中国比较医学杂志
Chinese Journal of Comparative Medicine
ISSN 1671-7856,CN 11-4822/R

《中国比较医学杂志》网络首发论文

题目：黄芪甲苷干预铁死亡改善高脂诱导小鼠睾丸间质细胞损伤的效应机制研究
作者：彭剑飞，吴丹丹
收稿日期：2026-06-24
网络首发日期：2026-10-21
引用格式：彭剑飞，吴丹丹．黄芪甲苷干预铁死亡改善高脂诱导小鼠睾丸间质细胞损伤的效应机制研究[J/OL]．中国比较医学杂志.
https://link.cnki.net/urlid/11.4822.R.20261020.1700.006

网络首发：在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认：纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188，CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

黄芪甲苷干预铁死亡改善高脂诱导小鼠睾丸间质细胞损伤的效应机制研究

彭剑飞，吴丹丹✉

（中国科学技术大学附属第一医院（安徽省立医院）内镜中心，合肥 230001）

*通信作者　吴丹丹（1983—），女，硕士，副主任护师，研究方向：中医药循证评价。E-mail：16013255@qq.com

摘要　目的 探讨黄芪甲苷对高脂诱导的小鼠睾丸间质细胞损伤的保护作用，并从铁死亡角度阐明其潜在作用机制。方法 采用棕榈酸（PA）诱导小鼠睾丸间质细胞（TM3）建立体外高脂损伤模型。CCK-8 法检测细胞活力以确定最佳造模及给药浓度；检测丙二醛（MDA）、活性氧（ROS）、超氧化物歧化酶（SOD）水平评估氧化应激状态；流式细胞术检测细胞凋亡情况；RT-qPCR 及免疫荧光法检测铁死亡相关基因及蛋白谷胱甘肽过氧化酶 4（GPX4）、长链酰基辅酶 A 合酶 4（ACSL4）、前列腺素-内过氧化物合酶 2（PTGS2）的表达变化，并以铁死亡抑制剂（Fer-1）作为阳性对照进行比较分析。结果 PA 处理显著降低 TM3 细胞活力，并引起 ROS 和 MDA 水平升高、SOD 活性下降，同时细胞凋亡率明显增加（$P<0.05$）。PA 可显著下调 GPX4 表达并上调 ACSL4 和 PTGS2 的 mRNA 及蛋白水平（$P<0.05$）。黄芪甲苷干预后，TM3 细胞活力显著提高，ROS 和 MDA 水平降低，SOD 活性升高，细胞凋亡明显减轻（$P<0.05$）。同时，黄芪甲苷可上调 GPX4 表达并抑制 ACSL4 和 PTGS2 的表达，其作用趋势与 Fer-1 相一致。结论 黄芪甲苷可有效改善高脂诱导的小鼠睾丸间质细胞损伤，其保护作用可能通过抑制铁死亡发生、减轻脂质过氧化及氧化应激水平实现。本研究为黄芪甲苷在代谢相关男性生殖功能损伤防治中的潜在应用提供了实验依据。

关键词　黄芪甲苷；铁死亡；高脂诱导；睾丸间质细胞；脂质过氧化

Protective effects of Astragaloside IV against ferroptosis in palmitic acid-induced injury of mouse testicular leydig cells

PENG Jianfei, WU Dandan✉

（Endoscopy Center, the First Affiliated Hospital of University of Science and Technology of China (Anhui Provincial Hospital), Hefei 230001, China）

Abstract　Objective To investigate the protective effects of astragaloside IV against palmitic acid (PA)-induced injury in mouse testicular leydig (TM3) cells and elucidate the potential role of ferroptosis. Methods PA was used to induce high fat-related cellular injury in TM3 cells in vitro. To determine the optimal PA and astragaloside IV concentrations, cell viability was assessed using the Cell Counting Kit-8 assay. Levels of malondialdehyde (MDA), reactive oxygen species (ROS), and superoxide dismutase (SOD) activity were measured to evaluate oxidative stress. Apoptosis was analyzed by flow cytometry. The mRNA and protein expression levels of the ferroptosis-related molecules glutathione peroxidase 4 (GPX4), acyl-coenzyme A synthetase long-chain family member 4 (ACSL4), and prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (PTGS2) were assessed by quantitative reverse transcription PCR and immunofluorescence, respectively. Ferrostatin-1 (Fer-1), a ferroptosis inhibitor, was used as a positive control. Results PA treatment significantly decreased TM3 cell viability, increased ROS and MDA levels, reduced SOD activity, and markedly increased apoptosis ($P<0.05$). PA significantly downregulated GPX4 expression while upregulating ACSL4 and PTGS2 mRNA protein expression ($P<0.05$). Following astragaloside IV treatment, TM3 cell viability was significantly increased, ROS and MDA levels were reduced, SOD activity was increased, and apoptosis was markedly attenuated ($P<0.05$). Astragaloside IV also upregulated GPX4 expression and suppressed ACSL4 and PTGS2 expression, with effects consistent with those of Fer-1. Conclusions Astragaloside IV effectively ameliorated PA-induced injury in TM3 cells. Its protective effects may be associated with inhibition of ferroptosis, reduction of lipid peroxidation, and

收稿日期：2026-06-24
作者简介：彭剑飞（1996—），男，硕士，护师，研究方向：中医药循证评价。E-mail：2596719525@qq.com
网络首发时间：2026-10-21 10:34:32　网络首发地址：https://link.cnki.net/urlid/11.4822.R.20261020.1700.006

alleviation of oxidative stress. These findings provide experimental evidence supporting the potential of astragaloside IV for the prevention and treatment of metabolic dysfunction-related male reproductive injury.
Key words astragaloside IV; ferroptosis; high-fat induction; testicular leydig cells; lipid peroxidation

高脂血症及相关代谢异常已成为全球性公共健康问题，不仅是心血管疾病、糖尿病和非酒精性脂肪肝的重要病理基础，也与男性生殖功能障碍密切相关[1]。研究表明，高脂饮食、肥胖及胰岛素抵抗状态可显著增加低睾酮血症和男性不育的发生风险[2-4]。睾丸作为高度依赖能量代谢与脂质稳态维持的器官，其结构与功能极易受到全身代谢异常的影响，其中睾丸间质细胞损伤被认为是代谢相关男性生殖内分泌障碍的重要病理基础[5]。睾丸间质细胞是睾酮合成与分泌的主要功能细胞，其正常功能依赖于稳定的脂质代谢、线粒体功能及氧化还原平衡[6,7]。

