

分类号: Q81

单位代码: 10363

密 级: 公开

学 号: 2210530147

基于 miR-181b-5p/Sirt1/自噬轴探讨五味子丙素防治动脉
粥样硬化的作用机制研究

The investigation of mechanism for preventing
atherosclerosis based on miR-181b-5p/Sirt1/autophagy axis
with Schizandrin C

学 生 姓 名: _____ 李 晗

校 内 教 师: _____ 段 红 教 授

校 外 导 师: _____ 唐 英 武 副 研 究 员

专 业 类 别: _____ 生 物 与 医 药

研 究 方 向: _____ 生 物 制 药 工 程

论文答辩日期: 2024 年 5 月 30 日

安徽工程大学学位论文原创性声明

本人郑重声明：我恪守学术道德，崇尚严谨学风。所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已明确注明和引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品及成果的内容。论文为本人亲自撰写，我对所写的内容负责，并完全意识到本声明的法律后果由本人承担。

学位论文作者签名：李晗

日期：2024 年 6 月 3 日

安徽工程大学学位论文版权使用授权书

学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅或借阅。本人授权安徽工程大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编本学位论文。

保密☐，在 _____ 年解密后适用本版权书。

本学位论文属于

不保密 ☒。

学位论文作者签名：李晗

指导教师签名：[Signature]

日期：2024 年 6 月 3 日

日期：2024 年 6 月 3 日

基于 miR-181b-5p/Sirt1/自噬轴探讨五味子丙素防治动脉粥样硬化的作用机制研究

摘 要

动脉粥样硬化（atherosclerosis, AS）属于中医“气虚血淤”的范畴，气虚则血运不畅，脉道不利，血脉失养。阴虚则虚火灼津，津亏液少，脉道干涩。所以中医以益气、养阴为原则治疗动脉粥样硬化。五味子（*Schisandra chinensis*）为木兰科植物五味子（*Schisandra chinensis* Turcz. Baill.）的干燥果实。五味子广泛地应用于高血压、冠心病、病毒性心肌炎、肺心病、心力衰竭等疾病的防治，疗效确定。五味子丙素（Schisandrin C, SC）是从五味子中分离得到的联苯环辛二烯类木脂素。新近我们研究发现五味子丙素具有很好的心脑血管保护作用。鉴于此，本研究通过高效液相色谱联合网络药理学及体内细胞实验考察五味子丙素对动脉粥样硬化的作用，并基于自噬的角度进一步探讨五味子丙素治疗动脉粥样硬化的具体分子作用机制。主要研究内容如下：

（1）通过高效液相色谱法（High Performance Liquid Chromatography, HPLC）对五味子中的五种混合有效成分同时进行检测，为建立五味子质量评价标准提供技术支持。通过五种成分的标准品建立标准曲线，从而对五味子中的有效成分进行比对，并测定五味子中有效成分的含量。同时根据测定的五味子五种成分与动脉粥样硬化疾病进行网络药理学预测，筛选核心靶点。确定五味子治疗动脉粥样硬化的药理途径和生物学功能。将核

心靶点进行蛋白相互作用，筛选出核心靶点，将五味子五种活性成分与核心靶点进行分子对接明确关键活性成分。五味子中有效成分具有较高的医用价值，利用此方法为测评五味子的质量提供了简便、省时的方式，同时为进一步研究医药和开发新的食疗产品提供参考数据。

(2) 采用 THP-1 细胞株模仿动脉粥样硬化病人体内生理病理过程建立了泡沫细胞体外模型，光镜下 ox-LDL 组经油红 O 染色可见细胞有明显的红色脂质颗粒，采用上述方法成功地建立了稳定的泡沫细胞体外模型；Taqman 探针法检测泡沫细胞上清外泌体中 miR-181b-5p 的表达量，实验结果表明，ox-LDL 组与对照组相比其中的 exosome-miR-181b-5p 的表达水平较高，给予五味子丙素干预后 exosome-miR-181b-5p 的表达水平降低，结果表明 miR-181b-5p 与动脉粥样硬化的发病机制之间有联系，为了进一步明确 exosome-miR-181b-5p 对 HUVEC 损伤的影响，采用 exosome-miR-181b-5p inhibitor 或 mimics 介导 HUVEC 细胞。对于 miR-181b-5p 对 HUVEC 细胞造成的损伤的机制，通过生物信息学手段预测了 miR-181b-5p 的靶基因为 Sirt1，实验证明 miR-181b-5p 可通过抑制 HUVEC 靶基因 Sirt1 表达，诱导血管内皮细胞损伤。本实验通过探索 HUVEC 细胞损伤及其机制，为动脉粥样硬化疾病的早期治疗和预防提供了新的生物标志物 miR-181b-5p。

(3) 为了探讨五味子丙素对自噬相关通路的影响，结合网络药理学，分析了 P13K/AKT/mTOR 信号通路在 ox-LDL 诱导的 HUVEC 细胞中的作用。结果表明，ox-LDL 可诱导 HUVEC 自噬功能障碍，抑制 LC3 II 表达，引起内皮损伤，从而导致动脉粥样硬化的发生。五味子丙素可以提高 HUVEC 中 LC3 II 的表达水平，减少 ox-LDL 在 HUVEC 中的积累和 p62 蛋

白的水平，从而改善 HUVEC 的自噬流，保护内皮细胞。五味子丙素确实可逆转经 ox-LDL 诱导的 HUVEC 细胞中 P13K/AKT/mTOR 通路异常激活状态。提示 P13K/AKT/mTOR 通路是五味子丙素发挥促进自噬及自噬通量的有效途径。

本研究综合利用多学科交叉技术，探讨五味子丙素通过调控泡沫细胞源外泌体 miR-181b-5p 释放，调节 Sirt1-PI3K/AKT/mTOR 自噬通路诱导心血管内皮细胞的损伤，参与动脉粥样硬化疾病的发生、发展过程。深入阐释五味子丙素通过调节外泌体 miR-181b-5p 释放途径防治动脉粥样硬化疾病作用的新机制，揭示五味子丙素防治动脉粥样硬化性心血管疾病的作用靶点、特色与信号途径，为具有良好心血管保护作用的中药活性成分防治心血管疾病微观生物学基础的阐释提供新的研究方向和思路。具有很强的针对性和临床指导意义。

关键词： miR-181b-5p，Sirt1，自噬，五味子丙素，动脉粥样硬化

THE INVESTIGATION OF MECHANISM FOR PREVENTING ATHEROSCLEROSIS BASED ON MIR-181B- 5P/SIRT1/AUTOPHAGY AXIS WITH SCHIZANDRIN C

ABSTRACT

Atherosclerosis (AS) belongs to the category of "Qi deficiency and blood stasis" in traditional Chinese medicine. Qi deficiency results in poor blood transport, unfavorable pulse and blood loss. Yin deficiency leads to deficient fire burning, less fluid depletion and dry veins. Therefore, TCM treats atherosclerosis on the principle of supplementing qi and nourishing Yin. *Schisandra chinensis* is the dried fruit of *Schisandra chinensis* Turcz. Baill. *Schisandra chinensis* is widely used in the prevention and treatment of hypertension, coronary heart disease, viral myocarditis, pulmonary heart disease, heart failure and other diseases. Schisandrin C (SC) is a benzocyclooctadiene lignan isolated from *Schisandra chinensis*. Recently, we found that Schisandrin C has a good cardio-cerebrovascular protective effect. In view of this, this study investigated the effect of Schisandrin C on atherosclerosis through high performance liquid chromatography combined with network pharmacology and in vivo cell experiments and further explored the specific molecular mechanism of Schisandrin C in the treatment of atherosclerosis from the perspective of

autophagy. The main research contents are as follows:

(1) The five mixed active ingredients in *Schisandra chinensis* were simultaneously detected by HPLC to provide technical support for establishing quality evaluation standards of *Schisandra chinensis*. The standard curve of five components was established to compare the active components in *Schisandra chinensis* and determine the content of active components in *Schisandra chinensis*. At the same time, according to the five components of *Schisandra chinensis* and atherosclerotic diseases, the network pharmacological prediction was made, and the core target was screened. To determine the pharmacological pathway and biological function of *Schisandra chinensis* in the treatment of atherosclerosis. The core target was screened for protein interaction, and the five active components of *Schisandra chinensis* were interfaced with the core target to identify the key active components. The effective components of *Schisandra chinensis* have high medical value. This method provides a simple and time-saving way to evaluate the quality of *Schisandra chinensis*, and provides reference data for further research on medicine and development of new dietary therapeutic products.

(2) The foam cell model in vitro was established by using THP-1 cell line to imitate the physiological and pathological process of atherosclerosis patients. The cells of ox-LDL group showed obvious red lipid particles by oil red O staining under light microscope. The expression level of miR-181b-5p in foam cell supernatant exosome was detected by Taqman probe method. The experimental

results showed that the expression level of exosome-miR-181b-5p in ox-LDL group was higher than that in the control group. A stable foam cell model was successfully established in vitro with the above method, and the expression level of exosome miR-181b-5p in ox-LDL group indicated that there was a relationship between miR-181b-5p and the pathogenesis of atherosclerosis. In order to further clarify the effect of exosome-miR-181b-5p on HUVEC injury, HUVEC cells were mediated by exosome-miR-181b-5p inhibitor or mimics. As for the mechanism of the damage caused by miR-181b-5p to HUVEC cells, the target gene of miR-181b-5p was predicted to be Sirt1 by bioinformatics means, and experiments proved that miR-181b-5p could induce vascular endothelial cell damage by inhibiting the expression of Sirt1, the target gene of HUVEC. By exploring HUVEC cell damage and its mechanism, this study provides a new biomarker miR-181b-5p for the early treatment and prevention of atherosclerotic diseases.

(3) In order to investigate the effects of Schisandrin C on autophagy related pathways, combined with network pharmacology, the role of P13K/AKT/mTOR signaling pathway in ox-LDL-induced HUVECs cells was analyzed. The results showed that ox-LDL could induce autophagy dysfunction in HUVECs, inhibit LC3II expression, cause endothelial injury, and thus lead to atherosclerosis. Schisandrin C can increase the expression level of LC3II in HUVECs, reduce the accumulation of ox-LDL in HUVECs and the level of p62 protein, so as to improve the autophagy flow of HUVECs and protect endothelial cells.

Schisandrin C did reverse the abnormal activation of P13K/AKT/mTOR pathway in ox-LDL-induced HUVEC cells. It is suggested that P13K/AKT/mTOR pathway is an effective pathway to promote autophagy and autophagy flux of Schisandrin C.

In this study, we comprehensively utilized interdisciplinary techniques to explore the role of Schisandrin C in the occurrence and development of atherosclerotic diseases by regulating the release of foam cell-derived exosome miR-181b-5p, regulating the Sirt1-PI3K/AKT/mTOR autophagy pathway to induce cardiovascular endothelial cell damage. Further elucidates the new mechanism of Schisandrin C in the prevention and treatment of atherosclerotic diseases by regulating the release pathway of exosome miR-181b-5p, and reveals the target, characteristics and signal pathway of Schisandrin C in the prevention and treatment of atherosclerotic cardiovascular diseases. It provides a new research direction and thinking for the explanation of microbiological basis of the active ingredients of Chinese medicine with good cardiovascular protection. It has strong pertinence and clinical guiding significance.

KEY WORDS: miR-181b-5p, Sirt1, Autophagy, Schisandrin C, atherosclerosis

目录

摘 要.....	I
ABSTRACT	IV
第 1 章 绪论	1
1.1 动脉粥样硬化疾病.....	1
1.1.1 胆固醇沉积与动脉粥样硬化.....	1
1.1.2 炎症反应与动脉粥样硬化.....	1
1.1.3 平滑肌细胞增生与动脉粥样硬化.....	2
1.1.4 斑块破裂与动脉粥样硬化.....	2
1.1.5 血管狭窄与动脉粥样硬化.....	2
1.2 自噬.....	3
1.2.1 自噬与动脉粥样硬化.....	3
1.2.2 自噬与 PI3K/AKT/mTOR 通路.....	4
1.3 miRNA 的概述	4
1.3.1 miRNA 的作用模式	5
1.3.2 循环中的 miRNA.....	5
1.3.3 miR-181b 的生物学功能.....	6
1.4 五味子及五味子丙素概述.....	7
1.4.1 五味子.....	7
1.4.2 五味子丙素.....	7
1.5 研究目的及意义.....	8
第 2 章 五味子抗动脉粥样硬化药效物质基础分析.....	9
2.1 引言.....	9
2.2 实验材料.....	10
2.2.1 实验仪器.....	10
2.2.2 实验试剂.....	10

2.3 五味子活性成分及其含量分析.....	11
2.3.1 五味子样品预处理.....	11
2.3.2 五味子提取液的制备.....	11
2.3.3 标准对照品溶液的制备.....	11
2.3.4 色谱条件.....	11
2.4 五味子主要活性成分抗动脉粥样硬化网络药理学研究.....	13
2.4.1 活性成分靶点和疾病靶点筛选.....	13
2.4.2 构建蛋白质与蛋白质相互作用网络图.....	13
2.4.3 潜在靶点的 GO 功能及 KEGG 通路富集分析	13
2.4.4 构建成分-靶点-通路网络图	13
2.5 五味子主要活性成分与核心靶点的分子对接.....	14
2.5.1 配体与受体的处理.....	14
2.5.2 大分子受体文件的制备.....	14
2.5.3 小分子配体文件的制备.....	14
2.5.4 对接口袋的构建.....	14
2.5.5 对接与可视.....	15
2.6 结果与分析.....	15
2.6.1 五味子活性成分及其含量分析.....	15
2.6.2 五味子主要活性成分抗动脉粥样硬化网络药理学研究.....	17
2.6.3 五味子主要活性成分与核心靶点的分子对接.....	20
2.7 本章小结.....	22
第 3 章 五味子丙素通过 miR-181b-5p 靶向 Sirt1 抗内皮细胞损伤作用机制研究	23
3.1 引言.....	23
3.2 实验材料.....	24
3.2.1 实验仪器.....	24
3.2.2 实验试剂.....	25
3.3 泡沫细胞体外模型的建立及五味子丙素浓度确定.....	26
3.3.3 细胞培养.....	26

3.3.4 五味子丙素对 THP-1 细胞活力的影响	26
3.3.5 细胞分组.....	26
3.3.6 油红 O 染色鉴定脂肪堆积	27
3.4 外泌体的收集及表征鉴定	27
3.4.1 超滤法收集上清液中的外泌体.....	27
3.4.2 外泌体的形态特征观察.....	27
3.4.3 外泌体粒径的检测.....	28
3.4.4 外泌体表面特异性标志物的检测.....	28
3.5 五味子丙素调控 exosome-miR-181b-5p 保护 ox-LDL 诱导的 HUVEC 细胞损伤	29
3.5.1 五味子丙素干预的泡沫细胞源外泌体对 ox-LDL 诱导的 HUVEC 细胞炎性因子的影响	29
3.5.2 外泌体中 miR-181b-5p 含量的检测	30
3.5.3 HUVEC 细胞 miR-181b-5p mimics/inhibitor 转染	33
3.5.4 miR-181b-5p 转染效率检测	33
3.5.5 miR-181b-5p 及五味子丙素对 ox-LDL 诱导的 HUVEC 细胞损伤的研究.....	33
3.6 五味子丙素调控 exosome-miR-181b-5p 靶向 Sirt1 保护 ox-LDL 诱导的 HUVEC 细胞损伤	34
3.6.1 miR-181b-5p 靶基因预测	34
3.6.2 五味子丙素通过外泌体调控 Sirt1 的水平	34
3.6.3 五味子丙素通过 exosome-miR-181b-5p 靶向调控 Sirt1 的水平	36
3.6.4 HUVEC 细胞干扰靶基因 Sirt1	36
3.6.5 siSirt1 干扰效率检测	36
3.6.6 Sirt1 及五味子丙素对 ox-LDL 诱导的 HUVEC 细胞损伤的研究.....	36
3.7 统计学分析.....	36
3.8 结果与分析.....	37
3.8.1 泡沫细胞体外模型的建立及五味子丙素浓度确定.....	37
3.8.2 外泌体的表征鉴定.....	38
3.8.3 五味子丙素调控 exosome-miR-181b-5p 保护 ox-LDL 诱导的 HUVEC 细胞	

损伤	39
3.8.4 五味子丙素调控 exosome-miR-181b-5p 靶向 Sirt1 保护 ox-LDL 诱导的 HUVEC 细胞损伤	42
3.9 本章小结	46
第 4 章 五味子丙素通过 miR-181b-5p 靶向 Sirt1 促进血管内皮细胞自噬作用机制研究	48
4.1 引言	48
4.2 实验材料	48
4.2.1 实验仪器	48
4.2.2 实验试剂	49
4.3 五味子丙素干预的 exosome-miR-181b-5p 对血管内皮细胞自噬及自噬通路的研究	50
4.3.1 细胞培养及分组	50
4.3.2 免疫荧光法观察自噬蛋白 Beclin-1 的表达水平	50
4.3.3 RT-qPCR 检测 HUVEC 细胞中自噬基因 ATG5、LC3mRNA 表达	51
4.3.4 Western Blot 检测自噬及自噬通路 PI3K/AKT/mTOR 的表达	51
4.4 自噬及自噬通路 PI3K/AKT/mTOR 受 Sirt1 蛋白调节影响研究	51
4.4.1 细胞培养及分组	51
4.4.2 RT-qPCR 检测 Sirt1 对下游自噬基因 ATG5、LC3mRNA 表达的影响 ...	51
4.4.3 Sirt1 对下游自噬通路蛋白 PI3K/AKT/mTOR 的影响	51
4.5 统计学分析	52
4.6 结果与分析	52
4.6.1 五味子丙素干预的 exosome-miR-181b-5p 对血管内皮细胞自噬及自噬通路的研究	52
4.6.2 自噬及自噬通路 PI3K/AKT/mTOR 受 Sirt1 蛋白调节影响研究	55
4.7 本章小结	58
第 5 章 总结与展望	60
5.1 结论	60

5.2 展望.....	60
参考文献.....	61
攻读硕士期间学术成果.....	67
致谢.....	68

第1章 绪论

1.1 动脉粥样硬化疾病

心血管疾病（cardiovascular disease, CVD）是威胁人类健康的主要原因^[1]。动脉粥样硬化（atherosclerosis, AS）是一种慢性炎症性动脉疾病，主要是由于动脉内的脂质沉积、炎症反应和纤维化导致的动脉壁增厚和硬化。在血管壁内形成动脉粥样硬化斑块，其发病率逐年升高^[2]。血脂异常是冠状动脉粥样硬化疾病最重要的致病原因，有助于分析个体发生心血管疾病事件的综合危险^[3]。这种疾病通常发生在中老年人群中，但也可能影响年轻人。动脉粥样硬化疾病可发生在全身各个部位的动脉，包括冠状动脉、颈动脉、脑动脉、外周动脉等^[4]。病变的程度和位置不同，可能导致不同的临床表现，如心绞痛、心肌梗死、脑卒中、外周动脉疾病等^[5]。

1.1.1 胆固醇沉积与动脉粥样硬化

胆固醇是一种脂质类物质，它在体内主要由肝脏合成，也可通过饮食摄入。当体内胆固醇水平过高时，会导致胆固醇在血管内壁沉积，形成斑块，从而促进动脉粥样硬化的发生和发展^[6]。具体来说，胆固醇沉积在血管内壁后，会引起炎症反应和平滑肌细胞增生，形成斑块。这些斑块会逐渐增大，并可能破裂释放出血栓物质，导致血管狭窄或阻塞，最终引发心脑血管疾病，如心绞痛、心肌梗塞、脑卒中等^[7]。因此，控制胆固醇水平对预防和控制动脉粥样硬化至关重要。通过健康的饮食习惯、适量运动、避免吸烟等方式，可以有效降低血液中的胆固醇水平，减少胆固醇在血管内壁的沉积，从而减少动脉粥样硬化的风险。

1.1.2 炎症反应与动脉粥样硬化

炎症反应可以加速斑块形成、促进斑块破裂和血管狭窄，进而导致心脑血管疾病的发生^[8]。具体来说，当血管内壁受到损伤时，炎症反应会被激活，引起炎性细胞（如白细胞）和炎症介质的聚集和释放。这些炎性细胞和介质会促进斑块形成的过程，加速胆固醇和其他脂质在血管内壁的沉积和斑块的形成^[9]。同时，炎症反应也会导致斑块内部的稳定性降低，增加斑块破裂的风险。斑块破裂后，释放出的血栓物质会进

一步激活炎症反应，引起血管炎症和狭窄，最终导致心脑血管疾病的发生，如心绞痛、心肌梗塞、脑卒中等^[10]。因此，控制炎症反应对预防和控制动脉粥样硬化至关重要。通过保持健康的生活方式、控制炎症介质的释放、减少炎症反应的激活等方式，可以减缓动脉粥样硬化的进展，降低心脑血管疾病的风险。

1.1.3 平滑肌细胞增生与动脉粥样硬化

平滑肌细胞是血管壁的主要细胞类型，在动脉粥样硬化的早期阶段，血管内壁受到损伤后，平滑肌细胞会被激活并增生。这些增生的平滑肌细胞可以参与修复受损的血管壁，形成斑块的基础结构^[11]。同时，增生的平滑肌细胞也会分泌胶原蛋白和其他细胞外基质成分，使斑块变得更加稳定。然而，过度的平滑肌细胞增生也可能导致动脉粥样硬化的进展^[12]。过多的平滑肌细胞会导致斑块内部细胞密度增加、斑块体积增大，最终可能破裂释放出血栓物质，引发血管狭窄或阻塞，导致心脑血管疾病的发生^[13]。因此，控制平滑肌细胞增生对预防和控制动脉粥样硬化至关重要。通过保持健康的生活方式、合理饮食、适量运动等方式，可以减缓平滑肌细胞的过度增生，降低斑块的形成和破裂风险，从而减少动脉粥样硬化的发生。

1.1.4 斑块破裂与动脉粥样硬化

斑块是由胆固醇、脂质、平滑肌细胞、炎性细胞和纤维素等物质组成的血管内壁的局部增生物，可在血管内壁形成肿块状结构。当斑块内部炎症反应加剧、斑块内的炎性细胞和介质释放增多时，斑块的稳定性会降低，斑块表面的纤维可能变薄、破裂或破裂处被破坏，导致斑块内部的血栓物质暴露在血流中^[14]。这些血栓物质可以激活血小板和凝血系统，形成血栓，进一步加剧血管狭窄或阻塞，导致心脑血管事件，如心肌梗塞、脑卒中等^[15]。因此，预防斑块破裂对于预防心脑血管疾病至关重要。通过控制炎症反应、稳定斑块、减少斑块内部的血栓形成等方式，可以降低斑块破裂的风险。

1.1.5 血管狭窄与动脉粥样硬化

在动脉粥样硬化的过程中，血管壁内的斑块逐渐增大，形成狭窄的血管腔。斑块的形成会导致血管壁变硬、失去弹性，同时也会引起血管内腔的狭窄^[16]。当血管腔狭

窄到一定程度时，会影响到血液的正常流动，导致血流速度减慢、血液流动受阻，从而影响到身体各部位的供血和氧气输送^[17]。血管狭窄还可能导致高血压、心脏负荷增加、心肌缺血等并发症的发生^[18]。另外，当斑块内部的血栓物质破裂或脱落时，也可能引发血栓形成，进一步加剧血管狭窄，甚至导致血管完全阻塞，引发心脑血管事件，如心肌梗塞、脑卒中等严重后果^[19]。因此，预防和控制动脉粥样硬化是预防血管狭窄的关键。保持健康的生活方式、合理饮食、适量运动、控制血脂、血糖和血压等，可以有效减缓动脉粥样硬化的发展，降低血管狭窄的风险。及时发现和处理血管狭窄也是预防心脑血管疾病的重要措施。

1.2 自噬

自噬是一种细胞自我调节的重要生理过程，通过这一过程，细胞可以将自身的部分或全部细胞器、蛋白质以及其他细胞成分进行降解和再利用。自噬在维持细胞内环境稳定、清除受损或老化细胞器、应对营养缺乏、抗击感染等方面起着重要作用^[20]。在自噬过程中，细胞会通过一系列信号通路（如 mTOR 信号通路、AMPK 信号通路等）被诱导启动自噬。它还与许多疾病的发生和发展密切相关，如癌症、神经退行性疾病、心血管疾病等。因此，研究自噬对于理解疾病的发病机制、开发治疗方法具有重要意义。

1.2.1 自噬与动脉粥样硬化

动脉粥样硬化是一种慢性进行性的血管疾病，主要特征是在血管内壁形成斑块，导致血管狭窄和功能异常^[21]。研究表明，自噬在斑块形成过程中扮演着重要角色^[22]。自噬可以调节炎症反应、氧化应激和细胞凋亡等过程，对斑块内的炎症细胞和脂质沉积进行调控^[23]。一些研究显示，自噬功能的异常可能与斑块形成和动脉粥样硬化的发展有关^[24]。斑块的稳定性与动脉粥样硬化的进展密切相关^[25]。自噬可以调节斑块内的细胞凋亡和炎症反应，维持斑块的稳定性。研究表明，自噬的活性下降可能导致斑块易破裂，增加心脑血管事件的风险^[26]。自噬可以调节血管内皮细胞的生存和功能，维持血管内皮屏障的完整性。自噬功能的异常可能导致血管内皮损伤，促进动脉粥样硬化的发展^[27]。

总的来说，自噬在动脉粥样硬化的发生和发展中扮演着重要角色，通过调节炎症

反应、细胞凋亡、氧化应激等过程影响斑块形成和稳定性。进一步研究自噬与动脉粥样硬化之间的关系，有助于深入理解动脉粥样硬化的发病机制，为预防和治疗提供新的思路和方法

1.2.2 自噬与 PI3K/AKT/mTOR 通路

PI3K/AKT/mTOR 通路是一个重要的细胞信号传导通路，参与调控细胞生长、增殖、存活等多种生物学过程。这一通路自噬之间的相互作用对于细胞的代谢平衡、生存和凋亡等过程至关重要^[28]。PI3K/AKT/mTOR 通路对自噬的调控起着重要作用。在正常情况下，当细胞处于营养充足状态时，PI3K/AKT/mTOR 通路被激活，抑制自噬的进行；而在饥饿或应激条件下，通路被抑制，促进自噬的启动^[29]。mTOR 是 PI3K/AKT/mTOR 通路中的一个重要组分，也是自噬的负调节因子。激活的 mTOR 能够抑制自噬的启动，而 mTOR 的抑制则有助于促进自噬的进行^[30]。AKT 是 PI3K/AKT/mTOR 通路中的一个关键蛋白激酶，对细胞生存、增殖和代谢等起着重要调节作用。AKT 的活性可以影响 mTOR 的磷酸化状态，从而影响自噬的调节^[31]。

