

分类号：Q81

单位代码：10363

密级：公开

学号：2220520112

五味子丙素通过干预 NMMHC IIA 与 HSP70 相互作用介导
外泌体分泌防治动脉粥样硬化机制研究

Mechanisms of exosome secretion mediated by Schisandra C
by interfering with the interaction between NMMHC IIA and
HSP70 in the prevention and treatment of atherosclerosis

学生姓名：	施颖
校内导师：	翟科峰
校外导师：	唐英武
专 业：	生物与医药
研究方向：	制药工程

论文答辩日期： 2025 年 5 月 15 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：

施颖

日期：2025 年 5 月 15 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：施颖

指导教师签名：



日期：2025 年 5 月 15 日

日期：2025 年 5 月 15 日

五味子丙素通过干预 NMMHC IIA 与 HSP70 相互作用介导外泌体分泌防治动脉粥样硬化机制研究

摘要

动脉粥样硬化(Atherosclerosis, AS)是一种最常见的具有慢性以及多种发病因素为特征的心血管疾病,同时也是冠心病和中风等主要心血管疾病的发病基础。目前的诊断工具和脂质检测在早期发现和预防方面存在局限性。外泌体和 microRNAs(miRNAs)在细胞间通信和基因调控中起着关键作用,其中 NMMHC IIA 的表达水平与 AS 的进展密切相关。此外, NMMHC IIA 也是中药治疗疾病的潜在靶点,中药中的活性成分可以调节 NMMHC IIA 及其相互作用蛋白,从而对疾病发挥治疗作用。五味子(*Schisandra chinensis*)为木兰科植物五味子(*Schisandra chinensis* Turcz. Baill.)的干燥果实。五味子丙素(Schizandrin C, SC)是从五味子中分离得到的联苯环辛二烯木质素,具有丰富的抗氧化、抗炎、抗肿瘤和心血管保护等药理作用。最近的研究表明, SC 在 AS 的治疗中有潜在的应用价值。鉴于此,本研究通过蛋白质组学和生物信息学方法揭示了 MYH9(NMMHC IIA)是 SC 调控巨噬细胞囊泡释放的关键靶点及体内细胞实验考察五味子丙素对动脉粥样硬化的作用,并通过体内敲除 MYH9 基因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)通过蛋白质组学和生物信息学方法对为探讨靶标蛋白调控泡沫细胞释放机制研究。主要综合蛋白质组学和生物信息学方法,采用蛋白质组学对 Control 组、ox-LDL 组及 ox-LDL+SC 组进行分析,深入解析差异蛋白的

功能。综合差异蛋白分析，我们共鉴定出 6152 个蛋白，以 $FC>2$ 倍且 $Pvalue<0.05$ 为标准，我们筛选出 423 个上调蛋白和 648 个下调蛋白。SC 处理后，发现 54 个上调蛋白和 302 个下调蛋白。其中 25 个上调蛋白和 32 个下调蛋白在 Venn 图分析中显示重叠，进一步利用 STRING 数据库 (<https://www.string-db.org/>) 进行 PPI 分析，揭示了 MYH9(NMMHC IIA) 是 SC 调控巨噬细胞囊泡释放的关键靶点，这一发现为 AS 中外泌体研究提供了新的视角。

(2) 在 AS 病理条件下，通过共定位实验检测外泌体标志蛋白 TSG101 的表达来鉴定外泌体的释放量，显示 SC 通过干预泡沫细胞抑制外泌体的释放行为。免疫共沉淀-银染-质谱及免疫印迹结果显示，NMMHC IIA 相互作用蛋白是 HSP70，为探讨 SC 对 NMMHC IIA 与 HSP70 相互作用共同调节外泌体释放，对细胞蛋白以及上清液中外泌体蛋白进行免疫印迹检测，结果提示在药物作用下，推测 SC 能够抑制 NMMHC IIA 的表达来影响 HSP70 的生成，并且能够抑制外泌体的释放。进一步干扰靶蛋白 NMMHC IIA，采用免疫荧光共定位及免疫印迹实验，结果显示抑制了外泌体释放。研究表明，NMMHC IIA 和 HSP70 可以通过相互作用共同调节细胞外泌体的释放，这一发现为 AS 疾病早期治疗和预防提供了重要的理论依据和潜在策略。

(3) 为探讨 SC 及其调控 MYH9 基因敲除对 AS 的保护作用及其机制。体外通过泡沫细胞源外泌体对心血管内皮损伤进行 ELISA 及免疫印迹实验，实验表明，SC 能够显著抑制泡沫细胞源外泌体诱导的 HUVECs 炎症反应和损伤，降低炎性因子 $TNF-\alpha$ 、 $IL-1\beta$ 及黏附分子 MCP-1、ICAM-1、VCAM-1

的表达。同时, SC 通过调控 NMMHC IIA-HSP70 相互作用, 抑制外泌体的释放, 从而减轻内皮细胞损伤。体内实验进一步证实, 通过构建 ApoE^{-/-} NC 组、ApoE^{-/-}模型组、ApoE^{-/-}给药组、MYH9^{+/-}-ApoE^{-/-}模型组、MYH9^{+/-}-ApoE^{-/-}给药组小鼠进行验证改善 AS 疾病。SC 干预及 MYH9 基因敲除能够显著改善高脂饮食诱导的 ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化病变, 减少斑块形成和脂质堆积, 并降低血管炎症和损伤蛋白的表达。此外, SC 通过抑制 NMMHC IIA 与 HSP70 的相互作用, 减少外泌体释放, 从而发挥抗 AS 作用。这些结果表明, SC 通过调控 MYH9 基因及其相关信号通路, 显著改善动脉粥样硬化病变。

综上所述, 本研究整合蛋白质组学和生物信息学方法来确定 MYH9(NMMHC IIA)是 SC 调节巨噬细胞囊泡释放的关键靶点, 研究了 SC 对巨噬细胞 NMMHC IIA 与 HSP70 相互作用的影响改善 AS 机制探究。揭示了 SC 防治 AS 性心血管疾病的作用靶点、特色与信号途径, 为 SC 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, 也为中药活性成分干预蛋白-蛋白相互作用调控疾病研究提供方法学借鉴。

关键词: NMMHC IIA, 外泌体, 蛋白质组学, 五味子丙素, 动脉粥样硬化

MECHANISMS OF EXOSOME SECRETION MEDIATED BY
SCHISANDRA C BY INTERFERING WITH THE INTERACTION
BETWEEN NMMHC IIA AND HSP70 IN THE PREVENTION
AND TREATMENT OF ATHEROSCLEROSIS

ABSTRACT

Atherosclerosis (AS) is one of the most common cardiovascular diseases characterised by chronicity and multiple pathogenic factors, and underlies major cardiovascular diseases such as coronary heart disease and stroke. Current diagnostic tools and lipid tests have limitations in early detection and prevention. Exosomes and microRNAs (miRNAs) play key roles in intercellular communication and gene regulation, among which the expression level of NMMHC IIA is closely related to the progression of AS. In addition, NMMHC IIA is also a potential target for the treatment of diseases by traditional Chinese medicine (TCM), and the active ingredients in TCM can regulate NMMHC IIA and its interacting proteins, thus exerting therapeutic effects on diseases. *Schisandra chinensis* is the dried fruit of *Schisandra chinensis* Turcz. Baill. Schizandrin C (SC) is a biphenyl cyclooctadiene lignan isolated from *Schisandra chinensis*, which is rich in antioxidant, anti-inflammatory, antitumour and cardiovascular protective pharmacological effects. Recent

studies have shown that SC has potential applications in the treatment of AS. In view of this, the present study revealed that MYH9 (NMMHC IIA) is a key target of SC to regulate macrophage vesicle release and in vivo cellular experiments to examine the effects of Schisandrin on atherosclerosis by proteomic and bioinformatic approaches, and further explored the specific molecular mechanism of action of Schisandrin in the treatment of atherosclerosis based on in vivo knockdown of MYH9 gene. The main research content is as follows:

(1) Through proteomics and bioinformatics methods on To explore the target protein regulation of foam cell release mechanism research. The mainly integrated proteomics and bioinformatics methods, using proteomics analysis of Control group, ox-LDL group and ox-LDL + SC group, in-depth analysis of the function of the differential proteins. Comprehensive differential protein analysis, we identified a total of 6152 proteins, and we screened 423 up-regulated proteins and 648 down-regulated proteins by $FC > 2$ -fold and $P\text{value} < 0.05$. 54 up-regulated proteins and 302 down-regulated proteins were found after SC treatment. Among them, 25 up-regulated proteins and 32 down-regulated proteins showed overlapping in Venn diagram analysis, and further PPI analysis using the STRING database (<https://www.string-db.org/>) revealed that MYH9 (NMMHC IIA) is a key target of SC to regulate macrophage vesicle release, and this finding provides a new perspective for exosome research in AS This finding provides a new perspective for exocytosis research in AS.

(2) Under AS pathological conditions, exosome release was identified by

co-localisation assay to detect the expression of exosome marker protein TSG101, which showed that SC inhibited exosome release behaviour by interfering with foam cells. Immunoprecipitation-silver staining-mass spectrometry and immunoblotting results showed that the NMMHC IIA-interacting protein was HSP70. In order to explore the interaction of SC on NMMHC IIA and HSP70 to jointly regulate exosome release, immunoblotting was performed on cellular proteins as well as exosome proteins in the supernatant, and the results suggested that under the action of drugs, it was hypothesised that SC could inhibit the expression of NMMHC IIA to affect the production of HSP70 and inhibit the release of exosomes. Further interference with the target protein NMMHC IIA, using immunofluorescence co-localisation and immunoblotting assays, showed inhibition of exosome release. The study showed that NMMHC IIA and HSP70 can regulate the release of exosomes through interaction, and this finding provides an important theoretical basis and potential strategy for the early treatment and prevention of AS disease.

