

脾瘅方对 db/db 小鼠骨骼肌胰岛素抵抗和自噬流阻滞的影响

韩茹杰¹, 张碧溦^{1,2}, 马雷雷¹, 刘一¹, 赵英捷¹, 王静雅¹, 李嘉钰¹, 李继安^{1,2,3*}

(1. 华北理工大学中医学院, 河北 唐山 063200; 2. 河北省中西医结合防治糖尿病及其并发症重点实验室, 河北 唐山 063210; 3. 河北省国际联合研究中心, 河北 唐山 063200)

摘要: 目的 探讨脾瘅方通过逆转自噬流阻滞改善 2 型糖尿病 (T2DM) 骨骼肌胰岛素抵抗 (IR) 的作用。方法 选取 8 只 db/m 小鼠作为对照组, 将 40 只 db/db 小鼠随机分为模型组、二甲双胍组 (0.26 g/kg) 及脾瘅方低、中、高剂量组 (5.98、11.96、23.92 g/kg), 连续灌胃给药 8 周, 其间定期检测空腹血糖 (FBG)、口服葡萄糖耐量 (OGTT) 和体质量。实验结束后, 取骨骼肌称定质量并计算脏器系数; 检测血清胰岛素 (INS)、C 肽 (C-P)、糖化血清蛋白 (GSP) 及血脂四项 (TG、T-CHO、LDL-C、HDL-C), 计算胰岛素抵抗指数 (HOMA-IR); 采用 HE 染色、Masson 染色和透射电镜观察骨骼肌病理变化; 免疫组化检测骨骼肌 p62 蛋白表达; 免疫荧光观察骨骼肌溶酶体关联膜蛋白 2 (LAMP2)、线粒体外膜 20 转位酶 (TOMM20) 及微管相关蛋白轻链 3 II (LC3 II) 表达与共定位; Western blot 法检测骨骼肌 PINK1、Parkin、Beclin-1、p62 和 LC3 II / I 蛋白表达。结果 与模型组比较, 脾瘅方中、高剂量组 INS、C-P、GSP、TG、T-CHO、LDL-C 水平降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), HDL-C 水平升高 ($P < 0.05$); 骨骼肌结构完整, 纤维化面积减少 ($P < 0.01$), 线粒体超微结构改善; PINK1、Parkin、Beclin-1、p62 和 LC3 II / I 蛋白表达降低 ($P < 0.05$); 线粒体-自噬体共定位增加, TOMM20 蛋白表达升高 ($P < 0.01$), LAMP2 蛋白表达降低 ($P < 0.01$), 自噬流阻滞得以逆转。结论 脾瘅方可改善 db/db 小鼠糖脂代谢紊乱, 延缓糖尿病进展, 其机制可能与激活 PINK1/Parkin 信号通路、增强线粒体自噬及溶酶体降解、恢复自噬流, 从而改善骨骼肌胰岛素抵抗和线粒体稳态有关。

关键词: 脾瘅方; 2 型糖尿病 (T2DM); 骨骼肌; 胰岛素抵抗; PINK1/Parkin 信号通路; 线粒体自噬; 线粒体稳态

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2026)01-0081-10

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2026.01.012

Effects of Pidan Formula on insulin resistance and impaired autophagic flux in skeletal muscle of db/db mice

HAN Ru-jie¹, ZHANG Bi-wei^{1,2}, MA Lei-lei¹, LIU Yi¹, ZHAO Ying-jie¹, WANG Jing-ya¹, LI Jia-yu¹, LI Ji-an^{1,2,3*}

(1. College of Traditional Chinese Medicine, North China University of Science and Technology, Tangshan 063200, China; 2. Hebei Provincial Key Laboratory for Prevention and Treatment of Diabetes and its Complications with Traditional Chinese and Western Medicine, Tangshan 063210, China; 3. Hebei Provincial International Joint Research Center, Tangshan 063200, China)

ABSTRACT: AIM To investigate the effect of Pidan Formula in improving skeletal muscle insulin resistance (IR) in type 2 diabetes mellitus (T2DM) through reversing autophagic flux blockade. **METHODS** Eight db/m mice were selected as the control group. Forty db/db mice were randomly divided into the model group, the metformin group (0.26 g/kg), and the low-, medium-, and high-dose Pidan Formula groups (5.98, 11.96, 23.92 g/kg). Intragastric administration was conducted continuously for 8 weeks. During this period, fasting blood glucose (FBG), oral glucose tolerance test (OGTT), and body weight were measured regularly. After the experiment, skeletal muscle was collected and weighed to calculate the organ coefficient. Serum insulin (INS), C-peptide (C-P), glycated serum protein (GSP), and four blood lipid items (TG, T-CHO, LDL-C, HDL-C) were

收稿日期: 2025-06-18

基金项目: 河北省自然科学基金资助项目 (H2023209038); 河北省重大科技支撑计划项目 (24297701Z); 河北省 2026 年度中医药类科学研究课题计划项目 (2026104); 河北省大学生创新创业训练项目 (S202510081059); 华北理工大学研究生创新项目 (2025S39)

作者简介: 韩茹杰 (2000—), 女, 硕士在读, 从事中医药防治糖尿病研究。E-mail: hanrujie2000@163.com

*通信作者: 李继安 (1962—), 男, 教授, 博士生导师, 从事代谢综合征防治研究。E-mail: lnyy@vip.sina.com

detected, and the homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) was calculated. Hematoxylin-eosin (HE) staining, Masson staining and transmission electron microscopy were used to observe pathological changes in skeletal muscle. Immunohistochemistry was used to detect the expression of p62 protein in skeletal muscle. Immunofluorescence was used to observe the expression and co-localization of lysosome-associated membrane protein 2 (LAMP2), translocase of outer mitochondrial membrane 20 (TOMM20) and microtubule-associated protein light chain 3 II (LC3 II) in skeletal muscle. Western blot was used to detect the protein expressions of PINK1, Parkin, Beclin-1, p62, and LC3 II/I in skeletal muscle. **RESULTS** Compared with the model group, the medium-dose and high-dose Pidan Formula groups showed decreased levels of INS, C-P, GSP, TG, T-CHO and LDL-C ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and increased level of HDL-C ($P < 0.05$); the skeletal muscle structure was intact, the fibrosis area was reduced ($P < 0.01$), and the mitochondrial ultrastructure was improved; the protein expressions of PINK1, Parkin, Beclin-1, p62, and LC3 II/I was decreased ($P < 0.05$); mitochondrial-autophagosome co-localization was increased, TOMM20 protein expression was increased ($P < 0.01$), while LAMP2 protein expression was decreased ($P < 0.01$), and the autophagic flux blockade was reversed.

CONCLUSION Pidan Formula can improve glucose and lipid metabolism disorders in db/db mice, and delay the progression of diabetes. Its mechanism may be related to activating the PINK1/Parkin signaling pathway, enhancing mitophagy and lysosomal degradation, restoring autophagic flux, thereby improving skeletal muscle insulin resistance and mitochondrial homeostasis.