总的来说，PI3K/AKT/mTOR 通路通过调控 mTOR 的活性，影响自噬的进行。这种相互作用在细胞内维持自噬和细胞代谢的平衡，对于细胞的生存和功能具有重要意义。进一步研究自噬与 PI3K/AKT/mTOR 通路之间的关系，有助于深入理解细胞信号传导网络的调控机制，为相关疾病的治疗提供新的靶点和策略。

1.3 miRNA 的概述

MicroRNA (miRNA) 是一类长度约为 20-25 个核苷酸的非编码 RNA 分子，主要存在于真核生物的细胞内^[32]。miRNA 通过与靶基因的 mRNA 结合，降解或抑制其翻译，在转录后水平调节基因表达，参与多种生物学过程的调控，包括细胞增殖、分化、凋亡、代谢等^[33]。自 1993 年在线虫细胞发现后，科学家们发现在动物、植物以及病毒体内存在大量的 miRNA^[16]。目前，在人类和其他真核生物中超过 600 种 miRNA 已经被确认。miRNA 在生物体内扮演重要的调控角色，参与调控细胞周期、细胞命运、代谢、免疫应答等多种生理过程^[34]。miRNA 的异常表达与多种疾病的发生和发展密切相关^[35]。因此，miRNA 作为一种重要的调控因子，对于疾病的诊断、治疗以及预防具有重要意义。

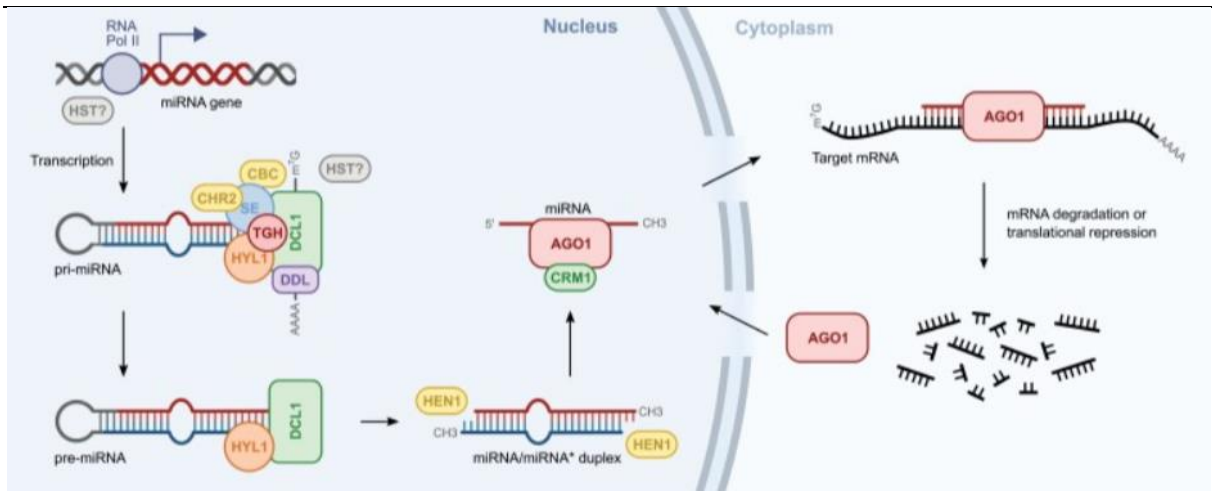


图 1-1 miRNA 的生物发生^[36]
Figure 1-1 Biogenesis of miRNA

1.3.1 miRNA 的作用模式

miRNA 通过与靶基因的 mRNA 结合，调控基因表达，从而影响细胞的生理过程。miRNA 的作用模式主要包括翻译抑制：miRNA 与 mRNA 的 3'非翻译区（3'UTR）结合，导致 mRNA 的翻译被抑制，从而减少靶基因蛋白的合成^[37]。这种方式是 miRNA 最常见的作用模式之一；mRNA 降解：miRNA 结合到 mRNA 上后，可能会导致 mRNA 的降解，从而减少靶基因的 mRNA 水平，进而影响靶基因的蛋白表达；转录调控：除了直接影响 mRNA 的稳定性和翻译外，miRNA 还可以通过影响靶基因的转录过程，调控靶基因的表达水平；剪切调控：有些 miRNA 可能会导致靶基因 mRNA 的剪切变化，从而影响靶基因的蛋白产物的结构和功能；转座活性：miRNA 还可能通过转座活性的方式，影响基因组的稳定性和表达模式^[38]。

总的来说，miRNA 通过多样化的作用模式，与 DNA、RNA 和蛋白质等分子产生相互作用，构成复杂而精密的调控网络，调控生物体内的众多生物学过程^[39]。miRNA 与靶基因之间的相互作用网络复杂，一个 miRNA 可能同时调控多个靶基因，一个靶基因也可能受到多个 miRNA 的调控。对 miRNA 的作用模式进行深入研究，有助于更好地理解 miRNA 的生物学功能，以及其在疾病发生和发展中的作用机制。

1.3.2 循环中的 miRNA

循环中的 miRNA（circulating miRNA）是指存在于体液中（如血浆、血清、唾液、

尿液等)的 miRNA, 它们以一种稳定的形式循环在体内^[40]。这些循环中的 miRNA 可以通过胞外囊泡、蛋白质载体或裸露在体液中的形式存在, 从而在体内进行远距离的细胞间通讯^[41]。循环中的 miRNA 在细胞间的传递和调控中起着重要作用, 循环中的 miRNA 相对稳定, 不易被降解, 能够在体液中长时间存在。循环中的 miRNA 可以通过胞外囊泡(如外泌体)或蛋白质载体等形式, 跨越细胞膜, 从而在不同细胞之间传递信息^[42]。循环中的 miRNA 可以通过靶向调控靶基因的表达, 影响接受细胞的生理过程, 参与细胞间的通讯和调控^[43]。循环中的 miRNA 可以作为潜在的生物标志物, 用于疾病的诊断、预后评估和治疗监测^[44]。

研究表明, 循环中的 miRNA 在多种疾病的发生和发展中发挥着重要作用, 如癌症、心血管疾病、神经系统疾病等^[45]。因此, 对循环中的 miRNA 进行深入研究, 有助于揭示其在疾病发生机制中的作用, 为疾病的早期诊断和治疗提供新的思路和方法。

1.3.3 miR-181b 的生物学功能

miR-181b 是一种 miRNA, 它在细胞内起着重要的调控作用, 参与多种生物学过程^[46]。miR-181b 可以通过靶向调控多个基因, 影响细胞的增殖和凋亡过程。在某些情况下, miR-181b 可能促进细胞增殖, 而在其他情况下可能促进细胞凋亡, 从而影响细胞的生存和增殖能力^[47]。miR-181b 也参与调控细胞的分化过程。它可以影响干细胞定向分化为特定细胞系, 促进或抑制细胞的分化发育。miR-181b 在免疫系统中发挥重要作用, 参与调控 T 细胞和 B 细胞的发育、分化和功能。它可以影响免疫细胞的活化、增殖和细胞因子的分泌, 从而调节免疫反应^[48]。miR-181b 在神经系统中也具有重要作用, 参与调控神经元的发育、突触形成和神经递质的合成释放^[49]。它可能影响神经元的功能和神经传导, 对神经系统的正常发育和功能维持起着重要作用。

总的来说, miR-181b 作为一种 miRNA, 在细胞内通过调控靶基因的表达, 参与调控多种生物学过程, 包括细胞增殖、凋亡、分化、免疫调节和神经系统调控等。对 miR-181b 的生物学功能进行深入研究, 有助于更好地理解其在不同生理和病理过程中的作用机制, 为相关疾病的治疗和预防提供新的思路和方法。

1.4 五味子及五味子丙素概述

1.4.1 五味子

五味子 (*Schisandra chinensis* Turcz. Baill.), 又称五味子果实、五味子子实, 属于五味子科五味子属。果实呈圆形或卵形, 具有特殊的香味^[50]。是一种传统中药材, 具有悠久的历史 and 广泛的应用^[51]。五味子在中医药理论中被视为一种重要的药材, 具有多种药用价值。它被认为具有温肺、益气、补肾、安神、生津等功效, 常用于治疗肺虚咳嗽、气虚乏力、肾虚遗精、失眠健忘等症状。现代研究表明, 五味子含有多种活性成分, 如五味子酸、五味子苷、五味子甙等, 具有抗氧化、抗炎、抗肿瘤、调节免疫等作用, 对心血管疾病、肝病、神经系统疾病等具有一定的保健和治疗作用^[52]。

总的来说, 五味子作为一种传统中药材, 具有丰富的药用价值和广泛的应用领域。对五味子的药理作用和活性成分进行深入研究, 有助于揭示其药效机制, 为其在临床和保健领域的应用提供科学依据。

1.4.2 五味子丙素

五味子丙素 (Schisandrin C, SC) 是一种来源于五味子果实的天然植物化合物, 具有很强的抗氧化作用, 可以有效清除体内的自由基, 减少氧化应激对心血管系统的损害^[53]。氧化应激是心血管疾病发生和发展的重要因素, 通过减少氧化应激可以降低心血管疾病的风险^[54]。此外, 五味子丙素还具有抗炎作用, 可以减轻炎症反应, 缓解疼痛和肿胀, 降低动脉粥样硬化的发生和发展。动脉粥样硬化是心血管疾病的主要病理基础, 炎症在其形成过程中扮演着重要角色^[55]。这些特性使其在心血管疾病的预防和治疗中具有潜在的益处。通过抑制炎症反应, 五味子丙素可以减少动脉粥样硬化的风险。五味子丙素还具有降血压和降血脂的作用, 可以改善心血管健康^[56]。高血压和高血脂是心血管疾病的危险因素, 通过调节血压和血脂水平, 五味子丙素可以降低心血管疾病的发生风险^[57]。

总的来说, 五味子丙素是一种具有多种生物活性的天然植物化合物, 对人体健康具有积极的影响, 可以作为预防和治疗心血管疾病的潜在药物或保健品成分。然而, 由于其在体内的代谢和作用机制尚不完全清楚, 尚需进一步的研究和临床试验来验证其在心血管疾病中的确切作用和效果。

1.5 研究目的及意义

动脉粥样硬化属于中医“气虚血淤”的范畴，气虚则血运不畅，脉道不利，血脉失养。阴虚则虚火灼津，津亏液少，脉道干涩。所以中医以益气、养阴为原则治疗动脉粥样硬化^[58]。五味子广泛地应用于病毒性心肌炎、高血压、肺心病、心力衰竭、冠心病等疾病的防治，疗效确定^[59]。五味子丙素是从五味子中分离得到的联苯环辛二烯类木脂素^[60]。新近我们研究发现五味子丙素具有很好的心脑血管保护作用。鉴于此，本研究通过高效液相色谱联合网络药理学及体内细胞实验考察五味子丙素对动脉粥样硬化的作用，并基于自噬的角度进一步探讨五味子丙素治疗动脉粥样硬化的具体分子作用机制。

本研究在课题组前期大量工作的基础上综合利用多学科交叉技术，探讨五味子丙素通过调控泡沫细胞源外泌体 miR-181b-5p 释放，调节 Sirt1-PI3K/AKT/mTOR 自噬通路诱导心血管内皮细胞的损伤，参与动脉粥样硬化疾病的发生、发展过程。深入阐释五味子丙素通过调节外泌体 miR-181b-5p 释放途径防治动脉粥样硬化疾病作用的新机制，揭示五味子丙素防治动脉粥样硬化性心血管疾病的作用靶点、特色与信号途径，为具有良好心血管保护作用的中药活性成分防治心血管疾病微观生物学基础的阐释提供新的研究方向和思路。具有很强的针对性和临床指导意义。

第2章 五味子抗动脉粥样硬化药效物质基础分析

2.1 引言

五味子又称五味子实、五味子仁，是一种中药材，常用于中医药领域^[61]。五味子在中医药领域被认为具有一定的抗动脉粥样硬化的作用。动脉粥样硬化是一种慢性疾病，主要是由于血管内壁发生炎症反应，导致胆固醇等物质在血管壁内沉积形成斑块，最终导致血管狭窄和硬化^[62]。五味子具有收敛止泻、涩肠止带的功效，可以帮助调节肠道功能，减少腹泻等情况，有助于维护肠道健康。在中医药中，五味子常被用于配伍其他药材，以增强疗效。在中医药理论中，肠道健康与心血管疾病有一定关联，因为肠道的炎症反应和菌群失调可能会引发全身炎症反应，从而影响心血管健康。

高效液相色谱法（High Performance Liquid Chromatography, HPLC）C 在分析不同的物质时，利用不同物质在不同条件下对紫外吸收能力的不同达到物质分离分析的方式^[63]，具有灵活的调节性，可通过调节柱温、波长、流动相的不同以及比例来达到分离物质的目的^[64]。此方法简便、可操作性强，具有优秀的分离不同物质能力，在化学分析过程中被广泛运用。

网络药理学是一门适用于考察多成分复杂体系对机体多靶点活性作用的生物信息学技术，多被用于中药复方的药理学机制研究，也适用于药食同源物品的分析，通过结构相似比对预测其可能作用的疾病靶点，构建“成分-靶点”相互作用网络，探索其主要活性成分及其作用机制^[65]。分子对接可以验证活性化合物与中心治疗靶点之间的相互作用^[66]。本研究将网络药理学和分子对接技术相结合，全面揭示五味子丙素抗动脉粥样硬化的作用机制，预测五味子抗动脉粥样硬化的关键活性成分和关键靶点，应用 AutoDock-Vina 进行分子对接，以揭示活性成分（配体）和目标蛋白（受体）之间的相互作用。

本章节通过 HPLC 对五味子中的五种混合有效成分同时进行检测，为建立五味子质量评价标准提供技术支持。通过五种成分的标准品建立标准曲线，从而对五味子中的有效成分进行比对，并测定五味子中有效成分的含量。同时根据测定的五味子五种成分与动脉粥样硬化疾病进行网络药理学预测，筛选核心靶点。确定五味子治疗动脉粥样硬化的药理途径和生物学功能。将核心靶点进行蛋白相互作用，筛选出核心靶点，将五味子五种活性成分与核心靶点进行分子对接明确关键活性成分。五味子中有效成

分具有较高的医用价值，利用此方法为测评五味子的质量提供了简便、省时的方式，同时为进一步研究医药和开发新的食疗产品提供参考数据。

2.2 实验材料

2.2.1 实验仪器

表 2-1 实验中的主要仪器

Table 2-1 The main equipments in the experiments

主要仪器	生产厂家
十万分之一电子分析天平	上海力辰邦西仪器有限公司
电子天平	常州市幸运电子设备有限公司
超纯水系统	舒活泉智能科技有限公司
电加热器	长沙米淇仪器设备有限公司
高效液相色谱仪	日本岛津 SIL-20A
超声波清洗器	深圳市歌能清洗设备有限公司

2.2.2 实验试剂

表 2-2 实验中的主要试剂

Table 2-2 The main reagents in the experiments

主要试剂	生产厂家
五味子	寻百草药业有限公司
乙腈（色谱纯）	上海阿拉丁生化科技股份有限公司
无水乙醇（色谱纯）	上海阿拉丁生化科技股份有限公司
甲醇（色谱纯）	上海阿拉丁生化科技股份有限公司
冰醋酸（色谱纯）	上海阿拉丁生化科技股份有限公司
五味子醇甲标准品	南京源植生物科技有限公司
五味子醇乙标准品	南京源植生物科技有限公司
五味子甲素标准品	南京源植生物科技有限公司
五味子乙素标准品	南京源植生物科技有限公司
五味子丙素标准品	南京源植生物科技有限公司

2.3 五味子活性成分及其含量分析

2.3.1 五味子样品预处理

将所得的五味子样品放入中药材打粉机中粉碎，过 80 目筛，得到五味子样品粉末。

2.3.2 五味子提取液的制备

取上述制备的五味子粉 5.000 g 按料液比 1:20 (g/mL) 加入 100 mL 无水乙醇 (v:v) 于圆底烧瓶中，采用热回流提取法提取 2.5 h，后过滤，收集滤液。所得溶液即为五味子提取液。

2.3.3 标准对照品溶液的制备

五味子醇甲标准品储备溶液：精密称取 23.0 mg 五味子醇甲标准品，溶于 10 mL 甲醇中，配制成浓度为 2.30 mg/mL。

五味子醇乙标准品储备溶液：精密称取 17.6 mg 五味子醇乙标准品，溶于 10 mL 甲醇中，配制成浓度为 1.76 mg/mL。

五味子甲素标准品储备溶液：精密称取 19.2 mg 五味子甲素标准品，溶于 10 mL 甲醇中，配制成浓度为 1.92 mg/mL。

五味子乙素标准品储备溶液：精密称取 14.7 mg 五味子乙素标准品，溶于 10 mL 甲醇中，配制成浓度为 1.47 mg/mL。

五味子丙素标准品储备溶液：精密称取 17.0 mg 五味子丙素标准品，溶于 10 mL 甲醇中，配制成浓度为 1.70 mg/mL。

将上述标准品储备液稀释 10 倍，将所得溶液过 0.45 μm 滤膜即得对应的标准品对照溶液。

2.3.4 色谱条件

在高效液相色谱仪（岛津 LC20AD）中以 shim-pack C18 ODS 色谱柱(200 mm×4.6 mm, 5 μm)，以乙腈 (A) -0.5%醋酸水溶液 (B) 为流动相，设置柱温 30°C，调整总流速为 0.8 mL/min；波长设置为 254 nm；进样量 20 μL 。洗脱时间程序见表。

表 2-3 梯度洗脱时间程序

Table 2-3 gradient elution time program

时间(min)	乙腈 (%)	0.5 %醋酸水 (%)
0	45	55
5	50	50
15	60	40
25	70	30
30	80	20
40	85	15
45	Stop	

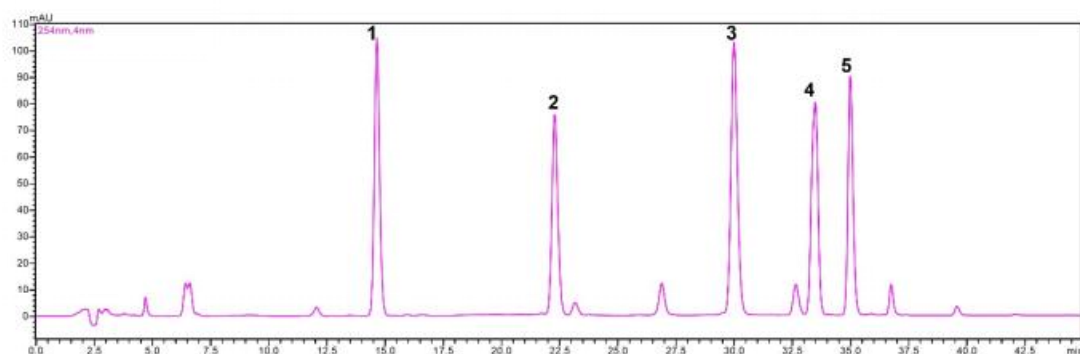


图 2-1 混合标准品色谱图 (1 五味子醇乙; 2 五味子醇甲; 3 五味子甲素; 4 五味子乙素; 5 五味子丙素)

Figure 2-1 Chromatogram of mixed standard products (1 Schisandrol B; 2 Schisandrol A; 3 Schisandrin A; 4 Schisandrin B; 5 Schisandrin C)

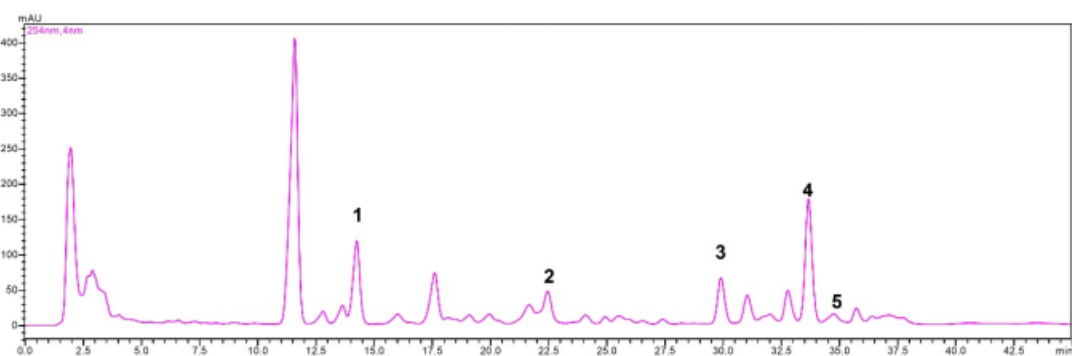


图 2-2 五味子提取液色谱图 (1 五味子醇乙; 2 五味子醇甲; 3 五味子甲素; 4 五味子乙素; 5 五味子丙素)

Figure 2-2 Chromatographic diagram of extract liquid of *Schisandra chinensis* (1 Schisandrol B; 2 Schisandrol A; 3 Schisandrin A; 4 Schisandrin B; 5 Schisandrin C)

2.4 五味子主要活性成分抗动脉粥样硬化网络药理学研究

2.4.1 活性成分靶点和疾病靶点筛选

在 Pubchem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) 分别找出五种五味子活性成分的 SMILES 号, 将五种五味子活性成分的 SMILES 导入 SwissTargetPrediction 数据库 (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) 中, 物种选择 “Homo sapiens” 得到其相应的靶点数据。利用 GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org/>) 以 “atherosclerosis” 为关键词检索动脉粥样硬化疾病的相关靶点。将所有活性成分靶点汇集到一起进行筛选, 将动脉粥样硬化的靶点汇集到一起进行筛选。将五味子中五种活性成分与动脉粥样硬化相关靶点导入 Venny 绘图软件 (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>) 取交集, 从而获得五味子抗动脉粥样硬化的共同靶点^[67]。

2.4.2 构建蛋白质与蛋白质相互作用网络图

将五味子抗动脉粥样硬化的共同靶点导入 String 数据库 (<https://cn.string-db.org/>), 构建生物物种设置为 “Human” 的 PPI 网络模型; 置信度 > 0.7 并隐藏网络中断开连接的节点, 其余参数设置为默认值。得到蛋白质间相互作用的数据图并保存其 TSV 格式文件, 再将其导入 Cytoscape 3.8.2 软件中对蛋白质相互作用 (PPI) 进行可视化^[68]。

2.4.3 潜在靶点的 GO 功能及 KEGG 通路富集分析

将五味子抗动脉粥样硬化共同靶点导入 DAVID 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>), 以 $P < 0.05$ 为筛选条件, 选取 GO 分析排名前 10、KEGG 分析排名前 20 的条目绘制图形。将结果进行可视化分析, 得到 GO 富集分析结果包括生物过程 (BP)、分子功能 (MF) 和细胞组分 (CC), 通过 KEGG 分析可以得到通路富集结果, 再用微生信数据库 (<https://www.bioinformatics.com.cn/>) 作图进行可视化分析^[69]。

2.4.4 构建成分-靶点-通路网络图

将五味子五种活性成分和成分靶点以及排名前十的通路靶点信息导入 Cytoscape 3.8.2 软件, 构建化合物-靶点-通路相互作用网络, 展示活性成分与靶点及通路之间的相互作用关系。通过软件计算网络拓扑参数、度和介数中心性 (BC), 筛选

主要候选目标和单体成分^[70]。

2.5 五味子主要活性成分与核心靶点的分子对接

2.5.1 配体与受体的处理

选择 PPI 结果中两个核心靶点作为靶点蛋白，在 uniprot 数据库 (<https://www.uniprot.org/>) 中搜索核心靶点名并选择 “human”，复制其 Entry 名，在 PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 中搜索核心靶点的 Entry 名，下载靶点文件。将五种五味子活性成分导入 Pubchem 数据库中下载其 2D 结构，再打开 Chem3D 软件计算最小能量后，将文件以 mol2 格式保存。

2.5.2 大分子受体文件的制备

从蛋白质数据库 (PDB) (<http://www.rcsb.org/>) 中检索蛋白质的三维结构，然后输入软件 Pymol 进行去除水分子修饰，共结晶的配体和离子。随后，在 AutoDock1.5.6 工具中，添加了缺失的氢和 Kollman 部分电荷，非极性氢被合并到它们相应的碳中。然后将结构保存为 PDBQT 蛋白受体文件。

2.5.3 小分子配体文件的制备

从 PubChem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)下载 SDF 格式的 2D 结构后，将化合物的 2D 结构导入 Chem3D 软件，最小化能量(MM²)并转移到 3D 结构。随后，在 AutoDockVina 软件中，通过添加氢和质子化来修改获得的 3D 结构。非极性氢被合并到它们相应的碳旋转中，并且软件中自动设置了扭转，然后将结构保存为 PDBQT 配体文件。

2.5.4 对接口袋的构建

将受体和配体的 PDBQT 结构导入 AutoDock tools，构建对接口袋。构建交配盒时，间距设置为 1，中心设置在大分子上，并设置 x-、y-和 z-维度上的点数以保持蛋白质完全被交配盒覆盖。对于每种蛋白质，交配盒的这些参数由配置文件 (config) 定义，供 Vina 进一步对接，其中包括以下内容：交配盒的中心 (centre-x、centre-y、centre-z)、

交配盒的大小(size-x, size-y, size-z), 要输出的最大绑定模式数(num modes)设置为 20, energy-range 设置为 5 和 exhaustiveness 设置为 8。

2.5.5 对接与可视

利用 Vina 软件进行分子对接, 计算对接亲和力。在此过程中, 除了配置文件外, 还使用了蛋白质和配体的 PDBQT 文件, 因为 PDBQT 文件确定了用于对接的配体和蛋白质的信息。Vina 运行完成后, 将结果输出为.pdbqt*和 log*.txt 文件, 并根据对接结合自由能进行评分, 建立目标蛋白受体与小分子配体的结合亲和力评分。

2.6 结果与分析

2.6.1 五味子活性成分及其含量分析

2.6.1.1 线性关系考察

取上述对应的标准品溶液至容量瓶中, 以甲醇为溶剂配制成梯度溶液。按上述色谱条件每个梯度重复进样 3 次, 记录各标准品的出峰时间统计各物质的峰面积, 以各标准品浓度 (x) 为横坐标, 峰面积 (y) 为纵坐标绘制标准曲线。结果表明五味子醇甲、五味子醇乙、五味子甲素、五味子乙素、五味子丙素在线性范围内具有良好的线性关系。各标准品线性关系, 结果见表。