铁死亡是一种以铁稳态失衡和脂质过氧化异常积累为特征的调节性细胞死亡方式，其发生高度依赖脂质代谢状态。代谢异常条件下，脂质沉积为脂质过氧化反应提供底物基础，可能显著提高睾丸间质细胞对铁死亡的敏感性。脂质过氧化是铁死亡发生的关键环节，其中长链酰基辅酶 A 合酶 4（long-chain-fatty-acid-CoA ligase 4，ACSL4）通过促进多不饱和脂肪酸向膜磷脂整合，为脂质过氧化提供底物；而谷胱甘肽过氧化酶 4（glutathione peroxidase 4，GPX4）作为清除磷脂过氧化物的核心抗氧化酶，其表达或活性下降可直接诱发铁死亡[8,9]。因此，调控 ACSL4/GPX4 介导的脂质过氧化通路，可能成为干预高脂诱导睾丸间质细胞损伤的重要策略。

黄芪甲苷（astragaloside IV，AS-IV）作为黄芪的主要活性成分，具有抗氧化、抗炎、抗凋亡及改善线粒体功能等多种药理作用，在心血管疾病、糖脂代谢异常及肾脏损伤等疾病中均表现出良好的保护作用[10]。然而，已有研究主要集中于黄芪甲苷调控氧化应激及细胞凋亡，对其是否能够调控铁死亡尚缺乏直接证据。尤其是在高脂诱导睾丸间质细胞损伤过程中，铁死亡是否参与疾病发生以及黄芪甲苷是否能够通过调控铁死亡发挥保护作用，目前仍未见系统研究。因此，本研究首次以 PA 诱导睾丸间质细胞（TM3）建立高脂损伤模型，从铁死亡角度系统评价黄芪甲苷对 GPX4、ACSL4 及前列腺素-内过氧化物合酶 2（prostaglandin-endoperoxide synthase 2，PTGS2）等关键分子的调控作用，并结合铁死亡抑制剂 Fer-1 进行机制验证，为阐明黄芪甲苷改善代谢相关男性生殖功能损伤提供新的理论依据。

1 材料和方法

1.1 细胞

小鼠睾丸间质细胞（TM3）购自中国医学科学院基础医学研究所（1101MOU-PUMC000297）。

1.2 主要试剂与仪器

黄芪甲苷IV（上海怡淼化学科技有限公司，CX163934）；棕榈酸（palmitic acid，PA，合肥博美生物科技有限责任公司，ZP1809）；无脂肪酸牛血清白蛋白（翌圣生物科技(上海)股份有限公司，36104ES25）；Ferrostantin-1（美国 GlpBio 公司，GC10380）；丙二醛（malondialdehyde，MDA）、超氧化物歧化酶（superoxide dismutase，SOD）试剂盒（南京建成生物工程研究所，A003-4-1、A001-1-2）；Anti-ACSL4 Antibody（武汉博士德生物工程有限公司，M04372-1)；Anti-GPX4 Rabbit pAb、Anti-SLC40A1 Rabbit pAb、Cy3 标记山羊抗兔 IgG、RNA 提取液、SYBR、Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒（武汉赛维尔生物科技有限公司，GB114327-100、GB111471-100、GB21303、G3013、G3326-05、G1511）；反转录试剂盒（北京兰杰柯科技有限公司，BL696A）。

Eppendorf 逆转录仪器（德国 Eppendorf 公司）；SpectraMax i3x 型多功能微孔板读板机（美谷分子仪器（上海）有限公司）；LightCycler 96 型实时荧光定量 PCR 仪（美国 Roche 公司）；Olympus BX81 倒置荧光显微镜（日本 Olympus 公司）。

1.3 实验方法

1.3.1 实验分组

正常对照组（NC 组）：1500 μL 完全培养基培养 24 h；高脂模型组（PA 组）：1 485 μL 完全培养基+15 μL PA（20 mmol/L）培养 24 h；PA+黄芪甲苷组（AS-IV组）：1 483.5 μL 完全培养基+15 μL PA（20 mmol/L）+1.5 μL AS-IV（100 μmol/L）培养 24 h；PA+铁死亡抑制剂组（Fer-1 组）：Fer-1（1 μmol）预处理 30 min，1 485 μL 完全培养基+15 μL PA（20 mmol/L）培养 24 h。

1.3.2 PA 诱导的 TM3 细胞损伤模型构建[11]

将细胞接种至 96 孔板中，待生长至所需丰度后给予不同浓度的 PA（0、100、200、400、800、1600）μmol/L 诱导处理 24 h，吸弃液体后加入配置好的 CCK-8 工作液（CCK-8：完全培养基=9：1），细胞培养箱孵育 1 h 后使用酶标仪检测各组吸光度值。

1.3.3 AS-IV对 PA 诱导的小鼠睾丸间质细胞（TM3）活性的影响

将细胞接种至 96 孔板中，待生长至所需丰度后给予 200 μmol/L 浓度的 PA 诱导，同时分别加入不同浓度的 AS-IV溶液（0、25、50、100、200、400）μmol/L 培养 24 h，吸弃液体后加入配置好的 CCK-8 工作液（CCK-8：完全培养基=9：1），细胞培养箱孵育 1 h 后使用酶标仪检测各组吸光度值。

1.3.4 MDA 及 SOD 水平检测

将细胞接种于 6 孔板中，等到生长至实验所需丰度后随机分为 NC、PA、AS-IV、Fer-1 4 组，按 1.3.1 方法给药处理后使用胰酶消化细胞，收集至 EP 管使用 PBS 清洗两次，使用超声破碎细胞。根据试剂盒说明书检测相应 MDA 及 SOD 水平。

1.3.5 流式细胞术检测 TM3 细胞损伤

将细胞接种于 6 孔板中，等到生长至实验所需丰度后随机分为 NC、PA、AS-IV、Fer-1 4 组，按 1.3.1 方法给药处理后按照 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒说明书处理细胞后检测细胞损伤。

1.3.6 RT-qPCR 法检测 TM3 睾丸间质细胞铁死亡相关基因表达水平

使用 TRIzol 提取液提取总 RNA，使用反转录试剂盒逆转录为 cDNA，RT-qPCR 采用三步法。在结束后对其进行溶解曲线分析以确保扩增单一产物，然后获得目的基因以及对应内参基因的 Cq 值，应用△△Cq 法进行结果分析。RT-qPCR 所用引物序列见表 1。

