

本文引用: 黄娟, 王一阳, 肖凡, 刘秀, 喻嵘. 参苓白术散调控 TLR4/NF- κ B 通路抑制 LPS 诱导心肌细胞炎症损伤的机制[J]. 湖南中医药大学学报, 2023, 43(10): 1815-1821.

参苓白术散调控 TLR4/NF- κ B 通路抑制 LPS 诱导 心肌细胞炎症损伤的机制

黄娟¹, 王一阳², 肖凡², 刘秀², 喻嵘^{2*}

1. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南长沙 410007; 2. 湖南中医药大学, 湖南长沙 410208

[摘要] 目的 基于 Toll 样受体 4(Toll-like receptor 4, TLR4)/核因子 κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B) 信号通路探讨参苓白术散含药血清对脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导 H9C2 心肌细胞炎症损伤的调控机制。方法 将分化完全的 H9C2 心肌细胞分为空白血清组、模型组、参苓白术散含药血清组、TLR4 抑制剂(TAK-242)组, 每组 6 个复孔。除空白血清组外, 其余各组以 10 μ g·mL⁻¹ LPS 处理细胞, 构建心肌细胞炎症损伤体外模型。空白血清组、模型组及 TAK-242 组以 10% 空白血清进行培养, 参苓白术散含药血清组用 10% 含药血清培养, 均培养 24 h。采用 CCK-8 法测定各组细胞增殖情况; 采用 ELISA 法及免疫荧光法检测细胞白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 含量及蛋白表达水平; 采用 Western blot 法检测 TLR4、NF- κ B、NF- κ B 抑制蛋白 α (degradation of protein κ B- α , I κ B α) 蛋白表达情况。结果 CCK-8 法结果发现, 10% 参苓白术散含药血清对细胞增殖无抑制作用。与空白血清组比较, 模型组细胞的 TNF- α 、IL-1 β 含量及荧光表达量明显增高($P < 0.01$), TLR4、NF- κ B、I κ B α 蛋白表达明显上调($P < 0.01$)。与模型组比较, 参苓白术散含药血清组 IL-1 β 、TNF- α 含量显著降低($P < 0.01$), TLR4、NF- κ B、I κ B α 蛋白表达明显下调($P < 0.01$)。结论 参苓白术散含药血清能抑制 LPS 诱导的心肌细胞炎症反应, 其作用机制可能与调控 TLR4/NF- κ B 通路, 下调细胞炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 表达有关。

[关键词] 参苓白术散; 含药血清; H9C2 细胞; 炎症反应; TLR4/NF- κ B 通路

[中图分类号] R285.5

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2023.10.010

Mechanism of Shenling Baizhu Powder in inhibiting LPS-induced inflammatory injury of myocardial cells by regulating TLR4/NF- κ B signaling pathway

HUANG Juan¹, WANG Yiyang², XIAO Fan², LIU Xiu², YU Rong^{2*}

1. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China;

2. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China

[Abstract] **Objective** To investigate the regulatory mechanism of medicated serum containing Shenling Baizhu Powder (SLBZP) on lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory injury of H9C2 myocardial cells based on Toll-like receptor 4 (TLR4)/nuclear factor- κ B (NF- κ B) signaling pathway. **Methods** The fully differentiated H9C2 cells were divided into blank serum group, model group, medicated serum containing SLBZP group, and TLR4 inhibitor (TAK-242) group, with six replicates in each group. Except for the blank serum group, cells of the other groups were treated with LPS 10 μ g·mL⁻¹ to establish an in vitro model of myocardial cell inflammatory injury. Blank serum group, model group, and TAK-242 group were cultured with 10% blank

[收稿日期] 2023-04-21

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(82074400); 湖南省重点研发计划项目(2020SK2101); 湖南省教育厅科研项目(20K094)。

[第一作者] 黄娟, 女, 副主任医师, 研究方向: 中医药防治糖尿病及其并发症的机制。

[通信作者] * 喻嵘, 女, 博士, 教授, 博士研究生导师, E-mail: yuron@21cn.com。

serum, and medicated serum containing SLBZP group with 10% medicated serum. All groups had been cultured for 24 h. CCK-8 assay was used to test the cell proliferation of each group; ELISA and immunofluorescence were used to determine the content of interleukin-1 β (IL-1 β) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) and their protein expression levels in cells, respectively; Western blot was used to check the protein expression levels of TLR4, NF- κ B, and degradation of protein κ B- α (I κ B α).

Results The results of CCK-8 assay showed that 10% SLBZP-medicated serum had no inhibitory effects on cell proliferation. Compared with the blank serum group, the content of TNF- α and IL-1 β and their fluorescent expression levels in cells of model group significantly increased ($P<0.01$), and the protein expression levels of TLR4, NF- κ B, and I κ B α were significantly up-regulated ($P<0.01$). Compared with the model group, medicated serum containing SLBZP group showed significantly reduced content of IL-1 β and TNF- α ($P<0.01$) and significantly down-regulated protein expression levels of TLR4, NF- κ B, and I κ B α ($P<0.01$).