表 2-4 各标准品标准曲线
Table 2-4 Standard curves of each standard product

成分	线性关系	相关系数 R^2	线性范围 $\mu\text{g/mL}$
五味子醇甲	$y = 33349x + 96352$	1	27.600-230.000
五味子醇乙	$y = 46774x - 180.1$	0.9999	3.52-176.000
五味子甲素	$y = 49494x + 136231$	0.9998	3.200-384.00
五味子乙素	$y = 54401x + 5462$	0.9999	2.940-147.000
五味子丙素	$y = 40552x + 3544.1$	0.9999	3.400-34.000

2.6.1.2 精密度考察

精密吸取“2.3.3”项下制备的对照品 20 μL , 按“2.3.4”项所述的色谱条件进样, 重复 6 次, 并记录峰面积, 测得 1~5 峰面积的 RSD(n=6)分别为 1.9%、1.2%、0.6%、0.7% 和 1.3%。结果表明, 仪器精密度良好。

2.6.1.3 重复性考察

精确称取同一批五味子样品 6 份，按“2.3.2”项所述方法制备五味子提取液，按照“2.3.4”项条件进样 20 μL ，记录个样品中各成分的峰面积，并计算各成分含量。测得上述样品的平均含量的 RSD 分别为1.6%、1.2%、1.6%、1.9%和 2.1%。表明该方法重复性良好。

2.6.1.4 稳定性试验

取适量的五味子样品，按照“2.3.2”项下方法制备样品溶液，分别在时间为0、2、4、8、12、24 h 的条件下按照“2.3.4”项所述的色谱条件进样 20 μL 进行分析，记录各标准品的出峰时间和峰面积。五味子醇甲、五味子醇乙、五味子甲素、五味子乙素和五味子丙素峰面积的 RSD (n=6) 分别为 0.8%、0.6%、1.3%、1.6%和 1.3%。结果表明，样品溶液中 5 个化合物在 24 h 内稳定性良好。

2.6.1.5 加样回收率实验

取上述已知含量的五味子样品 5 份。依次精密移取适量已知浓度的标准品储备液，按照“2.3.2”项方法制备样品溶液，按“2.3.4”项所述色谱条件下进行测定，计算回收率。结果五味子中上述各种有效成分的平均回收率 (n=5) 分别为 98.7%、101.3%、105.7%、97.4%和 99.8%；RSD 分别为 0.8%、1.3%、2.2%、1.7%和 1.1%。

2.6.1.6 样品含量测定

分别称取上述制备的五味子粉末 5.000 g，按照上述制备方法制备五味子提取液，参照“2.3.4”项所述色谱条件检测，进样 20 μL ，重复进样 3 次，所得峰面积代入上述线性方程计算对应成分的含量。结果见表。

表 2-5 五味子提取物中各物质成分含量 (n=3)

Table 2-5 Contents of components in extracts of *Schisandra chinensis* (n=3)

成分	峰面积 $\bar{y}$	含量 $\bar{x}$ ($\mu\text{g/g}$)
五味子醇甲	1371478	38.236
五味子醇乙	2548299	54.485
五味子甲素	1497506	23.913
五味子乙素	3806154	69.864
五味子丙素	561592	13.761

2.6.2 五味子主要活性成分抗动脉粥样硬化网络药理学研究

2.6.2.1 五味子抗动脉粥样硬化靶点的收集

利用 SwissTargetPrediction 数据库分别预测五味子的活性成分，去除重复项最终筛选出五味子五种活性成分对应靶点 284 个。通过 GeneCards 数据库筛选获得动脉粥样硬化相关靶点有 5113 个，最后运用 Venny 绘图软件将五味子中五种活性成分靶点与动脉粥样硬化相关靶点取交集，得到 197 个靶点，见图。

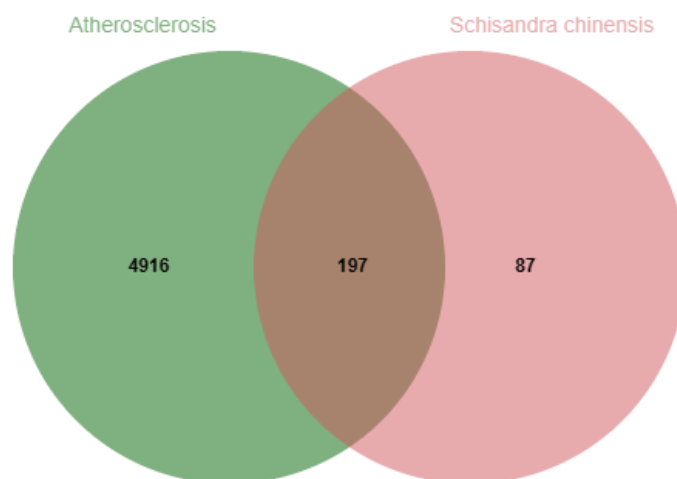


图 2-3 五味子抗动脉粥样硬化靶点维恩图

Figure 2-3 Venn diagram of anti-atherosclerosis targets of *Schisandra chinensis*

2.6.2.2 PPI 网络构建与分析

将五味子抗动脉粥样硬化共同靶点导入 STRING 数据库，再将得到的数据信息导入 Cytoscape 3.8.2 软件进行分析，去除游离节点后共得到 182 个节点，结果有 975 条边。节点越大、颜色越深，表示该靶点 degree（度值）越大，该节点在网络中具有更重要的作用。如图所示，五味子抗动脉粥样硬化的关键靶点主要包括 SRC、STAT3、HSP90AA1、AKT1、EGFR、PIK3CA、PIK3R1。

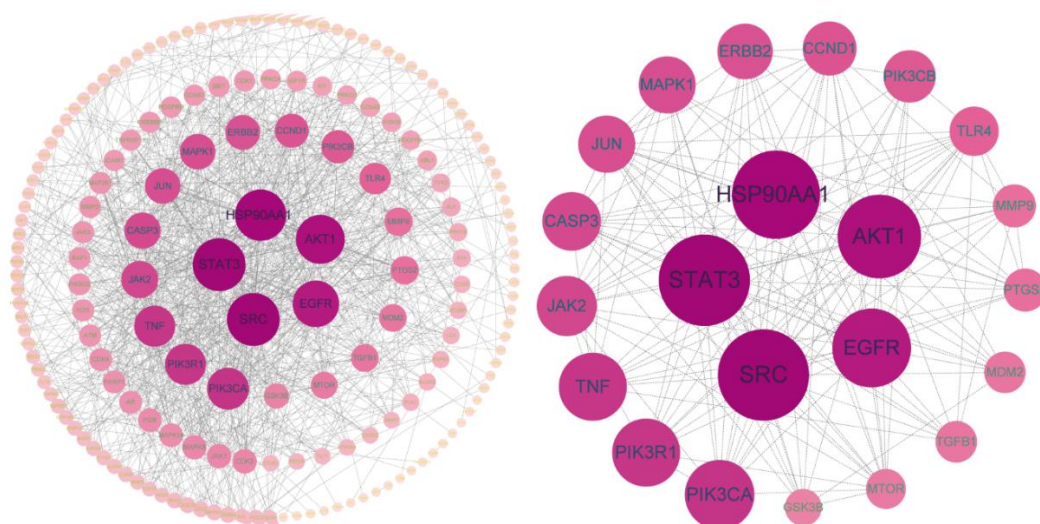


Figure 2-4 Protein interaction network

将五味子抗动脉粥样硬化的潜在 197 个靶点导入 DAVID 数据库，进行 GO (Gene Ontology) 富集分析以及 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 通路富集分析。GO (基因本体) 分析结果显示，生物过程 (BP) 中主要包括蛋白质磷酸化、蛋白质自身磷酸化、peptidyl-serine 磷酸化、peptidyl-threonine 磷酸化、炎症反应、蛋白激酶 B 信号的正向调节、信号转导、peptidyl-tyrosine 磷酸化、正向调控 MAPK 级联、激酶活性的正向调节等；由细胞成分 (CC) 可推测这些靶点主要集中在等离子体膜、质膜、细胞表面、细胞质等区域；分子功能 (MF) 主要集中于蛋白丝氨酸/苏氨酸/酪氨酸激酶活性、蛋白激酶活性、ATP 结合等。KEGG 通路富集分析结果显示，主要通路集中于 PI3K-AKT 信号通路、FoxO 信号通路、MAPK 信号通路等。

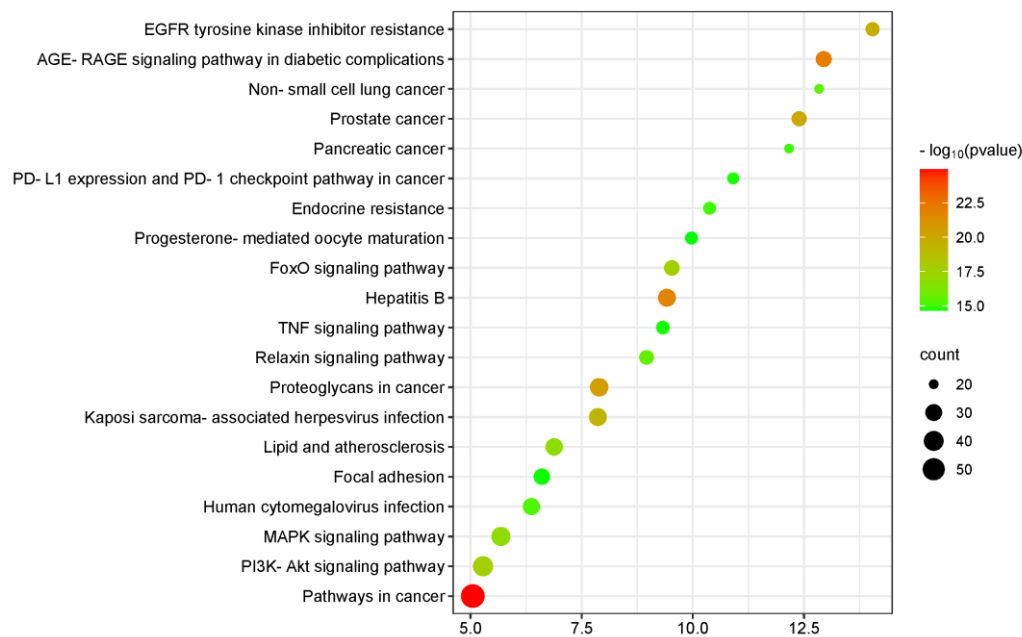


图 2-5 KEGG 功能富集分析
Figure 2-5 Functional enrichment analysis of KEGG

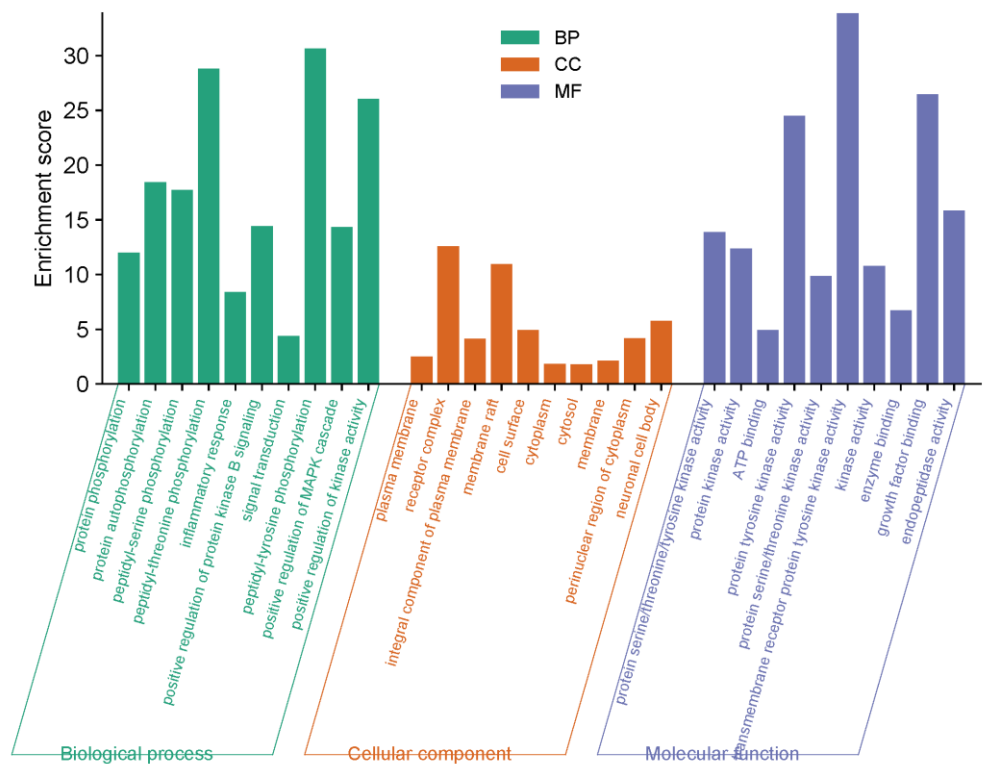


图 2-6 GO 功能富集分析（细胞组分(CC)、分子功能(MF) 和生物学过程(BP)）
Figure 2-6 GO functional enrichment analysis (Cell components (CC), molecular functions (MF), and biological processes (BP))

2.6.2.4 五味子“活性成分-靶点-通路”网络图

将五种五味子活性成分的潜在靶点及前十位富集分析的 KEGG 通路导入 cytoscape3.8.2 软件中，构建“活性成分-靶点-通路”网络图，见图。其中黄色方形代表五味子五种活性成分潜在靶点，共有 284 个黄色节点；蓝色箭头形状代表 KEGG 通路，共有 10 个蓝色节点；绿色圆形代表活性成分，共有 5 个绿色节点。

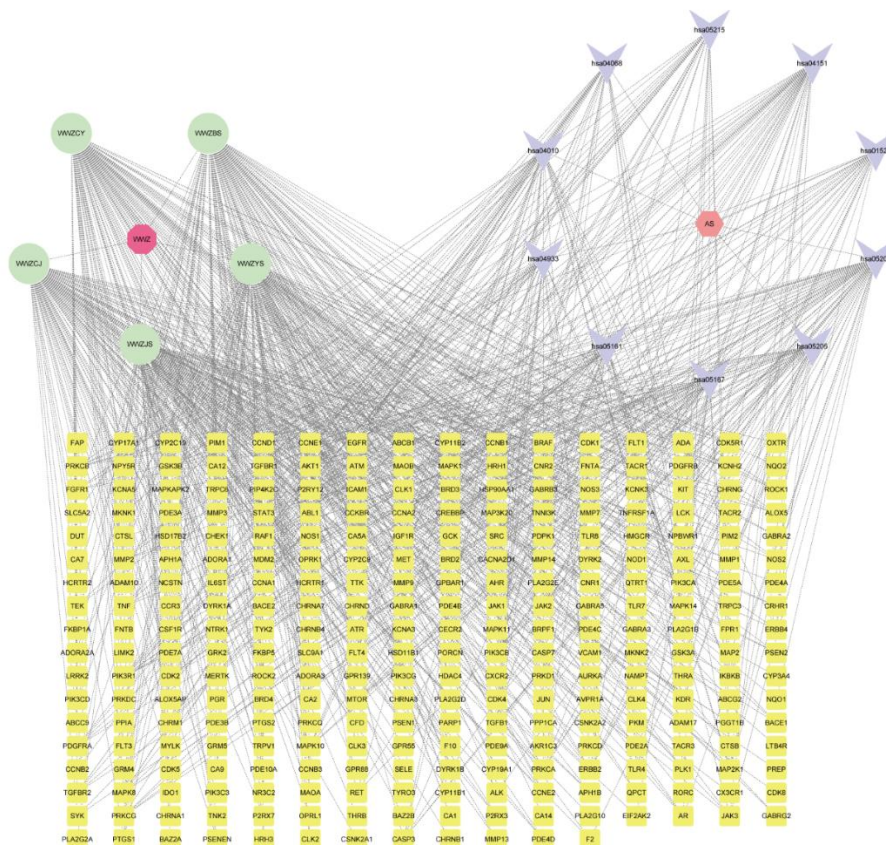


图 2-7 五味子“活性成分-靶点-通路”网络图

Figure 2-7 "Active ingredient-target-pathway" network of *Schisandra chinensis*

2.6.3 五味子主要活性成分与核心靶点的分子对接

在 PDB 数据库中得到两个关键靶点的受体蛋白，AKT1 (PDB ID: 1h10)、PI3K (PDB ID: 2enq)，在 Pubchem 数据库中得到五味子五种活性成分的二级结构，五味子醇甲 (CAS ID: 7432-28-2)、五味子醇乙 (CAS ID: 58546-54-6)、五味子甲素 (CAS ID: 61281-38-7)、五味子乙素 (CAS ID: 61281-37-6)、五味子丙素 (CAS ID: 61301-33-5)。对关键靶点蛋白和五味子五种活性成分分别处理后进行分子对接分析，得到相互间对接的结合自由能。结合能越低说明配体和受体结合越稳定，结合能小于 0 说明可以自发结合。一般以结合能小于 $-5 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ 作为评分标准。结果表明，五味

子五种活性成分与关键靶点之间，除了五味子甲素与 PI3K 之间的结合力为-4.9 kcal · mol⁻¹，其余均小于-5 kcal · mol⁻¹，因此，五个关键成分与 2 个关键靶点之间有较为强烈的结合能，五味子五种活性成分均可以与 AKT1、PI3K 关键靶点发生结合。

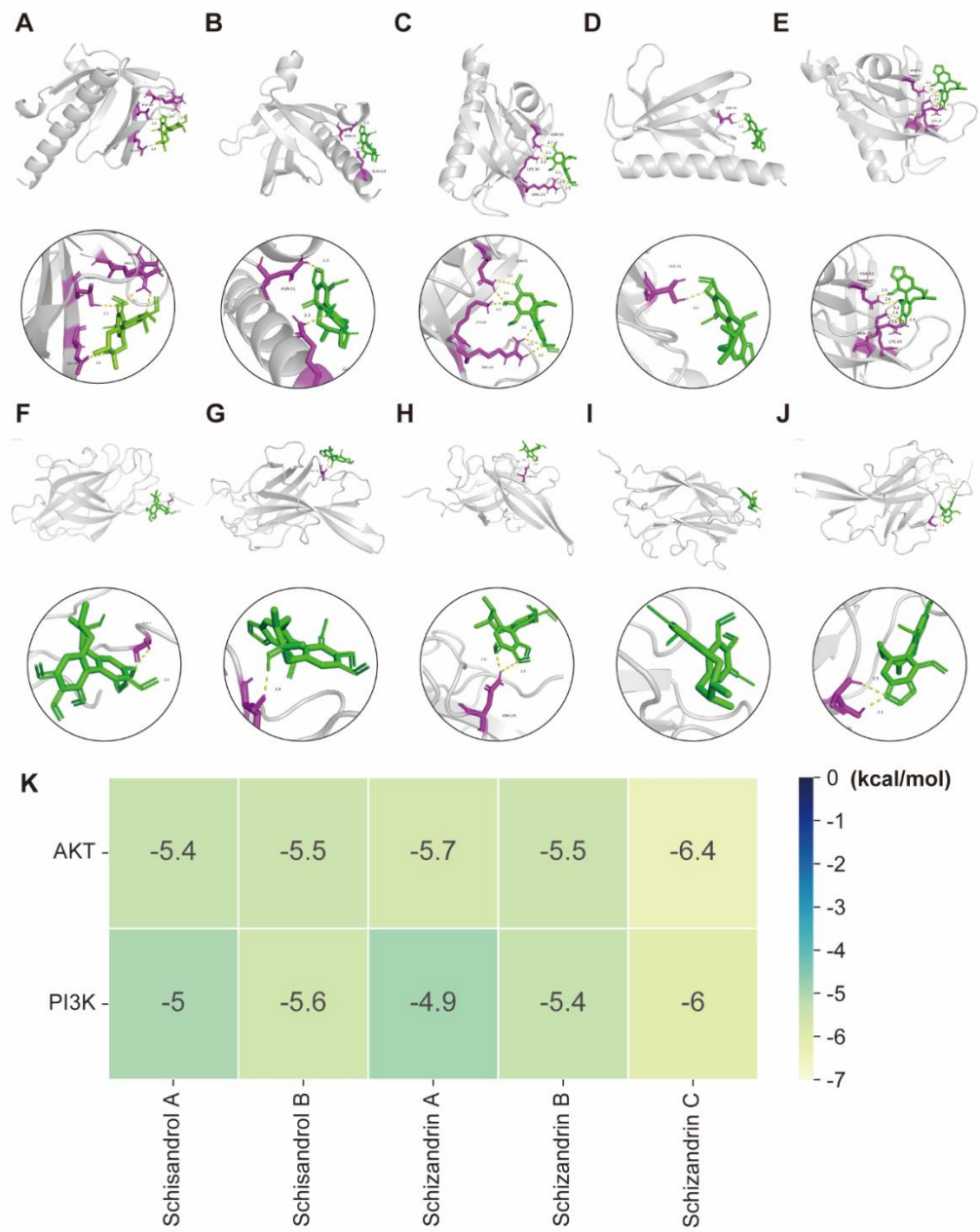


图 2-8 分子对接结果（A-E 五味子醇甲、五味子醇乙、五味子甲素、五味子乙素、五味子丙素与 AKT 对接可视化结果；F-J 五味子醇甲、五味子醇乙、五味子甲素、五味子乙素、五味子丙素与 PI3K 对接可视化结果；K 分子对接结果统计）

Figure 2-8 Molecular docking results (A-E Schisandrol A, Schisandrol B, Schisandrin A, Schisandrin B, Schisandrin C and AKT docking visual results; F-J Schisandrol A, Schisandrol B, Schisandrin A, Schisandrin B, Schisandrin C and PI3K docking visual results; K molecular docking results statistics)

2.7 本章小结

五味子是常用益气养阴方的重要药味，中医常用五味子治疗心血管疾病，疗效确切。五味子含有丰富的生物活性成分^[71]，这些成分具有抗氧化、抗炎、降血脂、抗凝血等作用，可以帮助降低心血管疾病的发生风险。一些研究也发现五味子可以降低血压、改善血管功能，对心血管健康有积极的影响。

本研究通过高效液相色谱法以五味子为研究对象，通过对提取溶剂的浓度、提取方法以及料液比等相关参数研究。实验发现，通过不同浓度的提取溶剂对五味子进行提取物，发现不同浓度的提取物溶剂对五味子中的不同物质的提取效果不同。最终，确定以无水乙醇为提取溶剂，按照料液比 1:20，热回流提取 2.5 h，能够快速实现对五味子中 5 中成分的定性分析，对其中 5 种成分进行定量分析。

采用网络药理学从多靶点、多角度、多途径预测五味子抗动脉粥样硬化的潜在靶点以及作用机制^[69]。本研究结果显示，共筛选出 284 个五味子作用靶点，5113 个动脉粥样硬化作用靶点，二者共同靶点共 197 个；进一步通过 STRING 数据库得到 33 个五味子抗动脉粥样硬化的核心靶点，其中 Degree 值排名前七的分别为 SRC、STAT3、HSP90AA1、AKT1、EGFR、PIK3CA 和 PIK3R1。

GO 功能富集分析结果表明，五味子可能通过炎症反应、信号转导等信号通路参与动脉粥样硬化进展。而 KEGG 通路富集分析结果显示 PI3K-AKT 信号通路、FoxO 信号通路、MAPK 信号通路等可能是五味子丙素发挥抗动脉粥样硬化的重要途径。为了鉴定出五味子的关键活性成分，将五味子的 5 种活性成分与核心靶点进行分子对接，结果表明五味子丙素为关键活性成分。

综上所述，本章通过高效液相色谱联合网络药理学与分子对接方法系统性地探讨了五味子治疗动脉粥样硬化的潜在作用，揭示了五味子多靶点、多途径的作用机制，并鉴定出五味子的关键活性成分为五味子丙素，为后文五味子丙素通过 PI3K/AKT/mTOR 信号通路参与自噬途径改善动脉粥样硬化奠定了理论基础。

第3章 五味子丙素通过 miR-181b-5p 靶向 Sirt1 抗内皮细胞损伤 作用机制研究

3.1 引言

动脉粥样硬化是常见的炎症疾病，是一个慢性的，多阶段，多病因的老年疾病。目前，动脉粥样硬化而形成血栓导致死亡的人数高达 28%，可以说动脉粥样硬化性疾病是世界范围内，死亡的重要原因^[72]。一般起始于血管内皮细胞(ECs)损伤^[73]。血管平滑肌细胞、单核/巨噬细胞和血管内皮细胞是参与动脉粥样硬化发生发展的重要因素。

目前普遍接受的发病机制是“损伤反应假说”，就是动脉粥样硬化疾病始于内皮细胞损伤。单核细胞和巨噬细胞及 T 淋巴细胞聚集在病灶部位，摄取大量的 ox-LDL 变成富含胆固醇酯的泡沫细胞^[74]。然后分泌出炎性介质，激活 NF- κ B 后，使血管内皮细胞的 ICAM-1 和 VCAM-1 表达水平增高，使得单核细胞和巨噬细胞及 T 淋巴细胞与血管内皮细胞粘合在一起^[75]。ox-LDL 毒性作用引起泡沫细胞坏死，并分泌超出巨噬细胞摄取能力的脂类和溶酶体酶，出现破坏血管内皮细胞膜和胆固醇结晶现象^[76]。由于相似相容原理，ox-LDL 进入血管内皮细胞，破坏该细胞的通透性和膜内外的离子梯度，从而引起细胞凋亡和破裂，引起内膜平滑肌细胞增殖，合成大量的结缔组织。增殖的平滑肌细胞、凋亡的血管内皮细胞以及大量的 ox-LDL 形成粥样纤维斑块，增殖的平滑肌细胞形成纤维帽，凋亡的血管内皮细胞和 ox-LDL 形成斑块，使血管腔变窄，从而造成供血困难^[77]。

