

# 石斛合剂通过调控 Sirt3 介导的线粒体自噬通路缓解大鼠糖尿病心肌病

林心君<sup>1</sup>, 何昱霖<sup>2</sup>, 施红<sup>1</sup>, 刘佳绣<sup>2</sup>, 胡海霞<sup>3</sup>

福建中医药大学<sup>1</sup>中西医结合学院,<sup>2</sup>中西医结合研究院,<sup>3</sup>科技创新与转化中心, 福建 福州 350122

**摘要:**目的 研究石斛合剂通过 Sirt3 介导的线粒体自噬通路改善糖尿病心肌病的作用机制。方法 将 40 只雄性 SPF 级 SD 大鼠分为对照组、模型组、二甲双胍组、石斛合剂组 ( $n=10$ )。对照组用生理盐水灌胃, 其它组用高脂高糖饮食喂养 12 周和 1.0% 链脲佐菌素 (25 mg/kg) 腹腔注射后, 模型组用生理盐水继续灌胃, 二甲双胍组则用二甲双胍溶液 (100 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>) 灌胃, 石斛合剂组用石斛合剂溶液 (16.7 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>) 灌胃, 持续干预 4 周。给药期间监测空腹血糖和心重指数, 应用比色法检测甘油三酯 (TG)、总胆固醇 (TC)、低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C)、乳酸脱氢酶 (LDH) 的含量; 酶联免疫法检测脑钠肽 (BNP)、C 反应蛋白 (CRP)、 $\alpha$ -肿瘤坏死因子 (TNF- $\alpha$ )、介素-6 (IL-6) 的水平; HE 及 Masson 染色观察心脏组织病理改变; 应用透射电镜观察心肌细胞的线粒体及自噬体的超微结构; RT-PCR 实验检测 Sirt3、FoxO3a、PINK1、Parkin、P62、LC3 的基因表达水平; Western blotting 和免疫组化法检测 Sirt3、FoxO3a、p-FoxO3a、PINK1、Parkin、LC3、P62 的蛋白表达水平。结果 与对照组相比, 模型组、二甲双胍组和石斛合剂组的空腹血糖、心重指数明显升高 ( $P<0.01$ ), 大鼠血清中 TC、TG、LDL-C、LDH、CRP、BNP 和心肌组织中的 TNF- $\alpha$ 、IL-6 含量显著增加 ( $P<0.01$ ), HDL-C 显著降低 ( $P<0.01$ ), 心肌纤维排列紊乱, 线粒体肿胀溶解, Sirt3、FoxO3a、PINK1、Parkin、LC3 的基因表达水平明显下降, P62 表达水平升高 ( $P<0.05$ ); Sirt3、p-FoxO3a/FoxO3a 值、PINK1、Parkin、LC3 的蛋白表达水平显著降低, P62 蛋白水平升高 ( $P<0.05$ )。与模型组相比, 石斛合剂组能显著降低空腹血糖水平和心重指数 ( $P<0.01$ ), 同时降低 LDH、CRP、BNP、TNF- $\alpha$ 、IL-6 的含量及 TC、TG、LDL-C 的水平 ( $P<0.01$ ), 升高 HDL-C 的水平 ( $P<0.01$ ), 抑制心肌纤维化, 修复线粒体, 促使自噬体产生, 上调线粒体自噬基因 Sirt3、FoxO3a、PINK1、Parkin、LC3 ( $P<0.01$ ), 下调 P62 的基因表达水平 ( $P<0.01$ ), 同时升高 Sirt3、PINK1、Parkin、LC3 蛋白水平和 p-FoxO3a/FoxO3a 比值 ( $P<0.05$ ), 降低 P62 的蛋白水平 ( $P<0.01$ )。石斛合剂与二甲双胍组相比差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。结论 石斛合剂可能通过 Sirt3 调节线粒体自噬途径改善糖尿病心肌病的组织损伤及线粒体功能。

**关键词:** 糖尿病心肌病; 石斛合剂; 线粒体自噬; Sirt3 途径

## Shihu Mixture alleviates diabetic cardiomyopathy in rats by Sirt3-mediated upregulation of myocardial mitochondrial mitophagy pathway

LIN Xinjun<sup>1</sup>, HE Yulin<sup>2</sup>, SHI Hong<sup>1</sup>, LIU Jiaxiu<sup>2</sup>, HU Haixia<sup>3</sup>

<sup>1</sup>College of Integrative Medicine, <sup>2</sup>Academy of Integrative Medicine, <sup>3</sup>Innovation and Transformation Center, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China

**Abstract: Objective** To explore the mechanism of Shihu Mixture (SHM) for improving diabetic cardiomyopathy. **Methods** Thirty male SD rats were randomized into 3 groups ( $n=10$ ) for type 2 diabetes mellitus modeling by high-fat and -sugar feeding for 12 weeks and intraperitoneal streptozotocin injection, followed by treatment with daily gavage of normal saline (model group), metformin solution, or SHM extract for 4 weeks, with 10 normally fed rats as the normal control group. Fasting blood glucose and cardiac weight index of the rats were monitored, and their TG, TC, LDL-C, HDL-C, and LDH levels were determined; serum and myocardial levels of BNP, CRP, TNF- $\alpha$  and IL-6 were detected with ELISA. Myocardial pathological changes and ultrastructures of myocardial mitochondria and autophagosomes were examined with HE and Masson staining and transmission electron microscopy. Myocardial expressions of Sirt3, FoxO3a, PINK1, Parkin, P62, and LC3 mRNAs and proteins were detected with RT-qPCR, Western blotting, and immunohistochemistry. **Results** Compared with those in the control group, the rats in the other 3 groups showed significantly increased fasting blood glucose, cardiac weight index, serum TC, TG, LDL-C, LDH, CRP and BNP levels and myocardial levels of TNF- $\alpha$  and IL-6 with lowered HDL-C level, obvious myocardial and mitochondrial pathologies, and dysregulated expression of Sirt3, FoxO3a, p-FoxO3a, PINK1, Parkin, LC3 and P62. Treatment of the rat models with SHM extract significantly reduced fasting blood glucose level and cardiac weight index, lowered the levels of LDH, CRP, BNP, TNF- $\alpha$ , IL-6, TC, TG, and LDL-C, increased HDL-C level, alleviated myocardial and mitochondrial damages, promoted autophagosome formation, and improved dysregulation of mitochondrial autophagy-related gene expression, showing similar effects to metformin. **Conclusion** SHM alleviates myocardial damage and improves mitochondrial function in rats with diabetic cardiomyopathy by regulating the mitochondrial autophagy pathway through Sirt3. **Keywords:** diabetic cardiomyopathy; Shihu Mixture; mitophagy; Sirt3 pathway

收稿日期: 2025-06-10

基金项目: 国家自然科学基金 (81973827); 福建省自然科学基金 (2023J01332, 2019J01332); 福建中医药大学校管课题 (X2022006)

Supported by National Natural Science Foundation of China (81973827).

