

·实验研究·

本文引用: 黄娟, 王一阳, 肖凡, 刘秀, 喻嵘. 左归降糖舒心方调控 TLR4/NF- κ B 通路抑制糖尿病心肌病小鼠心肌纤维化的机制研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2024, 44(5): 729-736.

左归降糖舒心方调控 TLR4/NF- κ B 通路抑制糖尿病 心肌病小鼠心肌纤维化的机制研究

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) 信号通路探讨左归降糖舒心方对糖尿病心肌病 MKR 小鼠心肌纤维化及炎症因子的影响。方法 以 8 周龄雄性 MKR 小鼠为实验对象, 采用高脂饮食联合腹腔注射链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)40 mg/kg 构建糖尿病心肌病模型, 随机分为中药高剂量组[33.67 g/(kg·d)左归降糖舒心方 2 g/mL]、中药低剂量组[16.84 g/(kg·d)左归降糖舒心方 2 g/mL]、西药联合组[0.23 g/(kg·d)二甲双胍联合 1.5 mg/(kg·d)依那普利]和模型组(等容量蒸馏水); 另设 FVB 小鼠为空白对照组(等容量蒸馏水)。每组 10 只, 连续给药 8 周后取材。收集尾静脉血液检测空腹血糖水平; 采用 HE、Masson 染色观察心肌病理改变, 电镜观察心肌组织超微结构变化; 采用 ELISA 检测小鼠血清肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)及白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)含量; 采用 Western blot 法检测 TLR4、NF- κ B p56、p-NF- κ B p56/NF- κ B p56 蛋白表达情况; RT-qPCR 及 Western blot 检测小鼠心肌组织 I 型胶原(collagen type I, Collagen I)、III 型胶原(collagen type III, Collagen III)及 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)的表达水平。结果 与空白对照组比较, 模型组小鼠空腹血糖及血清中 TNF- α 、IL-1 β 含量增高($P<0.01$); 心肌细胞结构紊乱, 胶原含量增加, 心肌细胞重度退行性变; 心肌组织中 TLR4、NF- κ B p56、p-NF- κ B p56/NF- κ B p56 蛋白表达上调($P<0.01$), Collagen I、Collagen III、 α -SMA mRNA 及蛋白表达增加($P<0.05$, $P<0.01$), 中药高剂量组小鼠心肌组织 Collagen I、Collagen III 蛋白表达增加($P<0.01$)。与模型组比较, 中药高、低剂量组和西药联合组小鼠空腹血糖及血清中 TNF- α 、IL-1 β 含量均降低($P<0.01$); 心肌结构改善, 胶原沉积减少; 心肌组织中 TLR4、NF- κ B p56、p-NF- κ B p56/NF- κ B p56 蛋白表达下调($P<0.01$), Collagen I、Collagen III、 α -SMA 蛋白及 mRNA 表达下调($P<0.01$)。与西药联合组比较, 中药低剂量组小鼠空腹血糖及血清中 TNF- α 、IL-1 β 含量均升高($P<0.01$), 心肌结构无明显改善, 胶原沉积无显著减少; 心肌组织中 TLR4、NF- κ B p56、p-NF- κ B p56/NF- κ B p56 蛋白表达上调($P<0.01$), Collagen I、Collagen III、 α -SMA 蛋白及 mRNA 表达上调($P<0.01$)。结论 左归降糖舒心方能抑制心肌炎性反应、改善心肌细胞结构, 其作用机制可能与调控 TLR4/NF- κ B 通路、下调细胞炎症因子表达、抑制心肌纤维化有关。

[关键词] 左归降糖舒心方; 心肌纤维化; 炎症反应; TLR4/NF- κ B 通路; MKR 鼠; 糖尿病

[中图分类号] R285.5

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2024.05.003

Mechanism of Zuogui Jiangtang Shuxin Formula in inhibiting myocardial fibrosis in mice with diabetic cardiomyopathy by regulating TLR4/NF- κ B 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;

[收稿日期] 2023-11-01

[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); 湖南省自然科学基金医学行业联合基金项目(2024JJ9436)。