动脉粥样硬化疾病早期不容易发现，等到发现时，一般都出现器官不同程度的损伤。病发后，各个部位的血管都有可能出现病变，这就会给病人带来很大的生理痛苦和经济损失，所以我们更应该注重早期治疗和预防。早期治疗和预防的关键就是寻找新的生物标志物。最新研究发现在很多动脉粥样硬化疾病患者体内，miRNAs 的表达含量变化非常明显，所以 miRNAs 非常有望成为动脉粥样硬化疾病诊断的新的生物标志^[78]。miRNAs 是小分子 RNA，由 20-23 个核苷酸构成的内源性非编码单链，人体的 30%以上的基因均受其调控。

miR-181b-5p 广泛表达于血管内皮细胞、平滑肌细胞和单核/巨噬细胞中，并通过作用于不同靶基因发挥其多样化的生物学功能，参与调控动脉粥样硬化^[79]。本文就

miR-181b-5p 与血管内皮细胞及单核巨噬细胞的关系及其在动脉粥样硬化发病机制中的研究进展进行。经过筛选发现 miR-181b-5p 在动脉粥样硬化患者身上的增加明显。但 miR-181b-5p 介导 HUVEC 细胞损伤及其机制仍然尚不明确, 也不能将 miR-181b-5p 直接作为动脉粥样硬化疾病诊断的生物标志物。通过加深对动脉粥样硬化等慢性炎症疾病的病因及机制的认识, 为临床诊断和治疗提供新方法。本课题在前期研究的基础上, 以 HUVEC 细胞为研究对象, 研究 exosome-miR-181b-5p 介导 HUVEC 细胞损伤及其机制。

3.2 实验材料

3.2.1 实验仪器

表 3-1 实验仪器

Table3-1 The list of experimental reagents and instruments

仪器名称	厂家
-80℃低温冰箱	Thermo Fisher
分析天平	Sartorius
蛋白质凝胶电泳仪	Biorad
接触式化学发光成像仪	上海易孚特
NIB900 荧光倒置显微镜	宁波永新光学股份有限公司
Infinite200 酶标仪	瑞士 Tecan 公司
ZEAL WAY 高压灭菌锅	致微仪器有限公司
PCR 仪	美国 Applied Biosystems 公司
实时荧光定量 PCR 仪	美国 Applied Biosystems 公司
倒置荧光显微镜	Leica
HH-2 恒温水浴锅	江苏省金坛市荣华仪器公司
JIMBIO iCytal 细胞计数仪	江苏卓微生物科技有限公司
灭菌锅	Zealway
高速冷冻离心机	Sartorius
涡旋振荡器	海门市其林贝尔
NTA 纳米颗粒跟踪仪	德国 Particle Metrix
二氧化碳恒温箱	Thermo Fisher
制冰机	Grant

3.2.2 实验试剂

表 3-2 实验试剂
Table 3-2 Experimental reagents

主要试剂	厂家
0.45 μm PVDF 膜	德国默克公司
VCAM-1 antibody	武汉三鹰生物技术有限公司
ICAM-1 antibody	武汉三鹰生物技术有限公司
MCP-1 antibody	武汉三鹰生物技术有限公司
β -actin antibody	武汉三鹰生物技术有限公司
Sirt1 antibody	武汉三鹰生物技术有限公司
油红 O 染色试剂	碧云天生物技术有限公司
五味子丙素	南京源植生物科技有限公司
BCA 蛋白浓度测定试剂盒	武汉三鹰生物技术有限公司
DMEM 高糖培养基	赛默飞世尔科技公司
ECL 发光显影液	武汉三鹰生物技术有限公司
Marker	武汉三鹰生物技术有限公司
蛋白酶磷酸酶抑制剂混合物	碧云天生物技术有限公司
人源 IL-1 β ELISA 试剂盒	翼飞雪生物技术有限公司
人源 TNF- α ELISA 试剂盒	翼飞雪生物技术有限公司
二甲基亚砷	麦克林生化科技有限公司
甘氨酸	麦克林生化科技有限公司
cDNA 合成试剂盒	碧云天生物技术有限公司
过硫酸铵	麦克林生化科技有限公司
牛血清蛋白	麦克林生化科技有限公司
噻唑蓝	麦克林生化科技有限公司
Celopener 转染液	上海吉荧生物技术有限公司
CD63 Proteintech	正能生物技术有限责任公司
Trizol 提取试剂盒	碧云天生物技术有限公司
SYBR Green 试剂盒	碧云天生物技术有限公司
RPMI 1640 培养液	赛默飞世尔科技公司
苏木精-伊红染液	碧云天生物技术有限公司
胎牛血清	赛默飞世尔科技公司
通用型抗体稀释液	新赛美生物技术有限公司
胰蛋白酶	赛默飞世尔科技公司

3.3 泡沫细胞体外模型的建立及五味子丙素浓度确定

3.3.3 细胞培养

将购买来的 THP-1 细胞放置 37℃ 的水浴锅中预热, 1000 rpm 离心 4 min。弃上清液, 加入 1 mL 含 10% 血清的 RPMI-1640 培养液, 将底部的细胞混合均匀。然后将细胞铺在 T25 细胞培养瓶内, 添加完全培养液到 4 mL, 将细胞培养于含 5% CO₂, 37℃ 的恒温培养箱中培养。待细胞长满培养瓶底 85% 以上时, 将细胞转至 15 mL 离心管中, 1000 rpm 的速离心 4 min。弃上清, 加入 1 mL 完全培养液, 将细胞接种到新的培养瓶中 (1:2 传代)。

将购买来的 HUVEC 细胞放置 37℃ 的水浴箱中复苏, 经离心机以 1000 rpm 离心 3 min 后, 去上清液。将 HUVEC 细胞转移至直径为 100 mm 的培养皿中, 其中含有 8 mL 完全 DMEM 培养基 (含 10% 胎牛血清和 1% 抗生素)。在 37℃, 5% CO₂, 饱和湿度条件下, 待细胞 80% 汇合成致密单层时传代培养, 大约 2 到 3 天按 1:4 传代培养。

3.3.4 五味子丙素对 THP-1 细胞活力的影响

取对数生长期 THP-1 细胞, 按 2×10^4 个/孔接种到 96 孔板, 经 100 mg/mL PMA 诱导后待细胞贴壁使用等量的不同浓度的五味子丙素给药, 均设三个复孔。培养 24 h 后, 向每孔中加入 20 μ L MTT (5 mg/mL), 培养 4 h 后弃上清液, 向每孔中加入 150 μ L DMSO, 用酶标仪于 490 nm 测量各孔的吸光度 (A)。并按以下公式计算细胞活力。

$$\text{细胞存活率}\% = (\text{A}_{\text{药物组}} - \text{A}_{\text{调零组}}) / (\text{A}_{\text{空白组}} - \text{A}_{\text{调零组}}) \times 100\%$$

3.3.5 细胞分组

将细胞随机分为 5 组: 空白对照组: 经 PMA 诱导以无血清 1640 培养基培养; 模型对照组: 经 100 mg/mL PMA 诱导以无血清 1640 培养基内加入终浓度为 100 μ g/mL 的 ox-LDL; 五味子丙素处理组: 经 PMA 诱导以无血清 1640 培养基内加入 0.1 μ M、1 μ M、10 μ M 的五味子丙素, 并经终浓度为 100 μ g/mL 的 ox-LDL 处理。细胞于 37℃、5% CO₂ 培养箱内孵育 48 h 后收集刺激后的泡沫细胞并观察细胞的形态学改变。

用不完全 DMEM 培养基培养 HUVEC 细胞 24 h, 饥饿处理后的细胞保存备用, 然后将 HUVEC 细胞分为五组。空白组: 用正常培养条件下巨噬细胞分泌的外泌体刺激

HUVEC 细胞；实验组：将 ox-LDL 处理巨噬细胞分泌的外泌体与 HUVEC 细胞共同培养；五味子丙素低、中、高剂量组，将不同浓度五味子丙素干预并经 ox-LDL 处理巨噬细胞分泌的外泌体一同作用于 HUVEC 细胞。

3.3.6 油红 O 染色鉴定脂肪堆积

- (1) 缓慢吸取上述泡沫细胞的培养液，并用 PBS 洗涤一次；
- (2) 加入适量染色洗涤液覆盖细胞 20 s；
- (3) 吸除染色洗涤液，加入适量改良油红 O 染色液，染色 10-20 min；
- (4) 去除油红 O 染色液，加入适量染色洗涤液，静置 30 s；
- (5) 去除染色洗涤液，并用 PBS 洗涤 20 s；
- (6) 加入适量 PBS，均匀覆盖细胞
- (7) 置于显微镜下观察泡沫细胞内脂滴的染色状况并拍照。

3.4 外泌体的收集及表征鉴定

3.4.1 超滤法收集上清液中的外泌体

参考文献方法进行如下提取^[80]：

- (1) 收集上述泡沫细胞上清液约 100 mL，分别装入 5 个 15 mL 的离心管中，并置于离心机中，在转速为 4000 rpm、温度为 4℃下离心 10 min，弃去剩余细胞。
- (2) 将离心管置于离心机中再次离心，在转速为 12,000 rpm 下离心 30 min，收集上清液并过滤。
- (3) 将上述步骤收集到的上清液分别移入 15 mL、100 kD 超滤管中以 4000 rpm 转速进行超滤，待上清液超滤至 20-50 μ L，加入 100 μ L 的 PBS 再次超滤，重复三次。
- (4) 待上述步骤结束后，加入 PBS 溶液 0.5 mL，使超滤膜中的外泌体悬浮，将外泌体悬浮液转到 1.5 mL 的 EP 管中，并放入 -80℃的冰箱待处理。

3.4.2 外泌体的形态特征观察

实验方法参考文献进行外泌体的处理^[81]，在室温下，取少量外泌体悬液滴在载样铜网上，放置 3 min。小心将滤纸置于载样铜网的一侧吸干液体，滴加 3%的磷钨酸溶

液于铜网上。向载样铜网中滴加负染液，5 min 后用滤纸吸干液体，并干燥铜网。将干燥后的铜网放在透射电子显微镜下观察，并拍摄外泌体形态的电镜照片。随机选取其中的 10 个外泌体测量粒径。

3.4.3 外泌体粒径的检测

外泌体的粒径可用 Zetasizer (Nano series) Nano-ZS90 粒度仪检测，取外泌体，并在其中加入 PBS 溶液，使其稀释至 100 倍，充分摇匀，根据说明取 100 μ L 稀释后的样品加入加样板中，然后检测外泌体的粒径^[82]。

3.4.4 外泌体表面特异性标志物的检测

(1) 提蛋白

在外泌体中加入裂解液 (RIDA 裂解液 (A): 蛋白磷酸酶抑制剂: RIDA 裂解液 (B)=100:1:1)，轻轻摇匀，冷冻裂解，然后放置 4°C 冰箱中裂解 40 min，估计每个样品体积，每个样品取出 4 μ L 备用，在剩余的样品中加入 Loading buffer 后短暂离心；100°C 下，孵育 7 min，置于 -20°C 冰箱保存。

(2) 蛋白定量

取 96 孔板先加入 BCA (A 液:B 液=50:1) 标曲，然后每孔加入 2 μ L 上步留出的样品，最后加入 BCA，放入 37°C 培育箱中孵育 30 min；置于酶标仪中在波长 562 nm 处测浓度，根据标准曲线计算蛋白样品的浓度。

(3) SDS-PAGE 电泳

制胶：将制备好的 10% 分离胶缓缓加入装好的板中，并注入蒸馏水以封住胶面，防止空气浸入凝胶中，静置 40 min，将配置好的堆积胶加入玻璃板中至满溢，插入梳子，静置 40 min，将板放置于电泳缓冲液中，竖直向上快速拔去梳子。

上样：将 Marker 和蛋白样品按顺序加入胶板的梳齿中。

跑胶：将电泳箱放入 4°C 冰箱，选择 80 V 恒压进行电泳。

(4) 转膜

根据 Marker 标记切下目标蛋白所在位置。置于甲醇活化后的 PVDF 膜上，并浸入转膜液中。转膜槽中加满转膜液，置于 4°C 冰箱，选择 200 mA 恒流进行转膜，根据目标蛋白的相对分子质量确定转膜的时间。

(5) 封闭

转膜结束后, 将其放入含有 5% BSA 的 TBST 溶液中, 室温下摇床震荡 2 h。并再次用 TBST 洗膜 3 次, 每次 8 min。

(6) 一抗孵育

用 5% BSA 稀释一抗 (即 CD63 单克隆抗体), 将稀释过的一抗滴加入封膜的 PVDF 膜上, 4℃过夜。取出并用 TBST 洗 3 次, 每次 8 min。

(7) 二抗孵育

回收一抗, 使 PVDF 膜浸泡入用 5% BSA 稀释后的二抗中, 室温摇床缓慢摇晃 2 h, TBST 洗涤 3 次, 每次 8 min, 洗涤完毕后滴加 HRP 标记的羊抗兔二抗, 室温下, 摇床缓慢摇晃 2 h, 回收二抗, TBST 洗涤 3 次, 每次 8 min。

(8) ECL 显色

以 1:1 混合 A 液 B 液配制显色液, 均匀滴加到 PVDF 膜上, 将其放置于化学发光凝胶成像系统中观察并拍摄照片^[69]。

(9) 结果分析

用 Image J 分析软件将目的蛋白条带及内参蛋白条带灰度数字化, 比较蛋白的表达。

3.5 五味子丙素调控 exosome-miR-181b-5p 保护 ox-LDL 诱导的 HUVEC 细胞损伤

3.5.1 五味子丙素干预的泡沫细胞源外泌体对 ox-LDL 诱导的 HUVEC 细胞炎症因子的影响

将细胞按上述实验分组处理, 每组 3 个复孔, 孵育 24 h 后取细胞上清液。本部分实验采用翼飞雪生物科技有限公司的 ELISA 试剂盒进行实验, 具体方法如下:

- (1) 按照说明书所述方法在 96 孔板中加入稀释标准品溶液;
- (2) 在 96 孔板中先加入 40 μ L 的样品稀释液后, 再加入 10 μ L 待测待测细胞上清溶液, 并于水平摇床上缓慢摇动;
- (3) 将混合好的 96 孔板用封膜封口后, 转移到 37℃孵育箱中静置 30 min。
- (4) 按说明书将洗涤液稀释备用;
- (5) 待孵育完成后, 弃去 96 孔板中液体, 甩干, 用洗涤液洗涤酶标板重复 5 次,

最后一次拍干；

- (6) 向每孔加入酶标试剂 50 μL ，空白孔除外；
- (7) 将混合好的 96 孔板用封膜封口后，转移到 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育箱中静置 30 min；
- (8) 重复洗涤操作，并拍干；
- (9) 先向每孔加入显色剂 A 50 μL ，再加入显色剂 B 50 μL ，于水平摇床上缓慢摇动，转移到 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 15 min；
- (10) 加入 50 μL 终止液，终止反应；
- (11) 于 450 nm 波长依序测量各孔的吸光度(OD 值)。

3.5.2 外泌体中 miR-181b-5p 含量的检测

3.5.2.1 外泌体总 miRNA 的提取

采用 miRNA 提取试剂盒进行外泌体中 miRNA 的提取，并根据说明书进行如下操作：

- (1) 取外泌体悬液，离心收集沉淀物。在沉淀物中加入 150 μL PBS 溶液重悬外泌体，同时滴加 450 μL miRNA Reagent A 上下摇晃至混匀，静置。
- (2) 在操作后的液体中加入 200 μL miRNA Reagent B，大力摇晃使其充分混匀。混匀后放置在离心机中离心 8 min，取离心后上清液 550 μL ，将其移至 1.5 mL EP 管中。
- (3) 向 EP 管内的上清液中滴加 200 μL 无水乙醇，大力摇晃 EP 管使其充分混匀，室温情况下静置。
- (4) 将 EP 管再次置于离心机内离心 10 min，取 650 μL 上清液移至 1.5 mL EP 管内。
- (5) 在 EP 管中滴加异丙醇 350 μL ，大力震荡使其充分混匀。
- (6) 将 EP 管中的溶液倒进吸附柱内，并离心 2 min，弃去过滤液。
- (7) 在上述溶液中滴加 700 μL 异丙醇洗涤，条件不变下离心 2 min，弃去过滤液。
- (8) 在上述处理后的溶液中滴加 500 μL 无水乙醇，再次洗涤，重复上述离心步骤，弃去过滤液。
- (9) 吸附柱不加任何溶液，重复上述离心步骤离心 2 min，除掉上述过程中剩余的乙醇。
- (10) 取上述吸附柱溶液至 1.5 mL EP 管中，静置，使溶液中的乙醇充分挥发。在

滤芯中滴加无 RNase 的 TE 缓冲液 30 μL ，静置，离心条件不变离心 2 min，所得产物为所需的 miRNA。

3.5.2.2 cDNA 的合成

采用 TaqMan miRNA 反转录试剂盒，根据说明书进行操作，方法如下：

(1) 按表组分在 0.2 mL EP 管中配制反应液。

表 3-3 反应液组分

Table 3-3 Components of reaction solution

成分	体积
miRNA (5~100 ng/ μL)	4 μL
5 $\times$ TaqMan miRNA RT Solution A	1 μL

(2) 按表温度时间条件在逆转录 PCR 仪内进行加 A 反应：

表 3-4 PCR 中加 A 反应条件

Table 3-4 Reaction conditions for adding A to PCR

温度	时间
37 $^{\circ}\text{C}$	30 min
85 $^{\circ}\text{C}$	5 min

(3) 反应结束后，在反应体系中滴加表中的试剂，并充分混匀。

表 3-5 反应组分

Table 3-5 Reaction components

成分	体积
10 $\times$ TaqMan miRNA RT Primer	2 μL
10 $\times$ TaqMan miRNA RT Solution B	2 μL
H ₂ O	11 μL

(4) 按表设置在 PCR 仪上进行反转录反应：

表 3-6 反转录条件

Table 3-6 Reverse transcription conditions

温度	时间
30 $^{\circ}\text{C}$	5 min
55 $^{\circ}\text{C}$	60 min
95 $^{\circ}\text{C}$	5 min

逆转录结束后所得的 cDNA，可在其中加入 ddH₂O 稀释 3-5 倍，通常取 2 μL 的 cDNA 用于 TaqMan hsa-miR-181b-5p miRNA 定量 PCR 试剂盒检测（货号：TAP13334）。

3.5.2.3 TaqMan 荧光定量 PCR

利用 TaqMan qPCR Kit 对上述反转录的 cDNA 产物进行 Real-Time PCR 检测。其中选择的内参为：TaqMan RNU6B miRNA 定量 PCR 试剂盒（货号：TAP01501）^[83]。实验利用 TaqMan 探针来检测泡沫细胞中 exosome-miR-181b-5p 的表达量，可以得出 miR-miR-181b-5p 相对表达情况。依照表 5 在冰上配置反应体系。所有样品均设置三个复孔。

（1）配制反应体系

根据表组分配制 20 μ L PCR 反应体系：

表 3-7 PCR 反应液体系
Table 3-7 Liquid system of PCR reaction

试剂	使用体积
5×Golden HS TaqMan qPCR Mix	4 μ L
50×ROX Reference Dye	0.4 μ L
20×miRNA TaqMan Assay	1 μ L
cDNA 模板	1-2 μ L
ddH ₂ O	Up to 20 μ L

（2）将上述 PCR 反应液充分混匀后，缓慢加到 PCR 反应所需的 96 孔板中，短暂离心。

进行 Real-Time PCR 反应：将 96 孔 PCR 反应板放置在 PCR 仪中，按以下程序设置循环：

Stage 1: 95°C 15min

Stage 2: 95°C 10s

60°C 60s 40 cycles

反应结束后，可以得到 cDNA 在 PCR 仪中扩增的 CT 值，最终 CT 值取三个复孔的平均值。

（3）实验结果处理

采用 $\Delta\Delta$ CT 法，以 U6 为内参，进行各样本中 miR-181b-5p 基因表达的相对定量分析：

处理组 Δ CT=CT(目的基因，待测样本)- Δ CT(内参基因，待测样本)

未处理组 Δ CT=CT(目的基因，对照样本)-CT(内参基因，对照样本)

$$\Delta\Delta CT = \text{处理组}\Delta CT - \text{未处理组}\Delta CT$$
$$\text{表达倍数} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

3.5.3 HUVEC 细胞 miR-181b-5p mimics/inhibitor 转染

提前一天将 HUVEC 细胞种植在 6 孔板中，转染实验分组设置：miR-181b-5p mimics NC + ox-LDL 外泌体、miR-181b-5p mimics + ox-LDL 外泌体、miR-181b-5p mimics + ox-LDL (1 μ M SC) 外泌体、miR-181b-5p inhibitor NC + ox-LDL 外泌体、miR-181b-5p inhibitor + ox-LDL 外泌体、miR-181b-5p inhibitor + ox-LDL (1 μ M SC) 外泌体。转染过程如下：

(1) RNA 稀释液制备

2.5 nM 小 RNA 以冻干粉的形式瞬时离心，加入 125 μ L RNase-free H₂O 配制成 20 μ M 储存液，分装保存，避免反复冻融。取 10 μ L 溶解好的小 RNA，加入 250 μ L OPTI-MEM 无血清稀释液，充分混匀，制成 RNA 稀释液。

(2) Celopener 稀释液制备

取 5 μ L 的 Celopener，然后加入 250 μ L OPTI-MEM 无血清稀释液体，充分混匀，制成 Celopener 稀释液，室温静置 5 min。转染复合物制备完成。确保在 25 min 内执行第三步操作，不要过于延迟。

(3) 将 Celopener 稀释液和 RNA 稀释液充分混合，室温静置 15 min。

(4) 将 500 μ L 转染复合物滴加到有 1500 μ L 全培养基（可含 10%血清和抗生素）的细胞上，前后移动培养皿，混合均匀。

(5) 细胞板置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 18-48 h，转染后 6 h 更换培养基。

3.5.4 miR-181b-5p 转染效率检测

取出细胞培养板，并用 PBS 清洗两遍，后续实验同 3.5.2

3.5.5 miR-181b-5p 及五味子丙素对 ox-LDL 诱导的 HUVEC 细胞损伤的研究

Western Blot 实验过程同 3.4.4

3.6 五味子丙素调控 exosome-miR-181b-5p 靶向 Sirt1 保护 ox-LDL 诱导的 HUVEC 细胞损伤

3.6.1 miR-181b-5p 靶基因预测

采用 Targetscan 数据库 (https://www.targetscan.org/vert_80/)^[84], 选择 “Human species”, 输入 microRNA 名字 “has-miR-181b-5p” 后提交, 进行靶基因预测。

3.6.2 五味子丙素通过外泌体调控 Sirt1 的水平

3.6.2.1 免疫荧光检测 Sirt1 的水平

将 HUVEC 细胞按照 1.5×10^5 个/皿接种于共聚焦小皿, 培养 24 h 后倒掉培养基加入 PBS 清洗, 加入无血清培养基与外泌体混合, 24 h 后准备免疫荧光。

- (1) 吸出培养液加入 1 mL PBS 洗 3 次, 每次 8 min, 不断摇晃洗去杂物。
- (2) 用 100 μ L 固定液固定 30 min。
- (4) 固定液处理后, 使用 PBS 洗去多余的固定液
- (5) 用 0.2% TritonX-100 处理 15 min。
- (6) 用 PBS 洗 3 次, 每次 5 min。
- (7) 5% BSA 以 PBS 为溶质进行配置, 在室温环境下封闭非特异性蛋白 1 h。
- (8) 按照相应比例稀释一抗, 并将稀释液滴加在细胞表面, 放入湿盒中, 4℃冰箱过夜。所需一抗 Sirt1。
- (9) 次日回收一抗。
- (10) 用 PBS 洗 3 次, 每次 5 min。
- (11) 加入免疫荧光二抗 (比例为 1:400) 处理 1 h, 加入荧光二抗需要避光, 后续步骤均需进行避光。
- (12) 吸出二抗, 并用 PBS 清洗 3 次。
- (13) 将 DAPI 以 (1: 1) 的比例使用 PBS 稀释, 并将稀释好的 DAPI 滴加到细胞上处理 5 min。
- (14) 用 PBS 洗 3 次, 每次 5 min。
- (15) 加入抗荧光淬灭剂。
- (16) 染色结束后使用激光共聚焦显微镜观察, 并采集图像。

3.6.2.2 Western Blot 检测 Sirt1 蛋白的表达

Western Blot 实验过程同 3.4.4;

3.6.2.3 RT-qPCR 检测 Sirt1 基因的表达

(1) 总 RNA 提取参考文献方法进行^[85]

① 吸尽培养液，于六孔板中每孔加 1 mL Trizol，晃动 3-5 下，再用枪吹打 2-3 下，确保全部裂解，然后吸至离心管中。再加入 0.2 mL 氯仿，混匀或猛烈晃动 15 秒，室温放置 10 min。

② 12,000 g 4℃离心 15 min，然后取上层无色水相至一新的离心管中。

③ 加入等体积异丙醇，混匀，室温沉淀 10 min。

④ 12,000 g 4℃离心 10 min，可见 RNA 沉淀。

⑤ 加入 1 mL 75%乙醇（DEPC 水配制），混匀。

⑥ 12,000 g 4℃离心 10 min，弃上清。

⑦ 敞口放置 8 min 后，加入 18 μL DEPC 水溶解，定量后，-80℃冻存。

(2) cDNA 合成

实验方法依据 cDNA 第一链快速合成试剂盒（去基因组）操作。将总 1 μg RNA、1 μL gDNA Eraser、8 μL DNase/RNase-Free Water 进行混合，42℃孵育 5 min 后，于冰上放置，得基因组 DNA 去除反应液。分别取 10 μL 的基因组 DNA 去除反应液和 2x 1st Strand cDNA Synthesis Super Mix，轻轻混匀，短暂离心，50 °C孵育 15 min。75℃、5 min 失活酶。取 1 μL 模板合成液直接用于后续 PCR 实验。

(3) 荧光定量 PCR 检测相对表达量

① 以 18s 为内参对照，人源 Sirt1 mRNA 引物均由通用生物科技有限公司合成。

表 3-8 引物序列

Table 3-8 primers sequence

Primer name	Sequence (5' to 3')
18s-F	AAACGGCTACCACATCCAAG
18s-R	CCTCCAATGGATCCTCGTTA
Sirt1-F	CTCATGTGATCTATGCCCGTC
Sirt1-R	AGGTGATACAACCTCGTTCGTAGT

② 将引物稀释至 10 μM，设计 96 孔板上样顺序，每个样品 5 个复孔。

③ 按如下反应体系（20 uL 反应体系）分别加入下列试剂：cDNA 模板 1 μL，正向引物 0.5 μL，反向引物 0.5 μL，2× SYBR Green Fast qPCR Master Mix-LR 10，DEPC

水 8 μL 。

④ 实验在 Applied Biosystems ViiA 7 (Real Time PCR 扩增仪) 上进行。

⑤ Real-time 反应两步法 PCR 扩增程序:

