

基于 System Xc-/GPX4 通路探讨白术内酯 I 对 2 型糖尿病大鼠胰岛细胞铁死亡的作用机制

田朝阳¹, 张碧澈¹, 马雷雷², 李超¹, 王静雅¹, 韩茹杰¹, 李嘉钰¹, 张文丽², 李继安^{1*}

1. 华北理工大学中医学院, 河北 唐山 063210

2. 华北理工大学公共卫生学院, 河北 唐山 063210

摘要: 目的 探讨白术内酯 I 对 2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 大鼠胰岛细胞铁死亡的作用机制。方法 随机选取 8 只大鼠作为对照组, 其余大鼠采用链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ, 30 mg/kg) 构建 T2DM 大鼠模型。将造模成功的大鼠随机分为模型组、卡格列净 (9 mg/kg) 组及白术内酯 I 低、高剂量 (25、75 mg/kg) 组, 连续 ig 给药 8 周, 测空腹血糖 (fasting blood glucose, FBG) 及口服葡萄糖耐量 (oral glucose tolerance test, OGTT); 取材后测血清胰岛素 (insulin, INS)、C 肽 (c-peptide, C-P)、谷胱甘肽 (glutathione, GSH)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 及胰腺组织铁含量、丙二醛 (malonaldehyde, MDA) 水平; 采用苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色和透射电镜观察胰岛细胞病理学变化; 免疫荧光染色观察胰岛细胞谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4) 的表达; 采用 Western blotting 法检测胰腺组织重链亚基溶质载体家族 3 成员 2 (solute carrier family 3 member 2, SLC3A2)、轻链亚基溶质载体家族 7 成员 11 (solute carrier family 7 member 11, SLC7A11)、谷氨酸-半胱氨酸连接酶修饰亚基 (glutamate-cysteine ligase modifier subunit, GCLM)、GSH 合成酶 (glutathione synthetase, GSS)、GPX4、酰基辅酶 A 合成酶长链家族成员 4 (acyl coenzyme A synthetase long chain family member 4, ACSL4) 蛋白表达; qRT-PCR 检测胰腺组织中 *SLC7A11*、*GPX4*、*ACSL4* mRNA 表达。结果 与对照组比较, 模型组大鼠 FBG、OGTT 水平显著升高 ($P < 0.001$), INS、C-P、GSH、SOD 水平显著降低 ($P < 0.01$ 、 0.001), 铁含量、MDA 水平显著升高 ($P < 0.001$); 病理和电镜结果显示胰岛细胞萎缩变形, 线粒体出现大量空泡, 外膜破裂, 萎缩, 嵴消失溶解; 免疫荧光染色显示 GPX4 表达显著减少 ($P < 0.001$); SLC3A2、SLC7A11、GCLM、GSS、GPX4 蛋白表达显著减少 ($P < 0.001$), ACSL4 蛋白表达显著增加 ($P < 0.001$); *SLC7A11*、*GPX4* mRNA 表达显著减少 ($P < 0.001$), *ACSL4* mRNA 表达显著增加 ($P < 0.001$)。与模型组比较, 各给药组 FBG、OGTT 显著降低 ($P < 0.001$), INS、C-P、GSH、SOD 水平显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01), 铁含量、MDA 水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001); 胰腺组织病理改变表现出不同程度的减轻; 免疫荧光染色显示 GPX4 表达显著增加 ($P < 0.001$); SLC3A2、SLC7A11、GCLM、GSS、GPX4 蛋白表达显著增加 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), ACSL4 蛋白表达显著减少 ($P < 0.001$); *SLC7A11*、*GPX4* mRNA 表达显著增加 ($P < 0.05$ 、 0.001), *ACSL4* mRNA 表达显著减少 ($P < 0.001$)。结论 白术内酯 I 可通过调控胱氨酸/谷氨酸反向转运系统 (cystine/glutamate reverse transport system, System Xc-) /GPX4 通路抑制铁死亡并发挥保护 T2DM 大鼠胰岛细胞的作用。

关键词: 2 型糖尿病; 白术内酯 I; 铁死亡; System Xc-/GPX4 信号通路; 胰岛细胞

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)20-6953-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.20.012

Mechanism of atractylenolide I on ferroptosis in pancreatic islet cells of type 2 diabetes mellitus rats based on System Xc-/GPX4 pathway

TIAN Zhaoyang¹, ZHANG Biwei¹, MA Leilei², LI Chao¹, WANG Jingya¹, HAN Rujie¹, LI Jiayu¹, ZHANG Wenli², LI Ji'an¹

1. Traditional Chinese Medical College, North China University of Science and Technology, Tangshan 063210, China

2. School of Public Health, North China University of Science and Technology, Tangshan 063210, China

收稿日期: 2024-05-21

基金项目: 河北省自然科学基金资助项目 (H2023209038); 华北理工大学研究生创新项目 (2024S21); 科技部对发展中国家常规性科技援助项目 (KY201904005); 河北省创新能力提升计划项目 (19392507D)

作者简介: 田朝阳, 硕士研究生, 从事中草药治疗糖尿病的研究。E-mail: 849510398@qq.com

*通信作者: 李继安, 博士, 教授, 硕士生导师, 从事中草药治疗糖尿病的研究。E-mail: linyj@vip.sina.com

Abstract: Objective To investigate the mechanism of atractylolactone I (AT-I) on ferroptosis of pancreatic islet cells in rats with type 2 diabetes mellitus (T2DM). **Methods** A total of eight rats were randomly selected as the control group, and the remaining rats were treated with streptozotocin (STZ, 30 mg/kg) to construct the T2DM rat model. The modeled rats were randomly divided into model group, canagliflozin (9 mg/kg) group, AT-I low-dose (25 mg/kg) group, AT-I high-dose (75 mg/kg) group, and were administered by gavage for eight weeks, and fasting blood glucose (FBG) and oral glucose tolerance test (OGTT) were measured. The levels of serum insulin (INS), C-peptide (C-P), glutathione (GSH), superoxide dismutase (SOD), ferric content and malonaldehyde (MDA) in pancreatic tissue were measured. Hematoxylin-eosin (HE) staining and transmission electron microscopy were used to observe the pathological changes of pancreatic islet cells. Immunofluorescence staining was used to observe the expression of glutathione peroxidase 4 (GPX4) in pancreatic islet cells. Western blotting was used to detect solute carrier family 3 member 2 (SLC3A2), solute carrier family 7 member 11 (SLC7A11) and glutamate-cysteine ligase in pancreatic tissue modifier subunit (GCLM), glutathione synthetase (GSS), GPX4, acyl coenzyme A synthetase long chain family member 4 (ACSL4) protein expressions. qRT-PCR was used to detect the mRNA expressions of *SLC7A11*, *GPX4* and *ACSL4* in pancreatic tissue. **Results** Compared with the control group, the levels of FBG and OGTT in the model group were significantly increased ($P < 0.001$), INS, C-P, GSH and SOD were significantly decreased ($P < 0.01, 0.001$), ferric content and MDA were significantly increased ($P < 0.001$). Pathological and electron microscopy results showed that pancreatic islet cells atrophied and deformed, a large number of vacuoles appeared in mitochondria, the outer membrane ruptured and atrophied, and the cristae disappeared and dissolved. Immunofluorescence staining showed that the expression of GPX4 was significantly reduced ($P < 0.001$). Expressions of SLC3A2, SLC7A11, GCLM, GSS and GPX4 were significantly decreased ($P < 0.001$), and the expression of ACSL4 was significantly increased ($P < 0.001$). The mRNA expressions of *SLC7A11* and *GPX4* decreased significantly ($P < 0.001$), and the mRNA expression of *ACSL4* was increased significantly ($P < 0.001$). Compared with the model group, the levels of FBG and OGTT in each administration group were significantly decreased ($P < 0.001$), INS, C-P, GSH and SOD were significantly increased ($P < 0.05, 0.01$), while ferric content and MDA were significantly decreased ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). The histopathological changes of pancreas showed varying degrees of reduction. Immunofluorescence staining showed a significant increase in GPX4 expression ($P < 0.001$). The expressions of SLC3A2, SLC7A11, GCLM, GSS and GPX4 were significantly increased ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), and the expression of ACSL4 was significantly decreased ($P < 0.001$). The mRNA expressions of *SLC7A11* and *GPX4* were significantly increased ($P < 0.05, 0.001$), and the mRNA expression of *ACSL4* was significantly decreased ($P < 0.001$). **Conclusion** AT-I can inhibit ferroptosis by regulating the cystine/glutamate reverse transport system (System Xc-)/GPX4 pathway and play a role in protecting T2DM rat pancreatic islet cells.

