

【DOI】 10.3969 / j.issn.1671-6450.2025.09.017

论著 · 基础

罗沙司他对 2 型糖尿病大鼠糖脂代谢、肝功能、炎症反应、肝脏脂肪蓄积及 TLR4/NF- κ B 通路的影响

石秀祯, 何艳, 徐申, 郭爱莉, 付锴, 谭金枚



基金项目: 湖北省卫生健康委科研立项项目(WJ2023M024); 长航局科技项目(202210005)

作者单位: 430014 武汉, 长江航运总医院肾内科(石秀祯、何艳、徐申、郭爱莉、付锴), 内分泌科(谭金枚)

通信作者: 付锴, E-mail: fukai616@163.com

【摘要】 目的 探究罗沙司他(ROX)对 2 型糖尿病(T2DM)大鼠糖脂代谢、肝功能、炎症反应、肝脏脂肪蓄积及 Toll 样受体 4(TLR4)/核转录因子- κ B(NF- κ B)通路的影响。方法 于 2024 年 8 月—2025 年 1 月在长江航运总医院动物实验室进行实验。T2DM 大鼠采用饲喂高脂高糖饲料和腹腔注射链脲佐菌素造模,将 T2DM 大鼠 60 只按随机数字表法分成:模型组、ROX 低剂量组(12.5 mg/kg)、ROX 中剂量组(25 mg/kg)、ROX 高剂量组(50 mg/kg)、盐酸二甲双胍组(200 mg/kg),每组 12 只。另取 12 只正常大鼠给予普通饲料喂养及腹腔一次性注射生理盐水作为对照组。各组给予相应干预 8 周。全自动生化仪检测大鼠血糖、血脂、肝功能指标,并测定肝指数;酶联免疫吸附法检测血清炎症因子水平;HE 染色和油红 O 染色观察肝组织病理学及脂肪蓄积;蛋白印迹法检测肝组织 TLR4/NF- κ B 通路蛋白表达。结果 与对照组比较,模型组大鼠肝组织结构紊乱,肝细胞形态改变,出现脂质空泡和大片橘红色,脂肪蓄积程度严重,且血清空腹血糖(FPG)、空腹胰岛素(FINS)、胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)、总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、肝指数、C-反应蛋白(CRP)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-6(IL-6)、肝组织 TLR4、磷酸化 NF- κ B p65(p-NF- κ B p65)/NF- κ B p65 蛋白表达升高,高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)降低(均 $P < 0.01$);与模型组比较,ROX 低、中、高剂量组及盐酸二甲双胍组大鼠肝组织病变明显好转,肝细胞中橘红色面积减小,脂肪蓄积程度减轻,且血清 FPG、FINS、HOMA-IR、TC、TG、LDL-C、ALT、AST、肝指数、CRP、TNF- α 、IL-6、肝组织 TLR4、p-NF- κ B p65/NF- κ B p65 蛋白表达降低,HDL-C 升高(均 $P < 0.01$),ROX 低、中、高剂量组血清 FPG、FINS、HOMA-IR、TC、TG、LDL-C、ALT、AST、肝指数、CRP、TNF- α 、IL-6、肝组织 TLR4、p-NF- κ B p65/NF- κ B p65 蛋白表达降低程度及 HDL-C 升高程度呈现剂量依赖性(均 $P < 0.01$);ROX 高剂量组和盐酸二甲双胍组大鼠肝组织结构形态相近,趋于正常,肝细胞中橘红色面积相近,脂肪蓄积程度减轻最为明显,糖脂代谢指标、肝功能指标及肝指数、炎症因子、肝组织 TLR4/NF- κ B 通路蛋白表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 ROX 能够改善 T2DM 大鼠糖脂代谢、肝功能及炎症反应,减轻肝组织病理损伤和脂肪蓄积,并抑制 TLR4/NF- κ B 通路。

【关键词】 2 型糖尿病;罗沙司他;糖脂代谢;肝脏脂肪蓄积;Toll 样受体 4/核转录因子- κ B 通路;大鼠**【中图分类号】** R587.1**【文献标识码】** A

Effects of roxadustat on glycolipid metabolism and liver injury in type 2 diabetic rats via TLR4/NF- κ B pathway Shi Xiuzhen*, He Yan, Xu Shen, Guo Aili, Fu Kai, Tan Jinmei. * Department of Nephrology, Changjiang Shipping General Hospital, Hubei, Wuhan 430014, China

Funding program: Hubei Health Commission Research Project (WJ2023M024); Science and Technology Project of Yangtze River Navigation Bureau (202210005)

Corresponding author: Fu Kai, E-mail: fukai616@163.com

【Abstract】 Objective To explore roxadustat's effects on diabetes-associated metabolic/liver dysfunction. **Methods**

The experiments were conducted at the Animal Laboratory of the Changjiang Shipping General Hospital from August 2024 to January 2025. T2DM rats were induced by feeding high fat and high sugar feed and intraperitoneal injection of streptozotocin. 60 T2DM rats were randomly divided into: model group, ROX low dose group (12.5 mg/kg), ROX medium dose group (25 mg/kg), ROX high dose group (50 mg/kg), metformin hydrochloride group (200 mg/kg), 12 animals in each group; another 12 normal rats were given normal feed for 8 weeks and normal saline was injected into the abdominal cavity as healthy control group; each group was given corresponding intervention for 8 weeks. Automatic biochemical analyzer was used to detect