表1 引物序列（5’-3’）

Table 1 Primer sequences（5’-3’）

基因 Gene	引物方向 Primer direction	序列 Sequence	长度/bp Length/bp
GPX4	下游引物 Reverse primer	GCACATGGTCTGCCTGGATAAG	192
	上游引物 Forward primer	TCTTGATTACTTCCTGGCTCCTG	
PTGS2	下游引物 Reverse primer	GTACCGCAAACGCTTCTCC	235
	上游引物 Forward primer	TTGAGGAGAACAGATGGGATTT	
ACSL4	上游引物 Forward primer	GCTAAGCCCACTTCAGACAAACC	315
	下游引物 Reverse primer	GGTGTTCTTTGGTTTCAGTCCC	
β-actin	上游引物 Forward primer	GTGACGTTGACATCCGTAAAGA	287
	下游引物 Reverse primer	GTAACAGTCCGCCTAGAAGCAC	

1.3.7 免疫荧光法检测 TM3 睾丸间质细胞铁死亡相关蛋白表达水平

将细胞接种于 6 孔板中，等到生长至实验所需丰度按照分组给药处理后经以下流程处理细胞，具体步骤如下：将 6 孔板取出弃培养基，用常温 PBS 洗涤 3 遍，每次 3 min。使用冰甲醇固定 5 min，

用常温 PBS 洗涤 3 遍，每次 3 min。使用 0.5%曲拉通通透 20 min，用常温 PBS 洗涤 3 遍，每次 3 min。使用 10%山羊血清室温封闭 1 h。封闭结束弃封闭，加一抗四度孵育过夜（一抗：PBS=1：200），次日回收一抗，用常温 PBS 洗涤 3 遍，每次 3 min。使用 Cy3 室温避光孵育二抗 1 h（二抗：PBS=1：200），用常温 PBS 洗涤 3 遍，每次 3 min。加入 DAPI 室温避光孵育 5 min，用常温 PBS 洗涤 3 遍，每次 3 min。置于荧光显微镜下观察。

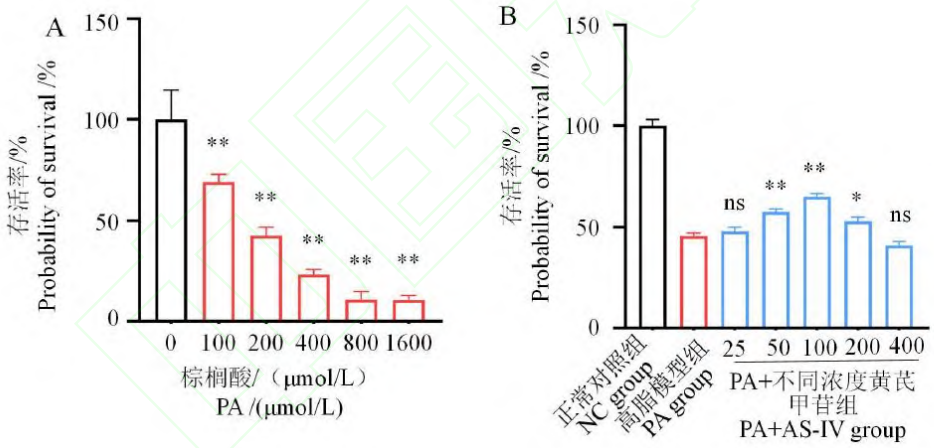
1.4 统计学方法

采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计分析。计量资料经 Shapiro-Wilk 检验符合正态分布，以平均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示；多组间比较采用单因素方差分析（One-way ANOVA），方差齐性采用 Levene 检验，满足方差齐性时采用 Tukey 事后检验，不满足时采用 Games-Howell 检验。P<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 黄芪甲苷增强 PA 诱导的 TM3 细胞活力

实验终点，使用 CCK-8 检测 24 h 不同浓度 PA 对 TM3 睾丸间质细胞活力的影响以确定最佳造模浓度。结果如图 1A 所示，200 μmol/L 浓度的 PA 干预 TM3 24 h，能够使其细胞活力下降至 42.66%，故后续选择 200 μmol/L 浓度的 PA 进行实验（P<0.01）。经 AS-IV干预，细胞活力呈剂量依赖性显著回升。然而，当 AS-IV浓度升至 200 μmol/L 时，其表现出显著细胞毒性（P＜0.01）。实验数据显示，50 μmol/L 与 100 μmol/L AS-IV干预组细胞活力均显著高于高脂模型组（P＜0.01）。基于此剂量效应关系，本研究进一步优化干预条件，最终选定 100 μmol/L AS-IV作为后续实验的标准化给药浓度。见图 1B。



注：A：不同浓度 PA 对 TM3 细胞活力的结果；B：不同浓度 AS-IV对 PA 诱导的 TM3 细胞活力的结果。与正常对照组相比，$^{*}P$<0.05，$^{**}P$<0.001。

图 1 CCK8 检测 TM3 细胞活力

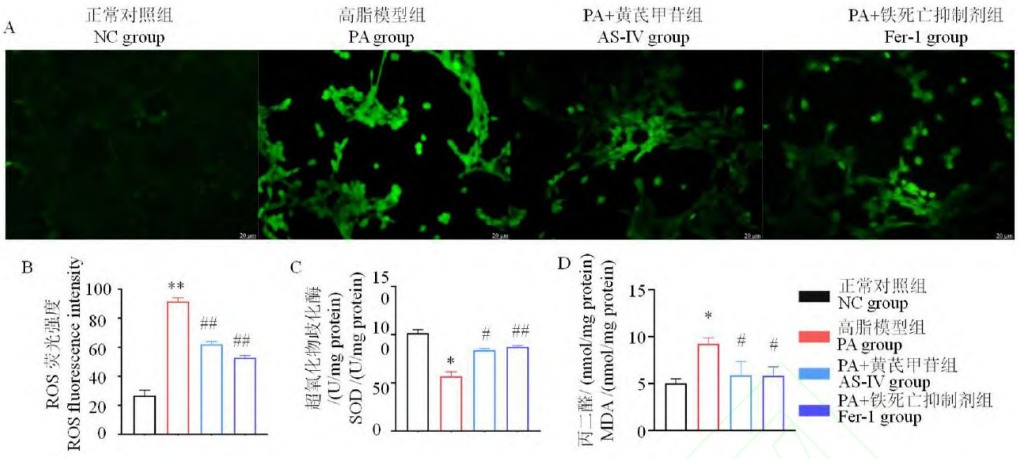
Note. A, Results of TM3 cell viability with different concentrations of PA. B, Results of TM3 cell viability induced by PA with different concentrations of AS-IV. Compared with NC group, $^{*}P$<0.05, $^{**}P$<0.001.