作者简介: 林心君, 博士, 教授, E-mail: 18960878167@163.com

通信作者: 胡海霞, 博士, 副研究员, E-mail: asunnyhaixia@163.com

糖尿病及其并发症糖尿病心肌病 (DCM) 已成为全球流行病, 目前全球约有 4.63 亿人受其影响, 预计到 2045 年将增至 7 亿例<sup>[1]</sup>。DCM 是糖尿病的主要并发症, 长期控糖不佳、合并肥胖或高血压、血脂异常的糖尿病患者 DCM 风险显著升高, 且 DCM 是糖尿病患者死

亡的主要原因。高血糖可引起心肌细胞代谢紊乱,心脏的血管基底膜变厚、间质纤维化。早期的DCM表现为舒张功能障碍和左心室肥厚,而在中晚期,收缩功能障碍会出现,并可能伴有心肌纤维化和细胞凋亡<sup>[2]</sup>,最终导致左心室收缩功能受损、舒张功能障碍和心室肥厚,甚至引发心衰<sup>[3]</sup>。

DCM是严重心血管事件的主要原因之一,以线粒体功能障碍、氧化应激和DNA损伤为主要特征<sup>[4]</sup>,心肌细胞的线粒体进行性损伤会导致脂质积累并最终致使糖尿病心脏损害<sup>[5,6]</sup>,使糖尿病患者的预后恶化<sup>[7]</sup>。生理状态下,心肌细胞依赖线粒体产生能量以维持心脏收缩功能,而在高糖状态下,心肌葡萄糖诱导电子传导链亚单位产生和线粒体蛋白乙酰化,损害线粒体功能,导致心脏的舒缩功能受损<sup>[8]</sup>。线粒体自噬是一种发生在功能失调线粒体中的自噬类型,主要是通过清除异常线粒体,从而防止氧化应激并减少心肌细胞凋亡,修复受损心肌组织,改善糖尿病心肌病的的心脏功能,在糖尿病心肌病中发挥着保护作用<sup>[9-11]</sup>。沉默信息调节因子3(Sirt3)在线粒体稳态中发挥关键作用,并对糖尿病心肌病的发生发展具有保护作用<sup>[12]</sup>。适度的线粒体自噬可改善糖尿病心肌病的的心脏功能<sup>[13]</sup>,是DCM的潜在治疗靶点,调控线粒体自噬可能降低DCM的心肌功能损伤,为DCM的预防和治疗提供新的干预策略。研究表明,高血糖环境下,心肌细胞中的Sirt3介导的线粒体自噬通路被抑制<sup>[14]</sup>,导致脂质堆积和能量代谢障碍,而激活Sirt3则可恢复心肌细胞自噬并保护心肌细胞免于凋亡,提示通过Sirt3调控线粒体自噬可能改善糖尿病心脏的心脏功能。

从中医学范畴而言,DCM属于“消渴”、“胸痹”、“惊悸”和“怔忡”,其病机是由于气阴两虚、脏腑功能紊乱,痰、湿、瘀、热等病理产物积聚,久病入络,心脉受损<sup>[15]</sup>。石斛合剂具有滋阴益气清热,活血化瘀,解郁祛浊毒的功效,是糖尿病及其并发症的疗效显著的中药复方(国家专利号ZL201110408411.0)。方药组成为石斛、黄芪、五味子、葛根、丹参、黄连、地龙、知母。其中,君药为石斛和黄芪,石斛味甘,性微寒,补充胃部和肾脏的津液,增强脾胃运化功能,滋阴补津。黄芪甘温,改善人体的气血运行,促进血液循环。臣药为知母、葛根、丹参,其中知母清热泻火,滋阴润燥;葛根解肌退热,生津止渴;丹参活血化瘀,缓解疼痛;三者相互为用,清热化瘀解毒。黄连、地龙、五味子、为佐使药,其中黄连清热解毒,燥湿泻火;地龙通经活络,祛瘀生新;五味子调节心肺、滋肾安神;全方共奏滋阴清热,益气活血,化瘀泻浊之功。前期研究已表明石斛合剂可通过调控多种病理机制抑制糖尿病的进展,包括调节糖尿病脂代谢、抑制

肝糖异生<sup>[16]</sup>,抑制糖尿病模型大鼠中肝细胞的mTOR活性、促进AMPK磷酸化和自噬因子LC3 II表达,减轻糖尿病肝损伤<sup>[17]</sup>,进一步研究发现石斛合剂还可抑制糖尿病心肌细胞的钙超载,提示其可能通过维持糖尿病心肌钙稳态缓解糖尿病合并的心肌损伤<sup>[18]</sup>。然而,石斛合剂保护心肌细胞治疗糖尿病心肌病的具体病理机制尚不完全清楚,因此本研究旨在探讨石斛合剂通过Sirt3调节线粒体自噬进而改善DCM的作用机制,为石斛合剂临床防治糖尿病心肌病提供确切的实验基础和理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

SPF级雄性SD大鼠40只(6周龄,体质量200±20g,上海斯莱克实验动物有限公司)。福建中医药大学实验动物平台常规饲养,自由饮食饮水,温度(20±2)°C,湿度40%~60%,每12h交替明暗环境。本研究经福建中医药大学实验动物伦理委员会审核通过(伦理批号:FJTCM-IACUC-2021037)。

### 1.2 实验药物

盐酸二甲双胍片规格为0.5g/片(中美上海施贵宝有限公司)。中药复方石斛合剂(福建中医药大学国医堂),组成为石斛12g、黄芪20g、五味子10g、知母10g、葛根15g、丹参20g、黄连8g、地龙9g。药物制备过程为用蒸馏水浸泡药材30min,大火煮开后调小火慢煎30min,过滤药渣后加适量蒸馏水,调小火对药汁继续浓缩30min。依前法行二次过滤后混合两次中药液,过滤后分装,-20°C冰箱保存备用。

### 1.3 主要仪器

血糖仪(罗氏);酶标仪(特宝);石蜡切片机(LEICA);化学发光成像仪(BIO-RAD);实时荧光定量PCR仪(Applied Biosyste)。

### 1.4 主要试剂

链脲佐菌素(STZ,sigma);叉头框蛋白O3a(FoxO3a)、p-FoxO3a、PINK1、LC3、Sirt3、Beclin-1、 $\beta$ -actin抗体(Proteintech);Parkin、P62抗体(Abcam);甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒(南京建成生物工程研究所);脑钠肽(BNP)、C反应蛋白(CRP)试剂盒(上海蓝基生物科技有限公司);大鼠肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-6(IL-6)ELISA试剂盒(碧云天生物技术有限公司);mRNA逆转录试剂盒、基因扩增试剂盒(南京vazyme公司)。动物高脂饲料(10%猪油、60.7%基础饲料、15%蔗糖、4%胆固醇、10%蛋黄粉和0.3%胆酸盐,福建省福州市吴氏实验动物贸易有限公司)。

