

葛根苓连汤改善糖尿病心肌损伤作用机制研究

江淼淼^{1,2}, 方金萍², 黄宗炫², 厉嘉敏³, 廖欢^{1,2}, 张文强^{1,2}, 余佳颖², 杨燕燕⁴, 连大卫^{1,2}

(1. 福建中医药大学中西医结合研究院, 福州 350122; 2. 福建中医药大学中西医结合学院, 福州 350122; 3. 福建中医药大学药学院, 福州 350122; 4. 福建中医药大学科技创新与转化中心, 福州 350122)

[摘要] **目的** 通过网络药理学和动物实验探究葛根苓连汤 (Gegen Qinlian decoction, GQD) 对糖尿病心肌损伤的改善作用及其机制。**方法** 结合网络药理学方法筛选 GQD 干预糖尿病心脏病 (diabetic cardiopathy, DC) 的潜在信号通路, 将 36 只 8 周龄 SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠, 适应性喂养 1 周后, 将小鼠分为正常对照组和造模组。正常对照组连续 4 周普通饲料、正常饮水喂养; 造模组予 60% 高脂饮食和 5% 葡萄糖水 4 周后, 腹腔注射 100 mg/kg 剂量链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ) 成功构建糖尿病动物模型后, 按体重随机分为: 模型对照组、GQD 低中高剂量组、阳性对照组, 每组 6 只。不同剂量 GQD、二甲双胍干预 6 周后, 将 6 组小鼠经 2% 异氟烷呼吸麻醉后, 进行摘眼球取血, 安乐死后采集心脏组织。采用苏木精-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 和小麦胚芽凝集素 (wheat germ agglutinin, WGA) 染色观察心肌组织病理损伤、心肌细胞横截面; 采用 ELISA 测定血清促炎因子表达、免疫组化染色检测心肌组织 RAGE、NLRP3、p-p65 蛋白表达情况。**结果** 网络药理学分析显示, GQD 干预 DC 的靶点显著富集于 RAGE、TNF、IL-17 等炎症通路; 动物实验通过 HE、WGA 染色观察, 与正常对照组相比, 模型对照组小鼠出现心肌纤维断裂、肿胀、心肌细胞的横截面积增大 ($P < 0.05$), GQD 干预能显著改善心肌纤维断裂与水肿, 减轻心肌细胞肥大等病理变化 ($P < 0.05$); 通过免疫组化、ELISA 检测, 与模型对照组相比, 经 GQD 干预后, 显著下调心肌组织中 RAGE、NLRP3、p-p65 蛋白表达及促炎因子水平 ($P < 0.05$)。**结论** GQD 可有效改善糖尿病小鼠心肌病理损伤, 其机制可能与抑制 RAGE/p-p65/NLRP3 信号通路活化、减轻心肌炎症反应有关。

[关键词] 葛根苓连汤; 糖尿病心肌损伤; 炎症; C57BL/6J 小鼠

[中图分类号] R542.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(XXXX)XX-0001-09



Study on the Mechanism of Gegen Qinlian Decoction in Improving Myocardial Injury in Diabetes Mellitus

JIANG Miaomiao^{1,2}, FANG Jinping², HUANG Zongxuan², LI Jiamin, LIAO Huan^{1,2}, ZHANG Wenqiang^{1,2}, YU Jiaying², YANG Yanyan, LIAN Dawei^{1,2}

(1. Academy of Integrative Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China. 2. College of Integrative Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, 350122, China; 3. Academy of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, 350122, China. 4. Innovation and Transformation Center, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, 350122, China)

Correspondence to: Lian Dawei (ORCID:0009-0007-4430-8284), E-mail: 675836257@qq.com

[ABSTRACT] **Objective** Investigation into the ameliorative effect and mechanism of Gegen Qinlian Decoction (GQD) on diabetic myocardial injury based on network pharmacology and animal experiments.

Methods Network pharmacology was employed to screen the potential signaling pathways of GQD in the intervention of diabetic cardiomyopathy (DC). Thirty-six 8-week-old SPF male C57BL/6J mice were

[基金项目] 国家自然科学基金青年项目“葛根通过调控 ASM-NLRP3 信号通路改善炎症微环境修复糖尿病血管内皮损伤的机制研究”(82204662); 福建省自然科学基金杰出青年项目“基于空间多组学探讨清达颗粒减轻高血压血管内皮损伤的作用机制及物质基础研究”(2024J010032); 福建省科技创新联合资金项目(2024Y9514)“基于智能多组学技术探讨清达颗粒治疗临界高血压的新作用及新机制”; 福建中医药大学高层次人才科研启动资金项目“基于 Rab 蛋白家族调控内皮细胞焦亡探讨高血压的机制及清达颗粒的干预作用”(X2022001); 全国大学生创新创业训练计划项目“基于 E3 泛素连接酶介导泛素化修饰 NLRP3 通路探讨芦荟大黄素保护高血压内皮损伤的作用机制”202510393010

[第一作者] 江淼淼 (1998—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 心血管疾病。E-mail: 15980224379@163.com

[通信作者] 连大卫 (1988—), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 心血管疾病。E-mail: 675836257@qq.com。ORCID: 0009-0007-4430-8284

adaptively fed for one week and then divided into a normal control group and a modeling group. The normal control group received a standard diet and normal water for four weeks. The modeling group was fed a 60% high-fat diet and 5% glucose water for four weeks, followed by an intraperitoneal injection of 100 mg/kg streptozotocin (STZ) to establish the diabetes mellitus model. Successfully modeled mice were randomly assigned to the model control group, GQD low-, medium-, and high-dose groups, and a positive control group (metformin), with 6 mice per group. After 6 weeks of intervention, mice were anesthetized with 2% isoflurane. Blood samples were collected via retro-orbital bleeding, and heart tissues were harvested after euthanasia. Hematoxylin-eosin (HE) and wheat germ agglutinin (WGA) staining were performed to observe myocardial pathological injury and myocardial cell cross-sectional area. Serum levels of pro-inflammatory cytokines were measured by ELISA, and the protein expressions of RAGE, NLRP3, and p-p65 in myocardial tissues were detected by immunohistochemistry. **Results** Network pharmacology analysis revealed that the targets of GQD in the intervention of DC were significantly enriched in inflammatory pathways such as RAGE, TNF, and IL-17. In animal experiments, HE and WGA staining showed that compared with the normal control group, the model control group exhibited myocardial fiber fragmentation, swelling, and significantly increased myocardial cell cross-sectional area ($P < 0.05$). GQD intervention significantly alleviated myocardial fiber fragmentation and edema, and reduced pathological changes such as myocardial hypertrophy ($P < 0.05$). Furthermore, immunohistochemistry and ELISA results demonstrated that compared with the model control group, GQD intervention significantly down-regulated the protein expression levels of RAGE, NLRP3, and p-p65 in myocardial tissues, as well as the levels of pro-inflammatory cytokines ($P < 0.05$). **Conclusion** GQD can effectively ameliorate myocardial pathological injury in diabetic mice. The underlying mechanism may be associated with the inhibition of RAGE/p-p65/NLRP3 signaling pathway activation and the alleviation of myocardial inflammatory response.