KEY WORDS: Pidan Formula; type 2 diabetes mellitus (T2DM); skeletal muscle; insulin resistance; PINK1/Parkin signaling pathway; mitophagy; mitochondrial homeostasis

2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 患者数量庞大，并发症严重，已成为全球重大公共卫生挑战^[1]，胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR) 作为其核心病理机制，表现为靶器官对葡萄糖摄取和利用障碍，导致糖脂代谢紊乱^[2]。骨骼肌作为胰岛素主要靶器官，负责全身约 80% 的葡萄糖代谢^[3]，其 IR 被认为是 T2DM 高血糖的起始环节^[4]。研究发现，线粒体功能紊乱及质量控制失调是骨骼肌 IR 发生与恶性循环的关键^[5-6]，在 T2DM 中呈“双刃剑”效应^[7]，即生理状态下维持代谢稳态^[8]，病理状态下则因自噬流阻滞引发线粒体堆积、氧化应激和胰岛素信号抑制^[9]。另外，骨骼肌中微管相关蛋白轻链 3 (microtubule-associated protein light chain 3, LC3)、螯合体 1 (sequestosome 1, SQSTM1/p62) 蓄积伴随溶酶体稳态失调是 IR 的重要分子基础^[10]，但现有药物难以全面恢复自噬流平衡^[11]，亟需多靶点干预新策略。

T2DM 属中医“脾瘅”范畴^[12]，认为其病机关键为“脾虚湿滞、痰瘀化热”，脾失健运则精微不布^[13]，其“脾不散精、中满内热”状态与现代医学中的代谢炎症及自噬失调高度吻合^[14]。李继安教授据施今墨之法，以苍术-玄参药对创制脾瘅方，既承“对药”之旨，又增活血通络之法^[15]，但其是否调控线粒体自噬-溶酶体轴改善 IR 尚未明

确。本研究基于“脾主肌肉、痰瘀阻络”理论，结合自噬流阻滞在骨骼肌 IR 中的作用，探讨脾瘅方通过修复“线粒体-溶酶体轴”功能耦合改善胰岛素抵抗的机制，以期为糖尿病防治提供新策略。

1 材料

1.1 动物 8 只 8 周龄 SPF 级雄性 db/m 小鼠，体质量 18~21 g；40 只 8 周龄 SPF 级雄性 db/db 小鼠，体质量 36~45 g，均购自常州市卡文斯实验动物有限公司 [实验动物生产许可证号 SCXK (苏) 2021-0013]，饲养于华北理工大学实验动物中心屏障实验室 [实验动物使用许可证号 SYXK (冀) 2023-018]，室温 21~23 °C，相对湿度 40%~70%，12 h/12 h 光照/黑暗循环，自由摄食进水。动物实验经华北理工大学实验动物伦理委员会审核通过 (批准号 2024SY3090)。

1.2 药物与试剂 脾瘅方由苍术、玄参、白术、瓜蒌、枳实、荷叶、鬼箭羽、黄连、陈皮、厚朴、泽泻组成，药材均购自于北京同仁堂天然药物(唐山)有限公司 (出库单号 LSD153202309010040)；盐酸二甲双胍 (北京索莱宝科技有限公司，批号 D9351)。小鼠胰岛素 (insulin, INS)、C 肽 (C-peptide, C-P) ELISA 检测试剂盒 (武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司，批号 E-EL-M1382、E-EL-M0354)；糖化血清蛋白 (glycated serum protein,

GSP)、总胆固醇 (total cholesterol, T-CHO)、甘油三酯 (triglyceride, TG)、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) 检测试剂盒 (南京建成生物工程研究所, 批号 A037-2-1、A111-1-1、A110-1-1、A113-1-1、A112-1-1); Gluta 固定液 (电镜专用, 2.5%) (北京兰杰柯科技有限公司, 批号 BL911A); PTEN 诱导激酶 1 (PTEN induced kinase 1, PINK1)、帕金森蛋白 2 (Parkinson protein 2/E3 ubiquitin protein ligase, Parkin/PARK2)、贝氯素 1 (Beclin1, BECN1) 抗体 (武汉三鹰生物技术有限公司, 批号 23274-1-AP、14060-1-AP、11306-1-AP); 线粒体外膜转位酶 20 (translocase of outer mitochondrial membrane 20, TOMM20)、螯合体 1 (sequestosome-1, SQSTM1/p62) 抗体 (杭州华安生物技术有限公司, 批号 ET1609-25、HA721171); 微管相关蛋白 1 轻链 3 beta (microtubule-associated protein 1 light chain 3 beta, LC3B) 抗体 (美国 GeneTex 公司, 批号 GTX127375); HRP-羊抗兔 IgG+HRP-羊抗小鼠 IgG 抗体 (武汉博士德生物工程有限公司, 批号 BA1056); 免疫荧光双标试剂盒 (湖南艾方生物科技有限公司, 批号 AFIHC033)。

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); 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 Leica 公司); TissueIlyer-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); SpectraMaxM3 多功能微孔板读板机 (美国 Molecular Devices 公司); JY600E 型通用电泳仪、垂直电泳槽 (北京君意东方电泳设备有限公司); ChemiDoc XRS +型凝胶成像系统 (美国 Bio-Rad 公司); cellSens Entry 成像软件、BX53 型荧光显微镜、SXZ71 型荧光体式显微成像系统 (日本奥林巴斯公司); H-7650 型透射电子显微镜 (日本日立公司)。

2 方法

2.1 脾瘅方制备 苍术、玄参、白术、瓜蒌、枳实、荷叶、鬼箭羽、黄连、陈皮、厚朴、泽泻按 9:12:9:12:6:9:9:5:9:6:6 的比例称取, 粉碎成粗粉, 75% 乙醇浸泡 12 h 后 80 °C 回流提取 3 次, 每次 2 h, 合并醇提液, 残渣加 10 倍量水浸泡 2 h 后煎煮 2 次, 每次 2 h, 过滤, 合并水提

液和醇提液, 浓缩至生药量 10 g/mL, 分装后保存于 -20 °C 冰箱中, 临用前用纯净水制成所需剂量。

2.2 分组及给药 小鼠适应性喂养 1 周后, 检测 40 只 db/db 小鼠 2 次不连续的空腹血糖 (fasting blood glucose, FBG) 水平, 若 FBG 水平 ≥ 11.1 mmol/L 视为模型小鼠^[16]。将模型小鼠随机分为模型组、二甲双胍组 (0.26 g/kg) 和脾瘅方低、中、高剂量组 (5.98、11.96、23.92 g/kg), 对照组和模型组灌胃给予 5 mL/kg 生理盐水, 二甲双胍组和脾瘅方各剂量组灌胃给予相应剂量药物, 每天 1 次, 持续 8 周后取材。