Conclusion Medicated serum containing SLBZP can inhibit the LPS-induced inflammatory response in H9C2 cells. Its mechanism may be related to regulating TLR4/NF- κ B pathway and down-regulating the expression of inflammatory factors of TNF- α and IL-1 β .

[**Keywords**] Shenling Baizhu Powder; medicated serum; H9C2 cells; inflammatory response; TLR4/NF- κ B signaling pathway

糖尿病心肌病(diabetic cardiomyopathy, DCM)是糖尿病主要的心血管并发症之一,是糖尿病患者心力衰竭高发生率和高死亡率的主要病因^[1-2]。目前,DCM的发病机制及诊治方面的研究尚有许多未知领域和难点。近年研究认为,DCM是心肌在长期高血糖状态下发生的一种慢性炎症性疾病^[3]。研究报道,糖尿病患者的血清和糖尿病动物模型的心肌组织中,多种炎症因子的表达水平显著升高^[4-5]。因此,早期抑制炎症级联反应是防治DCM的一个新靶点。Toll样受体4(Toll-like receptor 4, TLR4)作为炎症反应的重要受体及机体免疫防御系统中的重要组成,是免疫反应与慢性炎症的桥梁^[6]。但TLR4是否介导DCM早期炎症损伤的发生发展,需要进一步探究。

新近研究表明,肠道菌群具有内分泌器官的特征,可通过调节机体代谢及免疫炎症反应影响糖尿病心肌病的病理进程^[7]。肠道微生物群落参与机体免疫细胞的分化成熟,生理状态下,肠上皮细胞结构完整并通过宿主模式识别受体,调控菌群结构,维持内环境稳态;当肠黏膜屏障损伤时,通透性增加,大量促炎物质[如脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)]通过通透性升高的肠屏障进入血液循环到达心脏组织,直接激活TLR4相关通路,诱导病原相关模式分子信号活化,触发局部炎症级联反应;另一方面,心肌细胞功能缺失,并出现大量细胞死亡,与黏附因子相互作用产生炎症效应,引起心肌纤维化及心室重构等病理状态出现^[8-9]。前期临床研究表明,以益气健脾立法组方的参苓白术散可调节糖脂代谢,对心血管疾病疗效确切^[10]。同时,体内实验证实,其可改善脂代谢和减少肠道炎症因子释放,减缓血管病变的风险,抑制免疫炎症反应过度损伤,但其靶向

调控心血管的机制需要进一步研究^[11-12]。故本研究进行体外细胞实验研究,拟以心肌细胞作为研究对象,从免疫炎症角度出发,探讨参苓白术散含药血清对肠道代谢物LPS介导的TLR4/核因子 κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)信号通路及炎症相关因子白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)表达的影响。

1 材料

1.1 动物与细胞株

20只8周龄SD雄性大鼠,体质量200~220g,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供,动物许可证号:SCXK(湘)2019-0004,于湖南中医药大学第一附属医院实验动物中心进行饲养;温度(22 \pm 2) $^{\circ}$ C,湿度50%~65%,自由饮食、饮水,12h/12h光/暗周期(光照时间为6:00~18:00)。本研究经湖南中医药大学实验动物伦理委员会批准,批准号:430727221101382931。大鼠H9C2心肌细胞(批号:CL-0089),购自武汉普诺赛生物科技有限公司。

1.2 药物

参苓白术散由人参、茯苓、白术(炒)、山药、白扁豆(炒)、莲子、薏苡仁(炒)、砂仁、桔梗、甘草组成,批号:22101037,国药准字号:Z110020755,购自北京同仁堂股份有限公司同仁堂制药厂。

1.3 主要试剂与仪器

胎牛血清(批号:SA210518)、胰蛋白酶-EDTA消化液(批号:WH0221A171)、高糖DMEM培养基(批号:WH0022P299)、PBS缓冲液(批号:AD17792273)、CCK-8检测试剂盒(批号:AI07246697)、无血清细胞冻存液(批号:WH0221A091)均购自武汉普诺赛

生命科技有限公司;兔抗TLR4多克隆抗体(批号:ab13556)、兔抗核因子 κ B p56(nuclear factor- κ B p56, NF- κ B p56)单克隆抗体(批号:ab207297)、兔抗NF- κ B抑制蛋白 α (degradation of protein κ B- α , I κ B α)单克隆抗体(批号:ab32518);兔抗TNF- α 单克隆抗体(批号:ab215188)、兔抗IL-1 β 单克隆抗体(批号:ab234437)均购自英国Abcam公司。

SW-CJ-2G型超净工作台(美国Thermo Scientific公司);TGL-18R型冷冻高速离心机(德国Eppendorf公司);YP1002N型电子天平(上海精密科学仪器有限公司);EnSpire2300型多功能酶标分析仪(新加坡PerkinElmer公司);JSM-6700F型扫描显微镜(日本Jeol公司)。