the blood glucose, blood lipids and liver function indexes of rats, and the liver index was determined. Serum inflammatory factors were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. Liver tissue histopathology and fat accumulation were observed by hematoxylin-eosin staining and oil red O staining. The expression of TLR4/NF- κ B pathway protein in liver tissue was detected by western blot. **Results** Compared with healthy control group, the liver tissue structure of rats in model group was disordered, the morphology of liver cells was changed, lipid vacuoles and large orange red areas appeared, and the degree of fat accumulation was serious; serum fasting blood glucose (FPG), fasting insulin (FINS), insulin resistance index (HOMA-IR), total cholesterol (TC), triacylglycerol (TG), low density lipoprotein-cholesterol (LDL-C), alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), liver index, C-reactive protein (CRP), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), the expressions of TLR4, phosphorylated-NF- κ B p65 (p-NF- κ B p65)/NF- κ B p65 protein in liver tissue were increased, and high density lipoprotein-cholesterol (HDL-C) was decreased ($tP=12.983/<0.001, 10.640/<0.001, 19.194/<0.001, 16.195/<0.001, 17.406/<0.001, 17.660/<0.001, 14.805/<0.001, 13.273/<0.001, 9.039/<0.001, 10.590/<0.001, 16.086/<0.001, 20.255/<0.001, 22.789/<0.001, 14.976/<0.001, 9.824/<0.001$). Compared with model group, the rats of ROX low, medium, and high dose groups and metformin hydrochloride group showed significant improvement in liver tissue lesions, reduced orange red area in liver cells, decreased degree of fat accumulation; serum FPG, FINS, HOMA-IR, TC, TG, LDL-C, ALT, AST, liver index, CRP, TNF- α , IL-6, TLR4, p-NF- κ B p65/NF- κ B p65 protein expression in liver tissue were decreased, while HDL-C was increased ($F/P=37.001/<0.001, 34.685/<0.001, 99.532/<0.001, 101.881/<0.001, 120.663/<0.001, 105.021/<0.001, 61.833/<0.001, 48.872/<0.001, 37.652/<0.001, 36.541/<0.001, 69.113/<0.001, 86.194/<0.001, 66.174/<0.001, 63.913/<0.001, 27.611/<0.001$). The degree of decrease in serum FPG, FINS, HOMA-IR, TC, TG, LDL-C, ALT, AST, liver index, CRP, TNF- α , IL-6, liver tissue TLR4, p-NF- κ B p65/NF- κ B p65 protein expression in ROX low, medium, high dose groups and the degree increase in HDL-C were dose-dependent ($F/P=19.952/<0.001, 18.082/<0.001, 48.212/<0.001, 63.192/<0.001, 88.165/<0.001, 66.031/<0.001, 31.735/<0.001, 27.221/<0.001, 22.784/<0.001, 22.072/<0.001, 40.682/<0.001, 48.306/<0.001, 39.842/<0.001, 44.825/<0.001, 14.002/<0.001$). The liver tissue structure and morphology of rats in ROX high dose group and metformin hydrochloride group were similar and tended to be normal, the orange area of liver cells was similar, the degree of fat accumulation was most significantly reduced, and there was no statistical significance in the glucose and lipid metabolism indexes, liver function indexes and liver index, inflammatory factors, and TLR4/NF- κ B pathway protein expression in liver tissue ($P>0.05$). **Conclusion** Roxadustat ameliorates diabetic liver injury by modulating glucose metabolism and TLR4/NF- κ B signaling.

【Key words】 Type 2 diabetes; Roxadustat; Glucolipid metabolism; Liver fat accumulation; TLR4/NF- κ B pathway; Rats

糖尿病是全球发病率最高的疾病之一, 90% ~ 95% 的患者为 2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM), 预计到 2045 年将影响到 6.93 亿成年人, 严重者会出现肾功能衰竭, 导致病死率增加^[1-2]。T2DM 与糖脂代谢紊乱有关, 发病过程中会导致胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR), 出现葡萄糖利用障碍以及脂肪性肝炎^[3]。研究发现 T2DM 与肥胖、炎症反应等相关, 通过药物治疗减轻体质量, 降低血糖, 抑制炎症反应因子释放是治疗 T2DM 的策略之一^[4-5]。罗沙司他 (roxadustat, ROX) 在临床主要用于治疗贫血症, 如糖尿病肾性贫血^[6]。有研究发现, ROX 可以促进糖尿病大鼠皮肤伤口部位的血管生成加速伤口愈合^[7]。Toll 样受体 4 (Toll like receptor 4, TLR4)/核转录因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 通路是与炎症反应相关的经典通路之一, 研究发现抑制该通路可以改善糖尿病小鼠的糖脂代谢紊乱和炎症反应^[8]。T2DM 属于微血管疾病, ROX 可以改善炎症反应带来的血管损伤, 但

关于 ROX 对 T2DM 及 TLR4/NF- κ B 通路的影响研究尚少。因此本研究建立 T2DM 大鼠模型, 探讨 ROX 对于 T2DM 大鼠的糖脂代谢、脂肪蓄积以及 TLR4/NF- κ B 通路的影响, 为 T2DM 的治疗提供新的药物前景, 报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料 (1) 动物: SPF 级雄性 SD 大鼠 (12 周龄, 体质量 374~398 g) 80 只, 购自广州明迅生物科技有限责任公司 [动物生产许可证号: SCXK (粤) 2024-0070], 在相对湿度 57%~64%、温度 23~25℃、光照/黑暗 (12 h/12 h) 的条件下对大鼠进行饲养。本实验通过长江航运总医院伦理委员会批准 (L202407-03)。(2) 药物试剂: 罗沙司他胶囊 (批号 20240116) 购自珐博进 (中国) 医药技术开发有限公司; 盐酸二甲双胍片 (批号 20240215) 购自长春长庆药业集团有限公司; 高脂高糖饲料 (包含 55% 普通饲料, 11% 猪油, 22% 蔗糖, 3% 胆固醇, 9% 蛋黄粉, 批号 HG-1417)、链脲佐菌素

(批号 HG-2194)、苏木素—伊红(HE)染色试剂盒(批号 HG-1605)、油红 O 染色试剂盒(批号 HG-1713)、蛋白裂解液(批号 HG-1902)购自珠海恒屹生物科技公司;C-反应蛋白(CRP)(批号 A1089-R)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)(批号 A1138-R)、白介素-6(IL-6)(批号 A1106-R)酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒、羊抗兔二抗(批号 A1427-D)购自青岛泽泓生物科技公司;兔源 TLR4(批号 ab8376)、磷酸化 NF- κ B p65 (p-NF- κ B p65)(批号 ab239882)、NF- κ B p65(批号 ab246347)、 β -肌动蛋白(β -actin)(批号 ab14691)单克隆抗体购自美国 Abcam 公司。(3)仪器设备:全自动生化仪(型号 iMagic-V7)、酶标仪(型号 Thermo Varioskan ALF)、光学显微镜(型号 NIB400)均购自江苏英诺华医疗科技公司;蛋白成像系统(型号 G:Box chemi XX9)购自广州进科驰安科技公司。