2.3 体质量、FBG、口服糖耐量(OGTT) 测定 从给药当周开始, 每周测定 1 次小鼠体质量和 FBG 水平, 每 2 周进行 1 次口服葡萄糖耐量 (oral glucose tolerance test, OGTT) 实验。小鼠灌胃给予 2 g/kg 葡萄糖, 检测空腹、摄入葡萄糖后 30、60、120 min 血糖水平, 计算曲线下面积 (AUC), 公式为 $OGTT-AUC = [(空腹血糖水平 + 葡萄糖负荷后 30 \text{ min 血糖水平}) \times 0.5/2] + [(葡萄糖负荷后 30 \text{ min 血糖水平} + 葡萄糖负荷后 60 \text{ min 血糖水平}) \times 0.5/2] + [(葡萄糖负荷后 60 \text{ min 血糖水平} + 葡萄糖负荷后 120 \text{ min 血糖水平}) \times 1.0/2]$ 。

2.4 取材 给药 8 周后, 各组小鼠禁食 12 h, 腹腔注射戊巴比妥钠麻醉, 摘除眼球取血, 血液静置 4 h 后离心, 取上层血清, 置于 -80 °C 冰箱中保存。取新鲜腓肠肌 (代表骨骼肌), 称定并记录质量, 计算骨骼肌系数, 公式为骨骼肌系数 = (小鼠骨骼肌湿重 / 小鼠体质量) $\times 100\%$ 。每组随机选 3 只小鼠骨骼肌, 取 1 mm \times 2 mm 大小组织, 浸入 2.5% 戊二醛中进行固定; 其余分成 2 份, 一份放入 4% 多聚甲醛中固定, 另一份放入冻存管, 保存于 -80 °C 冰箱中。

2.5 血清生化指标检测及胰岛素抵抗指数 (HOMA-IR) 计算 采用微板法检测小鼠血清 GSP、TG、T-CHO、LDL-C、HDL-C 水平, ELISA 法检测 INS、C-P 水平。再计算胰岛素抵抗指数 (homeostatic model assessment of insulin resistance, HOMA-IR), 公式为 $HOMA-IR = (INS \times FBG) / 22.5$ 。

2.6 透射电子显微镜观察骨骼肌组织超微结构 取出固定于 2.5% 戊二醛中的骨骼肌组织, 漂洗后浸入 1% 四氧化锇进行二次固定, 乙醇梯度脱水, 丙酮渗透, 包埋, 置于 37 °C 烘箱中过夜后制成超薄切片, 铂、铅各染色 15 min, 过夜干燥, 在透射电子显微镜下观察。

2.7 骨骼肌组织病理学检测 取出固定于 4% 多聚甲醛中的骨骼肌组织，流水冲洗过夜，70%、80%、90% 无水乙醇梯度脱水，石蜡包埋，切片，烤片，二甲苯脱蜡，无水乙醇及 90%、80%、70% 乙醇梯度复水，分别进行 HE、Masson 染色，70%、80%、90% 乙醇及无水乙醇梯度脱水，中性树胶封片，在光学显微镜下观察。其中，Masson 染色后采用 ImageJ 软件分析切片阳性面积，并将其导入 SPSS 17.0 软件进行分析。

2.8 骨骼肌组织 p62 蛋白免疫组化染色 取骨骼肌组织切片，常规脱蜡水化后浸入抗原修复液，微波炉高火 6 min、低火 8 min 进行抗原热修复，滴加 3% 过氧化氢阻断内源性过氧化物酶，滴加无蛋白快速封闭液，室温封闭 30 min 后去除封闭液，滴加一抗，4 °C 孵育过夜，次日加二抗，室温孵育 1 h，DAB 显色，苏木素复染，中性树胶封片后在显微镜下观察，采用 ImageJ 软件分析染色强度。

2.9 骨骼肌组织 TOMM20、LC3 II 免疫荧光共定位染色 按照免疫荧光三色试剂盒说明书，对石蜡切片进行烤片、二甲苯脱蜡、梯度乙醇复水，微波炉高火 6 min、低火 8 min 进行抗原修复，3% 过氧化氢阻断过氧化酶 30 min，滴加封闭液封闭 30 min，滴加 LC3 II 抗体，4 °C 孵育过夜，滴加二抗并结合 TSA 染料，再次进行抗原修复，封闭后滴加 TOMM20 抗体，4 °C 孵育过夜，采用含 DAPI 的抗荧光淬灭封片剂进行封片，在荧光显微镜下观察，采用 ImageJ 软件分析荧光强度。

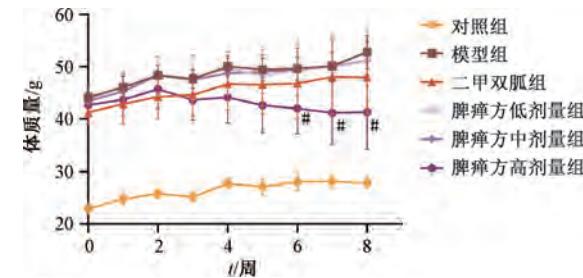
2.10 Western blot 法检测骨骼肌组织 PINK1、Parkin、Beclin-1、p62、LC3 II 蛋白表达 取冻存骨骼肌组织约 50 mg，加入含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解缓冲液，冰上研磨、裂解后 12 000 r/min 离心 15 min，取上清液，即为总蛋白，BCA 法检测浓度后上样，电泳后转膜、封闭，加 PINK1、Parkin、Beclin-1、p62、LC3 II、β-actin 一抗，4 °C 孵育过夜，次日孵育相应二抗，ECL 超敏发光液进行曝光，采用 Image Lab 软件进行灰度值分析。以 β-actin 为内参，计算目的蛋白表达。

2.11 统计学分析 通过 SPSS 17.0 软件进行处理，计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示，符合正态分布者组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较时方差齐的采用事后分析 LSD 检验，方差不齐的采用 Tamhane's 检验；同组多时间点比较采用重复测量方差分析，若不满球形检验则采用 Greenhouse-Geisser 法进行校正，同组不同时间点比较采用

Bonferroni 法。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 脾瘅方对 db/db 小鼠体质量、骨骼肌系数的影响 对照组小鼠活动自如，精神状态良好，反应迅速灵敏，毛发柔顺有光泽；模型组小鼠活动迟缓，精神萎靡，毛发粗糙并有脱落情况；与模型组比较，二甲双胍组和脾瘅方各剂量组小鼠日常状态、毛发及活动情况均有所改善。如图 1 所示，与模型组比较，从给药第 6 周开始，脾瘅方高剂量组小鼠体质量降低 ($P < 0.05$)。

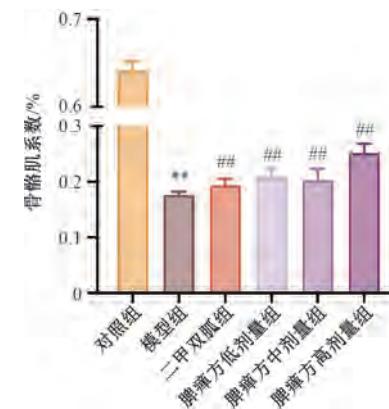


注：与模型组比较，* $P < 0.05$ 。

图 1 脾瘅方对 db/db 小鼠体质量的影响 ($\bar{x} \pm s$, n=8)

