sup>*P*<0.01。  
<sup>##</sup>*P*<0.01 vs control group; <sup>\*</sup>*P*<0.05 <sup>\*\*</sup>*P*<0.01 vs model group.

图 9 GQD 含药血清对 PA 诱导的 AML-12 细胞脂质代谢紊乱的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Fig. 9 Effect of GQD-containing serum on PA-induced lipid metabolism disorder in AML-12 cells ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

0.01), 提示 PA 诱导可触发肝细胞铁死亡; 与模型组相比, 10%、15%及 20% GQD 含药血清干预后, Fe<sup>2+</sup>及 MDA 水平均显著降低 (*P*<0.05、0.01), 同时 GSH 及 GSH-Px 水平显著回升 (*P*<0.05、0.01);

Pio 组也表现出类似的调控效应 (*P*<0.01), 结果见图 10。结果表明, GQD 含药血清可有效抑制 PA 诱导的肝细胞铁死亡, 其机制可能与降低 Fe<sup>2+</sup>过载、减轻脂质过氧化及恢复抗氧化酶活性相关。



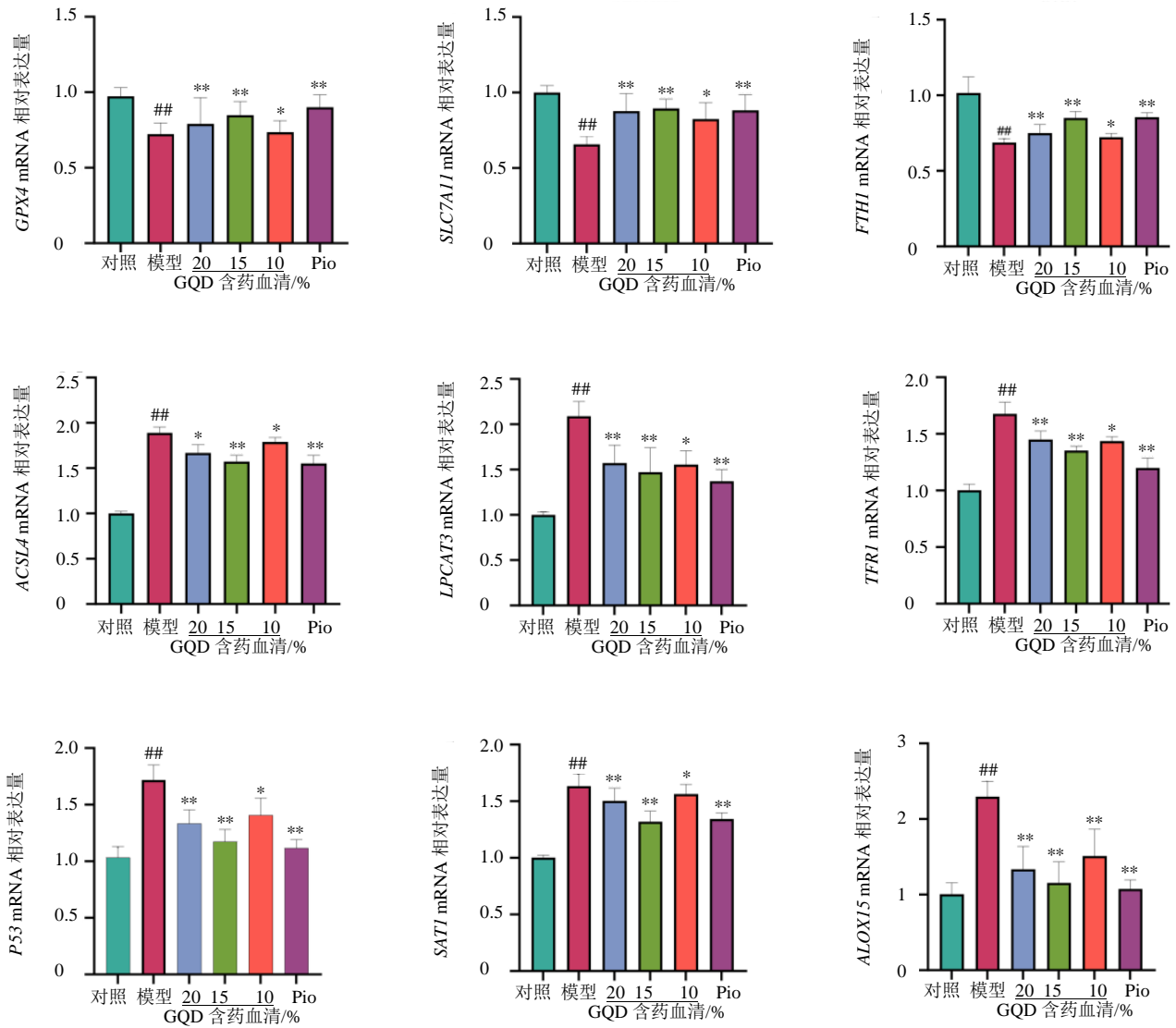
与对照组比较: <sup>##</sup>*P*<0.01; 与模型组比较: <sup>\*</sup>*P*<0.05 <sup>\*\*</sup>*P*<0.01。  
<sup>##</sup>*P*<0.01 vs control group; <sup>\*</sup>*P*<0.05 <sup>\*\*</sup>*P*<0.01 vs model group.

