

黄芪甲苷通过抑制 IL-17 信号通路改善糖尿病心肌病小鼠心功能

田小超^{1,2}, 刘玉¹, 方敬¹, 刘时乔¹, 张学琴¹, 陈志强^{3*}

1. 河北中医药大学, 河北 石家庄 050013

2. 河北医科大学第二医院, 河北 石家庄 050000

3. 河北省中医院, 河北 石家庄 050017

摘要: **目的** 探究黄芪甲苷对糖尿病心肌病 (diabetic cardiomyopathy, DCM) 小鼠的心肌保护作用及作用机制。**方法** 随机选取 10 只 db/m 小鼠作为对照组, 选取 30 只 db/db 小鼠将其随机分为模型组、黄芪甲苷 (40 mg/kg) 组和恩格列净 (10 mg/kg) 组, 每组 10 只; 采用酶联免疫吸附分析 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 法检测各组小鼠血清中肌酸激酶同工酶 (creatinase kinase-MB, CK-MB)、糖化血红蛋白 (glycated albumin, GA)、三酰甘油 (triglycerides, 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)、超氧化物歧化酶 (super oxide dismutase, SOD) 和白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 水平; 苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE)、Masson 和天狼星红染色观察各组小鼠心肌组织病理改变, 免疫组织化学法和 Western blotting 法检测小鼠心肌组织中 IL-1 β 、IL-6、CXC 趋化因子配体-10 (C-X-C motif chemokine ligand 10, CXCL-10) 和 IL-17 信号通路相关蛋白表达量, qRT-PCR 法检测小鼠心肌组织中 IL-1 β 、IL-6、IL-17 和 IL-17 受体 (interleukin-17 receptor, IL-17R) mRNA 表达量。**结果** 与对照组比较, 模型组小鼠血清中 CK-MB 活性、GA 含量、TG、LDL-C、SOD 和 IL-1 β 水平显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01); 心肌组织病理损伤明显, 心肌纤维染色不均程度加重, 心肌组织中呈紫红色心肌组织减少, 蓝染的胶原纤维增多, 心肌组织中呈红染的胶原纤维增多; 免疫组织化学检测结果显示, 心肌组织中 IL-1 β 、IL-6 和 CXCL-10 蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01); Western blotting 结果显示, 心肌组织中 IL-1 β 、IL-17、IL-17R、肿瘤坏死因子受体相关因子 6 (tumor necrosis factor receptor associated factor 6, TRAF6)、丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPKs)、c-Jun、核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) p65 蛋白表达量显著增加 ($P < 0.01$); qRT-PCR 结果显示, 心肌组织中 IL-1 β 、IL-6、IL-17 和 IL-17R mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。与模型组比较, 给予黄芪甲苷治疗后, DCM 小鼠血清中 CK-MB 活性、GA 含量、TG、LDL-C、SOD 和 IL-1 β 水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), HDL-C 水平显著升高 ($P < 0.05$); 心肌组织病理损伤减轻, 心肌纤维染色不均程度减轻, 心肌组织中以紫红色心肌组织为主, 蓝色胶原纤维减少, 心肌组织中红色胶原纤维减少; 免疫组织化学检测结果显示, 心肌组织中 IL-1 β 、IL-6 和 CXCL-10 蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$); Western blotting 结果显示, 心肌组织中 IL-1 β 、IL-17、IL-17R、TRAF6、MAPKs、c-Jun、NF- κ B p65 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01); qRT-PCR 结果显示, 心肌组织中 IL-1 β 、IL-6、IL-17 和 IL-17R mRNA 表达水平降低 ($P < 0.01$)。**结论** 黄芪甲苷可抑制炎症因子的表达、改善 DCM 小鼠心脏功能, 作用机制可能与抑制 IL-17 信号通路有关。

关键词: 糖尿病; 糖尿病心肌病; 黄芪甲苷; 炎症反应; IL-17

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)21-7335-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.21.014

Protective effect and mechanism of astragaloside IV on diabetic cardiomyopathy by inhibiting IL-17 signaling pathway

TIAN Xiaochao^{1,2}, LIU Yu¹, FANG Jing¹, LIU Shiqiao¹, ZHANG Xueqin¹, CHEN Zhiqiang³

1. Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050013, China

收稿日期: 2024-08-01

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (82274504); 河北省重点研发计划项目 (20377711D, 192777104D); 河北省自然科学基金项目 (H2023206203); 河北省中医药管理局科研计划项目 (2024038); 河北省医学科学研究课题计划 (20230474)

作者简介: 田小超 (1986—), 女, 博士研究生, 副主任医师, 主要研究方向为中西医结合防治心脏病的临床及基础研究。

E-mail: xiaochao_tian2009@126.com

*通信作者: 陈志强, 男, 博士, 教授, 主任医师, 博士生导师, 主要研究方向为中医药防治肾脏病的临床及基础研究。

E-mail: chenzhiqiang2011@163.com

2. The Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China
3. Hebei Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shijiazhuang 050017, China

Abstract: Objective To investigate the cardioprotective effects of astragaloside IV, an active component of the traditional Chinese medicine *Astragalus membranaceus*, on the myocardium of diabetic cardiomyopathy (DCM) mice, and to elucidate its underlying mechanisms. **Methods** A total of ten db/m mice were randomly selected as the control group, and 30 db/db mice were randomly divided into model group, astragaloside (40 mg/kg) group and engaglipzin (10 mg/kg) group, with ten mice in each group. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect creatine kinase-MB (CK-MB), glycated albumin (GA), triglycerides (TG), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), super oxide dismutase (SOD) and interleukin-1 β (IL-1 β) levels in serum of mice in each group. Hematoxylin-eosin (HE), Masson and Sirius red staining were used to observe pathological changes in myocardial tissue of mice in each group. Immunohistochemical and Western blotting methods were used to detect the expression levels of IL-1 β , IL-6, CXCL10 (CXCL-10) and IL-17 signaling pathway-related proteins in mouse myocardial tissue. The mRNA expression of *IL-1 β* , *IL-6*, *IL-17* and *IL-17R* in mice myocardial tissue was detected by qRT-PCR. **Results** Compared with control group, CK-MB activity, GA content, TG, LDL-C, SOD and IL-1 β levels in serum of mice in model group were significantly increased ($P < 0.05$, 0.01). Pathological damage to myocardial tissue was obvious, uneven degree of myocardial fiber staining was increased, purplish red myocardial tissue was reduced, blue-dyed collagen fibers were increased, and red-dyed collagen fibers were increased. Immunohistochemical test results showed that the expression of IL-1 β , IL-6 and CXCL-10 protein in myocardial tissue was significantly increased ($P < 0.05$, 0.01). Western blotting results showed that expression of IL-1 β , IL-17, IL-17R, tumor necrosis factor receptor associated factor 6 (TRAF6), mitogen activated protein kinase (MAPKs), c-Jun and nuclear factor-kappa B (NF- κ B) p65 proteins in myocardial tissue were significantly increased ($P < 0.01$). Results of qRT-PCR showed that the mRNA expression levels of *IL-1 β* , *IL-6*, *IL-17* and *IL-17R* in myocardial tissue were significantly decreased ($P < 0.05$, 0.01). Compared with model group, after treatment with astragaloside IV, CK-MB activity, GA content, TG, LDL-C, SOD and IL-1 β levels in serum of DCM mice were significantly decreased ($P < 0.05$, 0.01), while HDL-C level was significantly increased ($P < 0.05$). Pathological damage of myocardial tissue was alleviated, the degree of uneven staining of myocardial fibers was alleviated, the purplish red myocardial tissue was dominant, the blue collagen fibers were decreased, and the red collagen fibers were decreased. Immunohistochemical results showed that the expressions of IL-1 β , IL-6 and CXCL-10 in myocardial tissue were significantly decreased ($P < 0.05$). Results of Western blotting showed that the expression levels of IL-1 β , IL-17, IL-17R, TRAF6, MAPKs, c-Jun, NF- κ B p65 protein in myocardial tissue were significantly decreased ($P < 0.05$, 0.01). The mRNA expression levels of *IL-1 β* , *IL-6*, *IL-17* and *IL-17R* in myocardial tissue were decreased by qRT-PCR ($P < 0.01$). **Conclusion** Astragaloside IV inhibited inflammatory factor expression and improved cardiac function in DCM mice. This protective effect may be achieved by inhibiting IL-17 signaling pathway.