1.2 实验方法 于 2024 年 8 月—2025 年 1 月在长江航运总医院动物实验室进行实验。

1.2.1 造模与分组:SD 大鼠以高脂高糖饲料喂养 8 周后,控制大鼠禁食 12 h,腹腔一次性注射链脲佐菌素(30 mg/kg),1 周后对空腹血糖(FPG)进行测定,T2DM 大鼠造模成功标准:FPG \geq 16.7 mmol/L^[9]。成功造模 T2DM 大鼠 60 只(共 68 只大鼠参与造模,其中 5 只未成模和 3 只造模过程中死亡的大鼠予以剔除),随机数字表法分成:模型组、ROX 低剂量组(12.5 mg/kg)、ROX 中剂量组(25 mg/kg)、ROX 高剂量组(50 mg/kg)、盐酸二甲双胍组(200 mg/kg),每组 12 只^[10-11]。另取 12 只正常大鼠给予 8 周的普通饲料喂养及腹腔一次性注射生理盐水(30 mg/kg)作为对照组。

1.2.2 给药方式:造模后 ROX 低(12.5 mg/kg)、中(25 mg/kg)、高(50 mg/kg)剂量组分别按照对应剂量给予大鼠 ROX 灌胃(ROX 和生理盐水相溶配制成浓度分别为 1.25、2.5、5.0 mg/ml 的混悬液,灌胃体积 10 ml/kg)^[10]。盐酸二甲双胍组(200 mg/kg)按照对应剂量灌胃大鼠(盐酸二甲双胍和生理盐水相溶配制成浓度为 20 mg/ml 的混悬液,灌胃体积 10 ml/kg)^[11]。模型组和对对照组大鼠给予生理盐水 10 ml/kg 灌胃。每天 1 次,持续 8 周。给药期间无大鼠死亡。

1.3 观测指标与方法

1.3.1 血糖、血脂、肝功能指标检测:给药结束后,禁食 8 h,将大鼠麻醉(55 mg/kg 戊巴比妥钠腹腔注射)后,腹主动脉取血 5 ml,离心保留血清-70℃冻存待测。取部分血清,使用全自动生化仪测定血清 FPG、空腹胰岛素(FINS)、总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇

(LDL-C)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)水平,并计算胰岛素抵抗指数(HOMA-IR) = FPG \times FINS/22.5。

1.3.2 肝组织收集及肝指数计算:剥离大鼠肝组织称质量,肝指数 = 肝湿质量/体质量 \times 100%,随后肝组织用于 HE、油红 O 染色和蛋白印迹检测。

1.3.3 血清炎症因子水平检测:取上述血清以 ELISA 法按照试剂盒说明书检测血清 CRP、TNF- α 、IL-6 水平。

1.3.4 HE 染色观察肝组织病理学变化:将肝组织冲洗干净后,分成三部分,一部分肝组织加入 4%多聚甲醛固定,冲洗后,用乙醇梯度脱水,浸蜡包埋,切片,按照 HE 染色试剂盒说明书进行染色,光学显微镜下拍照。

1.3.5 油红 O 染色观察肝组织脂肪蓄积:另一部分肝组织,根据油红 O 染色试剂盒说明书进行染色,70%乙醇溶液分化,水洗,光镜下观察脂肪变性情况。

1.3.6 蛋白印迹法检测肝组织 TLR4/NF- κ B 通路蛋白表达:将剩余的肝组织研磨匀浆后,添加蛋白裂解液对总蛋白进行提取,定量蛋白浓度后(二喹啉甲酸法),对蛋白进行变性、电泳、转膜、脱脂奶封闭等步骤,随后洗膜,加入 TLR4(1:1 400)、p-NF- κ B p65(1:1 100)、NF- κ B p65(1:1 100)、 β -actin(1:1 700)一抗,4℃孵育过夜,Tris-盐酸缓冲液洗膜后,加入羊抗兔二抗(1:3 300),37℃孵育 2 h,显影液显影,于蛋白成像系统中利用条带灰度值计算蛋白表达量。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 26.0 软件进行数据分析。正态分布计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较用单因素方差分析,组间两两比较用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ROX 对 T2DM 大鼠糖代谢的影响 与对照组比较,模型组血清 FPG、FINS、HOMA-IR 升高($P < 0.01$);与模型组比较,ROX 低、中、高剂量组及盐酸二甲双胍组血清 FPG、FINS、HOMA-IR 降低($P < 0.01$);ROX 低、中、高剂量组血清 FPG、FINS、HOMA-IR 依次降低($F/P = 19.952 / < 0.001, 18.082 / < 0.001, 48.212 / < 0.001$);ROX 高剂量组血清 FPG、FINS、HOMA-IR 与盐酸二甲双胍组比较差异均无统计学意义($P > 0.05$),见表 1。

2.2 ROX 对 T2DM 大鼠脂代谢的影响 与对照组比较,模型组血清 TC、TG、LDL-C 升高,HDL-C 降低($P < 0.01$);与模型组比较,ROX 低、中、高剂量组及盐酸二甲双胍组血清 TC、TG、LDL-C 降低,HDL-C 升高($P < 0.01$);ROX 低、中、高剂量组血清 TC、TG、LDL-C 依次

降低, HDL-C 依次升高 ($F/P = 63.192 / < 0.001$ 、 $88.165 / < 0.001$ 、 $66.031 / < 0.001$ 、 $14.002 / < 0.001$); ROX 高剂量组血清 TC、TG、HDL-C、LDL-C 与盐酸二甲双胍组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 2。

2.3 ROX 对 T2DM 大鼠肝功能指标及肝指数的影响
与对照组比较, 模型组血清 ALT、AST、肝指数升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, ROX 低、中、高剂量组及盐酸二甲双胍组血清 ALT、AST、肝指数降低 ($P < 0.01$); ROX 低、中、高剂量组血清 ALT、AST、肝指数依次降低 ($F/P = 31.735 / < 0.001$ 、 $27.221 / < 0.001$ 、 $22.784 / <$

0.001); ROX 高剂量组血清 ALT、AST、肝指数与盐酸二甲双胍组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 3。

2.4 ROX 对 T2DM 大鼠血清炎症因子的影响 与对照组比较, 模型组血清 CRP、TNF- α 、IL-6 升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, ROX 低、中、高剂量组及盐酸二甲双胍组血清 CRP、TNF- α 、IL-6 降低 ($P < 0.01$); ROX 低、中、高剂量组血清 CRP、TNF- α 、IL-6 依次降低 ($F/P = 22.072 / < 0.001$ 、 $40.682 / < 0.001$ 、 $48.306 / < 0.001$); ROX 高剂量组血清 CRP、TNF- α 、IL-6 与盐酸二甲双胍组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 4。

表 1 各组大鼠糖代谢指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.1 Comparison of glucose metabolism indicators among different groups of rats