2 方法

2.1 含药血清制备

将20只SD大鼠适应性喂养1周后,随机分成2组:空白血清组、参苓白术散含药血清组,每组10只。给药剂量为等效剂量的5倍,依据体表面积方法换算^[13],参苓白术散含药血清组大鼠用药剂量=($5 \times 12 \text{ g} \times 6.3$)/70 kg=5.4 g/kg,给予参苓白术散药液灌胃;空白血清组采用等容量的灭菌超纯水灌胃,每日1次,连续7 d。末次灌胃1 h后,腹主动脉取血,用含肝素抗凝管收集血液,静置3 h后;以3 000 r·min⁻¹离心(离心半径10 cm)15 min,收集上层血清,0.22 μ m一次性滤过器过滤,56 $^{\circ}$ C恒温水浴锅灭活30 min;将灭活的血清分装至无菌EP管中标记,置于-80 $^{\circ}$ C保存。

2.2 含药血清浓度筛选

取对数生长期的H9C2细胞接种于96孔板中,按照每孔100 μ L、每孔 5×10^3 个细胞,在5%CO₂、37 $^{\circ}$ C条件下培养24 h,弃去培养基,设空白对照组、空白血清组及含药血清组,设置5%、10%、15%、20%、25%的浓度梯度。培养24 h后,吸弃上清液,每孔加入CCK-8溶液10 μ L及完全培养基90 μ L,2 h后用酶标仪在450 nm波长处检测各组细胞的OD值。

2.3 细胞分组及处理

H9C2细胞用10%胎牛血清DMEM培养液调整细胞密度为 5×10^5 /mL,接种于6孔板中,予以10 μ g/mL LPS干预处理24 h后收集细胞。随机分成空白血清组(10%空白血清)、模型组(10 μ g/mL LPS+10%空白血清)、参苓白术散含药血清组(10 μ g/mL LPS+10%参苓白

术散含药血清)及TAK-242组(10 μ g/mL LPS+5 μ mol/L TAK-242^[14])。

2.4 CCK-8法筛选含药血清干预浓度

H9C2细胞以 5×10^4 mL⁻¹密度接种至96孔板中,放入37 $^{\circ}$ C、5% CO₂细胞培养箱中培养24 h;吸弃培养基后,分别加入稀释后的胎牛血清、空白血清及含药血清,每组设置5%、10%、15%、20%、25%的浓度梯度,每组均设6个复孔。干预处理24 h后,每孔加入10 μ L CCK-8溶液及90 μ L完全培养基,培养箱孵育2 h后采用酶标仪在450 nm波长下检测各组细胞的OD值。

2.5 ELISA法检测细胞IL-1 β 、TNF- α 含量

取生长良好的H9C2细胞按照分组干预后,吸取细胞上清液,以3 000 r·min⁻¹(离心半径15 cm)离心20 min,取上清液检测。分别设空白孔、待测样品孔。在酶标包被板上待测样品孔中先加样品稀释液40 μ L,然后再加待测样品10 μ L。将样品加于酶标板孔底部,尽量不触及孔壁,轻轻晃动混匀;每孔加入酶标试剂100 μ L,空白孔除外;用封板膜封板后置37 $^{\circ}$ C温育60 min;弃去液体,甩干,每孔加满洗涤液,静置30 s后弃去;每孔先加入显色剂A 50 μ L,再加入显色剂B 50 μ L,轻轻震荡混匀,37 $^{\circ}$ C避光显色15 min;加终止液50 μ L,终止反应;以空白孔调零,450 nm波长依序测量各孔的OD值,计算IL-1 β 、TNF- α 含量变化。

2.6 免疫荧光法检测IL-1 β 、TNF- α 蛋白表达

将H9C2细胞按照每孔 1×10^5 个细胞接种于含细胞爬片的6孔板。按照分组加入相应药物干预,培养24 h后,以4%预冷的多聚甲醛溶液对细胞进行固定(15 min),PBS溶液洗3遍后加入5% BSA封闭30 min,加入稀释的IL-1 β 、TNF- α (1:50)一抗孵育过夜;滴加稀释的IgG/FITC二抗孵育60 min;洗涤后复染核,然后进行封片,荧光显微镜下观察。

2.7 Western blot法检测TLR4、NF- κ B p65、I κ B α 蛋白表达

将H9C2细胞以 5×10^5 /mL的细胞密度接种于6孔板中,细胞培养24 h后,按照分组加入相应药物干预,培养24 h后,弃培养上清液,用PBS洗涤2次,加入适量RIPA裂解液重悬;低温下匀浆后将样品转移至1.5 mL离心管中,以12 000 r·min⁻¹(离心半径10 cm)离心5 min,取上清液分装。采用BCA法测定蛋白浓度后,进行丙烯酰胺凝胶电泳,转膜切