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

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

[Abstract] Objective To investigate the effects of Zuogui Jiangtang Shuxin Formula (ZGJTSXF) on myocardial fibrosis and inflammatory factors in MKR mice with diabetic cardiomyopathy (DCM) based on the Toll-like receptor 4 (TLR4)/nuclear factor- κ B (NF- κ B) signaling pathway. **Methods** Male MKR mice aged 8 weeks were used as experimental subjects. A diabetic cardiomyopathy model was established using a high-fat diet combined with intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ) 40 mg/kg. The mice were randomized into high- [33.67 g/(kg·d)] and low-dose [16.84 g/(kg·d)] ZGJTSXF groups (containing raw medicinals 2 g/mL), western medicine combination group [metformin 0.23 g/(kg·d) combined with enalapril 1.5 mg/(kg·d)], and model group (equal volume of distilled water); additionally, FVB mice were set as the blank control group (equal volume of distilled water). Each group consisted of 10 mice and samples were collected after 8 weeks of continuous medication. Tail vein blood was collected to test fasting blood glucose levels. Myocardial pathological changes were observed using HE and Masson's trichrome staining, and ultrastructural changes in the myocardial tissue were examined with electron microscopy. ELISA was used to measure the content of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin 1 β (IL-1 β) of the mice serum. Western blot was used to check the protein expressions of TLR4, NF- κ B p56, and p-NF- κ B p56/NF- κ B p56. RT-qPCR and Western blot were employed to measure the expression levels of collagen type I (Collagen I), collagen type III (Collagen III), and α -smooth muscle actin (α -SMA) in the myocardial tissue of mice. **Results** Compared with the blank control group, the model group showed increased fasting blood glucose and serum levels of TNF- α and IL-1 β ($P < 0.01$), accompanied by myocardial cell structural disorder, increased collagen content, and severe myocardial cell degeneration; the protein expressions of TLR4, NF- κ B p56, and p-NF- κ B p56/NF- κ B p56 were upregulated in the myocardial tissue ($P < 0.01$), and the mRNA and protein expression levels of Collagen I, Collagen III, and α -SMA were elevated ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the model group, the high- and low-dose ZGJTSXF groups and the western medicine combination group showed reductions in fasting blood glucose and serum levels of TNF- α and IL-1 β ($P < 0.01$), improved myocardial structure, and decreased collagen deposition; the protein expressions of TLR4, NF- κ B p56, and p-NF- κ B p56/NF- κ B p56 were downregulated in the myocardial tissue ($P < 0.01$), as well as the protein and mRNA expressions of Collagen I, Collagen III, and α -SMA ($P < 0.01$). Compared with the western medicine combination group, the low-dose ZGJTSXF group exhibited increased fasting blood glucose and serum levels of TNF- α and IL-1 β ($P < 0.01$), with no noticeable improvement in myocardial structure and no obvious reduction in collagen deposition; the protein expressions of TLR4, NF- κ B p56, and p-NF- κ B p56/NF- κ B p56 were upregulated in the myocardial tissue ($P < 0.01$), along with increased protein and mRNA expressions of Collagen I, Collagen III, and α -SMA ($P < 0.01$). **Conclusion** ZGJTSXF may inhibit myocardial inflammatory response and improve myocardial cell structure. Its mechanism of action may be related to the regulation of TLR4/NF- κ B pathway, down-regulation of cellular inflammatory factor expression, and inhibition of myocardial fibrosis.

[Keywords] Zuogui Jiangtang Shuxin Formula; myocardial fibrosis; inflammatory response; Toll-like receptor 4/nuclear factor- κ B pathway; MKR mice; diabetes

糖尿病心肌病(diabetic cardiomyopathy, DCM)是一种临床常见的独立于冠心病及高血压的特异性心肌病,是糖尿病患者的重要致死原因之一^[1-2]。近年来研究发现,心肌成纤维细胞过度增殖导致胶原纤维过度沉积,引起心肌纤维化及心肌重构,影响DCM进程和预后^[3-5]。炎症因子可诱导成纤维细胞异常增殖分化,而炎症导致的级联损伤效应可诱导细胞凋亡及焦亡,在损伤修复的过程中,形成心肌纤维化,而纤维化进程又可进一步促进多种炎症因子如白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)及肿瘤坏死

因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)等释放,诱导心肌缺血的发生^[6]。Toll样受体4(Toll-like receptor 4, TLR4)/核因子 κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)作为与炎症反应关系密切的信号通路,参与许多炎症性疾病的发生与发展^[7],也介导心肌炎症的发生与发展^[8]。TLR4/NF- κ B通路通过调节炎症反应影响DCM心肌纤维化,因此,针对该通路的靶向抑制成为防治DCM的研究关注点^[9]。DCM归属于中医学“消渴”并发“胸痹”“心痛”等范畴,本课题组认为“虚、毒、瘀”是2型糖尿病及其慢性并发症发生发展

的关键中医病机,采用滋阴益气、活血解毒的左归降糖舒心方治疗糖尿病心血管疾病取得显著疗效^[10]。结合前期实验研究,左归降糖舒心方可明显改善DCM模型小鼠的心肌纤维化、促进抗凋亡因子B细胞淋巴瘤-2(B-cell leukemia/lymphoma-2, Bcl-2)的表达、抑制促凋亡因子相关X蛋白(Bcl-2-associated X protein, Bax)和胱天蛋白酶-9表达,从而抑制心肌细胞损伤,但其具体作用机制尚不明确^[11]。本实验从调控TLR4/NF- κ B通路角度出发,探讨其与DCM中炎症机制及心肌纤维化的关联性,并以左归降糖舒心方进行干预,为临床诊疗DCM寻找新的治疗靶点和治疗药物。

1 材料

1.1 实验动物

8周龄MKR转基因糖尿病小鼠,体质量20~25 g,自美国国立卫生研究院引进后自然交配繁殖用于实验研究[SYXK(湘)2019-0009];FVB小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号:SCXK(湘)2019-0003。动物饲养于湖南中医药大学第一附属医院SPF级实验动物中心(伦理审批编号ZY-FY20210728),温度(24 \pm 2) $^{\circ}$ C,湿度50% \pm 10%,12 h/12 h人工光照/黑暗循环。

1.2 药物

左归降糖舒心方组成:人参18 g,黄芪18 g,麦冬12 g,山茱萸12 g,生地黄15 g,黄连6 g,丹参9 g,葛根12 g,山楂9 g。中药均采购于湖南中医药大学第一附属医院门诊中药房,由湖南中医药大学药学院吴勇军副教授鉴定为正品。制备方法:药材浸泡0.5 h,8倍量水煎煮1 h,过滤保留药液;6倍水煮1 h,合并2次滤液,于旋转蒸发器浓缩至含生药量为2 g/mL的药液,置于4 $^{\circ}$ C冰箱备用。