组别	n	FPG (mmol/L)	FINS (mU/L)	HOMA-IR
对照组	12	5.31±0.45	20.94±2.25	4.94±0.61
模型组	12	23.49±4.83	30.31±2.06	31.64±4.78
ROX 低剂量组	12	17.76±4.27 ^a	27.41±1.97 ^a	21.64±3.92 ^a
ROX 中剂量组	12	13.94±3.14 ^{ab}	24.98±1.85 ^{ab}	15.48±3.03 ^{ab}
ROX 高剂量组	12	9.28±2.11 ^{abc}	22.55±2.11 ^{abc}	9.30±1.97 ^{abc}
盐酸二甲双胍组	12	9.07±2.06 ^{abc}	22.06±2.14 ^{abc}	8.89±1.83 ^{abc}
t/P 模型组与对照组间值		12.983 / < 0.001	10.640 / < 0.001	19.194 / < 0.001
F/P 干预组与模型组间值		37.001 / < 0.001	34.685 / < 0.001	99.532 / < 0.001

注: 与模型组比较, ^a $P < 0.01$; 与 ROX 低剂量组比较, ^b $P < 0.05$; 与 ROX 中剂量组比较, ^c $P < 0.01$ 。

表 2 各组大鼠脂代谢指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.2 Comparison of lipid metabolism indicators among different groups of rats

组别	n	TC (mmol/L)	TG (mmol/L)	HDL-C (mmol/L)	LDL-C (mmol/L)
对照组	12	2.03±0.35	0.41±0.08	1.43±0.26	0.63±0.08
模型组	12	7.16±1.04	4.05±0.72	0.64±0.10	2.51±0.36
ROX 低剂量组	12	5.19±0.66 ^a	2.72±0.41 ^a	0.86±0.12 ^a	1.86±0.29 ^a
ROX 中剂量组	12	3.77±0.54 ^{ab}	1.95±0.33 ^{ab}	1.01±0.16 ^{ab}	1.39±0.24 ^{ab}
ROX 高剂量组	12	2.56±0.51 ^{abc}	1.01±0.15 ^{abc}	1.22±0.21 ^{abc}	0.80±0.11 ^{abc}
盐酸二甲双胍组	12	2.49±0.47 ^{abc}	0.96±0.12 ^{abc}	1.27±0.23 ^{abc}	0.84±0.12 ^{abc}
t/P 模型组与对照组间值		16.195 / < 0.001	17.406 / < 0.001	17.660 / < 0.001	9.824 / < 0.001
F/P 干预组与模型组间值		101.881 / < 0.001	120.663 / < 0.001	105.021 / < 0.001	27.611 / < 0.001

注: 与模型组比较, ^a $P < 0.01$; 与 ROX 低剂量组比较, ^b $P < 0.05$; 与 ROX 中剂量组比较, ^c $P < 0.01$ 。

表 3 各组大鼠肝功能指标及肝指数比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.3 Comparison of liver function indicators and liver indices among different groups of rats

组别	n	ALT (U/L)	AST (U/L)	肝指数 (%)
对照组	12	26.37±4.04	19.24±4.11	3.19±0.28
模型组	12	65.63±8.25	47.36±6.08	4.38±0.36
ROX 低剂量组	12	52.47±7.17 ^a	38.25±6.17 ^a	3.99±0.29 ^a
ROX 中剂量组	12	43.15±7.02 ^{ab}	31.19±5.24 ^{ab}	3.64±0.25 ^{ab}
ROX 高剂量组	12	31.44±5.03 ^{abc}	22.35±4.29 ^{abc}	3.31±0.19 ^{abc}
盐酸二甲双胍组	12	29.98±4.76 ^{abc}	23.08±4.05 ^{abc}	3.26±0.21 ^{abc}
t/P 模型组与对照组间值		14.805 / < 0.001	13.273 / < 0.001	9.039 / < 0.001
F/P 干预组与模型组间值		61.833 / < 0.001	48.872 / < 0.001	37.652 / < 0.001

注: 与模型组比较, ^a $P < 0.01$; 与 ROX 低剂量组比较, ^b $P < 0.01$; 与 ROX 中剂量组比较, ^c $P < 0.01$ 。

表 4 各组大鼠血清炎症反应因子比较 ($\bar{x}\pm s$)

Tab.4 Comparison of serum inflammatory response factors among different groups of rats

组别	n	CRP (mg/L)	TNF- α (ng/L)	IL-6 (ng/L)
对照组	12	5.03 \pm 1.06	31.06 \pm 4.25	22.67 \pm 3.05
模型组	12	14.04 \pm 2.75	82.63 \pm 10.26	74.21 \pm 8.27
ROX 低剂量组	12	11.12 \pm 2.60 ^a	65.84 \pm 8.33 ^a	58.45 \pm 8.33 ^a
ROX 中剂量组	12	8.45 \pm 2.09 ^{ab}	54.29 \pm 8.01 ^{ab}	45.09 \pm 6.74 ^{ab}
ROX 高剂量组	12	5.61 \pm 1.12 ^{abc}	38.91 \pm 5.29 ^{abc}	31.05 \pm 5.01 ^{abc}
盐酸二甲双胍组	12	5.82 \pm 1.15 ^{abc}	40.27 \pm 5.07 ^{abc}	32.26 \pm 4.98 ^{abc}
t/P 模型组与对照组间值		10.590/ $<$ 0.001	16.086/ $<$ 0.001	20.255/ $<$ 0.001
F/P 干预组与模型组间值		36.541/ $<$ 0.001	69.113/ $<$ 0.001	86.194/ $<$ 0.001

注:与模型组比较,^a P $<$ 0.05;与 ROX 低剂量组比较,^b P $<$ 0.05;与 ROX 中剂量组比较,^c P $<$ 0.01。

2.5 ROX 对 T2DM 大鼠肝组织病理学及脂肪蓄积的影响 HE 染色结果显示,对照组大鼠肝组织结构完整,细胞排列紧密规则,未见脂质空泡;模型组大鼠肝组织结构紊乱,肝细胞形态改变,出现脂质空泡;ROX 低、中、高剂量组大鼠肝组织病变随着剂量的增大明显好转;ROX 高剂量组和盐酸二甲双胍组大鼠肝组织结构形态相近,趋于正常,见图 1。