Fig. 1 Effect of Pidan Formula on body weight of db/db mice ($\bar{x} \pm s$, n=8)

如图 2 所示，给药 8 周后，与对照组比较，模型组小鼠骨骼肌系数降低 ($P < 0.01$)；与模型组比较，二甲双胍组和脾瘅方各剂量组小鼠骨骼肌系数升高 ($P < 0.01$)。



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

图 2 各组 db/db 小鼠骨骼肌系数 ($\bar{x} \pm s$, n=8)

Fig. 2 Skeletal muscle coefficient for db/db mice in each group ($\bar{x} \pm s$, n=8)

3.2 脾瘅方对 db/db 小鼠 FBG 水平和 OGTT-AUC 的影响 如表 1 所示，对照组小鼠血糖稳定；与对照组比较，模型组小鼠 FBG 水平随时间延长而升高 ($P < 0.01$)，OGTT-AUC 增加 ($P < 0.01$)；与模型组比较，给药 4 周时，二甲双胍组小鼠 FBG 水

平降低 ($P<0.01$)；给药8周时，二甲双胍组和脾瘅方中、高剂量组小鼠FBG水平降低 ($P<0.01$)，

OGTT-AUC减小 ($P<0.05$)。

表1 各组db/db小鼠FBG水平和OGTT-AUC比较 (mmol/L, $\bar{x}\pm s$, n=8)

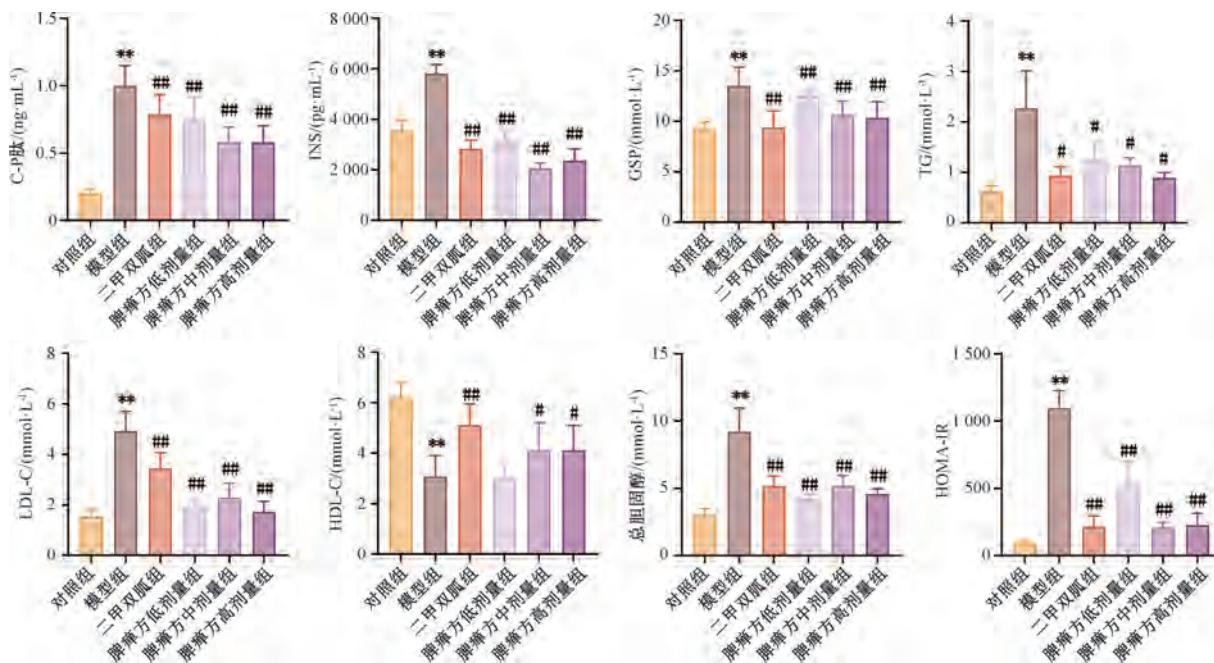
Tab. 1 Comparison of FBG level and OGTT-AUC in db/db mice in each group (mmol/L, $\bar{x}\pm s$, n=8)

组别	给药当周时	给药4周时	给药8周时	OGTT-AUC
对照组	5.36±0.35	5.16±0.45	5.40±0.93	19.93±2.21
模型组	16.38±1.95 **	25.89±5.83 **	29.53±3.43 **	64.54±1.95 **
二甲双胍组	16.69±2.06	11.41±1.55 ##	11.89±3.82 ##	50.50±7.39 #
脾瘅方低剂量组	17.55±3.21	20.99±5.75	25.98±5.10	61.00±4.26
脾瘅方中剂量组	17.01±1.69	19.13±1.29	14.29±1.49 ##	54.08±6.56 #
脾瘅方高剂量组	17.80±1.18	20.09±2.89	12.33±0.90 ##	56.73±4.47 #

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

3.3 脾瘅方对db/db小鼠血清糖脂代谢的影响 如图3所示，与对照组比较，模型组小鼠血清INS、C-P、GSP、TG、LDL-C、T-CHO水平和HOMA-IR均升高 ($P<0.01$)，HDL-C水平降低 ($P<0.01$)；与模型组比较，二甲双胍组和脾瘅方各剂量组小鼠

血清INS、C-P、GSP、TG、LDL-C、T-CHO水平和HOMA-IR均降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)，二甲双胍组和脾瘅方中、高剂量组HDL-C水平升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)。