Key words: type 2 diabetes mellitus; atractylenolide I; ferroptosis; System Xc-/GPX4 pathway; pancreatic islet cells

全球糖尿病的患病率及死亡率正迅速上升, 据国际糖尿病联盟的最新数据显示, 预计到 2045 年, 全球糖尿病患者人数将达 7.832 亿, 其中 2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 患者占 90%~95%, 严重威胁着全人类的生命健康^[1]。T2DM 的病理基础主要表现为胰岛素 (insulin, INS) 分泌缺陷和 INS 抵抗, 胰岛细胞功能受损是其病情发展的核心病因^[2]。胰岛细胞功能受损与多种因素密切相关, 包括铁死亡、凋亡、坏死性凋亡、焦亡、内质网应激和自噬^[3], 其中铁死亡尤为关键。铁死亡是一种新的程序性细胞死亡形式, 在大量的铁离子和活性氧化物的催化下, 导致细胞膜中含有多不饱和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acids, PUFAs) 的磷脂发生过氧化反应, 产生大量的脂质过氧化产物并破坏细胞膜的完整性诱导细胞发生死亡^[4]。胰岛 β 细胞自身的抗氧化酶表达水平较低, 因此其容易受到氧化应激和脂毒性影响, 进而引发铁死亡^[5]。目前, 临

床上缺乏能够恢复胰岛细胞功能的有效药物, 从抑制胰岛细胞铁死亡入手改善胰岛细胞功能或将是防治 T2DM 的重要研究方向。T2DM 引发的高血糖可加剧炎症因子的上调和氧化应激^[6], 炎症细胞会释放大量的活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 并分泌细胞因子, 这些细胞因子不断使周围细胞中产生大量 ROS^[7], 加重细胞内氧化应激和过度脂质过氧化, 同时, 这个过程也促使机体内的铁离子代谢失调和氧化还原系统的失衡, 是诱发铁死亡的关键因素^[8]。

白术为菊科苍术属植物白术 *Atractylodes macrocephala* Koidz. 的干燥根茎。味苦、甘, 性温, 归脾、胃经, 具健脾益气、燥湿利水、止汗、安胎的功效^[9]。在治疗 T2DM 方面, 白术展现出显著的降糖效果^[10]。白术内酯 I (atractylenolide I) 作为白术的主要活性成分, 具有增加 INS 敏感性, 改善糖尿病导致代谢紊乱的功能^[11], 有研究表明白术内酯 I 有保护胰岛细胞的作用。白术内酯 I 是一种具有三环结

构的天然倍半萜内酯化合物,可以调节血糖和血脂,并有良好的抗炎作用^[12]。白术内酯 I 可提高 T2DM 大鼠血清中超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性,降低脂质过氧化产物丙二醛 (malonaldehyde, MDA) 水平,调节氧化应激相关蛋白的表达^[13]。据此推断白术内酯 I 可能通过抗炎作用,抑制胰腺组织产生过量的 ROS 和脂质过氧化物,稳定氧化还原系统,并调节铁离子含量,抑制胰岛细胞铁死亡,进而发挥治疗糖尿病的作用。同时,白术内酯 I 具有吸收良好、代谢快、毒性低的特点^[14],更符合临床治疗 T2DM 的用药需求。本研究深入探究白术内酯 I 对胰岛细胞铁死亡的作用机制,旨在为其应用于临床治疗 T2DM 提供理论依据。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 50 只,6 周龄,体质量 180~210 g,由中国食品药品检定研究院提供,实验动物许可证号 SCXK (京) 2022-0002,饲养于华北理工大学实验动物中心屏障环境实验室,室温 (22~23) °C,明暗交替周期为 12 h,饲养期间大鼠正常饮水进食。动物实验经华北理工大学实验动物伦理委员会批准 (批准号 2023-SY-215)。

1.2 药品与试剂

白术内酯 I 批号 PRF23021402,质量分数 ≥ 98%) 购自成都普瑞法科技开发有限公司;卡格列净片 (批号 MGL1900,进口药品注册号 H20170375) 购自西安杨森制药有限公司;链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ, 批号 13104) 购自美国 Cayman Chemical 公司;SOD 试剂盒 (批号 20231110)、谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 试剂盒 (批号 A006-2-1) 均购自南京建成生物工程研究所;铁含量检测试剂盒 (批号 LCSSH-1212W)、MDA 试剂盒 (批号 LCSSH-0109W)、大鼠 INS 酶联免疫试剂盒 (批号 ED-30973)、大鼠 C 肽 (C-peptide, C-P) 酶联免疫试剂盒 (批号 ED-30079) 均购自仑昌硕生物科技有限公司;戊二醛固定液 (批号 23181709) 购自北京兰杰柯科技有限公司;重链亚基溶质载体家族 3 成员 2 (solute carrier family 3 member 2, SLC3A2) 抗体 (批号 15193-1-AP)、谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4) 抗体 (批号 67763-1-Ig)、谷氨酸-半胱氨酸连接酶修饰亚基 (glutamate-cysteine ligase modifier subunit, GCLM) 抗体 (批

号 14241-1-AP)、GSH 合成酶 (glutathione synthetase, GSS) 抗体 (批号 15712-1-AP)、HRP 标记羊抗小鼠二抗 (批号 SA00001-1) 均购自武汉三鹰生物技术有限公司;轻链亚基溶质载体家族 7 成员 11 (solute carrier family 7 member 11, SLC7A11) 抗体 (批号 ARG57998) 购自上海 Arigobio 公司;β-actin 抗体 (批号 T0022)、酰基辅酶 A 合成酶长链家族成员 4 (acyl coenzyme A synthetase long chain family member 4, ACSL4) 抗体 (批号 DF12141) 均购自江苏 Affinity 公司;HRP 标记羊抗兔二抗 (批号 A0208) 购自碧云天生物技术有限公司;Trizol 试剂 (批号 15596-026) 购自美国 Ambion 公司。