(3) To explore the protective effect of SC and its regulation of MYH9 knockdown on AS and its mechanism. In vitro ELISA and immunoblotting experiments on cardiovascular endothelial injury by foam cell-derived exosomes showed that SC significantly inhibited the inflammatory response and injury induced by foam cell-derived exosomes in HUVECs, and reduced the expression of the inflammatory factors $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, and the adhesion molecules MCP-1, ICAM-1, and VCAM-1. Meanwhile, SC inhibited the release of exosomes by regulating the NMMHC IIA-HSP70 interaction, thereby

attenuating endothelial cell injury. In vivo experiments further confirmed that the improvement of AS disease was verified by constructing ApoE^{-/-} NC group, ApoE^{-/-} model group, ApoE^{-/-} administration group, MYH9^{+/-} ApoE^{-/-} model group, and MYH9^{+/-} ApoE^{-/-} administration group of mice. The SC intervention and the MYH9 knockdown were able to significantly ameliorate the high-fat diet-induced ApoE^{-/-} mice with atherosclerotic lesions, reduced plaque formation and lipid accumulation, and decreased the expression of vascular inflammatory and damaging proteins. In addition, SC exerted anti-AS effects by inhibiting the interaction of NMMHC IIA with HSP70 and reducing exosomal release. These results suggest that SC significantly ameliorates atherosclerotic lesions by regulating the MYH9 gene and its associated signalling pathways.

In summary this study integrated proteomics and bioinformatics approaches to identify MYH9 (NMMHC IIA) as a key target of SC to regulate macrophage vesicle release, and investigated the effect of SC on macrophage NMMHC IIA-HSP70 interaction to improve the exploration of AS mechanisms. The target, characteristics and signalling pathway of SC against AS cardiovascular disease were revealed, providing new research direction and ideas for the interpretation of the microbiological basis of SC against cardiovascular disease, as well as methodological reference for the study of active ingredients of traditional Chinese medicine intervening in protein-protein interactions to regulate disease.

KEY WORDS: NMMHC IIA, exosome, proteomics, Schisandrin C,

atherosclerosis

目录

摘要	I
ABSTRACT	IV
第 1 章 绪论	5
1.1 动脉粥样硬化疾病研究进展	5
1.1.1 巨噬细胞形成与动脉粥样硬化	5
1.1.2 泡沫细胞形成与动脉粥样硬化	6
1.1.3 炎症反应与动脉粥样硬化	6
1.1.4 内皮细胞损伤与动脉粥样硬化	7
1.1.5 平滑肌细胞增生与动脉粥样硬化	7
1.2 外泌体囊泡	7
1.2.1 细胞外囊泡与心血管疾病	8
1.2.2 细胞外囊泡在心血管疾病的发生与进展	8
1.2.3 细胞外囊泡在心血管疾病的诊断与治疗	9
1.2.4 细胞外囊泡在心血管疾病的应用	10
1.3 五味子及五味子丙素概述	10
1.3.1 五味子	10
1.3.2 五味子丙素	11
1.4 研究目的及意义	11
第 2 章 综合蛋白质组学和生物信息学方法预测五味子丙素调控巨噬细胞 囊泡释放的关键靶点	13
2.1 引言	13
2.2 实验材料	14
2.2.1 实验试剂	14
2.2.2 实验仪器	15
2.3 泡沫细胞体外模型的建立	15
2.3.1 细胞培养	15

2.4 外泌体的收集及表征鉴定	17
2.4.1 超滤法收集上清液中的 exosome	17
2.4.2 外泌体的形态电镜鉴定	17
2.4.3 外泌体粒径检测	17
2.4.4 外泌体表面标志性蛋白检测	17
2.5 生物信息学分析方法	19
2.5.1 样品制备	19
2.5.2 directDIA 数据采集	19
2.5.3 分析流程	20
2.5.4 蛋白质定性定量分析	20
2.5.5 差异表达蛋白聚焦分析	21
2.5.6 生物功能 GO 及 KEGG 通路分析	21
2.5.7 构建蛋白质与蛋白质相互作用网络分析	21
2.6 统计学方法	21
2.7 结果与分析	21
2.7.1 建立 PMA 诱导 THP-1 细胞转化为巨噬细胞形态学变化	21
2.7.2 SC 对 THP-1 细胞活性的影响	22
2.7.3 油红 O 染色观察脂肪堆积	22
2.7.4 外泌体表征鉴定	23
2.7.5 差异表达的蛋白质生物信息的分析	24
2.8 本章小结	28
第 3 章 NMMHC IIA-HSP70 相互作用对巨噬细胞外泌体释放的调控作用及五味子丙素的干预研究	30
3.1 引言	30
3.2 实验材料	31
3.2.1 实验试剂	31
3.2.2 实验仪器	32
3.3 泡沫细胞体外模型的建立	32
3.3.1 细胞培养	32

3.3.2 细胞分组及给药	33
3.4 SC 干预 NMMHC IIA-HSP70 相互作用调节巨噬细胞中外泌体的释放	33
3.4.1 免疫荧光共定位观察外泌体释放行为	33
3.4.2 免疫共沉淀联合质谱研究蛋白互作	33
3.4.3 Western blot 法检测细胞与上清液中相关蛋白表达水平	35
3.4.4 干扰 NMMHC IIA 后与 HSP70 相互作用调节巨噬细胞外泌体的释放	35
3.5 统计学方法	36
3.6 结果与分析	36
3.6.1 免疫荧光法观察 SC 干预泡沫细胞对外泌体释放行为的影响	36
3.6.2 免疫共沉淀联合质谱研究 NMMHC IIA 相互作用蛋白 HSP70	37
3.6.3 Western blot 法检测五味子丙素通过 NMMHC II 和 HSP70 相互作用调控外泌体释放	39
3.6.4 五味子丙素通过干扰 NMMHC IIA 后与 HSP70 相互作用调节巨噬细胞外泌体的释放	40
3.6.4.1 siNMMHC IIA 干扰效率检测	40
3.7 本章小结	42
第 4 章 五味子丙素对敲除 MYH9 基因改善动脉粥样硬化机制研究	44
4.1 引言	44
4.2 实验材料	45
4.2.1 实验试剂	45
4.2.2 实验仪器	46
4.3 五味子丙素调控 exosome-siNMMHC IIA 保护 ox-LDL 诱导的 HUVECs 损伤研究	46
4.3.1 细胞培养	46
4.3.2 细胞分组及给药	47
4.3.3 ELISA 检测泡沫细胞源外泌体对 HUVECs 上清液炎症因子的表达情况 ..	47
4.3.4 PKH-67 检测对泡沫细胞释放的外泌体追踪研究	48
4.3.5 Western blot 法检测五味子丙素对 ox-LDL 诱导的 HUVECs 损伤的研究 ..	48
4.4 五味子丙素调控 MYH9 基因敲除小鼠动脉粥样硬化损伤研究	48
4.4.1 MYH9+Apoe-KO 小鼠的构建	48

4.4.2 动物实验分组及造模	48
4.4.3 动物样本采集	49
4.4.4 动物体重变化	49
4.4.5 多普勒超声评估小鼠血流速度	49
4.4.6 血管组织病理学观察 HE 染色	49
4.4.7 血管组织油红 O 染色	50
4.4.8 免疫荧光法观察 NMMHC IIA 和 TSG101 共定位观察外泌体释放行为 ..	50
4.4.9 Western blot 法检测 MYH9+Apoe-KO 小鼠 NMMHC IIA 与 HSP70 的表达	50
4.4.10 Western blot 法检测 MYH9+Apoe-KO 小鼠损伤蛋白的表达	50
4.5 统计学方法	50
4.6 结果与分析	50
4.6.1 五味子丙素调控泡沫细胞源外泌体保护 ox-LDL 诱导的 HUVECs 损伤研 究	50
4.6.1.2 PKH-67 检测对泡沫细胞释放的外泌体追踪 HUVECs 研究	51
4.6.2 五味子丙素调控 MYH9 基因敲除小鼠动脉粥样硬化损伤研究	52
4.6.2.1 高脂喂养及五味子丙素对小鼠体质量的影响	52
4.6.2.2 多普勒超声评估小鼠血流速度	53
4.6.2.3 五味子丙素调控 MYH9 基因敲除小鼠血管组织病理学观察 HE 染色 ..	54
4.6.2.4 五味子丙素调控 MYH9 基因敲除小鼠血管组织脂质堆积观察	54
4.7 本章小结	57
第 5 章 总结与展望	59
5.1 结论	59
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 动脉粥样硬化疾病研究进展

动脉粥样硬化(Atherosclerosis, AS)是一种最常见的具有慢性以及多种发病因素为特征的心血管疾病,同时也是冠心病和中风等主要心血管疾病的发病基础,严重威胁着人类健康^[1]。其发生及发展是一个复杂的病理过程,一般认为是脂质沉积与动脉壁内炎症反应协同作用的结果^[2]。其主要特征为血管内膜形成纤维斑块或粥样斑块,多累及大动脉和中等动脉,导致管壁变硬、管腔狭窄以及弹性减弱,进而引发相应器官的缺血性改变^[3]。机体在长期受高血压、糖尿病、高脂血症、吸烟等高危因素影响下,血管内皮受损,血液中的低密度脂蛋白沉积于内皮下,氧化成氧化低密度脂蛋白(ox-LDL),促使单核巨噬细胞浸润并转化为泡沫细胞,释放炎症因子,多层次体现了 AS 发生发展机制的复杂性^[4,5]。近年来,随着生活方式的改变和人口老龄化的加剧,AS 的发病率呈上升趋势,对其研究也愈发深入^[6]。因此,深入了解导致斑块形成和破裂的细胞和分子机制,对于开发新的治疗干预措施以应对这一全球性健康挑战至关重要。