Keywords: diabetes; diabetic cardiomyopathy; astragaloside IV; inflammatory response; IL-17

糖尿病心肌病 (diabetic cardiomyopathy, DCM) 是由糖尿病 (diabetes mellitus, DM) 引起的最为严重的心血管并发症之一。2021 年国际糖尿病联盟 (international diabetes federation, IDF) 发布的调查报告显示^[1], 全球范围内患有糖尿病的成年人约 5.37 亿, 预计到 2030 年患病人数将增至 6.43 亿, 2045 年将达到 7.84 亿。因此, 糖尿病已经成为对人类健康造成威胁的重大问题。

DCM 的主要病理改变为心肌细胞肥大、坏死, 肌纤维大量丢失, 心肌细胞外间质胶原沉积、纤维化, 最终导致心脏收缩和舒张功能障碍, 甚至发展至心力衰竭导致患者死亡^[2-3], 严重危害患者的健康和生命安全。然而, DCM 的发病机制尚不完全明确,

临床主要通过控制血糖减缓其病变进程, 目前并无有效药物能针对性治疗 DCM^[4]。因此, 深入探索 DCM 的发病机制、发现新的治疗靶点、研发针对性有效药物迫在眉睫。

现代研究表明, 黄芪甲苷具有抑制炎症反应、氧化应激和抗病毒等药理作用^[5-6]。黄芪甲苷可通过调控 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) /髓样分化因子 88 (myeloid differentiation factor 88, MyD88) /核因子- κ B (nuclear factor-kappa B, NF- κ B) 信号通路抑制心肌梗死导致的炎症反应^[7], 还可通过调控小分子 RNA-1 (microRNA-1, miRNA-1) 抑制脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱发的心肌炎症反应^[8], 改善多种致病因素引起的心功能障碍, 发

挥心脏保护作用^[9-10], 提示黄芪甲苷可通过抑制炎症反应发挥心脏保护作用, 但其是否通过抑制炎症反应发挥心脏保护作用及分子机制尚未明确。据此, 本研究通过炎症指标、心肌损伤、心肌组织病理及白细胞介素-17 (interleukin-17, IL-17) 信号通路相关靶点的表达情况, 阐明黄芪甲苷治疗 DCM 的作用及分子机制, 为研发防治 DCM 的有效药物提供理论依据。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 db/db 小鼠 30 只和 db/m 小鼠 10 只, 7~8 周龄, 体质量 30~50 g, 由江苏省常州市卡文斯实验动物有限公司提供, 实验动物许可证号 SCXK9 (苏) 2021-0013。动物饲养于 12 h 昼夜循环、温度 20~25 °C、相对湿度 40%~70% 的环境下, 饲养期间动物自由饮食。本研究动物实验方案经河北中医药大学实验动物伦理委员会批准 (伦理号 DWLL202212011)。

1.2 药品与试剂

黄芪甲苷 (批号 C13366499, 质量分数 ≥95%), 购自上海麦克林生物科技有限公司; 恩格列净片 (国药准字 HJ20170351/HJ20201008, 批号 864070-44-0) 购自上海勃林格殷格翰医药公司; 三酰甘油 (triglycerides, TG) 检测试剂盒 (批号 76072401)、低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDL-C) 检测试剂盒 (批号 75512001)、高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDL-C) 均购自瑞士 Roche 公司; 肌酸激酶同工酶 (creatin kinase-MB, CK-MB) 检测试剂盒 (批号 40520B11)、糖化血红蛋白 (glycated albumin, GA) 检测试剂盒 (批号 40426B13) 购自北京安图公司; 超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 检测试剂盒 (批号 L221007573)、IL-1 β 检测试剂盒 (批号 B93253) 购自美国 Cloud-clone 公司; 苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色试剂盒 (批号 G1120)、Masson 染色试剂盒 (批号 G1340)、天狼星红染色试剂盒 (批号 S8060) 均购自北京 Solarbio 公司; 免疫组化通用小鼠/兔链霉卵白素-生物素法检测系统 (streptavidin-peroxidase, SP) 试剂盒 (批号 SP-9000)、HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗 (批号 ZB2301) 购自北京中杉金桥生物技术有限公司; RNA 提取试剂盒 (批号 LS1040)、RNA 逆转录酶

(批号 A5001)、PCR 试剂盒 (批号 A6002) 购自美国 Promega 公司; IL-1 β 抗体 (批号 GTX55675)、IL-6 抗体 (批号 GTX110527) 购自美国 GeneTex 公司; CXC 趋化因子配体-10 (C-X-C motif chemokine ligand 10, CXCL-10) 抗体 (批号 10937-1-AP)、丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen activated protein kinase, MAPKs) 抗体 (批号 11937-1-AP) 购自武汉 Proteintech Group 公司; IL-17 受体 (IL-17 receptor, IL-17R) 抗体 (批号 bs-2606R)、c-Jun 抗体 (批号 bs-0670R)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体 (批号 bs-2188R) 购自美国 Bioss 公司; 肿瘤坏死因子受体相关因子 6 (tumor necrosis factor receptor associated factor 6, TRAF6) 抗体 (批号 ab33915) 购自英国 Abcam 公司; NF- κ B p65 抗体 (批号 #8242) 购自美国 Cell Signaling Technolog 公司。

1.3 仪器

BSA124S-CW 型分析电子天平 (德国 Sartorius 公司); Milli-Q IQ 7003 型纯水仪 (德国默克公司); 5424R 型低温高速离心机 (德国 Eppendorf 公司); 酶标仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 电泳仪 (美国伯乐公司); TP1020 型组织脱水机、Arcadia H+C 型组织包埋机、HistoCore AUTOCUT 型全自动轮转式切片机 (德国徕卡公司); Aperio VERSA 8 型全景组织切片扫描仪 (德国徕卡公司); Omega Lum W 型化学发光分析仪 (美国 Aplegen 公司)。

2 方法

2.1 动物分组、造模及给药

选取 10 只 db/m 小鼠作为对照组。db/db 小鼠连续 3 次尾静脉取血, 空腹血糖 ≥16.7 mmol/L 即认为糖尿病模型^[11], 继续饲养 10 周后尾静脉取血, 检测小鼠心肌损伤情况。采用 Excel 软件生成随机数字, 将 30 只 db/db 小鼠随机分为模型组、黄芪甲苷组 (40 mg/kg) 和恩格列净组 (10 mg/kg), 每组 10 只。配制黄芪甲苷水溶液, 计算得出小鼠的给药剂量为 40 mg/kg^[12]; 配制恩格列净水溶液, 计算得出小鼠的给药剂量为 10 mg/kg^[13]。各给药组 ig 相应药物, 1 次/d, 连续给药 12 周, 对照组和模型组 ig 等体积蒸馏水。