[Key words] Gegen Qinlian Decoction; Diabetic Myocardial Injury; Inflammation; C57BL/6J mice

糖尿病 (diabetes mellitus, DM) 已成为继心脑血管疾病和恶性肿瘤之后危害人类健康的第三大慢性疾病^[1]。其发病率持续上升,且并发症多、致残率高、治疗负担重^[2-3]。糖尿病性心脏病 (diabetic cardiomyopathy, DC) 是 DM 常见的严重并发症之一,DC 是导致患者心力衰竭和死亡的首要原因,深入探究其机制发现,糖尿病心肌病是驱动这一疾病发生发展的核心病理基础。该损伤过程主要表现为心肌细胞炎症损伤、代谢紊乱,进而诱发心肌肥厚、间质纤维化及舒缩功能异常^[4-6]。当前临床治疗主要依赖降糖药物及 β 受体阻滞剂等药物干预,虽可在一定程度上改善代谢状态,但难以从根本上阻断糖尿病引发的心肌持续性炎症与微观结构重塑过程^[7]。研究表明,糖尿病可通过持续高糖和胰岛素抵抗诱导炎症级联反应,促进心肌细胞损伤、肥大和间质纤维化^[7],但目前尚缺乏针对糖尿病心肌损伤炎症通路的有效药物,这也成为临床治疗的一大瓶颈。

中医药在糖尿病及其心脏并发症防治中具有多靶点、整体调节的独特优势。经典方剂葛根芩连汤 (Gegen Qinlian decoction, GQD) 由葛根、黄芩、黄

连、甘草组成,具有清热解毒、升阳止泻之功,历代常用于治疗湿热泄泻、消渴等病证^[9]。现代药理研究表明,GQD 能改善糖脂代谢紊乱,抑制炎症反应及胰岛素抵抗,具有明确的降糖^[10]及心血管保护作用^[9-11]。然而,然而,GQD 对糖尿病心肌损伤的作用机制尚未得到系统阐明,特别是在心肌炎症反应及心肌结构重塑中的调控机制仍不明确。

基于此,本研究借助网络药理学分析,以 DC 相关基因集为背景,系统筛选 GQD 干预糖尿病心肌损伤的潜在核心靶点及关键信号通路,初步预测 GQD 对心肌损伤的保护作用机制。进一步通过 60% 高脂饲料喂养的膳食诱导型与注射 STZ 化学药物诱导 C57BL/6J 小鼠建立 2 型糖尿病动物模型,再通过 HE 与 WGA 染色观察心脏病理结构变化,并以免疫组化和 ELISA 检测验证关键炎症通路的调控效应,从而揭示 GQD 干预糖尿病心肌损伤的分子机制,为临床防治提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

8 周龄 SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠 36 只,体重 20~

24 g, 购自上海斯莱克实验动物科技有限公司 [SCXK (沪) 2022-0004], 质量合格证号为 20220004024311。小鼠饲养于福建中医药大学实验动物中心屏障设施内 [SYXK (闽) 2020-0002], 恒温 24 ± 2 °C, 相对湿度 50%~60%, 全程分笼喂养, 每笼 3~4 只, 进行 12 h 的光-暗循环自由饮水进食。所有动物实验操作均已获准, 符合我国现行《实验动物福利伦理审查指南》(GB/T 35892—2018) 与《实验动物生物样本采集规范》(T/ CVMA 324—2025) 的相关要求, 动物实验方案经福建中医药大学实验动物福利伦理委员会批准 (伦理批准号: 2023132)。

1.2 主要试剂和仪器

生理盐水 (批号 C18060604) 购自江西科伦药业有限公司; 异氟烷 (批号 9970-00026-00) 购自深圳市瑞沃德公司; STZ (批号 S0130) 购自美国 Sigma 公司; 高脂饲料 (批号 D12492) 购自 Research Diets 公司; 葛根 (批号 A1082241)、黄芩 (批号 A1086291)、黄连 (批号 A209B821)、甘草 (批号 A210A821) 购自广东一方制药有限公司; 4% 多聚甲醛 (批号 La0427)、苏木素染液 (批号 G1140)、伊红染液 (批号 G1100)、PBS 缓冲剂 (批号 P1010)、中性树胶 (批号 G8590) 购自中国索莱宝科技有公司; 二甲双胍 (批号 S6015) 购自北京圣永制药有限公司; 二甲苯 (批号 x820585)、无水乙醇 (批号 128034010160) 购自福州宏新玻璃仪器有限公司; 粉剂型抗原修复液 (批号 MVS-0066)、DAB 染液 (批号 DAB-0031)、免疫组化试剂盒 (批号 Kit-9730) 购自福州迈新生物开发有限公司; WGA (批号 W11261)、Donkey anti-Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor™ 555 (批号 A-31572) 购自美国 Thermo Fisher Scientific 有限公司; Quick Block™ 免疫染色一抗稀释液 (批号 P0262)、Quick Block™ 免疫染色二抗稀释液 (批号 P0265)、免疫染色封闭液 (批号 P0102)、抗荧光淬灭封片液 (含 DAPI) (批号 P0131) 购自上海碧云天生物技术有限公司; RAGE (批号 49341)、p-p65 (批号 11217)、NLRP3 (批号 49012-2) 购自美国 Signalway Antibody 公司。