图 10 GQD 含药血清对 PA 诱导的 AML-12 细胞铁死亡相关指标的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Fig. 10 Effects of GQD-containing serum on ferroptosis-related indicators in PA-induced AML-12 cells ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

**3.2.7 GQD 对 AML-12 细胞 GPX4、SLC7A11、FTH1、ACSL4、TFRI、LPCAT3、P53、SAT1、ALOX15 mRNA 表达的影响** 为进一步探讨 GQD 含药血清调控肝细胞铁死亡的分子机制, 采用 qRT-PCR 技术检测了铁死亡及 P53/SAT1/ALOX15 通路相关基因的 mRNA 表达。与对照组相比, 模型组铁死亡关键调控基因 GPX4、SLC7A11、FTH1 的 mRNA 表达显著降低 ( $P < 0.01$ ), 而铁死亡促进基因 ACSL4、LPCAT3、TFRI 及通路关键基因 P53、SAT1、ALOX15 的 mRNA 表达显著升高 ( $P < 0.01$ ), 提示 PA 诱导可通过激活 P53/SAT1/

ALOX15 通路, 进而触发肝细胞铁死亡。与模型组相比, 10%、15%、20% GQD 含药血清干预后, GPX4、SLC7A11、FTH1 的 mRNA 表达均显著回升 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ), 同时 ACSL4、LPCAT3、TFRI、P53、SAT1、ALOX15 的 mRNA 表达均显著降低 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ); Pio 组也表现出类似的调控效应 ( $P < 0.01$ )。结果表明, GQD 含药血清可通过抑制 P53/SAT1/ALOX15 通路的过度激活, 上调 GPX4 等抗氧化基因表达, 下调 ACSL4、ALOX15 等铁死亡促进基因表达, 从而有效抑制 PA 诱导的肝细胞铁死亡。见图 11。



与对照组比较: ## $P < 0.01$ ; 与模型组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$ 。

## $P < 0.01$  vs control group; \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  vs model group.

图 11 GQD 含药血清对 PA 诱导的 AML-12 细胞铁死亡及 P53/SAT1/ALOX15 通路相关基因表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

Fig. 11 Effects of GQD-containing serum on PA-induced ferroptosis and expression of P53/SAT1/ALOX15 pathway-related genes in AML-12 cells ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