2.2 ELISA 法检测各组小鼠血清中 TG、CK-MB、LDL-C、HDL-C、GA、SOD 和 IL-1 β 水平

各组小鼠末次给药后禁食不禁水 12 h, 摘眼球取血, 4 000 r/min、4 °C 离心 10 min, 取上清。根

据试剂盒说明书检测小鼠血清中 CK-MB 活性、GA 含量、TG、LDL-C、SOD 和 IL-1 β 水平。

2.3 HE 染色法观察心肌组织病理变化

迅速摘除小鼠心脏，取左心室前壁组织，固定于 4%多聚甲醛 24 h 后常规脱水包埋，切片厚度为 4 μ m，切片常规脱蜡至水，HE 染色，二甲苯透明，中性树胶封片，于光学显微镜下观察，采集图像，采用 Image-J 图像分析系统分析。

2.4 Masson 染色法观察心肌组织纤维化改变

组织固定于 4%多聚甲醛 24 h 后常规脱水包埋，切片厚度为 4 μ m，常规脱蜡至水后，Masson 染色，二甲苯透明，中性树胶封片，于光学显微镜下观察，采集图像，采用 Image-J 图像分析系统分析。

2.5 天狼星红染色法观察心肌组织纤维化改变

组织于 4%多聚甲醛中固定 24 h，常规脱水包埋，切片厚度 4 μ m，常规脱蜡至水，天狼星红染色液滴染 1 h 后，洗涤切片表面染液，常规脱水透明，中性树胶封固，于显微镜下观察并采集图像。

2.6 免疫组织化学技术检测心肌组织中 IL-1 β 、IL-6 和 CXCL-10 蛋白表达

石蜡切片厚度 4 μ m，脱蜡至水，60 $^{\circ}$ C 烘烤 45 min 后，经二甲苯 I、II、III 脱蜡及梯度乙醇水化，热修复抗原。封闭后，滴加适量一抗(1:200)，4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。次日，滴加二抗，DAB 显色，苏木素复染胞核，脱水，透明，中性树胶封片。于光学显微镜下观察，每张切片随机选取 5 个不同视野采集图像，采用 Image-J 图像分析系统分析。

2.7 Western blotting 检测心肌组织 IL-1 β 、IL-17、IL-17R、TRAF6、MAPKs、c-Jun、NF- κ B p65 蛋白表达

将各组待测样品分别称定质量，剪碎后于液氮中研磨至细粉末状，分装于离心管中，加入 RIPA 裂解液，充分混匀，冰浴 30 min，4 $^{\circ}$ C、12 000 $\times g$ 离心 10 min，取上清。用改良的 Lowry 法进行蛋白定量，蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳，转至 PVDF 膜，5%脱脂奶粉封闭 2 h，经一抗、二抗孵育后，采用 ECL 化学发光法检测信号强度，利用 Bio 1D 图像分析软件进行分析。

2.8 qRT-PCR 检测心肌组织中 IL- β 、IL-6、IL-17 和 IL-17R mRNA 表达

采用 Trizol 法从各组的样本中提取总 RNA。根据 RNA 逆转录酶试剂盒说明书进行反转录，将样品于 PCR 仪中进行扩增，PCR 扩增产物用 1%

琼脂糖凝胶电泳分离，扫描成像，以 GAPDH 为内参，利用凝胶成像分析系统进行分析。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	序列 (5'-3')
IL-17	F: TCTTTAACTCCCTTGCGCA R: TCAGGGTCTTCATTGCGGTG
IL-17R	F: AGTTCCCAAGCCAGTTGCAG R: GCAGAATGGCGATGAGTGTG
IL-1 β	F: TGCCACCTTTTGACAGTGATG R: TGATGTGCTGCTGCCGAGATT
IL-6	F: GACAAAGCCAGAGTCCTTCAGA R: TGTGACTCCAGCTTATCTCTTGG
GAPDH	F: GCATCTTCTTGTGCAGTGCC R: TACGGCCAAATCCGTTACA

2.9 统计学分析

采用 SPSS 21.0 软件对数据进行统计分析，以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间比较采用卡方检验，若满足正态性再采用 Levene's Test 进行两组间方差齐性检验，若方差齐则采用 Tukey Test 检验进行组间两两比较，多组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA)，若方差不齐则采用非参数秩和检验。

3 结果

3.1 对 DCM 小鼠血清中 CK-MB 活性、GA 含量的影响

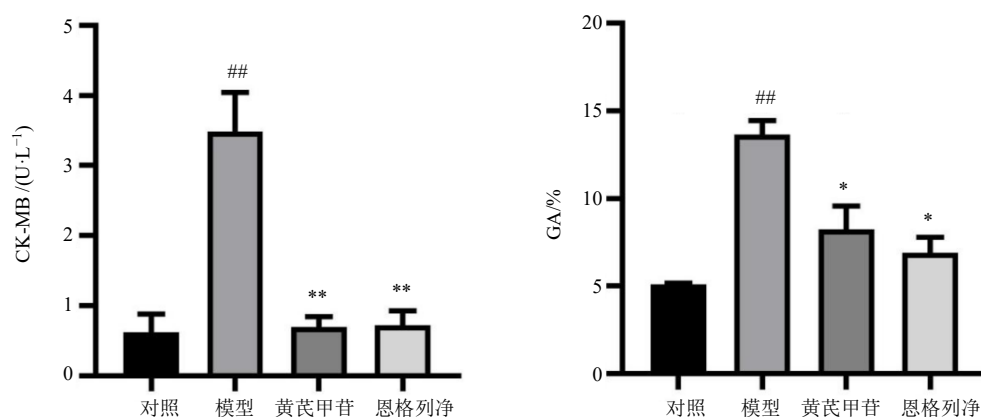
如图 1 所示，与对照组比较，模型组小鼠血清中 CK-MB 活性和 GA 含量显著升高 ($P < 0.01$)；与模型组比较，黄芪甲苷组小鼠血清中 CK-MB 活性和 GA 含量明显降低 ($P < 0.05$)。

3.2 对 DCM 小鼠血清中 TG、LDL-C 和 HDL-C 水平的影响

如图 2 所示，与对照组比较，模型组小鼠血清中 TG、LDL-C 水平显著升高 ($P < 0.05$ 、0.01)，HDL-C 水平无明显变化；与模型组比较，黄芪甲苷组小鼠血清中 TG、LDL-C 水平明显降低，HDL-C 水平升高 ($P < 0.05$ 、0.01)。

3.3 对 DCM 小鼠血清中 SOD 和 IL-1 β 水平的影响

如图 3 所示，与对照组比较，模型组小鼠血清中 SOD 和 IL-1 β 水平显著升高 ($P < 0.05$ 、0.01)；与模型组比较，黄芪甲苷组小鼠血清中 SOD 和 IL-1 β 水平降低 ($P < 0.05$ 、0.01)。



与对照组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$, 下图同。
[#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group, same as below figures.