盐酸二甲双胍片(浙江亚太药业股份有限公司,国药准字:H33020106,批号:1170522,规格:0.25 g/片);马来酸依那普利片(江苏制药股份有限公司,国药准字:H32026568,批号:17061412,规格:5 mg/片)。

1.3 主要试剂与仪器

链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)(美国Sigma公司,批号:S17049);Trizol总RNA抽提试剂(美国Life Technologies公司,批号:251804);小鼠IL-1 β 、TNF- α ELISA检测试剂盒(江苏晶美生物科技有限公司,批号:JM-02323M1、JM-02415M2);兔抗TLR4多克隆抗体、兔抗NF- κ B p56单克隆抗体、兔抗p-NF- κ B p56单克隆抗体、兔抗I型胶原(collagen type I, Col-

lagen I)单克隆抗体、兔抗III型胶原(collagen type III, Collagen III)单克隆抗体、兔抗 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)单克隆抗体(英国Abcam公司,批号:ab13556、ab207297、ab239882、ab270993、ab184993、ab124964)。

电泳仪、转膜仪(北京六一生物科技有限公司,型号:DYY-6C、DYCZ-40D);台式高速冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司,型号:H1650R);化学发光成像系统(上海勤翔科学仪器有限公司,型号:ChemiScope6100);酶标仪(美国BioTek公司,型号:ELx800);凝胶成像系统(美国Bio-Rad公司,型号:ChemiDoc XRS+)。

2 方法

2.1 模型建立、分组及给药

8周龄MKR小鼠采用高脂饲料喂养,FVB小鼠予以普通饲料喂养。4周后对MKR小鼠进行STZ腹腔注射以加速成模,实验前一天禁食不禁水8 h。将STZ溶于0.1 mmol/L柠檬酸钠缓冲液(pH=4.0),按40 mg/kg剂量行腹腔注射,1次/d,连续3 d。STZ注射后第3天测小鼠空腹血糖,空腹血糖 \geq 11.1 mmol/L提示2型糖尿病制备成功。继续高脂喂养4周后观察小鼠心肌组织内胶原含量明显增多且胶原纤维粗大、排列紊乱,肌纤维断裂且有炎症细胞浸润,提示DCM模型制备成功^[12]。

50只MKR小鼠造模,造模过程中死亡4只。造模成功46只,随机选取40只分为模型组、西药联合组、中药高剂量组及中药低剂量组,每组10只。另取10只FVB小鼠为空白对照组。

按人和动物体表面积^[13]的等效剂量系数折算法,选用60 kg成人用量换算,其中中药高剂量组以左归降糖舒心方33.67 g/(kg \cdot d)灌胃;中药低剂量组以左归降糖舒心方16.84 g/(kg \cdot d)灌胃;西药联合组予二甲双胍0.23 g/(kg \cdot d)联合依那普利1.5 mg/(kg \cdot d)灌胃。空白对照组、模型组以等体积蒸馏水灌胃。给药均持续8周,每天1次。

2.2 血糖水平检测

按照分组干预8周后,收集小鼠尾静脉血液,用血糖仪检测空腹血糖水平。

2.3 光镜下观察小鼠心肌组织病理形态

取心肌组织,多聚甲醛固定,经脱水、石蜡包埋、切片、脱蜡至水、染色、贴片,采用HE及Masson染色,观察心肌组织形态结构及胶原含量。

2.4 透射电镜观察心肌组织结构

取心肌组织置于装有电镜固定液的培养皿中,用手术刀切割成 1 mm^3 的小组织块。再将切割好的小组织块转移至装有新的电镜固定液的EP管内继续固定;0.1 mmol/L磷酸缓冲液(pH=7.4)漂洗3次,每次15 min。采用0.1 mmol/L磷酸缓冲液(pH=7.4)配制的1%锇酸避光室温固定2 h,0.1 mmol/L磷酸缓冲液(pH=7.4)漂洗3次,每次15 min。将组织依次于30%、50%、70%、80%、95%、100%、100%乙醇中脱水,每次20 min,100%丙酮脱水两次,每次15 min。以丙酮:812包埋剂=1:1比例于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 渗透2~4 h,以丙酮:812包埋剂=1:2比例于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 渗透过夜,纯812包埋剂 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 包埋5~8 h;将纯812包埋剂倒入包埋板,将样品插入包埋板后 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 烤箱过夜。包埋板放于 $60\text{ }^\circ\text{C}$ 烤箱聚合48 h,取出树脂块备用。超薄切片机切取60~80 nm超薄切片树脂块,150目芳华膜铜网捞片。铜网于2%醋酸铀饱和乙醇溶液避光染色8 min;70%乙醇清洗3次;超纯水清洗3次;2.6%枸橼酸铅溶液避开二氧化碳染色8 min;超纯水清洗3次,滤纸稍吸干。铜网切片放入铜网盒内室温干燥过夜。透射电子显微镜下观察,采集图像分析。

2.5 ELISA法检测血清TNF- α 、IL-1 β 含量

实验步骤严格按照ELISA试剂盒说明书进行操作,标准品加样后,设空白孔、待测样品孔。于待测样品孔中先加样品稀释液40 μL ,然后再加待测样品10 μL ,每孔加入酶标试剂100 μL ,封板后置于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 温育60 min。弃去液体,甩干后每孔加入洗涤液,静置30 s后弃去,重复5次后拍干。各孔先后加入显色剂50 μL ,轻轻振荡混匀, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 避光显色15 min,于450 nm波长依序测量各孔的吸光度,于酶标仪下进行TNF- α 、IL-1 β 含量检测。