Figure 1 CCK8 test of TM3 cell viability

2.2 黄芪甲苷对 PA 诱导的 TM3 细胞脂质过氧化及氧化应激水平的影响

如图 2A 所示，PA 处理后 TM3 细胞内 ROS 荧光明显增强，提示细胞内 ROS 大量积累；经 AS-IV及 Fer-1 干预后，ROS 荧光信号明显减弱。图 2B 显示，PA 组 ROS 荧光强度显著高于 NC 组（P<0.05），而 AS-IV组及 Fer-1 组均较 PA 组显著降低（P<0.05）。图 2C 显示，与 NC 组相比，PA 组 MDA 水平明显升高（P<0.05）；AS-IV及 Fer-1 干预后 MDA 水平明显下降（P<0.05）。图 2D 显示，PA 处理后 SOD 活性明显降低（P<0.05），而 AS-IV及 Fer-1 均可显著提高 SOD 活性

（P<0.05），提示黄芪甲苷能够减轻 PA 诱导的脂质过氧化及氧化应激损伤。



注：A：ROS 荧光染色图像（100×）；B：ROS 荧光强度；C：MDA 水平比较；D：SOD 活性比较。与 NC 组相比，$^{*}P$<0.05，$^{**}P$<0.01；与 PA 组相比，$^{\#}P$<0.05，$^{\#\#}P$<0.01。

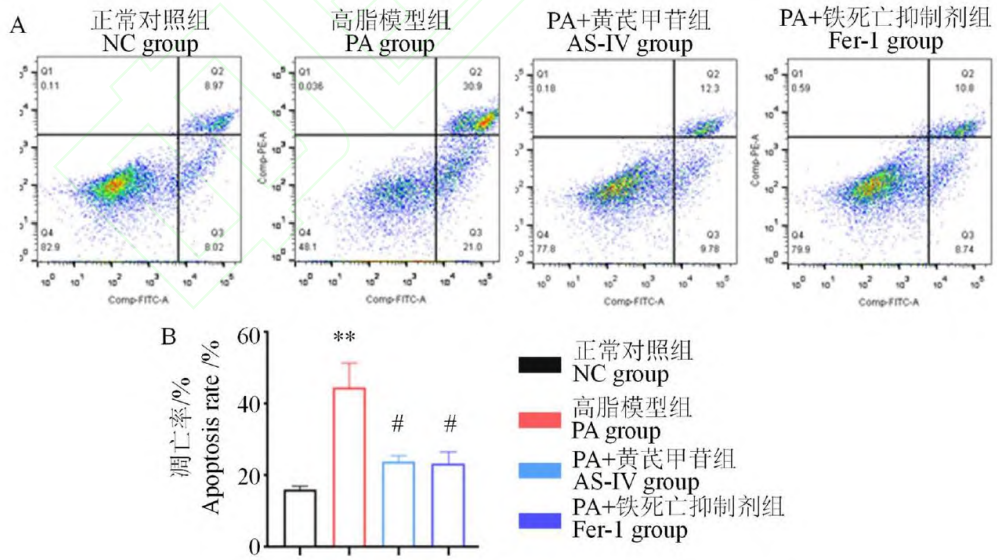
图 2 AS-IV对 PA 诱导的 TM3 细胞氧化应激的影响

Note. A, Representative ROS fluorescence staining images (100×). B, Quantitative analysis of ROS fluorescence intensity. C, MDA levels. D, SOD activity. Compared with NC group, $^{*}P$<0.05, $^{**}P$<0.01. Compared with PA group, $^{\#}P$<0.05, $^{\#\#}P$<0.01.

Figure 2 Effect of AS-IV on PA-induced oxidative stress in TM3 cells (100×)

2.3 黄芪甲苷抑制 PA 诱导的 TM3 细胞凋亡

使用流式细胞术检测 TM3 睾丸间质细胞凋亡率为 51.9%，细胞群的偏移量表明细胞死亡，如图 3A 所示，流式细胞术结果显示 PA 处理后 TM3 细胞早期及晚期凋亡细胞明显增多，而 AS-IV及 Fer-1 干预后凋亡细胞数量明显减少。图 3B 显示，PA 组细胞凋亡率较 NC 组显著升高（P<0.05）；AS-IV 组及 Fer-1 组细胞凋亡率均较 PA 组显著降低（P<0.05）。



注：A：流式细胞术检测各组 TM3 细胞凋亡；B：细胞凋亡率统计分析。与 NC 组相比，$^{*}P$<0.05，$^{**}P$<0.01；与 PA 组相比，$^{\#}P$<0.05，$^{\#\#}P$<0.01。