### 1.5 糖尿病心肌病大鼠模型制备与干预

雄性SD大鼠40只,适应性饲养1周,随机分组为对照(NC)组10只:基础饲料喂养,行生理盐水( $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ )灌胃;模型(DCM)组10只:高脂高糖饮食喂养12周,联合腹腔注射1.0% STZ( $25\text{ mg/kg}$ ,2次,注射间隔时间72 h),大鼠尾尖静脉抽血测量空腹血糖和随机血糖水平,连续两次空腹血糖水平超过 $11.1\text{ mmol/L}$ 或随机血糖水平超过 $16.7\text{ mmol/L}$ ,即可认定糖尿病模型构建成功<sup>[9]</sup>,之后行生理盐水( $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ )灌胃4周;二甲双胍(MET)组10只:高脂高糖饮食喂养12周,MET溶液( $100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ )灌胃4周;石斛合剂(SHM)组10只:高脂高糖饮食喂养12周,石斛合剂溶液( $16.7\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ )灌胃4周。药物灌胃干预结束后取材,前1d禁食禁水12 h,腹腔注射20%乌拉坦( $0.5\text{ mL}/100\text{ g}$ )麻醉大鼠后进行腹主动脉取血, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $15\text{ 000 r/min}$ 离心15 min,取上层血清置于 $1.5\text{ mL EP}$ 管中,于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

### 1.6 大鼠空腹血糖和心重指数的变化情况

大鼠在高脂饲料喂养期间每周监测空腹血糖。大鼠禁食但不禁饮水12 h,当大鼠精神状态稳定时,使用一次性无菌采血针抽取尾静脉血液,使用血糖仪测量血糖并记录。STZ注射造模后,连续2 d每天测空腹血糖1次,药物干预后连续4周,每周测1次空腹血糖,干预前后称量大鼠体质量和心脏重量,并计算心重指数(CWI):全心重量(mg)/体质量(g)。

### 1.7 比色法检测TG、TC、LDL-C、HDL-C、LDH的含量

将各组血清样本置于96孔板,同时设置空白孔、标准孔,每组设3个复孔。按试剂盒说明在各孔加入工作液,室温孵育1 h后在 $510\text{ nm}$ 、 $530\text{ nm}$ 处用酶标仪检测吸光度 $A$ ,利用标准曲线计算出样本的指标浓度。

### 1.8 酶联免疫法检测BNP、CRP、TNF- $\alpha$ 、IL-6的含量

将各组大鼠血清或心脏组织蛋白提取液加入96孔板,设置空白孔、样本孔和标准孔,并设3个复孔,封板后放入 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温箱孵育30 min,用洗涤液洗板3次,各孔加入显色液后混匀,放入 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 温箱继续孵育15 min后加入终止液,将孔板置于酶标仪,测量吸光度 $A_{450\text{ nm}}$ 值。

### 1.9 心脏组织HE染色

将心脏组织切片脱蜡后,浸入苏木精染液10 min使细胞核呈蓝色,流水冲洗后再经盐酸乙醇分化、水洗蓝化后,用伊红染色2 min使细胞质染成粉红色,随后通过梯度乙醇脱水、二甲苯透明,最后滴加中性树胶封片,即可在显微镜下观察组织细胞形态。

### 1.10 心脏组织Masson染色

制备心脏组织切片后,滴加苏木素染色液 $50\text{ }\mu\text{L}$ 染色心肌细胞核,流水缓流冲洗3 min,用酸性乙醇溶液分化10 s后,流水冲洗3 min,接着滴加 $50\text{ }\mu\text{L}$  Masson蓝化液反蓝4 min,用蒸馏水缓慢冲洗玻片1 min,用 $40\text{ }\mu\text{L}$ 丽春红品红染色液染色5 s,蒸馏水清洗,用弱酸溶液、

磷酸清洗后将苯胺蓝染色液均匀染色30 s后用弱酸性溶液清洗1 min,进行脱水、中性树胶封片后用生物显微镜拍照。

### 1.11 透射电镜观察心肌细胞内线粒体和自噬体的超微结构

药物干预后手术取出大鼠心脏,冰上用PBS溶液冲洗将心肌样品放入2.5%戊二醛溶液固定24 h,用 $0.1\text{ mol/L}$ 的磷酸溶液清洗3次,每次15 min。将1.0%锇酸溶液浸泡3 h,用磷酸溶液清洗后进行脱水操作,然后进行组织包埋和固定,经超薄切片机切片(厚度 $50\sim 60\text{ nm}$ ),用4%醋酸铀和枸橼酸铅进行双染色,使用透射电镜随机选取视野观察心肌样本,拍摄心肌组织的自噬体和线粒体的形态。

### 1.12 RT-qPCR 实验检测心脏组织线粒体自噬基因的表达水平

用超低温研磨仪将心脏组织充分研磨,加入 $1\text{ mL}$  RNA isolater 完全溶解30 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$   $12\text{ 000 r/min}$ 离心5 min,提取组织总RNA并检测RNA的浓度后进行逆转录,获取cDNA产物。引物由上海铂尚生物技术有限公司设计,引物序列为Sirt3:F,5'-CGCGAGTACAA CTTTCTTGC-3'; R,5'-CCTTCTGACCCATACCCAC C-3',FoxO3a:F,5'-CTCGGACTCTCTCTCAGGCT-3'; R,5'-CGGCATCCATGAGTTCGCTA-3',PINK1:F,5'-TGTCGTCTCAAAGGGAGCAG-3'; R,5'-TGTTG CTGAACCCAAGGCT-3'; Parkin:F,5'-CTCAGACAA GGACACATCAGTAG-3'; R,5'-GCGGTGGTTACATT GGAAGA-3'; P62:f,5'-GCACTACCGCGATGAGGA TG-3'; R,5'-TCACAAATCACGTTGGGGTG-3'; LC3:F,5'-TTGGTCAAGATCATCCGGCG-3'; R,5'-AGCC GAAGGTTTCTTGGGAG-3';  $\beta$ -actin:F,5'-CGCGAG TACAACCTTCTTGC-3'; R,5'-CCTTCTGACCCATA CCCACC-3'。配置 $20\text{ }\mu\text{L}$ 反应体系,应用荧光定量仪进行基因扩增, $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性3 min, $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  10 s、 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  34 s进行40个循环反应,获得样本Ct值,以 $\beta$ -actin为内参,计算 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 分析基因的相对表达量。