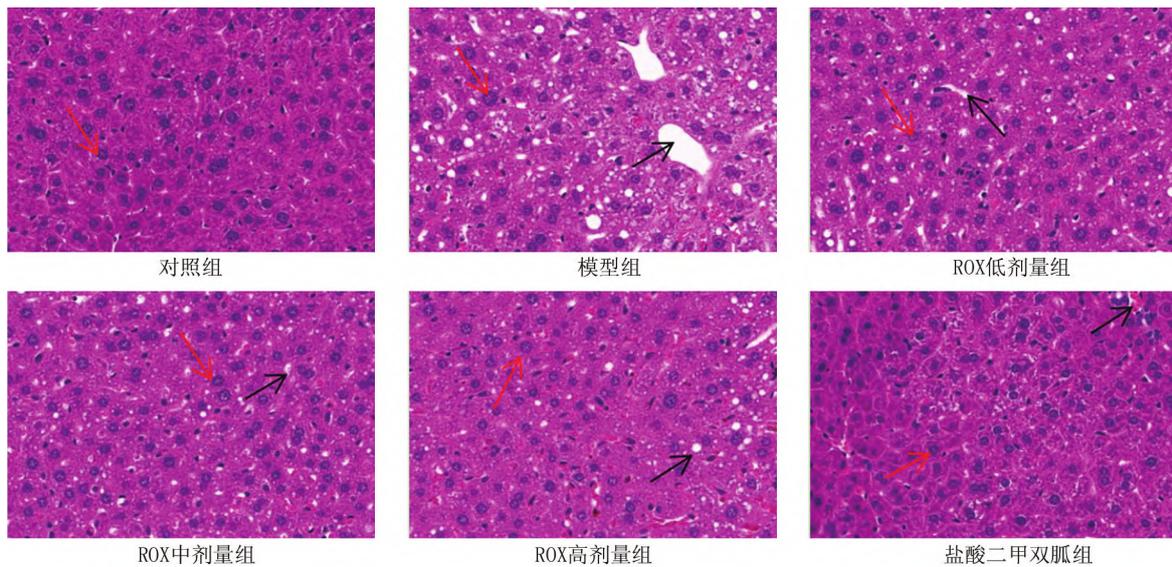
油红 O 染色可以使细胞脂质液滴表现为橘红色,对照组大鼠肝细胞中未发现明显的橘红色;模型组大鼠肝细胞中出现大片橘红色,即脂肪蓄积程度严重;ROX 低、中、高剂量组大鼠肝细胞中橘红色面积随着剂量的增大逐渐减小,即脂肪蓄积程度逐渐减轻;ROX 高剂量组和盐酸二甲双胍组大鼠肝细胞中橘红色面积相近,即脂肪蓄积程度减轻最为明显,见图 2。

2.6 ROX 对 T2DM 大鼠肝组织 TLR4/NF- κ B 通路的

影响 与对照组比较,模型组肝组织 TLR4、p-NF- κ B p65/NF- κ B p65 蛋白表达升高 (P $<$ 0.01);与模型组比较,ROX 低、中、高剂量组及盐酸二甲双胍组肝组织 TLR4、p-NF- κ B p65/NF- κ B p65 蛋白表达降低 (P $<$ 0.01);ROX 低、中、高剂量组肝组织 TLR4、p-NF- κ B p65/NF- κ B p65 蛋白表达依次降低 ($F/P = 39.842 / < 0.001, 44.825 / < 0.001$);ROX 高剂量组肝组织 TLR4、p-NF- κ B p65/NF- κ B p65 蛋白表达与盐酸二甲双胍组比较差异无统计学意义 (P $>$ 0.05),见图 3、表 5。

3 讨论

T2DM 的发病机制尚未完全明确,目前认为可能与糖脂代谢紊乱引发的肝脏脂肪蓄积有关,肝脏脂肪蓄积会使脂肪发生变性,导致炎症反应的发生,而炎症反应又加剧 T2DM 的严重程度^[12-13]。T2DM 群体大多存在肥胖,体内存在脂质代谢紊乱现象,TC、TG、LDL-C



注:红色箭头所示为肝细胞,黑色箭头所示为脂质空泡。

图 1 各组大鼠肝组织病理学变化(HE 染色, $\times 200$)

Fig.1 Pathological changes in liver tissue of rats in each group (HE staining, $\times 200$)

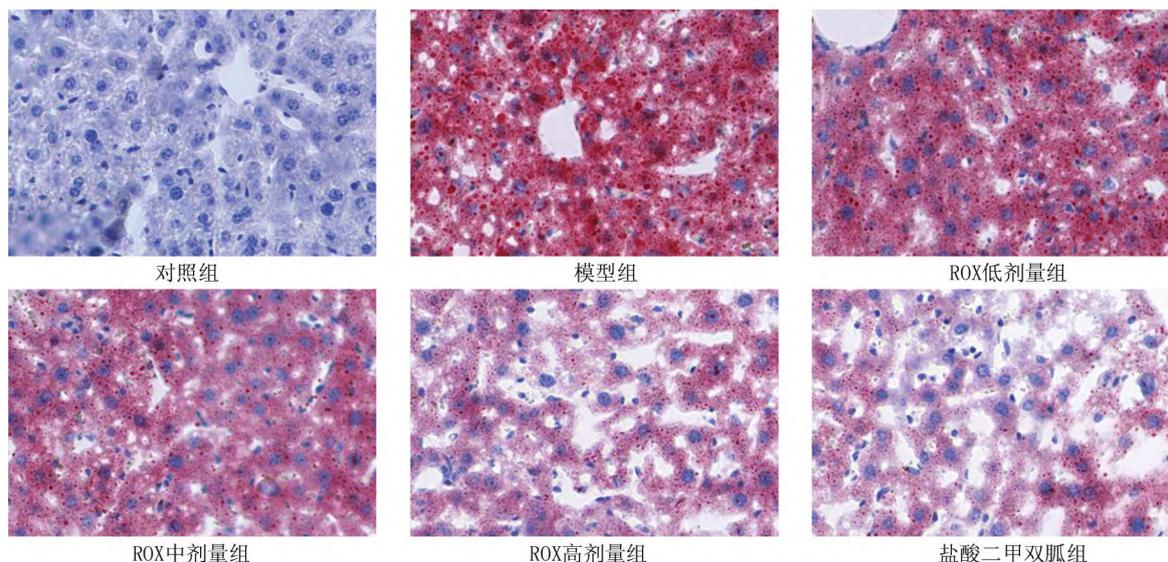
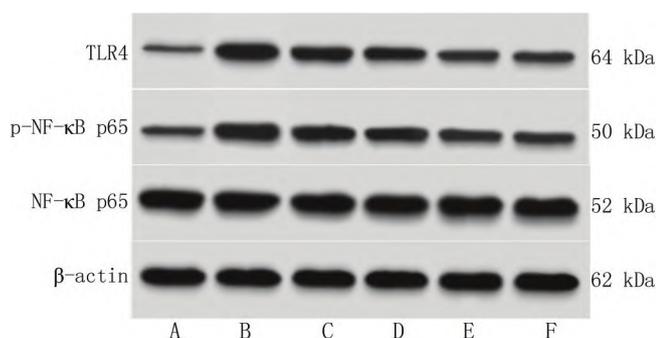