Stage 1. Initial denaturation: 95°C, 5 min

Stage 2. Denaturation: 95°C, 10 s

60°C, 30 s

Annealing/Extension: 60°C, 5 s

90°C, 50 s

45 cycles

3.6.3 五味子丙素通过 exosome-miR-181b-5p 靶向调控 Sirt1 的水平

Western Blot 实验过程同 3.4.4;

RT-qPCR 实验过程同 3.6.2

3.6.4 HUVEC 细胞干扰靶基因 Sirt1

提前一天将 HUVEC 细胞种植在 6 孔板中, 以转染时细胞密度在 30% 左右为宜, 转染前含血清培养基总量为 1500 μL 。转染实验分组设置: siSirt1 NC+ox-LDL 外泌体、siSirt1 +ox-LDL 外泌体、siSirt1 +ox-LDL (1 μM SC) 外泌体。

转染过程同 3.5.3

3.6.5 siSirt1 干扰效率检测

RT-qPCR 过程同 3.6.2

3.6.6 Sirt1 及五味子丙素对 ox-LDL 诱导的 HUVEC 细胞损伤的研究

Western Blot 实验过程同 3.4.4

3.7 统计学分析

采用 Graph Pad Prism 8 对实验数据进行分析 and 作图, 所有数据都以平均值 $\pm$ 标准误差平均值 (mean $\pm$ SEM) 来表示。组间差异使用单因素方差分析 (ANOVA), $P <$

0.05 表示具有统计学意义。

3.8 结果与分析

3.8.1 泡沫细胞体外模型的建立及五味子丙素浓度确定

3.8.1.1 THP-1 细胞转化为巨噬细胞的细胞形态学改变

THP-1 细胞经 100 ng/mL PMA 孵育 24 h 后，将其置于光镜下观察，细胞体积变大，由圆形转变为形态不一的多角细胞，且细胞易于贴壁，有触角（如图），说明细胞已由 THP-1 细胞转变成巨噬细胞。

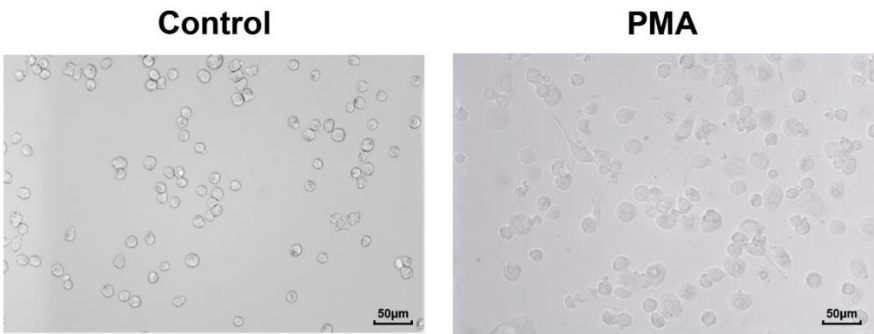


图 3-1 THP-1 细胞经 PMA 诱导后的形态变化 (×200) (诱导前; 诱导后)

Figure 3-1 Morphological changes of THP-1 cells induced by PMA (×200) (before induction; after induction)

3.8.1.2 不同浓度五味子丙素对细胞活力的影响

给药 24 h 后结果显示，与对照组细胞活力比较，五味子丙素对 THP-1 细胞抑制的 IC₅₀=198 μM，在 50 μM 浓度细胞毒性明显，具有显著性差异 ($P<0.01$)，0-20 μM 范围内细胞毒性作用较小。因此，本研究后续的实验均选定 0.1 μM、1 μM、10 μM 作为五味子丙素的低、中、高实验剂量。

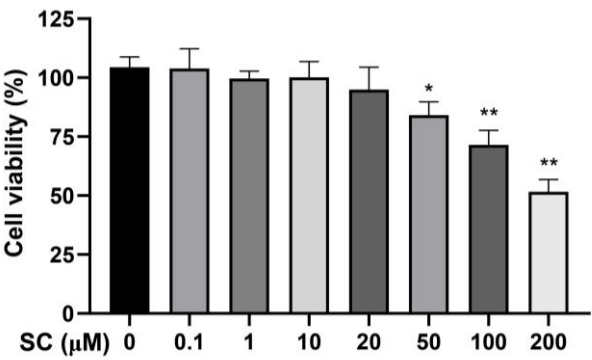


图 3-2 MTT 检测细胞毒性

Figure 3-2 MTT detection of cytotoxicity

3.8.1.3 油红 O 染色观察脂质堆积情况

在 ox-LDL 组中加入 100 $\mu\text{g/mL}$ 的 ox-LDL 刺激巨噬细胞 48 h 后, 并采用油红 O 染液染色发现, ox-LDL 组细胞内有明显的红色脂质的存在, 且细胞大小不一形态为椭圆或不规则形状, 与泡沫细胞的形态特征相符; 而对照组中未经 ox-LDL 处理, 在光镜下观察发现细胞内没有明显的红色颗粒, 说明巨噬细胞已在 ox-LDL 的诱导下转化为泡沫细胞。经不同浓度的五味子丙素处理后细胞内红色脂质随药物浓度剂量的升高而逐渐变少。结果表明五味子丙素可以显著抑制 ox-LDL 诱导的脂质堆积, 并且呈现出剂量依赖性。

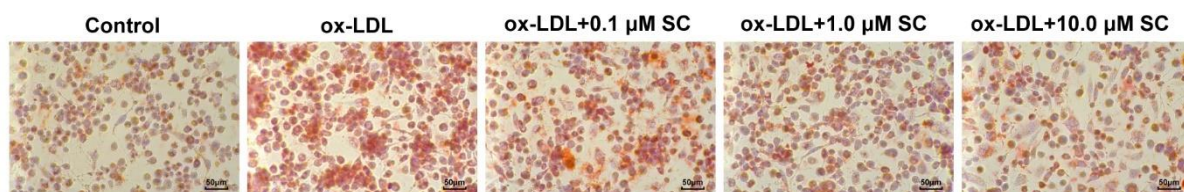


图 3-3 油红 O 染色泡沫细胞的形态 ($\times 200$)

Figure 3-3 Morphology of oil red O stained foam cells ($\times 200$)

3.8.2 外泌体的表征鉴定

3.8.2.1 TEM 观察外泌体 的形态

超滤法收集上清液中的外泌体, 经处理后将其置于 TEM 样品室内观察发现外泌体形态特征呈圆形或椭圆形, 有完整的胞膜结构。与理论上外泌体形态结构一致。

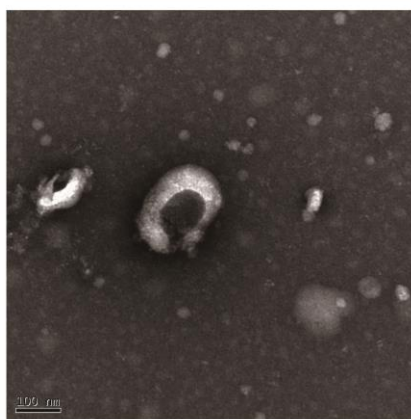


图 3-4 TEM 下外泌体 的超微结构图

Figure 3-4 Ultrastructure of exosome in the TEM

3.8.2.2 粒度仪测定外泌体粒径

外泌体悬液加 PBS 稀释后经粒度仪测定, 软件分析的粒径分布图表明外泌体粒径

大小较为集中，粒径范围约在 50-200 nm 之间，与理论上外泌体粒径大小一致，说明超滤法收集的为细胞上清中外泌体。

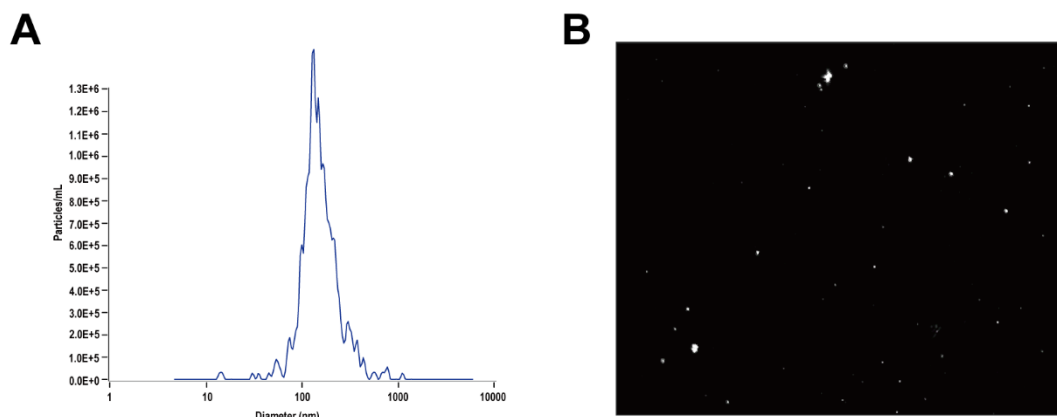


图 3-5 外泌体粒径大小分布图 (A 粒径; B 动态图像捕捉)

Figure 3-5 Size distribution of exosomes (A Particle size; B Motion image capture)

3.8.2.3 蛋白免疫印迹法鉴定细胞上清中外泌体标志物

在相关文献报道中，外泌体表面一般都含有 CD9、CD63、CD81 等特异性蛋白标志物^[86]，采用 Western blot 对外泌体上的特异性蛋白标志物进行鉴定，结果显示标志蛋白 CD63 在提取的外泌体中均有表达，进一步说明泡沫细胞上清中有外泌体。

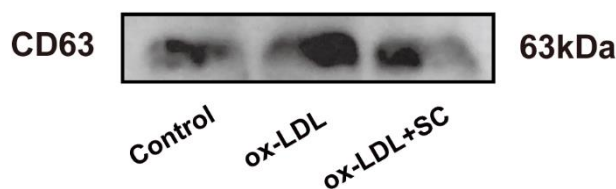


图 3-6 泡沫细胞上清外泌体标志物 CD63

Figure 3-6 exosome marker CD63 in foam cell supernatant

3.8.3 五味子丙素调控 exosome-miR-181b-5p 保护 ox-LDL 诱导的 HUVEC 细胞损伤

3.8.3.1 ELISA 检测 HUVECs 中炎症因子表达量

为探究五味子丙素对 HUVEC 细胞炎症因子表达水平的影响，采用 ELISA 法检测 HUVEC 细胞上清中的 TNF- α 和 IL-1 β 的表达水平。结果如图所示，与空白对照组相比，ox-LDL 诱导组细胞上清中 TNF- α 和 IL-1 β 的表达水平显著升高；与模型组相比，五味子丙素中、高剂量给药组细胞上清中 IL-1 β 的表达水平显著降低，五味子丙素低、中、高剂量给药组细胞上清中 TNF- α 的表达水平均有下降趋势，但无明显差异。提示五味子丙素可显著降低 HUVEC 细胞中的炎症因子表达水平，减轻炎症反应。

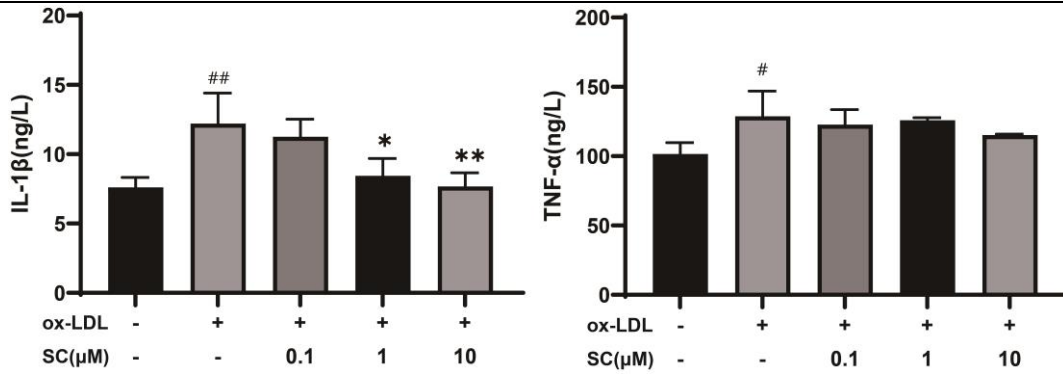


图 3-7 ELISA 检测 HUVEC 细胞上清液中 IL-1β 和 TNF-α 的表达水平

Figure 3-7 Expression levels of IL-1β and TNF-α in the supernatant of HUVEC cells were detected by ELISA

注：与正常对照组比较，[#] $P<0.05$ ，^{##} $P<0.01$ ；与模型组比较，^{*} $P<0.05$ ，^{**} $P<0.01$ 。

Note: [#] $P<0.05$ ，^{##} $P<0.01$ vs the control group; ^{*} $P<0.05$ ，^{**} $P<0.01$ vs the model group.

3.8.3.2 泡沫细胞 exosome-miR-181b-5p 的表达水平

实验利用 TaqMan 探针法检测泡沫细胞上清外泌体中 miR-181b-5p 的表达水平，其结果表明，对照组（巨噬细胞）中存在 miR-181b-5p 的表达，只是其表达量极低，而检测经 100 μg/mL 的 ox-LDL 处理 48 h 后的细胞上清外泌体表明 ox-LDL 组中 miR-181b-5p 的表达量明显高于对照。实验数据表明 ox-LDL 组与对照组之间存在统计学差异，经 ox-LDL 诱导后的泡沫细胞中的 exosome-miR-181b-5p 表达水平升高。经不同浓度的五味子丙素处理后细胞上清外泌体中 miR-181b-5p 的表达量随药物浓度剂量的升高而逐渐变少。结果表明五味子丙素可以显著抑制 miR-181b-5p 的表达，并且呈现出剂量依赖性。

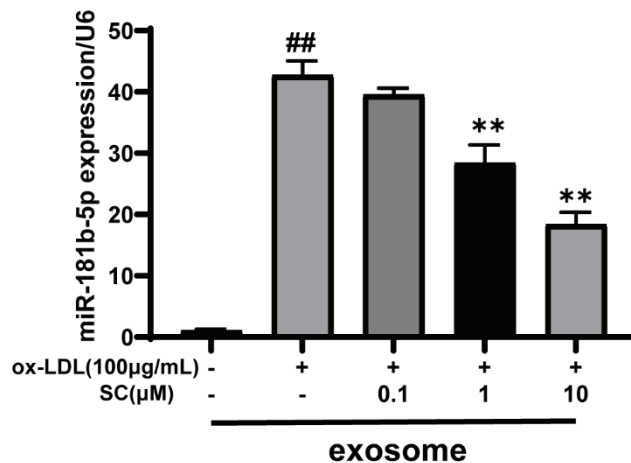


图 3-8 exosome-miR-181b-5p 的表达水平

Figure 3-8 exosome-miR-181b-5p expression level

注：与正常对照组比较，[#] $P<0.05$ ，^{##} $P<0.01$ ；与模型组比较，^{*} $P<0.05$ ，^{**} $P<0.01$ 。

Note: [#] $P<0.05$ ，^{##} $P<0.01$ vs the control group; ^{*} $P<0.05$ ，^{**} $P<0.01$ vs the model group.

3.8.3.3 RT-qPCR 检测 miR-181b-5p 转染效率

为明确 miR-181b-5p 的转染是否成功, 采用 RT-qPCR 检测 miR-181b-5p 转染效率。结果如图所示, 与 miR-181b-5p mimics NC 组相比, miR-181b-5p mimics 显著提高了 miR-181b-5p 的表达水平, 与 miR-181b-5p mimics 组相比, 五味子丙素可以一定程度的降低 miR-181b-5p 的表达水平 (如图 3-9 A)。与 miR-181b-5p inhibitor NC 组相比, miR-181b-5p inhibitor 显著降低了 miR-181b-5p 的表达水平, 在 miR-181b-5p inhibitor 的基础上, 五味子丙素并不能继续降低 miR-181b-5p 的表达水平 (如图 3-9 B)。结果表明 miR-181b-5p 的转染效率较好。

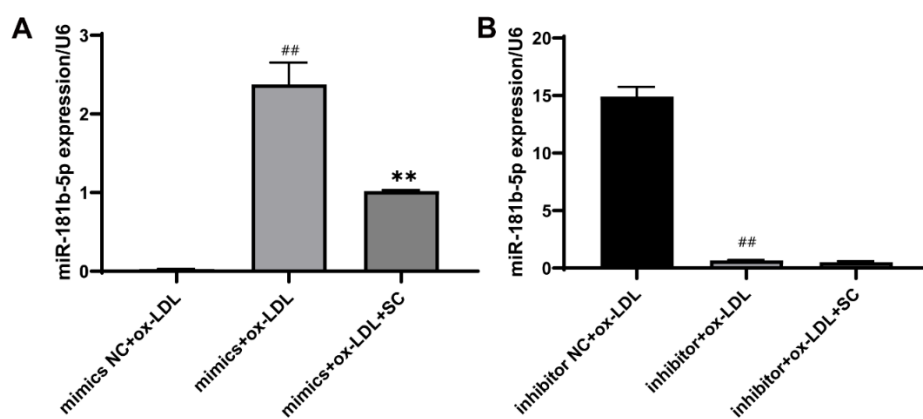


图 3-9 miR-181b-5p 表达水平 (A 转染 miR-181b-5p mimics 后 miR-181b-5p 的表达; B 转染 miR-181b-5p inhibitor 后 miR-181b-5p 的表达)

Figure 3-9 Expression level of miR-181b-5p (A expression of miR-181b-5p after transfection of miR-181b-5p mimics; B Expression of miR-181b-5p after transfection with miR-181b-5p inhibitor)

注: 与正常对照 NC 组比较, [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$; 与 mimics/inhibitor 组比较, ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$ 。

Note: [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$ vs the control NC group; ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$ vs the mimics/inhibitor group.

3.8.3.4 Western Blot 检测 miR-181b-5p 及五味子丙素对 ox-LDL 诱导的 HUVEC 细胞损伤的影响

为验证 miR-181b-5p 及五味子丙素对 ox-LDL 诱导的 HUVEC 细胞损伤的影响, 采用 Western Blot 检测转染 miR-181b-5p 后, HUVEC 细胞损伤因子 MCP-1、VCAM-1、ICAM-1 的表达水平, 结果显示, exosome-miR-181b-5p mimics 介导 HUVEC 细胞的 MCP-1、VCAM-1、ICAM-1 表达水平与空白对照组相比显著增加, 给予五味子丙素干预后 MCP-1、VCAM-1、ICAM-1 表达水平显著降低 (如图 3-10 A)。exosome-miR-181b-5p inhibitor 和 exosome-miR-181b-5p 同时作用 HUVEC 细胞, 使 MCP-1、VCAM-1、ICAM-1 水平与空白组相比极显著降低, 再给予五味子丙素干预后 MCP-1、VCAM-

1、ICAM-1 表达水平更加降低（如图 3-10 B）。实验结果表明是 exosome-miR-181b-5p 引起 HUVEC 细胞损伤。

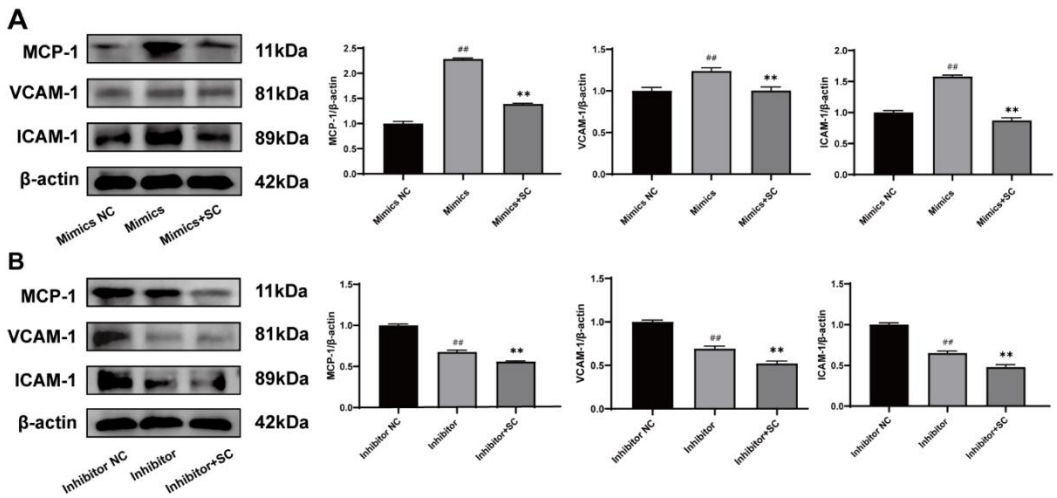


图 3-10 转染 miR-181b-5p 后血管内皮细胞损伤蛋白的表达（A 转染 miR-181b-5p mimics 后血管内皮细胞损伤蛋白的表达；B 转染 miR-181b-5p inhibitor 后血管内皮细胞损伤蛋白的表达）

Figure 3-10 Expression of damage protein in vascular endothelial cells after transfection of miR-181b-5p (A expression of vascular endothelial cell damage protein after transfection with miR-181b-5p mimics; B Expression of vascular endothelial cell damage protein after transfection with miR-181b-5p inhibitor)

注：与正常对照 NC 组比较，# $P<0.05$ ，## $P<0.01$ ；与 mimics/inhibitor 组比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ 。

Note: # $P<0.05$ ，## $P<0.01$ vs the control NC group; * $P<0.05$ ，** $P<0.01$ vs the mimics/inhibitor group.

3.8.4 五味子丙素调控 exosome-miR-181b-5p 靶向 Sirt1 保护 ox-LDL 诱导的 HUVEC 细胞损伤

3.8.4.1 miR-181b-5p 的靶基因预测

通过 Targetscan 数据库预测出 has- miR-181b-5p 的靶基因为 Sirt1，预测分数为 94，对接位点为 Sirt1 3' UTR 的 63-69 碱基位点。



图 3-11 miR-181b-5p 的靶基因预测

Figure 3-11 Target gene prediction of miR-181b-5p

3.8.4.2 五味子丙素通过外泌体调控 Sirt1 的水平

为探讨五味子丙素可以通过外泌体调控 Sirt1 的水平，采用免疫荧光、RT-qPCR 和 Western Blot 检测五味子丙素对 Sirt1 的影响。免疫荧光结果显示，与空白对照组相比，

ox-LDL 诱导的 HUVEC 细胞中 Sirt1 的荧光强度减弱，而给予五味子丙素干预后，HUVEC 细胞中 Sirt1 的荧光强度增强，且随着五味子丙素浓度的增加，荧光强度递增，具有剂量依赖性（如图 3-12 A）；RT-qPCR 结果显示，与空白对照组相比，ox-LDL 诱导的 HUVEC 细胞中 Sirt1 的基因表达水平下降，而给予五味子丙素干预后，HUVEC 细胞中 Sirt1 的基因表达水平显著增加，具呈剂量依赖性（如图 3-12 B）；Western Blot 结果显示，与空白对照组相比，ox-LDL 诱导的 HUVEC 细胞中 Sirt1 的蛋白表达水平下降，而给予五味子丙素干预后，HUVEC 细胞中 Sirt1 的蛋白表达水平显著增加，具呈剂量依赖性（如图 3-12 C）；免疫荧光、RT-qPCR 和 Western Blot 结果一致表明，五味子丙素可以增加靶基因 Sirt1 的表达。

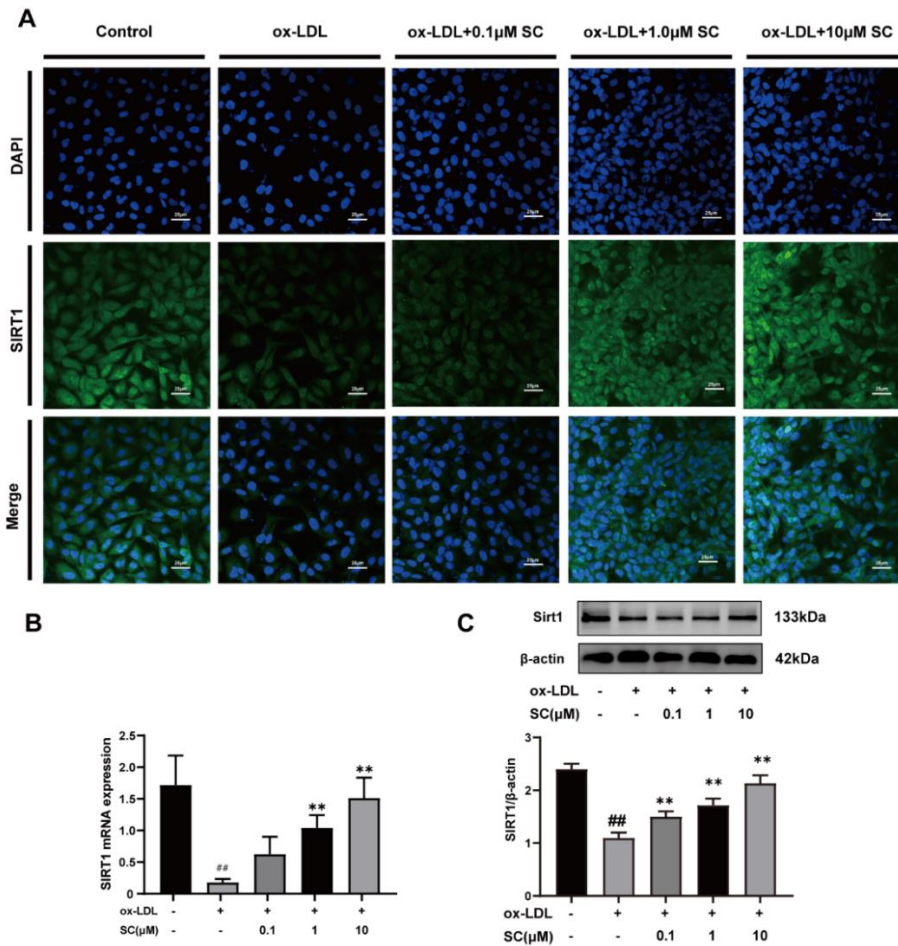


图 3-12 五味子丙素通过外泌体调控 Sirt1 的水平（A 免疫荧光检测 Sirt1 的表达（400×）；B RT-qPCR 检测 Sirt1 mRNA 的表达；C Western Blot 检测 Sirt1 蛋白的表达）

Figure 3-12 Schisandrin C regulates Sirt1 levels through exosome (A immunofluorescence detection of Sirt1 expression (400×) ; B The expression of Sirt1 mRNA was detected by RT-qPCR; C Western Blot detection of Sirt1 protein expression)

注：与正常对照组比较， $^{\#}P<0.05$, $^{\#\#}P<0.01$ ；与模型组比较， $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$ 。

Note: $^{\#}P<0.05$, $^{\#\#}P<0.01$ vs the control group; $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$ vs the model group.