石蜡切片机、DMI8 正置荧光显微镜购自德国 Leica 有限公司; Ci-L 正置荧光显微镜购自日本 Nikon 有限公司; 酶标仪购自美国 Thermo Fisher Scientific 有限公司。

1.3 糖尿病小鼠造模与给药剂量以及葛根芩连汤

的制备

将 36 只雄性 C57BL/6J 小鼠, 随机分为 2 组, A 组为正常对照组 (6 只)、B 组为造模组 (30 只), 造模组喂养 60% 高脂饲料以及 5% 葡萄糖水, 正常对照组饲喂普通饲料 4 周后, 各组小鼠均禁食 12 h (自由饮水), 采用柠檬酸盐缓冲液配制 1% STZ (10 mg/mL), 对照组注射等体积柠檬酸盐缓冲液, 造模组根据小鼠体重按 100 mg/kg (1.0 mL/100 g) 剂量腹腔注射, 构建 2 型糖尿病动物模型, 注射 STZ 后造模组持续喂养 60% 高脂饲料以及 5% 葡萄糖水直至实验结束。注射后分别于第 3、7、14、21、28 天对各组小鼠进行剪尾取血, 检测小鼠空腹 8 h 后的血糖值。以小鼠空腹血糖值 ≥ 16.7 mmol/L 作为糖尿病模型造模成功的判定标准。造模成功后, 将造模组糖尿病小鼠随机分组为模型对照组, GQD 低、中、高剂量组, 阳性对照组。

葛根芩连汤的组成为葛根 15 g、黄芩 9 g、黄连 9 g、甘草 6 g。按上述制备葛根芩连汤的水提取液, 按照料液 1: 10 加入蒸馏水, 充分浸泡后, 煎煮 2 次, 每次 1h, 煎液合并过滤浓缩至水提液 (生药量 1 g/mL) 于 -20 °C 冷藏保存备用。

按照《药理试验方法学》中人与小鼠的折算系数为 0.0026, 中剂量的选择是基于临床葛根芩连汤的应用, 即人的葛根芩连汤剂量为 $0.557 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 。调整体表面积和计算公式: 小鼠中剂量 = 人剂量 ($0.557 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) \times 人体重 (70 kg) \times 转换因子 (0.0026) / 小鼠体重 (0.02 kg) = $5.07 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, 低剂量、高剂量分别为中剂量的 0.5 和 2 倍。根据上述计算获得葛根芩连汤 2.53, 5.07, 10.14 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 的给药剂量。GQD 低、中、高剂量组分别以 2.535 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 、5.07 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 、10.14 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 的剂量进行灌胃给药, 阳性对照组以 $0.2 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 剂量灌胃二甲双胍, 正常对照组和模型对照组灌胃等量 ddH₂O, 每日灌胃一次, 连续干预 6 周。

1.4 网络药理学分析

1.4.1 葛根芩连汤与疾病交集靶点获取

BATMAN-TCM 数据库获取 GQD 所含药物的主要活性成分, 以 Confidence Scores ≥ 0.84 (LR=80.88) 且 $P \leq 0.05$ 为标准筛选出各药物相应的潜在作用靶点, 以 “Diabetic Heart Disease” 和 “Diabetic Cardiomyopathy” 为关键词, 通过 Gene Cards 数据库检索, 获取去重疾病靶点, 靶点视为 DC 疾病靶点。微生信分析工具韦恩图绘制功能, 进行可视化交集分析。

1.4.2 蛋白质-蛋白质相互作用 (Protein-Protein Interaction, PPI) 网络构建和关键核心靶点

将上述共同靶点导入 STRING 数据库物种设置为“Homo sapiens”，构建 GQD-DC-PPI 网络图，导入 Cytoscape3.7.2，以度值 (Degree)、中介中心性 (Betweenness) 和接近中心性 (Closeness) 作为参考值进行蛋白互作网络可视化分析。

1.5 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析

交集靶点导入 David 数据库，进行基因本体论 (Gene Ontology, GO) 富集分析和京都基因与基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 富集分析，获得主要生物过程、细胞组分、分子功能和信号通路以 $P < 0.05$ 作为显著功能和通路临界值，根据 P 小到大进行排序，值绘制成气泡图。

1.6 小鼠血清和组织样本的采集与保存

实验结束后，小鼠禁食不禁水 12 h 后，小鼠经 2% 异氟烷呼吸麻醉后，进行摘眼球取血，每只 0.5–1 mL，麻醉后以心脏放血安乐死，使用生理盐水洗涤血液后，迅速摘取心脏组织。心脏组织浸于 4% 多聚甲醛溶液固定，后续用于石蜡切片，进行 HE、WGA 染色观察组织病理学形态。血清常温静置 2 h，4 °C、3 000 r/min 离心 10 min，血清置于 -80 °C 保存。

1.7 HE 染色观察葛根芩连汤干预对糖尿病小鼠心肌病理的影响

小鼠心脏组织固定 48 h 后，经修块、梯度乙醇、二甲苯脱水、浸蜡和包埋处理。组织切片成 4 μm 厚度的石蜡切片，切片依次经二甲苯和梯度乙醇脱蜡与水化后，进行常规苏木素-伊红染色，分别标记细胞核和细胞质。中性树胶封片，在光学显微镜下进行组织学结构的观察和图像采集。每张切片随机选取 6 个视野 ($\times 400$)。

1.8 WGA 染色观察小鼠心肌细胞的横截面积

小鼠心脏切片如上述脱蜡与水化。抗原修复，免疫染色封闭，以 1: 200 稀释 WGA 染料液，避光常温孵育 1 h，以防荧光信号减弱。PBS 洗涤 3 次，去除未结合的 WGA 染料。加入抗荧光淬灭剂 (含 DAPI) 封片保存。使用荧光显微镜在 400 \times 的视野下观察染色后的切片。采用 ImageJ 软件对心肌细胞横截面积进行分析。

1.9 酶联免疫吸附剂 (ELISA) 检测促炎因子表达水平

眼眶取血后，收集上清液体 -80 °C 保存。检测采用

酶联免疫吸附法 (ELISA)，检测采用酶联免疫吸附法 (ELISA)，严格按照说明书操作。稀释标准品，分别加入空白孔、标准孔、样品孔，37 °C 避光孵育 30 min，加入酶标试剂再次 37 °C 避光孵育 30 min，每次孵育结束后洗涤 5 次，加入显色剂充分反应后，滴加终止液，450 nm 波长依序测量各孔的吸光度。