图 1 黄芪甲苷对小鼠血清中 CK-MB 活性和 GA 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 1 Effects of astragaloside IV on CK-MB activity and GA content in serum of mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

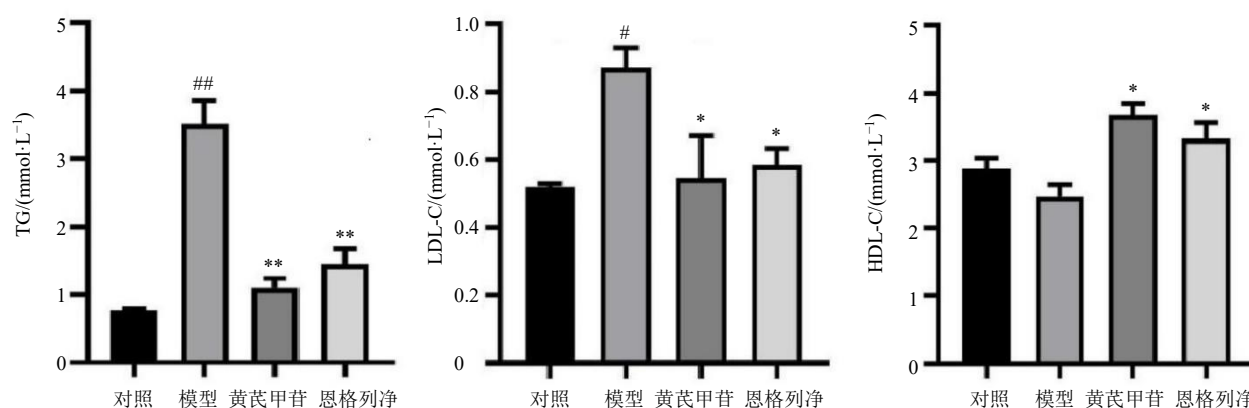


图 2 黄芪甲苷对小鼠血清中 TG、LDL-C 和 HDL-C 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 2 Effects of astragaloside IV on levels of TG, LDL-C and HDL-C in serum of mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

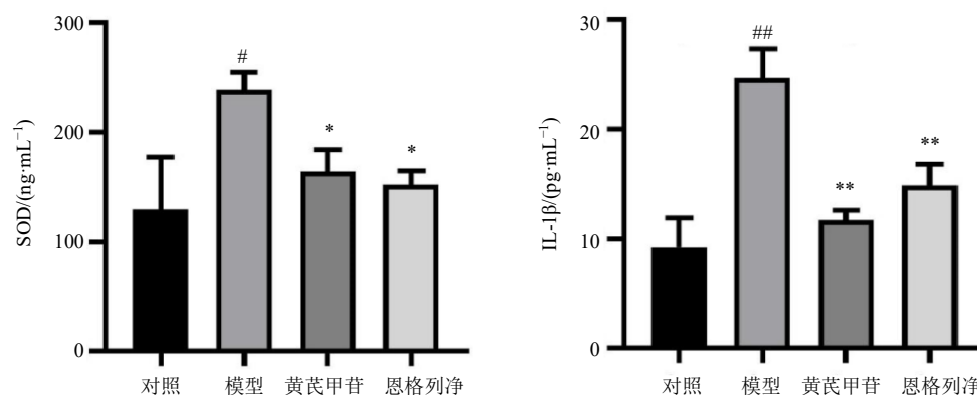


图 3 黄芪甲苷对小鼠血清中 SOD 和 IL-1β 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 3 Effects of astragaloside IV on level of SOD and IL-1β in serum of mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

3.4 对 DCM 小鼠心肌组织病理形态的影响

HE 染色结果显示,对照组小鼠心肌组织中心肌纤维紧密排列,细胞核清晰,胞浆着色均一。模型组心肌纤维数量明显减少,心肌纤维

横径增宽,心肌胞浆着色不均,颜色深浅不一,心肌细胞间连接松散,心肌纤维完整性及连续性较差;黄芪甲苷组小鼠心肌纤维出现不同程度的染色不均,但与模型组比较该情况有所减

轻 (图 4)。

Masson 染色结果显示, 对照组小鼠心肌组织形态完整、清晰, 镜下视野呈紫红色, 可见少量蓝染的胶原组织; 模型组小鼠心肌组织排列紊乱, 呈紫红色心肌组织减少, 蓝染的胶原纤维增多; 与模型组比较, 给予黄芪甲苷治疗后小鼠均以紫红色心肌组织为主, 蓝染的胶原纤维减少 (图 5)。

天狼星红染色结果显示, 对照组小鼠心肌组织可见少量红染的胶原纤维; 与对照组比较, 模型组小鼠心肌组织排列紊乱, 呈红染的胶原纤维增多; 与模型组比较, 给予黄芪甲苷治疗后小鼠心肌组织呈红染的胶原纤维减少 (图 6)。

3.5 对 DCM 小鼠心肌组织中 IL-1 β 、IL-6 和 CXCL-10 蛋白表达的影响

免疫组织化学检测结果显示, 与对照组比较, 模型组小鼠心肌细胞中 IL-1 β 、IL-6 和 CXCL-10 棕黄色阳性颗粒明显增多 ($P<0.01$); 与模型组比较, 给予黄芪甲苷治疗后小鼠心肌组织中 IL-1 β 、IL-6 和 CXCL-10 蛋白棕黄色阳性颗粒减少 ($P<0.01$), 表明黄芪甲苷可抑制 DCM 小鼠心肌组织中 IL-1 β 、IL-6 和 CXCL-10 蛋白表达 (图 7)。

3.6 对 DCM 小鼠心肌组织中 IL-17 和 IL-17R 蛋白表达水平的影响

如图 8 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠心肌组织中 IL-17 和 IL-17R 蛋白表达量显著升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 黄芪甲苷组小鼠心肌组织中 IL-17 和 IL-17R 蛋白表达量显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01)。

3.7 对 DCM 小鼠心肌组织中 TRAF6 和 NF- κ B p65 蛋白表达水平的影响

如图 9 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠心肌组织中 TRAF6 和 NF- κ B p65 蛋白表达量显著升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 黄芪甲苷组小鼠心肌组织中 TRAF6 和 NF- κ B p65 蛋白表达量显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01)。

3.8 对 DCM 小鼠心肌组织中 MAPKs 和 c-Jun 蛋白表达水平的影响

如图 10 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠心肌组织中 MAPKs 和 c-Jun 蛋白表达量显著升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 黄芪甲苷组小鼠心肌组织中 MAPKs 和 c-Jun 蛋白表达量显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01)。

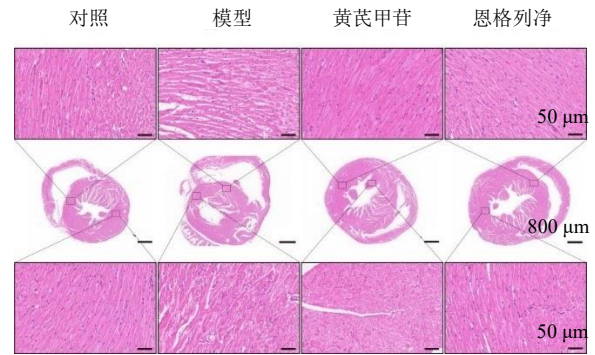


图 4 各组小鼠心肌组织病理学改变 (HE, $\times 200$)

Fig. 4 Histopathologic morphological changes in myocardial tissue of mice in each group (HE, $\times 200$)

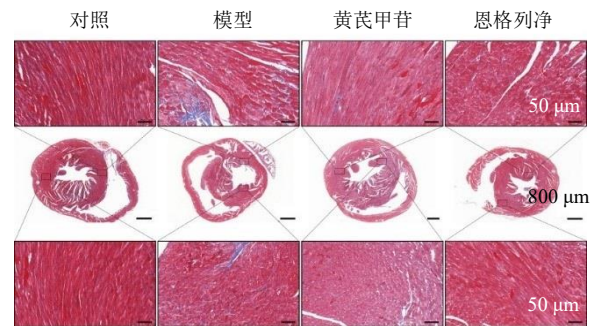


图 5 各组小鼠心肌组织病理学改变 (Masson, $\times 200$)

Fig. 5 Histopathologic morphological changes in myocardial tissue of mice in each group (Masson, $\times 200$)

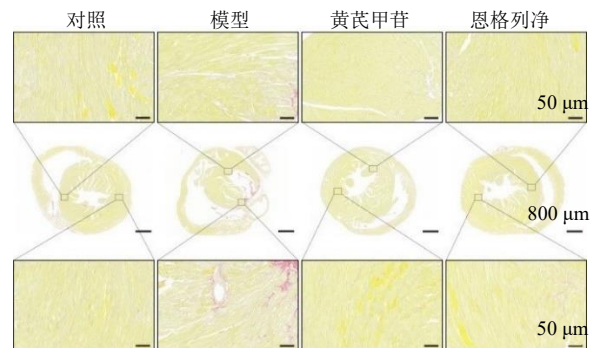


图 6 各组小鼠心肌组织病理学改变 (天狼星红, $\times 200$)