### 1.13 Western blotting 实验检测心脏组织线粒体自噬通路蛋白的表达水平

用预冷蛋白裂解液在超低温研磨仪中提取心脏组织总蛋白, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $12\text{ 000 r/min}$ 离心10 min获取蛋白样本后用BCA实验测定蛋白质浓度,蛋白变性后计算蛋白含量,进行SDS-PAGE电泳。用无水甲醇浸润5 min的PVDF膜转膜,5%脱脂牛奶室温封闭2 h,TBST清洗PVDF膜3次,每次5 min。按试剂盒添加一抗Sirt3(1:1000)、FoxO3a(1:5000)、p-FoxO3a(1:5000)、PINK1(1:1000)、Parkin(1:1000)、 $\beta$ -actin(1:1000)于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 摇床孵育过夜,TBST洗膜3次,每次10 min。二抗(1:5000)室温孵育1 h,洗膜后用显影液滴加在PVDF膜上显影,呈

像并拍照,β-actin作为内参进行半定量分析。

### 1.14 免疫组化实验检测心脏组织线粒体自噬相关蛋白的表达水平

心脏组织经固定、脱水、透明处理,用石蜡包埋成块,切成厚度约5 μm的薄片,贴附在载玻片上,放入二甲苯脱蜡,用不同浓度乙醇水化后进行抗原修复,阻断性内源性过氧化物酶浸润后清洗,每张玻片滴加50 μL山羊血清于37 °C烘箱封闭30 min,用P62(1:100)、LC3(1:100)一抗过夜孵育,清洗后继续进行二抗(1:500)室温孵育,滴加50 μL链霉素抗生物素-过氧化物酶覆盖玻片,放入37 °C烘箱中孵育30 min后,滴加30 μL DAB显色1 min,清洗后中性树胶封片,在光学显微镜下观察和拍照并进行相关表达量分析。

### 1.15 统计学分析

所有实验数据以均数±标准差表示,结果用SPSS

25.0软件进行统计学分析。采用单因素ANOVA分析和t检验进行组间比较,单因素ANOVA分析多组间的差异,LSD方法来进行两两比较,P<0.05为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 石斛合剂对大鼠血糖和心重指数的影响

治疗0、7、14、21、28 d时,与对照组相比,模型组、二甲双胍组和石斛合剂组的空腹血糖明显升高(P<0.01)。治疗前,空腹血糖在3组间无显著差异(P>0.05),治疗7 d后,与模型组相比,石斛合剂组空腹血糖显著下降(P<0.05);治疗14、21、28 d时,石斛合剂与二甲双胍组空腹血糖均明显下降(P<0.01)。与对照组相比,模型组心重指数(CWI)显著增加,而石斛合剂和二甲双胍干预可明显降低CWI,但两组干预比较无统计学意义(图1)。

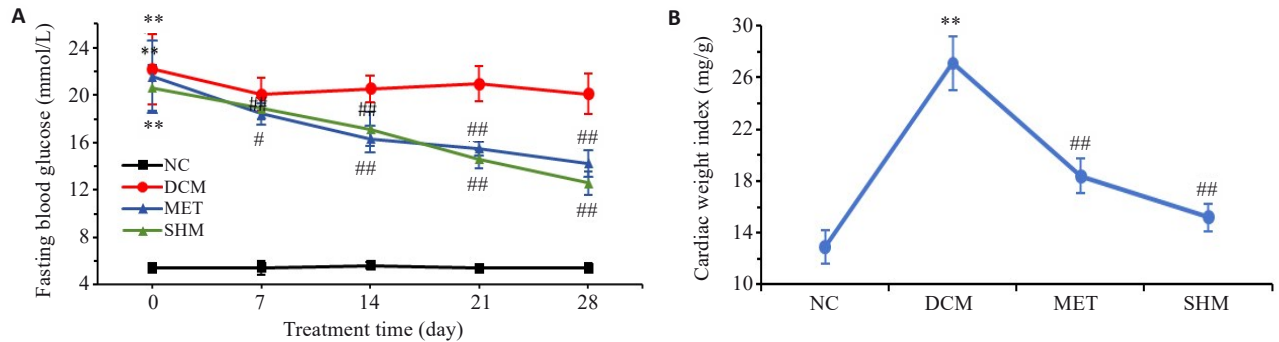


图1 大鼠空腹血糖和心重指数的变化情况

Fig.1 Changes in fasting blood glucose and cardiac weight index of the rats. n=3,\*\*P<0.01 vs NC group; #P<0.05, ##P<0.01 vs DCM group. NC: Normal control group; DCM: Model group; MET: Metformin-treated group; SHM: Shihu mixture-treated group.

### 2.2 石斛合剂对大鼠血脂的影响

与对照组相比,模型组TC、TG、LDL-C显著升高(P<0.01),HDL-C显著降低(P<0.01)。与模型组相比,石斛合剂组与二甲双胍组TC、TG、LDL-C显著下降(P<0.01),HDL-C则显著升高(P<0.01),两组间差异无统计学意义(P>0.05,图2)。

### 2.3 大鼠LDH、TNF-α、IL-6、CRP、BNP含量测定

与对照组相比,模型组、二甲双胍组和石斛合剂组的大鼠血清中LDH、CRP、BNP和心肌组织中的TNF-α、IL-6含量明显升高(P<0.01);与模型组比,石斛合剂组和二甲双胍组LDH、CRP、BNP、TNF-α、IL-6含量显著下降(P<0.01),两组间差异无统计学意义(P>0.05,表1)。

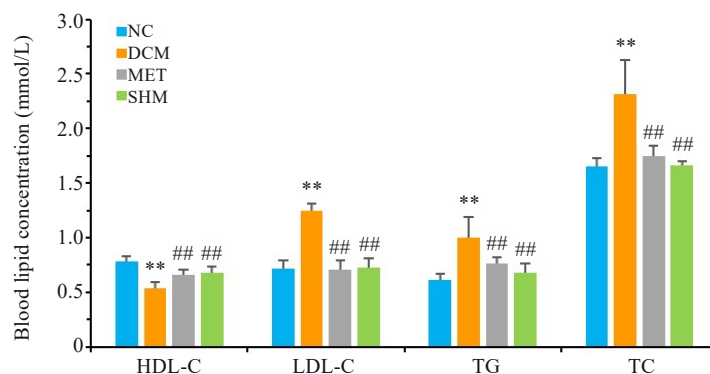


图2 石斛合剂对大鼠血脂水平的影响情况

Fig.2 Effect of Shihu mixture (SHM) on blood lipid levels in the rat models. n=3, \*\*P<0.01 vs NC group; ##P<0.01 vs DCM group.