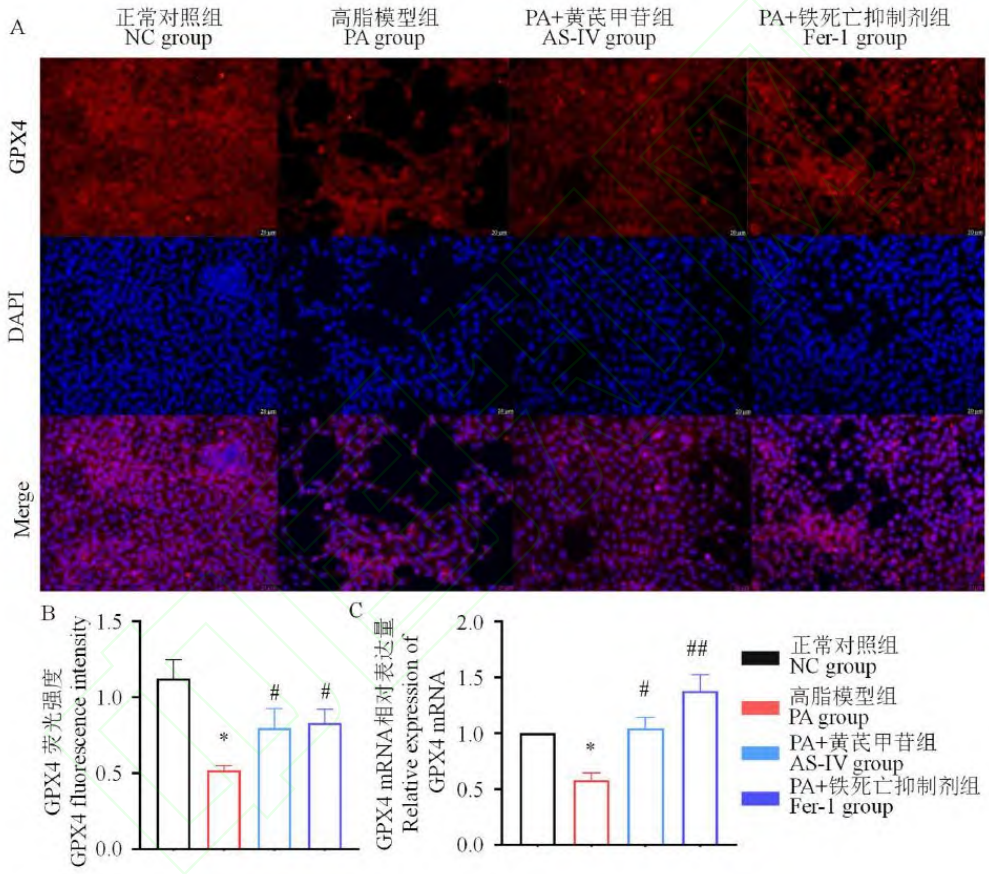
图 3 AS-IV对 PA 诱导的 TM3 细胞损伤的影响

Note. A, Representative flow cytometry plots of apoptosis. B, Quantitative analysis of apoptosis rate. Compared with NC group, $^{*}P$<0.05, $^{**}P$<0.01. Compared with PA group, $^{\#}P$<0.05, $^{\#\#}P$<0.01.

Figure 3 Effect of AS-IV on PA-induced TM3 cell damage

2.4 黄芪甲苷对 PA 诱导的 TM3 细胞铁死亡相关基因及蛋白表达水平的影响

实验终点，检测铁死亡相关基因 GPX4、ACSL4、PTGS2 蛋白和 mRNA 表达。如图 4A 所示，PA 处理后 GPX4 免疫荧光信号明显减弱；AS-IV及 Fer-1 干预后 GPX4 荧光表达明显增强。图 4B 定量分析结果进一步证实，PA 组 GPX4 蛋白表达较 NC 组显著降低（P<0.05），AS-IV组及 Fer-1 组较 PA 组显著升高（P<0.05），GPX4 mRNA 表达变化趋势与蛋白表达一致（图 4C）。如图 5A 所示，PA 处理后 ACSL4 免疫荧光明显增强，而 AS-IV及 Fer-1 干预后荧光信号明显减弱。PA 组 ACSL4 蛋白表达显著高于 NC 组（P<0.05），AS-IV组及 Fer-1 组均显著下降（P<0.05），ACSL4 mRNA 表达变化与蛋白表达一致（图 5B、5C）。如图 6A 所示，PA 处理后 PTGS2 免疫荧光明显增强，经 AS-IV及 Fer-1 干预后明显减弱。PA 组 PTGS2 蛋白表达显著高于 NC 组（P<0.05），AS-IV组及 Fer-1 组均明显降低（P<0.05），PTGS2 mRNA 表达趋势与蛋白表达一致（图 6B、6C）。

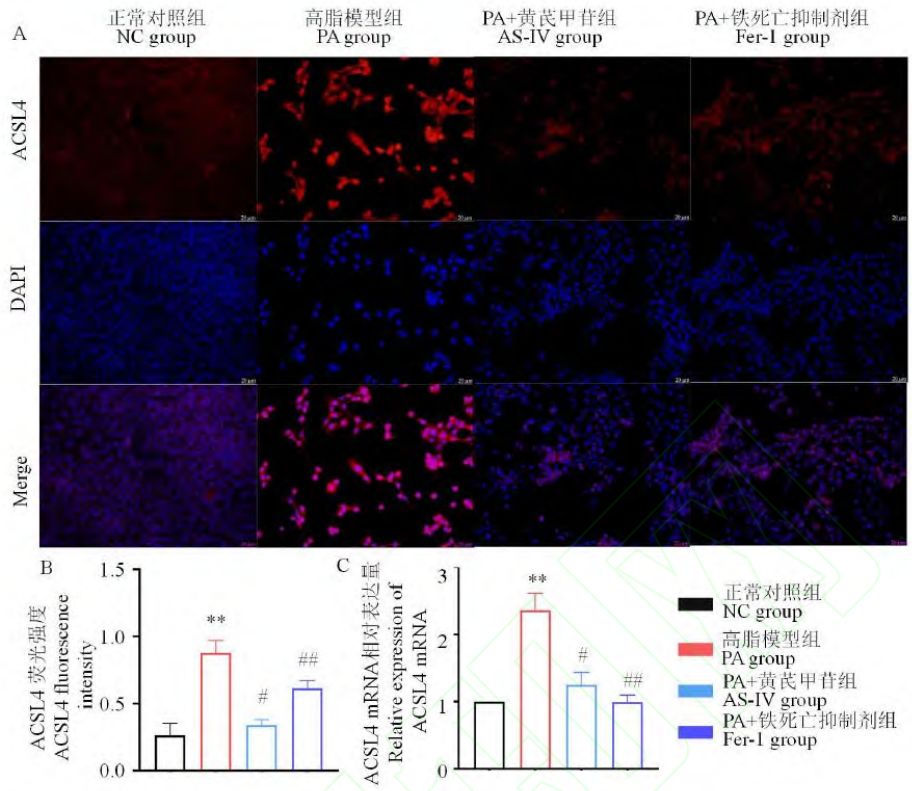


注：A：GPX4 免疫荧光染色图像（100×）；B：GPX4 荧光强度定量分析；C：GPX4 mRNA 相对表达水平。与 NC 组相比，*P<0.05，**P<0.01；与 PA 组相比，#P<0.05，##P<0.01。

图 4 AS-IV对 PA 诱导的 TM3 细胞 GPX4 表达的影响

Note. A, Representative immunofluorescence images of GPX4 (100×). B, Quantitative analysis of GPX4 fluorescence intensity. C, Relative mRNA expression of GPX4. Compared with NC group, *P<0.05, **P<0.01. Compared with PA group, #P<0.05, ##P<0.01.