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

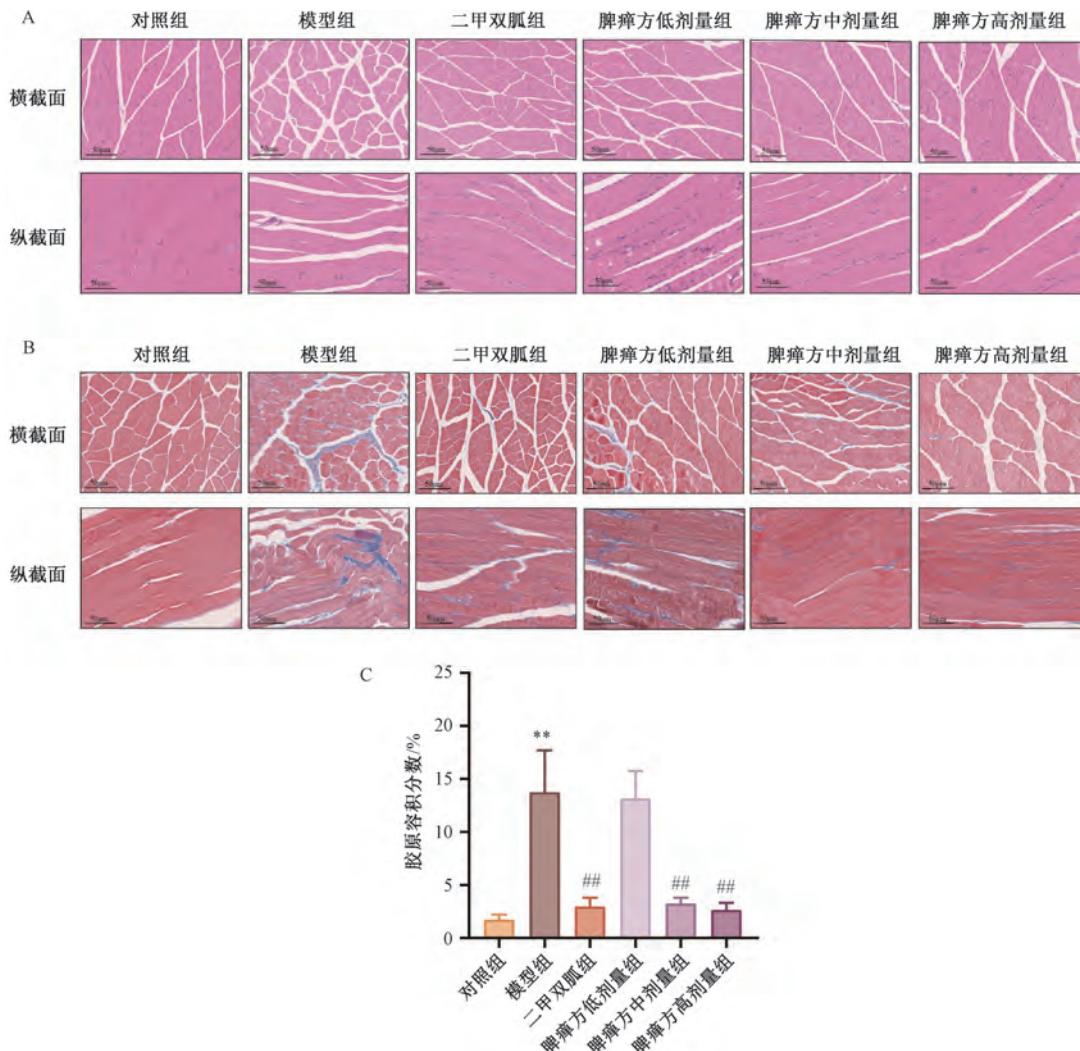
图3 各组db/db小鼠血清INS、C-P、GSP、TG、LDL-C、T-CHO、HDL-C水平和HOMA-IR ($\bar{x}\pm s$, n=8)

Fig. 3 Serum INS, C-P, GSP, TG, LDL-C, T-CHO, HDL-C levels and HOMA-IR in db/db mice in each group ($\bar{x}\pm s$, n=8)

3.4 脾瘅方对db/db小鼠骨骼肌组织病理学变化的影响 HE染色结果见图4A，可知对照组小鼠肌肉细胞形态规则，排列致密；模型组小鼠肌束松散、杂乱，纵截面可观察到明显的细胞核内移和肌纤维萎缩、变形；二甲双胍组小鼠肌细胞形态结构有一定的改善，肌束排列较整齐，肌纤维断裂较少；脾瘅方各剂量组小鼠肌细胞形态明显改善，仅可见

轻度的肌纤维变形、断裂，同时核内移大幅改善。

Masson染色结果见图4B~4C，可知与对照组比较，模型组小鼠骨骼肌胶原沉积增加 ($P<0.01$)，表明糖尿病诱导了早期纤维化，以血管周围、肌束膜、肌内膜局灶性沉积为主要特征；与模型组比较，二甲双胍组和脾瘅方中、高剂量组小鼠骨骼肌胶原沉积减少 ($P<0.01$)。



注：A 为 HE 染色，B 为 Masson 染色，C 为骨骼肌组织胶原容积分数。与对照组比较，** $P < 0.01$ ；与模型组比较，## $P < 0.01$ 。

图 4 各组 db/db 小鼠骨骼肌组织病理学变化 ($\bar{x} \pm s$, n=8)

Fig. 4 Histopathological changes in skeletal muscle of db/db mice in each group ($\bar{x} \pm s$, n=8)

3.5 脾瘅方对 db/db 小鼠骨骼肌细胞超微结构的影响 如图 5 所示，对照组小鼠骨骼肌 Z 线整齐，线粒体结构较完整，线粒体嵴排列分布正常、形态规则，未观察到明显的自噬现象；模型组小鼠骨骼肌出现严重的线粒体损伤，包括广泛空泡化（每个视野 60% 以上线粒体受累）、线粒体嵴结构断

裂、大量线粒体自噬（红色箭头）；脾瘅方低剂量组小鼠骨骼肌仍可观察到较多线粒体自噬和线粒体结构紊乱；脾瘅方中、高剂量组及二甲双胍组小鼠骨骼肌空泡化减少，鲜见线粒体自噬，线粒体结构发生不同程度的改善。

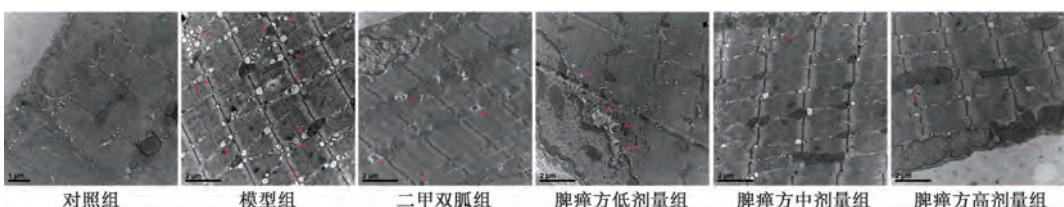


图 5 各组 db/db 小鼠骨骼肌超微结构变化 ($\times 13\,000$)