图 2 各组大鼠肝组织脂肪蓄积(油红 O 染色, ×200)

Fig.2 Fat accumulation in liver tissue of rats in each group (Oil Red O staining, × 200)



注: A.对照组; B.模型组; C.ROX 低剂量组; D.ROX 中剂量组; E.ROX 高剂量组; F.盐酸二甲双胍组。

图 3 各组大鼠肝组织 TLR4/NF-κB 通路蛋白印迹图

Fig.3 Western blot images of TLR4/NF-κB pathway in liver tissue of rats in each group

表 5 各组大鼠肝组织 TLR4、p-NF-κB p65/NF-κB p65 蛋白表达比较 (x±s)

Tab.5 Comparison of TLR4 and p-NF-κB p65/NF-κB p65 protein expression in liver tissues of rats in different groups

组别	n	TLR4/β-actin	p-NF-κB p65/NF-κB p65
对照组	12	0.21±0.04	0.33±0.06
模型组	12	0.98±0.11	0.91±0.12
ROX 低剂量组	12	0.81±0.09 ^a	0.79±0.09 ^a
ROX 中剂量组	12	0.67±0.06 ^{ab}	0.63±0.08 ^{ab}
ROX 高剂量组	12	0.55±0.06 ^{abc}	0.49±0.06 ^{abc}
盐酸二甲双胍组	12	0.53±0.07 ^{abc}	0.46±0.05 ^{abc}
t/P 模型组与对照组间值		22.789/<0.001	14.976/<0.001
F/P 干预组与模型组间值		66.174/<0.001	63.913/<0.001

注:与模型组比较, ^aP<0.01;与 ROX 低剂量组比较, ^bP<0.01;与 ROX 中剂量组比较, ^cP<0.01。

水平升高,而具有保护作用的 HDL-C 水平降低,导致脂肪蓄积,从而加重肝脏损伤^[14-15]。因此治疗 T2DM 主要应该从血糖、血脂水平、脂肪蓄积、炎症反应层面考虑。糖脂代谢紊乱导致的肝脏损伤、脂肪堆积,常用 ALT、AST 及肝指数升高来判断肝脏损伤状况^[16]。本研究建立的 T2DM 模型大鼠血糖、血脂、肝功能、肝指数、炎症因子指标均较健康大鼠明显升高, HDL-C 较健康大鼠明显降低,且 T2DM 大鼠肝组织发生病变,脂肪蓄积程度严重。表明 T2DM 大鼠体内糖脂代谢紊乱,肝功能异常,且伴随着炎症反应和肝组织病理损伤及脂肪蓄积。

T2DM 的治疗主要通过调节糖脂代谢平衡,增强糖脂利用能力,降低 HOMA-IR,从而改善糖脂代谢紊乱现象^[17-18]。有研究显示,ROX 对糖尿病相关并发症有较好的改善作用,ROX 能够维持机体糖脂代谢稳定,在糖尿病肾病、糖尿病心肌病、糖尿病视网膜损伤和糖尿病伤口愈合受损等疾病的治疗方面显示出较好的效果^[19]。Mäkinen 等^[20]报道发现,ROX 可调节 T2DM 小鼠葡萄糖代谢及糖酵解,改善 HOMA-IR。Fang 等^[21]研究显示,ROX 能够抑制心肌细胞中炎症反应和氧化应激,进而改善糖尿病小鼠心肌损伤。本结果显示, T2DM 大鼠经 ROX 低、中、高剂量干预后血清 FPG、FINS、HOMA-IR、TC、TG、LDL-C、ALT、AST、肝指数、CRP、TNF-α、IL-6 呈剂量依赖性降低, HDL-C 呈剂量依赖性升高,且肝组织病变明显好转,肝细胞脂肪蓄积程度减轻;ROX 高剂量组和盐酸二甲双胍组作用效果相近。本研究结果与前述报道结果相似,提示

ROX 可改善 T2DM 大鼠糖脂代谢及肝功能,抑制炎症反应,减轻肝组织病理损伤和脂肪蓄积。分析原因可能是 ROX 能够调节葡萄糖代谢及糖酵解进程,还可通过调控炎症及氧化应激反应发挥对肝脏的保护作用。

TLR4/NF- κ B 通路参与了糖尿病及其并发症的发生和发展^[22-24],有研究发现,抑制 TLR4/NF- κ B 通路活性能够缓解炎症反应,改善糖尿病肾病大鼠肾损伤^[25]。Zhang 等^[26]报道发现,沉默 TLR4/NF- κ B 通路可调节糖脂代谢紊乱,抑制神经炎症反应,从而缓解糖尿病认知障碍。有研究显示,抑制 TLR4/NF- κ B 信号通路的激活能够减轻妊娠期糖尿病小鼠的炎症反应和胰岛素抵抗^[27]。本结果发现,T2DM 大鼠肝组织 TLR4、p-NF- κ B p65/NF- κ B p65 蛋白表达较健康大鼠明显升高,经 ROX 干预后大鼠肝组织 TLR4、p-NF- κ B p65/NF- κ B p65 蛋白表达明显降低,ROX 剂量越高降低程度越显著,表明 ROX 对 T2DM 大鼠糖脂代谢、肝功能、炎症反应、肝脏脂肪蓄积的改善效果可能与抑制 TLR4/NF- κ B 通路有关,与既往研究结果一致^[25-27]。

4 结 论

综上所述,对 TLR4/NF- κ B 通路的抑制作用可能是 ROX 改善 T2DM 大鼠糖脂代谢、肝功能及炎症反应,减轻肝组织病理损伤和脂肪蓄积的作用机制。本实验为 ROX 治疗 T2DM 提供了药理学依据,并初步探究了其机制。但未设置 TLR4/NF- κ B 通路激活剂进行恢复实验是本研究的不足之处,以后将进行 TLR4/NF- κ B 通路激活剂实验,进一步明确 ROX 改善 T2DM 的作用机制。

利益冲突:所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明

石秀祯:设计研究方案及课题,实施研究过程,论文撰写;何艳、徐申:提出研究思路,分析试验数据,论文审核;郭爱莉、付锴:实施研究过程,资料搜集整理,论文修改;谭金枚:进行统计学分析

参考文献

[1] Lee J, Yoon KH. Evolving characteristics of type 2 diabetes mellitus in East Asia[J]. *Endocrinol Metab (Seoul)*, 2025, 40(1):57-63. DOI: 10.3803/EnM.2024.2193.