胶后封闭,加入一抗 TLR4(1:1 000)、NF- κ B p65(1:1 000)、I κ B α (1:1 000)抗体,4 $^{\circ}$ C下孵育过夜;PBST洗膜3次,加入HRP标记的山羊抗鼠IgG(1:5 000)、山羊抗兔IgG(1:5 000)二抗,室温孵育90 min。PBST洗膜3次,ECL显色液中显影1 min,冲洗胶片、扫描。

2.8 统计学方法

采用SPSS 22.0进行统计处理。计量资料满足正态性和方差齐性者用“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,多组间比较用单因素方差分析,组间比较用LSD检验;不满足正态性和方差齐性者用Tamhane's T2检验。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 参苓白术散含药血清对H9C2细胞增殖的影响

与空白对照组相比,参苓白术散含药血清组及空白血清组在10%浓度水平的OD值差异无统计学意义($P>0.05$);而参苓白术散血清浓度为5%、15%、20%、25%时,OD值明显降低,细胞增殖受到抑制,差异有统计学意义($P<0.01$)。结果表明,10%参苓白术散含药血清对H9C2细胞无明显毒性作用,故以此浓度作为后续实验含药血清的干预浓度。详见图1。

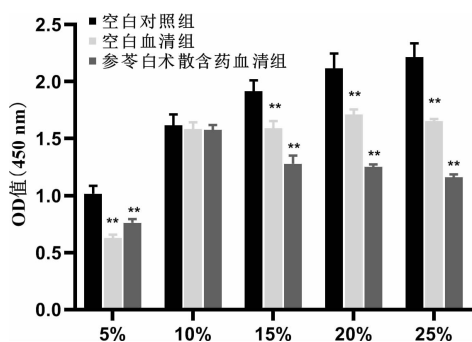


图1 各组H9C2细胞增殖情况比较($\bar{x}\pm s, n=6$)

注:与空白对照组比较,** $P<0.01$ 。

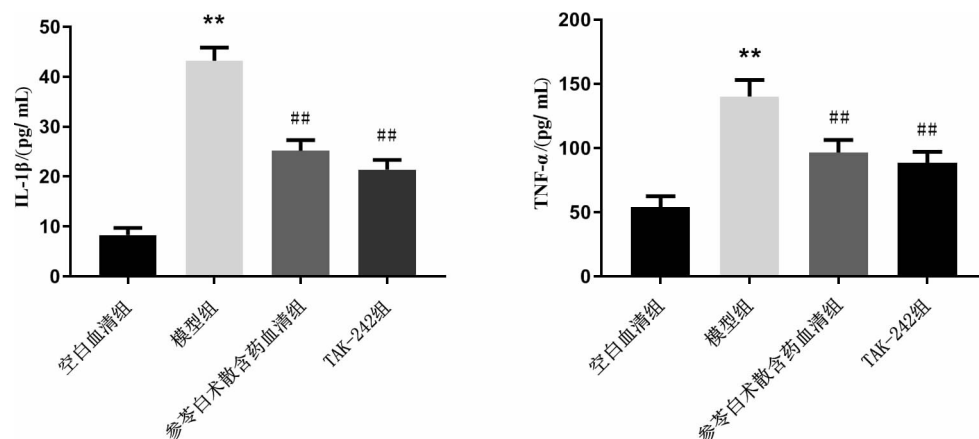


图2 各组H9C2细胞中TNF- α 、IL-1 β 水平比较($\bar{x}\pm s, n=6$)

注:与空白血清组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,## $P<0.01$ 。

3.2 参苓白术散含药血清对H9C2细胞中TNF- α 、IL-1 β 水平的影响

与空白血清组相比,模型组H9C2细胞释放的TNF- α 、IL-1 β 含量增加($P<0.01$)。与模型组相比,参苓白术散含药血清组及TAK-242组细胞中的TNF- α 、IL-1 β 含量显著降低($P<0.01$)。详见图2。

3.3 参苓白术散含药血清对H9C2细胞IL-1 β 、TNF- α 蛋白表达的影响

与空白血清组比较,模型组H9C2细胞的IL-1 β 、TNF- α 的平均OD值明显增加($P<0.01$)。与模型组比较,参苓白术散含药血清组及TAK-242组细胞的IL-1 β 、TNF- α 平均OD值明显下降($P<0.01$)。详见图3。

3.4 参苓白术散含药血清对H9C2细胞TLR4、NF- κ B p65、I κ B α 蛋白表达的影响

与空白血清组相比,模型组H9C2细胞内TLR4、NF- κ B p65、I κ B α 蛋白表达显著增加($P<0.01$)。与模型组相比,参苓白术散含药血清组及TAK-242组细胞的TLR4、NF- κ B p65、I κ B α 蛋白表达减少($P<0.01$)。详见图4。