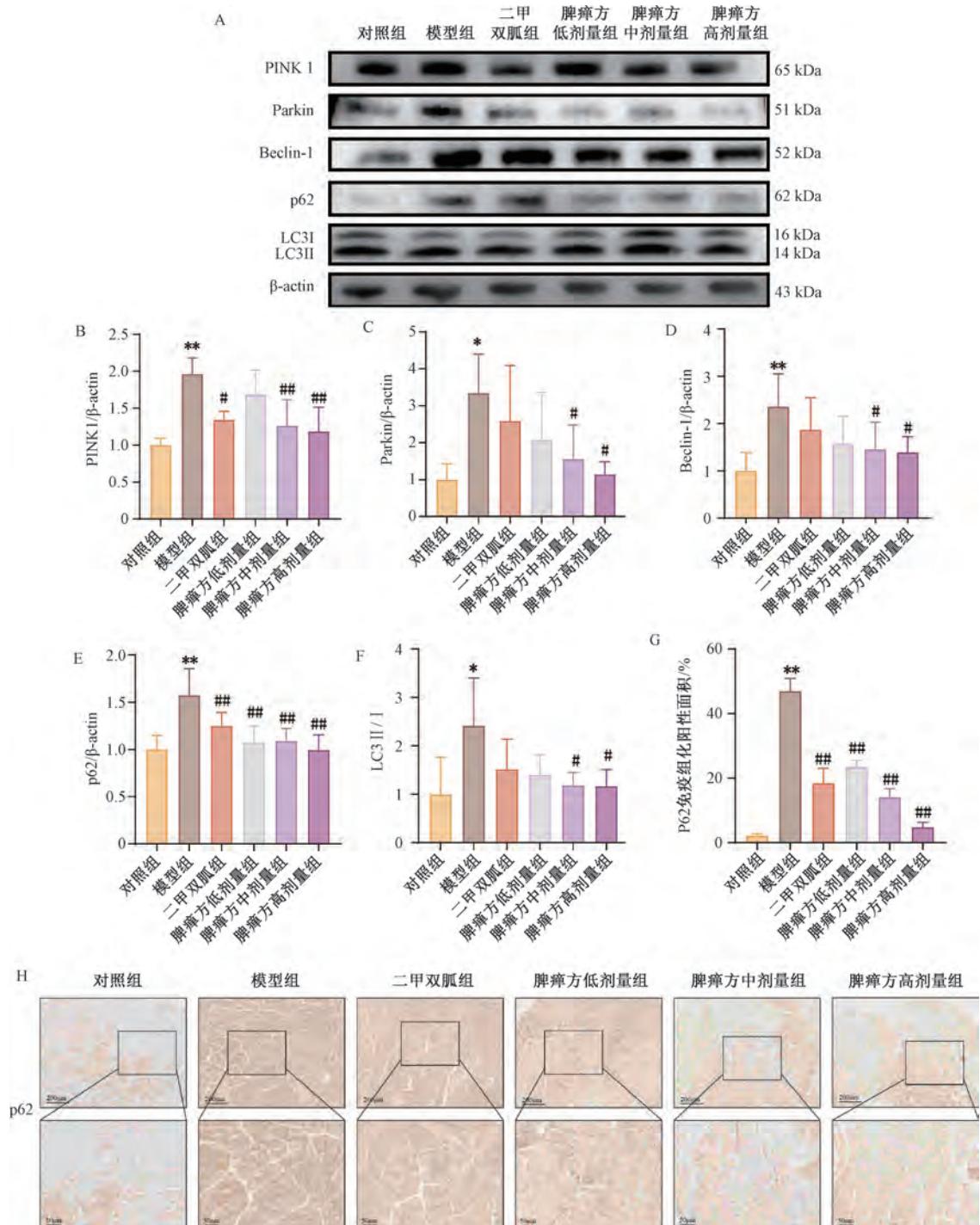
Fig. 5 Ultrastructural changes in skeletal muscle of db/db mice in each group ($\times 13\,000$)

3.6 脾瘅方对 db/db 小鼠骨骼肌 PINK1/Parkin 介导的线粒体自噬相关蛋白表达的影响 如图 6A ~

6F 所示，与对照组比较，模型组小鼠骨骼肌 PINK1、Parkin、Beclin-1、p62 及 LC3 II/I 蛋白表

达均升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)；与模型组比较，脾瘅方中、高剂量组小鼠骨骼肌 PINK1、Parkin、Beclin-1、p62 及 LC3 II / I 蛋白表达均降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)，脾瘅方低剂量组 p62 蛋白表达降低 ($P<0.01$)，二甲双胍组 PINK1、p62 蛋白表达均降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)。

另外，LC3 II / I、p62 蛋白表达呈现同步升高趋势，这与经典线粒体自噬调控模式存在差异。为验证这一现象，再通过 p62 免疫组化染色（图6G~6H）进行确认，结果与 Western blot 一致，提示自噬体-溶酶体融合效率可能受损。

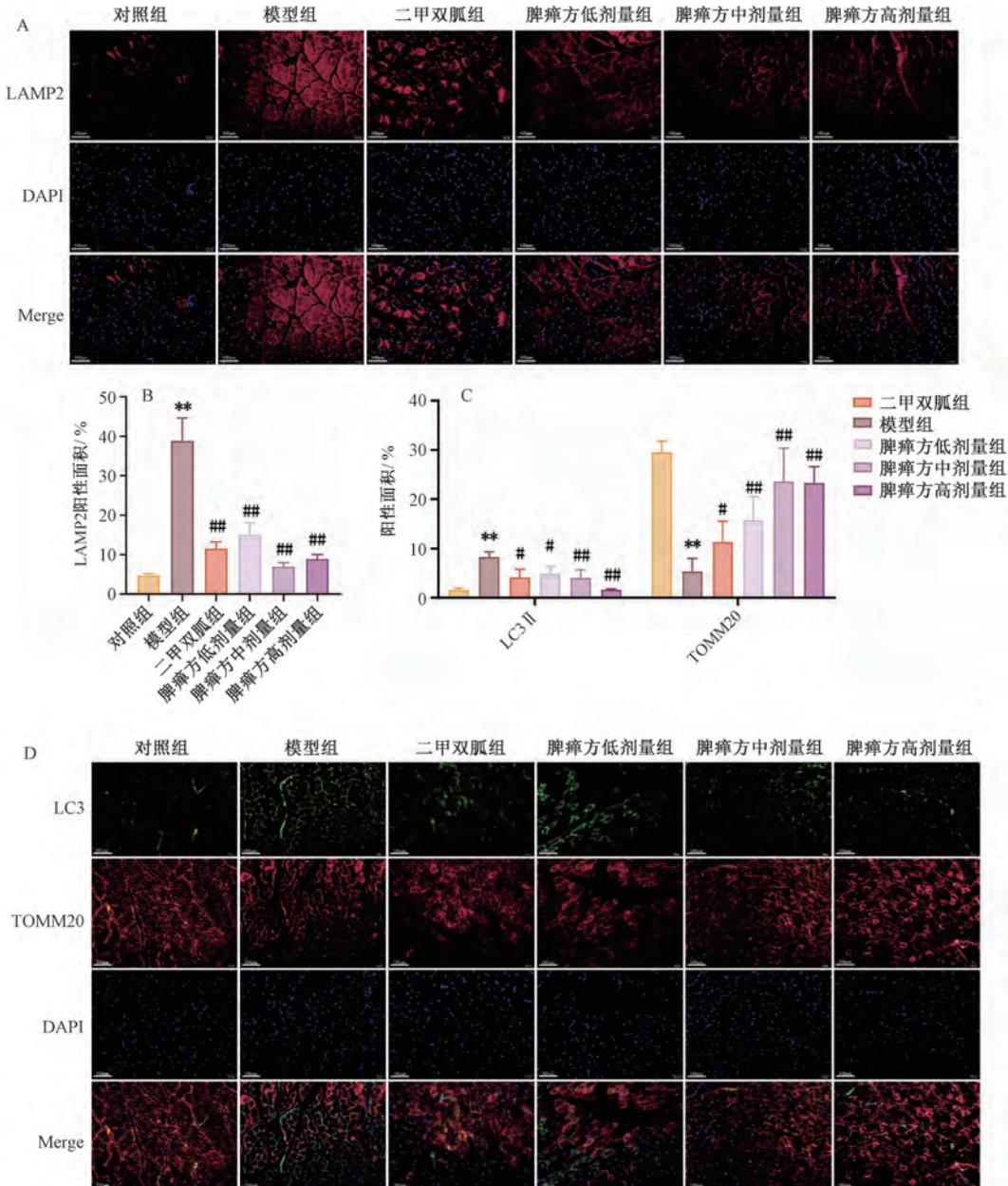


注：与对照组比较，* $P<0.05$, ** $P<0.01$ ；与模型组比较，# $P<0.05$, ## $P<0.01$ 。

图 6 各组 db/db 小鼠骨骼肌组织 PINK1、Parkin、Beclin-1、p62 及 LC3 II / I 蛋白表达 ($\bar{x}\pm s$, $n=4$)