Fig. 6 Histopathologic morphological changes in myocardial tissue of mice in each group (sirius scarlet, $\times 200$)

3.9 对 DCM 小鼠心肌组织中 IL-1 β 和 CXCL-10 蛋白表达水平的影响

如图 11 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠心肌组织中 IL-1 β 和 CXCL-10 蛋白表达量显著升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 黄芪甲苷组小鼠心肌组织中 IL-1 β 和 CXCL-10 蛋白表达量显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01)。

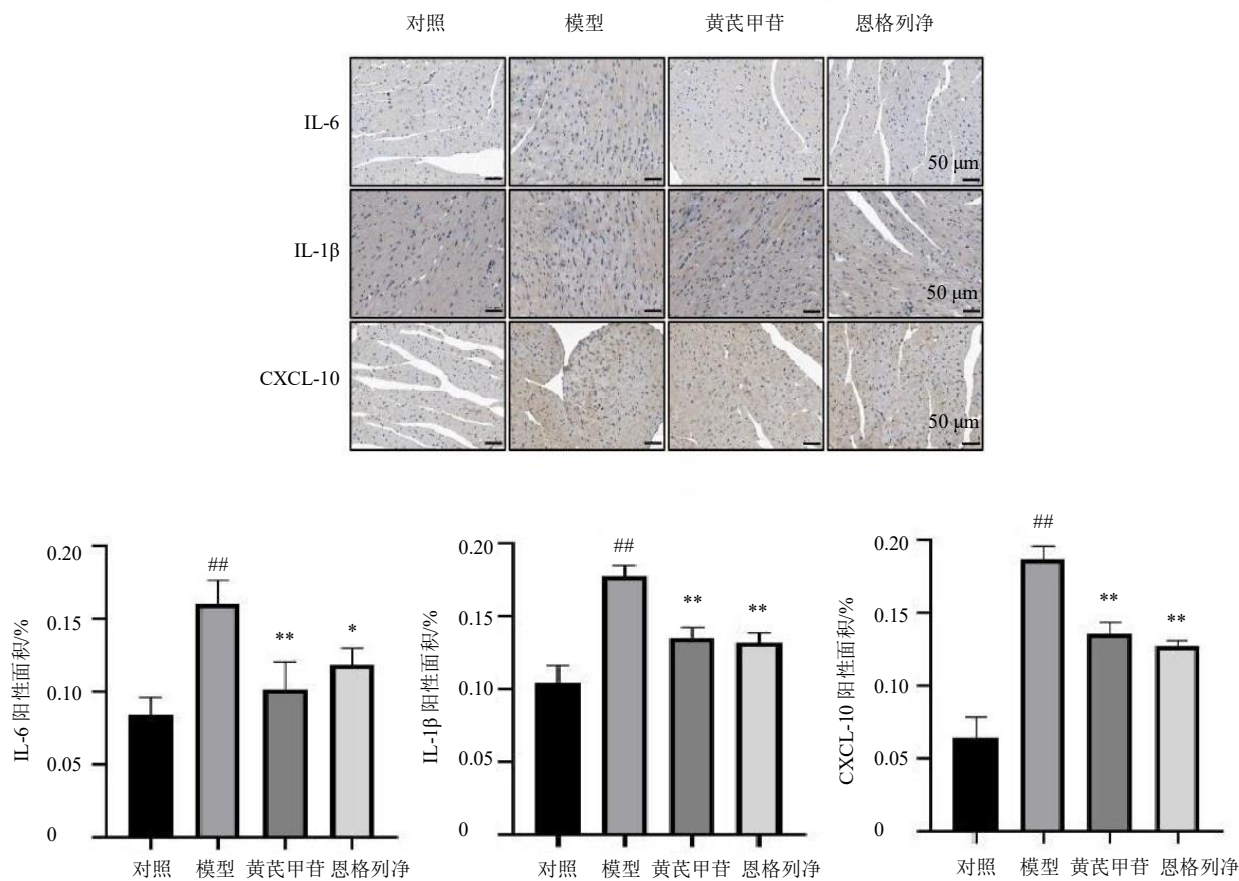


图 7 黄芪甲苷对小鼠心肌组织中 IL-6、IL-1 β 、CXCL-10 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 7 Effects of astragaloside IV on regulation of IL-6, IL-1 β and CXCL-10 in myocardial tissue of mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

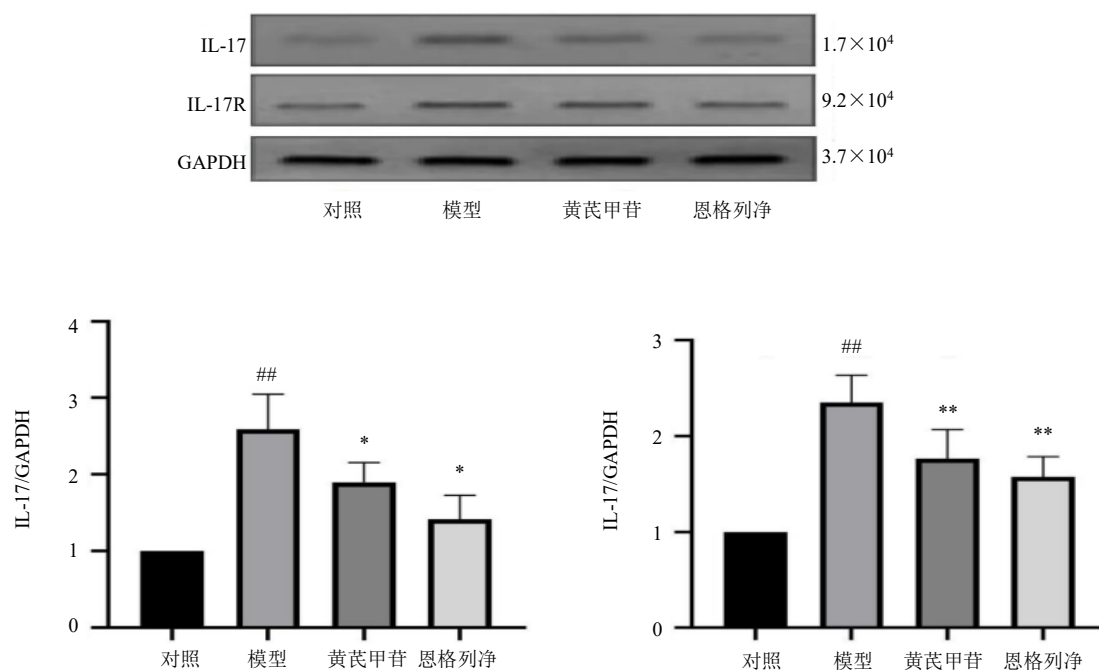


图 8 黄芪甲苷对小鼠心肌组织中 IL-17 和 IL-17R 蛋白表达量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 8 Effects of astragaloside IV on regulation of IL-17 and IL-17R in myocardial tissue of mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