**3.2.8 GQD 对 AML-12 细胞 P53/SAT1/ALOX15 信号通路相关蛋白表达的影响** 与对照组相比,模型组中 P53、SAT1、ALOX15、ACSL4 蛋白的相对表达量显著升高 ( $P < 0.001$ ),而 GPX4、FTH1、SLC7A11 蛋白的相对表达量显著降低 ( $P < 0.001$ ),提示 PA 诱导可显著激活 P53/SAT1/ALOX15 通路,同时抑制铁死亡相关的抗氧化及铁储存蛋白表达。与模型组相比,10%、15%、20% GQD 含药血清干预后,P53、SAT1、ALOX15、ACSL4 蛋白的表达

均显著降低 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ),而 GPX4、FTH1、SLC7A11 蛋白的表达均显著回升 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ );Pio 组也表现出类似的调控效应 ( $P < 0.01$ )。结果表明,GQD 含药血清可通过抑制 P53/SAT1/ALOX15 信号通路的过度激活,上调 GPX4、FTH1、SLC7A11 等铁死亡抑制蛋白表达,下调 ALOX15、ACSL4 等铁死亡促进蛋白表达,从而在蛋白水平进一步验证了其对 PA 诱导肝细胞铁死亡的保护作用。见图 12。

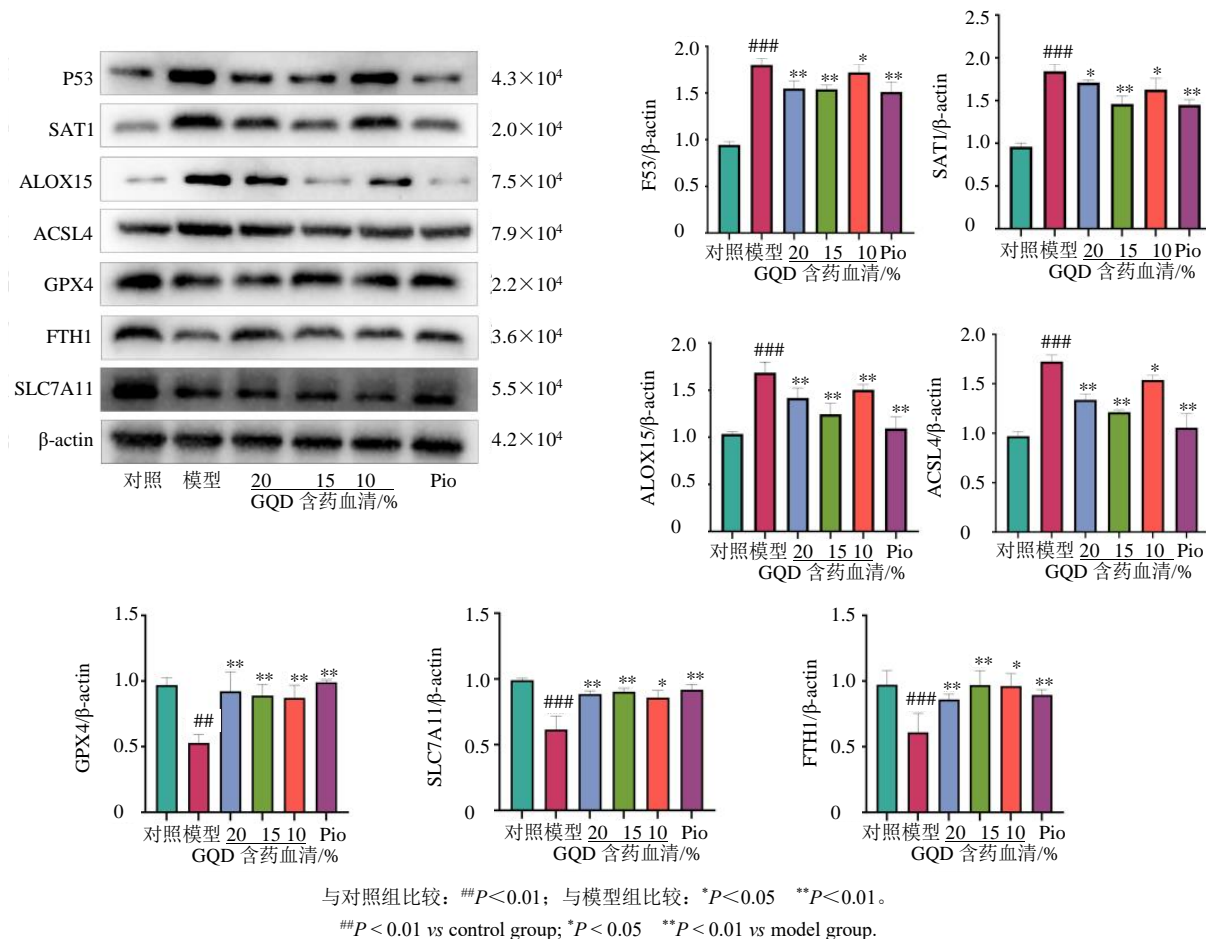


图 12 GQD 含药血清对 PA 诱导的 AML-12 细胞 P53/SAT1/ALOX15 信号通路相关蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )  
Fig. 12 Effect of GQD-containing serum on expression of P53/SAT1/ALOX15 signaling pathway-related proteins in PA-induced AML-12 cells ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