Fig. 6 PINK1, Parkin, Beclin-1, p62 and LC3 II / I protein expressions in skeletal muscle of db/db mice in each group ($\bar{x}\pm s$, $n=4$)

3.7 脾瘅方对db/db小鼠线粒体自噬的影响 如图7A~7B所示,与对照组比较,模型组小鼠骨骼肌LAMP2蛋白表达升高($P<0.01$);与模型组比较,二甲双胍组和脾瘅方各剂量组小鼠骨骼肌LAMP2蛋白表达降低($P<0.01$)。如图7C~7D所示,与对照组比较,模型组小鼠骨骼肌TOMM20表达降低($P<0.01$);与模型组比较,二甲双胍组和脾瘅方各剂量组小鼠骨骼肌TOMM20表达升高($P<0.05$, $P<0.01$)。各组LC3表达趋势与Western blot一致。免疫荧光共定位显示,与对照组比较,模型组小鼠骨骼肌TOMM20与LC3的结合共定位较低,而脾瘅方干预后可逆转此趋势。



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

图7 各组db/db小鼠骨骼肌LAMP2、TOMM20及LC3免疫荧光染色($\bar{x}\pm s$, n=6)

Fig. 7 Immunofluorescence staining of LAMP2, TOMM20 and LC3 in skeletal muscle of db/db mice in each group ($\bar{x}\pm s$, n=6)

4 讨论

自噬流是维持细胞内稳态的核心调控机制,涵盖从自噬体形成、底物识别至溶酶体降解的全过程

表达降低($P<0.01$);与模型组比较,二甲双胍组和脾瘅方各剂量组小鼠骨骼肌TOMM20表达升高($P<0.05$, $P<0.01$);各组LC3表达趋势与Western blot一致。免疫荧光共定位显示,与对照组比较,模型组小鼠骨骼肌TOMM20与LC3的结合共定位较低,而脾瘅方干预后可逆转此趋势。

动态平衡,在生理状态下,线粒体自噬通过清除功能失调的线粒体维持氧化磷酸化效率,参与代谢调控^[17]。骨骼肌作为葡萄糖代谢的关键组织,其脂

代谢异常可导致线粒体功能障碍，与 IR 密切相关^[18]。糖尿病状态下，细胞通过上调自噬体生成以应对线粒体损伤^[19]，但因溶酶体组织蛋白酶活性下降及酸化障碍导致降解能力不足，引发转录因子 EB (transcription factor EB, TFEB) 介导的 LAMP2 代偿高表达^[20]，同时自噬体-溶酶体融合障碍导致损伤线粒体积聚，加剧炎症及 IR。修复自噬流可改善 IR，如通过 miR-27-3p-Miro1 轴缓解脂毒性 IR^[21]，增强自噬通量减轻棕榈酸诱导的胰岛素信号障碍。db/db 小鼠因 Lepr 基因突变导致脂蛋白脂肪酶活性降低^[22]，高脂环境改变囊泡融合，损害自噬体-溶酶体结合，增加自噬空泡，破坏自噬多阶段稳态，形成“自噬代偿-失代偿”的病理过程^[23]。

PINK1/Parkin 通路作为泛素依赖的线粒体自噬经典通路，在膜电位降低时 PINK1 在线粒体积累并招募 Parkin，激活自噬受体与 LC3 结合引发线粒体自噬^[24]。LC3 II 与自噬体数量正相关，p62 积累反映自噬流抑制，两者同步升高为自噬流阻滞标志，与 IR 呈正相关^[25]。二甲双胍激活 AMPK 促自噬体生成^[26]，雷帕霉素抑制 mTOR 增强溶酶体功能^[27]，却难以协同调控“自噬体-溶酶体”动态平衡。脾瘅方基于中医“脾主肌肉、痰瘀阻络”理论，以健脾化痰、活血通络为治则，可多靶点干预，方中苍术、玄参健脾清热，白术、枳实、陈皮、厚朴理气化湿，瓜蒌、黄连清化痰热，泽泻、荷叶利湿，鬼箭羽活血通络。现代研究显示，苍术多糖、玄参多糖通过调节肠道菌群改善胰岛素敏感性^[28]；白术多糖激活 PINK1/Parkin 通路并抑制过度自噬，保护线粒体稳态^[29]；白术-枳实降低 PINK1、Parkin 过度表达，提升 p62 mRNA 表达^[30]；小檗碱增强溶酶体活性突破降解瓶颈^[31]，共同构成“菌群-线粒体-溶酶体”三级干预网络。

本研究结果显示，db/db 小鼠出现糖脂代谢紊乱、IR 加重及骨骼肌萎缩纤维化，伴 PINK1/Parkin 过度激活、LC3 II 与 LAMP2 升高但 LC3-TOMM20 共定位降低，自噬体堆积 (p62 表达升高) 及线粒体空泡受损；脾瘅方干预后，代谢指标改善，肌纤维结构修复，线粒体嵴结构恢复，自噬体数量正常化，并抑制 PINK1/Parkin 通路相关蛋白过度激活，提升 LC3-TOMM20 共定位，降低 LAMP2、p62 表达，重建自噬流。

综上所述，本研究首次从线粒体-溶酶体轴”功能耦合视角揭示脾瘅方改善糖尿病骨骼肌胰岛素

抵抗的机制，一方面通过抑制 PINK1/Parkin 通路过度激活，精准提升线粒体靶向效率（增加 LC3-TOMM20 共定位）；另一方面增强溶酶体降解效能（降低 LAMP2 无效代偿），从而突破自噬流阻滞瓶颈，重建代谢稳态，这一发现不仅为中医“脾主肌肉，痰瘀阻络”理论提供了现代生物学诠释，即“脾不散精”与“线粒体能量代谢失衡”，以及“络阻”与“自噬流通量障碍”的科学关联，更凸显了中药复方多靶点协同调控的独特优势。相较于二甲双胍单一激活自噬起始 (AMPK 依赖)，脾瘅方同步协调“靶向识别-底物降解”双环节，为糖尿病骨骼肌病变提供了更全面的干预策略。未来可进一步解析脾瘅方中调控溶酶体活性的关键药效成分，并探索其与线粒体自噬激动剂的联合应用潜力，为开发靶向“自噬流再平衡”的中医药精准治疗糖尿病方案奠定基础。