[2] 林婷, 吴静, 冉兴无.《中国 2 型糖尿病运动治疗指南(2024 版)》解读[J]. *疑难病杂志*, 2025, 24(1):7-12. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6450.2025.01.002.

[3] Amangurbanova M, Huang DQ, Nouredin N, et al. A prospective study on the prevalence of masld in patients with type 2 diabetes and hyperferritinaemia[J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2025, 61(3):456-464. DOI: 10.1111/apt.18377.

[4] Chandrasekaran P, Weiskirchen R. The role of obesity in type 2 diabetes mellitus-an overview[J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(3):1882-1902. DOI: 10.3390/ijms25031882.

[5] Mokgalaboni K, Mashaba RG, Phoswa WN, et al. Curcumin attenuates hyperglycemia and inflammation in type 2 diabetes mellitus: Quantitative analysis of randomized controlled trial[J]. *Nutrients*, 2024, 16(23):4177-4196. DOI: 10.3390/nu16234177.

[6] Jiang L, Jia R, Zheng Z, et al. A clinical study on roxadustat for anemia in diabetic nephropathy: A 8-week study[J]. *Int Urol Nephrol*, 2024, 56(3):1093-1101. DOI: 10.1007/s11255-023-03757-0.

[7] 夏如意, 唐棣, 杨斌. 丹参联合罗沙司他对糖尿病大鼠全层皮肤缺损创面愈合的影响及其机制[J]. *中华烧伤与创面修复杂志*, 2024, 40(4):380-388. DOI: 10.3760/cma.j.cn501225-20231020-00124.

[8] Chen X, Wu J, Fu X, et al. Fructus mori polysaccharide alleviates diabetic symptoms by regulating intestinal microbiota and intestinal barrier against TLR4/NF- κ B pathway[J]. *Int J Biol Macromol*, 2023, 249:126038. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2023.126038.

[9] 宋燕娟, 马春莲, 丁海超, 等. 中等强度游泳运动调控 PPAR γ /NF- κ B/ADPN 通路对 2 型糖尿病大鼠肝脏糖脂代谢紊乱的影响[J]. *中国康复医学杂志*, 2024, 39(5):618-627,633. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1242.2024.05.002.

[10] 徐炜, 高云星, 陈晓, 等. 罗沙司他抑制 HIF-1 α /Notch-1 信号通路缓解单侧输尿管梗阻大鼠肾间质纤维化的研究[J]. *中国现代应用药学*, 2022, 39(6):717-724. DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2022.06.001.

[11] 崔水霞, 尚子慧, 侯亚迪, 等. 基于血清代谢组学探究山茱萸多糖对 2 型糖尿病大鼠的干预机制[J]. *中草药*, 2024, 55(9):2976-2986. DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.09.012.

[12] Wang X, He K, Li J, et al. Effect of Liraglutide combined with Jinlida granules on glycolipid metabolism and islet function of type 2 diabetes mellitus[J]. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2024, 70(2):156-160. DOI: 10.14715/emb/2024.70.2.22.

[13] Ni X, Tong C, Halengbieke A, et al. Association between nonalcoholic fatty liver disease and type 2 diabetes: A bidirectional two-sample Mendelian randomization study[J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2023, 206:110993. DOI: 10.1016/j.diabres.2023.110993.

[14] Zhong H, Wang L, Jia F, et al. Effects of Lactobacillus plantarum supplementation on glucose and lipid metabolism in type 2 diabetes mellitus and prediabetes: A systematic review and Meta-analysis of randomized controlled trials[J]. *Clin Nutr ESPEN*, 2024, 61(1):377-384. DOI: 10.1016/j.clnesp.2024.04.009.

[15] Hansen CD, Gram-Kampmann EM, Hansen JK, et al. Effect of calorie-unrestricted low-carbohydrate, high-fat diet versus high-carbohydrate, low-fat diet on type 2 diabetes and nonalcoholic fatty liver disease: A randomized controlled trial[J]. *Ann Intern Med*, 2023, 176(1):10-21. DOI: 10.7326/M22-1787.

[16] Zhang C, Xu Q, Xu C, et al. Sex differences in the association between AST/ALT and incidence of type 2 diabetes in Japanese patients with nonalcoholic fatty liver disease: A retrospective cohort study[J]. *Endocr Res*, 2024, 49(1):1-11. DOI: 10.1080/07435800.2023.2262034.

[17] Luo Y, Sun S, Zhang Y, et al. Effects of oltipraz on the glycolipid metabolism and the Nrf2/HO-1 pathway in type 2 diabetic mice[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2024, 18(1):5685-5700. DOI: 10.2147/DDDT.S485729.

(下转 1131 页)

症状前做出准确的诊断依然是一个具有挑战性的问题。

参考文献

[1] Pescini F, Nannucci S, Bertaccini B, et al. The cerebral autosomal-dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CADASIL) Scale: A screening tool to select patients for NOTCH3 gene analysis[J]. *Stroke*, 2012, 43(11):2871-2876. DOI: 10.1161/STROKEAHA.112.665927.

[2] 令晨,王朝霞,袁云. 常染色体显性遗传脑动脉病伴皮质下梗死及白质脑病的发病机制研究进展[J]. *中华神经科杂志*, 2021, 54(4):399-403. DOI: 10.3760/cma.j.cn113694-20210413-00260.

[3] 张翌, 吴志英. 伴皮质下梗死和白质脑病的常染色体显性遗传性脑动脉病的发病机制及治疗研究进展[J]. *遗传*, 2023, 45(7):568-579. DOI: 10.16288/j.yczs.23-023.

[4] Wang Z, Yuan Y, Zhang W, et al. NOTCH3 mutations and clinical features in 33 mainland Chinese families with CADASIL[J]. *Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2011, 82(5):534-539. DOI: 10.1136/jnnp.2010.209247.