3.8.4.3 五味子丙素通过 exosome-miR-181b-5p 靶向调控 Sirt1 的水平

为验证 miR-181b-5p 后对靶蛋白 Sirt1 的影响, 采用 Western Blot 检测转染 miR-181b-5p 不同组后的靶蛋白 Sirt1 表达情况。结果如图所示, 与 miR-181b-5p mimics NC 组相比, miR-181b-5p mimics 降低了靶蛋白 Sirt1 的表达水平, 与 miR-181b-5p mimics 组相比, 五味子丙素可以一定程度的提高靶蛋白 Sirt1 的表达水平 (如图 3-13 A)。与 miR-181b-5p inhibitor NC 组相比, miR-181b-5p inhibitor 显著提高了靶蛋白 Sirt1 的表达水平, 在 miR-181b-5p inhibitor 的基础上, 五味子丙素能够显著提高靶蛋白 Sirt1 的表达水平 (如图 3-13 B)。结果表明, Sirt1 的表达水平与 miR-181b-5p 的表达量呈负相关, RT-qPCR 的结果与 Western Blot 一致 (如图 3-13 C-D)。

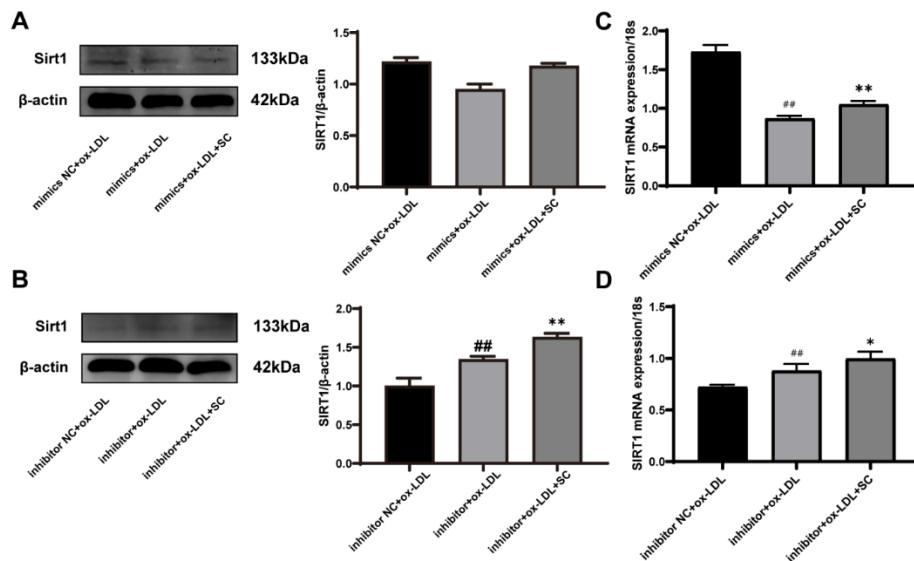


图 3-13 exosome-miR-181b-5p 靶向调控 Sirt1 的水平 (A 转染 miR-181b-5p mimics 后靶蛋白 Sirt1 蛋白的表达; B 转染 miR-181b-5p inhibitor 后靶蛋白 Sirt1 的表达; C 转染 miR-181b-5p mimics 后靶基因 Sirt1 的表达; B 转染 miR-181b-5p inhibitor 后靶基因 Sirt1 的表达)

Figure 3-13 exosome-miR-181b-5p targeted regulation of Sirt1 levels (A expression of Sirt1 protein after transfection of miR-181b-5p mimics; B transfection of miR-181b-5p inhibitor after the expression of target protein Sirt1; Expression of the target gene Sirt1 after transfection with miR-181b-5p mimics; Expression of miR-181b-5p inhibitor target gene Sirt1 after transfection)

注: 与正常对照 NC 组比较, # $P<0.05$, ## $P<0.01$; 与 mimics/inhibitor 组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

Note: # $P<0.05$, ## $P<0.01$ vs the control NC group; * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs the mimics/inhibitor group.

3.8.4.4 siSirt1 干扰效率检测

为探讨靶基因的作用, 通过干扰靶基因 Sirt1, 采用 RT-qPCR 检测 Sirt1 的干扰效率。结果如图所示, 与 siSirt1 NC 组相比, 干扰 Sirt1 后, Sirt1 的表达水平显著降低; 与干扰 Sirt1 组相比, 给予五味子丙素干预后, Sirt1 的表达水平显著升高, 五味子丙素

可以提高靶基因的表达水平。

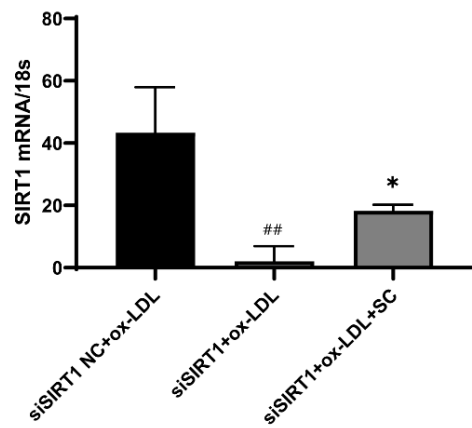


图 3-14 Sirt1 的表达水平

Figure 3-14 Expression levels of Sirt1

注：与正常对照 NC 组比较，[#] $P<0.05$ ，^{##} $P<0.01$ ；与干扰组比较，^{*} $P<0.05$ ，^{**} $P<0.01$ 。

Note: [#] $P<0.05$ ，^{##} $P<0.01$ vs the control NC group; ^{*} $P<0.05$ ，^{**} $P<0.01$ vs the siSirt1 group.

3.8.4.5 Sirt1 及五味子丙素对 ox-LDL 诱导的 HUVEC 细胞损伤的研究

为探讨靶基因 Sirt1 及五味子丙素对 ox-LDL 诱导的 HUVEC 细胞损伤的作用，通过干扰靶基因 Sirt1，采用 Western Blot 检测干扰 Sirt1 后，HUVEC 细胞损伤因子 MCP-1、VCAM-1、ICAM-1 的表达水平，结果显示，与 ox-LDL 诱导组相比，干扰 Sirt1 后 ox-LDL 诱导的 HUVEC 细胞损伤因子 MCP-1、VCAM-1、ICAM-1 的表达水平均显著升高，表明 Sirt1 可以抑制 HUVEC 细胞损伤。给予五味子丙素干预后，ox-LDL 诱导的 HUVEC 细胞损伤因子 MCP-1、VCAM-1、ICAM-1 的表达水平均显著降低，结果表明五味子丙素抑制 HUVEC 细胞损伤（如图 3-15 A-D）。

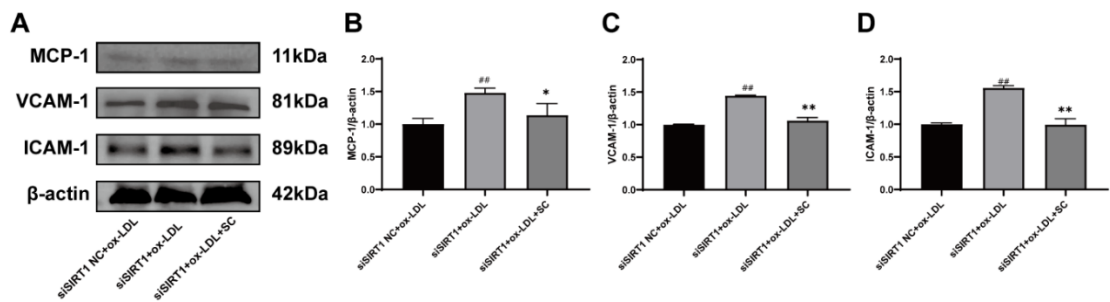


图 3-15 干扰 Sirt1 后血管内皮细胞损伤蛋白的表达（A Western Blot 显示干扰 Sirt1 后细胞损伤蛋白表达结果；B MCP-1 蛋白表达水平；C VCAM-1 蛋白表达水平；D ICAM-1 蛋白表达水平）

Figure 3-15 Expression of vascular endothelial injury protein after silencing Sirt1 (A Western Blot showed the expression of cell damage protein after interfering with Sirt1. B MCP-1 protein expression level; C VCAM-1 protein expression level; D ICAM-1 protein expression level)

注：与正常对照 NC 组比较，[#] $P<0.05$ ，^{##} $P<0.01$ ；与干扰组比较，^{*} $P<0.05$ ，^{**} $P<0.01$ 。

Note: [#] $P<0.05$ ，^{##} $P<0.01$ vs the control NC group; ^{*} $P<0.05$ ，^{**} $P<0.01$ vs the siSirt1 group.

3.9 本章小结

动脉粥样硬化斑块中所出现的病理细胞称之为泡沫细胞，血管中的平滑肌细胞和血液中的单核细胞是其主要来源。在动脉粥样硬化形成的早期，血液中的单核细胞先分化为巨噬细胞并进入血管内皮，而巨噬细胞通过摄入大量的脂蛋白胆固醇及胆固醇酯，而使细胞内积累大量的脂质进而转化为泡沫细胞^[87]。因此实验采用 ox-LDL 诱导巨噬细胞使巨噬细胞内大量脂质堆积形成泡沫细胞进而建立泡沫细胞体外模型^[88]，而本实验采用的是购买的人类 THP-1 细胞株作为细胞源，其建立的泡沫细胞模型的病理生理特征与人类动脉粥样硬化病人体内细胞较为接近，因此本实验所建立的以 THP-1 细胞株作为细胞源的泡沫细胞体外模型，有利于动脉粥样硬化疾病的研究与防治。实验采用的超滤法是一种提取外泌体的新方法，利用该方法提取的外泌体较为完全，且经 TEM、粒度仪、蛋白印迹检测证实为外泌体，便于后续实验对外泌体中 miR-181b-5p 表达量的检测。

近年来，miRNA 在药物的研究以及靶点防治疾病方面已成为热议。且目前在 miRNA 基因防治动脉粥样硬化方面也已受到了研究者的重视^[89]。在目前 miRNAs 的研究中 miR-181b-5p 是重点之一，且 miR-181b-5p 与许多免疫炎症疾病密切相关，它在巨噬细胞、单核细胞、T 淋巴细胞等许多免疫和炎症细胞中都高度表达^[90]。近年来研究显示，miR-181b-5p 在经 ox-LDL 刺激后的单核巨噬细胞中的表达发生显著变化。因此，本实验需要检测所建立的泡沫细胞中是否存在 miR-181b-5p 的显著表达。

本实验采用 THP-1 细胞株模仿动脉粥样硬化病人体内生理病理过程建立了泡沫细胞体外模型，光镜下 ox-LDL 组经油红 O 染色可见细胞有明显的红色脂质颗粒；Taqman 探针法检测泡沫细胞上清外泌体中 miR-181b-5p 的表达量，实验结果表明，ox-LDL 组与对照组相比其中的 exosome-miR-181b-5p 的表达水平高。采用上述方法成功地建立了稳定的泡沫细胞体外模型，且 ox-LDL 组中 exosome-miR-181b-5p 的表达水平表明 miR-181b-5p 与动脉粥样硬化的发病机制之间有联系，为了进一步明确 exosome-miR-181b-5p 对 HUVEC 损伤的影响，采用 exosome-miR-181b-5p inhibitor 或 mimics 介导 HUVEC 细胞，exosome-miR-181b-5p mimics 介导 HUVEC 细胞 MCP-1、VCAM-1 和 ICAM-1 表达水平均比巨噬细胞分泌外泌体介导的较高，加入 exosome-miR-181b-5p inhibitor 介导 HUVEC 细胞 MCP-1、VCAM-1 和 ICAM-1 表达水平显著降低。实验表明 exosome-miR-181b-5p 介导 HUVEC 细胞损伤。

对于 miR-181b-5p 对 HUVEC 细胞造成的损伤的机制，通过我们查阅资料可知，miR-181b-5p 的靶基因有很多。而本实验中通过生物信息学手段预测了 miR-181b-5p 的靶基因为 Sirt1，并通过转染实验证明 exosome-miR-181b-5p 抑制 HUVEC 靶基因 Sirt1 的表达。

综上所述，实验证明 miR-181b-5p 可通过抑制 HUVEC 靶基因 Sirt1 表达，诱导血管内皮细胞损伤。本实验通过探索 HUVEC 细胞损伤及其机制，为动脉粥样硬化疾病的早期治疗和预防提供了新的生物标志物 miR-181b-5p。

第 4 章 五味子丙素通过 miR-181b-5p 靶向 Sirt1 促进血管内皮细胞自噬作用机制研究

4.1 引言

自噬是细胞内一种常见的生物学现象，指的是细胞通过吞噬自身的部分结构或细胞器来维持自己的生存和功能，自噬过程通常发生在细胞内部的囊泡（又称自噬体）内，通过将细胞内的有害或受损物质分解并回收利用，帮助细胞维持稳定的内部环境。自噬在细胞发育、细胞代谢和细胞应激等过程中起着重要作用，对细胞的生存和适应性具有重要意义。通过自噬，细胞可以将受损或老化的细胞器、蛋白质等有害物质包裹成囊泡，然后将其降解并回收利用。自噬在维持细胞内稳态、清除有害物质、应对压力等方面发挥着重要作用^[91]。适度的自噬可以帮助清除血管内皮细胞中的有害物质，维持血管内皮细胞的正常功能，从而有助于预防动脉粥样硬化的发生。一些研究也发现，自噬功能的异常或失调可能会导致血管内皮细胞的损伤和炎症反应的加剧，进而促进动脉粥样硬化的发展^[92]。总的来说，适度的自噬对于预防动脉粥样硬化具有积极的作用，但是自噬的具体作用机制和在动脉粥样硬化发生发展中的作用还需要进一步的研究来阐明。

前期实验表明：氧化型低密度脂蛋白（oxidized low density lipoprotein, ox-LDL）诱导巨噬细胞转化为泡沫细胞，与巨噬细胞相比，泡沫细胞分泌外泌体增多，exosome-miR-181b-5p 在外泌体中含量也显著上升。exosome-miR-181b-5p 介导 HUVEC 表达 ICAM-1、VCAM-1 水平升高，从而导致 HUVEC 细胞损伤。HUVEC 细胞损伤是否是由于细胞自噬受阻引起的目前还在研究中。所以本实验以正常巨噬细胞分泌的外泌体做空白对照组，用泡沫细胞分泌的外泌体研究 exosome-miR-181b-5p 对 HUVEC 细胞自噬的影响，以及 exosome-miR-181b-5p 的靶基因 Sirt1 对自噬的影响。

4.2 实验材料

4.2.1 实验仪器

表 4-1 实验仪器

Table 4-1 The list of experimental reagents and instruments

仪器名称	厂家
蛋白质凝胶电泳仪	Biorad
接触式化学发光成像仪	上海易宇特
PCR 仪	美国 Applied Biosystems 公司
分析天平	Sartorius
二氧化碳恒温箱	Thermo Fisher
NIB900 荧光倒置显微镜	宁波永新光学股份有限公司
Infinite200 酶标仪	瑞士 Tecan 公司
倒置荧光显微镜	Leica
实时荧光定量 PCR 仪	美国 Applied Biosystems 公司
HH-2 恒温水浴锅	金坛市荣华仪器制造有限公司
制冰机	Grant

4.2.2 实验试剂

表 4-2 实验试剂

Table 4-2 Experimental reagents

试剂名称	生产厂家
PI3K antibody	武汉三鹰生物技术有限公司
p-PI3K antibody	武汉三鹰生物技术有限公司
AKT antibody	武汉三鹰生物技术有限公司
p-AKT antibody	武汉三鹰生物技术有限公司
mTOR antibody	武汉三鹰生物技术有限公司
p-mTOR antibody	武汉三鹰生物技术有限公司
Sirt1 antibody	武汉三鹰生物技术有限公司
ATG5 antibody	武汉三鹰生物技术有限公司
LC3 antibody	武汉三鹰生物技术有限公司
Beclin1 antibody	武汉三鹰生物技术有限公司
P62 antibody	Abcam
β -actin antibody	武汉三鹰生物技术有限公司
BCA 蛋白浓度测定试剂盒	武汉三鹰生物技术有限公司

4.3 五味子丙素干预的 exosome-miR-181b-5p 对血管内皮细胞自噬及自噬通路的研究

4.3.1 细胞培养及分组

用不完全 DMEM 培养基培养 HUVEC 细胞 24 h，饥饿处理后的细胞保存备用，然后将 HUVEC 细胞分为五组。空白组：用正常培养条件下巨噬细胞分泌的外泌体刺激 HUVEC 细胞；实验组：将 ox-LDL 处理巨噬细胞分泌的外泌体与 HUVEC 细胞共同培养；五味子丙素低、中、高剂量组：将不同浓度五味子丙素干预并经 ox-LDL 处理巨噬细胞分泌的外泌体一同作用于 HUVEC 细胞。

4.3.2 免疫荧光法观察自噬蛋白 Beclin-1 的表达水平

将 HUVEC 细胞按照 1.5×10^5 个/皿接种于共聚焦小皿，培养 24 h 后倒掉培养基加入 PBS 清洗，加入无血清培养基与外泌体混合，24 h 后准备免疫荧光。

- (1) 吸出培养液加入 1 mL PBS 洗 3 次，每次 8 min，不断摇晃洗去杂物。
- (2) 用 100 μ L 固定液固定 30 min。
- (4) 固定液处理后，使用 PBS 洗去多余的固定液
- (5) 用 0.2% TritonX-100 处理 15 min。
- (6) 用 PBS 洗 3 次，每次 5 min。
- (7) 5% BSA 以 PBS 为溶质进行配置，在室温环境下封闭非特异性蛋白 1 h。
- (8) 按照相应比例稀释一抗，并将稀释液滴加在细胞表面，放入湿盒中，4℃冰箱过夜。所需一抗 Beclin-1。
- (9) 次日回收一抗。
- (10) 用 PBS 洗 3 次，每次 5 min。
- (11) 加入免疫荧光二抗（比例为 1:400）处理 1 h，加入荧光二抗需要避光，后续步骤均需进行避光。
- (12) 吸出二抗，并用 PBS 清洗 3 次。
- (13) 将 DAPI 以（1: 1）的比例使用 PBS 稀释，并将稀释好的 DAPI 滴加到细胞上处理 5 min。
- (14) 用 PBS 洗 3 次，每次 5 min。

(15) 加入抗荧光淬灭剂。

(16) 染色结束后使用激光共聚焦显微镜观察，并采集图像。

4.3.3 RT-qPCR 检测 HUVEC 细胞中自噬基因 ATG5、LC3mRNA 表达

RT-qPCR 实验过程同 3.6.2

以 18s 为内参对照，人源 ATG 5、LC 3 mRNA 引物均由通用生物科技有限公司合成。

表 4-3 引物序列

Table 4-3 primers sequence

Primer name	Sequence (5' to 3')
ATG 5-F	CTGGGCTGGTCTTACTTTGC
ATG 5-R	GGCCAAAGGTTTCAGCTTCA
LC 3-F	AACATGAGCGAGTTGGTCAAG
LC 3-R	GCTCGTAGATGTCCGCGAT
18s-F	AAACGGCTACCACATCCAAG
18s-R	CCTCCAATGGATCCTCGTTA

4.3.4 Western Blot 检测自噬及自噬通路 PI3K/AKT/mTOR 的表达

Western Blot 实验过程同 3.4.4

4.4 自噬及自噬通路 PI3K/AKT/mTOR 受 Sirt1 蛋白调节影响研究

4.4.1 细胞培养及分组

转染 Sirt1 的 HUVEC 培养过程同 3.6.3

4.4.2 RT-qPCR 检测 Sirt1 对下游自噬基因 ATG5、LC3mRNA 表达的影响

RT-qPCR 实验过程同 3.6.2

4.4.3 Sirt1 对下游自噬通路蛋白 PI3K/AKT/mTOR 的影响

Western Blot 实验过程同 3.4.4

4.5 统计学分析

采用 Graph Pad Prism 8 对实验数据进行分析 and 作图，所有数据都以平均值 $\pm$ 标准误差平均值 (mean $\pm$ SEM) 来表示。组间差异使用单因素方差分析 (ANOVA)， $P < 0.05$ 表示具有统计学意义。

4.6 结果与分析

4.6.1 五味子丙素干预的 exosome-miR-181b-5p 对血管内皮细胞自噬及自噬通路的研究

4.6.1.1 免疫荧光观察

Beclin-1 是一重要的自噬调控因子，通过免疫荧光的方法，检测了 HUVEC 细胞中自噬蛋白 Beclin-1 的表达。结果如图所示，与空白对照组相比，经 ox-LDL 诱导组的 Beclin-1 的表达量明显降低，与模型组相比，给药组能显著提高 ox-LDL 诱导的 HUVEC 细胞中 Beclin-1 的表达量，不同剂量的五味子丙素能显著提高 ox-LDL 诱导的 HUVEC 细胞中 Beclin-1 的表达量。且随着药物浓度不断升高，自噬蛋白 Beclin-1 的表达量也升高。上述结果表明，五味子丙素能够通过调节细胞中自噬蛋白的表达来促进细胞自噬的发生。

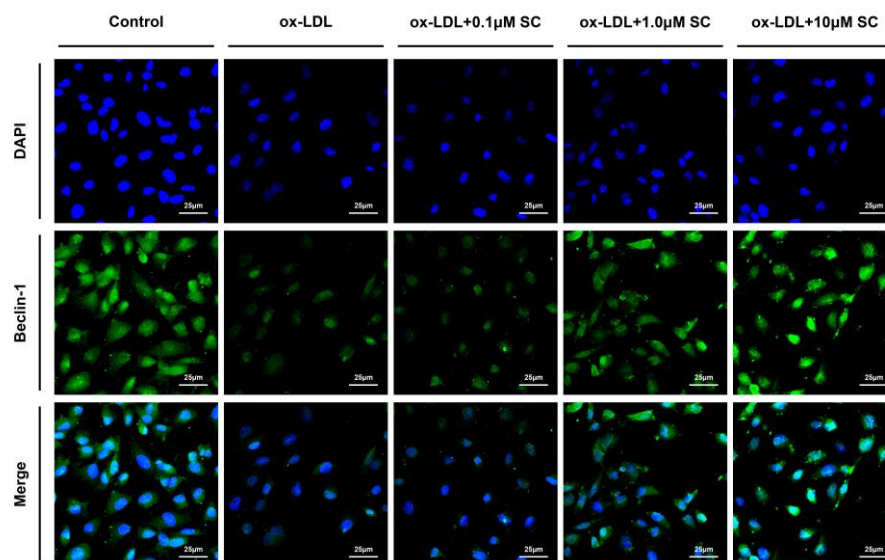


图 4-1 免疫荧光观察自噬蛋白 Beclin-1 的表达 (400 $\times$)

Figure 4-1 Immunofluorescence observation of Beclin-1 expression of autophagy protein (400 $\times$)

4.6.1.2 RT-qPCR 检测细胞中自噬基因 ATG5、LC3mRNA 的表达

为进一步验证五味子丙素对 ox-LDL 诱导的 HUVEC 细胞自噬基因的影响, 采用 RT-qPCR 技术对细胞中自噬相关基因 ATG5、LC3 的 mRNA 表达水平进行考察。结果如图所示, 与空白组相比, ox-LDL 诱导组的自噬基因 ATG5、LC3 水平显著降低, 与模型组相比, 五味子丙素低、中、高剂量给药组均显著提高了自噬基因 ATG5、LC3mRNA 的表达水平 (如图 4-2 A-B)。结果表明, 五味子丙素能够通过促进自噬来缓解动脉粥样硬化。

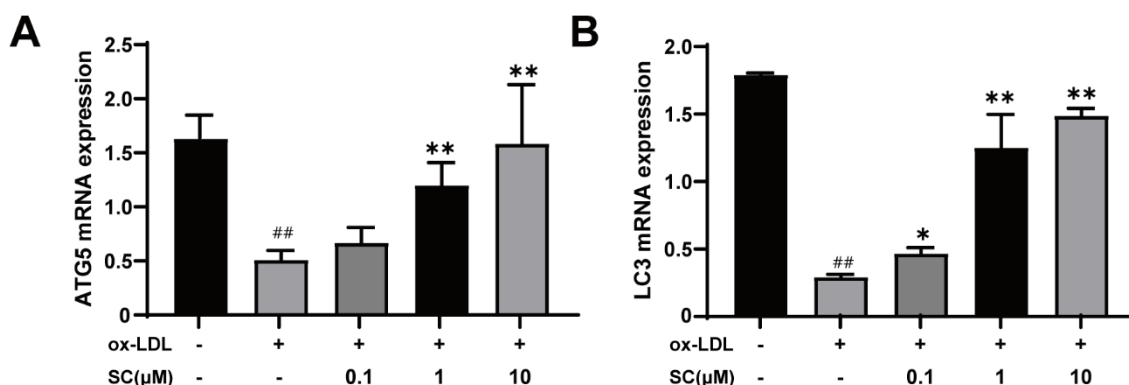


图 4-2 自噬基因的表达 (A ATG5 mRNA 的表达; B LC3 mRNA 的表达)

Figure 4-2 Autophagy gene expression (A ATG5 mRNA expression; B LC3 mRNA expression)

注: 与正常对照组比较, # $P<0.05$, ## $P<0.01$; 与模型组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

Note: # $P<0.05$, ## $P<0.01$ vs the control group; * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs the model group.