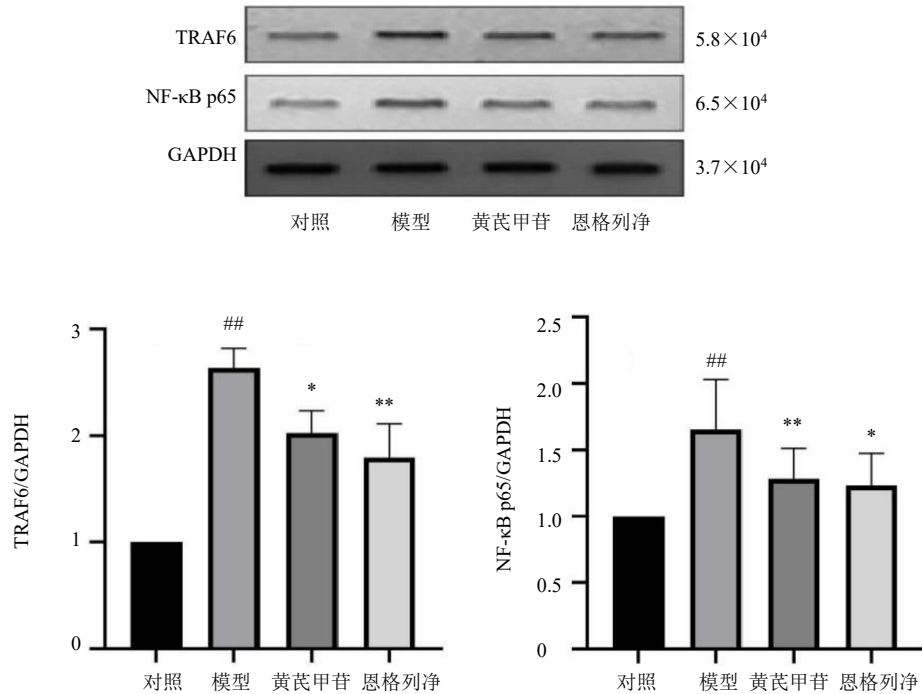


图 9 黄芪甲苷对小鼠心肌组织中 TRAF6 和 NF-κB p65 蛋白表达量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 9 Effects of astragaloside IV on regulation of TRAF6 and NF-κB p65 in myocardial tissue of mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

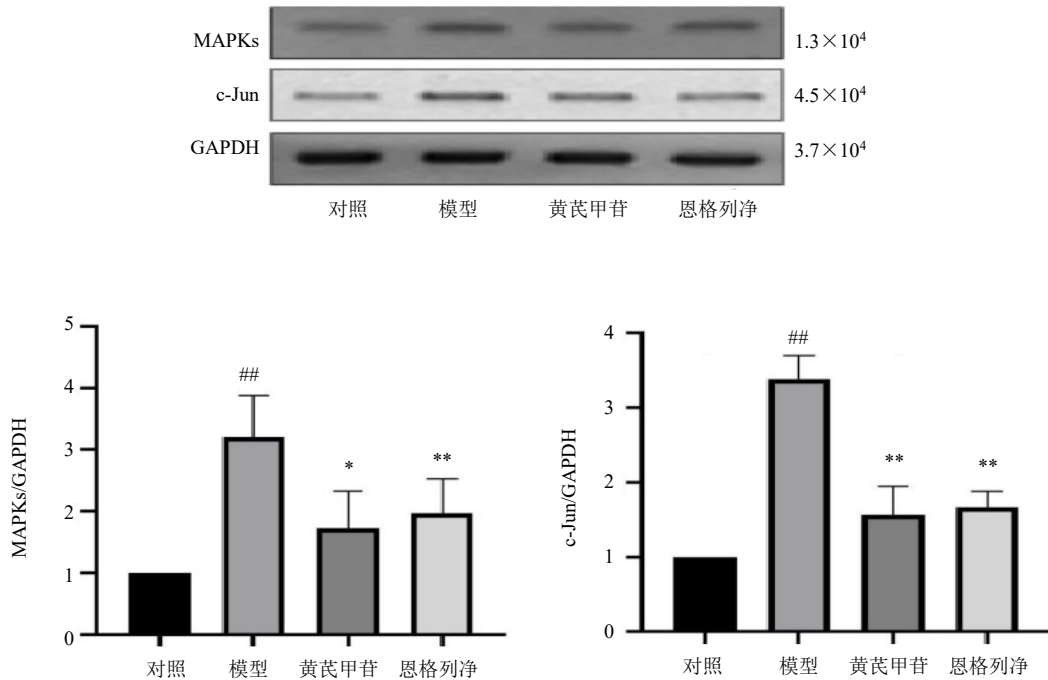


图 10 黄芪甲苷对小鼠心肌组织中 MAPKs 和 c-Jun 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 10 Effects of astragaloside IV on regulation of MAPKs and c-Jun in myocardial tissue of mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3.10 对 DCM 小鼠心肌组织中 *IL-1β*、*IL-6*、*IL-17* 和 *IL-17R* mRNA 表达水平的影响

如图 12 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠心肌组织中 *IL-1β*、*IL-6*、*IL-17* 和 *IL-17R* mRNA

表达水平显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01); 与模型组比较, 黄芪甲苷组小鼠心肌组织中 *IL-1β*、*IL-6*、*IL-17* 和 *IL-17R* mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

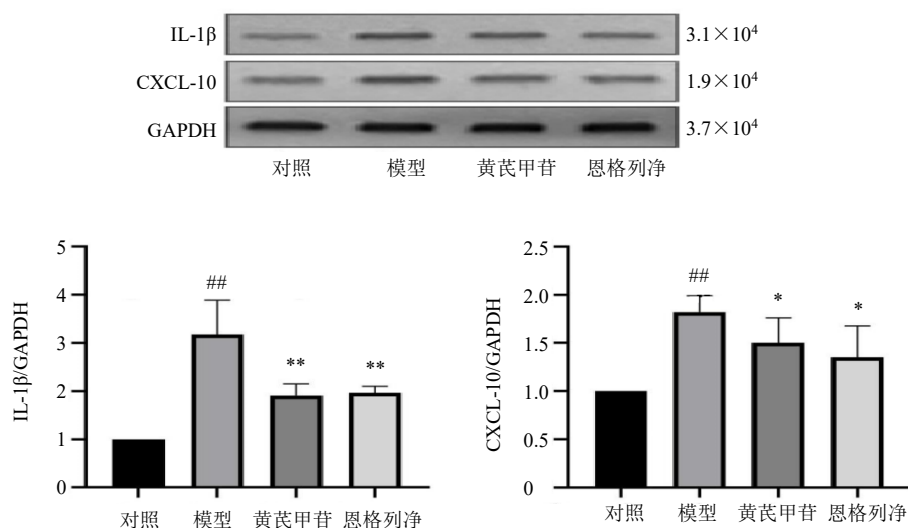


图 11 黄芪甲苷对小鼠心肌组织中 IL-1β 和 CXCL-10 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 11 Effects of astragaloside IV on regulation of IL-1β and CXCL-10 in myocardial tissue of mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