2.6 Western blot法检测TLR4、NF- κB p65、p-NF- κB p65、Collagen I、Collagen III及 α -SMA蛋白表达

剪取适量心肌组织,用冰预冷PBS洗组织,加入300 μL RIPA裂解液,于生物样品均质仪中反复研磨,根据蛋白定量的结果,于第一孔点入蛋白标准品2 μL ,其他每孔上样10 μL 已变性蛋白;开始电泳,电泳恒定电压75 V,时间为130 min,待溴酚蓝电泳至胶底部时终止电泳;电泳结束后电转移至硝酸纤维素膜,4 $^\circ\text{C}$ 封闭过夜,封闭后加入TLR4(1:1 000)、NF- κB p65(1:1 000)、p-NF- κB p65(1:1 000)、Collagen I(1:1 000)、Collagen III(1:1 000)、 α -SMA(1:2 000)一抗,室温孵育30 min。再加入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。使用ECL化学发光液与膜孵育1 min,在暗盒内与X射线胶片曝光20 min,显影冲洗。采用Quantity One专业灰度分析软件进行数据分析。

2.7 RT-qPCR检测Collagen I、Collagen III、 α -SMA mRNA表达

取新鲜的心脏组织50 mg,充分研磨均匀后加入Trizol总RNA抽提试剂1 mL,冰浴匀浆,按说明书提取总RNA,每组取总RNA 1 μg 逆转录成cDNA,按照实验指导书进行PCR反应。PCR反应条件为 $95\text{ }^\circ\text{C}$ 预变性60 s, $95\text{ }^\circ\text{C}$ 变性20 s, $60\text{ }^\circ\text{C}$ 退火60 s,进行40个循环。以GAPDH为内参基因,使用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算mRNA表达水平。引物由上海生工生物工程有限公司设计合成,引物序列见表1。

表1 引物序列

引物	序列(5'-3')	长度/bp
Collagen I	正向 CTGGTGCTCGCGGTAACGAT	216
	反向 CAGCACCAGGTTTCCAGCA	
Collagen III	正向 ACGTAAGCACTGGTGGACAG	98
	反向 CAGGAGGCCATAGCTGAAC	
α -SMA	正向 GCCCTGAAGAGCATCCGAC	179
	反向 CCAGAGTCCAGCACAATACCAGT	
GAPDH	正向 GCGACTTCAACAGCAACTCCC	122
	反向 CACCCTGTTGCTGTAGCCGTA	

2.8 统计学方法

采用SPSS 22.0进行统计处理。计量资料符合正态分布和方差齐性者,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;不符合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 左归降糖舒心方对DCM小鼠血糖的影响

与空白对照组相比,模型组、中药低剂量组小鼠空腹血糖升高($P<0.01$)。与模型组相比,各用药组小鼠血糖降低($P<0.01$)。与西药联合组比较,中药低剂量组小鼠血糖升高($P<0.01$)。详见表2。

3.2 左归降糖舒心方对DCM小鼠心肌组织病理形态的影响

HE染色、Masson染色结果显示,空白对照组小鼠心肌细胞形态正常,心肌间隙紧密,细胞间胶原沉积较少,未见明显炎性浸润;模型组小鼠心肌细胞肥大增粗,细胞质、细胞核分离,细胞间隙增大,可见较多

表2 各组小鼠空腹血糖比较($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	空腹血糖/(mmol/L)
空白对照组	3.501±1.153
模型组	12.734±1.305 ^{##}
中药低剂量组	8.267±1.007 ^{##**$\Delta\Delta$}
中药高剂量组	5.033±0.665 ^{**}
西药联合组	4.053±0.778 ^{**}

注:与空白对照组比较,^{##} $P<0.01$;与模型组比较,^{**} $P<0.01$;与西药联合组比较, ^{$\Delta\Delta$} $P<0.01$ 。

炎症浸润,心肌纤维排列紊乱,胶原含量明显增加。与模型组比较,各药物组心肌细胞与心肌纤维排列均有不同程度改善,胶原沉积及炎症浸润明显减少,细胞排列较整齐,纤维相对完整,其中,以中药高剂量组及西药联合组改善较为明显。详见图1。

3.3 左归降糖舒心方对 DCM 小鼠心肌组织超微结构的影响

空白对照组见心肌细胞轻度退行性变,胞内基质溶解、略显稀疏,肌原纤维丝结构排列紧密;细胞核呈不规则形,核膜完整,核周隙未见增宽,染色质均匀;线粒体大小不均、异形,多数膜完整,Z线、H带结构尚可、清晰,局部断裂。模型组心肌细胞重度退行性变,可见胞内基质大面积溶解、稀疏,细胞器减少、散乱分布,肌纤维大面积断裂、退化,肌原纤维丝结构排列紊乱、稀疏。各药物组心肌细胞中度退行性病变,细胞器减少、分布不均,肌纤维局部断裂、退化,肌原纤维丝结构排列紧密、融合,肌节结构多