#### 4 讨论

IR 是多种代谢性疾病发生发展的共同核心病理机制,其病理过程涉及脂质异位沉积、慢性低度炎症、内质网应激及线粒体功能障碍等多个相互关联的环节,各环节彼此调控、共同推动 IR 的发生与进展<sup>[21]</sup>。随着全球肥胖人群的持续增加,IR 及相关代谢性疾病的防控需求日益迫切,探寻安全有效的干预药物与作用靶点成为领域研究热点。GQD 作为

中医经典清热祛湿方剂,其“辛开苦降、升清降浊”的组方配伍原则与 IR“脾虚湿盛、湿热内蕴”的核心病机高度契合;现代药理研究已证实,该方可通过多靶点、多通路调节糖脂代谢、提升胰岛素敏感性,展现出良好的抗 IR 活性<sup>[22]</sup>。但目前关于 GQD 改善肝脏 IR 的具体分子机制尚未完全阐明,尤其是是否通过调控铁死亡这一新型细胞死亡方式发挥作用,相关研究仍然不足。

本研究首先采用网络药理学方法,系统预测 GQD 治疗 IR 的潜在作用靶点与调控通路,结果提示 TP53、AKT1、STAT3、JUN 及 ALOX15 等为其核心作用靶点;KEGG 通路富集分析显示,GQD 抗 IR 作用主要涉及脂质与动脉粥样硬化、PI3K-Akt 信号通路、胰岛素抵抗通路及 P53 信号通路等,为后续实验研究明确了精准方向。前期研究已证实,GQD 可有效改善 PA 诱导的肝细胞 IR 模型,其机制可能与调控 P53 信号通路及下游关键蛋白表达相关<sup>[23]</sup>;同时,临床研究与动物实验均验证了 GQD 改善 T2DM 患者及模型动物糖脂代谢紊乱的明确功效<sup>[24-25]</sup>。基于此,本研究结合网络药理学预测线索,深入探讨 GQD 是否通过干预 P53 下游信号通路改善 PA 诱导的 AML-12 肝细胞 IR,并进一步验证其作用是否与调控铁死亡相关蛋白的表达水平、抑制肝细胞铁死亡有关。

铁死亡是一种由脂质过氧化过度累积引发的程序性细胞死亡方式,其发生发展主要受 system Xc<sup>-</sup>-GSH-GPX4 轴、铁代谢轴 (TFR1-Ferritin-NCOA4) 及脂质代谢轴 (ACSL4-LPCAT3-PE) 等多条通路精密调控<sup>[26-27]</sup>。近年来研究发现,铁死亡与 IR 的病理进程密切相关:肝细胞、脂肪细胞等胰岛素靶细胞中铁死亡的异常激活,可直接造成细胞结构与功能损伤,干扰胰岛素信号的正常传导,进而加重 IR;而 IR 状态下靶细胞内铁代谢紊乱与氧化应激失衡,又会进一步促进铁死亡的发生,二者形成恶性循环,加速肝脏 IR 及相关代谢性疾病的进展<sup>[28]</sup>。