4 讨论

据最新国际糖尿病联盟的数据统计,目前全球约有4.25亿糖尿病患者,且呈现逐年上升的趋势,预计到2045年将达到7亿^[15]。持续的血糖增高可诱导机体代谢紊乱、免疫炎症反应及氧化应激等多种病理状态出现,引起机体组织及细胞的损伤,而糖尿病心血管并发症是糖尿病患者的主要死亡原因^[16]。DCM是糖尿病常见并发症之一,是独立于冠心病及高血压的特异性心肌病,其发病机制尚未完全阐明。

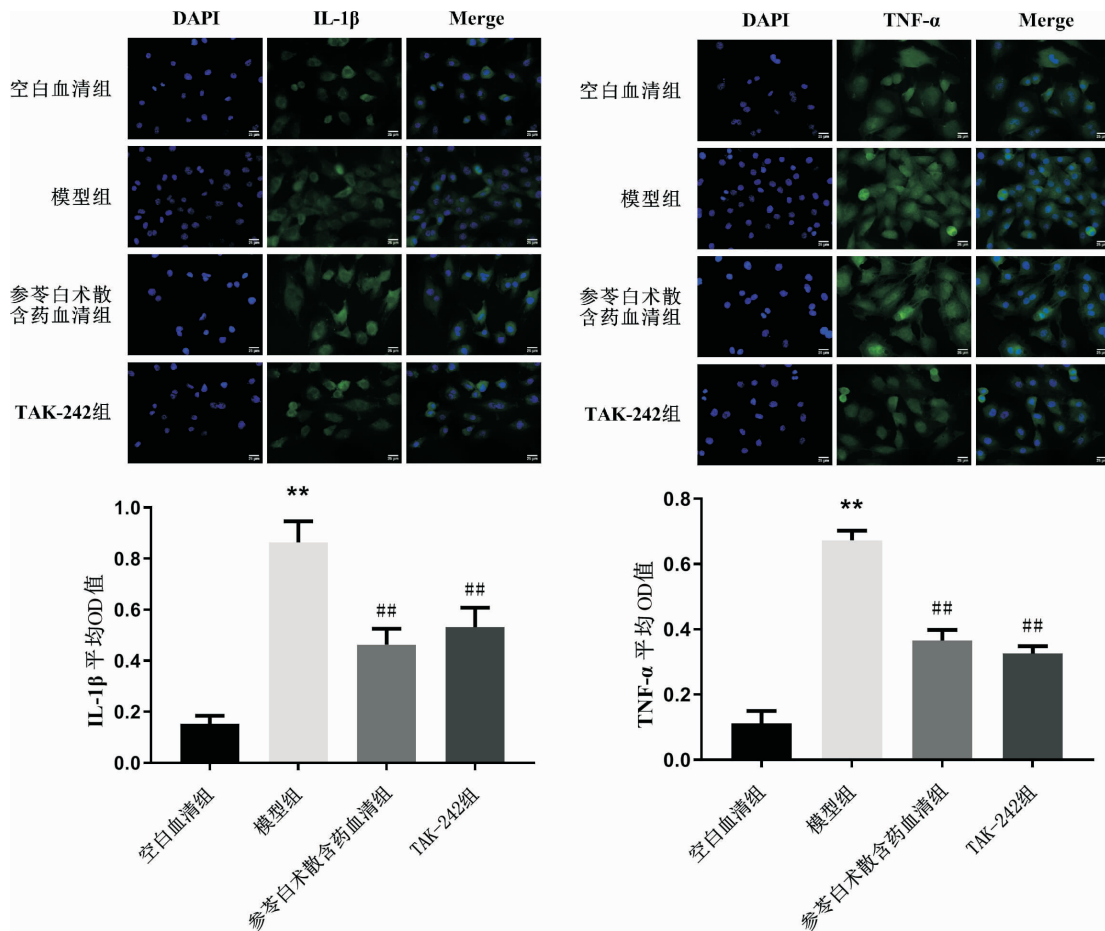


图3 各组 H9C2 细胞 IL-1β、TNF-α 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

注:与空白血清组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,## $P < 0.01$ 。

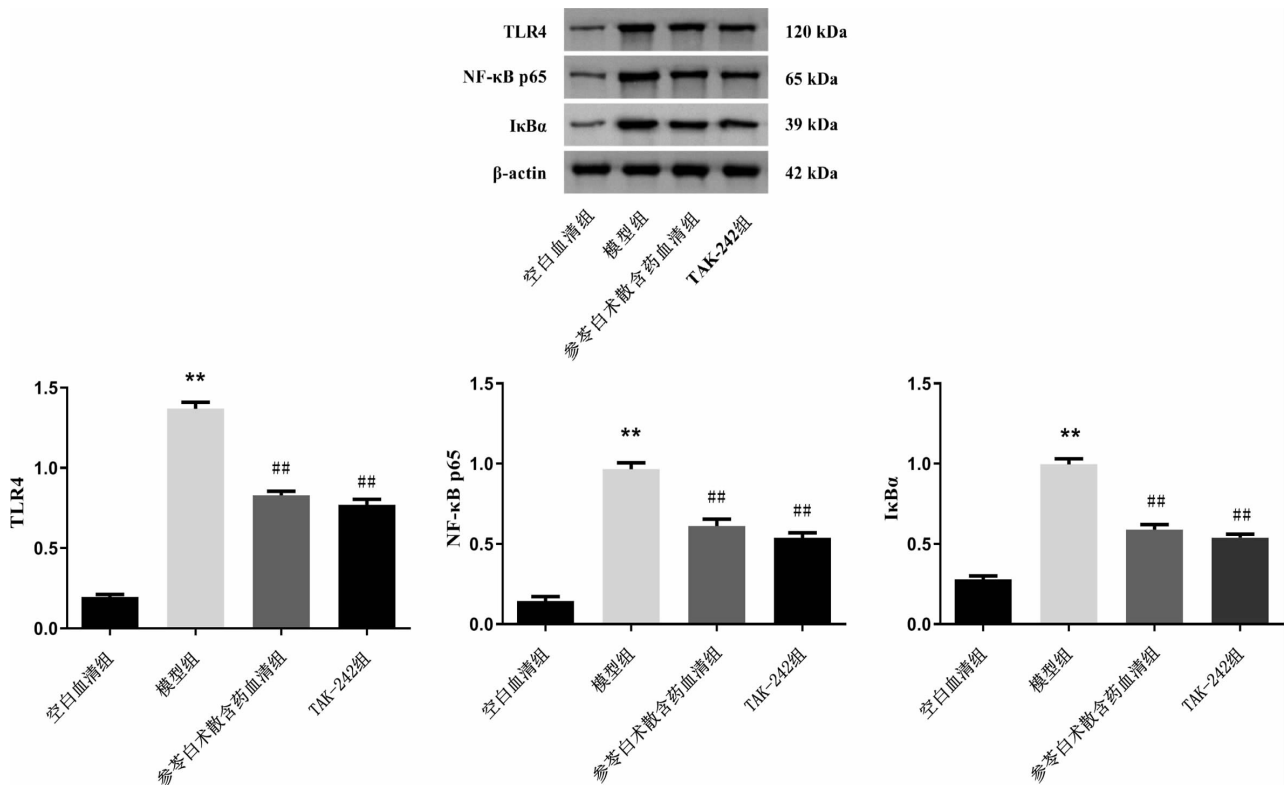


图4 各组 H9C2 细胞 TLR4、NF-κB p65、IκBα 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

注:与空白血清组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,## $P < 0.01$ 。

糖尿病心肌病既有“消渴”症状,也存在“心病”表现。中医学认为,先天不足或后天失养及他脏病变累及脾胃,可导致其胃火偏盛,脾阴亏损,运化不能,气机失畅,水谷精微疏布失常,痰浊内生。病程迁延不愈,气阴耗伤,久病内舍于心,心气不足,运血无力,心阴亏虚,则燥热内盛,暗耗心血,瘀滞内生。脾不散精是 DCM 的中医病机关键,故选用参苓白术散,探究从脾治心的科学内涵。方中君药人参、白术、茯苓益气健脾,渗湿化浊;臣以莲子、山药补气生津;合用白扁豆、薏苡仁、砂仁健脾渗湿,行气化滞;桔梗宣通肺气,载药上行于心肺为佐;甘草健脾和中,调和诸药。