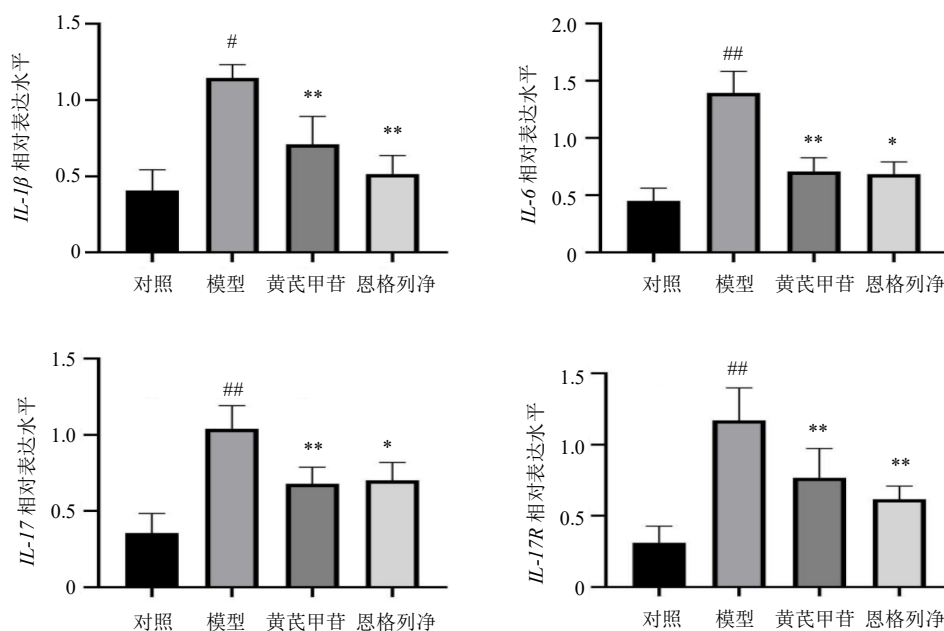


图 12 黄芪甲苷对小鼠心肌组织 IL-1β、IL-6、IL-17、IL-17R mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 12 Effects of astragaloside IV on regulation of IL-1β, IL-6, IL-17 and IL-17R mRNA in myocardial tissue of mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

4 讨论

慢性炎症反应、氧化应激、细胞凋亡等因素是 DCM 的主要发病机制，据此，抑制炎症反应、维持氧化应激平衡和拮抗细胞凋亡是治疗 DCM 的突破点^[14-15]。研究表明，高良姜素通过抑制 DCM 小鼠血清 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 等炎症因子释放发挥抗炎作用，逆转 DCM 小鼠病变进程^[16]。黄芩苷可通过抑制炎症反应和调节氧化应激保护 DCM 小鼠的心功能^[17]。沉默调节蛋白 6 (sirtuin 6, Sirt6) 的特异性抑制剂 OSS-128167 通过加重炎症反应

和氧化应激反应加速 DCM 小鼠的病变^[18]。联合应用二甲双胍与阿托伐他汀可抑制 2 型糖尿病小鼠炎症反应和氧化应激反应，从而拮抗 DCM 的病变^[19]。本研究结果显示，黄芪甲苷可能通过抑制心肌细胞炎症反应发挥心肌保护作用，而黄芪甲苷发挥心肌保护作用的具体分子机制还需进一步研究。

IL-17 信号通路是介导炎症反应的重要通路，IL-17 由 Th17 细胞分泌，CD4⁺T 淋巴细胞活化后可分化包括 Th17 细胞在内的 Th1、Th2 和 Th17 细

胞。IL-17 是一种由 155 个氨基酸组成的同型二聚体糖蛋白, 相对分子质量为 3.2×10^4 Da。IL-17 是 Th17 细胞主要效应因子, 该家族包括 6 个成员的配体 (IL-17A~IL-17F) 和 5 个受体 (IL-17RA~IL-17RD 和 SEF)。IL-17 是炎症反应的早期启动因子, 可促进上皮细胞、内皮细胞等产生多种细胞因子, 如 IL-6、IL-8、粒细胞-巨噬细胞刺激因子 (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF) 及细胞黏附分子 1 (cellular adhesion molecule 1, CAM-1), 从而导致炎症的产生。IL-17 与受体结合后可通过激活 MAPK 途径和 NF- κ B 途径发挥其生物学作用^[20-21]。Th17 细胞除分泌产生 IL-17 外, 还可分泌 IL-6、TNF- α 等炎性因子, 以上细胞因子可集体动员、募集及活化中性粒细胞。在此过程中, IL-17 能有效地介导中性粒细胞动员的兴奋过程, 从而介导组织的炎症反应。

TRAF6 作为衔接分子参与 IL-17 炎症信号通路的传导^[22]。TRAF6 是一种 E3 泛素连接酶, 可通过激活 TLR4/NF- κ B 信号通路抑制巨噬细胞 M2 极化, 参与机体炎症反应^[23-24]。TRAF6 作为一个开关, 在炎症反应中发挥关键作用。NF- κ B 作为一种转录因子, 生物学活性广泛, 参与炎症反应、免疫反应等生物学过程^[25]。有研究证实 NF- κ B 作为 TRAF6 下游的衔接分子参与 IL-17 炎症信号通路的传导^[22]。NF- κ B 的表达对心脏炎症发挥至关重要作用^[26], 通过抑制 NF- κ B 介导的炎症反应有可能阻断炎症损害恶性循环, 减轻心肌损伤程度^[27-28]。本研究结果显示, 黄芪甲苷治疗后, DCM 小鼠心肌组织中 TRAF6、NF- κ B 与 IL-17 和 IL-17R 表达水平的变化相一致, 表明 TRAF6 和 NF- κ B 可能是 IL-17 信号通路中的衔接分子, 协同参与炎症反应。

MAPK 是信号从细胞表面传导到细胞核内部的重要传递者。MAPK 是级联反应中的第 3 级激酶, 在一定条件下可被激活, 并作用于下游相应分子, 调节特定基因的表达, 从而调控细胞增殖、分化、炎症反应等多种生理、病理过程^[29]。活化蛋白 1 (activated protein-1, AP-1) 是细胞内的一种转录激活因子, 由 c-Fos 和 c-Jun 组成的异二聚体。AP-1 可控制细胞分化、增殖和凋亡等进程。c-Jun 可以作为转录激活因子激活 AP-1 表达, 还可以作为转录因子参与细胞迁移等生物活动^[30]。有研究表明, MAPK/AP-1 信号通路参与细胞增殖、

衰老和炎症反应^[31-33]。本研究结果显示, 黄芪甲苷治疗后, DCM 小鼠心肌组织中 MAPK 和 c-Jun 表达量与 IL-17 变化趋势一致, 结合文献关于 IL-17 信号通路的报道^[22], 推测 MAPK 和 c-Jun 也可参与 IL-17 信号通路的传导, 从而介导黄芪甲苷改善 DCM 小鼠心功能。

本研究证明了黄芪甲苷可通过抑制炎症反应改善 DCM 小鼠的心功能。由此推测, 黄芪甲苷可通过抑制 IL-17 信号通路, 并进一步抑制 TRAF6/NF- κ B p65 和 MAPK/c-Jun 通路减少炎性相关因子 IL-1 β 和 CXCL-10 的表达发挥心脏保护作用 (图 13)。

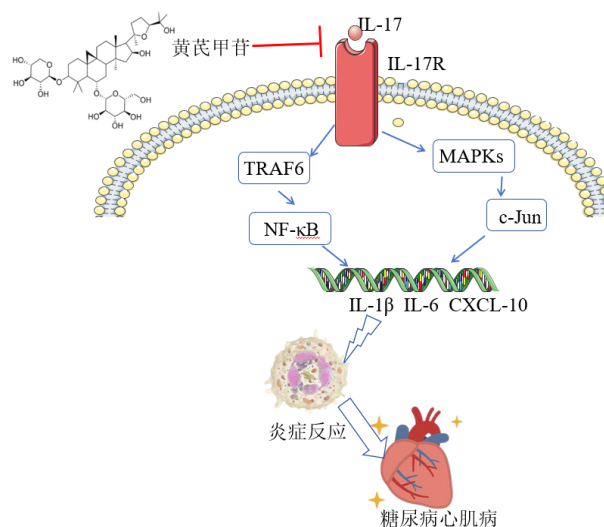


图 13 黄芪甲苷作用机制图

Fig. 13 Mechanism of astragaloside IV alleviating DCM in mice by regulating IL-17 signaling pathway