1.3 仪器

Gold-Accu 型金稳血糖仪 (长沙三诺生物传感股份有限公司);Tissuelyser-24L 型样品组织研磨仪 (上海净信实业发展有限公司);HI-16KR 型台式高速冷冻离心机 (湖南可成仪器设备有限公司);JT-12J 型组织脱水机、JB-L6 型组织包埋机 (武汉俊杰电子有限公司);UC6 型超薄切片机 (德国徕卡仪器有限公司);SpectraMaxM3 型多功能微孔板读板机 (美国 Molecular Devices 公司);cellSens Entry 成像软件、BX53 型荧光显微镜 (日本奥林巴斯公司);H-7650 型透射电子显微镜 (日本日立公司);DYY-7C 型电泳仪电源、DYCZ-24DN 型垂直电泳槽、DYCZ-40 型电转仪、WD-9413B 型凝胶成像分析仪 (北京六一生物科技有限公司);proFlex 型 PCR 扩增仪、ViiA-7 型实时荧光定量 PCR 仪 (美国 ABI 公司)。

2 方法

2.1 动物分组、造模及给药

SD 雄性大鼠适应性饲养 7 d,随机选取 8 只作为对照组,喂养普通饲料,其余大鼠喂养高脂饲料,4 周后开始构建 T2DM 大鼠模型^[15-16]。造模前禁食 12 h,饮水自由,ip STZ (30 mg/kg),72 h 后尾静脉取血检测空腹血糖 (fasting blood glucose, FBG),FBG ≥ 16.7 mmol/L 被认为糖尿病模型构建成功^[17]。将造模成功大鼠随机分为模型组、卡格列净 (9 mg/kg) 组和白术内酯 I 低、高剂量 (25、75 mg/kg) 组。对照组、模型组 ig 等体积生理盐水,其余组 ig 相应药物 (4.5 mL/kg),每日 1 次,连续 8 周。本研究共 33 只大鼠造模成功,因给药过程中死亡 1 只,最终纳入统计的大鼠为 32 只,每组 8 只。

2.2 一般情况观察和动态血糖指标检测

每日观察大鼠毛发色泽, 饮食、饮水及尿量的变化, 每周监测 FBG 及体质量, 根据体质量变化调整给药体积, 于 0、4、8 周测定口服葡萄糖耐量(oral glucose tolerance test, OGTT)。

2.3 标本采集

给药 8 周后, ip 5%戊巴比妥钠麻醉大鼠, 腹主动脉进行采血, 离心后取血清冻存。取部分胰腺组织放入 4%多聚甲醛溶液和 2.5%戊二醛内固定, 用于 HE 染色、免疫荧光染色及透射电镜观察, 剩余部分置于-80 ℃冰箱保存。

2.4 检测血清 INS、C-P、GSH 水平及 SOD 活性

采用双抗夹心法检测血清 INS 及 C-P 水平, 采用微板法检测血清 GSH 水平, 采用 WST-1 方法检测血清 SOD 活性。

2.5 检测胰腺组织铁含量及 MDA 水平

取胰腺组织 0.1 g, 加入 1 mL 提取液, 进行冰浴匀浆后, 4 ℃、12 000 r/min 离心 5 min, 取上清, 置于冰上待测。按照试剂盒说明书检测各组大鼠胰腺组织铁含量及 MDA 水平。

2.6 苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色

已固定的胰腺组织梯度脱水, 包埋并切片, 二甲苯脱蜡, 应用梯度乙醇脱水, HE 染色, 再次应用梯度乙醇脱水, 封片, 于显微镜下观察并拍照。

2.7 透射电子显微镜观察胰腺组织超微结构

将胰腺组织浸入 2.5%戊二醛固定, 冲洗后浸入 1%四氧化锇再次固定, 应用不同体积分数丙酮脱水, 包埋, 切片, 于透射电子显微镜观察并采集图像。

2.8 胰腺组织免疫荧光染色

将胰腺组织切片后进行脱蜡, 抗原修复, 血清封闭, 孵育一抗、二抗, DAPI 染色, 封片后使用显微镜采集图像。采用 Image J 软件定量分析阳性区域面积。

2.9 Western blotting 检测胰腺组织相关蛋白表达

取胰腺组织放入装有一定比例 PIPA 裂解液的 EP 管内, 研磨组织后置于冰上裂解, 12 000 r/min 离心 15 min, 取上清于-20 ℃保存; 检测蛋白浓度, 蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 封闭后加入相应的 SLC3A2、SLC7A11、GCLM、GSS、ACSL4、GPX4 一抗孵育过夜, 二抗孵育后使用 ECL 显色曝光, 采用 ip 软件分析胶片灰度值。

2.10 qRT-PCR 检测胰腺组织 SLC7A11、GPX4、ACSL4 mRNA 表达

取胰腺组织, 利用 Trizol 试剂和液氮提取大鼠总 RNA^[18], 测定 RNA 浓度和纯度并进行反转录。qRT-PCR 反应程序为 95 ℃、10 min, 95 ℃、10 s, 60 ℃、60 s, 95 ℃、15 s, 共 40 个循环。使用相对定量 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 mRNA 的水平。以 β -actin 基因为内参, 基因引物序列由武汉擎科生物技术有限公司设计合成, 如表 1 所示。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	序列 (5'-3')
β -actin	F: CACGATGGAGGGGCCGACTCATC R: TAAAGACCTCTATGCCAACACAGT
SLC7A11	F: CCTCTGTTCATCCCAGCATT R: CGTCTGAACCACTTGGGTTT
GPX4	F: CCGGCTACAATGTCAGGTTT R: CACGGCAGGTCCTTCTCTAT
ACSL4	F: AAATGCAGCCAAATGGAAAG R: CACAGAAAATGGCAATGGTG

2.11 统计学分析

采用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析, 以 $\bar{x} \pm s$ 来表示, 多组间进行比较时, 应用单因素方差分析(ANOVA), 方差齐采用 LSD 检验, 方差不齐采用 Tamhane's 检验。

3 结果

3.1 白术内酯 I 对 T2DM 大鼠一般状态的影响

如图 1 所示, 对照组大鼠精神状态好, 反应灵敏, 毛发柔顺, 有光泽, 无脱落, 体质量逐渐增加。模型组大鼠表现为精神状态萎靡, 反应迟缓, 毛发偏枯黄, 无光泽, 并伴有毛发脱落, 与对照组比较体质量明显降低($P < 0.001$)。与模型组比较, 各给药组大鼠一般状态均有不同程度的改善。

3.2 白术内酯 I 对 T2DM 大鼠 FBG 和 OGTT 水平的影响

如图 2-A 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠 FBG 水平显著升高($P < 0.001$); 与模型组比较, 给药 4 周后卡格列净组和白术内酯 I 高、低剂量组大鼠 FBG 水平显著降低($P < 0.001$)。如图 2-B 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠 OGTT 水平明显升高($P < 0.001$); 与模型组比较, 给药 4 周后卡格列净组和白术内酯 I 高、低剂量组大鼠 OGTT 水平显著下降($P < 0.001$)。