Figure 4 Effect of AS-IV on GPX4 expression in PA-induced TM3 cells

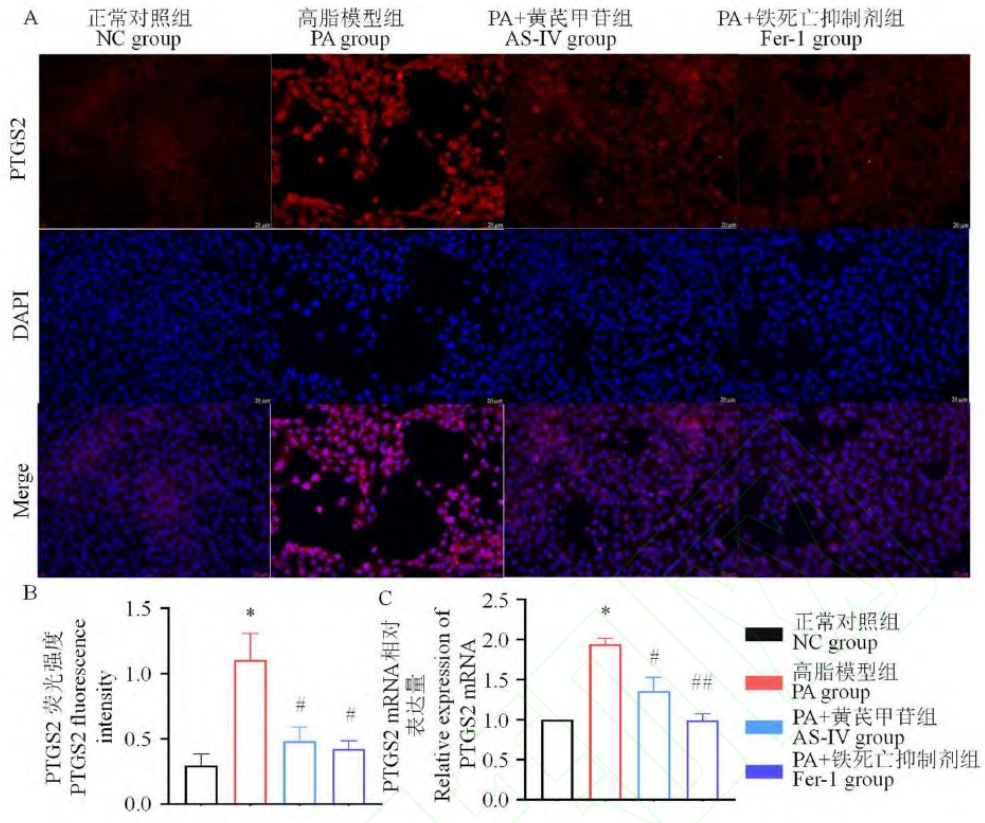


注：A：ACSL4 免疫荧光染色图像（100×）；B：ACSL4 荧光强度定量分析；C：ACSL4 mRNA 相对表达水平。与 NC 组相比，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$；与 PA 组相比，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$。

图 5 AS-IV对 PA 诱导的 TM3 细胞 ACSL4 表达的影响

Note. A, Representative immunofluorescence images of ACSL4 (100×). B, Quantitative analysis of ACSL4 fluorescence intensity. C, Relative mRNA expression of ACSL4. Compared with NC group, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$. Compared with PA group, $^{\#}P<0.05$, $^{\#\#}P<0.01$.

Figure 5 Effect of AS-IV on ACSL4 expression in PA-induced TM3 cells



注：A：PTGS2 免疫荧光染色图像（100×）；B：PTGS2 荧光强度定量分析；C：PTGS2 mRNA 相对表达水平。与 NC 组相比，$^{*}P$<0.05，$^{**}P$<0.01；与 PA 组相比，$^{\#}P$<0.05，$^{\#\#}P$<0.01。

图 6 AS-IV对 PA 诱导的 TM3 细胞 PTGS2 表达的影响

Note. A, Representative immunofluorescence images of PTGS2 (100×). B, Quantitative analysis of PTGS2 fluorescence intensity. C, Relative mRNA expression of PTGS2. Compared with NC group, $^{*}P$<0.05, $^{**}P$<0.01. Compared with PA group, $^{\#}P$<0.05, $^{\#\#}P$<0.01.

Figure 6 Effect of AS-IV on PA-induced PTGS2 expression in TM3 cells

3 讨论

随着高脂饮食、肥胖及代谢综合征发病率的持续上升，代谢异常相关的男性生殖功能损伤问题日益凸显[12]。睾丸间质细胞作为睾酮合成的主要功能细胞，其结构与功能稳定性对维持男性生殖内分泌稳态至关重要[13]。既往研究表明，长期高脂暴露可通过脂质沉积、氧化应激增强及线粒体功能障碍等途径损伤睾丸间质细胞，但其主导性的细胞死亡方式及关键分子调控网络尚未完全明确[14-16]。近年来，铁死亡作为一种新型程序性细胞死亡方式逐渐受到关注，其发生与脂质代谢紊乱、铁稳态失衡及氧化应激密切相关，被认为是代谢性疾病导致组织器官损伤的重要机制之一。因此，从铁死亡角度探讨高脂诱导睾丸间质细胞损伤的发生机制，对于深入阐明代谢相关男性生殖功能障碍具有重要意义。

铁死亡作为一种以铁依赖性脂质过氧化为核心特征的调节性细胞死亡形式，近年来被证实广泛参与代谢性疾病相关的器官损伤过程[17]。与凋亡不同，铁死亡更强调脂质代谢异常与氧化还原失衡在细胞损伤中的协同作用。睾丸间质细胞富含线粒体，脂质代谢及类固醇合成活跃，对脂质过氧化和铁稳态紊乱高度敏感，因此推测铁死亡可能在高脂诱导的睾丸间质细胞损伤中发挥关键作用。

本研究以 PA 诱导 TM3 小鼠睾丸间质细胞损伤模型为切入点，系统评估了细胞活力、氧化应激水平及铁死亡相关分子变化。结果显示，PA 处理显著降低 TM3 细胞活力，并伴随 ROS 及 MDA 水平明显升高、SOD 活性下降，提示氧化应激和脂质过氧化显著增强。与此同时，铁死亡关键调控分子 ACSL4 和 PTGS2 的 mRNA 及蛋白表达显著上调，而抗脂质过氧化核心酶 GPX4 表达明显下调，提示 PA 诱导的细胞损伤过程中存在典型的铁死亡分子特征。Fer-1 干预可显著逆转上述改变，进一步