综上, 本研究表明黄芪甲苷可以改善 DCM 小鼠心功能, 其作用机制可能与黄芪甲苷抑制 IL-17 信号通路相关。本研究为 DCM 的临床防治奠定了基础, 为研发针对 DCM 的新的有效药物提供理论依据。但黄芪甲苷不同剂量对 DCM 作用的量效关系以及黄芪甲苷缓解 DCM 的具体分子机制尚未阐明, 有待在今后的研究中深入探讨。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Rajbhandari J, Fernandez C J, Agarwal M, *et al.* Diabetic heart disease: A clinical update [J]. *World J Diabetes*, 2021, 12(4): 383-406.
- [2] Jia G H, Whaley-Connell A, Sowers J R. Diabetic cardiomyopathy: A hyperglycaemia- and insulin-resistance-induced heart disease [J]. *Diabetologia*, 2018,

- 61(1): 21-28.
- [3] Marfella R, Sardu C, Mansueto G, *et al.* Evidence for human diabetic cardiomyopathy [J]. *Acta Diabetol*, 2021, 58(8): 983-988.
- [4] 李向庚, 高媛, 杨浩, 等. 利拉鲁肽防治糖尿病心肌病的研究进展 [J]. 临床医学研究与实践, 2024, 9(4): 21-24.
- [5] 王绍鹏, 杨光远, 林鸿扬, 等. 黄芪甲苷的药理作用研究进展 [J]. 广东化工, 2021, 48(24): 48-49.
- [6] Li D, Liu Y T, Qin X M. Rapid quantitative analysis of 12 chemical constituents in wild-simulated and cultivated *Astragali Radix* based on UHPLC-MS [J]. *Chin Herb Med*, 2022, 14(3): 464-469.
- [7] Shi H, Zhou P, Gao G, *et al.* Astragaloside IV prevents acute myocardial infarction by inhibiting the TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway [J]. *J Food Biochem*, 2021, 45(7): e13757.
- [8] Wang Q N, Chen W Y, Yang X F, *et al.* Inhibition of miRNA-1-mediated inflammation and autophagy by astragaloside IV improves lipopolysaccharide-induced cardiac dysfunction in rats [J]. *J Inflamm Res*, 2022, 15: 2617-2629.
- [9] 吴红伟, 李东辉, 张育贵, 等. 黄芪甲苷对心脏保护作用的研究现状 [J]. 中国临床药理学杂志, 2021, 37(1): 81-83.
- [10] 于淼, 郭松霖, 杨凯晶, 等. 黄芪及其制剂治疗心力衰竭的研究进展 [J]. 中医药学报, 2021, 49(6): 94-99.
- [11] Zhang ZY, Long C, Guan YF, *et al.* Hepatocyte growth factor intervention to reduce myocardial injury and improve cardiac function on diabetic myocardial infarction rats [J]. *Eur J Histochem*, 2020, 64(s2): 3142.
- [12] 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.
- [13] Bugger H, Abel E D. Molecular mechanisms of diabetic cardiomyopathy [J]. *Diabetologia*, 2014, 57(4): 660-671.
- [14] Li C G, Zhang J, Xue M, *et al.* SGLT2 inhibition with empagliflozin attenuates myocardial oxidative stress and fibrosis in diabetic mice heart [J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2019, 18(1): 15.
- [15] 汪四海, 方朝晖, 马格非, 等. 基于炎症反应、氧化应激和细胞凋亡研究中药防治糖尿病心肌病的机制进展 [J]. 中国临床保健杂志, 2023, 26(6): 854-860.
- [16] Abukhalil M H, Althunibat O Y, Aladaileh S H, *et al.* Galangin attenuates diabetic cardiomyopathy through modulating oxidative stress, inflammation and apoptosis in rats [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 138: 111410.
- [17] Xu L J, Chen R C, Zhang X, *et al.* Scutellarin protects against diabetic cardiomyopathy via inhibiting oxidative stress and inflammatory response in mice [J]. *Ann Palliat Med*, 2021, 10(3): 2481-2493.
- [18] Huang Y B, Zhang J K, Xu D D, *et al.* SIRT6-specific inhibitor OSS-128167 exacerbates diabetic cardiomyopathy by aggravating inflammation and oxidative stress [J]. *Mol Med Rep*, 2021, 23(5): 367.
- [19] Jia W K, Bai T, Zeng J, *et al.* Combined administration of metformin and atorvastatin attenuates diabetic cardiomyopathy by inhibiting inflammation, apoptosis, and oxidative stress in type 2 diabetic mice [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 634900.
- [20] Beringer A, Noack M, Miossec P. IL-17 in chronic inflammation: From discovery to targeting [J]. *Trends Mol Med*, 2016, 22(3): 230-241.
- [21] Li X X, Bechara R, Zhao J J, *et al.* IL-17 receptor-based signaling and implications for disease [J]. *Nat Immunol*, 2019, 20(12): 1594-1602.
- [22] 牛世伟, 龚红霞, 付晓燕. IL-17 及其介导的信号通路在胃癌中的研究进展 [J]. 医学研究生学报, 2022, 35(6): 660-663.
- [23] Liu X Q, Lin Z F, Xu Y F. Pellino1 promoted inflammation in lung injury model of sepsis by TRAF6/NF- κ B signal pathway [J]. *J Inflamm*, 2021, 18(1): 11.
- [24] Huo L L, Sun Z R. MiR-128-3p alleviates TNBS-induced colitis through inactivating TRAF6/NF- κ B signaling pathway in rats [J]. *Kaohsiung J Med Sci*, 2021, 37(9): 795-802.
- [25] Tian J J, Zhao Y Y, Wang L L, *et al.* Role of TLR4/MyD88/NF- κ B signaling in heart and liver-related complications in a rat model of type 2 diabetes mellitus [J]. *J Int Med Res*, 2021, 49(3): 300060521997590.
- [26] Wang C H, Bao Q, Hou C, *et al.* Mono-macrophage-derived MANF alleviates bacterial myocarditis by inhibiting NF- κ B activation and myocardial inflammation [J]. *Inflammation*, 2021, 44(5): 1916-1926.
- [27] Lv H, Tian M, Hu P, *et al.* Overexpression of miR-365a-3p relieves sepsis-induced acute myocardial injury by targeting MyD88/NF- κ B pathway [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2021, 99(10): 1007-1015.
- [28] 马金玲, 冷锦红. 基于 NF- κ B 通路探讨中医药治疗糖尿病心肌病研究进展 [J]. 河南中医, 2024, 44(2): 317-324.
- [29] Seo J, Koçak D D, Bartelt L C, *et al.* AP-1 subunits

- converge promiscuously at enhancers to potentiate transcription [J]. *Genome Res*, 2021, 31(4): 538-550.
- [30] Papavassiliou A G, Musti A M. The multifaceted output of c-Jun biological activity: Focus at the junction of CD8 T cell activation and exhaustion [J]. *Cells*, 2020, 9(11): 2470.
- [31] Guo H Y, Ji J, Wei K M, *et al.* MAPK/AP-1 and ROS participated in ratio- and time-dependent interaction effects of deoxynivalenol and cadmium on HT-29 cells [J]. *Food Chem Toxicol*, 2021, 148: 111921.
- [32] Nguyen Q T N, Fang M Z, Zhang M Y, *et al.* *Crataegus laevigata* suppresses LPS-induced oxidative stress during inflammatory response in human keratinocytes by regulating the MAPKs/AP-1, NF- κ B, and NFAT signaling pathways [J]. *Molecules*, 2021, 26(4): 869.
- [33] Jin Y J, Ji Y, Jang Y P, *et al.* *Acer tataricum* subsp. *ginnala* inhibits skin photoaging via regulating MAPK/AP-1, NF- κ B, and TGF β /smad signaling in UVB-irradiated human dermal fibroblasts [J]. *Molecules*, 2021, 26(3): 662.

[责任编辑 罗 曦]