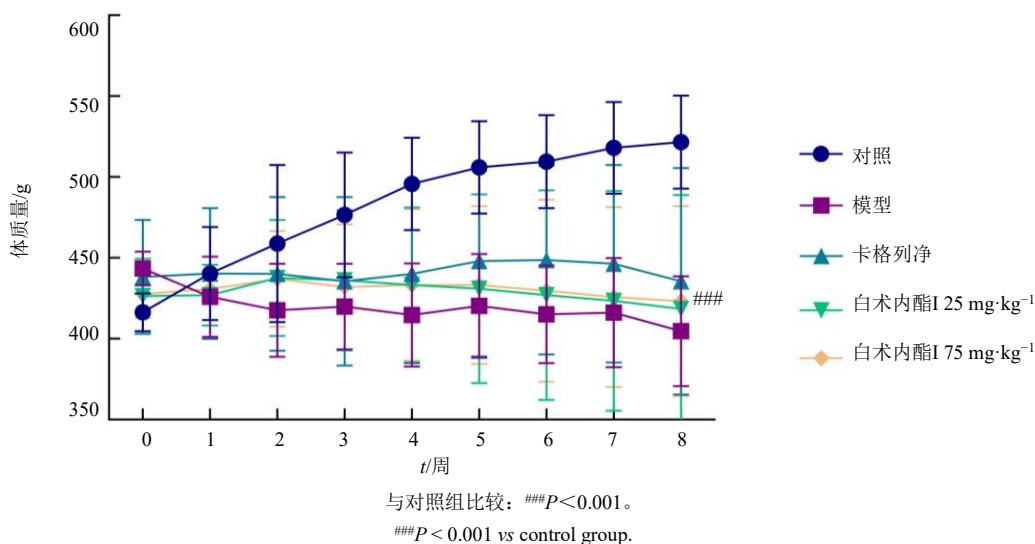


图 1 各组大鼠体质量比较

Fig. 1 Comparison of body weight of rats in each group

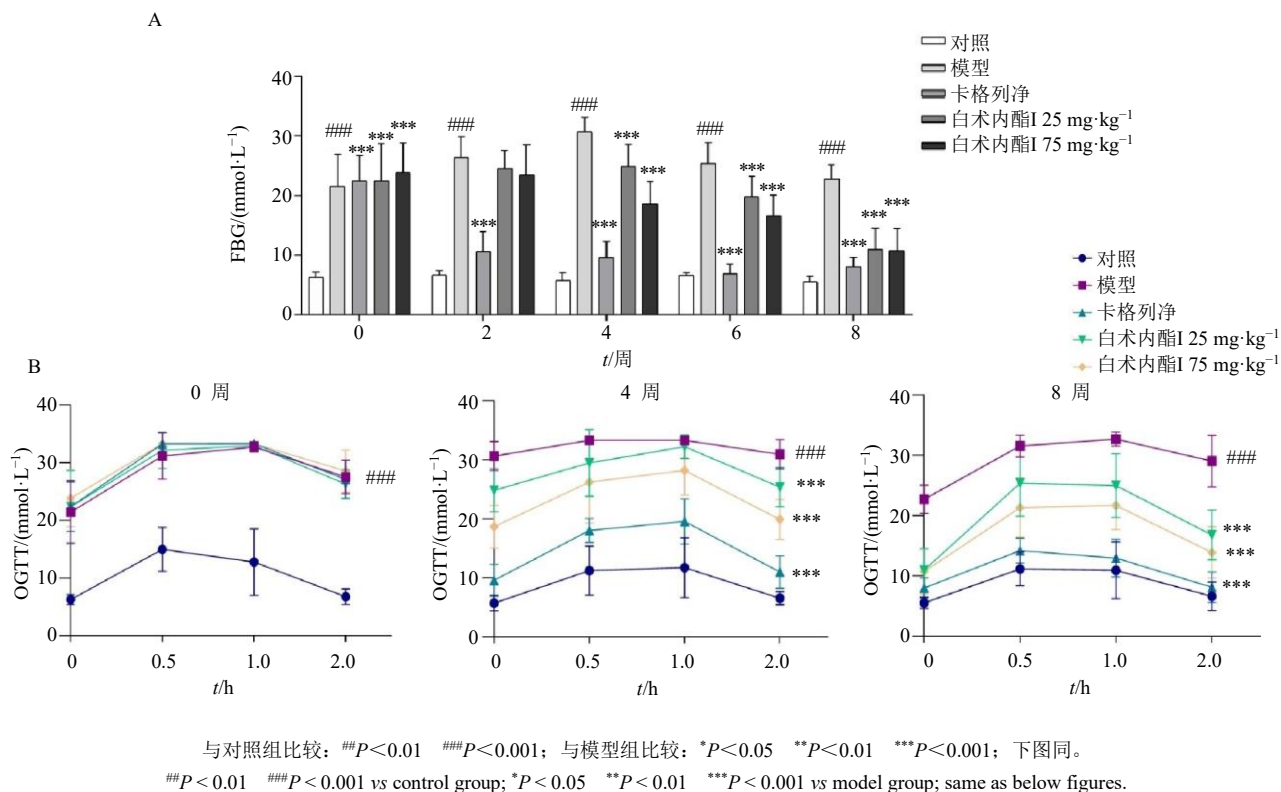


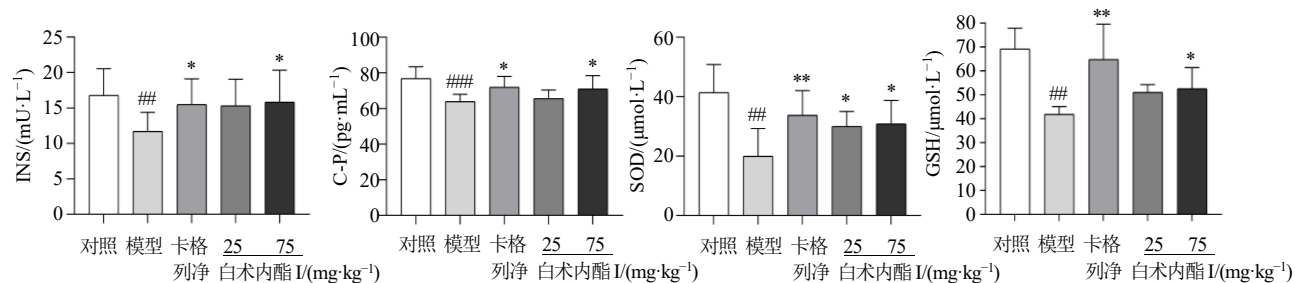
图 2 各组大鼠空腹血糖 (A) 及 OGTT (B) 比较 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 2 Comparison of fasting blood glucose levels (A) and OGTT (B) among different groups of rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

3.3 白术内酯 I 对 T2DM 大鼠血清 INS、C-P 水平及 SOD、GSH 活性的影响

如图 3 所示,与对照组比较,模型组大鼠 INS 与 C-P、GSH 水平显著降低 ($P < 0.01$ 、 0.001), SOD 活性显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较,卡格列

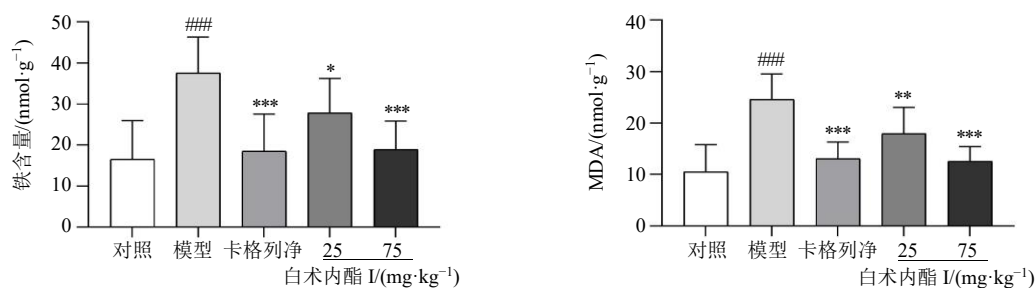
净组与白术内酯 I 高剂量组大鼠 INS、C-P、GSH 水平显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01), 白术内酯 I 低剂量组大鼠 INS、C-P、GSH 水平有升高趋势,无统计学差异;卡格列净组和白术内酯 I 低、高剂量组大鼠 SOD 活性均显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