见溶解、不对称,明暗带结构模糊,细胞核呈不规则形,核膜完整,核周隙未见增宽,染色质不均、少量凝集,其中,以中药高剂量组及西药联合组改善状态更为明显。详见图2。

3.4 左归降糖舒心方对 DCM 小鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 水平的影响

与空白对照组相比,其余各组小鼠血清中的TNF- α 、IL-1 β 含量增加($P<0.01$)。与模型组相比,各用药组小鼠血清中的TNF- α 、IL-1 β 含量降低($P<0.01$)。与西药联合组比较,中药低剂量组TNF- α 、IL-1 β 含量增加($P<0.01$)。详见表3。

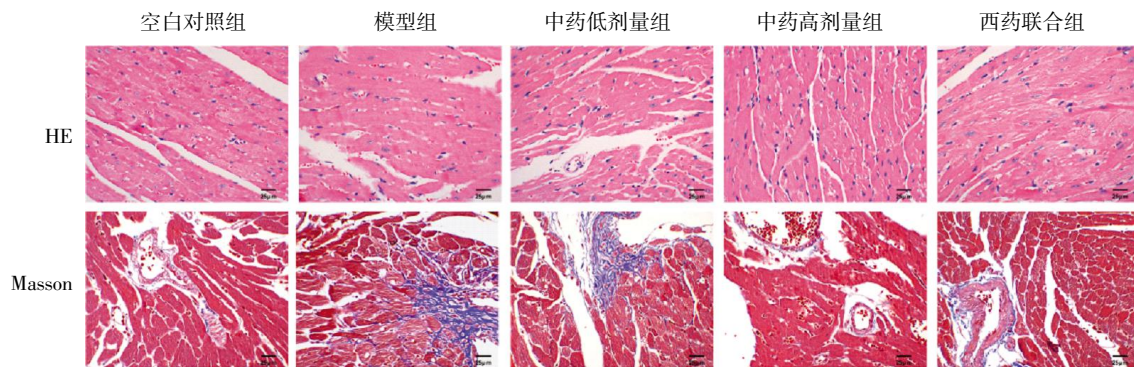
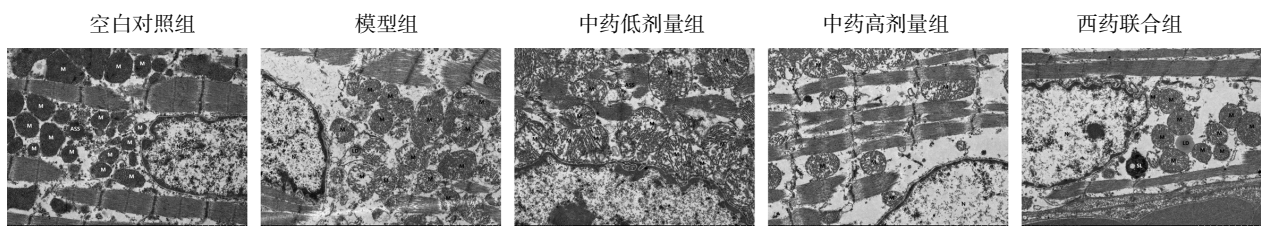
表3 各组小鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 水平比较($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	TNF- α /(pg/mL)	IL-1 β /(pg/mL)
空白对照组	132.732±8.709	21.178±7.117
模型组	498.212±12.525 ^{##}	75.126±8.383 ^{##}
中药低剂量组	398.587±11.615 ^{##**$\Delta\Delta$}	59.726±9.276 ^{##**$\Delta\Delta$}
中药高剂量组	289.127±9.352 ^{**}	43.601±10.332 ^{##**}
西药联合组	267.892±11.392 ^{##**}	38.823±9.891 ^{##**}

注:与空白对照组比较,^{##} $P<0.01$;与模型组比较,^{**} $P<0.01$;与西药联合组比较, ^{$\Delta\Delta$} $P<0.01$ 。

3.5 左归降糖舒心方对 DCM 小鼠 TLR4、NF- κ B p65、p-NF- κ B p65/NF- κ B p65 蛋白表达的影响

与空白对照组相比,其余各组小鼠心肌组织TLR4、NF- κ B p65、p-NF- κ B p65/NF- κ B p65蛋白表达增加($P<0.01$)。与模型组相比,各用药组TLR4、NF-

图1 各组小鼠心肌组织 HE 及 Masson 染色比较($\times 400$)图2 各组小鼠心肌组织超微结构比较($\times 8000$)

注:N代表细胞核;M代表线粒体;Z代表Z线;H代表H带。

κB p65、p-NF-κB p65/NF-κB p65 蛋白表达降低 ($P<0.01$)。与西药联合组比较,中药低剂量组 TLR4、NF-κB p65、p-NF-κB p65/NF-κB p65 蛋白表达增加 ($P<0.01$)。详见图 3、表 4。

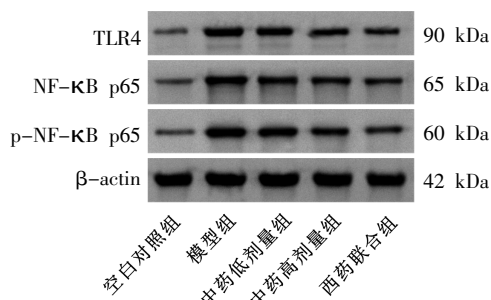


图 3 各组小鼠心肌组织 TLR4、NF-κB p65、p-NF-κB p65/NF-κB p65 蛋白表达条带图

3.6 左归降糖舒心方对 DCM 小鼠 Collagen I、Collagen III 及 α-SMA 蛋白表达的影响

与空白对照组相比,模型组、中药低剂量组及西药联合组小鼠心肌组织 Collagen I、Collagen III 及 α-SMA 蛋白表达增加 ($P<0.05$, $P<0.01$), 中药高剂量组小鼠心肌组织 Collagen I、Collagen III 蛋白表达增加 ($P<0.01$)。与模型组相比,各用药组 Collagen I、Collagen III 及 α-SMA 蛋白表达降低 ($P<0.01$)。与西