1.1.1 巨噬细胞形成与动脉粥样硬化

巨噬细胞在 AS 的发生发展过程中发挥着极为关键的作用,是这一病理进程中的核心参与者^[7]。在动脉壁内皮下间隙里,巨噬细胞与单核细胞全程参与 AS 的各个阶段^[8]。在 AS 形成初期,单核细胞会迁移至内皮下,进而分化为巨噬细胞,这些巨噬细胞会吞噬氧化低密度脂蛋白,逐渐转变为泡沫细胞^[7]。具体来说,巨噬细胞在摄取过量的 LDL 后,细胞内脂质含量急剧上升,逐渐转化为泡沫细胞,这是动脉粥样硬化早期病变脂纹形成的主要标志^[9]。有研究显示,受到 ox-LDL 刺激的巨噬细胞会分泌出富含特定微小核糖核酸(miRNA)的外泌体(Exo),这些 miRNA 能够对受体细胞内的特定靶标蛋白发挥调节作用,从而推动 AS 的发生与发展^[10]。在 AS 进入晚期时,巨噬细胞会分泌多种炎症因子与基质金属蛋白酶(MMP),这些物质会对纤维帽中的胶原蛋白发起破坏,同时促使平滑肌细胞走向死亡,进而加剧斑块的不稳定性^[11]。有研究显示,巨噬细胞通过胞吐作用能够有效清除死细胞,这一过程对于预防继发性坏死意义重大,从而开启了 AS 的病理进程^[12]。

1.1.2 泡沫细胞形成与动脉粥样硬化

泡沫细胞的形成与脂质代谢紊乱之间存在着紧密关联,主要表现为细胞摄取脂质和胞内胆固醇酯化增加,胆固醇水解和外排减少^[13]。泡沫细胞的大量堆积,是动脉粥样硬化早期病变脂纹形成的主要特征,具体来说,随着泡沫细胞不断增多,它们会进一步释放多种细胞因子和炎症介质,吸引更多的炎症细胞如单核细胞、T淋巴细胞等聚集到病变部位^[14]。这些炎症细胞的持续浸润,使得炎症反应不断放大,促进纤维结缔组织增生,进而形成纤维斑块,随着病程的发展,纤维斑块内部的泡沫细胞发生坏死、崩解,释放出大量的胆固醇结晶和细胞碎片,形成粥样物质,最终发展为动脉粥样斑块^[15]。近年来研究发现,泡沫细胞还能产生大量外泌体,这些纳米级囊泡携带蛋白质、脂质和核酸等生物活性分子,参与细胞间通讯,调控炎症反应、血管功能以及斑块稳定性^[16]。因此,泡沫细胞及其外泌体在动脉粥样硬化的病理生理过程中扮演着重要角色,深入研究其机制将为疾病防治提供新的思路和靶点。

1.1.3 炎症反应与动脉粥样硬化

动脉粥样硬化是一种慢性炎症性疾病,其发生和发展与炎症反应的持续激活密切相关^[17]。炎症反应贯穿动脉粥样硬化的整个病程,是动脉粥样硬化发生发展的关键驱动因素^[18]。具体来说,在动脉粥样硬化早期,巨噬细胞摄取大量氧化修饰的低密度脂蛋白(ox-LDL)转化为泡沫细胞,泡沫细胞又会分泌一系列促炎细胞因子和炎症介质,如肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1(IL-1)、白细胞介素-6(IL-6)等^[19]。这些炎症因子一方面可以激活内皮细胞,使其持续表达黏附分子,招募更多炎症细胞,另一方面能够刺激平滑肌细胞增殖并向内膜下迁移,同时促使细胞外基质合成增加,共同推动病变向纤维斑块发展^[20]。随着病情进展,炎症反应持续加剧,同时,炎症细胞还会浸润到斑块肩部,这是斑块最薄弱的部位,炎症的浸润使得斑块肩部的稳定性进一步下降^[21]。一旦纤维帽破裂,斑块内的促凝物质暴露,就会迅速激活凝血系统形成血栓,引发急性心血管事件,如急性心肌梗死、脑卒中等^[22]。炎症反应在动脉粥样硬化的起始、发展以及急性事件的触发中都起着核心作用,对其深入研究炎症反应机制,有望为动脉粥样硬化的防治提供新的靶点和治疗策略。

1.1.4 内皮细胞损伤与动脉粥样硬化

动脉粥样硬化的发生与血管内皮细胞损伤密切相关,内皮功能障碍被认为是疾病的始动环节^[23]。研究发现,在高胆固醇血症、高血压、糖尿病和吸烟等危险因素的作用下,内皮细胞受到氧化应激、剪切力异常和炎症因子的刺激,导致其屏障功能和抗炎特性受损^[24]。受损的内皮细胞表达黏附分子(如VCAM-1和ICAM-1)并分泌趋化因子(如MCP-1),招募单核细胞进入内膜,启动动脉粥样硬化病变^[25]。此外,研究还表明,内皮细胞损伤会促进血管通透性增加,使低密度脂蛋白(LDL)更容易渗入内膜并被氧化,进一步加剧炎症反应和斑块形成^[26]。因此,内皮细胞损伤不仅是动脉粥样硬化的早期事件,也是疾病进展的关键驱动因素,针对内皮保护的治疗策略可能为动脉粥样硬化的防治提供新的方向。

1.1.5 平滑肌细胞增生与动脉粥样硬化

在动脉粥样硬化的复杂发病机制中,平滑肌细胞增生是一个不可忽视的重要环节,与炎症反应、脂质代谢紊乱等因素相互交织,共同推动着动脉粥样硬化的发展^[27]。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^[28]。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,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^[29]。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,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^[30,31]。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。

1.2 外泌体囊泡

外泌体和 microRNAs(miRNAs)是近年来生物医学领域的两个重要研究热点,它们在细胞间的通信和基因调控中发挥着关键作用^[32]。2024 年诺贝尔生理学或医学奖授予维克多·安布罗斯和加里·鲁夫昆,以表彰他们发现 mirna 及其在转录后基因调控中的作用^[33]。外泌体是由细胞释放到细胞外液的纯天然纳米级生物囊泡,具有双层膜结构,直

径在 50-200 nm 之间, 包含脂质、蛋白质、DNA、mRNA 和 miRNA 等多种生物分子, 广泛存在于人体的体液和组织液中^[34]。外泌体源于细胞中的早期核内体, 在早期核内体成熟为晚期核内体的过程中内体膜向内凹陷形成多泡体, 多泡体含有许多腔内囊泡, 并能够通过溶酶体或质膜融合的方式将这些囊泡释放至细胞外, 这些被释放的腔内囊泡即为外泌体^[35]。最初外泌体被认为是细胞“碎片”, 后来研究证明外泌体可通过运输细胞间信号分子从而在细胞通讯中发挥关键作用, 并与微囊泡, 凋亡小体等生物微粒同属生物囊泡研究范畴^[36]。近年来, 积极分泌的外泌体 miRNAs 参与各种疾病的诊断和调控的研究已成为一个热点方向。研究表明外泌体在免疫调节、肿瘤转移、神经退行性疾病和心血管疾病中发挥重要作用^[37]。特别是在心血管领域, 外泌体被发现能够介导血管内皮细胞、平滑肌细胞和巨噬细胞之间的相互作用, 影响动脉粥样硬化、心肌梗死和心力衰竭等疾病的发展^[38]。因此, 外泌体不仅是疾病诊断的生物标志物, 也是潜在的治疗靶点和药物递送载体, 具有重要的研究和临床应用价值。

1.2.1 细胞外囊泡与心血管疾病

心血管系统是外泌体介导细胞间通讯的关键场所, 这些纳米级囊泡通过运输生物活性物质作用于局部或远端的靶细胞, 在维持心血管稳态和病理过程中发挥重要作用^[39]。研究表明, 细胞外囊泡通过其携带的核酸、蛋白质和脂质等分子调控靶细胞功能, 为心血管疾病的发病机制提供了新的视角^[40]。在动脉粥样硬化进程中, 多种细胞来源的细胞外囊泡参与疾病的发生与发展^[41]。内皮细胞衍生的囊泡可转运 miRNA 等调控分子, 影响平滑肌细胞的增殖、迁移和表型转化, 在血管重塑中起关键作用^[42]。当内皮屏障受损时, 这些囊泡可能携带损伤相关分子模式(DAMPs), 激活免疫细胞并放大炎症级联反应, 从而加速动脉粥样硬化进程^[42]。巨噬细胞来源的囊泡在炎症微环境中同样具有重要功能。活化的巨噬细胞释放的囊泡富含促炎因子和趋化因子, 这些信号分子通过旁分泌或内分泌方式被邻近细胞摄取, 形成复杂的炎症调控网络, 影响斑块稳定性^[10]。同时, 平滑肌细胞释放的囊泡通过调节细胞外基质的合成与降解, 参与血管壁的重塑过程^[28]。囊泡分泌异常可能导致基质代谢紊乱, 进而影响血管的结构完整性和功能特性^[43]。这些发现揭示了细胞外囊泡在动脉粥样硬化中的多重调控作用, 为疾病防治提供了新的思路。

1.2.2 细胞外囊泡在心血管疾病的发生与进展

细胞外囊泡在心血管疾病的发生与进展中发挥重要作用, 其通过携带蛋白质、脂质

和核酸等生物活性分子参与细胞间通讯,调控多种病理生理过程^[44]。内皮细胞来源的囊泡与血管炎症等微循环障碍密切相关,而T细胞衍生的外泌体则可通过磷脂酰丝氨酸识别单核细胞膜表面受体,诱导胆固醇堆积,促进动脉粥样硬化形成,在心肌梗死中,缺血再灌注损伤会触发内源性EVs的释放^[45]。有研究表明,心肌细胞来源的EVs富含miR-208a/b,其通过与RNA结合蛋白Quaking(QKI)结合,降低其表达,加剧心肌细胞的缺氧/复氧损伤^[46]。也有研究表明,急性心梗患者血清EVs中的miR-30a可通过调节自噬水平促进心肌细胞凋亡,而miR-486-5p和miR-182等miRNA则具有心脏保护作用,减轻缺血再灌注损伤^[47]。胚胎干细胞(ESC)来源的外泌体因其富含miR-294等分子,能够促进心肌细胞增殖、血管生成,抑制细胞凋亡和纤维化,从而改善急性心肌梗死后的心脏功能^[48]。在动脉粥样硬化性疾病中,内皮细胞衍生的囊泡可促进平滑肌细胞表型转换,而巨噬细胞来源的囊泡则通过传递促炎因子扩大炎症反应,此外,细胞外囊泡在心衰衰竭和高血压等疾病中也通过介导心肌肥厚、纤维化及血管重塑等过程参与疾病进展^[49]。研究表明,细胞外囊泡不仅可作为心血管疾病的潜在生物标志物,还可能成为新型治疗靶点或药物递送载体,为疾病的诊断和治疗提供了新的方向。这些发现揭示了细胞外囊泡在心血管疾病中的多重调控作用,为开发基于EVs的诊疗策略奠定了重要基础。