从功能与分子层面验证了铁死亡在 PA 诱导 TM3 细胞损伤中的重要作用。机制层面分析显示，ACSL4 通过促进多不饱和脂肪酸向磷脂的酯化整合，为脂质过氧化反应提供底物基础，其表达升高被认为是细胞铁死亡易感性增加的重要标志；而 GPX4 作为抑制铁死亡的关键抗氧化酶，能够清除磷脂过氧化物，维持细胞膜结构稳定[18,19]。本研究中，PA 诱导 ACSL4 和 PTGS2 上调、GPX4 下调，伴随脂质过氧化水平升高及细胞凋亡率增加，提示铁死亡可能与凋亡在睾丸间质细胞损伤过程中并行发生，并共同参与细胞损伤进程。值得注意的是，本研究采用铁死亡抑制剂 Fer-1 作为阳性对照，其保护作用与黄芪甲苷基本一致，进一步支持了铁死亡参与 PA 诱导 TM3 细胞损伤的可能性。虽然本研究尚未检测脂质 ROS、Fe^{2+}含量及线粒体超微结构等铁死亡特征性指标，但结合 GPX4、ACSL4 及 PTGS2 表达变化以及 Fer-1 干预结果，可以从分子和功能两个层面支持铁死亡参与该过程。

黄芪甲苷作为黄芪的主要活性成分，具有抗氧化、抗炎及调节能量代谢等多重生物学效应[20,21]。既往研究多集中于其在心血管系统和代谢性疾病中的保护作用，而其对代谢性生殖细胞损伤，尤其是铁死亡调控方面的研究相对有限。本研究结果表明，黄芪甲苷可显著提高 PA 诱导 TM3 细胞的存活率，降低 ROS 和 MDA 水平，提高 SOD 活性，并明显抑制细胞凋亡，提示其在高脂诱导的睾丸间质细胞损伤中具有明确的细胞保护作用。进一步机制研究发现，黄芪甲苷干预可显著下调 ACSL4 和 PTGS2 的表达，同时上调 GPX4 的表达，其调控趋势与铁死亡抑制剂 Fer-1 高度一致，提示黄芪甲苷可能通过抑制铁死亡信号通路发挥保护作用。结合氧化应激及脂质过氧化指标的同步改善，说明黄芪甲苷可能通过减轻脂质过氧化负荷、维持细胞膜及线粒体结构稳定性，从而降低睾丸间质细胞对铁死亡的敏感性。此外，已有研究表明，氧化应激、凋亡及铁死亡之间存在复杂的交叉调控关系，高脂环境下多种程序性细胞死亡方式可能同时存在并相互影响。本研究仅评价了细胞凋亡及铁死亡相关指标，尚未进一步观察焦亡、坏死性凋亡及自噬等其他程序性细胞死亡形式，因此目前尚不能明确铁死亡在 TM3 细胞损伤中的主导地位，未来仍需进一步开展相关机制研究。

本研究仍存在一定局限性：首先，本研究仅基于 TM3 细胞体外模型开展，尚缺乏动物实验及临床研究验证，其结果外推性仍需进一步证实；其次，本研究未检测脂质 ROS、Fe^{2+}含量、线粒体超微结构等铁死亡直接证据，因此关于铁死亡的结论仍主要依据分子表达及功能学结果推导；此外，本研究未进一步评价焦亡、自噬及坏死性凋亡等其他程序性细胞死亡方式，也未明确不同细胞死亡方式之间的相互关系。未来应结合高脂饮食动物模型、多组学分析及信号通路阻断实验，对黄芪甲苷调控铁死亡的分子机制进行更加深入的研究，为其在代谢相关男性生殖功能障碍中的临床转化提供更加充分的实验依据。

综上所述，本研究从铁死亡角度系统阐明了 PA 诱导睾丸间质细胞损伤的潜在机制，证实铁死亡在代谢性睾丸细胞损伤中发挥重要作用；同时明确黄芪甲苷可通过调控铁死亡相关分子、抑制脂质过氧化及氧化应激反应，从而改善高脂诱导的睾丸间质细胞损伤，为其在代谢相关男性生殖功能损伤中的潜在应用提供了新的理论依据。

参考文献

[1] 都正泓， 毛飞， 赵雪， 等． 高脂饮食致雄性斑马鱼生殖功能降低的分子基础研究 [J]． 中华男科学杂志， 2025， 31（11）： 963-971．
Du Z H, Mao F, Zhao X, et al. The reduction of reproductive function of male zebrafish caused by high-fat diet: a molecular basis study [J]. Natl J Androl, 2025, 31(11): 963-971.

[2] 石学颖． 高脂饮食与精子形态异常的潜在机制 [J]． 国际生殖健康/计划生育杂志， 2025， 44（6）： ： 490-495．．
Shi X Y. The mechanism of high fat diet-induced sperm morphological abnormalities [J]. J Int Reprod Heal Plan, 2025, 44(6): : 490-495.

[3] 梅翠云， 姚平波， 蔡瑞． 肥胖调控生殖生理功能 [J]． 中国生物化学与分子生物学报， 2025， 41（9）： 1257-1267．
Mei C Y, Yao P B, Cai R. Function of obesity in regulating reproductive physiology [J]. Chin J Biochem Mol Biol, 2025, 41(9): 1257-1267.

[4] 冯宗刚， 魏磊， 程兰兰， 等． 肥胖不育患者血清白脂素水平及其与胰岛素抵抗、精液质量的关系 [J]． 河南医学研究， 2026， 35（3）： 407-410．
Feng Z G, Wei L, Cheng L L, et al. Serum asprosin levels in obese infertile patients and their relationship with insulin resi stance and semen quality [J]. Henan Med Res, 2026, 35(3): 407-410.

[5] 彭思雪， 王梅静， 兰秀成， 等． 睾丸间质细胞损伤的模型构建及发生机制的研究现状 [J]． 世界科学技术-中医药现代化， 2026， 28（2）： 640-652．
Peng S X, Wang M J, Lan X C, et al. The current status of research on the construction of models of leydig cell injury and th e mechanism of its occurrence [J]. Mod Tradit Chin Med Materia Med World Sci Technol, 2026, 28(2): 640-652.