图 3 各组大鼠 INS、C-P、SOD、GSH 比较 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)Fig. 3 Comparison of INS, C-P, SOD and GSH among different groups of rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

3.4 各组大鼠胰腺组织铁含量及 MDA 比较

如图 4 所示,与对照组比较,模型组大鼠胰腺组织铁含量、MDA 水平显著升高 ($P < 0.001$);与

模型组比较,卡格列净组与白术内酯 I 低、高剂量组大鼠胰腺组织铁含量和 MDA 水平显著降低 ($P < 0.05, 0.01, 0.001$)。

图 4 各组大鼠胰腺铁含量、MDA 水平比较 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)Fig. 4 Comparison of pancreatic ferric content and MDA level among different groups of rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

3.5 各组大鼠胰岛细胞形态结构比较

如图 5 所示,对照组大鼠的胰岛细胞形态结构完整,边缘光滑清晰,形状似圆形或卵圆形呈现,胰岛细胞数量多且均匀分布,细胞核分布均匀,胞质丰富。模型组大鼠胰岛细胞结构明显萎

缩变形,边界模糊不清,形态不规则,细胞核数量减少,细胞核分布不均匀,胞质出现空泡。与模型组比较,卡格列净组和白术内酯 I 高、低剂量组大鼠胰岛细胞形态、数量、细胞核分布情况得到明显改善。

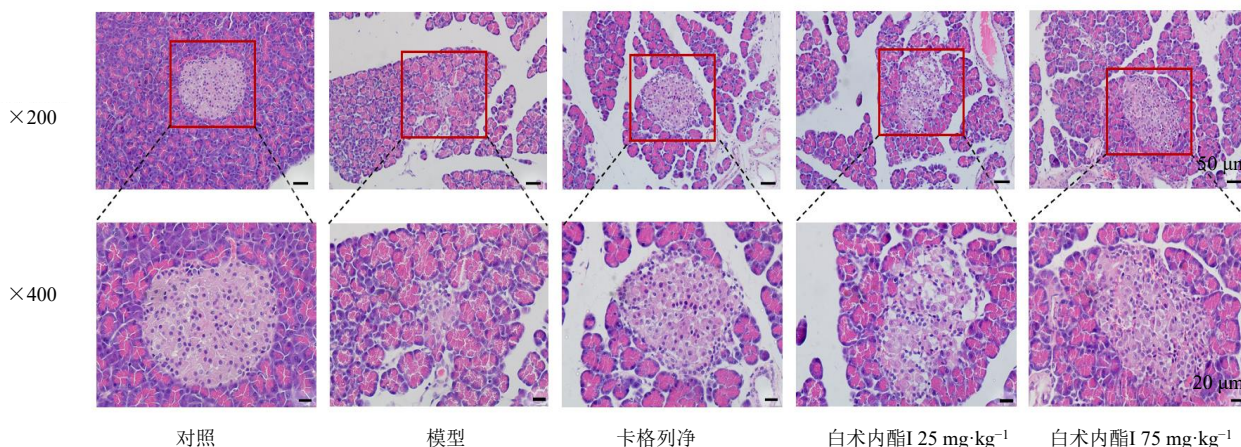


图 5 各组大鼠胰岛细胞的形态结构 (HE)

Fig. 5 Morphological structure of pancreatic islet cells in different groups of rats (HE)

3.6 各组大鼠胰岛 β 细胞线粒体超微结构比较

如图 6 所示, 对照组大鼠胰岛细胞线粒体结构完整, 线粒体嵴正常分布排列, 分泌颗粒丰富且分布均匀。模型组大鼠胰岛细胞线粒体出现大量空泡, 外

膜破裂, 线粒体萎缩, 线粒体嵴消失溶解, 分泌颗粒减少, 分布不均匀且稀疏, 是细胞铁死亡的典型特征。与模型组比较, 卡格列净组与白术内酯 I 高、低剂量组大鼠胰岛 β 细胞线粒体损伤均有明显的改善。

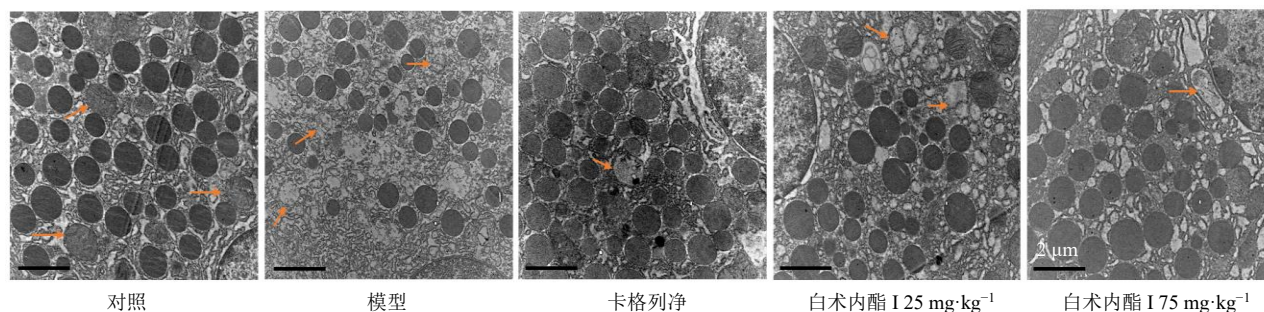


图 6 各组大鼠胰岛细胞线粒体超微结构 ($\times 10\ 000$)

Fig. 6 Ultrastructure of mitochondria in pancreatic islet cells of different groups of rats ($\times 10\ 000$)

3.7 各组大鼠胰腺组织 GPX4 蛋白免疫荧光强度比较

如图 7 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠胰腺组织 GPX4 蛋白免疫荧光强度明显降低 ($P < 0.001$); 与

模型组比较, 卡格列净组与白术内酯 I 高剂量组大鼠胰腺组织 GPX4 蛋白免疫荧光强度显著增强 ($P < 0.001$), 白术内酯 I 低剂量组荧光强度有增加趋势, 但无统计学差异。