全方以补中气、渗湿浊、行气滞为要。近年来,随着肠道微生态相关内容的研究深入,发现肠道菌群与 DCM 的发生密切相关^[17-18]。肠道菌群与宿主免疫系统相互协调平衡,维持机体内环境稳态。正常状态下,肠道屏障功能能够抑制病原微生物的蓄积及移位,并通过宿主模式识别受体(pattern recognition receptor, PRR)感知微生物的异常活动,激活免疫反应识别清除;而病理情况下,出现肠道渗漏、肠屏障功能降低、肠道通透性升高,伴随肠道菌群丰度及结构变化,可触发局部炎症反应,大量释放的炎症因子可进入循环,发生移位,靶向损伤心肌细胞^[19-20]。微生物相关模式分子和 LPS 是肠道菌群与宿主相互作用的主要介质,可与 PRR 识别结合,直接作用于免疫系统,并诱导炎症级联反应,促进 DCM 的发生发展。

TLR4 是一种广泛表达于心肌细胞表面的 PRR,可响应不同病原相关分子模式,启动识别、靶向结合并诱导一系列的信号传输,在机体内环境免疫炎症调控中具有重要作用,与心血管疾病紧密相关^[21-22]。持续的代谢紊乱状态及氧化应激可触发机体免疫炎症反应,TLR4 可识别并激活机体的免疫细胞,促使炎症介质及趋化因子释放,同时活化经典的下游炎症信号转录因子 NF- κ B。在静息状态下, NF- κ B 常以 2 个亚单位 p65 和 p50 结合成异源二聚体,与 I κ B 抑制蛋白家族结合,形成一个稳定的三聚体,存在于细胞质中^[23-24]。I κ B α 是 I κ B 家族中的一员,是 NF- κ B 蛋白的主要抑制剂,当受到细胞外信号刺激时, I κ B α 发生泛素化、磷酸化并降解, I κ B 从三聚体中解离出来,释放 p65/p50,进行核移位,使其移至细胞核与靶基因启动区或增强子的 NF- κ B p65 位点结合,上调 IL-6、IL-8、TNF- α 等促炎