表1 大鼠血清LDH、CRP、BNP和大鼠心肌TNF- $\alpha$ 、IL-6的含量Tab.1 Contents of LDH, CRP and BNP in rat serum and TNF- $\alpha$ , IL-6 in rat myocardium ( $n=3$ )

Group	LDH (mmol/L)	CRP (ng/mL)	BNP (pg/mL)	TNF- $\alpha$ (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)
NC	1388.6 $\pm$ 105.4	1.40 $\pm$ 0.01	72.67 $\pm$ 4.92	30.28 $\pm$ 4.25	18.72 $\pm$ 5.42
DCM	2002.9 $\pm$ 112.2**	2.98 $\pm$ 0.08**	173.89 $\pm$ 4.24**	156.36 $\pm$ 16.62**	64.62 $\pm$ 8.51**
MET	1659.0 $\pm$ 73.1 <sup>#</sup>	2.47 $\pm$ 0.06 <sup>#</sup>	137.77 $\pm$ 4.69 <sup>#</sup>	62.82 $\pm$ 9.35 <sup>#</sup>	22.12 $\pm$ 6.23 <sup>#</sup>
SHM	1613.6 $\pm$ 83.3 <sup>#</sup>	2.25 $\pm$ 0.08 <sup>#</sup>	128.84 $\pm$ 7.48 <sup>#</sup>	83.17 $\pm$ 8.02 <sup>#</sup>	34.08 $\pm$ 5.83 <sup>#</sup>

\*\* $P<0.01$  vs NC group; <sup>#</sup> $P<0.01$  vs DCM group.

## 2.4 大鼠心肌组织的病理变化情况

对照组的心肌细胞结构清晰,胞核(呈蓝色)胞质(呈粉红色)分布均匀有序。模型组心肌细胞结构不完整,胞质间隙增大,胞核分布不均。石斛合剂组和二甲双胍组的心肌细胞排列紧凑,结构较模型组更加清晰、

完整(图3A)。

与对照组相比,模型组大鼠心肌纤维之间蓝染的胶原纤维含量显著增加,心肌纤维化程度显著提升。与模型组相比,二甲双胍组和石斛合剂组心肌胶原纤维含量显著降低,心肌纤维化的进程受到明显抑制(图3B)。

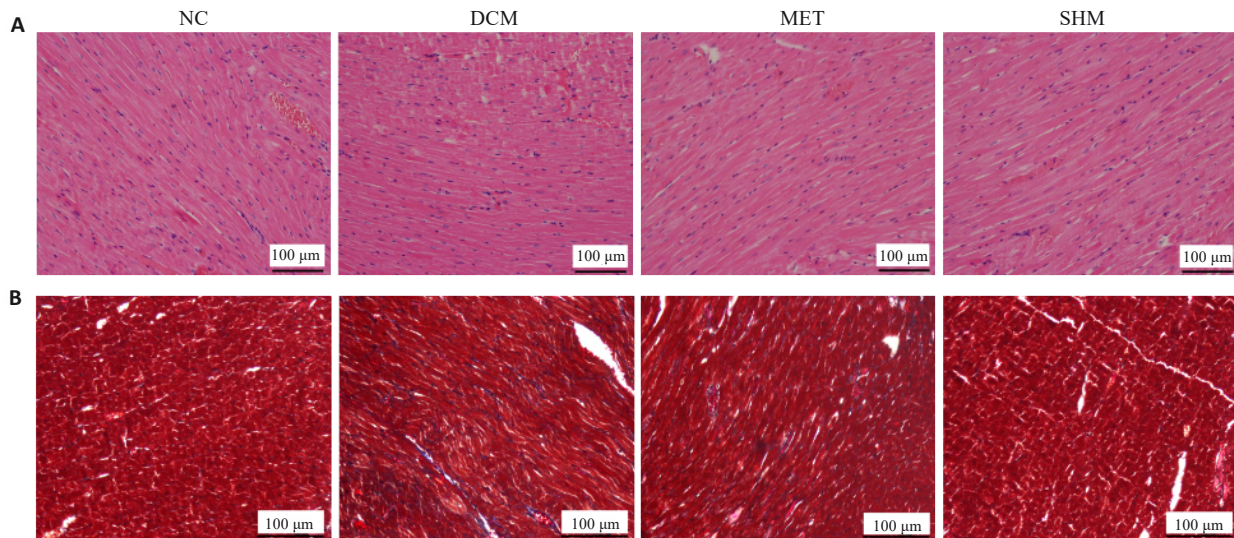


图3 大鼠心肌组织HE和Masson染色情况

Fig.3 HE and Masson staining of rat myocardial tissue. A: HE staining. B: Masson staining.

## 2.5 大鼠心肌线粒体和自噬体形态变化情况

对照组大鼠心肌纤维结构完整,心肌小节清晰,心肌线粒体排列整齐,线粒体和心肌小节垂直交叉;单个线粒体为椭圆形,有内外膜双层结构。线粒体脊和脊线清晰,排列整齐。模型组心肌纤维排列紊乱,分布不均匀,线粒体肿胀发生溶解,线粒体脊间距增大甚至断裂,而石斛合剂和二甲双胍干预后线粒体脊分布变清晰,线粒体个体形状也变完整(图4A)。对照组大鼠心肌线粒体排列整齐,但未发现明显自噬体。模型组大鼠心肌线粒体排列紊乱,未发现明显自噬体形成(图4B)。石斛合剂组和二甲双胍组的线粒体之间出现了自噬体,这些自噬体呈双层膜液泡结构,内部包裹着像线粒体形状的细胞器。

## 2.6 石斛合剂对Sirt3介导的线粒体自噬通路的基因表达水平的影响

与对照组相比,模型组大鼠心脏组织中Sirt3、FoxO3a、PINK1、Parkin、LC3的基因表达量下降明显( $P<0.05$ ),P62基因表达量明显增加( $P<0.05$ );与模型组相比,石斛合剂组与二甲双胍组Sirt3、FoxO3a、PINK1、Parkin、LC3相对表达量明显上升( $P<0.01$ ),而P62的基因表达水平明显下降( $P<0.01$ ),而两组间差异无统计学意义( $P>0.05$ ,图5)。