1.2.3 细胞外囊泡在心血管疾病的诊断与治疗

细胞外囊泡作为一种非侵入性生物标志物,在心血管疾病的早期筛查和诊断中具有重要价值,其携带的生物信息物质,尤其是RNA,为疾病检测提供了关键依据^[50]。研究表明,动脉粥样硬化患者血浆中内皮细胞来源的EVs水平显著升高,且其携带的miR-126和miR-92a与疾病严重程度密切相关;急性心肌梗死患者血清EVs中miR-208a和miR-30a的表达水平也发生显著变化,为早期诊断提供了潜在标志物^[51, 52]。此外,通过液体活检技术从血液、尿液、体液中分离EVs,可实现心血管疾病的动态监测和预后评估^[53]。例如,急性冠脉综合征(ACS)患者血清中肌特异性miR-133a水平升高,且与肌钙蛋白T(cTnT)水平相关;血液中膜微粒与内皮祖细胞的比值(MPs/EPCs)也能反映ACS中内皮细胞凋亡与修复的动态平衡^[54]。在治疗领域,EVs因其低免疫原性、良好的生物相容性以及易于穿透生物膜的特性,成为理想的药物递送载体,间充质干细胞(MSCs)来源的EVs通过传递miR-210和miR-132等分子,促进血管生成和心肌修复,在心肌梗死和心力衰竭治疗中展现出显著疗效^[55]。胚胎干细胞(ESC)衍生的EVs富含miR-294,

能够诱导心肌保护反应,促进心肌细胞增殖并抑制凋亡^[56]。此外,工程化改造的 EVs 可通过靶向递送 siRNA、抗炎药物或促血管生成因子,精准调控疾病进程,例如,过表达 HIF-1 的心脏内皮细胞来源的 exosome 与心脏祖细胞联合输注,可提高移植细胞的存活率,改善心肌梗死损伤,这一作用主要归因于 exosome 中富含的 miR-126 和 miR-210^[57]。尽管细胞外囊泡在心血管疾病的诊断与治疗中展现出广阔前景,但其临床应用仍面临诸多挑战,如标准化生产、靶向递送效率和大规模制备等问题。未来需要进一步研究以优化 EVs 的分离、检测和工程化技术,推动其在精准医学中的应用,为心血管疾病的早期干预和个性化治疗提供新策略。

1.2.4 细胞外囊泡在心血管疾病的应用

计算机断层扫描(CT)血管造影在血管病变诊断中具有重要价值^[58]。近期研究开发了一种护肾 CT 血管造影囊泡,不仅具备优异的血管成像效果,还能显著降低造影剂肾病风险^[59]。该囊泡通过三重机制实现肾脏保护:首先,其疏水膜层将碘原子包埋,减少碘与体内环境的直接接触,从而降低过敏反应和细胞毒性;其次,较低的渗透压和延长的体内循环时间(可达 30 分钟,远超传统碘小分子造影剂的 5 分钟)减轻了肾脏血流动力学负担,避免因短时间内代谢大量造影剂造成的损伤;最后,囊泡能够原位清除活性氧,降低肾脏氧化应激水平,进一步保护肾功能^[60]。实验表明,该囊泡在 CT 血管造影中能有效保护肾脏,且体外酶解实验显示其在 48 小时内降解率可达 80%,展现了良好的生物可降解性^[61]。

1.3 五味子及五味子丙素概述

1.3.1 五味子

五味子[*Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill.],为木兰科植物五味子的干燥成熟果实,属于五味子科五味子属,是一种传统中药,最早收载于《神农本草经》上品中药,五味子的药用部位主要包括果实、藤茎和枝叶,研究表明其富含木脂素、多糖、芳香油及三萜类化合物等多种活性成分^[62]。这些成分赋予其广泛的药理作用,使其在药物开发和利用领域具有重要潜力^[63]。它被认为具有镇静安神、增强气力以及抗肿瘤等功效,常用于治疗肺虚咳嗽、气虚乏力、肾虚遗精、失眠健忘等症状^[64]。目前有研究表明,五味子含有多重活性成分,如五味子素、五味子甲素、五味子乙素、五味子丙素等,这些活性成

分共同赋予了五味子多种药理作用，如抗氧化、心血管保护、抗炎、抗肿瘤、增强免疫力和神经保护等，使其在传统医学和现代药物开发中具有重要价值^[65]。

总的来说，近年来，随着天然药物研究的深入，五味子在心血管保护、神经保护、抗衰老以及代谢性疾病治疗中的潜力也逐渐被发掘。其多方面的生物活性使其成为连接传统医学与现代医学的重要桥梁，为开发新型天然药物提供了广阔的研究空间。

1.3.2 五味子丙素

五味子丙素是(Schisandrin C, SC)一种从五味子中分离得到的联苯环辛二烯类木脂素，近年来因其显著的抗氧化、抗炎、抗凋亡及心血管保护作用等多种药理活性受到广泛关注^[66]。其作为一味传统中药在临床上得到广泛的应用，在《中国药典》中，将其作为其质量标准。在其药理作用的研究中，抗氧化研究表明 SC 通过清除自由基、抑制脂质过氧化和增强细胞内抗氧化酶活性发挥抗氧化作用。SC 能够激活 Nrf2/ARE 信号通路，上调抗氧化酶(如超氧化物歧化酶 SOD 和谷胱甘肽过氧化物酶 GSH-Px)的表达，从而减轻氧化应激损伤^[67]。SC 在 AS 的治疗中具有潜在的应用价值，有研究提示 SC 可以通过增强内皮型 eNOS 的活性，促进 NO 的生成，从而改善内皮细胞功能，维持血管舒张功能^[68]。在抗炎方面已有研究证实，SC 通过抑制 NF- κ B 信号通路和降低促炎因子(如 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β)的表达，发挥抗炎作用^[69]。发现 SC 能够显著缓解血管紧张素 II 诱导的小鼠炎性反应和心肌重构^[70]。此外，SC 还能调节脂质代谢，降低血脂水平，减少动脉粥样硬化斑块的形成^[71]。

总的来说，SC 作为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。其在心肌缺血再灌注损伤、动脉粥样硬化和心力衰竭等心血管疾病中展现出广阔的应用前景。随着研究的深入，SC 有望成为心血管疾病治疗的重要天然药物成分，为相关疾病的防治提供新的策略

1.4 研究目的及意义

AS 是一种由脂质沉积、炎症反应等因素共同引起的慢性血管疾病，AS 的早期阶段通常由内皮细胞损伤或功能障碍触发，导致低密度脂蛋白(LDL)，特别是 ox-LDL 在动脉内膜中沉积，并诱导巨噬细胞向泡沫细胞转化，这是 AS 进化的关键环节^[72]。近年来的研究越来越强调了内皮细胞(ECs)在 AS 发病机制中的中心地位，而血管内皮损伤被

认为是 AS 发生发展的关键触发因素^[23]。外泌体囊泡在细胞间通信和基因调控中起着关键作用，其中 MYH9 的表达水平与 AS 的进展密切相关。本研究重点深入研究了 NMMHC IIA 在细胞囊泡的分泌、运输和胞质胞吐作用中的关键作用正在受到关注。我们的蛋白质组学分析显示，SC 处理后存在显著的差异蛋白变化，而 NMMHC IIA 是差异蛋白之一，提示它可能是 SC 调节外泌体释放的潜在关键靶蛋白。关于 AS 中 NMMHC IIA 的调控的报道有限。在本研究中，免疫共沉淀和共定位实验显示，NMMHC IIA 与 HSP70 相互作用，共同调节外泌体释放。HSP70 作为外泌体膜上的热休克蛋白，可以与囊泡膜蛋白和陷阱蛋白相互作用，作为分子伴侣，促进囊泡与靶膜的融合，并在突触释放过程中调节外泌体的释放。此外，HSP70 可以参与外泌体中的蛋白质折叠和稳定。我们的研究表明，NMMHC IIA 和 HSP70 可以通过相互作用共同调节细胞外泌体的释放，这一发现为 AS 的外泌体研究提供了新的视角。深入阐释五味子丙素通过调节外泌体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与调控途径，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 综合蛋白质组学和生物信息学方法预测五味子丙素调控

巨噬细胞囊泡释放的关键靶点

2.1 引言

心血管疾病作为威胁人类健康最主要的疾病之一，仍然是具有较高的发病率和死亡率，特别是在发展中国家^[73]。一般对于心血管疾病的医疗策略是有效的早期诊断，理想的治疗靶点和合理的预后检测^[74]。蛋白质组学作为一门强大的生物信息学技术，在探索多成分复杂体系对机体多靶点活性作用方面具有独特优势^[75]。蛋白质组学被认为是表征生物学系统的最相关的数据集，已被广泛用于揭示致病机制、寻找特异性生物标志物、发现新治疗靶点，以及与疾病的早期诊断、治疗和预后判断关系密切^[76]。

外泌体(Exosomes)在体内广泛存在，获取较为便捷，在精准医学方面拥有巨大的潜力^[77]。近年来的深入研究表明，外泌体通过清除细胞内废物，维持细胞内稳态，介导细胞间和器官间的通信，在各种病理和生理过程中发挥着重要作用^[77]。外泌体，又称腔内囊泡(ILVs)，是一种直径为 50-200 nm 的脂质双层结构囊泡，可由巨噬细胞、肝细胞、脂肪细胞等多种细胞分泌，并释放到细胞外液和体循环中^[78]。