因子的表达^[25-26]。IL-1 β 、TNF- α 可协同介导免疫炎症反应的级联放大^[27]。IL-1 β 是炎症反应启动因子,应激状态下,以前体形式剪切活化,IL-1 β 释放增加可促进血管细胞分泌大量的黏附因子,介导氧自由基及炎性递质蓄积^[28]。同时,可上调 TNF- α 的合成与表达,激活凋亡通路,加快心肌细胞凋亡^[29-30]。本研究以 LPS 作为诱导剂,模拟“肠漏”状态下, LPS 通过循环诱导心肌细胞炎症损伤的过程。采用 CCK-8 法检测细胞增殖抑制率,筛选含药血清浓度,10%参苓白术散含药血清对细胞增殖状态无明显影响,故选做实验含药血清干预浓度。研究结果显示,参苓白术散含药血清可有效抑制 H9C2 细胞中 TNF- α 、IL-1 β 的含量,降低炎症因子的释放。H9C2 细胞在 LPS 刺激后,可激活炎症相关通路,参与细胞炎症损伤过程。本研究中,与空白血清组比较, LPS 诱导的模型组 H9C2 细胞 TLR4、NF- κ B p65、I κ B α 及 TNF- α 、IL-1 β 蛋白表达明显上调,继发的炎症反应明显。而参苓白术散含药血清可抑制 TLR4/NF- κ B 通路蛋白表达,其中 NF- κ B p65 活化后的核移位效应可促进成熟的 IL-1 β 、TNF- α 蛋白表达变化,并促进其分泌至细胞外,引起炎症反应,其作用效应与 TLR4 抑制剂相当。参苓白术散含药血清组 IL-1 β 、TNF- α 蛋白表达差异与 TLR4、NF- κ B p65、I κ B α 的结果具有一致性。

综上所述,参苓白术散含药血清可能通过细胞炎症信号通路 TLR4/NF- κ B,抑制炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 的释放与表达,阻断慢性炎症反应的持续过程,维持心肌细胞正常功能状态。本研究进一步验证参苓白术散通过抑制炎症机制调控 LPS 对心肌细胞的损伤效应,为临床诊疗 DCM 的应用提供依据。

参考文献

- [1] NAKAMURA K, MIYOSHI T, YOSHIDA M, et al. Pathophysiology and treatment of diabetic cardiomyopathy and heart failure in patients with diabetes mellitus[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(7): 3587.
- [2] ORPHANOU N, PAPATHEODOROU E, ANASTASAKIS A. Dilated cardiomyopathy in the era of precision medicine: Latest concepts and developments[J]. Heart Failure Reviews, 2022, 27(4): 1173-1191.
- [3] TAYLOR S I, YAZDI Z S, BEITELSHEES A L. Pharmacological treatment of hyperglycemia in type 2 diabetes [J]. Journal of Clinical Investigation, 2021, 131(2): e142243.