P53/SAT1/ALOX15 信号轴是目前公认的连接脂质过氧化与铁死亡的核心调控通路,该通路的异常激活可直接推动铁死亡发生与脂代谢紊乱,进而参与 IR 的病理过程<sup>[29]</sup>。P53 作为关键的抑癌基因与转录调控因子,不仅参与细胞周期调控、凋亡诱导等基础生物学过程,更在代谢紊乱与炎症反应中发挥核心调控作用,其异常激活或表达失调可直接干扰胰岛素信号通路的传导,诱发并加重肝细胞 IR<sup>[31]</sup>。SAT1 作为 P53 的特异性下游转录靶基因,可被活化的 P53 直接上调,进而调控下游脂质代谢与炎症相关基因的表达,成为连接 P53 与脂代谢紊乱、氧化应激的关键分子<sup>[32]</sup>。ALOX15 是脂质过氧化过程中的关键限速酶,作为 SAT1 的下游靶分子,其表达水平受 SAT1 直接调控;一方面,ALOX15 可催化多不饱和脂肪酸氧化,产生大量脂质过氧化

物,引发细胞内氧化应激失衡,直接干扰胰岛素信号通路的正常传导;另一方面,ALOX15 作为铁死亡的核心调控分子,其异常高表达可显著促进脂质过氧化累积,加速铁死亡进程<sup>[33]</sup>,三者形成完整的 P53-SAT1-ALOX15 调控链,通过协同调控脂质过氧化、氧化应激及铁死亡等过程,共同参与肝细胞 IR 的发生发展,该通路的异常激活是发病的重要分子机制之一。

实验通过 CCK-8 法筛选出 200  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  PA 为 AML-12 细胞 IR 模型的最佳造模浓度,进一步检测胰岛素信号通路关键蛋白 p-AKT、p-IRS-1 (Ser307) 的表达水平,验证了模型构建的可靠性。结果显示,GQD 可浓度相关性地提升 PA 诱导的 AML-12 细胞胰岛素敏感性,同时有效降低细胞内 TG、TC、FFA 水平,减轻肝细胞脂质沉积;并且 GQD 可显著逆转 PA 诱导的肝细胞铁死亡表型,降低细胞内  $\text{Fe}^{2+}$  和脂质过氧化产物 MDA 水平,同时提升细胞内 GSH 含量与 GSH-Px 活性,增强细胞抗氧化防御能力。在分子机制层面,GQD 可显著下调促铁死亡通路关键分子 P53、SAT1、ALOX15、ACSL4 的 mRNA 和蛋白表达,同时上调抗铁死亡核心蛋白 GPX4、SLC7A11 和 FTH1 的表达。上述结果证实,GQD 可通过抑制 P53/SAT1/ALOX15 信号通路的异常活化,从源头减少脂质过氧化物的发生,同时强化细胞抗氧化防御体系与铁代谢平衡,从而有效遏制 PA 触发的肝细胞铁死亡进程;而铁死亡的有效抑制,可显著减少脂质过氧化产物引发的肝细胞结构与功能损伤,降低炎症信号的释放,进而恢复胰岛素信号通路的正常传导功能,最终实现肝细胞 IR 的改善。