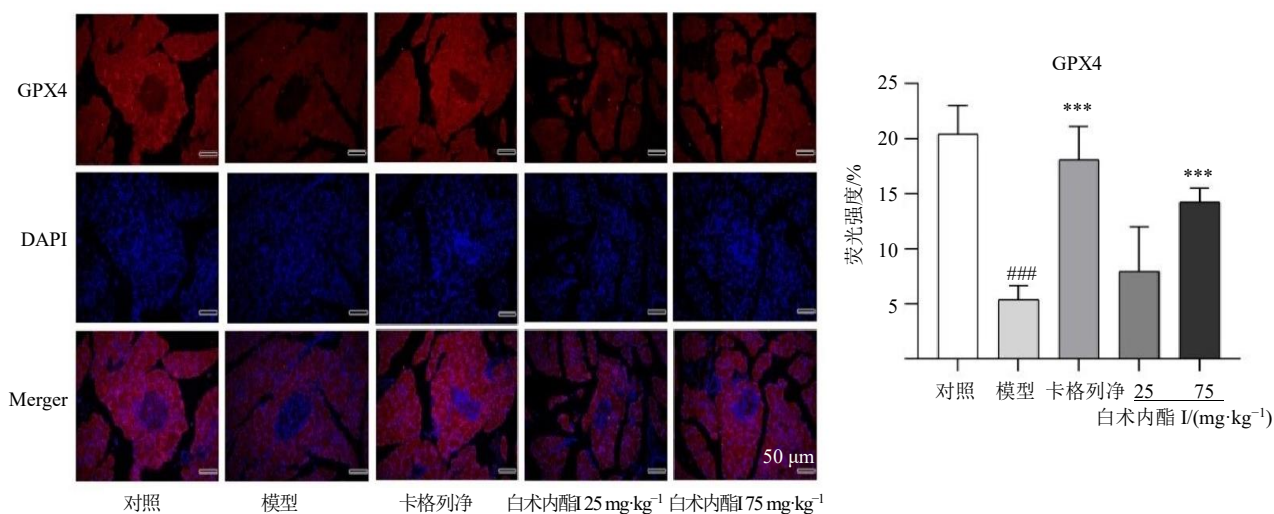


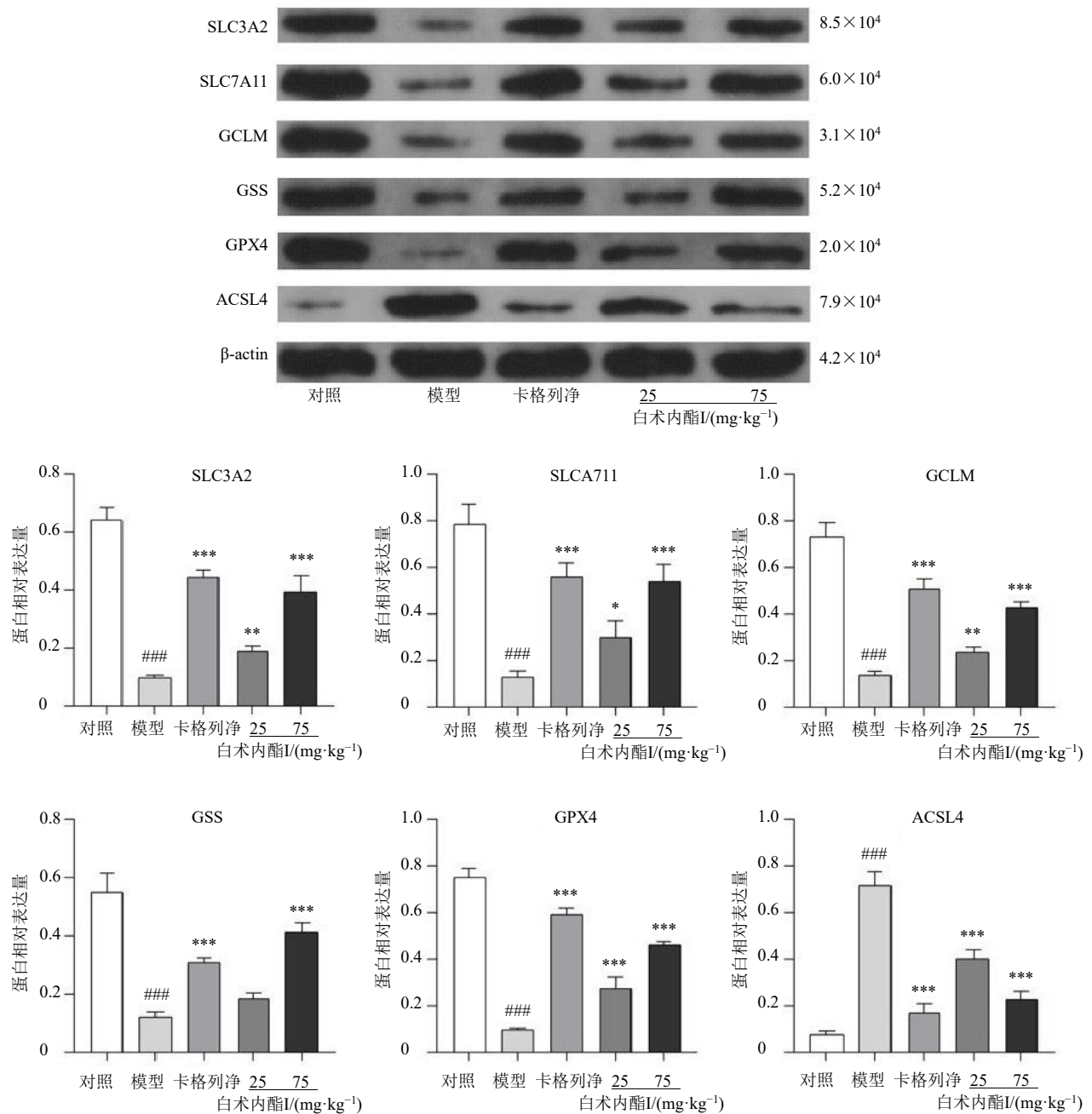
图 7 各组大鼠胰腺组织 GPX4 蛋白表达的荧光强度 ($\times 200$)

Fig. 7 Fluorescence intensity of GPX4 protein expression in pancreatic tissue of different groups of rats ($\times 200$)

3.8 各组大鼠 SLC3A2、SLC7A11、GCLM、GSS、GPX4、ACSL4 蛋白表达水平比较

如图 8 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠胰腺组织中 SLC3A2、SLC7A11、GCLM、GSS 和 GPX4 蛋白表达显著降低 ($P < 0.001$), ACSL4 蛋白表达显著升高 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 卡格列净组和白术内酯 I 高剂量组

SLC3A2、SLC7A11、GCLM、GSS 和 GPX4 蛋白表达显著升高 ($P < 0.001$), ACSL4 蛋白表达显著降低 ($P < 0.001$); 白术内酯 I 低剂量组 SLC3A2、SLC7A11、GCLM 和 GPX4 蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), ACSL4 蛋白表达明显下降 ($P < 0.001$), GSS 蛋白表达有上升的趋势, 但无统计学差异。

图 8 各组大鼠胰腺组织铁死亡相关蛋白表达水平的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Fig. 8 Comparison of ferroptosis-related protein expression levels in pancreatic tissues of rats in different group ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.9 各组大鼠胰腺组织 *SLC7A11*、*GPX4*、*ACSL4* mRNA 表达比较

如图 9 所示,与对照组比较,模型组大鼠胰腺组织中 *GPX4*、*SLC7A11* mRNA 表达显著降低 ($P < 0.001$), *ACSL4* mRNA 表达显著升高 ($P < 0.001$);与模型组比较,卡格列净组和白术内酯 I 高

剂量组 *GPX4*、*SLC7A11* mRNA 表达显著升高 ($P < 0.001$), *ACSL4* mRNA 表达显著降低 ($P < 0.001$);白术内酯 I 低剂量组 *SLC7A11* mRNA 表达显著升高 ($P < 0.05$), *ACSL4* mRNA 表达显著降低 ($P < 0.001$), *GPX4* mRNA 表达有上升趋势,但无统计学差异。