## 2.7 石斛合剂对Sirt3介导的线粒体自噬通路的蛋白表达水平的影响

与对照组相比,模型组中Sirt3、PINK1、Parkin的蛋白表达量下降,p-FoxO3a/FoxO3a值降低,而P62的蛋

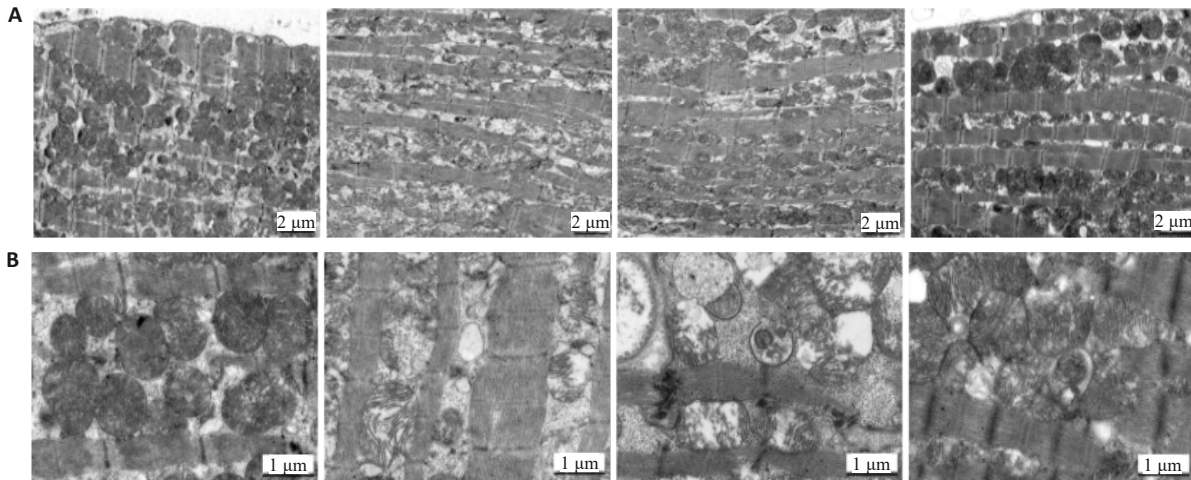


图4 大鼠心肌组中的线粒体和自噬体的超微结构的变化情况

Fig.4 Ultrastructural changes of mitochondria (A) and autophagosomes (B) in rat myocardial tissue.

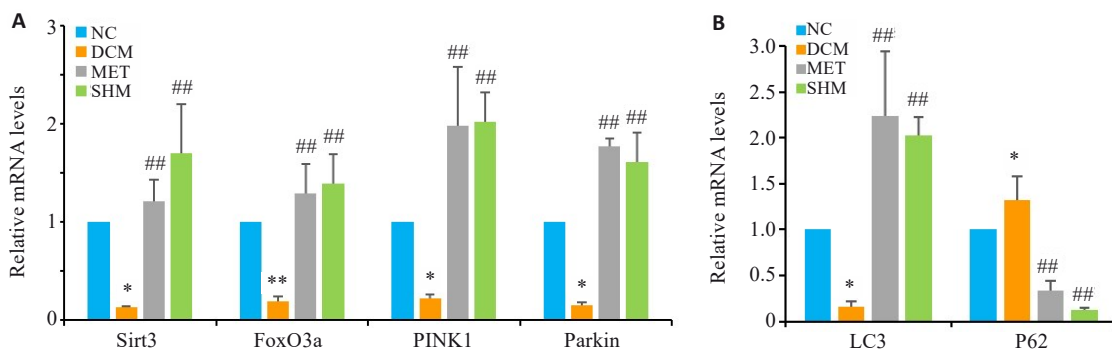


图5 大鼠心脏线粒体自噬通路及自噬相关基因的表达情况

Fig.5 Expressions of cardiac mitophagic pathway and autophagy-related genes in rats. A: Expressions of cardiac mitophagic pathway-related genes. B: Expressions of autophagy-related genes. n=3, \*P<0.05, \*\*P<0.01 vs NC group; ##P<0.01 vs DCM group.

白表达量升高(P<0.05);与模型组相比,石斛合剂组和二甲双胍组中 Sirt3、PINK1、Parkin 表达量升高、p-FoxO3a/FoxO3a 值升高,P62 的蛋白表达量降低(P<0.05),而两组间差异无统计学意义(P>0.05,图6)。

### 3 讨论

糖尿病心肌病是在不存在冠状动脉疾病、高血压和瓣膜病的情况下出现的心脏功能障碍,心肌细胞线粒体自噬水平的改变会显著影响线粒体功能、心肌细胞的存亡及心脏功能<sup>[20]</sup>。临床常用降糖药物可通过靶向线粒体自噬发挥心脏保护作用,从而治疗和预防糖尿病心肌病,如二甲双胍可以通过激活心肌细胞自噬水平来改善 DCM 氧化应激、炎症反应、代谢失常、心肌纤维化等病理状态<sup>[21]</sup>。目前,针对糖尿病心肌病尚无特异性治疗或预防手段,血糖控制仍是主要干预措施。本研究采用高脂饲料喂养联合小剂量 STZ 注射制备 DCM 大鼠模型,STZ 可选择性破坏大鼠胰岛 β 细胞,该模型已经获得普遍认可<sup>[22,23]</sup>。本研究提示,经石斛合剂干预可使 DCM 大鼠的空腹血糖、心重指数、TC、TG、LDL-C 水平明显

下降,HDL-C 水平上升,说明石斛合剂可以改善 DCM 组的糖脂代谢水平。本研究还观察了 DCM 心肌病患者心肌炎症的重要指标 CRP、BNP 的水平,研究报道二者均可灵敏诊断 DCM 心肌功能损伤<sup>[24]</sup>,CRP 升高预示心肌梗塞、心绞痛发作以及心脏骤停的风险<sup>[25]</sup>,而 BNP 增多时出现左室功能障碍或者心脏舒张功能不全<sup>[26]</sup>,且已证实抑制心肌炎症中的 TNF-α 和 IL-6 水平可降低 LDH,改善糖尿病心肌损伤<sup>[27]</sup>。本研究也发现石斛合剂和二甲双胍治疗后,DCM 大鼠的 CRP、BNP、TNF-α、IL-6、LDH 含量显著降低,说明石斛合剂和二甲双胍能改善心肌炎症反应和心肌功能损伤。心肌结构和功能的病理学改变,特别是左室功能异常是 DCM 的诊断标准之一,高脂饲料喂养大鼠配合注射 STZ 后,心肌组织有氧化应激、微血管基底膜增厚的改变,逐渐还会出现心肌细胞肥大增生、心肌间质纤维化和心室舒张功能障碍的病理改变<sup>[28]</sup>。本研究中病理结果也显示石斛合剂和二甲双胍可明显改善 DCM 大鼠心肌细胞的形态改变和损伤,降低心肌间胶原纤维含量,同时心肌细胞的超微结构结果进一步提示石斛合剂和二甲双胍可促使线粒