肝细胞 IR 的发生发展与 P53/SAT1/ALOX15 信号通路异常激活及铁死亡异常密切相关,二者形成的恶性循环是推动肝 IR 进展的重要因素;GQD 可通过多靶点、多通路协同作用发挥抗 IR 功效,其核心机制之一为抑制 P53/SAT1/ALOX15 信号通路活化、调控铁死亡相关蛋白表达、有效遏制肝细胞铁死亡,进而恢复胰岛素信号通路的正常传导。本研究通过“网络药理学预测-细胞实验验证”的研究思路,明确了 GQD 通过调控 P53/SAT1/ALOX15 轴抑制铁死亡改善 PA 诱导的 AML-12 肝细胞 IR,丰富了 GQD 治疗 IR 的分子机制,为其临床应用提供了新的实验支撑与理论依据。但本研究仍局限于体外肝细胞模型,尚未深入验证该机制在动物体内的有效性,后续可结合基因敲除/过表达等分子生物学技

术与动物模型,进一步验证 P53/SAT1/ALOX15 轴在 GQD 抗肝脏 IR 中的关键作用,明确各靶点的因果关系;同时可开展 GQD 拆方研究,探讨方中各药味在调控铁死亡、改善 IR 中的协同作用,为 GQD 的临床精准应用及剂型优化提供更全面、可靠的实验依据。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

**参考文献**

[1] Jung I, Koo D J, Lee W Y. Insulin resistance, non-alcoholic fatty liver disease and type 2 diabetes mellitus: Clinical and experimental perspective [J]. *Diabetes Metab J*, 2024, 48(3): 327-339.

[2] Chen X Y, Liu P, Zhang W, et al. ETNPPL modulates hyperinsulinemia-induced insulin resistance through the SIK1/ROS-mediated inactivation of the PI3K/Akt signaling pathway in hepatocytes [J]. *J Cell Physiol*, 2023, 238(5): 1046-1062.

[3] Malik S, Inamdar S, Acharya J, et al. Characterization of palmitic acid toxicity induced insulin resistance in HepG2 cells [J]. *Toxicol Vitro*, 2024, 97: 105802.

[4] Qu J, Tan S Y, Xie X Y, et al. *Dendrobium Officinale* polysaccharide attenuates insulin resistance and abnormal lipid metabolism in obese mice [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 659626.

[5] Tu J, Zhu S L, Li B T, et al. Gegen Qinlian decoction coordinately regulates PPAR $\gamma$  and PPAR $\alpha$  to improve glucose and lipid homeostasis in diabetic rats and insulin resistance 3T3-L1 adipocytes [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 811.

[6] Hu Y, Xu J X, Wang J C, et al. Resveratrol alleviates diabetic adipose tissue-derived extracellular vesicles-induced hippocampal ferroptosis and cognitive dysfunction via inhibiting miR-9-3p/SLC7A11 axis [J]. *Mol Neurobiol*, 2025, 62(9): 12307-12330.

[7] Xu R, Wang W N, Zhang W L. Ferroptosis and the bidirectional regulatory factor p53 [J]. *Cell Death Discov*, 2023, 9: 197.

[8] Zhou C L, Xu Z M, Ding S H, et al. Benzo(a)pyrene-7, 8-dihydrodiol-9, 10-epoxide (BPDE) induces ferroptosis in rat cortical neurons via p53-SLC7A11-ALOX12/p53-SAT1-ALOX15 Pathways [J]. *J Appl Toxicol*, 2025, 45(8): 1637-1648.

[9] Ren X, Wen Y, Yuan M, et al. Cerebroprotein hydrolysate-I ameliorates cognitive dysfunction in APP/PS1 mice by inhibiting ferroptosis via the p53/SAT1/ALOX15 signalling pathway [J]. *Eur J Pharmacol*, 2024, 979: 176820.

[10] 陈佳美, 陈蓉, 成颜芬, 等. 经典名方葛根芩连汤基准样品的 HPLC 指纹图谱及量质传递规律研究 [J]. *中草药*, 2024, 55(4): 1189-1201.  
Chen J M, Chen R, Cheng Y F, et al. Establishment of HPLC fingerprint chromatogram and quantity-quality transmitting of benchmark samples of classical prescription Gegen Qinlian Decoction [D]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2024, 55(4): 1189-1201.