1.10 免疫组化法观察 RAGE、NLRP3 和 p-p65 表达

小鼠组织切片同前脱蜡与水化处理。严格按照迈新组化试剂盒说明书进行操作，按 1: 100 分别稀释 RAGE、NLRP3、p-p65 抗体 4 °C 过夜孵育。每次孵育完成后，PBS 洗涤 3 次。DAB 染色，苏木素复染，中性树胶封片。在光学显微镜下进行组织学结构的观察和图像采集。每张切片随机选取 6 个视野 ($\times 400$)，使用 ImageJ 软件计算小鼠心脏中目标蛋白的阳性染色表达。

1.11 数据统计分析

采用 GraphPad Prism 10.1.2 和 ImageJ 1.54d 软件进行实验结果数据的处理与图片分析。所有实验均独立进行 3 次，采用 Shapiro-Wilk 检验方法分析该数据是否符合正态分布，在符合正态分布，结果数值以 $\bar{x} \pm s$ 表示。当数据符合正态分布且方差齐下使用 LSD- t 检验进行组间差异性比较， $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 网络药理学分析

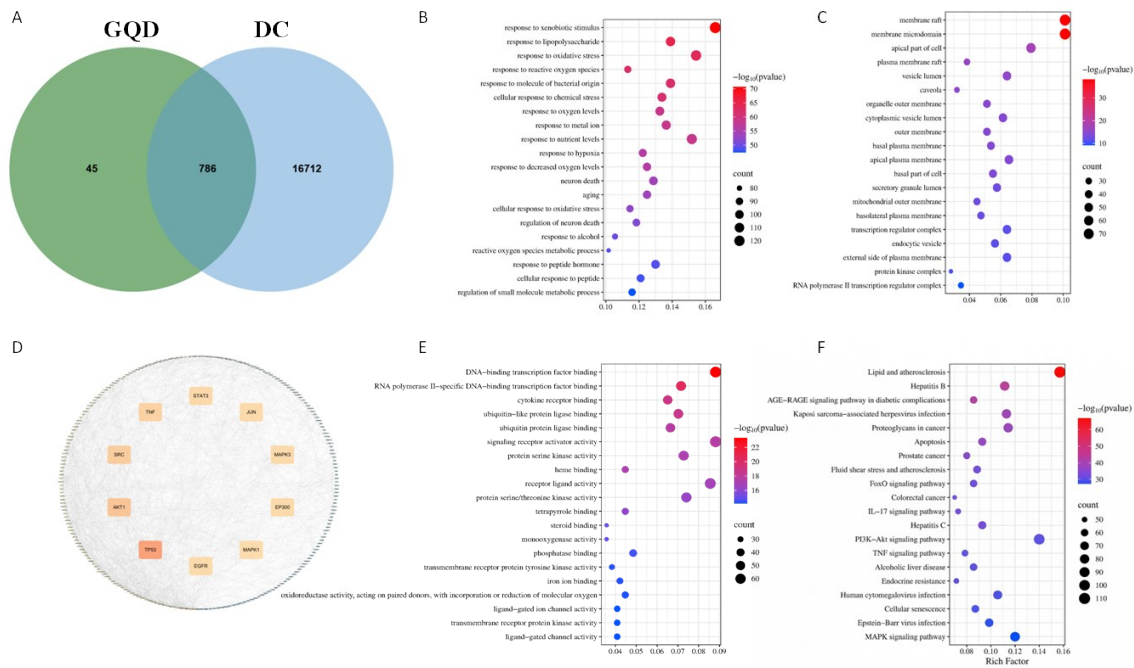
2.1.1 葛根芩连汤与疾病交集靶点筛选、PPI 网络模型构建与分析

为进一步揭示 GQD 干预糖尿病心肌损伤的潜在分子机制，本研究基于糖尿病心肌病 (DC) 疾病靶点数据集，与系统筛选 GQD 的作用靶点。最终获得 786 个交集靶点，将其视为 GQD 改善糖尿病心肌损伤的潜在关键靶点，见图 1A。交集靶点导入 STRING 数据库获得靶点互作关系，颜色对应每个基因蛋白 Degree 值的大小 TNF、TP53、EGFR 等靶点排名靠前见图 1D。

2.1.2 GO 功能注释分析与 KEGG 通路富集分析

为探索 GQD 治疗糖尿病心肌损伤的潜在作用机制，核心靶点导入 DAVID 数据库进行 GO 功能富集分析、KEGG 通路富集分析。根据 P 值排序，节点颜色越红，代表着富集相关性越高。采用微生信分析平台进行可视化分析，绘制对应的气泡图，见图 1B、1C、1E、1F。信号通路分析结果显示，差异基因主要富集

于糖尿病并发症中的 AGE - RAGE 信号通路、IL-17 信号通路及 TNF 信号通路等。GQD 治疗糖尿病心肌损伤作用与炎症相关信号通路的调控密切相关。



注：A, 葛根芩连汤 (Gegen Qinlian decoction, GQD) 与糖尿病心脏病 (diabetic cardiopathy, DC) 的交集靶点图; B, GO 生物过程 (BP) 富集图; C, GO 细胞组分 (CC) 富集图; D, STRING 数据库构建的 PPI 网络图; E, GO 分子功能 (MF) 富集图; F, KEGG 通路富集图。

Note: A. Intersection target map of GQD and DC; B. GO biological process (BP) enrichment map; C. GO cellular component (CC) enrichment map; D. PPI network map constructed by STRING database; E. GO molecular function (MF) enrichment map; F. KEGG pathway enrichment map.