4.6.1.3 PI3K/AKT/mTOR 自噬信号通路的确证

PI3K/AKT/mTOR 通路是一条重要的信号传导通路, 参与调控细胞生长、增殖和存活等生物学过程。这条通路的活化会抑制自噬的进行, 而抑制 PI3K/AKT/mTOR 通路则会促进自噬的发生。采用 Western blot 检测五味子丙素是否通过自噬信号通路 PI3K/AKT/mTOR 发挥促进自噬的作用, 结果如图所示, 与空白对照组相比, 经 ox-LDL 诱导后, PI3K/AKT/mTOR 信号通路被活化, 抑制 HUVEC 细胞自噬, 经不同浓度五味子丙素干预后, PI3K/AKT/mTOR 信号通路的活化被抑制, 促进 HUVEC 细胞自噬的发生 (如图 4-3 A-C)。结果表明, 五味子丙素确实是通过 PI3K/AKT/mTOR 通路发挥促进自噬作用。

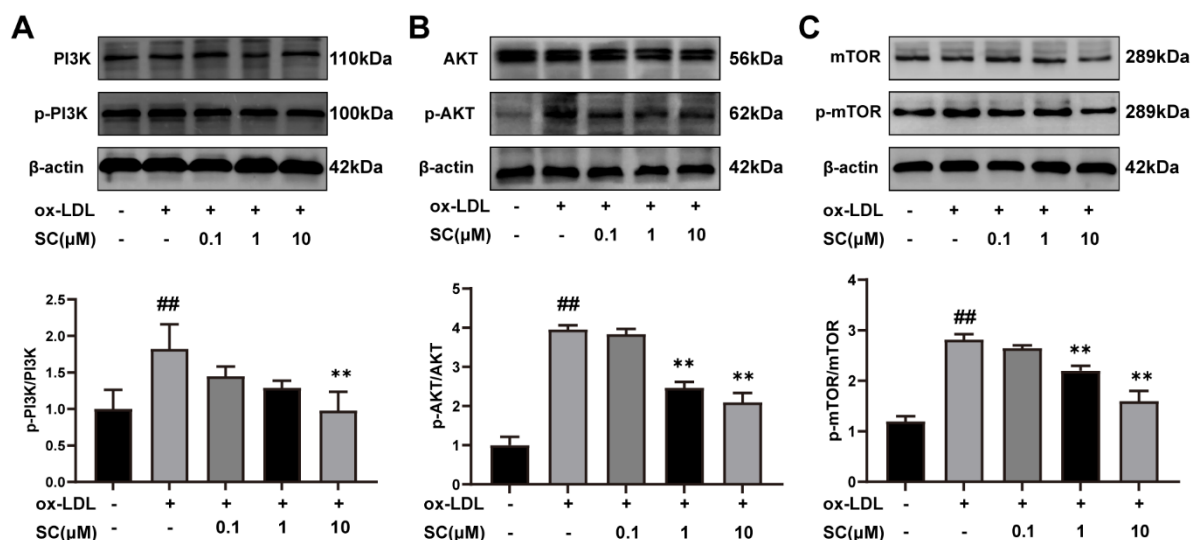


图 4-3 PI3K/AKT/mTOR 通路蛋白的表达 (A PI3K 及 p-PI3K 的蛋白表达; B AKT 及 p-AKT 的蛋白表达; C mTOR 及 p-mTOR 的蛋白表达)

Figure 4-3 Expression of PI3K/AKT/mTOR pathway proteins (A Protein expression of PI3K and p-PI3K; B Protein expression of AKT and p-AKT; C Protein expression of mTOR and p-mTOR)

注: 与正常对照组比较, # $P<0.05$, ## $P<0.01$; 与模型组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

Note: # $P<0.05$, ## $P<0.01$ vs the control group; * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs the model group.

4.6.1.4 Western blot 检测细胞中自噬蛋白 Beclin-1、LC3 II、ATG5、P62 的表达水平

Beclin-1 是自噬过程中的一个关键蛋白, 它在自噬的调控中发挥着重要作用。它参与形成自噬小体和自噬囊泡的过程。ATG5 是自噬相关基因 (autophagy-related gene, ATG) 家族的一个成员, 参与自噬囊泡的形成和自噬过程的执行。LC3 是一个与自噬囊泡膜结合的蛋白, 它在自噬过程中经历翻译后修饰 (主要是磷酸化和脂质化), 从而转变为 LC3 II 形式。LC3 II 的产生标志着自噬囊泡的形成和自噬过程的进行。p62 在自噬中的作用是连接废物识别和自噬体形成的关键环节, 促进废物降解和细胞内废弃物的清除。p62 的过度堆积可能会导致自噬通路的阻塞, 影响自噬囊泡的形成和废物降解的进行。结果如图所示, 与空白对照组比较, 模型组细胞中 P62 蛋白表达升高 (如图 4-4 B), Beclin-1、LC3 II、ATG 5 蛋白表达显著降低, 提示 ox-LDL 可引发细胞自噬的阻滞 (如图 4-4 C-D); 与模型组相比, 五味子丙素不同剂量给药组细胞中 Beclin-1、LC3 II、ATG 5 蛋白显著升高。五味子丙素不同剂量给药组细胞中 P62 蛋白显著下调。提示五味子丙素可提高自噬水平, 并显著改善自噬通路阻滞现象。

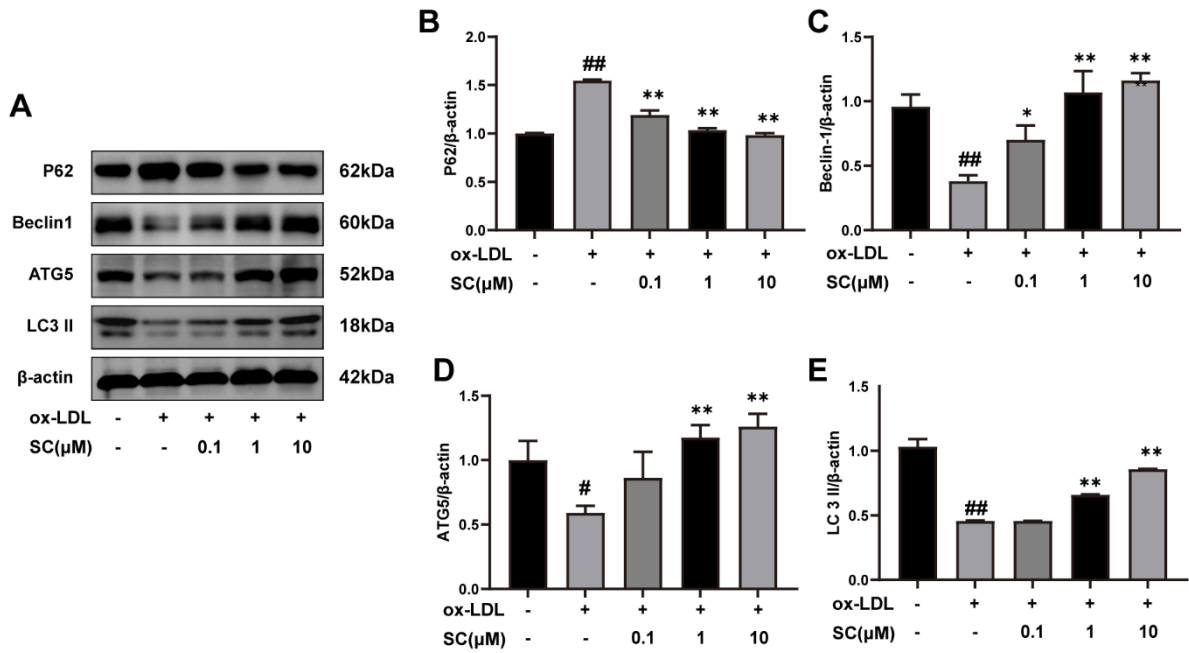


图 4-4 自噬蛋白的表达 (A Western Blot 显示自噬蛋白表达结果; B P62 蛋白表达水平; C Beclin-1 蛋白表达水平; D ATG5 蛋白表达水平; E LC3 II 蛋白表达水平)

Figure 4-4 Expression of autophagy protein (A Western Blot showed the expression result of autophagy protein; B P62 protein expression level; C Beclin-1 protein expression level; D ATG5 protein expression level; E LC3 II protein expression level)

注: 与正常对照组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; 与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Note: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs the control group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs the model group.

4.6.2 自噬及自噬通路 PI3K/AKT/mTOR 受 Sirt1 蛋白调节影响研究

4.6.2.1 RT-qPCR 检测干扰 Sirt1 后对自噬相关基因 ATG5、LC3mRNA 表达的影响

为探讨靶基因对下游自噬蛋白的影响, 通过干扰靶基因 Sirt1, 采用 RT-qPCR 检测下游自噬基因的表达水平。结果如图所示, 与 siSirt1 NC 组相比, 干扰 Sirt1 后, 自噬基因 ATG5 和 LC3 的表达水平显著降低, 而给予五味子干预后 ATG5 和 LC3 的表达水平显著升高。结果表明靶基因 Sirt1 可以介导 HUVEC 细胞的自噬, 五味子丙素可以提高靶基因 Sirt1 的表达水平来促进自噬 (如图 4-5 A-B)。

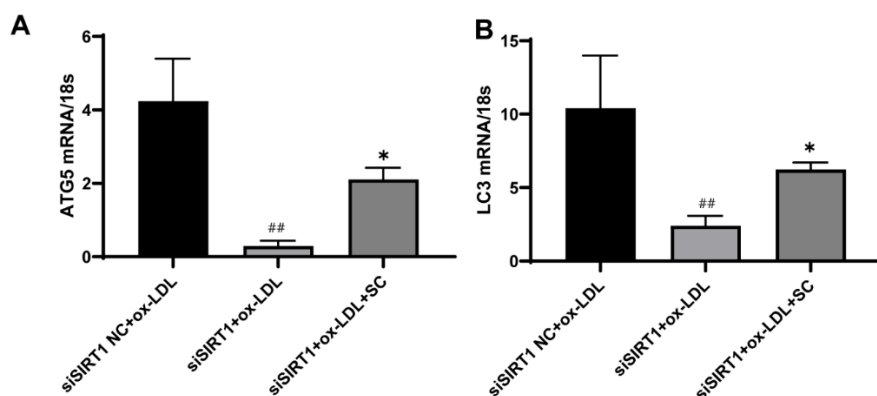


图 4-5 干扰 Sirt1 后对自噬相关基因的表达 (A ATG5 mRNA 的表达; B LC3 mRNA 的表达)

Figure 4-5 The expression of autophagy related genes after interfering with Sirt1 (ATG5 mRNA expression; B LC3 mRNA expression)

注: 与正常对照 NC 组比较, $^{\#}P<0.05$, $^{##}P<0.01$; 与干扰组比较, $^*P<0.05$, $^{**}P<0.01$ 。

Note: $^{\#}P<0.05$, $^{##}P<0.01$ vs the control NC group; $^*P<0.05$, $^{**}P<0.01$ vs the siSirt1 group.

4.6.2.2 Western Blot 检测干扰 Sirt1 后 PI3K/AKT/mTOR 通路蛋白的影响

为探讨 Sirt1 是否介导 PI3K/AKT/mTOR 信号通路, 通过 Western Blot 检测干扰 Sirt1 后 PI3K/AKT/mTOR 通路蛋白。结果显示干扰 Sirt1 后, PI3K/AKT/mTOR 信号通路被活化, 抑制 HUVEC 细胞自噬, 经不同浓度五味子丙素干预后, PI3K/AKT/mTOR 信号通路的活化被抑制, 促进 HUVEC 细胞自噬的发生。结果表明, 五味子丙素确实是通过调控 Sirt1 蛋白介导 PI3K/AKT/mTOR 通路发挥促进自噬作用, 并参与下游分子作用机制 (如图 4-6 A-C)。

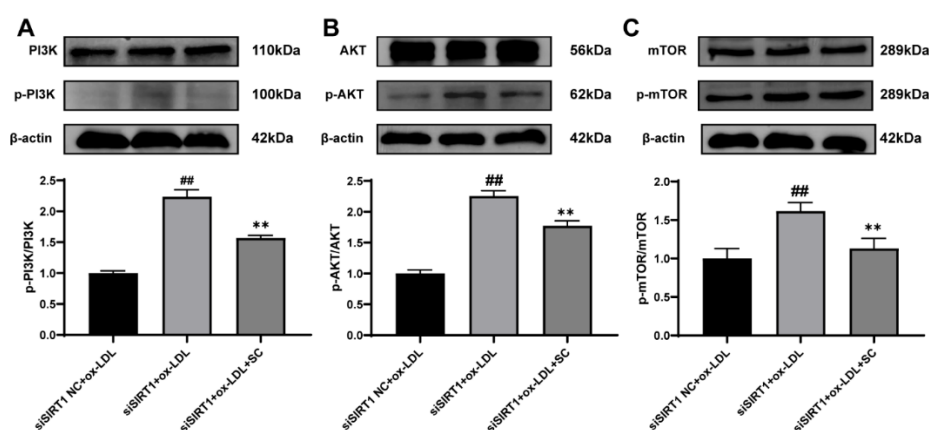


图 4-6 干扰 Sirt1 后 PI3K/AKT/mTOR 通路蛋白表达 (A PI3K 及 p-PI3K 的蛋白表达; B AKT 及 p-AKT 的蛋白表达; C mTOR 及 p-mTOR 的蛋白表达)

Figure 4-6 Expression of PI3K/AKT/mTOR pathway protein after Sirt1 interference (A Protein expression of PI3K and p-PI3K; B Protein expression of AKT and p-AKT; C Protein expression of mTOR and p-mTOR)

注: 与正常对照 NC 组比较, $^{\#}P<0.05$, $^{##}P<0.01$; 与干扰组比较, $^*P<0.05$, $^{**}P<0.01$ 。

Note: $^{\#}P<0.05$, $^{##}P<0.01$ vs the control NC group; $^*P<0.05$, $^{**}P<0.01$ vs the siSirt1 group.

4.6.2.3 Western Blot 检测干扰 Sirt1 后 Sirt1 的表达水平及对下游自噬蛋白的影响

通过 Western Blot 检测干扰 Sirt1 后 Sirt1 的表达水平及对下游自噬蛋白的影响, 结果如图所示, 与 siSirt1 NC 组相比, 干扰 Sirt1 后, Sirt1 的表达水平显著降低; 与干扰 Sirt1 组相比, 给予五味子丙素干预后, Sirt1 的表达水平显著升高 (如图 4-7 B), 五味子丙素可以提高靶蛋白的表达水平。与 siSirt1 NC 组相比, 干扰 Sirt1 后, P62 蛋白表达升高 (如图 4-7 C), Beclin-1、LC3 II、ATG 5 蛋白表达显著降低 (如图 4-7 D-F), 提示干扰 Sirt1 可引发细胞自噬的阻滞; 与干扰 Sirt1 组相比, 五味子丙素给药组细胞中 Beclin-1、LC3 II、ATG 5 蛋白显著升高。五味子丙素给药组细胞中 P62 蛋白显著下调。提示五味子丙素可通过提高靶蛋白 Sirt1 的表达来提高自噬水平, 并显著改善自噬通路阻滞现象。具体的机制通路如图 4-8。

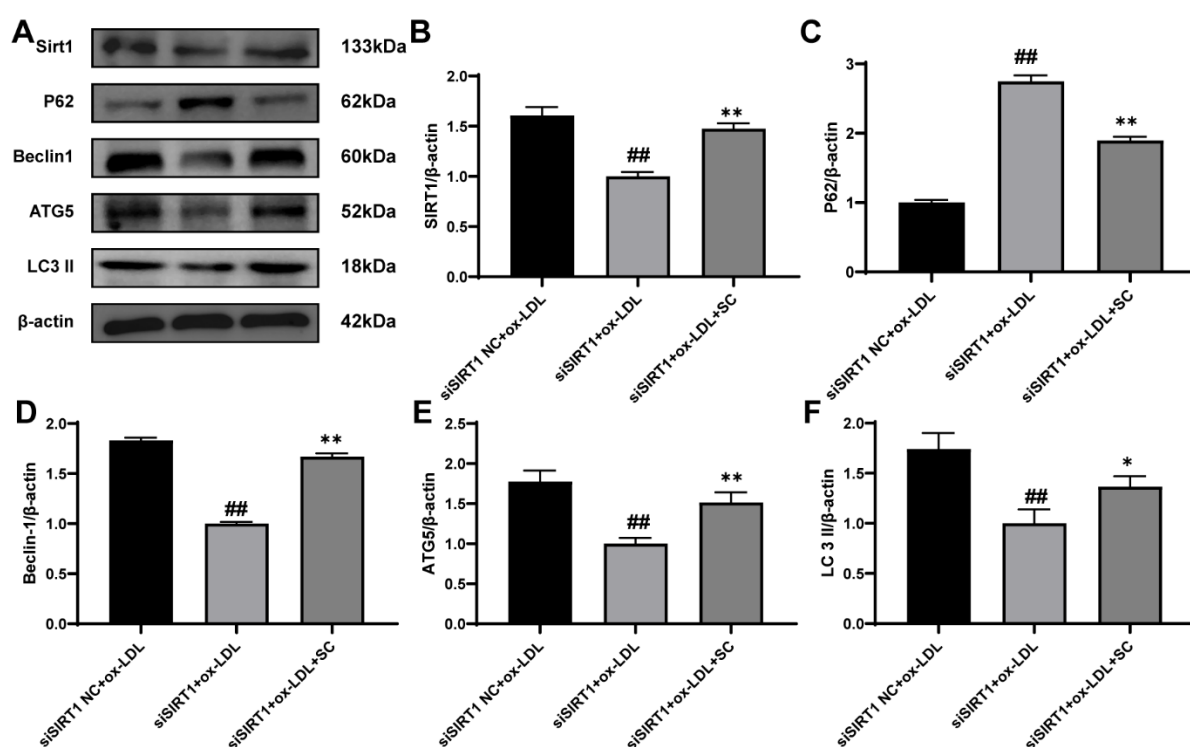


图 4-7 干扰 Sirt1 后 Sirt1 的表达水平及对下游自噬蛋白的表达 (A Western Blot 显示蛋白表达结果; B Sirt1 蛋白表达水平; C P62 蛋白表达水平; D Beclin-1 蛋白表达水平; E ATG5 蛋白表达水平; F LC3 II 蛋白表达水平)

Figure 4-7 The expression level of Sirt1 and the expression of downstream autophagy protein after interfering with Sirt1 (A Western Blot showed the protein expression results; B Sirt1 protein expression level; C P62 protein expression level; D Beclin-1 protein expression level; E ATG5 protein expression level; F LC3 II protein expression level)

注: 与正常对照 NC 组比较, $^{\#}P<0.05$, $^{##}P<0.01$; 与干扰 Sirt1 组比较, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$ 。

Note: $^{\#}P<0.05$, $^{##}P<0.01$ vs the control NC group; $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$ vs the siSirt1 group.

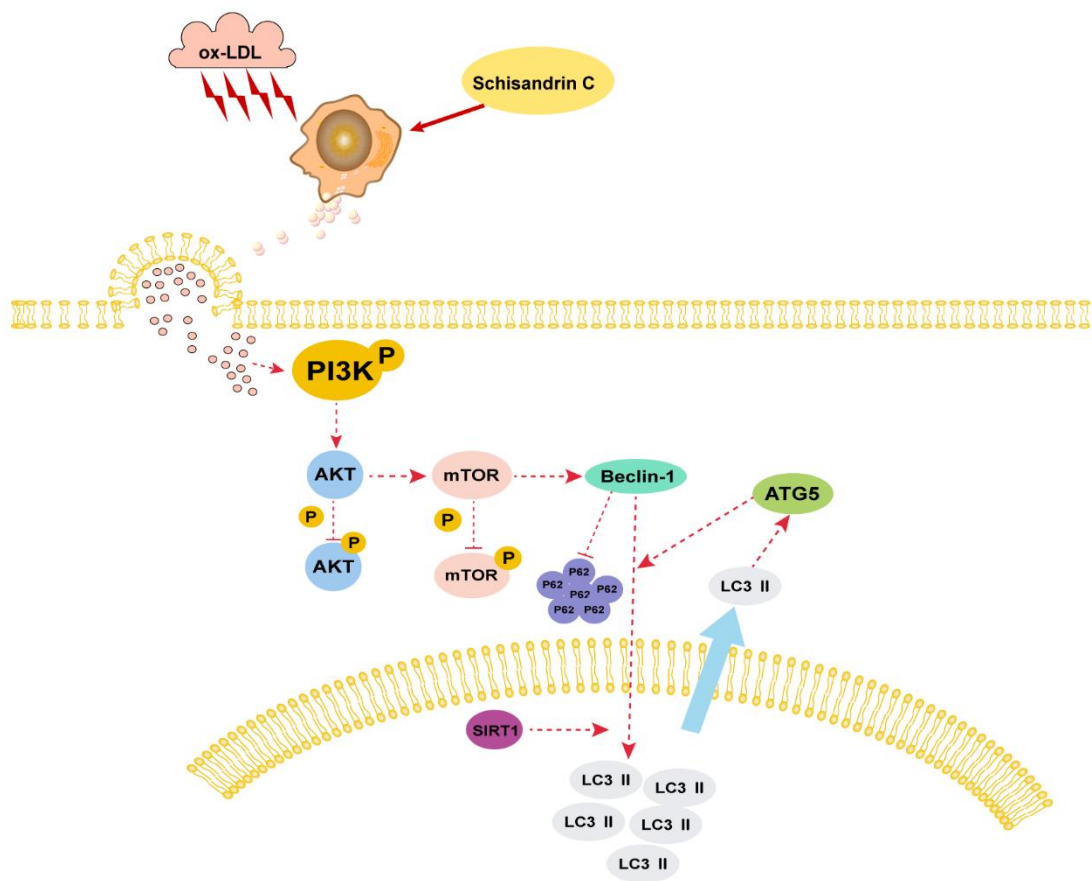


图 4-8 五味子丙素防治动脉粥样硬化的分子机制图

Figure 4-8 Molecular mechanism diagram of Schisandrins C in preventing atherosclerosis

4.7 本章小结

动脉粥样硬化的发生与多种危险因素密切相关，包括血管内皮损伤、炎症反应、脂质代谢异常等。近年来的研究表明，自噬在动脉粥样硬化的进展中起着至关重要的作用^[93]。我们探讨了动脉粥样硬化与自噬之间的关系，并论证了自噬对动脉粥样硬化发展的可能影响。自噬有助于维持细胞稳态，清除受损蛋白和细胞器，并参与调节细胞代谢和应激反应。首先，自噬可以清除细胞内的氧化应激产物和炎症因子，从而减轻血管内皮损伤和炎症反应，有助于减缓动脉粥样硬化的发展。其次，自噬还调节脂质代谢，通过清除胆固醇和脂质沉积，有助于防止动脉粥样硬化斑块的形成^[94]。

为了探讨五味子丙素对自噬相关通路的影响，我们结合网络药理学，分析了 PI3K/AKT/mTOR 信号通路在 ox-LDL 诱导的 HUVECs 细胞中的作用。结果表明，ox-LDL 可诱导 HUVECs 自噬功能障碍，抑制 LC3 II 表达，引起内皮损伤，从而导致动脉

粥样硬化的发生。五味子丙素可以提高 HUVECs 中 LC3 II 的表达水平,减少 ox-LDL 在 HUVECs 中的积累和 p62 蛋白的水平,从而改善 HUVECs 的自噬流,保护内皮细胞。研究表明,五味子丙素可以通过调节 PI3K/AKT/mTOR 通路的活性来影响自噬。mTOR 在自噬中起着重要的调控作用,是自噬的主要负调控轴。PI3K/AKT/信号通路位于 mTOR 的上游,在调控 mTOR 和自噬中起重要作用。它以中医为指导,通过辨证论治,通过多种方法调节靶脏器,显示出独特的优势。它能有效治疗复杂的疾病。大量中药及其有效成分已被证明可靶向 PI3K/AKT/mTOR 信号通路介导的自噬,从而抑制炎症或自身免疫性疾病。

mTOR 是自噬的主要负调节轴^[95]。而作为 mTOR 上游的 PI3K/AKT/信号通路在调节 mTOR 以及自噬中发挥重要作用。为探究五味子丙素对自噬相关通路的影响,通过联合网络药理学分析 PI3K/AKT/mTOR 在 ox-LDL 诱导的 HUVEC 细胞中的作用。结果发现,五味子丙素确实可逆转经 ox-LDL 诱导的 HUVEC 细胞中 PI3K/AKT/mTOR 通路异常激活状态。提示 PI3K/AKT/mTOR 通路是五味子丙素发挥促进自噬及自噬通量的有效途径。

结果表明,Sirt1 介导的细胞自噬在动脉粥样硬化的发病机制中起着至关重要的作用,五味子丙素通过 PI3K/AKT/mTOR 促进自噬、下调炎性因子释放来改善动脉粥样硬化。

第 5 章 总结与展望

5.1 结论

中药活性成分五味子丙素通过调节外泌体 miR-181b-5p 的释放，调控外泌体 miRNA 跨细胞介导心血管内皮细胞的自噬，进而起到防治动脉粥样硬化性疾病的作用；基于高效液相分析联合网络药理学和分子对接技术预测五味子丙素可能发挥作用的通路，发现了五味子丙素可能通过 PI3K/AKT/mTOR 信号通路促进自噬从而发挥抗动脉粥样硬化的作用机制。阐明五味子丙素防治动脉粥样硬化性心血管疾病的微观生物学基础，揭示五味子丙素防治动脉粥样硬化的科学内涵。为动脉粥样硬化性心血管疾病的防治提供参考依据和可能的策略，为类似特性的中药活性成分防治心血管疾病的作用机制阐释提供新的研究方向和思路。

主要发现总结如下：

- (1) 五味子治疗动脉粥样硬化具有多靶点、多通路的特点。
- (2) 五味子丙素能够显著改善 ox-LDL 诱导的血管内皮细胞损伤以及炎症反应。
- (3) 五味子丙素通过调控巨噬细胞外泌体 miR-181b-5p 释放，调节 Sirt1 介导的 PI3K/AKT/mTOR 自噬通路防治动脉粥样硬化。
- (4) 从微观角度揭示五味子丙素改善脂质紊乱条件下动脉粥样硬化的发生、发展的科学内涵。

5.2 展望

- (1) 关于五味子丙素调节外泌体释放途径的方式，本研究并未详细探讨，未来将深入探讨外泌体释放机制。
- (2) 关于五味子丙素通过 miR-181b-5p/Sirt1 自噬途径防治动脉粥样硬化的作用机制研究仅停留在细胞水平，未来将在动物层面进行深度探究。