- [4] TAN Y, ZHANG Z, ZHENG C, et al. Mechanisms of diabetic cardiomyopathy and potential therapeutic strategies: Preclinical and clinical evidence[J]. *Nature Reviews Cardiology*, 2020, 17(9): 585–607.
- [5] PENG C, ZHANG Y, LANG X, et al. Role of mitochondrial metabolic disorder and immune infiltration in diabetic cardiomyopathy: New insights from bioinformatics analysis[J]. *Journal of Translational Medicine*, 2023, 21(1): 66.
- [6] LI M, TAN H, GAO T, et al. Gypensapogenin I ameliorates isoproterenol (ISO)-induced myocardial damage through regulating the TLR4/NF- κ B/NLRP3 pathway[J]. *Molecules*, 2022, 27(16): 5298.
- [7] PETRICK H L, OGILVIE L M, BRUNETTA H S, et al. Dietary nitrate and corresponding gut microbiota prevent cardiac dysfunction in obese mice[J]. *Diabetes*, 2023, 72(7): 844–856.
- [8] LUO W, LIN K, HUA J, et al. Schisandrin B attenuates diabetic cardiomyopathy by targeting MyD88 and inhibiting MyD88-Dependent inflammation[J]. *Advanced Science*, 2022, 9(31): e2202590.
- [9] HU Y, LI Q, PAN Y, et al. Sal B alleviates myocardial ischemic injury by inhibiting TLR4 and the priming phase of NLRP3 inflammasome[J]. *Molecules*, 2019, 24(23): 4416.
- [10] 杨凡. 参苓白术散临床研究进展[J]. *新中医*, 2018, 50(10): 38–42.
- [11] 卢广英, 邢训颜, 王嘉响, 等. 经典名方参苓白术散的研究进展及质量标志物的预测分析[J]. *中国中药杂志*, 2022, 47(19): 11.
- [12] 顾菁, 张美玲. 参苓白术散合五苓散加减治疗痰湿体质冠心病合并高血脂症的临床研究[J]. *湖南中医药大学学报*, 2020, 40(2): 236–241.
- [13] 邓文龙. 动物中人体剂量换算遵循的原则[J]. *中药药理与临床*, 2016, 32(3): 196–197.
- [14] XIA L, ZHOU H, WANG T, et al. Activation of mTOR is involved in anti- β 2GPI/ β 2GPI-induced expression of tissue factor and IL-8 in monocytes[J]. *Thrombosis Research*, 2017, 157: 103–110.
- [15] RITCHIE R H, ABEL E D. Basic mechanisms of diabetic heart disease[J]. *Circulation Research*, 2020, 126(11): 1501–1525.
- [16] JIN L, DENG Z, ZHANG J, et al. Mesenchymal stem cells promote type 2 macrophage polarization to ameliorate the myocardial injury caused by diabetic cardiomyopathy[J]. *Journal of Translational Medicine*, 2019, 17(1): 251.
- [17] 李琳, 曾逸笛, 叶家豪, 等. 基于益气养阴法探讨参麦注射液调控肠道菌群-TMAO-炎症轴防治慢性心力衰竭的思路与策略[J]. *湖南中医药大学学报*, 2023, 43(7): 1258–1262.
- [18] JIANG W Y, HUO J Y, WANG S C, et al. Trimethylamine N-oxide facilitates the progression of atrial fibrillation in rats with type 2 diabetes by aggravating cardiac inflammation and connexin remodeling[J]. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 2022, 78(4): 855–867.
- [19] BASTIN M, ANDRELLI F. The gut microbiota and diabetic cardiomyopathy in humans[J]. *Diabetes & Metabolism*, 2020, 46(3): 197–202.
- [20] ALHAJRI N, KHURSHEED R, ALI MT, et al. Cardiovascular health and the intestinal microbial ecosystem: The impact of cardiovascular therapies on the gut microbiota[J]. *Microorganisms*, 2021, 9(10): 2013.
- [21] TSOUROUKTSOGLU T D, WARNATSCH A, IOANNOU M, et al. Histones, DNA, and citrullination promote neutrophil extracellular trap inflammation by regulating the localization and activation of TLR4[J]. *Cell Reports*, 2020, 31(5): 107602.
- [22] CIESIELSKA A, MATYJEK M, KWIATKOWAKA K. TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2021, 78(4): 1233–1261.
- [23] FU Y J, XU B, HUANG S W, et al. Baicalin prevents LPS-induced activation of TLR4/NF- κ B p65 pathway and inflammation in mice via inhibiting the expression of CD14[J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2021, 42(1): 88–96.
- [24] JI J, DING K, LUO T, et al. TRIM22 activates NF- κ B signaling in glioblastoma by accelerating the degradation of I κ B α [J]. *Cell Death & Differentiation*, 2021, 28(1): 367–381.
- [25] YI G, LI H, LIU M, et al. Soybean protein-derived peptides inhibit inflammation in LPS-induced H9C2 macrophages via the suppression of TLR4-mediated MAPK-JNK and NF- κ B activation[J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2020, 44(8): e13289.
- [26] LIU S, KANG W, MAO X, et al. Melatonin mitigates aflatoxin B1-induced liver injury via modulation of gut microbiota/intestinal FXR/liver TLR4 signaling axis in mice[J]. *Journal of Pineal Research*, 2022, 73(2): e12812.
- [27] JIANG W Y, HUO J Y, WANG S C, et al. Trimethylamine N-oxide facilitates the progression of atrial fibrillation in rats with type 2 diabetes by aggravating cardiac inflammation and connexin remodeling[J]. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 2022, 78(4): 855–867.
- [28] 史留阳, 谭丹妮, 刘秀, 等. 白虎人参汤合枳实薤白桂枝汤对糖尿病心肌病 MKR 小鼠心肌细胞焦亡的影响[J]. *湖南中医药大学学报*, 2023, 43(4): 591–597.
- [29] JOUBERT M, MANRIQUE A, CARIOU B, et al. Diabetes-related cardiomyopathy: The sweet story of glucose overload from epidemiology to cellular pathways[J]. *Diabetes & Metabolism*, 2019, 45(3): 238–247.
- [30] XUE Y, ZHANG J, KE J, et al. LncGBP9 knockdown alleviates myocardial inflammation and apoptosis in mice with acute viral myocarditis via suppressing NF- κ B signaling pathway[J]. *Inflammation Research*, 2022, 71(12): 1559–1576.