图1 GQD 干预糖尿病心肌损伤的网络药理学分析

Figure 1 Network pharmacology analysis of GQD on Diabetic Myocardial Injury

2.2 葛根芩连汤干预对糖尿病小鼠心肌损伤的影响

所有造模组注射 STZ 后, 小鼠状态均良好。如图 2A-2F, 正常对照组心肌细胞排列整齐, 未见肿胀, 心肌纤维完整; 与正常对照组相比, 模型对照组见心肌纤维断裂、肿胀; 经 GQD 不同剂量干预后有不同程度的缓解, GQD 中、高剂量组和阳性对照组可见心肌细胞排列相对整齐, 心肌纤维较为完整, 水肿较轻, 间质轻度水肿。心肌细胞横截面积是心肌细胞肥大程度的量化指标, 间接表明心脏结构破坏和心肌重塑的严重程度。图 3A-3B 可见, 模型对照组小鼠心肌细胞的横截面积显著高于正常对照组 ($P < 0.05$), 经不同剂量 GQD 干预后, GQD 高剂量组心肌细胞的横截面积显著低于模型对照组 ($P < 0.05$), 提示 GQD 可显著减轻糖尿病小鼠的心肌病理损伤, 改善心肌纤维断裂、细胞

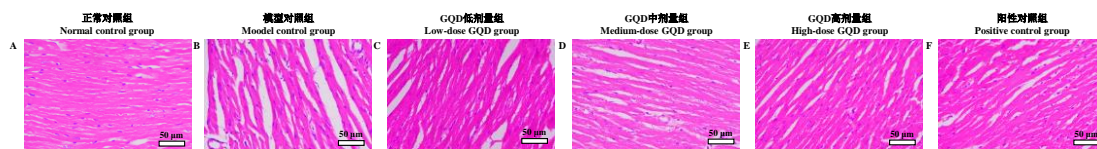
肿胀、间质水肿及心肌肥大等病理改变。

2.3 ELISA 检测血清中 IL-1 β 、IL-6、IL-8、HMGB1、MCP-1 的表达水平

如图 4A-4E 所示, 正常对照组比较, 模型对照组 IL-1 β 、IL-6、IL-8、HMGB1、MCP-1 的表达水平升高 ($P < 0.05$); 与模型对照组比较, GQD 高剂量组促炎因子水平均显著降低 ($P < 0.05$), 提示 GQD 干预可抑制炎症因子表达。

2.4 免疫组化染色验证心肌组织中 RAGE、NLRP3 和 p-p65 蛋白表达

图 5A-5F 可见, 与正常对照组相比, 模型对照组 RAGE、NLRP3 和 p-p65 阳性产物 (黄色与黄棕色区域), 表达明显增多, 阳性细胞的棕黄色区域面积明显增加 ($P < 0.05$), 并可见棕黄色色度明显加深; 经 GQD 干预后, GQD 高剂量组 RAGE、NLRP3 和 p-p65 在心

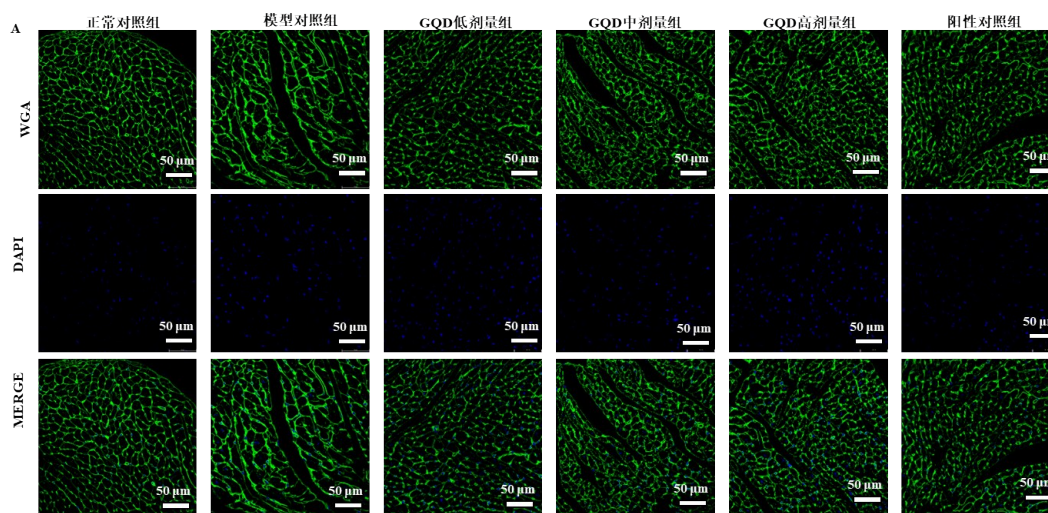


注: A-F. HE 染色正常对照组、模型对照组和 GQD 低中高剂量组、阳性对照组代表性图片 ($\times 400$, 标尺=50 μm)。

Note: A-F. Representative images of HE staining in the normal control group, model control group, and GQD low, medium, and high dose group, and positive control groups ($\times 400$, scale bar = 50 μm).

图2 葛根苓连汤干预对糖尿病小鼠心肌损伤的影响

Figure 2 Effect of Gegen Qinlian Decoction on Myocardial Injury in Diabetic Mice



注: A, WGA 染色代表性图片 ($\times 400$, 标尺=50 μm); B. WGA 染色显示心肌细胞横截面积统计分析图 ($n=6$), 与正常对照组比较, $*P < 0.05$; 与模型对照组比较, $\#P < 0.05$ 。

Note: A. Representative images of WGA staining ($\times 400$, scale bar=50 μm); B. Statistical analysis of the cross-sectional area of myocardial cells by WGA staining ($n=6$), compared with the normal control group, $*P < 0.05$; compared with the model control group, $\#P < 0.05$.