已有越来越多的研究通过检测细胞来源外泌体蛋白质组的方法去寻找疾病相关生物标志物^[79]。国外学者通过蛋白质组技术筛选出差异蛋白，并对候选生物标志物进行验证，表明筛选的标志物在乳腺癌患者和健康人群中具有显著的差异分布^[80]。外泌体的释放量和释放速率依赖于细胞，并受到不同的细胞微环境和外部刺激的调节，例如，脂质诱导的信号传导导致肝细胞释放外泌体，雷帕霉素处理的细胞的外泌体释放受 mTORC1 负调控，转铁蛋白(Tf)以 Ca^{2+} 依赖的方式刺激 K562 细胞释放外泌体^[81]。

目前，巨噬细胞分泌外泌体蛋白质组学技术应用鲜有报道，本研究利用体外培养的人单核细胞 THP-1，用 ox-LDL 诱导的 THP-1 巨噬细胞样本出发，收集细胞样本，通过蛋白质组学技术分析观察调控巨噬细胞囊泡释放的关键靶点，结合已有的数据，应用生物信息学分析蛋白之间的相互关系，以阐明差异表达蛋白的功能，揭示了 SC 调控巨噬细胞囊泡释放的关键靶点，为了深入研究 SC 如何通过调节靶蛋白来调节外泌体的释放，同时对 AS 的早期预防和疾病进展的分子基础提供新思路。

2.2 实验材料

2.2.1 实验试剂

表 2-1 实验试剂

Table2-1 Experimental reagents

主要试剂	厂家
RPMI 1640 培养基	赛默飞世尔科技公司
4%多聚甲醛	上海碧云天生物技术有限公司
MYH9 antibody	武汉三鹰生物技术有限公司
CD9 antibody	武汉三鹰生物技术有限公司
CD81 antibody	艾比玛特生物医药有限公司
β -actin antibody	武汉三鹰生物技术有限公司
油红 O 染色试剂	上海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
ECL 发光显影液	诺唯赞生物科技股份有限公司
CCK8	南京翼飞雪生物科技有限公司
RIPA 裂解液	上海碧云天生物技术有限公司
SDS	上海麦克林生化科技有限公司
SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液	上海碧云天生物技术有限公司
Tris	上海麦克林生化科技有限公司
二甲基亚砷	国药集团化学试剂有限公司
甘氨酸	上海麦克林生化科技有限公司
过硫酸铵	上海麦克林生化科技有限公司
特级南美胎牛血清	苏州双洙生物科技有限公司
青链霉素-新霉素三抗	上海逍鹏生物科技有限公司
磷酸盐缓冲液(PBS), pH7.4	塞维尔生物科技有限公司
CD63 Proteintech	成都正能生物技术有限公司
多聚赖氨酸	Biosharp
细胞冻存液	新赛美生物科技有限公司
通用型抗体稀释液	苏州新赛美生物技术有限公司

2.2.2 实验仪器

表 2-2 实验仪器

Table2-2 The list of experimental reagents and instruments

仪器名称	厂家
-80 °C低温冰箱	Thermo Fisher
超纯水仪	Sartorius
超净台	Farma Scientific
蛋白质凝胶电泳仪	Biorad
二氧化碳恒温箱	Thermo Fisher
分析天平	Sartorius
高速冷冻离心机	Sartorius
接触式化学发光成像仪	上海易亨特
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
超滤离心管	德国 Sartorius 公司
HH-2 恒温水浴锅	江苏荣华仪器制造有限公司
JIMBIO iCytal 细胞计数仪	江苏卓微生物科技有限公司
灭菌锅	Zealway
Infinite200 酶标仪	瑞士 Tecan 公司
NTA 纳米颗粒跟踪仪	德国 Particle Metrix
制冰机	Grant

2.3 泡沫细胞体外模型的建立

2.3.1 细胞培养

2.3.1.1 细胞复苏

从-80 °C冰箱中取出装有 THP-1 细胞的冻存管，放置在 37 °C水浴锅中速融后，向冻存管中加入 1 ml 含有 15%的特级南美胎牛血清和 1%的青链霉素-新霉素三抗的 RPMI-1640 培养基，反复轻轻吹打均匀后，1100 rpm 离心 4 min。弃去上清后，加入 1 mL 完全培养基至沉淀中，轻轻吹打混匀，将混悬液铺在 T25 细胞培养瓶内，加入 3 mL 完全培养基摇匀，置于在 37 °C和 5% CO₂ 条件下在培养箱中培养。

2.3.1.2 细胞传代

将 THP-1 单核细胞在含有 15%的特级南美胎牛血清和 1%的青链霉素-新霉素三抗的 RPMI-1640 培养基中培养, 在 37 °C和 5%CO₂ 条件下在培养箱中培养, 待细胞铺满培养瓶中 80%-90%时, 将细胞转至 10 mL 离心管中, 1100 rpm 的离心 4 min。弃上清, 加入 1 mL 完全培养基至沉淀中, 将细胞接种到新的培养瓶中(1:3 传代)。

2.3.1.3 细胞冻存

取长满培养瓶中 80%-90%THP-1 单核细胞, 将细胞转至 10 mL 离心管中, 1100 rpm 的离心 4 min。弃上清, 加入 0.8 mL 无血清冻存液, 轻轻吹打混匀。然后分装于冻存管中(1 mL/管), 做好标记后立即放入-80 °C冰箱中保存。

2.3.1.4 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 10 μ L CCK8, 培养箱继续孵育 4 h 后, 设置 OD 值为 450 nm, 进行吸光度的测量。并按以下公式计算细胞活力。

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

2.3.1.5 实验分组及给药

将细胞随机分为 3 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; 五味子丙素处理给药组: 经 PMA 诱导以无血清 1640 培养基内加入 1 μ M 的五味子丙素 1 h 后, 加经终浓度为 100 μ g/mL 的 ox-LDL 处理。细胞于 37 °C、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。

2.3.1.6 PMA 诱导 THP-1 细胞成巨噬细胞

将 1ml 多聚赖氨酸铺满提前准备好的小皿的皿底(多聚赖氨酸: 无菌水=1:9), 静置 10 min, 吸干后, 至于超净台打开吹风按钮, 照一夜紫外。从 37 °C、5%CO₂ 培养箱取出长至 80%-90%THP-1 细胞, 取 1×10^6 个细胞铺至小皿, 经终浓度 100 ng/mL PMA 诱导 24 h, 观察细胞的形态学改变。

2.3.1.7 油红 O 染色鉴定脂肪堆积

取出小皿后, 缓慢吸取细胞上清液, 用 PBS 洗涤一次。加入适量染色洗涤液覆盖细胞 20 s, 吸除染色洗涤液, 取适量改良油红 O 染色液, 染色 15 min 后, 去除改良油红 O 染色液, 加入适量染色洗涤液, 静置 30 s, 然后去除染色洗涤液, 并用 PBS 洗涤 20 s, 加入适量 PBS, 均匀覆盖细胞, 染色完成后, 在显微镜下观察泡沫细胞内脂滴的

染色状况并拍照。

2.4 外泌体的收集及表征鉴定

2.4.1 超滤法收集上清液中的 exosome

参考文献方法进行如下提取^[82]:

(1)造模 48 h 后, 收集上述泡沫细胞上清液约 50 mL, 分别装入 5 个 10 mL 的离心管中, 并置于温度为 4 °C 下离心机中, 1100 rpm/min, 离心 30 min, 弃去剩余细胞沉淀。

(2)再次将上清移至 15 mL、100 kD 超滤管中, 转速为 4500 rpm/min, 40 min 每次, 重复三次, 待超滤至 20-50 μ L, 再加入 PBS 再次超滤 3 次, 每次加入 150 μ L PBS。

(3)待超滤步骤结束后, 加入 0.2 mL PBS 溶液, 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 °C 的冰箱待处理。

2.4.2 外泌体的形态电镜鉴定

实验方法参考文献进行 exosome 的处理^[83]:

(1)外泌体固定: 将外泌体悬液与固定液按 1 : 1 至 3 的比例混合, 然后在室温下固定 10-20 min。

(2)载体准备: 将固定后的混合物滴于载体(如铜网)上, 覆盖一层疏水膜以均匀分布。

(3)负染色与干燥: 使用 2%醋酸双氧铀对载体上的外泌体样本进行负染, 然后进行干燥处理。

(4)透射电镜观察: 将干燥后的样品用于透射电镜的观察, 通过高电压和强磁场条件来获取外泌体的高分辨率图像。

2.4.3 外泌体粒径检测

采用 Zetasizer (Nano series) Nano-ZS90 粒度仪进行外泌体的粒径检测, 取 exosome, 加入 PBS 溶液稀释至 100 倍, 轻轻吹打均匀后, 根据说明取 100 μ L 稀释后的样品加入加样板中, 上机进行 exosome 的粒径检测。

2.4.4 外泌体表面标志性蛋白检测

2.4.4.1 外泌体蛋白提取

(1)从-80 °C 冰箱中取出预先冻存的外泌体样本，带样本溶解后加入 70 μ L 裂解液(RIPA 裂解液(A)：蛋白酶抑制剂：磷酸酶抑制剂：RIPA 裂解液(B)=100：2：2：1)，震荡混匀后放入 4 °C冰箱裂解 40 min，随后进行定量。

(2)取 96 孔板先加入 BCA(A 液：B 液=50：1)标曲，从样品中取出 2 μ L+18 μ L PBS+200 μ L BCA 加入每孔，随后放入 37 °C 烘箱中孵育 30 min，在酶标仪内，于 562 nm 的波长条件下对蛋白样品进行检测，而后依据预先绘制的标准曲线，对该蛋白样品的浓度数值展开计算。

(3)向余下的样品中添加 6 $\times$ Loading 试剂，随后进行短时间的离心操作。接着，将样品放置在 100 °C的环境中孵育 7 min，完成孵育后，把样品转移至温度为-20 °C的冰箱内进行保存。

2.4.4.2 Western blot 法检测标志性蛋白

(1)制胶：分离胶：制备 10%的下层分离胶缓慢加入固定好的板中至玻璃板顶端 1 cm 处。液面上填充蒸馏水进行胶面封闭，压平胶面防止空气浸入凝胶中，静置 45 min，等待其分层。堆积胶：用无菌滤纸吸去分离胶上方的蒸馏水，动作需谨慎避免触动分离胶。随后，将已配制好的上层堆积胶沿玻璃板缓慢注入，直至溶液开始溢出。接着，迅速且小心地插入梳子，过程中务必保证不混入气泡。完成插入后，静置 45 min，使堆积胶充分凝固。待时间一到，将电泳板小心放置于电泳缓冲液中，动作要轻缓，随后轻轻拔出梳子，准备后续电泳操作。