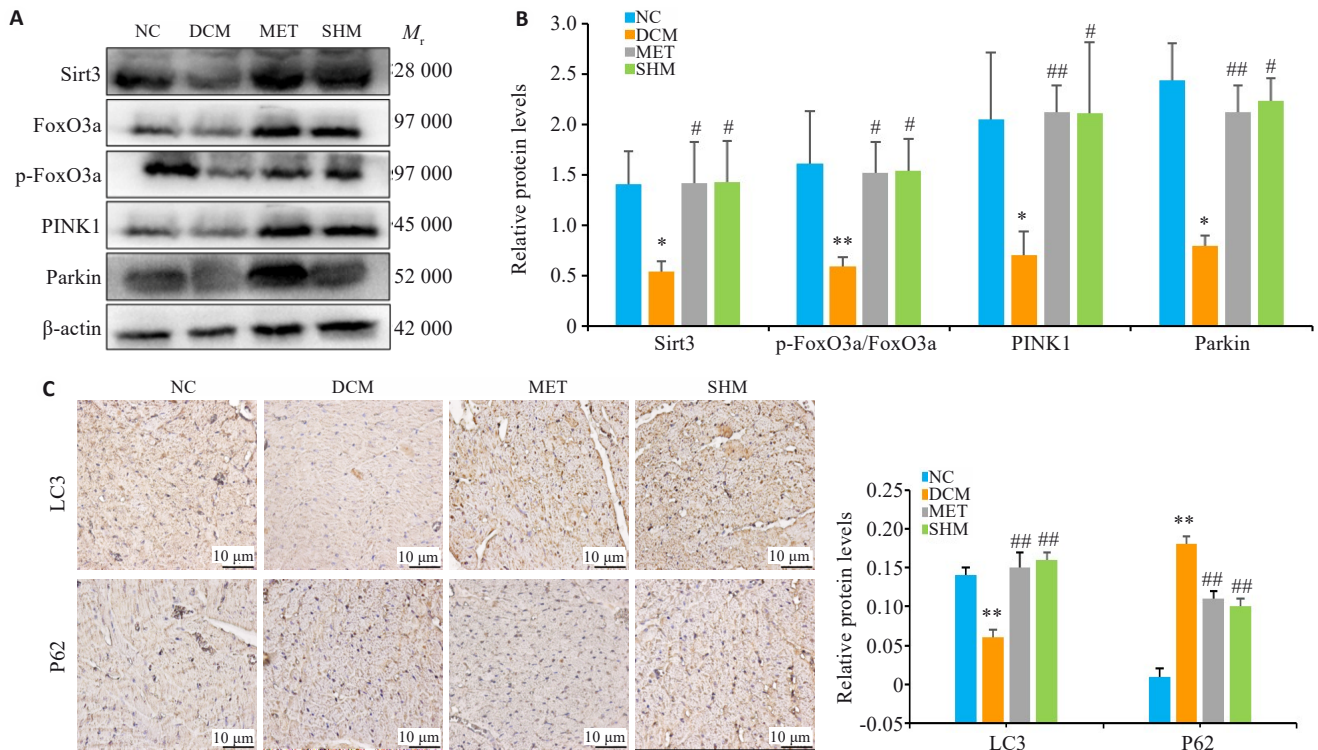


图6 大鼠心脏自噬通路及自噬相关蛋白的表达情况

Fig.6 Expression of cardiac mitophagic pathway and autophagy-related proteins in rats. A: Representative immunoblot images. B: Sirt3, p-FoxO3a/FoxO3a, PINK1, Parkin relative protein expression levels. C: Representative immunohistochemical images. D: LC3 and P62 relative protein expression levels.  $n=3$ , \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  vs NC group; # $P<0.05$ , ## $P<0.01$  vs DCM group.

体形态恢复和自噬小体增加,表明石斛合剂在逆转DCM大鼠心肌损伤的同时还可能恢复线粒体功能并激活自噬,清除受损线粒体维持细胞内稳态。

为深入探究石斛合剂通过调节心肌细胞线粒体自噬改善心功能的分子机制,我们进一步研究了石斛合剂对线粒体自噬信号通路的调控作用。研究证实Sirt3是一种介导线粒体自噬信号通路的线粒体去乙酰化酶,可通过抑制Sirt3蛋白表达影响线粒体自噬,加重DCM心肌损伤<sup>[29]</sup>,而FoxO3a参与调节心肌细胞周期和细胞凋亡<sup>[30]</sup>。Sirt3表达上调,激活作用底物FoxO3a,通过磷酸化作用“招募”PINK1分子,使其定位于受损线粒体外膜上,并结合Parkin分子,激活E3泛素连接酶Parkin,将自噬信号传递到下游自噬标志蛋白LC3、P62<sup>[13,31]</sup>。在自噬发生时,胞浆型LC3I会被酶分解出少量多肽,从而产生LC3II,而LC3 II/I的比例则可以反映自噬程度;自噬接头蛋白p62表达量增加是自噬活性受到抑制的标志<sup>[32]</sup>。既往研究已表明,高血糖环境中心肌细胞的Sirt3、FoxO3a及Parkin蛋白表达显著下降,线粒体自噬通路被抑制<sup>[33,34]</sup>,导致脂质堆积和能量代谢障碍,而激活Sirt3则可恢复心肌细胞自噬并保护心肌细胞免于凋亡,提示通过Sirt3调控线粒体自噬可能改善糖尿病心脏的心脏功能。我们的实验也发现,石斛合剂和二甲双胍可上调大鼠心脏Sirt3、PINK1、Parkin、LC3、下调P62的表达水平,同时促进FoxO3a的磷酸化,提示石斛合剂

可能通过激活Sirt3介导的FoxO3a-PINK1-Parkin线粒体自噬信号通路,上调心肌线粒体自噬水平,减少异常线粒体数量,抑制脂质积累,改善心脏功能障碍,在DCM中发挥心脏保护作用。

综上所述,石斛合剂能显著改善DCM糖脂代谢紊乱、抑制心肌炎症、改善心肌细胞和线粒体形态、调控心肌线粒体自噬,其作用机制可能与激活Sirt3介导的自噬信号通路、启动心肌细胞自噬程序,逆转心肌功能受损密切相关。糖尿病心肌病明确存在线粒体自噬异常,但由于线粒体自噬的启动机制比较复杂,不同机制之间的相互关联和协同控制着有效的线粒体自噬,未来将进一步探讨石斛合剂调控线粒体自噬维持线粒体稳态保护心肌的其它分子机制,为其临床应用提供更为详实的实验依据。

**Declaration of interests:** The authors declare no competing interests.

#### 参考文献:

- [1] Wu H, Liu Y, and Liu C. The Interregulatory Circuit Between non-coding RNA and Apoptotic Signaling in Diabetic Cardiomyopathy [J]. *Noncoding RNA Res*, 2024, 9(4): 1080-97.
- [2] Marwick TH, Ritchie R, Shaw JE, et al. Implications of underlying mechanisms for the recognition and management of diabetic Cardiomyopathy [J]. *J. Am. Coll. Cardiol*, 2018, 71(3): 339-51.
- [3] Tan Y. and Zhang Z. Mechanisms of Diabetic Cardiomyopathy and