药联合组比较,中药低剂量组 Collagen I、Collagen III 及 α-SMA 蛋白表达增加 ($P<0.01$)。详见图 4、表 5。

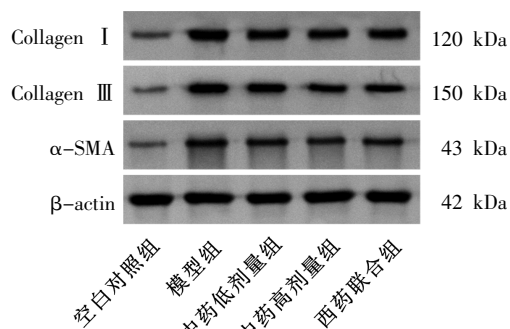


图 4 各组小鼠心肌组织 Collagen I、Collagen III、α-SMA 蛋白条带图

3.7 左归降糖舒心方对 DCM 小鼠 Collagen I、Collagen III、α-SMA mRNA 表达的影响

与空白对照组比较,其余各组心肌组织 Collagen I、Collagen III、α-SMA mRNA 表达量增加 ($P<0.01$)。与模型组比较,各用药组小鼠心肌组织中 Collagen I、Collagen III、α-SMA mRNA 表达量下降 ($P<0.01$)。与西药联合组比较,中药低剂量组 Collagen I、Collagen III、α-SMA mRNA 表达量增加 ($P<0.01$)。详见表 6。

表 4 各组小鼠心肌组织 TLR4、NF-κB p65、p-NF-κB p65/NF-κB p65 蛋白表达比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

组别	TLR4	NF-κB p65	p-NF-κB p65/NF-κB p65
空白对照组	0.216±0.025	0.261±0.026	0.516±0.076
模型组	0.893±0.064 [#]	0.943±0.069 [#]	0.874±0.048 [#]
中药低剂量组	0.781±0.032 ^{#**ΔΔ}	0.832±0.022 ^{#**ΔΔ}	0.775±0.018 ^{#**ΔΔ}
中药高剂量组	0.643±0.076 ^{#**}	0.636±0.051 ^{#**}	0.639±0.021 ^{#**}
西药联合组	0.606±0.051 ^{#**}	0.631±0.047 ^{#**}	0.621±0.037 ^{#**}

注:与空白对照组比较,[#] $P<0.01$;与模型组比较,^{**} $P<0.01$;与西药联合组比较,^{ΔΔ} $P<0.01$ 。

表 5 各组小鼠心肌组织 Collagen I、Collagen III、α-SMA 蛋白表达比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

组别	Collagen I	Collagen III	α-SMA
空白对照组	0.197±0.031	0.243±0.035	0.203±0.042
模型组	0.833±0.061 [#]	0.887±0.047 [#]	0.777±0.067 [#]
中药低剂量组	0.603±0.067 ^{#**ΔΔ}	0.703±0.051 ^{#**ΔΔ}	0.533±0.051 ^{#**ΔΔ}
中药高剂量组	0.397±0.031 ^{#**}	0.443±0.049 ^{#**}	0.277±0.045 ^{**}
西药联合组	0.383±0.057 ^{#**}	0.417±0.061 ^{#**}	0.332±0.055 ^{#**}

注:与空白对照组比较,[#] $P<0.05$,[#] $P<0.01$;与模型组比较,^{**} $P<0.01$;与西药联合组比较,^{ΔΔ} $P<0.01$ 。

表 6 各组小鼠心肌组织 Collagen I、Collagen III、α-SMA mRNA 表达比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

组别	Collagen I mRNA	Collagen III mRNA	α-SMA mRNA
空白对照组	1.001±0.039	1.006±0.131	1.003±0.096
模型组	15.983±0.988 [#]	16.509±1.029 [#]	24.672±2.434 [#]
中药低剂量组	11.773±1.102 ^{#**ΔΔ}	12.997±1.894 ^{#**ΔΔ}	15.403±2.374 ^{#**ΔΔ}
中药高剂量组	7.785±0.307 ^{#**}	9.083±1.283 ^{#**}	8.332±0.553 ^{#**}
西药联合组	8.974±1.002 ^{#**}	8.175±1.072 ^{#**}	7.934±0.439 ^{#**}

注:与空白对照组比较,[#] $P<0.01$;与模型组比较,^{**} $P<0.01$;与西药联合组比较,^{ΔΔ} $P<0.01$ 。

4 讨论

据最新国际糖尿病联盟的数据统计,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7亿人^[14],糖尿病心血管并发症是糖尿病患者的主要死亡原因^[15-16]。在DCM的发生发展过程中,持续糖脂代谢紊乱和活性氧(reactive oxygen species, ROS)过度释放触发炎症反应。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,同时活化经典的下流炎症信号转录因子NF- κ B,从而上调下游IL-6、IL-1 β 、TNF- α 等促炎因子的表达^[17-19]。炎症的级联反应可引起血管内皮细胞损伤、心肌细胞凋亡等病理状态,影响心脏收缩功能^[20]。正常状态下,细胞外基质中存在Collagen I、Collagen III的合成,促使心肌细胞排列整齐、保持心室壁强度,从而维持心肌组织结构的完整性^[21-22]。研究发现,TLR4/NF- κ B信号通路可调节基质金属蛋白酶/基质金属蛋白酶组织抑制物水平,降低蛋白水解酶含量,引起胶原在细胞外基质沉积^[23]。同时Collagen I、Collagen III的异常合成及比例失常可引起成纤维细胞增殖活化^[24-26]。在炎症因子的持续介导下, α -SMA表达上调,促进纤维连接蛋白和纤维状胶原蛋白合成,激活心肌成纤维细胞的异常增殖及心肌纤维化过程,进一步引起心室重塑,最终诱发慢性心力衰竭^[27]。