(2)上样：将电泳槽中加入电泳缓冲液，按照空白、模型、给药组蛋白样品，依次将蛋白样品连续添加至对应的泳道中，并且在蛋白样品前后泳道加入 1.8 μ L 和 1.5 μ L 的蛋白 Marker。

(3)跑胶：选择 80 V 恒压进行电泳，待两端蛋白 Marker 清晰分层后，转用 120 V 恒压，至溴酚蓝条带跑入底端后，停止电泳。

(4)转膜：标记目标蛋白的位置，滴加 Transfer 防止胶变干，然后小心撬开玻璃板，根据 Marker 的标记以及目标蛋白的位置，小心切下胶条，按照胶条的尺寸裁剪滤纸与 PVDF 膜，在 PVDF 膜上任意一面右上角标记，用甲醇活化 PVDF 膜 5 min 后浸泡 Transfer 中，从负极到正极按照“滤纸 $\times$ 4-凝胶-PVDF 膜-滤纸 $\times$ 4”顺序，卡紧膜板，转膜槽中加满 Transfer，至于 4 °C冰箱中，选择 200 mA 电流进行转膜，视目标蛋白分子量确定转膜的时间。

(5)封闭：取 TBST 溶液对 PVDF 膜进行 3 次洗涤操作，每次洗涤时长控制为 8 min；

洗涤完成后, 将 PVDF 膜放入含有 5%BSA 的溶液中, 在室温环境下, 置于摇床上震荡孵育 2 h。待孵育结束, 再次使用 TBST 溶液对 PVDF 膜进行 3 次清洗, 每一次清洗的时间同样保持在 8 min。

(6)一抗孵育: 用通用型抗体稀释液稀释一抗 CD9、CD63、CD81。往已封闭的 PVDF 膜上添加经过稀释处理的一抗溶液, 随后将其置于 4 °C 的环境中孵育过夜。次日, 小心翻动 PVDF 膜, 仔细检查膜的正面是否存在气泡。为了促使一抗与膜上物质更好地结合, 将膜从孵育环境中取出, 在室温条件下放置 20 min, 之后回收一抗溶液。一抗溶液回收完毕后, 使用 TBST 溶液对 PVDF 膜进行 3 次清洗, 每次清洗的时间为 8 min。

(7)二抗孵育: 把 PVDF 膜浸没于已稀释好的二抗(兔抗或鼠抗)溶液中, 在室温环境下, 通过摇床以较慢的速度进行震荡处理, 持续震荡 2 h 后, 回收二抗溶液, 接着用 TBST 溶液对 PVDF 膜进行洗涤, 共洗涤 3 次, 每次洗涤时间为 8 min。

(8)显影: 以 1:1 混合 A 液 B 液配制显色液, 接着, 把显色液均匀地滴加 200 μ L 在 PVDF 膜表面, 之后将该膜放置于化学发光凝胶成像系统内, 进行观察操作, 并拍摄相应的照片。

(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。

2.5 生物信息学分析方法

2.5.1 样品制备

将细胞随机分为 3 组, 然后选择空白组(经终浓度 100 ng/mL PMA 诱导)、模型组(经终浓度 100 ng/mL PMA 诱导+终浓度为 100 μ g/mL 的 ox-LDL)和五味子丙素给药组(经终浓度 100 ng/mL PMA 诱导+终浓度为 100 μ g/mL 的 ox-LDL+1 μ M SC)都给予以无血清 1640 培养基培养, 细胞于 37 °C、5%CO₂ 培养箱内孵育 48 h 后收集细胞蛋白组进行蛋白质组学的研究。所有样本都是从- 80°C 的冰箱中取出并重复三组, 然后用干冰运输。

2.5.2 directDIA 数据采集

将除盐冻干后的肽段重溶于 A 相(0.1%甲酸水)溶液, 随后进行 LC-MS/MS 分析。系统由 UltiMate 3000(Thermo Fisher Scientific, MA, USA)与 timsTOF Pro2 质谱仪(Bruker Daltonics)串联组成。样品量为 200 ng, 使用 AUR3-15075C18 分析柱(15 cm×75 μ m 内径,

1.7 μm 粒径, 120 $\text{\AA}$ 孔径, IonOpticks), 在 50 $^{\circ}\text{C}$ 柱温下以 60 min 的梯度分离样品, 流速为 400 nL/min。梯度从 4% 的 B 相(80%乙腈, 0.1%甲酸)开始, 在 25 min 内升高到 28%, 10 min 内升高 44%, 10 min 到 90%, 维持 7 min, 4% 平衡 8 min。质谱仪采用 diaPASEF 模式进行 DIA 数据采集, 扫描范围从 349-1229 m/z, 隔离窗口宽度设置为 40 Da。在 PASEF MSMS 扫描过程中, 碰撞能量随离子迁移率线性上升, 从 59 eV ($1/K0 = 1.6 \text{ Vs/cm}^2$) 上升到 20 eV ($1/K0 = 0.6 \text{ Vs/cm}^2$)。

2.5.3 分析流程

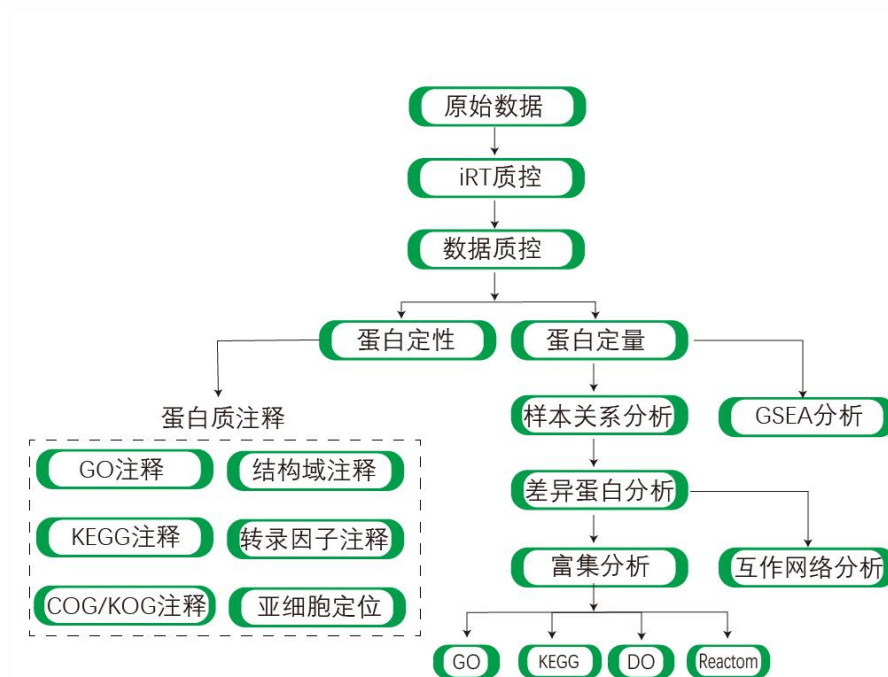


图 2-1 样品处理分析流程图

Figure 2-1 Sample Processing and Analysis Flowchart

2.5.4 蛋白质定性定量分析

首先从样本中分离提取蛋白质, 随后对提取的蛋白质进行酶解处理。质谱检测前, 向每一个样品中添加 Biognosys 的质控试剂 iRT Kit, 通过多肽在色谱中的保留时间 (retention time, RT) 进行校准, 利用 QuiC(Biognosys) 软件对原始质谱数据进行质控, 评估各个样本间的质控指标是否相近, 如果指标结果相近, 表明检测重复性好。然后利用 Spectronaut 14 引入深度机器学习算法, 预测理论谱图及保留时间用于鉴定打分, 依据 DIA 数据结果直接进行分析以鉴定蛋白。

2.5.5 差异表达蛋白聚焦分析

以 $FC > 2$ 倍且 $P < 0.05$, 作为差异表达蛋白的筛选标准对空白组 VS 模型组和模型组 VS 给药组 2 个比较组的差异表达蛋白进行 Venn 图分析, 得到 SC 干预后的上调蛋白和下调蛋白。

2.5.6 生物功能 GO 及 KEGG 通路分析

将共同靶点导入 DAVID 数据库(<https://david.ncifcrf.gov/>), 在数据库中进行 GO(Gene Ontology)分析以及 KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)分析, 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 的条目绘制图形进行可视化分析。

2.5.7 构建蛋白质与蛋白质相互作用网络分析

将共同靶点导入 String 数据库(<https://cn.string-db.org/>), 设置物种 “Human” PPI 网络模型; 置信度 > 0.7 并隐藏其断开链接的节点, 获得 PPI 关系, 将数据导入其 Cytoscape 3.8.2 软件进行可视化分析。

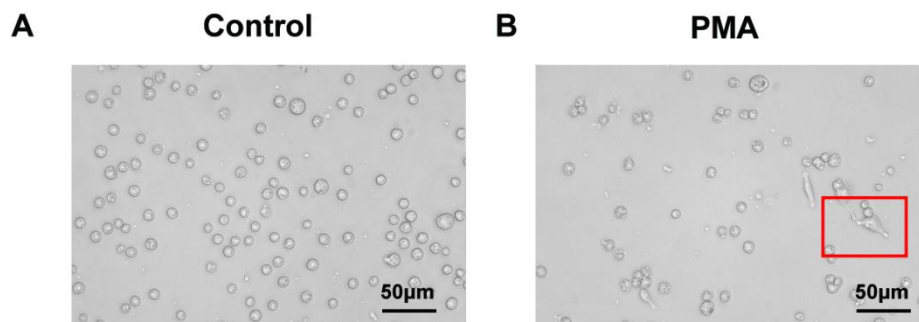
2.6 统计学方法

将数据导入 GraphPad Prism 8.0.2 进行计算和处理, 并通过 Student t 检验或 ANOVA 分析检测数据的显著性。结果以平均值 $\pm$ 标准误 ($\bar{X} \pm SEM$) 的形式表示。 P 值 < 0.05 ($P < 0.05$) 被认为是显著性差异并由 (*) 表示, 而 P 值 < 0.01 ($P < 0.01$) 的显著性水平由 (**) 表示。