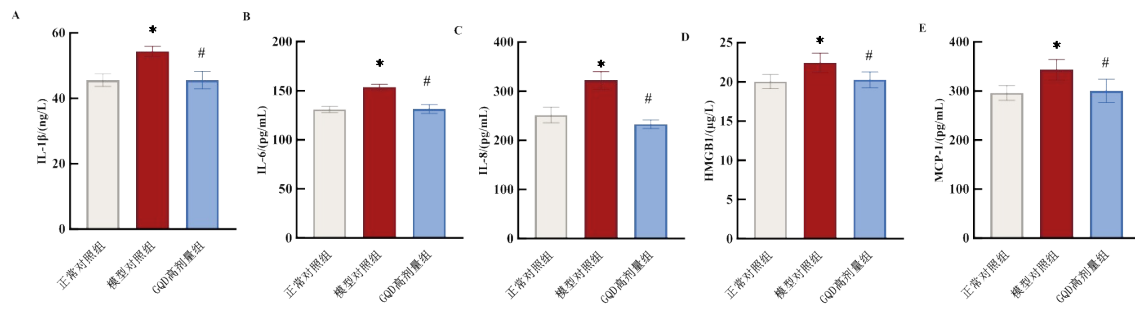
图3 GQD 干预对糖尿病小鼠心肌肥大的影响

Figure 3 Effect of GQD intervention on myocardial hypertrophy in diabetic mice

脏组织中表达量明显减少, 且棕黄色表达区域与颜色深度较模型组明显降低 ($P < 0.05$), 提示 GQD 可能通过抑制 RAGE/p-p65/NLRP3 信号轴的过度激活, 减轻心肌组织炎症反应, 从而改善糖尿病引发的心肌病理损伤。

3 讨论

DC 是糖尿病患者最常见且最具致残性的心血管并发症之一, 其主要特征为心肌肥大、纤维化及心功能障碍^[12], 而糖尿病心肌损伤则是驱动其发生发展、最终引发心功能障碍的核心病理基础。虽然近年来糖尿

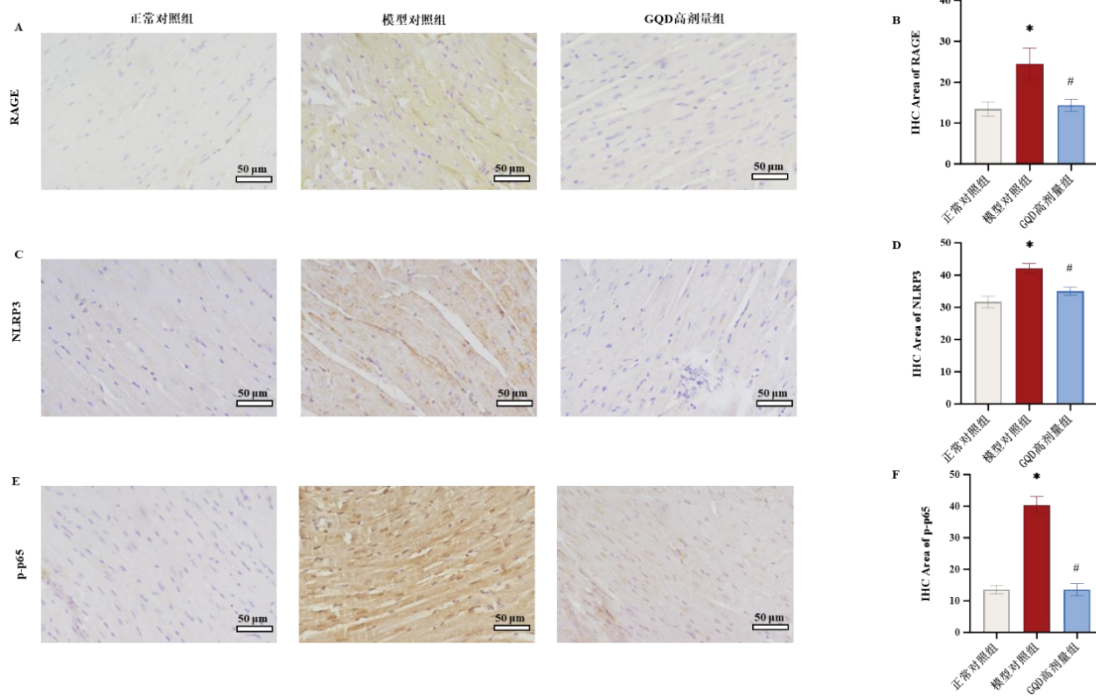


注: A-E, ELISA 法检测各组小鼠血清白细胞介素-1 β (Interleukin-1 β , IL-1 β)、白细胞介素-6 (Interleukin-6, IL-6)、白细胞介素-8 (Interleukin-8, IL-8)、高迁移率族蛋白 B1 (High mobility group protein, HMGB1)、单核细胞趋化蛋白-1 (Monocyte chemotactic protein 1, MCP-1) 含量变化 ($n=6$)。与正常对照组比较, * $P<0.05$; 与模型对照组比较, # $P<0.05$ 。

Note: (A-E) Serum levels of IL-1 β , IL-6, IL-8, HMGB1, and MCP-1 in each group were measured by ELISA ($n=6$). * $P < 0.05$; compared with the model control group, # $P < 0.05$.

图4 GQD 干预对小鼠血清中炎症因子水平的影响

Figure 4 Effects of GQD intervention on the levels of inflammatory factors in the serum of mice



注: A、C、E 依次为 RAGE、NLRP3 和 p-p65 蛋白免疫组化染色结果 ($\times 400$, 标尺=50 μm) ; B、D、F 依次为 GQD 干预后对糖尿病小鼠心肌组织 RAGE、NLRP3 和 p-p65 蛋白表达柱状图 $n=6$, 与正常对照组比较, * $P<0.05$; 与模型对照组比较, # $P<0.05$ 。和磷酸化核转录因子 p65 (pNF- κ Bp65, p-p65) 蛋白分布的影响

Note: (A, C, E) Representative images of immunohistochemical staining for RAGE, NLRP3, and p-p65 proteins (magnification, $\times 400$; scale bar = 50 μm). (B, D, F) Quantitative analysis of RAGE, NLRP3, and p-p65 protein expression in myocardial tissue of diabetic mice following GQD intervention ($n=6$). compared with the normal control group, * $P<0.05$; compared with the model control group, # $P<0.05$.