DCM的临床表现归属于中医学“消渴”并发“胸痹”“心痛”等范畴。中医学认为,DCM病因病机为先天禀赋不足,后天失于调摄、劳累过度、久病耗伤、年老体衰,伤及于脾肾,脾主运化转输功能失司,肾主封藏失常,机体气机运化失常,脏腑气血阴阳失调,导致气滞、血瘀、痰浊闭阻心脉,久而久之,损及心阳,可成心衰。在课题组前期研究的基础上,依据DCM的基本病因病机,治法以“滋阴益气以固本,活血解毒以治标”为要,故实验中选择左归降糖舒心方进行干预^[28-29]。方中黄芪、人参、山茱萸益气健脾补肾,地黄、麦冬、葛根清热养阴生津,丹参活血化瘀,黄连清热解毒,山楂行气散瘀,诸药合用,共奏滋阴益气、活血解毒之功效,药味功效切合DCM病因病机。

本研究使用的MKR小鼠为良好的2型糖尿病模型鼠,其具有骨骼肌特异性胰岛素样生长因子-1受体功能缺失特性^[30],同时,采用STZ及高脂饲料喂养促进DCM模型的构建。研究结果显示,与空白对照组比较,模型组小鼠血糖水平明显增高;HE染色及Masson染色显示心肌细胞肥大增粗,结构紊乱,

间隙增大,可见明显炎性浸润,局部出现变性坏死;胶原含量明显增加,胶原纤维粗大;小鼠心肌组织中 α -SMA、Collagen I、Collagen III mRNA及蛋白表达增加,心肌纤维化病理改变明显;小鼠血清中炎症因子TNF- α 、IL-1 β 含量及心肌组织TLR4、NF- κ B p65、p-NF- κ B p65/NF- κ B p65蛋白表达显著增加,提示DCM模型小鼠炎症因子大量释放;心肌组织TLR4、NF- κ B p65、p-NF- κ B p65/NF- κ B p65蛋白表达显著增加,TLR4/NF- κ B通路激活,并参与了DCM心肌炎症反应。左归降糖舒心方干预8周后,小鼠心肌组织的病理变化有明显改善,炎性浸润及胶原沉积明显减少;血清中TNF- α 、IL-1 β 含量降低,小鼠心肌组织TLR4、NF- κ B p65、p-NF- κ B p65/NF- κ B p65蛋白表达降低,表明左归降糖舒心方可抑制TLR4/NF- κ B通路激活,降低炎症因子水平,抑制炎症损伤。同时,Western blot及RT-qPCR分析结果进一步表明,左归降糖舒心方可能通过抑制 α -SMA、Collagen I、Collagen III的表达,干预心肌纤维化的进程。

综上所述,本研究探究了左归降糖舒心方对MKR小鼠心肌纤维化及炎症反应的作用及调控机制。结果显示,左归降糖舒心方可有效抑制TLR4/NF- κ B通路,下调炎症因子及 α -SMA、Collagen I、Collagen III表达,减少胶原蛋白的沉积,抑制心肌细胞炎症反应及纤维化过程,发挥干预DCM的作用。但关于中药的最佳用药剂量及靶向调节机制尚不明确,有待进一步研究分析。

参考文献

- [1] KNAPP M, TU X, WU R X. Vascular endothelial dysfunction, a major mediator in diabetic cardiomyopathy[J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2019, 40(1): 1-8.
- [2] 李文珊, 易晓利, 卜献春, 等. 滋肾通脉饮对糖尿病心脏病大鼠糖脂代谢及氧化应激的影响[J]. *中医药导报*, 2023, 29(1): 12-18.
- [3] TAN Y, ZHANG Z G, 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.
- [4] KHAN S, AHMAD S S, KAMAL M A. Diabetic cardiomyopathy: From mechanism to management in a nutshell[J]. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders Drug Targets*, 2021, 21(2): 268-281.
- [5] 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.
- [6] LUO W, LIN K, HUA J Y, et al. Schisandrin B attenuates dia-