2.7 结果与分析

2.7.1 建立 PMA 诱导 THP-1 细胞转化为巨噬细胞形态学变化

经终浓度 100 ng/mL PMA 诱导 THP-1 细胞 24 h 后, 在光学显微镜下对细胞进行观察, 可见细胞的体积明显增大, 细胞形态从原本的圆形转变为形态各异的多角形。并且这些细胞表现出较强的贴壁能力, 同时还长出了触角(如图)说明 THP-1 细胞已经成功分化为巨噬细胞。

图 2-2 THP-1 细胞经 PMA 诱导后的形态变化($\times 200$)Figure 2-2 Morphological changes of THP-1 cells induced by PMA($\times 200$)

2.7.2 SC 对 THP-1 细胞活性的影响

经不同浓度的 SC 干预 THP-1 细胞 24 h, 筛选药物浓度。CCK8 结果显示, 与空白组相比, SC 对 THP-1 细胞抑制的 $IC_{50}=198 \mu M$, 当 SC 浓度增加到 $25 \mu M$ 时, THP-1 细胞活力显著下调, 具有明显差异($P<0.05$), 在 $50 \mu M$ 浓度时细胞具有显著的毒性作用差异显著($P<0.01$)。因此, 在后续实验中选择 $1 \mu M$ 的药物浓度。

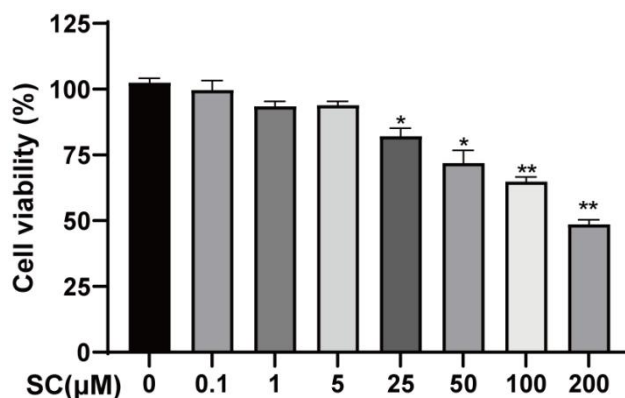


图 2-3 CCK8 检测细胞毒性

Figure 2-3 CCK8 detects cytotoxicity

2.7.3 油红 O 染色观察脂肪堆积

经终浓度 $100 \mu g/mL$ ox-LDL 诱导巨噬细胞 48 h 后, 油红 O 染色观察, 结果显示, 与空白组相比, ox-LDL 组能够明显发现有红色脂质的存在, 并且细胞大小存在差异, 形态呈现出椭圆形或者不规则的形状, 这与泡沫细胞所具有的形态特点相契合, 与

ox-LDL 组相比, SC 组细胞内红色颗粒明显降低, 脂质堆积逐渐缓解。结果表明 SC 可以显著抑制 ox-LDL 诱导的脂质堆积。

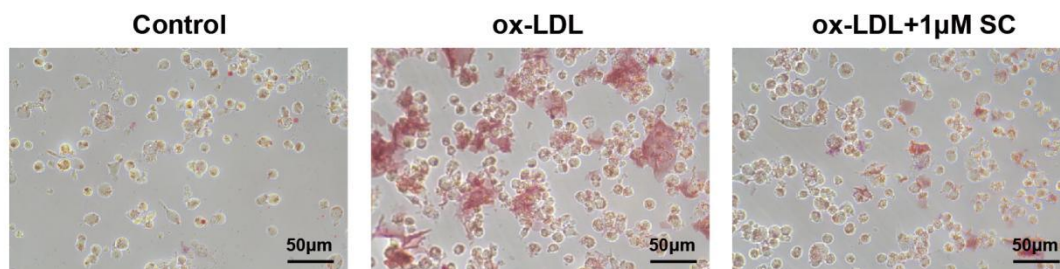


图 2-4 油红 O 染色泡沫细胞脂质堆积($\times 200$)

Figure 2-4 Oil red O staining foam cell lipid accumulation ($\times 200$)

2.7.4 外泌体表征鉴定

2.7.4.1 透射电镜观察 exosome 的形态

经超滤方法提取的外泌体通过透射电镜拍摄后发现, 结果显示能够明显发现囊泡结构, exosome 形态特征呈圆形或椭圆形, 呈现出完整的胞膜结构特征, 和理论层面上 exosome 的形态结构相匹配。

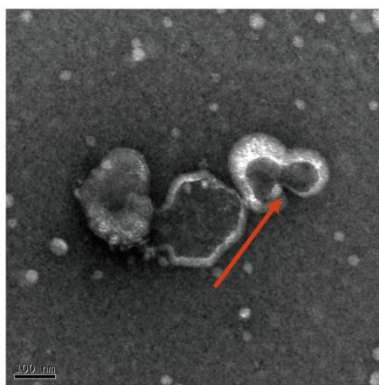


图 2-5 外泌体形态鉴定

Figure 2-5 Morphological identification of exosomes

2.7.4.2 粒度仪检测外泌体粒径大小

用 PBS 将外泌体稀释至适宜的浓度经粒度仪测定, 结果显示, 外泌体粒径一浓度的分布集中呈显著的单峰态势, 这一特征说明其具备较高的纯度, 且粒径富集尺寸约在 147 nm, 该尺寸基本与理论上外泌体的直径范围相符。说明超滤法收集溶液初步鉴定为 exosome。

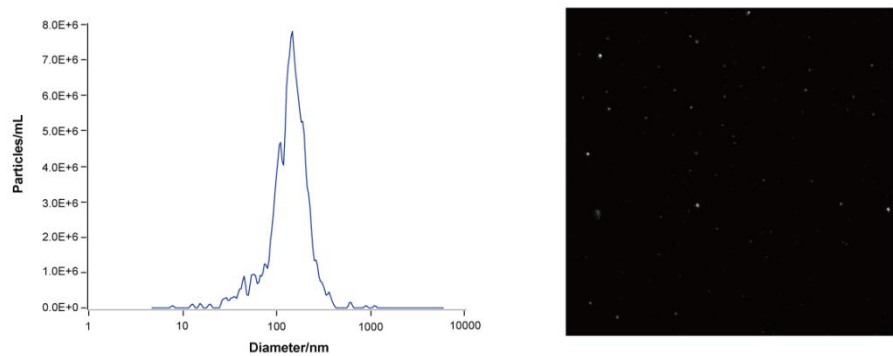


图 2-6 外泌体粒径大小检测

Figure 2-6 Exosome particle size assay

2.7.4.3 蛋白免疫印迹法检测外泌体标志物

经 Western blot 法检测外泌体中标志性蛋白 CD9、CD63、CD81 的表达，结果显示，提取的 exosome 蛋白中 CD9、CD63、CD81 均有所表达，进一步验证了所提取的泡沫细胞上清液中有 exosome。

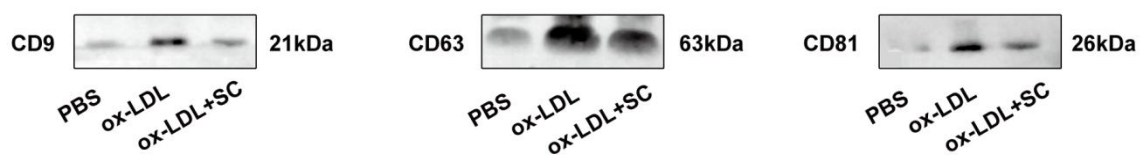


图 2-7 外泌体标志性蛋白检测

Figure 2-7 Exosome signature protein assay

2.7.5 差异表达的蛋白质生物信息的分析

2.7.5.1 空白组 VS 模型组差异蛋白的 GO 功能富集分析及 KEGG 通路富集分析

为能够更加清楚的分析差异蛋白的功能，通过 DAVID 数据库对空白组 VS 模型组差异蛋白进行分析。GO 功能富集分析结果显示，生物过程(BP)中主要包括细胞质翻译、蛋白质定位到含有 CENP-A 的染色质上、核糖体组装、细胞因子的产生、对巨核细胞分化的负向调节等；细胞成分(CC)可推测这些靶点主要集中在细胞质部分、细胞骨架、糖蛋白、细胞外基质等细胞结构中；而在分子功能(MF)水平上，它们主要承担蛋白质结合、RNA 结合等重要功能。KEGG 通路富集分析结果显示，主要集中在胆固醇代谢、氨基聚糖和核苷酸糖代谢，以及脂质和途径，和肌动蛋白细胞骨架的调节。

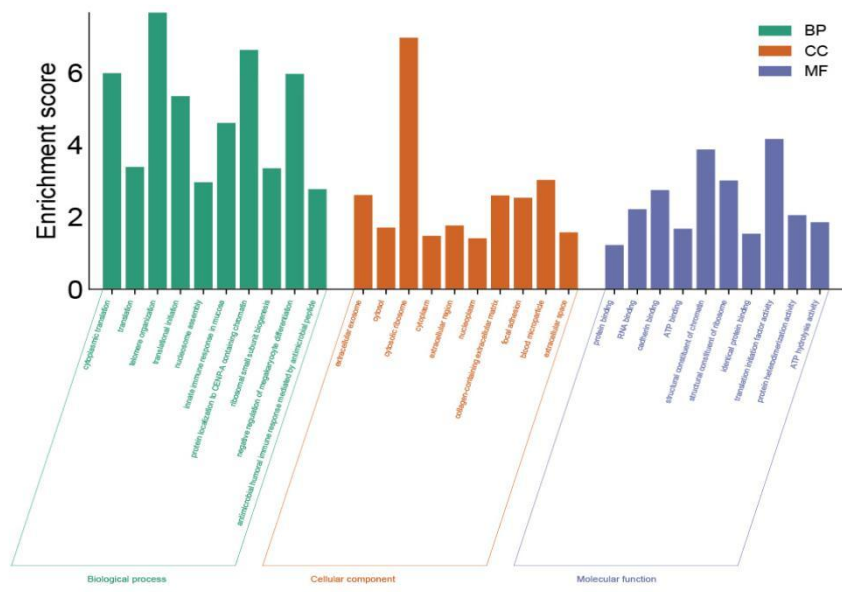


图 2-8 空白组 VS 模型组差异蛋白的 GO 功能富集分析

Figure 2-8 GO function enrichment analysis plot of Con VS Mod group differential proteins