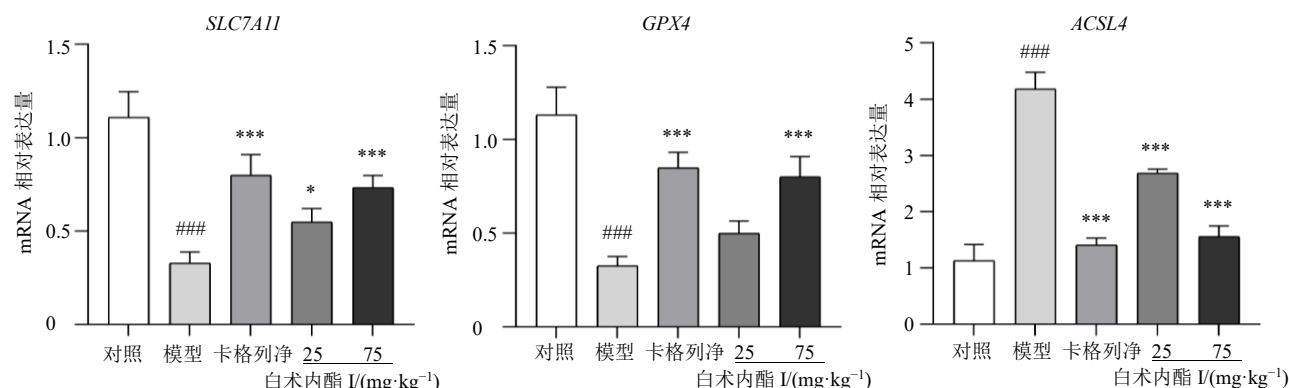


图 9 各组大鼠胰腺组织铁死亡相关因子 mRNA 表达的比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 9 Comparison of mRNA expressions of ferroptosis-related factors in pancreatic tissues of rats in different groups ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

4 讨论

铁死亡是胰岛细胞中一种新的细胞死亡形式^[19],其发生与铁代谢异常以及脂质过氧化密切相关^[20],在T2DM的发生发展过程中发挥关键作用^[21]。相关研究表明,在高血糖条件下,STZ可以诱导胰岛细胞产生脂质过氧化物、ROS及铁离子的积累,过量的铁离子在胰腺中沉积,导致蛋白质、DNA、细胞膜的损伤,同时还会通过芬顿反应产生细胞毒性羟基自由基和ROS,进而引发胰岛细胞的铁死亡^[22],从而导致胰岛细胞功能障碍^[23]。本研究发现,与对照组比较,模型组大鼠的一般状态恶化,精神萎靡,毛发脱落,摄食量增加,尿量增加,同时FBG和OGTT水平明显升高,INS和C-P明显下降,表明T2DM大鼠胰岛细胞受损导致INS分泌不足。胰腺组织中铁含量和脂质过氧化产物MDA水平明显上升,而SOD和GSH的水平降低,表明胰岛细胞的抗氧化应激能力减弱。铁离子的过量积累,脂质过氧化物蓄积,提示铁死亡参与了胰岛细胞受损的病理过程。与模型组比较,白术内酯I治疗后,糖尿病大鼠的一般状态有所改善,FBG、OGTT、MDA水平和铁含量显著下降,而INS、C-P、SOD和GSH显著上升,表明白术内酯I在一定程度上有保护胰岛细胞功能的作用,同时促进INS分泌,减缓了胰岛细胞铁死亡,有效改善了T2DM大鼠的糖尿病症状。

细胞铁死亡的主要形态学特征包括线粒体萎缩,线粒体嵴减少或丢失、线粒体外膜破裂和线粒体膜起皱^[4]。Li等^[24]使用STZ诱导T2DM小鼠模型后发现,铁死亡导致胰岛β细胞线粒体结构和整体结构表现出铁死亡的病理学特征,用槲皮素干预

后这些病理改变得到了一定缓解。本研究与Li等^[24]的研究结果一致,与对照组比较,模型组大鼠胰岛β细胞线粒体出现萎缩或空泡,线粒体嵴减少等病理改变,符合铁死亡的特征。白术内酯I给药干预后,T2DM模型大鼠胰岛β细胞内线粒体损伤得到改善,提示白术内酯I在拮抗胰岛β细胞铁死亡中起到一定作用。HE染色结果显示,与对照组比较,模型组大鼠的胰岛细胞结构明显萎缩变形,形态不规则,细胞核数量减少且分布不均匀,同时出现胞质空泡,表明模型大鼠的胰岛细胞受到了严重损伤。白术内酯I干预后,胰岛细胞结构的受损程度减轻,提示白术内酯I可以减轻T2DM大鼠的胰岛细胞损伤,具有一定的保护作用。

胱氨酸/谷氨酸反向转运系统(cystine/glutamate reverse transport system, System Xc-)是由SLC7A11和SLC3A2组成的异二聚体蛋白复合物,主要功能是以1:1的比例同时输入胱氨酸和输出谷氨酸,将胱氨酸转移到细胞中^[25]。SLC7A11是一种多次跨膜蛋白,可导入胱氨酸以进行GSH生物合成和抗氧化防御,SLC3A2是一种单跨膜蛋白,具有维持SLC7A11蛋白的稳定性并向胞膜运输的作用,其功能不仅限于胱氨酸转运,还转运多种氨基酸蛋白^[26],二者是合成GSH的重要参与蛋白^[27]。激活System Xc-可以促进细胞内胱氨酸的摄取并将其还原为半胱氨酸,半胱氨酸与谷氨酸和甘氨酸经过谷氨酰半胱氨酸连接酶(glutamate-cysteine ligase, GCL)和GSS的催化作用共同合成GSH^[28]。GSH是一种由3种氨基酸(半胱氨酸、谷氨酸和甘氨酸)组成的三肽,是细胞内最丰富的抗氧化剂,在氧化应激中发挥着

抗氧化的作用,也是 GPX4 的主要辅助因子^[29]。GPX4 作为铁死亡的关键蛋白能够还原多不饱和脂质和甾醇等有机过氧化物,将复杂的过氧化物还原为相应的对应物,阻断脂质过氧化链反应,抑制铁死亡的发生^[30]。本研究发现,与对照组比较,模型组大鼠胰腺组织中 SLC3A2、SLC7A11、GCLM、GSS、GPX4 的蛋白表达显著下调,而在白术内酯 I 给药干预后,这些蛋白的表达显著上调,提示白术内酯 I 可以增强胰岛细胞的抗氧化能力,进而增强对抗铁死亡的能力。

ACSL4 在铁死亡的过程中是一个不可或缺的下游角色,它是一种脂肪酸活化酶,对 PUFAs 有较高的倾向性^[31],而 PUFAs 在 ACSL4 的催化下先与辅酶 A (coenzyme A, CoA) 结合生成多不饱和脂肪酸-辅酶 A (polyunsaturated fatty acid, PUFA-CoA),再与溶血磷脂酰胆碱酰基转移酶 3 (lysophosphatidylcholine Acyltransferase 3, LPCAT3) 促发酯化反应生成细胞膜磷脂,然后在脂氧合酶 (lipoxygenase, LOXs) 催化下生成脂质过氧化物,诱发铁死亡^[32]。本研究发现,与对照组比较,模型组大鼠胰腺组织中 ACSL4 蛋白表达显著升高,在白术内酯 I 干预后显著降低了 ACSL4 蛋白表达,这表明白术内酯 I 通过降低 ACSL4 蛋白表达,抑制胰岛细胞脂质过氧化物的生成,增强了细胞抗氧化能力,进而抑制铁死亡的发展。