- betic cardiomyopathy by targeting MyD88 and inhibiting MyD88-dependent inflammation[J]. *Advanced Science*, 2022, 9(31): e2202590.
- [7] 孙丽萍, 徐文娟. 中药内服外熨对肝肾亏虚型膝骨关节炎患者炎性致痛因子、TLR4及NF- κ B水平的影响[J]. *湖北中医药大学学报*, 2023, 25(6): 80-82.
- [8] YOUSSEF M E, ABDELRAZEK H M, MOUSTAFA Y M. Cardioprotective role of GTS-21 by attenuating the TLR4/NF- κ B pathway in streptozotocin-induced diabetic cardiomyopathy in rats[J]. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 2021, 394(1): 11-31.
- [9] ZHAO J Y, LIU B, LI C. Knockdown of long noncoding RNA GAS5 protects human cardiomyocyte-like AC16 cells against high glucose-induced inflammation by inhibiting miR-21-5p-mediated TLR4/NF- κ B signaling[J]. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 2020, 393(8): 1541-1547.
- [10] HUANG Y L, XIANG Q, ZOU J J, et al. Zuogui Jiangtang Shuxin formula Ameliorates diabetic cardiomyopathy mice via modulating gut-heart axis[J]. *Frontiers in Endocrinology*, 2023, 14: 1106812.
- [11] 苏丽清, 喻嵘, 吴勇军, 等. 左归降糖舒心方对糖尿病心肌病 MKR 鼠心肌细胞损伤和凋亡的影响[J]. *世界科学技术: 中医药现代化*, 2022, 24(2): 554-562.
- [12] 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.
- [13] NAIR A, MORSY M A, JACOB S. Dose translation between laboratory animals and human in preclinical and clinical phases of drug development[J]. *Drug Development Research*, 2018, 79(8): 373-382.
- [14] AVAGIMYAN A, POPOV S, SHALNOVA S. The pathophysiological basis of diabetic cardiomyopathy development[J]. *Current Problems in Cardiology*, 2022, 47(9): 101156.
- [15] WANG H C, WANG L J, HU F L, et al. Neuregulin-4 attenuates diabetic cardiomyopathy by regulating autophagy via the AMPK/mTOR signalling pathway[J]. *Cardiovascular Diabetology*, 2022, 21(1): 205.
- [16] CHEN D D, GENG Y, DENG Z W, et al. Inhibition of TLR4 alleviates heat stroke-induced cardiomyocyte injury by down-regulating inflammation and ferroptosis[J]. *Molecules*, 2023, 28(5): 2297.
- [17] PAN L F, NIU Z Q, GAO Y X, et al. Silencing of CREB inhibits HDAC2/TLR4/NF- κ B cascade to relieve severe acute pancreatitis-induced myocardial injury[J]. *Inflammation*, 2021, 44(4): 1565-1580.
- [18] DU H B, DING L Q, ZENG T, et al. LncRNA SNHG15 modulates ischemia-reperfusion injury in human AC16 cardiomyocytes depending on the regulation of the miR-335-3p/TLR4/NF- κ B pathway[J]. *International Heart Journal*, 2022, 63 (3): 578-590.
- [19] AKSEH S, NEMATI M, ZAMANI-GHAREHCHAMANI E, et al. Amnion membrane proteins attenuate LPS-induced inflammation and apoptosis by inhibiting TLR4/NF- κ B pathway and repressing microRNA-155 in rat H9c2 cells[J]. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 2021, 43(4): 487-494.
- [20] ZHOU T, XIANG D K, LI S N, et al. MicroRNA-495 ameliorates cardiac microvascular endothelial cell injury and inflammatory reaction by suppressing the NLRP3 inflammasome signaling pathway[J]. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2018, 49 (2): 798-815.
- [21] 熊霞军, 胡思远, 钟森杰, 等. 基于 miR-378 探讨丹红注射液干预压力超负荷心力衰竭大鼠心肌纤维化机制[J]. *湖南中医药大学学报*, 2023, 43(3): 383-390.
- [22] PENG C, ZHANG Y X, LANG X Y, 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.
- [23] YANAN S, BOHAN L, SHUAIFENG S, et al. Inhibition of Mogroside III on isoproterenol-induced myocardial fibrosis through the TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway[J]. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 2023, 26(1): 114-120.
- [24] ZHANG M, SUI W H, XING Y Q, et al. Angiotensin IV attenuates diabetic cardiomyopathy via suppressing FoxO1-induced excessive autophagy, apoptosis and fibrosis[J]. *Theranostics*, 2021, 11(18): 8624-8639.
- [25] LI C G, ZHANG J, XUE M, et al. SGLT2 inhibition with empagliflozin attenuates myocardial oxidative stress and fibrosis in diabetic mice heart[J]. *Cardiovascular Diabetology*, 2019, 18(1): 15.
- [26] 易丽贞, 杨俊, 谢涛, 等. 隔药灸灸对动脉粥样硬化易损斑块兔腹主动脉 TLR2、TLR4、NF- κ B 表达的影响[J]. *湖南中医药大学学报*, 2021, 41(3): 364-369.
- [27] ZHANG X Q, QU H Y, YANG T, et al. Astragaloside IV attenuate MI-induced myocardial fibrosis and cardiac remodeling by inhibiting ROS/caspase-1/GSDMD signaling pathway[J]. *Cell Cycle*, 2022, 21(21): 2309-2322.
- [28] 廖心悦, 向琴, 邹骏驹, 等. 左归降糖舒心方对糖尿病心肌病 MKR 鼠 Foxo1/ β -MHC 的影响[J]. *时珍国医国药*, 2023, 34(6): 1302-1305.
- [29] 田娜, 喻嵘, 张薇薇, 等. 左归降糖舒心方调控自噬对糖尿病转基因 MKR 鼠心肌损伤的影响[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2023, 29(5): 747-752.
- [30] 喻嵘, 成细华, 胡伟, 等. 骨骼肌特异性胰岛素样生长因子 1 及胰岛素双受体功能缺失所致小鼠 2 型糖尿病[J]. *中国糖尿病杂志*, 2008(7): 438-440.

(本文编辑 周旦)