- potential therapeutic strategies: preclinical and clinical evidence[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2020, 17(9): 585-607.
- [4] Wang M, Zhang S, Tian J, et al. Impaired iron-sulfur cluster synthesis induces mitochondrial parthanatos in diabetic cardiomyopathy[J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2025, 12(1): e2406695.
- [5] Tong M, Saito T, Zhai P, et al. Mitophagy is essential for maintaining cardiac function during high fat diet-induced diabetic cardiomyopathy[J]. *Circ Res* 2019, 124(9): 1360-71.
- [6] Wu S, Lu Q, Ding Y, et al. Hyperglycemia-Driven Inhibition of AMP-activated protein Kinase  $\alpha$ 2 induces diabetic cardio-myopathy by promoting mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes *in vivo* [J]. *Circulation*, 2019, 139(16): 1913-36.
- [7] Lu QB, Sun HT, Zhou K, et al. Therapeutic Targeting of Decr1 Ameliorates Cardiomyopathy by Suppressing Mitochondrial Fatty Acid Oxidation in Diabetic Mice[J]. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2025, 16(2): e13761.
- [8] 李振钰, 许欣竹, 刘文俊, 等. 脾气虚大鼠心肌细胞线粒体Lon蛋白酶和ClpXP复合物表达的研究[J]. *中华中医药杂志*, 2021, 36(6): 3616-9.
- [9] Werbner B, Tavakoli-Rouzbhani OM, Fatahian AN, et al. The dynamic interplay between cardiac mitochondrial health and myocardial structural remodeling in metabolic heart disease, aging, and heart failure[J]. *The journal of cardiovascular aging*, 2023, 3(1): 9.
- [10] 刘 蕾, 杨丽霞, 梁永林, 等. 中医药通过调控细胞自噬改善糖尿病心肌病的研究现状[J]. *中国临床药理学杂志*, 2024, 40 (10): 1530-4.
- [11] Volpe C, Villar-Delfino PH, Dos AP, et al. Cellular death, reactive oxygen species (ROS) and diabetic complications[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(2): 119.
- [12] Peng ML, Fu Y, Wu CW, et al. Signaling Pathways Related to Oxidative Stress in Diabetic Cardiomyopathy[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2022, 13: 907757.
- [13] Zheng H, Zhu H, Liu X, Huang X, et al. Mitophagy in Diabetic Cardiomyopathy: Roles and Mechanisms[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 750382.
- [14] Yu W, Gao B, Li N, et al. Sirt3 deficiency exacerbates diabetic cardiac dysfunction: Role of Foxo3A-Parkin-mediated mitophagy [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2017, 1863(8): 1973-83.
- [15] 王 泽, 王秋虹, 李晓文, 等. 糖尿病胃轻瘫从“痿”论治探讨[J]. *中华中医药杂志*, 2019, 34(10): 4705-8.
- [16] 林心君, 胡海霞, 何昱霖, 等. 石斛合剂基于PKB/FoxO1通路抑制糖尿病大鼠肝糖异生的机制研究[J]. *湖南中医药大学学报*, 2021, 41 (8): 1166-71.
- [17] 庄舒婷, 张家林, 邹玉卿, 等. 石斛合剂对2型糖尿病合并非酒精性脂肪肝大鼠AMPK/TFEB信号通路自噬蛋白的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(24): 53-8.
- [18] 王海生, 谢永财, 李长征, 等. 石斛合剂对高脂高糖糖尿病大鼠大鼠心肌细胞Ca<sup>2+</sup>代谢的影响[J]. *福建中医药*, 2020, 51(1): 47-50.
- [19] Ren BC, Zhang YF, Liu SS, et al. Curcumin alleviates oxidative stress and inhibits apoptosis in diabetic cardiomyopathy via Sirt1-Foxo1 and PI3K-Akt signalling pathways[J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(21): 12355-67.
- [20] Zhou Y, Suo W, Zhang X, et al. Targeting mitochondrial quality control for diabetic cardiomyopathy: Therapeutic potential of hypoglycemic drugs[J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 168: 115669.
- [21] Yang F, Qin Y, Wang Y, et al. Metformin inhibits the nlrp3 inflammasome *via* ampk/mTOR-dependent effects in diabetic cardiomyopathy[J]. *International journal of biological sciences*, 2019, 15(5): 1010-9.
- [22] John O D, Mushunje A T, Surugau N, et al. The metabolic and molecular mechanisms of  $\alpha$ -mangostin in cardiometabolic disorders (Review)[J]. *International journal of molecular medicine*, 2022, 50 (3): 120.
- [23] Chen H Y, Hong Y H, Chiang Y F, et al. Effects of Rice-Husk Silica Liquid in Streptozotocin-Induced Diabetic Mice[J]. *Metabolites*, 2022, 12(10): 964.
- [24] Varga Z V, Giricz Z, Liaudet L, et al. Interplay of oxidative, nitrosative/nitrative stress, inflammation, cell death and autophagy in diabetic cardiomyopathy[J]. *Biochimica et biophysica acta*, 2015, 1852(2): 232-42.
- [25] Jakubik D, Fitas A, Eyileten C, et al. MicroRNAs and long non-coding RNAs in the pathophysiological processes of diabetic cardiomyopathy: emerging biomarkers and potential therapeutics [J]. *Cardiovascular diabetology*, 2021, 20(1): 55.
- [26] Rajesh M, Mukhopadhyay P, B tkai S, et al. Cannabinoid receptor 2 activation alleviates diabetes-induced cardiac dysfunction, inflammation, oxidative stress, and fibrosis[J]. *GeroScience*, 2022, 44(3): 1727-41.
- [27] Chen X, Yun C, Zheng H, et al. The protective effects of S14G-humanin (HNG) against streptozotocin (STZ)-induced cardiac dysfunction[J]. *Bioengineered*, 2021, 12(1): 5491-503.
- [28] Becher P M, Lindner D, Fröhlich M, et al. Assessment of cardiac inflammation and remodeling during the development of streptozotocin-induced diabetic cardiomyopathy *in vivo*: a time course analysis[J]. *International journal of molecular medicine*, 2013, 32(1): 158-64.
- [29] Ketenci M, Zablocki D, Sadoshima J. Mitochondrial quality control mechanisms during diabetic cardiomyopathy[J]. *JMA journal*, 2022, 5(4): 407-15.
- [30] Link W. Introduction to FOXO Biology[J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 1890: 1-9.
- [31] Wu J, Yang Y, Gao Y, et al. Melatonin attenuates anoxia/reoxygenation injury by inhibiting excessive mitophagy through the mt2/sirt3/foxo3a signaling pathway in h9c2 cells[J]. 2020, 14: 2047-60.
- [32] Cai C, Wu F, He J, et al. Mitochondrial quality control in diabetic cardiomyopathy: from molecular mechanisms to therapeutic strategies[J]. *International journal of biological sciences*, 2022, 18 (14): 5276-90.
- [33] Huang L, Yao T, Chen J, et al. Effect of Sirt3 on retinal pigment epithelial cells in high glucose through Foxo3a/ PINK1-Parkin pathway mediated mitophagy[J]. *Experimental eye research*, 2022, 218, 109015.
- [34] Gong Y, Tang N, Liu P, et al. Newcastle disease virus degrades SIRT3 *via* PINK1-PRKN-dependent mitophagy to reprogram energy metabolism in infected cells. Newcastle disease virus degrades SIRT3 *via* PINK1-PRKN-dependent mitophagy to reprogram energy metabolism in infected cells[J]. *Autophagy*, 2022, 18(7): 1503-21.

(编辑:吴锦雅)