[5] Wijeratne T, Sales C. Understanding why post-stroke depression may be the norm rather than the exception: The anatomical and neuroinflammatory correlates of post-stroke depression[J]. *Clin Med*, 2021, 10(8):1674. DOI:10.3390/jcm10081674.

[6] Matsuno H, Tsuchimine S, O'Hashi K, et al. Association between vascular endothelial growth factor-mediated blood-brain barrier dysfunction and stress-induced depression[J]. *Mol Psychiatry*, 2022, 27(9):3822-3832. DOI:10.1038/s41380-022-01618-3.

[7] Tikka S, Mykkanen K, Ruchoux MM, et al. Congruence between NOTCH3 mutations and GOM in 131 CADASIL patients[J]. *Brain*, 2009, 132(Pt 4):933-939. DOI:10.1093/brain/awn364.

[8] Di Donato I, Bianchi S, De Stefano N, et al. Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CADASIL) as a model of small vessel disease: update on clinical, diagnostic, and management aspects[J]. *BMC Med*, 2017, 15(1):41. DOI:10.1186/s12916-017-0778-8.

[9] Manini A, Pantoni L. CADASIL from bench to bedside: Disease models and novel therapeutic approaches[J]. *Mol Neurobiol*, 2021, 58(6):2558-2573. DOI:10.1007/s12035-021-02282-4.

[10] 张凡,肖健. 与细胞外基质具有超亲和力的生物工程化因子血管内皮生长因子 A 和血小板衍生生长因子 BB 及肝素结合表皮生长因子的三联疗法可促进 1 型糖尿病小鼠的创面愈合[J]. *中华烧伤与创面修复杂志*, 2022, 38(7):628. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2022.07.101.

[11] Liu XY, Gonzalez-Toledo ME, Fagan A, et al. Stem cell factor and granulocyte colony-stimulating factor exhibit therapeutic effects in a mouse model of CADASIL[J]. *Neurobiol Dis*, 2015, 73:189-203. DOI:10.1016/j.nbd.2014.09.006.

[12] Gorukmez O, Gorukmez O, Topak A, et al. NOTCH3 variants in patients with suspected CADASIL[J]. *Ann Indian Acad Neurol*, 2023, 26(4):484-490. DOI:10.4103/aian.aian_989_22.

[13] Machuca-Parra AI, Bigger-Allen AA, Sanchez AV, et al. Therapeutic antibody targeting of Notch3 signaling prevents mural cell loss in CADASIL[J]. *Exp Med*, 2017, 214(8):2271-2282. DOI:10.1084/jem.20161715.

[14] Ghezali L, Capone C, Baron-Menguy C, et al. Notch3ECD immunotherapy improves cerebrovascular responses in CADASIL mice[J]. *Ann Neurol*, 2018, 84(2):246-259. DOI:10.1002/ana.25284.

[15] Oliveira DV, Coupland KG, Shao W, et al. Active immunotherapy reduces NOTCH3 deposition in brain capillaries in a CADASIL mouse model[J]. *EMBO Mol Med*, 2023, 15(2):e16556. DOI: 10.15252/emmm.202216556.

[16] Ahn Y, An JH, Yang HJ, et al. Blood vessel organoids generated by base editing and harboring single nucleotide variation in Notch3 effectively recapitulate CADASIL-related pathogenesis[J]. *Mol Neurobiol*, 2024, 61(11):9171-9183. DOI:10.1007/s12035-024-04141-4. (收稿日期:2024-12-04)

(上接 1121 页)

[18] Yin Y, Nie W, Tang ZQ, et al. Flavonoid-rich extracts from Chujun (asteraceae chrysanthemum l.) alleviate the disturbance of glycolipid metabolism on type 2 diabetic mice via modulating the gut microbiota[J]. *Foods*, 2025, 14(5):765-787. DOI: 10.3390/foods14050765.

[19] Fang T, Ma C, Zhang Z, et al. Roxadustat, a HIF-PHD inhibitor with exploitable potential on diabetes-related complications[J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14:1088288. DOI: 10.3389/fphar.2023.1088288.

[20] Mäkinen S, Sree S, Ala-Nisula T, et al. Activation of the hypoxia-inducible factor pathway by roxadustat improves glucose metabolism in human primary myotubes from men[J]. *Diabetologia*, 2024, 67(9):1943-1954. DOI: 10.1007/s00125-024-06185-6.

[21] Fang T, Ma C, Yang B, et al. Roxadustat improves diabetic myocardial injury by upregulating HIF-1 α /UCP2 against oxidative stress[J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2025, 24(1):67-84. DOI: 10.1186/s12933-025-02601-2.

[22] 张琳萍,姚筱,朱燕亭,等.基于 TLR4/NF- κ B 信号通路沉默 miR-21 对糖尿病肾病大鼠的干预效果[J]. *河北医药*, 2023, 45(19):2891-2894, 2900. DOI:10.3969/j.issn.1002-7386.2023.19.002.

[23] 岳树香,甄云凤,霍丽梅.木丹颗粒联合西医常规治疗早期糖尿病肾病临床疗效及对患者 Toll 样受体 4/核因子 κ B/转化生长因子 β 1/Smad 信号通路的影响[J]. *河北中医*, 2020, 42(5):722-726. DOI:10.3969/j.issn.1002-2619.2020.05.018.

[24] 谷海林,张效丽,聂鑫,等.水蛭素对糖尿病肾病模型小鼠的作用机制研究[J]. *中国医药科学*, 2024, 14(15):16-19. DOI: 10.20116/j.issn2095-0616.2024.15.04.

[25] Guo M, Gao J, Jiang L, et al. Astragalus polysaccharide ameliorates renal inflammatory responses in a diabetic nephropathy by suppressing the TLR4/NF- κ B pathway[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2023, 17(1):2107-2118. DOI: 10.2147/DDDT.S411211.

[26] Zhang ZT, Deng SM, Chen C, et al. Pterostilbene could alleviate diabetic cognitive impairment by suppressing TLR4/NF- κ B pathway through microbiota-gut-brain axis[J]. *Phytother Res*, 2023, 37(8):3522-3542. DOI: 10.1002/ptr.7827.

[27] Liu K, Gu Y, Pan X, et al. Behenic acid alleviates inflammation and insulin resistance in gestational diabetes mellitus by regulating TLR4/NF- κ B signaling pathway[J]. *Iscience*, 2024, 27(10):111019. DOI: 10.1016/j.isci.2024.111019. (收稿日期:2025-04-07)