综上,本研究通过多种实验方法验证了铁死亡通路主要相关蛋白 (SLC7A11、GPX4、ACSL4) 的表达,研究结果发现,白术内酯 I 对这些蛋白的表达均有一定的上调和抑制作用,提示白术内酯 I 可能通过调控 System Xc-/GPX4 通路抑制 T2DM 大鼠胰岛细胞铁死亡,从而起到保护胰岛细胞的作用,同时白术内酯 I 还能够降低血糖水平,减轻 T2DM 及并发症的危害,延缓疾病的进展。以上研究旨在为临床治疗 T2DM 提供了理论依据和参考,但白术内酯 I 是否还能通过其他机制发挥保护胰岛细胞的作用,仍需进一步深入研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Sun H, Saeedi P, Karuranga S, *et al.* IDF diabetes atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045 [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2022, 183: 109119.
- [2] Galicia-Garcia U, Benito-Vicente A, Jebari S, *et al.*

- Pathophysiology of type 2 diabetes mellitus [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(17): 6275.
- [3] Prasad M K, Mohandas S, Ramkumar K M. Dysfunctions, molecular mechanisms, and therapeutic strategies of pancreatic β -cells in diabetes [J]. *Apoptosis*, 2023, 28(7/8): 958-976.
- [4] Xie D D, Li K, Feng R X, *et al.* Ferroptosis and traditional Chinese medicine for type 2 diabetes mellitus [J]. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2023, 16: 1915-1930.
- [5] Dalle S, Abderrahmani A, Renard E. Pharmacological inhibitors of β -cell dysfunction and death as therapeutics for diabetes [J]. *Front Endocrinol*, 2023, 14: 1076343.
- [6] Luc K, Schramm-Luc A, Guzik T J, *et al.* Oxidative stress and inflammatory markers in prediabetes and diabetes [J]. *J Physiol Pharmacol*, 2019, 70(6): 10.26402.
- [7] Yu W H, Tu Y M, Long Z, *et al.* Reactive oxygen species bridge the gap between chronic inflammation and tumor development [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 2606928.
- [8] Chen Y, Fang Z M, Yi X, *et al.* The interaction between ferroptosis and inflammatory signaling pathways [J]. *Cell Death Dis*, 2023, 14(3): 205.
- [9] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 107.
- [10] 张文友, 李紫梅, 吴礼宜. 白术提取物对 db/db 小鼠降血糖作用及机制研究 [J]. *中药药理与临床*, 2022, 38(6): 120-125.
- [11] Chao C L, Huang H C, Lin H C, *et al.* Sesquiterpenes from Baizhu stimulate glucose uptake by activating AMPK and PI3K [J]. *Am J Chin Med*, 2016, 44(5): 963-979.
- [12] Xie Z Y, Lin M Q, He X, *et al.* Chemical constitution, pharmacological effects and the underlying mechanism of atractylenolides: A review [J]. *Molecules*, 2023, 28(10): 3987.
- [13] Li H, Cao W, Zhang X B, *et al.* Atractylenolide-1 alleviates gastroparesis in diabetic rats by activating the stem cell factor/c-kit signaling pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2021, 24(4): 691.
- [14] Zhang W L, Li N, Shen Q, *et al.* Establishment of a mouse model of cancer cachexia with spleen deficiency syndrome and the effects of atractylenolide I [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2020, 41(2): 237-248.
- [15] Misiakiewicz-Has K, Maciejewska-Markiewicz D, Rzeszutok S, *et al.* The obscure effect of *Tribulus terrestris* saponins plus inulin on liver morphology, liver fatty acids, plasma glucose, and lipid profile in SD rats with and without induced type 2 diabetes mellitus [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(16): 8680.
- [16] Ding Y S, Li H Y, Li Y, *et al.* Protective effects of grape seed proanthocyanidins on the kidneys of diabetic rats

- through the Nrf2 signalling pathway [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2020, 2020: 5205903.
- [17] Davies M J, D'Alessio D A, Fradkin J, *et al.* Management of hyperglycemia in type 2 diabetes, 2018. A consensus report by the american diabetes association (ADA) and the european association for the study of diabetes (EASD) [J]. *Diabetes Care*, 2018, 41(12): 2669-2701.
- [18] Li D M, Ren W C, Wang X, *et al.* A modified method using TRIzol reagent and liquid nitrogen produces high-quality RNA from rat pancreas [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2009, 158(2): 253-261.
- [19] Battaglia A M, Chirillo R, Aversa I, *et al.* Ferroptosis and cancer: Mitochondria meet the “iron maiden” cell death [J]. *Cells*, 2020, 9(6): 1505.
- [20] 崔一然, 尚津锋, 焦家康, 等. 活血化痰中药通过抑制铁死亡对 MCAO 大鼠脑缺血损伤的保护作用机制 [J]. *中华中医药杂志*, 2023, 38(7): 3080-3085.
- [21] Schepp F, Schubert U, Schmid J, *et al.* Mechanistic insights into ferroptotic cell death in pancreatic islets [J]. *Horm Metab*, 2024, 56(4): 279-285.
- [22] Huang Z J, Ma Y, Sun Z G, *et al.* Ferroptosis: Potential targets and emerging roles in pancreatic diseases [J]. *Arch Toxicol*, 2024, 98(1): 75-94.
- [23] Stancic A, Saksida T, Markelic M, *et al.* Ferroptosis as a novel determinant of β -cell death in diabetic conditions [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 3873420.
- [24] Li D, Jiang C J, Mei G B, *et al.* Quercetin alleviates ferroptosis of pancreatic β cells in type 2 diabetes [J]. *Nutrients*, 2020, 12(10): 2954.
- [25] Tu H, Tang L J, Luo X J, *et al.* Insights into the novel function of system Xc- in regulated cell death [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2021, 25(3): 1650-1662.
- [26] Koppula P, Zhuang L, Gan B Y. Cystine transporter SLC7A11/xCT in cancer: Ferroptosis, nutrient dependency, and cancer therapy [J]. *Protein Cell*, 2021, 12(8): 599-620.
- [27] Chen X, Li J B, Kang R, *et al.* Ferroptosis: Machinery and regulation [J]. *Autophagy*, 2021, 17(9): 2054-2081.
- [28] 白晶雪, 雷根平, 王婷, 等. 基于铁死亡探讨中医药干预肾脏疾病作用机制研究进展 [J]. *中草药*, 2024, 55(18): 6393-6401.
- [29] Li F J, Long H Z, Zhou Z W, *et al.* System Xc-/GSH/GPX4 axis: An important antioxidant system for the ferroptosis in drug-resistant solid tumor therapy [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 910292.
- [30] Xie Y C, Kang R, Klionsky D J, *et al.* GPX4 in cell death, autophagy, and disease [J]. *Autophagy*, 2023, 19(10): 2621-2638.
- [31] Zhang H L, Hu B X, Li Z L, *et al.* PKC β II phosphorylates ACSL4 to amplify lipid peroxidation to induce ferroptosis [J]. *Nat Cell Biol*, 2022, 24(1): 88-98.
- [32] Zeng F, Lan Y, Wang N, *et al.* Ferroptosis: A new therapeutic target for bladder cancer [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 1043283.

[责任编辑 罗 曦]