利益冲突：所有作者均声明不存在利益冲突。

参考文献：

- [1] 赵常红, 王菲菲, 连红强, 等. 运动改善糖尿病骨骼肌萎缩的研究进展与展望[J]. 天津体育学院学报, 2025, 40(3): 322-330.
- [2] Lee S H, Park S Y, Choi C S. Insulin resistance: from mechanisms to therapeutic strategies[J]. *Diabetes Metab J*, 2022, 46(1): 15-37.
- [3] Xu Y, Hu T, Shen Y, et al. Association of skeletal muscle mass and its change with diabetes occurrence: a population-based cohort study[J]. *Iabetol Metab Syndr*, 2023, 15(1): 53.
- [4] Guo Q, Xu Z, Zhou D, et al. Mitochondrial proteostasis stress in muscle drives a long-range protective response to alleviate dietary obesity independently of ATF4[J]. *Sci Adv*, 2022, 8(30): eab0340.
- [5] Fabbri E, Chia C W, Spencer R G, et al. Insulin resistance is associated with reduced mitochondrial oxidative capacity measured by 31P-magnetic resonance spectroscopy in participants without diabetes from the Baltimore Longitudinal Study of Aging[J]. *Diabetes*, 2017, 66(1): 170-176.
- [6] Civelek E, Karaman E F, Özden S, et al. Effect of pioglitazone on endoplasmic reticulum stress and autophagy response in the perivascular adipose tissue of type 2 diabetic rats[J]. *PPAR Res*, 2025, 2025: 9645836.
- [7] Wu T, Shao Y, Li X, et al. NR3C1/glucocorticoid receptor activation promotes pancreatic β-cell autophagy overload in response to glucolipotoxicity[J]. *Autophagy*, 2023, 19(9): 2538-2557.
- [8] 陈玉华, 郑标, 成迪, 等. 线粒体自噬影响胰岛素抵抗的作用及机制[J]. 生物化学与生物物理进展, 2024, 51(4): 772-784.

- [9] 曹倩颖, 郑 豪, 王娅玲, 等. 玉米赤霉烯酮致 PC12 细胞自噬流阻滞的相关作用机制[J]. 畜牧兽医学报, 2022, 53(4): 1270-1279.
- [10] Mito T, Vincent A E, Faigt J, et al. Mosaic dysfunction of mitophagy in mitochondrial muscle disease[J]. *Cell Metab*, 2022, 34(2): 197-208. e5.
- [11] Klionsky D J, Abdel-Aziz A K, Abdelfatah S, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition) [J]. *Autophagy*, 2021, 17(1): 1-382.
- [12] 陈燕清, 肖凯文, 曹卓青, 等. 基于《圣济总录》脾瘅干预的糖尿病前期辨证保健策略探析[J]. 中华中医药杂志, 2022, 37(9): 5032-5035.
- [13] 庞国明, 曹秋平, 李鹏辉, 等. 纯中药“辨病-辨证-辨体诊疗模式”治疗 2 型糖尿病患者 546 例临床特征分析——一项真实世界回顾性研究[J]. 中医杂志, 2022, 63(18): 1766-1772.
- [14] 何 永, 马 君, 何敬华. 黄帝内经素问[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2022.
- [15] 周婧雅, 赵进喜, 张耀夫, 等. 运用施今墨降糖对药治疗糖尿病肾脏病探析[J]. 中医杂志, 2019, 60(16): 1425-1427.
- [16] 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.
- [17] Zhang M, Sui W, Xing Y, et al. Angiotensin IV attenuates diabetic cardiomyopathy via suppressing FoxO1-induced excessive autophagy, apoptosis and fibrosis[J]. *Theranostics*, 2021, 11(18): 8624-8639.
- [18] Ma Q, Jiang L, You Y, et al. Ketogenic diet ameliorates high-fat diet-induced insulin resistance in mouse skeletal muscle by alleviating endoplasmic reticulum stress[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2024, 702: 149559.
- [19] Dagar N, Habshi T, Shelke V, et al. Renoprotective effect of esculetin against ischemic acute kidney injury-diabetic comorbidity[J]. *Free Radic Res*, 2024, 58(2): 69-87.
- [20] Bajaj L, Lotfi P, Pal R, et al. Lysosome biogenesis in health and disease[J]. *J Neurochem*, 2019, 148(5): 573-589.
- [21] Li J M, Li X, Chan L W C, et al. Lipotoxicity-polarised macrophage-derived exosomes regulate mitochondrial fitness through Miro1-mediated mitophagy inhibition and contribute to type 2 diabetes development in mice[J]. *Diabetologia*, 2023, 66(12): 2368-2386.
- [22] 黄 慧, 许嘉慧, 陆 瀚, 等. 健脾清化方通过抑制脂肪组织炎症改善肥胖的多模型验证研究[J]. 天津中医药, 2025, 42(5): 647-655.
- [23] 阮诺冰, 方朝晖, 李金菊, 等. 丹蛭降糖胶囊改善 db/db 小鼠肾组织损伤的作用机制[J]. 中国临床药理学杂志, 2025, 41(4): 517-521.
- [24] Zhu Q, Taylor J M. ARHGAP26/GRAF1 orchestrates actin remodeling and membrane dynamics to drive mitochondrial clearance and promote fuel flexibility[J]. *Autophagy*, 2024, 20(8): 1906-1908.
- [25] Jiménez-Loygorri J I, Benítez-Fernández R, Viedma-Poyatos Á, et al. Mitophagy in the retina: viewing mitochondrial homeostasis through a new lens[J]. *Prog Retin Eye Res*, 2023, 96: 101205.
- [26] 王 乾, 赵黎明. 姜黄素调节 LKB1-AMPK-LC3 信号通路对膀胱癌细胞增殖、迁移和顺铂耐药性的影响[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2025, 41(1): 9-16.
- [27] Liu F, Tian T, Zhang Z, et al. Long non-coding RNA SNHG6 couples cholesterol sensing with mTORC1 activation in hepatocellular carcinoma[J]. *Nat Metab*, 2022, 4(8): 1022-1040.
- [28] 贾丽娜, 马 倩, 王新月, 等. 基于体外发酵模型分析植物多糖对 T2DM 患者肠道菌群及代谢的影响[J]. 食品科学, 2023, 44(2): 248-261.
- [29] Qi C, Lv C, Jiang M, et al. The surface morphology of *Atractylodes macrocephala* polysaccharide and its inhibitory effect on PCV2 replication[J]. *J Sci Food Agric*, 2024, 104(6): 3624-3636.
- [30] 王晓鹏, 杨会举, 孙明伟, 等. 枳实-白术调节 PINK1/Parkin 信号通路介导的线粒体自噬改善慢传输型便秘大鼠结肠动力障碍[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(13): 45-53.
- [31] 张 诚, 万鼎铭, 曹伟杰, 等. 小檗碱对人骨髓增生异常综合征细胞 MUTZ-1 自噬活性的影响及机制[J]. 现代免疫学, 2019, 39(1): 18-22.