[11] Liu R, Wang J H, Zhao Y K, et al. Study on the mechanism of modified Gegen Qinlian decoction in regulating the intestinal flora-bile acid-TGR5 axis for the treatment of type 2 diabetes mellitus based on macro genome sequencing and targeted metabonomics integration [J]. *Phytomedicine*, 2024, 132: 155329.

[12] Cao Z B, Zeng Z L, Wang B H, et al. Identification of potential bioactive compounds and mechanisms of Gegen Qinlian decoction on improving insulin resistance in adipose, liver, and muscle tissue by integrating system pharmacology and bioinformatics analysis [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 264: 113289.

[13] Bao W P, Sun H P, Wu X, et al. Exploring anti-type 2 diabetes mellitus mechanism of Gegen Qinlian decoction by network pharmacology and experimental validation [J]. *Dis Markers*, 2022, 2022(1): 1927688.

[14] 曹博宁, 王耀献. 基于网络药理学探究葛根芩连汤治疗糖尿病肾病中的潜在分子机制 [J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2025, 26(2): 133-136, I0004, I0005.  
Cao B N, Wang Y X. Exploring the potential molecular mechanism of Gegen Qinlian decoction in treating diabetic nephropathy based on network pharmacology [J]. *Chin J Integr Tradit West Nephrol*, 2025, 26(2): 133-136, I0004, I0005.

[15] Zhang X Y, Ji Z X, He Q, et al. Gegen Qinlian Decoction inhibits liver ferroptosis in type 2 diabetes mellitus models by targeting Nrf2 [J]. *J Ethnopharmacol*, 2025, 340: 119290.

[16] 黄璟夷, 林俊, 钟玉娇, 等. 葛根芩连汤对 2 型糖尿病合并非酒精性脂肪肝大鼠模型铁死亡干预作用研究 [J]. *环球中医药*, 2024, 17(7): 1291-1298.  
Huang J Y, Lin J, Zhong Y J, et al. Effect of Gegen Qinlian Decoction on the intervention of ferroptosis in rat model with T2DM combined with NAFLD [J]. *Glob Tradit Chin Med*, 2024, 17(7): 1291-1298.

[17] Zhang C H, Xu G L, Liu Y H, et al. Anti-diabetic activities of Gegen Qinlian Decoction in high-fat diet combined with streptozotocin-induced diabetic rats and in 3T3-L1 adipocytes [J]. *Phytomedicine*, 2013, 20(3/4): 221-229.