图5 免疫组化法检测 GQD 干预后对糖尿病小鼠心肌组织中晚期糖基化末端受体 (Receptor for Advanced Glycosylation End-products, RAGE)、NOD 样受体蛋白 3 (NOD-like Receptor Protein 3, NLRP3)

Figure 5 Immunohistochemical Assessment of RAGE, NLRP3, and p-p65 Protein Expression in Myocardial Tissue of Diabetic Mice Following GQD Intervention

病的代谢控制手段不断改进,但DC的发病率仍逐年升高,其防控效果不佳与缺乏针对心肌持续性炎症损伤与结构重塑的有效干预密切相关^[8]。现有降糖药物及心血管药物虽可在一定程度上改善代谢状态,但难以阻止糖尿病诱导的心肌炎症和纤维化进展^[13, 14]。因此,寻找能够靶向炎症反应、延缓心肌损伤的新型干预手段具有重要意义。本研究通过结合网络药理学分析与动物实验,系统探讨了葛根芩连汤在改善糖尿病心肌损伤中的保护作用及分子机制。结果显示,GQD可显著逆转糖尿病小鼠的心脏病理结构异常,减轻心肌细胞肥大及炎症浸润,提示其在防治糖尿病心肌损伤方面具有潜在优势。

文献报道,GQD对2型糖尿病及其并发症、代谢综合征疗效较优^[11]。为阐明GQD减轻心肌损伤的具体分子机制,本研究首先通过网络药理学分析发现,其抗DC的关键靶点显著富集于AGE-RAGE信号通路。AGEs是糖代谢紊乱的典型产物,可与受体RAGE结合并激活下游炎症反应,是诱发心肌细胞损伤的重要始动因素。AGE-RAGE轴持续激活可引起氧化应激和线粒体功能障碍,放大局部免疫炎症级联反应,促进心肌细胞的凋亡、坏死与间质纤维化^[15-16]。其中,NLRP3炎症小体的异常激活被认为是高糖环境下诱发心肌炎症损伤与结构重塑的关键环节^[17]。NLRP3可诱导心肌细胞焦及胶原沉积,导致心肌纤维断裂、水肿和病理性重构^[18-19]。已有研究表明,AGE-RAGE通路能通过激活NF- κ B上调NLRP3炎症小体的组装,形成“AGE-RAGE/NF- κ B/NLRP3”炎症信号轴,持续驱动糖尿病心肌的炎症损伤与重构^[20]。因此,抑制该信号轴的过度活化被认为是减轻糖尿病心肌损伤的重要策略,这提示GQD可能通过调控该炎症信号轴发挥心脏保护作用,为其机制研究提供了理论预测。

为在整体动物水平验证GQD对糖尿病心肌损伤的改善作用,本研究采用高脂饮食联合STZ建立2型糖尿病小鼠模型,模拟糖尿病相关心肌损伤。通过HE染色观察,GQD干预显著改善了糖尿病小鼠心肌纤维断裂、肿胀及间质水肿等病理表现;WGA染色结果显示,GQD能够有效逆转心肌细胞肥大,降低细胞横截面积。这些形态学证据表明,GQD能显著减轻高糖诱导的心肌组织病理损伤,维持心肌微观结构的完整性。然而,上述抗损伤作用是否通过调控预测的“AGE-RAGE/NF- κ B/NLRP3”炎症信号轴实现,仍需在分子层面进行验证。

为进一步证实“AGE-RAGE/NF- κ B/NLRP3”信号轴在GQD减轻心肌损伤过程中的关键作用,本研究通过体内实验检测该通路中关键蛋白的表达及相关炎症因子水平。实验结果显示,GQD可显著下调糖尿病小鼠心肌组织中RAGE、p-p65及NLRP3的表达水平;同时,ELISA结果显示,GQD可显著降低IL-1 β 、IL-6、IL-8、HMGB1、MCP-1等多种促炎因子释放。这些结果表明,GQD通过抑制AGE-RAGE/NLRP3炎症通路的过度激活,阻断炎症级联反应,从而减轻心肌持续性炎症损伤,改善心肌微观结构重塑,从分子水平验证了网络药理学预测结果的可靠性。

综上所述,本研究从网络药理学、组织病理学和分子生物学多个层面系统揭示了GQD干预糖尿病心肌损伤的潜在机制。GQD可通过抑制AGE-RAGE信号通路,阻断NF- κ B介导的NLRP3炎症小体激活,降低炎症因子释放,从而减轻心肌炎症浸润、细胞肥大与间质纤维化,最终实现心肌保护作用。本研究为GQD防治糖尿病引发的心肌损伤提供了确凿的实验依据,也为临床治疗DC提供了以“抗炎、抗损伤”为导向的新策略。

[医学伦理声明 Medical Ethics Statement]

本研究涉及的所有动物实验均已通过福建中医药大学实验动物福利伦理批准(动物伦理批件号:2023132)。所有实验过程均遵照中国实验动物相关法律法规条例要求进行。

All animal experiments involved in this study have been approved by the welfare ethics of laboratory animals of Fujian University of Traditional Chinese Medicine (animal ethics approval number: 2023132). All experimental processes are carried out in accordance with the relevant laws, regulations and regulations of Chinese laboratory animals.

[作者贡献 Author Contribution]

江淼淼负责形式分析、调查研究、方法设计、项目管理、初稿写作,参与软件处理、有效验证、可视化;

方金萍负责软件处理、有效验证,参与形式分析、调查研究、可视化;

黄宗炫负责可视化,参与形式分析、调查研究、软件处理、有效验证;

厉嘉敏参与形式分析、软件处理、可视化;

廖欢参与形式分析、软件处理、可视化;

张文强参与调查研究、可视化;

余佳颖参与调查研究、可视化;

杨燕燕参与项目管理、监督管理;

连大卫负责方案策划、数据策划、提供资源、写作审稿。

[利益声明 Declaration of Interest]

所有作者均声明本文不存在利益冲突。

[参考文献 References]