[6] 曾欣， 王梅静， 兰秀成， 等． 补肾论治男性不育症视角下温阳类中药改善睾丸间质细胞功能的机制研究现状 [J]． 四川中医，

2025， 43（5）： 208-215.
Zeng X, Wang M J, Lan X C, et al. Yang-Warming traditional Chinese medicines: mechanisms in enhancing Leydig cells function and treating male infertility from a kidney-tonifying perspective [J]. J Sichuan Tradit Chin Med, 2025, 43(5): 208-215.
[7] 郭小宇， 母春兰， 王佳， 等. 枸杞多糖经 GPX4/AIF 通路修复小鼠睾丸间质细胞氧化应激损伤的研究 [J]. 宁夏医科大学学报， 2025， 47（1）： 1-7.
Guo X Y, Mu C L, Wang J, et al. *Lycium barbarum* polysaccharides repair oxidative stress damaged mouse testicular interstitial cells by GPX4/AIF pathway [J]. J Ningxia Med Univ, 2025, 47(1): 1-7.
[8] 孙凤琼， 张国伟， 王灵巧， 等. DEHP 通过抑制 Fto 表达诱导睾丸间质细胞铁死亡 [J]. 陆军军医大学学报， 2024， 46（21）： 2369-2382.
Sun F Q, Zhang G W, Wang L Q, et al. DEHP induces ferroptosis in testicular interstitial cells by inhibiting Fto expression [J]. J Army Med Univ, 2024, 46(21): 2369-2382.
[9] 彭阿建， 宁港， 吴悔， 等. 雄蚕益肾方对小鼠睾丸间质细胞氧化应激损伤后铁死亡的影响 [J]. 中华男科学杂志， 2024， 30（7）： 640-647.
Peng A J, Ning G, Wu H, et al. Add to Favorite Effect of Xiongcan Yishen Formula on ferroptosis in mouse TM3 Leydig cells after oxidative stress injury [J]. Natl J Androl, 2024, 30(7): 640-647.
[10] 张文龙， 彭红艳， 郭露琴， 等. 基于 AMPK 信号通路探究黄芪甲苷IV对糖尿病肾病大鼠的干预机制 [J]. 天然产物研究与开发， 2025， 37（9）： 1618-1626.
Zhang W L, Peng H Y, Guo L Q, et al. Intervention mechanism of astragaloside IV on diabetic kidney disease in rats based on the AMPK signaling pathway [J]. Nat Prod Res Dev, 2025, 37(9): 1618-1626.
[11] Pan M, Li J, Wang Y, et al. The downregulation of hormone-sensitive lipase and dysregulation of cholesterol receptors/transporter affect testicular lipid homeostasis and function in HFD-induced oligoasthenospermia mice [J]. Mol Med, 2025, 31(1): 274.
[12] 魏冉， 郎哲涛， 王二辉. 肥胖对雄性生殖功能的影响及机制研究进展 [J]. 中华男科学杂志， 2025， 31（4）： 357-362.
Wei R, Lang Z T, Wang E H. Impact and action mechanisms of obesity on male reproductive function: an update [J]. Natl J Androl, 2025, 31(4): 357-362.
[13] O'Donnell L, Smith L B, Rebourcet D. Sertoli cells as key drivers of testis function [J]. Semin Cell Dev Biol, 2022, 121: 2-9.
[14] 蔡旺春， 胡亚楠， 胡振兴， 等. Nesfatin-1 对高糖高脂诱导的睾丸间质细胞氧化应激的干预作用 [J]. 宁夏医科大学学报， 2020， 42（4）： 372-376.
Cai W C, Hu Y N, Hu Z X, et al. Intervention of nesfatin-1 on high glucose and high fat induced oxidative stress in leydig cells [J]. J Ningxia Med Univ, 2020, 42(4): 372-376.
[15] 韦雯雯， 郭灿， 丁俊丽， 等. 高脂饮食对兔睾丸组织损害机制及光甘草定保护作用研究 [J]. 安徽医科大学学报， 2019， 54（6）： 899-904.
Wei W W, Guo C, Ding J L, et al. Study on the damage mechanism of hyperlipidemic diet on testicular tissue and the protective effect of glabradin [J]. Acta Univ Med Anhui, 2019, 54(6): 899-904.
[16] 刘畅， 马文欣， 虎娜， 等. 复方甘草酸苷调节肥胖大鼠睾丸组织凋亡和类固醇合成相关因子表达的作用 [J]. 中草药， 2025， 56（6）： 2025-2033.
Liu C, Ma W X, Hu N, et al. Role of compound glycyrrhizin in regulating apoptosis and expression of steroid synthesis-related factors in testicular tissues of obese rats [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2025, 56(6): 2025-2033.
[17] 赵梦然， 杨蓓蓓， 王百惠， 等. 铁死亡作用机制及其在动物生殖中的研究进展 [J]. 中国畜牧兽医， 2026， 53（2）： 587-597.
Zhao M R, Yang B B, Wang B H, et al. Mechanism of ferroptosis and its research advance in animal reproduction [J]. China Anim Husb Vet Med, 2026, 53(2): 587-597.
[18] 李亚赛， 张宇， 陈大可， 等. 铁死亡在雄性哺乳动物精子发生障碍及雄性不育中的作用研究进展 [J]. 中国畜牧杂志， 2025， 61（8）： 44-51.
Li Y S, Zhang Y, Chen D K, et al. Research progress on the role of ferroptosis in spermatogenic disorders and male infertility in mammals [J]. Chin J Anim Sci, 2025, 61(8): 44-51.
[19] 江晓翠， 萧闵， 吕银娟， 等. 基于铁死亡探讨参苓白术散对高尿酸血症小鼠睾丸生精功能的改善作用 [J]. 北京中医药大学学报， 2024， 47（8）： 1100-1110.
Jiang X C, Xiao M, Lyu Y J, et al. Investigate the effect of Shenling Baizhu Powder on the spermatogenic function of the testes in hyperuricemic mice based on ferroptosis [J]. J Beijing Univ Tradit Chin Med, 2024, 47(8): 1100-1110.
[20] 袁惠， 施敏， 黄爱思， 等. 基于生物信息学和铁死亡研究黄芪甲苷抗阿霉素心肌损伤的作用机制及实验验证 [J]. 中华中医药杂志， 2025， 40（5）： 2499-2507.
Yuan H, Shi M, Huang A S, et al. Mechanism and experimental verification of astragaloside IV against doxorubicininduced myocardial injury based on bioinformatics and ferroptosis [J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2025, 40(5): 2499-2507.
[21] 李国婷， 杨长超， 刘琳， 等. 黄芪甲苷通过 SLC7A11/GPX4 通路调控铁死亡抗血管平滑肌细胞增殖的作用机制分析 [J]. 中国实验方剂学杂志， 2025， 31（10）： 159-167.
Li G T, Yang C C, Liu L, et al. Analysis of mechanism of astragaloside IV in regulating ferroptosis through SLC7A11/GPX4 pathway against vascular smooth muscle cell proliferation [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2025, 31(10): 159-167.