- [18] 彭国梅, 张启云, 李冰涛, 等. UPLC-MS/MS 同时测定葛根芩连汤含药血清 10 个有效成分的含量 [J]. 中药新药与临床药理, 2016, 27(3): 393-398.  
Peng G M, Zhang Q Y, Li B T, et al. Simultaneous determination of ten active components of Gegen Qinlian decoction in rat serum by UPLC-MS/MS [J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol, 2016, 27(3): 393-398.
- [19] 章常华, 程子文, 薛亚楠, 等. 葛根芩连汤含药血清对游离脂肪酸诱导的 HepG2 细胞脂肪堆积模型 FXR 通路相关信号因子的影响 [J]. 时珍国医国药, 2022, 33(9): 2077-2080.  
Zhang C H, Cheng Z W, Xue Y N, et al. Effects of Gegen Qinlian Decoction containing serum on FXR pathway related signal factors in free fatty acid-induced adipose accumulation model of HepG2 cells [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2022, 33(9): 2077-2080.
- [20] 潘新艳. 白藜芦醇通过 ddit4/mtor 通路改善胰岛素抵抗的机制研究 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2023.  
Pan X Y. Study on the mechanism of resveratrol improving insulin resistance via ddit4/mtor pathway [D]. Shijiazhuang: Hebei Medical University, 2023.
- [21] Sefried S, Häring H U, Weigert C, et al. Suitability of hepatocyte cell lines HepG2, AML12 and THLE-2 for investigation of insulin signalling and hepatokine gene expression [J]. Open Biol, 2018, 8(10): 180147.
- [22] Wang J, Wu Q, Zhou Y, et al. The mechanisms underlying olanzapine-induced insulin resistance via the brown adipose tissue and the therapy in rats [J]. Adipocyte, 2022, 11(1): 84-98.
- [23] Xu J Y, Zou Z K, Li X Y, et al. Effect of Gegen Qinlian Decoction on the regulation of gut microbiota and metabolites in type II diabetic rats [J]. Front Microbiol, 2024, 15: 1429360.
- [24] 柳荣, 王佳慧, 杨霞, 等. 加味葛根芩连汤对 2 型糖尿病 db/db 小鼠 FXR/SHP/PPAR $\alpha$  信号通路的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(20): 1-8.  
Liu R, Wang J H, Yang X, et al. Effect of modified Gegen Qinliantang on FXR/SHP/PPAR $\alpha$  signaling pathway in type 2 diabetic db/db mice [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2023, 29(20): 1-8.
- [25] Yuan M J, Guo X T, Li N, et al. Silicon oxide-protected nickel nanoparticles as biomass-derived catalysts for urea electro-oxidation [J]. J Colloid Interface Sci, 2021, 589: 56-64.
- [26] 王岳峰, 董永书. 基于 KAT3B/ACSL4 途径探讨针刺对脑缺血再灌注大鼠铁死亡和铁自噬的影响 [J]. 针刺研究, 2026, 51(3): 310-322.  
Wang Y F, Dong Y S. Effects of acupuncture on ferroptosis and ferritinophagy in cerebral ischemia-reperfusion rats based on KAT3B/ACSL4 pathway [J]. Acupunct Res, 2026, 51(3): 310-322.
- [27] 黄麟媛, 高静, 孙一锦, 等. 脂肪和肥胖相关基因调节谷胱甘肽过氧化物酶 4 m~6A 修饰抑制 3T3-L1 前脂肪细胞分化 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2025, 41(11): 1687-1699.  
Huang L Y, Gao J, Sun Y J, et al. FTO inhibits 3T3-L1 preadipocyte differentiation by regulation the m6A modification of GPX4 [J]. Chin J Biochem Mol Biol, 2025, 41(11): 1687-1699.
- [28] Cao Y, Song N, Wang Y, et al. The potential association of TFR1/SLC11A2/GPX4 with ferroptosis in mediating lipid metabolism disorders in atherosclerosis [J]. Comb Chem High Throughput Screen, 2025, 28(3): 467-477.
- [29] Liu H M, Yan J, Guan F T, et al. Zeaxanthin prevents ferroptosis by promoting mitochondrial function and inhibiting the p53 pathway in free fatty acid-induced HepG2 cells [J]. Biochim Biophys Acta BBA Mol Cell Biol Lipids, 2023, 1868(4): 159287.
- [30] 董海航, 涂钰莹, 李兴榕, 等. 消脂清肝汤调控铁死亡治疗代谢障碍相关性脂肪性肝病的作用机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2026, 32(6): 109-119.  
Dong H H, Tu Y Y, Li X R, et al. Mechanisms of Xiaozhi Qinggan decoction in treatment of metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease by regulating ferroptosis [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2026, 32(6): 109-119.
- [31] Chen L, Wang W. P53 regulates lipid metabolism in cancer [J]. Int J Biol Macromol, 2021, 192: 45-54.
- [32] He G, Zhang Y, Feng Y, et al. SBF126 induces triple-negative breast cancer cells ferroptosis via lipid peroxidation [J]. J Cell Mol Med, 2024, 28(7): e18212.
- [33] Yang L, Jiang L, Sun X, et al. DEHP induces ferroptosis in testes via p38 $\alpha$ -lipid ROS circulation and destroys the BTB integrity [J]. Food Chem Toxicol, 2022, 164: 113046.