- [1] LI J Y, PANDIAN V, DAVIDSON P M, et al. Burden and attributable risk factors of non-communicable diseases and subtypes in 204 countries and territories, 1990-2021: a systematic analysis for the global burden of disease study 2021[J]. *Int J Surg*, 2025, 111(3): 2385-2397. DOI: 10.1097/JS9.0000000000002260.
- [2] XU Y, LU J L, LI M, et al. Diabetes in China part 1: epidemiology and risk factors[J]. *Lancet Public Health*, 2024, 9(12): e1089-e1097. DOI: 10.1016/S2468-2667(24)00250-0.
- [3] JIA W P, CHAN J C, WONG T Y, et al. Diabetes in China: epidemiology, pathophysiology and multi-omics[J]. *Nat Metab*, 2025, 7(1): 16-34. DOI: 10.1038/s42255-024-01190-w.
- [4] ZHANG N N, YU H, LIU T Z, et al. Bmal1 downregulation leads to diabetic cardiomyopathy by promoting Bcl2/IP3R-mediated mitochondrial Ca²⁺ overload[J]. *Redox Biol*, 2023, 64: 102788. DOI: 10.1016/j.redox.2023.102788.
- [5] ZHAO X D, LIU S W, WANG X, et al. Diabetic cardiomyopathy: Clinical phenotype and practice[J]. *Front Endocrinol*, 2022, 13: 1032268. DOI: 10.3389/fendo.2022.1032268.
- [6] CAI C, WU F, HE J, et al. Mitochondrial quality control in diabetic cardiomyopathy: from molecular mechanisms to therapeutic strategies[J]. *Int J Biol Sci*, 2022, 18(14): 5276-5290. DOI: 10.7150/ijbs.75402.
- [7] 李晓文. 基于PI3K/AKT信号通路探讨糖心平胶囊治疗糖尿病心肌病药效及机制[D]. 北京: 中国中医科学院, 2021. DOI: 10.27658/d.cnki.gzzyy.2021.000016.
LI X W. Efficacy and mechanism of Tangxinping capsule in treatment of diabetic cardiomyopathy base on PIK/AKT signaling pathway[D]. Beijing: China Academy of Chinese Medical Sciences, 2021. DOI: 10.27658/d.cnki.gzzyy.2021.000016.
- [8] 黄鑫磊, 贾雪雯, 丁元庆. 葛根苓连汤临床应用进展[J]. *山东中医药大学学报*, 2020, 44(2): 215-220. DOI: CNKI:SUN:SDYX.0.2020-02-021.
HUANG X L, JIA X W, DING Y Q. Review on clinical application of Gegen Qinlian decoction(葛根苓连汤)[J]. *J Shandong Univ Tradit Chin Med*, 2020, 44(2): 215-220. DOI: CNKI:SUN:SDYX.0.2020-02-021.
- [9] 孙洪平, 张会峰, 陈煜, 等. 葛根苓连汤调控FoxO1/MARCH1通路对小鼠胰岛素抵抗的改善作用[J]. *中成药*, 2024, 46(5): 1662-1667. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1528.2024.05.041.
SUN H P, ZHANG H F, CHEN Y, et al. Effect of Gegen Qinlian decoction on improving insulin resistance in mice by regulating FoxO1/MARCH1 pathway[J]. *Chin Tradit Pat Med*, 2024, 46(5): 1662-1667. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1528.2024.05.041.
- [10] 刘莲莹, 吴威, 庞琳琳, 等. 葛根苓连汤化学成分、药理作用及临床应用研究进展[J]. *中华中医药学刊*, 2022, 40(3): 147-154.
LIU L X, WU W, PANG L L, et al. Research progress on chemical composition, pharmacological action and clinical application of Gegen Qinlian decoction(葛根苓连汤)[J]. *Chin Arch Tradit Chin Med*, 2022, 40(3): 147-154.
- [11] DILLMANN W H. Diabetic cardiomyopathy[J]. *Circ Res*, 2019, 124(8): 1160-1162. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.118.314665.
- [12] NAKAMURA K, MIYOSHI T, YOSHIDA M, et al. Pathophysiology and treatment of diabetic cardiomyopathy and heart failure in patients with diabetes mellitus[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(7): 3587. DOI: 10.3390/ijms23073587.
- [13] MARGULIES K B, HERNANDEZ A F, REDFIELD M M, et al. Effects of liraglutide on clinical stability among patients with advanced heart failure and reduced ejection fraction: a randomized clinical trial[J]. *JAMA*, 2016, 316(5): 500-508. DOI: 10.1001/jama.2016.10260.
- [14] SEFEROVIĆ P M, COATS A J S, PONIKOWSKI P, et al. European Society of Cardiology/Heart Failure Association position paper on the role and safety of new glucose-lowering drugs in patients with heart failure[J]. *Eur J Heart Fail*, 2020, 22(2): 196-213. DOI: 10.1002/ehf.1673.
- [15] ZHOU M Z, ZHANG Y Y, SHI L, et al. Activation and modulation of the AGEs-RAGE axis: Implications for inflammatory pathologies and therapeutic interventions - A review[J]. *Pharmacol Res*, 2024, 206: 107282. DOI: 10.1016/j.phrs.2024.107282.
- [16] BUGGER H, ABEL E D. Molecular mechanisms of diabetic cardiomyopathy[J]. *Diabetologia*, 2014, 57(4): 660-671. DOI: 10.1007/s00125-014-3171-6.
- [17] DING S J, XU S, MA Y, et al. Modulatory mechanisms of the NLRP3 inflammasomes in diabetes[J]. *Biomolecules*, 2019, 9(12): 850. DOI: 10.3390/biom9120850.
- [18] ZHENG X Q, WAN J, TAN G. The mechanisms of NLRP3 inflammasome/pyroptosis activation and their role in diabetic retinopathy[J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1151185. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1151185.
- [19] CHEN Y, YE X Y, ESCAMES G, et al. The NLRP3 inflammasome: contributions to inflammation-related diseases[J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2023, 28(1): 51. DOI: 10.1186/s11658-023-00462-9.
- [20] ZHANG X M, MIN X R, XIE H X, et al. Piperazine ferulate inhibits diabetic nephropathy by suppressing AGE/RAGE-mediated inflammatory signaling in rats and podocytes[J]. *Front Pharmacol*, 2024, 15: 1394369. DOI: 10.3389/fphar.2024.1394369.

(收稿日期: XXXX-XX-XX 修回日期: XXXX-XX-XX)

[引用本文]

江淼淼, 方金萍, 黄宗炫等. 葛根苓连汤改善糖尿病心肌损伤作用机制研究[J]. *实验动物与比较医学*, DOI:10.12300/j.issn.1674-5817.2025.212.
JIANG Miaomiao, FANG Jinping, HUANG Zongxuan, et al. Study on the Mechanism of Gegen Qinlian Decoction in Improving Myocardial Injury in Diabetes Mellitus[J]. *Laboratory Animal and Comparative Medicine*, DOI:10.12300/j.issn.1674-5817.2025.212.