参考文献

- [1] ZHAO D, LIU J, WANG M, et al. Epidemiology of cardiovascular disease in China: current features and implications[J]. *Nature Reviews. Cardiology*, 2019, 16(4): 203-212.
- [2] KOBAYAMA K, LEY K. Atherosclerosis[J]. *Circulation Research*, 2018, 123(10): 1118-1120.
- [3] PEREZ-CALAHORRA S, LACLAUSTRA M, MARCO-BENEDI V, et al. Comparative efficacy between atorvastatin and rosuvastatin in the prevention of cardiovascular disease recurrence[J]. *Lipids in Health and Disease*, 2019, 18(1): 216.
- [4] 李军. 如何使血脂降下来[J]. *中医健康养生*, 2015(7): 60-61.
- [5] POREDOŠ P, CEVC M, BLINC A. Characteristics of atherosclerosis in femoropopliteal artery and its clinical relevance[J]. *Atherosclerosis*, 2021, 335: 31-40.
- [6] HUMMELGAARD S, VILSTRUP J P, GUSTAFSEN C, et al. Targeting PCSK9 to tackle cardiovascular disease[J]. *Pharmacology & Therapeutics*, 2023, 249: 108480.
- [7] DUEWELL P, KONO H, RAYNER K J, et al. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals[J]. *Nature*, 2010, 464(7293): 1357-1361.
- [8] LI Q, YU L, GAO A, et al. METTL3 (Methyltransferase Like 3)-Dependent N6-Methyladenosine Modification on Braf mRNA Promotes Macrophage Inflammatory Response and Atherosclerosis in Mice[J]. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2023, 43(5): 755-773.
- [9] CANFRÁN-DUQUE A, ROTLLAN N, ZHANG X, et al. Macrophage-Derived 25-Hydroxycholesterol Promotes Vascular Inflammation, Atherogenesis, and Lesion Remodeling[J]. *Circulation*, 2023, 147(5): 388-408.
- [10] BADIMON L, VILAHUR G. Thrombosis formation on atherosclerotic lesions and plaque rupture[J]. *Journal of Internal Medicine*, 2014, 276(6): 618-632.
- [11] GONG X, TIAN M, CAO N, et al. Circular RNA circEys2 regulates vascular smooth muscle cell remodeling via splicing regulation[J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 2021, 131(24): e147031.
- [12] BÄCK M, BU D xiu, BRÄNSTRÖM R, et al. Leukotriene B4 signaling through NF-kappaB-dependent BLT1 receptors on vascular smooth muscle cells in atherosclerosis and intimal hyperplasia[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(48): 17501-17506.
- [13] POTENTE M, GERHARDT H, CARMELIET P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis[J]. *Cell*, 2011, 146(6): 873-887.
- [14] CHEN W, TUMANOV S, STANLEY C P, et al. Destabilization of Atherosclerotic Plaque by Bilirubin Deficiency[J]. *Circulation Research*, 2023, 132(7): 812-827.
- [15] DEPTA J P, BHATT D L. New approaches to inhibiting platelets and coagulation[J]. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 2015, 55: 373-397.
- [16] 王乐, 王卫杰, 李惠, 等. 动脉粥样硬化相关 miRNA 研究进展[J]. *临床医药实践*, 2017, 26(1): 54-56+65.
- [17] 赵豪, 邓欢, 黎彪, 等. 颈动脉粥样硬化性狭窄治疗研究进展[J]. *成都医学院学报*, 2024, 19(1): 187-192.
- [18] JIA B, ZHANG X, MA N, et al. Comparison of Drug-Eluting Stent With Bare-Metal Stent in Patients With Symptomatic High-grade Intracranial Atherosclerotic Stenosis: A Randomized Clinical Trial[J]. *JAMA neurology*, 2022, 79(2): 176-184.
- [19] LIU L, HUO C, SUN H, et al. Vascular Morphology has No Direct Relationship with Atherosclerotic

- Plaque Burden in Patients with Symptomatic Middle Cerebral Artery Stenosis[J]. *Current Neurovascular Research*, 2019, 16(3): 224-231.
- [20] VARGAS J N S, HAMASAKI M, KAWABATA T, et al. The mechanisms and roles of selective autophagy in mammals[J]. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 2023, 24(3): 167-185.
- [21] SHAN R, LIU N, YAN Y, et al. Apoptosis, autophagy and atherosclerosis: Relationships and the role of Hsp27[J]. *Pharmacological Research*, 2021, 166: 105169.
- [22] PI S, MAO L, CHEN J, et al. The P2RY12 receptor promotes VSMC-derived foam cell formation by inhibiting autophagy in advanced atherosclerosis[J]. *Autophagy*, 2021, 17(4): 980-1000.
- [23] YU Y, YAN Y, NIU F, et al. Ferroptosis: a cell death connecting oxidative stress, inflammation and cardiovascular diseases[J]. *Cell Death Discovery*, 2021, 7(1): 193.
- [24] MADRIGAL-MATUTE J, DE BRUIJN J, VAN KUIJK K, et al. Protective role of chaperone-mediated autophagy against atherosclerosis[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2022, 119(14): e2121133119.
- [25] MAO X, YANG L, FAN Y, et al. The Vacuole and Mitochondria Patch (vCLAMP) Protein Mcp1 Is Involved in Maintenance of Mitochondrial Function and Mitophagy in *Candida albicans*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 633380.
- [26] SCHRIJVERS D M, DE MEYER G R Y, MARTINET W. Autophagy in atherosclerosis: a potential drug target for plaque stabilization[J]. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2011, 31(12): 2787-2791.
- [27] LI Y, JIANG X, ZHANG Z, et al. Autophagy promotes directed migration of HUVEC in response to electric fields through the ROS/SIRT1/FOXO1 pathway[J]. *Free Radical Biology & Medicine*, 2022, 192: 213-223.
- [28] ZHOU J, JIANG Y Y, CHEN H, et al. Tanshinone I attenuates the malignant biological properties of ovarian cancer by inducing apoptosis and autophagy via the inactivation of PI3K/AKT/mTOR pathway[J]. *Cell Proliferation*, 2020, 53(2): e12739.
- [29] MA L, ZHANG R, LI D, et al. Fluoride regulates chondrocyte proliferation and autophagy via PI3K/AKT/mTOR signaling pathway[J]. *Chemico-Biological Interactions*, 2021, 349: 109659.
- [30] 赵新月, 田颖颖, 刘闯, 等. 基于 mTOR/STAT3 信号轴探讨桑色素诱导非小细胞肺癌 A549 细胞自噬的机制[J]. *中药新药与临床药理*, 2024, 35(3): 317-324.
- [31] HERAS-SANDOVAL D, PÉREZ-ROJAS J M, HERNÁNDEZ-DAMIÁN J, et al. The role of PI3K/AKT/mTOR pathway in the modulation of autophagy and the clearance of protein aggregates in neurodegeneration[J]. *Cellular Signalling*, 2014, 26(12): 2694-2701.
- [32] CHEN L, HEIKKINEN L, WANG C, et al. Trends in the development of miRNA bioinformatics tools[J]. *Briefings in Bioinformatics*, 2019, 20(5): 1836-1852.
- [33] DIENER C, KELLER A, MEESE E. Emerging concepts of miRNA therapeutics: from cells to clinic[J]. *Trends in genetics: TIG*, 2022, 38(6): 613-626.
- [34] LU T X, ROTHENBERG M E. MicroRNA[J]. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2018, 141(4): 1202-1207.
- [35] POZNIAK T, SHCHARBIN D, BRYSEWSKA M. Circulating microRNAs in Medicine[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(7): 3996.
- [36] PIETRYKOWSKA H, SIEROCKA I, ZIELEZINSKI A, et al. Biogenesis, conservation, and function of miRNA in liverworts[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2022, 73(13): 4528-4545.
- [37] FAN X, ZOU X, LIU C, et al. Global analysis of miRNA-mRNA regulation pair in bladder cancer[J]. *World Journal of Surgical Oncology*, 2022, 20(1): 66.

- [38] KILIKEVICIUS A, MEISTER G, COREY D R. Reexamining assumptions about miRNA-guided gene silencing[J]. *Nucleic Acids Research*, 2022, 50(2): 617-634.
- [39] 王文俏, 刘露, 许馨, 等. miR-146a/b 在动脉粥样硬化疾病中的研究进展[J]. *生命科学*, 2015, 27(4): 471-476.
- [40] VALIHRACH L, ANDROVIC P, KUBISTA M. Circulating miRNA analysis for cancer diagnostics and therapy[J]. *Molecular Aspects of Medicine*, 2020, 72: 100825.
- [41] LI W, LIU J B, HOU L K, et al. Liquid biopsy in lung cancer: significance in diagnostics, prediction, and treatment monitoring[J]. *Molecular Cancer*, 2022, 21(1): 25.
- [42] ZHANG J, LI S, LI L, et al. Exosome and exosomal microRNA: trafficking, sorting, and function[J]. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 2015, 13(1): 17-24.
- [43] HUSSEN B M, HIDAYAT H J, SALIHI A, et al. MicroRNA: A signature for cancer progression[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 2021, 138: 111528.
- [44] WANG L, ZHANG L. Circulating Exosomal miRNA as Diagnostic Biomarkers of Neurodegenerative Diseases[J]. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 2020, 13: 53.
- [45] SHARMA A R, SHARMA G, BHATTACHARYA M, et al. Circulating miRNA in Atherosclerosis: A Clinical Biomarker and Early Diagnostic Tool[J]. *Current Molecular Medicine*, 2022, 22(3): 250-262.
- [46] BARABAN J M, TUDAY E, BERKOWITZ D E, et al. Deciphering the Role of microRNAs in Large-Artery Stiffness Associated With Aging: Focus on miR-181b[J]. *Frontiers in Physiology*, 2021, 12: 747789.
- [47] 刘相城, 付宏, 刘春柏, 等. 结合外周血微 RNA-181b 表达水平探讨急性脑梗死病人侧支循环形成的影响因素[J]. *安徽医药*, 2024, 28(3): 602-607.
- [48] MA X, BECKER BUSCAGLIA L E, BARKER J R, et al. MicroRNAs in NF-kappaB signaling[J]. *Journal of Molecular Cell Biology*, 2011, 3(3): 159-166.
- [49] BRAICU C, GULEI D, COJOCNEANU R, et al. miR-181a/b therapy in lung cancer: reality or myth?[J]. *Molecular Oncology*, 2019, 13(1): 9-25.
- [50] YANG K, QIU J, HUANG Z, et al. A comprehensive review of ethnopharmacology, phytochemistry, pharmacology, and pharmacokinetics of *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. and *Schisandra sphenanthera* Rehd. et Wils[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2022, 284: 114759.
- [51] OLAS B. Cardioprotective Potential of Berries of *Schisandra chinensis* Turcz. (Baill.), Their Components and Food Products[J]. *Nutrients*, 2023, 15(3): 592.
- [52] 赵志远, 张金朋, 赵硕, 等. UPLC 法同时测定护肝片中 8 种五味子木脂素的含量[J]. *中成药*, 2024, 46(1): 10-14.
- [53] XU H N, WANG W, LI X Z, et al. A Review of Extraction and Purification, Biological Properties, Structure-Activity Relationships and Future Prospects of Schisandrin C: A Major Active Constituent of *Schisandra Chinensis*[J]. *Chemistry & Biodiversity*, 2023, 20(12): e202301298.
- [54] HAN J, SHI X, DU Y, et al. Schisandrin C targets Keap1 and attenuates oxidative stress by activating Nrf2 pathway in Ang II-challenged vascular endothelium[J]. *Phytotherapy research: PTR*, 2019, 33(3): 779-790.
- [55] KIM T W, HWANG S, PARK M S, et al. Schisandrin C: an active compound from the fruit of *Schisandra chinensis* in anti-inflammation and anti-oxidation[J]. *Cellular and Molecular Biology (Noisy-Le-Grand, France)*, 2023, 69(15): 167-173.
- [56] 杜孝林, 刘寅, 杨亚男. 五味子丙素通过 SIRT1/PGC-1 α /NRF1 通路减轻脂多糖诱导的大鼠心肌细胞氧化应激损伤机制的研究[J]. *沈阳药科大学学报*, 2023, 40(8): 1044-1050.
- [57] QIN X ling, CHEN X, ZHONG G ping, et al. Effect of Tacrolimus on the pharmacokinetics of bioactive

- lignans of Wuzhi tablet (*Schisandra sphenanthera* extract) and the potential roles of CYP3A and P-gp[J]. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 2014, 21(5): 766-772.
- [58] WANG X juan, RAO X rong, LI S, et al. Effect of Huanshuai Recipe Oral Liquid ([characters: see text]) on renal dysfunction progression in patients with atherosclerotic renal artery stenosis[J]. *Chinese Journal of Integrative Medicine*, 2015, 21(11): 811-816.
- [59] 李坦城, 安丽萍, 滕昊林, 等. 五味子提取物的研究现状与进展[J]. *中国医药科学*, 2014, 4(19): 80-82.
- [60] 李珊, 柳熠鑫, 任菲菲, 等. 天然植物活性成分通过下调 P-糖蛋白逆转肿瘤多药耐药的研究进展[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2023, 28(3): 331-340.
- [61] JIA M, ZHOU L, LOU Y, et al. An analysis of the nutritional effects of *Schisandra chinensis* components based on mass spectrometry technology[J]. *Frontiers in Nutrition*, 2023, 10: 1227027.
- [62] FALK E. Pathogenesis of atherosclerosis[J]. *Journal of the American College of Cardiology*, 2006, 47(8 Suppl): C7-12.
- [63] PEREZ DE SOUZA L, ALSEEKH S, SCOSSA F, et al. Ultra-high-performance liquid chromatography high-resolution mass spectrometry variants for metabolomics research[J]. *Nature Methods*, 2021, 18(7): 733-746.
- [64] HAMEEDAT F, HAWAMDEH S, ALNABULSI S, et al. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) with Fluorescence Detection for Quantification of Steroids in Clinical, Pharmaceutical, and Environmental Samples: A Review[J]. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 2022, 27(6): 1807.
- [65] NOGALES C, MAMDOUH Z M, LIST M, et al. Network pharmacology: curing causal mechanisms instead of treating symptoms[J]. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2022, 43(2): 136-150.
- [66] LI X, WEI S, NIU S, et al. Network pharmacology prediction and molecular docking-based strategy to explore the potential mechanism of Huanglian Jiedu Decoction against sepsis[J]. *Computers in Biology and Medicine*, 2022, 144: 105389.
- [67] GUO B, ZHAO C, ZHANG C, et al. Elucidation of the anti-inflammatory mechanism of Er Miao San by integrative approach of network pharmacology and experimental verification[J]. *Pharmacological Research*, 2022, 175: 106000.
- [68] ZHANG L, HAN L, WANG X, et al. Exploring the mechanisms underlying the therapeutic effect of *Salvia miltiorrhiza* in diabetic nephropathy using network pharmacology and molecular docking[J]. *Bioscience Reports*, 2021, 41(6): BSR20203520.
- [69] 汪威. 基于自噬、焦亡探讨王枣子乙素治疗慢性阻塞性肺疾病的作用机制研究[D]. 安徽工程大学, 2023.
- [70] WU X, LI W, LUO Z, et al. The molecular mechanism of *Ligusticum wallichii* for improving idiopathic pulmonary fibrosis: A network pharmacology and molecular docking study[J]. *Medicine*, 2022, 101(6): e28787.
- [71] YUAN R, TAO X, LIANG S, et al. Protective effect of acidic polysaccharide from *Schisandra chinensis* on acute ethanol-induced liver injury through reducing CYP2E1-dependent oxidative stress[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 2018, 99: 537-542.
- [72] KOETH R A, WANG Z, LEVISON B S, et al. Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis[J]. *Nature Medicine*, 2013, 19(5): 576-585.
- [73] BOTHAM K M, WHEELER-JONES C P D. Postprandial lipoproteins and the molecular regulation of vascular homeostasis[J]. *Progress in Lipid Research*, 2013, 52(4): 446-464.
- [74] HARTLEY A, HASKARD D, KHAMIS R. Oxidized LDL and anti-oxidized LDL antibodies in atherosclerosis - Novel insights and future directions in diagnosis and therapy<sup>[J]>. *Trends in*

- Cardiovascular Medicine, 2019, 29(1): 22-26.
- [75] KATTOOR A J, POTHINENI N V K, PALAGIRI D, et al. Oxidative Stress in Atherosclerosis[J]. Current Atherosclerosis Reports, 2017, 19(11): 42.
- [76] HUI B, HOU X, LIU R, et al. Gypenoside inhibits ox-LDL uptake and foam cell formation through enhancing Sirt1-FOXO1 mediated autophagy flux restoration[J]. Life Sciences, 2021, 264: 118721.
- [77] 吴佳,吴进,肖凯,等. 栀子苷调节 PI3K/AKT/mTOR 信号通路在动脉粥样硬化形成过程中对 Th17/Treg 功能的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2024, 22(05): 817-822.
- [78] WANG C, LI Z, LIU Y, et al. Exosomes in atherosclerosis: performers, bystanders, biomarkers, and therapeutic targets[J]. Theranostics, 2021, 11(8): 3996-4010.
- [79] WANG S, SHI M, ZHOU J, et al. Circulating Exosomal miR-181b-5p Promoted Cell Senescence and Inhibited Angiogenesis to Impair Diabetic Foot Ulcer via the Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2/Heme Oxygenase-1 Pathway[J]. Frontiers in Cardiovascular Medicine, 2022, 9: 844047.
- [80] KLYMIUK M C, BALZ N, ELASHRY M I, et al. Exosomes isolation and identification from equine mesenchymal stem cells[J]. BMC veterinary research, 2019, 15(1): 42.
- [81] XIE H, YAO J, WANG Y, et al. Exosome-transmitted circVMP1 facilitates the progression and cisplatin resistance of non-small cell lung cancer by targeting miR-524-5p-METTL3/SOX2 axis[J]. Drug Delivery, 2022, 29(1): 1257-1271.
- [82] JIN J, SHI Y, GONG J, et al. Exosome secreted from adipose-derived stem cells attenuates diabetic nephropathy by promoting autophagy flux and inhibiting apoptosis in podocyte[J]. Stem Cell Research & Therapy, 2019, 10(1): 95.
- [83] PESKOE S B, BARBER J R, ZHENG Q, et al. Differential long-term stability of microRNAs and RNU6B snRNA in 12-20 year old archived formalin-fixed paraffin-embedded specimens[J]. BMC cancer, 2017, 17(1): 32.
- [84] FRIEDMAN R C, FARH K K H, BURGE C B, et al. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs[J]. Genome Research, 2009, 19(1): 92-105.
- [85] 丁亚兰. HBV 剪接特异性蛋白 HBDSP 对 Huh7 细胞影响的蛋白质组学分析[D]. 福建医科大学, 2021.
- [86] FAN Y, PIONNEAU C, COCOZZA F, et al. Differential proteomics argues against a general role for CD9, CD81 or CD63 in the sorting of proteins into extracellular vesicles[J]. Journal of Extracellular Vesicles, 2023, 12(8): e12352.
- [87] ALLAHVERDIAN S, FRANCIS G A. Cholesterol homeostasis and high-density lipoprotein formation in arterial smooth muscle cells[J]. Trends in Cardiovascular Medicine, 2010, 20(3): 96-102.
- [88] CAO H, JIA Q, YAN L, et al. Quercetin Suppresses the Progression of Atherosclerosis by Regulating MST1-Mediated Autophagy in ox-LDL-Induced RAW264.7 Macrophage Foam Cells[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(23): 6093.
- [89] HO P T B, CLARK I M, LE L T T. MicroRNA-Based Diagnosis and Therapy[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(13): 7167.
- [90] 王美华, 陈丽琴. 慢性阻塞性肺疾病急性加重期患者血清 microRNA-146a 水平及其临床意义[J]. 中国现代医学杂志, 2020, 30(18): 36-40.
- [91] MIZUSHIMA N, KOMATSU M. Autophagy: renovation of cells and tissues[J]. Cell, 2011, 147(4): 728-741.
- [92] HWANG H Y, SHIM J S, KIM D, et al. Antidepressant drug sertraline modulates AMPK-MTOR signaling-mediated autophagy via targeting mitochondrial VDAC1 protein[J]. Autophagy, 2021, 17(10): 2783-2799.

-
- [93] 韩倩倩, 潘芸芸, 温紫云, 等. 水蛭对 ApoE^{-/-}动脉粥样硬化小鼠自噬的影响[J]. 中国临床药理学杂志, 2024, 40(5): 688-692.
- [94] LI N, ZHANG R X, XIE X J, et al. Autophagy in chronic stress induced atherosclerosis[J]. Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry, 2020, 503: 70-75.
- [95] KIM Y C, GUAN K L. mTOR: a pharmacologic target for autophagy regulation[J]. The Journal of Clinical Investigation, 2015, 125(1): 25-32.

攻读硕士期间学术成果

- [1] 翟科峰、段红、计宇航、陈圣雄、王鑫、**李晗**、吕佳敏、汪威、陈远, 中华传统食材丛书·野菜卷(上下册), 合肥工业大学出版社, 2022.08, ISBN 978-7-5650-5115-9.
- [2] Hong Duan, **Han Li**, Jun Feng, Jing Zhou, Ying Shi, Li Wang, Zeng Dong, Kefeng Zhai, Lili Li, Zhaojun Wei. *Isodon Suzhouensis* extract interferes with miRNA expression profile for prevention and treatment of Chronic Obstructive Pneumonia Disease. Food Science and Human Wellness, 2024. (导师共同一作)
- [3] Yuan Chen, **Han Li**, Xinlian Zhang, Wei Wang, Marwan M.A. Rashed, Hong Duan, Lili Li, Kefeng Zhai. Exploring the anti-skin inflammation substances and mechanism of *Paeonia lactiflora* Pall. Flower via network pharmacology-HPLC integration. Phytomedicine, 2024: 155565. (共同一作)
- [4] Wei Wang, **Han Li**, Ying Shi, Jing Zhou, Ghulam Jilany Khan, Juan Zhu, Fawang Liu, Hong Duan, Lili Li, Kefeng Zhai. Targeted intervention of natural medicinal active ingredients and traditional Chinese medicine on epigenetic modification: Possible strategies for prevention and treatment of atherosclerosis. Phytomedicine, 2024 Jan;122:155139. (共同一作)
- [5] Hong Duan, Wei Wang, Shu Li, **Han Li**, Ghulam Jilany Khan, Fawang Liu, Kefeng Zhai, Lili Li, Zhaojun Wei. The potential mechanism of *Isodon suzhouensis* against COVID-19 via EGFR/TLR4 pathways. Food Science and Human Wellness, 2024.
- [6] Wei Wang, **Han Li**, Jiamin Lv, Ghulam Jilany Khan, Hong Duan, Juan Zhu, Nina Bao, Kefeng Zhai, Zhenglian Xue. Determination of the Anti-Oxidative Stress Mechanism of *Isodon suzhouensis* Leaves by Employing Bioinformatic and Novel Research Technology. ACS Omega, 2023, 8(3): 3520-3529.
- [7] 翟科峰,段红,**李晗**,施颖,周婧,陈远. 血清外泌体 miRNA 作为分子标志物在诊断和治疗慢性阻塞性肺炎中的应用[P]. 2023.3, ZL2023102476647, 实审中.
- [8] 段红,翟科峰,**李晗**,吕佳敏,汪威,陈远. UPLC-LTQ-Orbitrap-MS 法检测芍药花中化学成分的方法[P]. 2022.9, ZL 202211115186.6, 实审中.
- [9] 翟科峰,段红,鲍妮娜,张兴桃,**李晗**,陈远,周亚茹. 动脉粥样硬化血浆外泌体 miRNA 标志物组、获取方法及其应用[P]. 2022.8, ZL202110626265.2, 实审中.
- [10] 翟科峰,段红,鲍妮娜,董增,陈远,**李晗**. 一种芍药花提取物及其提取方法、检测方法和应用[P]. 2022.9, ZL202211114956.5, 实审中.
- [11] 翟科峰,段红,陈远,汪威,吕佳敏,**李晗**. 一种含芍药花提取液的护肤品及其制备方法[P]. 2022.9, ZL 202211119416.6, 实审中.

致谢

不知不觉，研究生生涯就要接近尾声了，在研究生学习期间我成长了很多，也成熟了许多，不像大学时那么懵懂无知。在收到研究生录取通知书之前，我内心是忐忑的，也很迷茫，不知路在何方，在那个炎热的夏天我收到了安徽工程大学的研究生录取通知书，我既兴奋又恐慌，兴奋的是未来三年我有了奋斗的目标，可以奋力前进，但是又恐慌自己做不好研究生的工作。

自 2021 年 9 月步入研究生生涯，为了锻炼自己，不让自己与他人交流起来那么怯弱，我参与了班干部的竞选，在大家的支持下我很荣幸的成为了我们班的副班长，然而后续因为联合培养，不能待在本校，所以没能好好地服务大家。在安徽工程大学的一年理论学习期间，我也结识了很多同学，尤其要感谢我亲爱的室友胡紫微同学，杜田莹同学，我们的班长黄伟同学在我不在学校的时候帮助我处理一些琐事，真的很由衷的感谢他们。同时也要感谢辅导员王玲玲老师、李玉峰老师、李良渊老师和谢亮亮老师对我们联培学生的厚爱。

随之而来的就是与相处一年的好伙伴们的分离，来到我曾经的母校宿州学院开展研究生后续生涯。又回到熟悉的地方，但已经物是人非，曾经的同学都已经毕业，但是见到翟老师和段老师的时候又是满怀欣喜的。翟老师和段老师在我的研究生生涯中起到了启蒙老师的作用，大一期间翟老师就是教授我们无机及分析化学的老师，我也在大一寒假结束的时候就加入了翟老师和段老师的实验小组，大学四年，跟着翟老师学习了许多关于实验的东西，也为后来的实验生涯夯实了基础。同时我也在宿州学院遇到了我曾经的学长汪威和陈远，他们俩既是我的学长也是我研究生涯的两盏指路明灯，汪威学长的理论知识比较扎实，在我课题思路遇到瓶颈的时候总是向他请教，他也总是会细心的为我解答；陈远学长的技术操作能力比较强，在我的实验遇到瓶颈的时候，向他请求他也总能耐心的给予我指导，我很幸运能够遇见他们。同样在宿州学院联培的还有来自新疆医科大学的张思蓉同学，我们的实验课题有相似的实验方法，很庆幸能遇到她，教我细胞实验与网络药理学，让我少走很多弯路，我们结伴而行共同成长。研究生的最后一年，研究生生涯也接近尾声了，实验生涯迎来了几个搞怪的师妹，感谢她们给我们的实验生活增添了许多乐趣。同时要感谢翟老师带我们去杭州和北京参加学术会议，开阔眼界，增长见识。

研究生生涯即将结束，我还要感谢我的家人，是他们一直支持我，鼓励我，让我能有现在的收获。最后，我还要感谢在我无助的时候一直陪伴在我身边的于文祥先生，我们互相分享生活中的趣事和一些不开心的事，他总是开导我要积极向上，这三年期间我们之间既有开心也有矛盾，总之我们携伴而行，共同成长，共同进步。我们都要努力的变优秀，为下一次相遇！

最后，向评审论文和答辩的各位专家表示衷心的感谢和最诚挚的祝福！

致谢人：李晗
2024 年 5 月
安徽工程大学