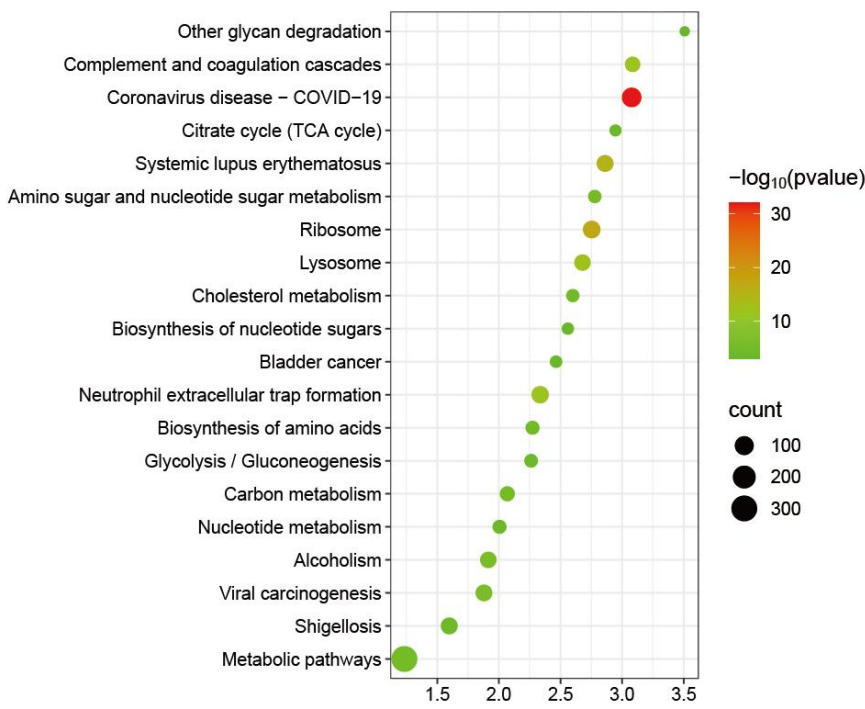


图 2-9 空白组 VS 模型组差异蛋白的 KEGG 通路富集分析

Figure 2-9 KEGG pathway enrichment analysis of Con VS Mod group differential proteins

2.7.5.2 模型组 VS 给药组差异蛋白的 GO 功能富集分析及 KEGG 通路富集分析

对模型组 VS 给药组差异蛋白进行分析。GO 功能富集分析结果显示，生物过程(BP)中主要包括细胞质翻译、内质网到高尔基体囊泡介导的运输、核糖体组装、细胞因子的产生、蛋白质折叠等；细胞成分(CC)可推测这些靶点主要集中在细胞外分泌体、细胞骨架、含胶原蛋白的细胞外基质、细胞外基质等细胞结构中；而在分子功能(MF)水平上，

它们主要承担蛋白质结合、mRNA 结合等重要功能。KEGG 通路富集分析结果显示，主要集中在核糖体、血脂与动脉粥样硬化，以及内质网中的蛋白质加工，和肌动蛋白细胞骨架的调节。这可能与 SC 调控的外泌体释放对 AS 的作用机制密切相关。

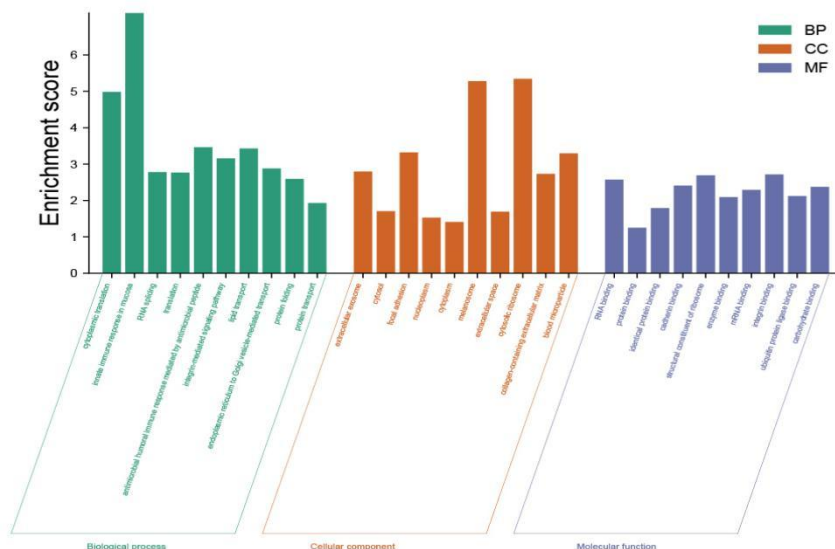


图 2-10 模型组 VS SC 组差异蛋白的 GO 功能富集分析

Figure 2-10 GO function enrichment analysis plot of Mod VS SC group differential proteins

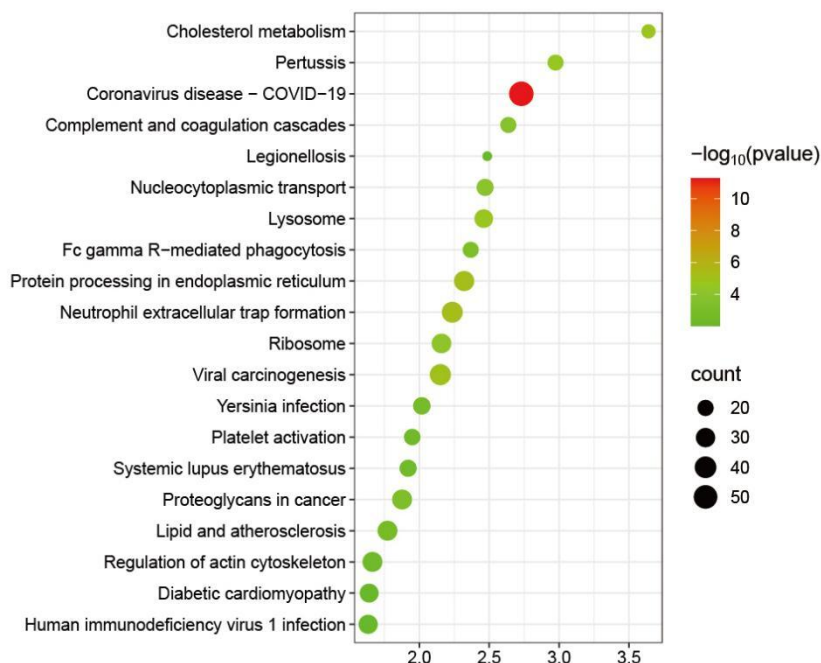


图 2-11 模型组 VS SC 差异蛋白的 KEGG 通路富集分析

Figure 2-11 KEGG pathway enrichment analysis of Mod VS SC group differential proteins

2.7.5.3 差异蛋白分析

综合差异蛋白分析，共鉴定出 6152 个蛋白，以 $FC > 2$ 倍和 P 值 < 0.05 为筛选标准，与空白组相比，模型组有 423 个上调蛋白和 648 个下调蛋白。与模型组相比，SC 处理后发现上调蛋白 54 个，下调蛋白 302 个。其中，25 个上调蛋白和 32 个下调蛋白在维恩图分析中出现重叠，利用 STRING 数据库(<https://www.string-db.org/>)进一步 PPI 分析显示，MYH9(NMMHC IIA)是差异蛋白之一，在囊泡形成和运输中起关键作用。因此，我们初步确定 MYH9 与 AS 的发病机制以及 SC 的干预途径密切相关，很可能是 SC 调控外泌体释放的潜在关键靶蛋白。

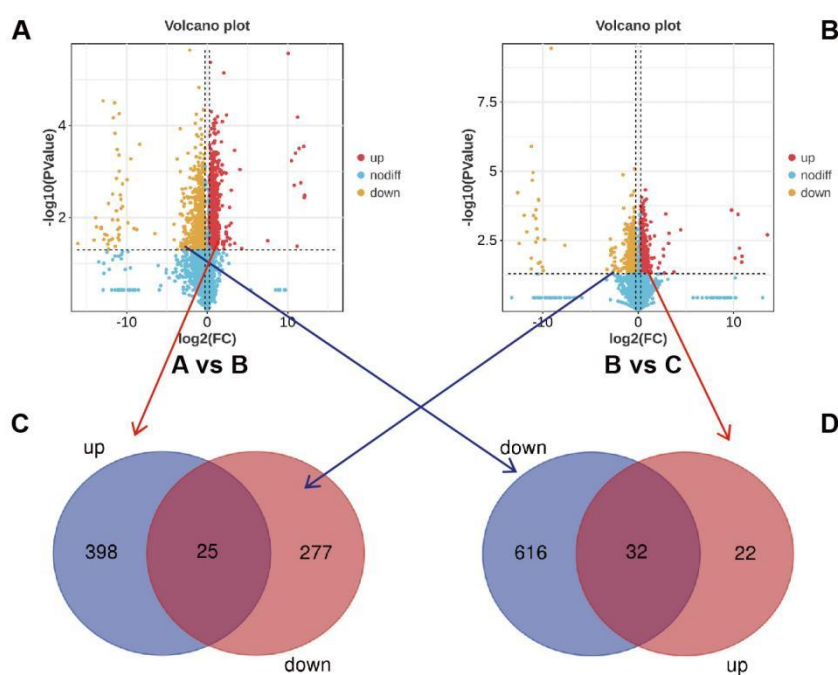


图 2-12 差异蛋白分析
Figure 2-12 Differential protein analysis

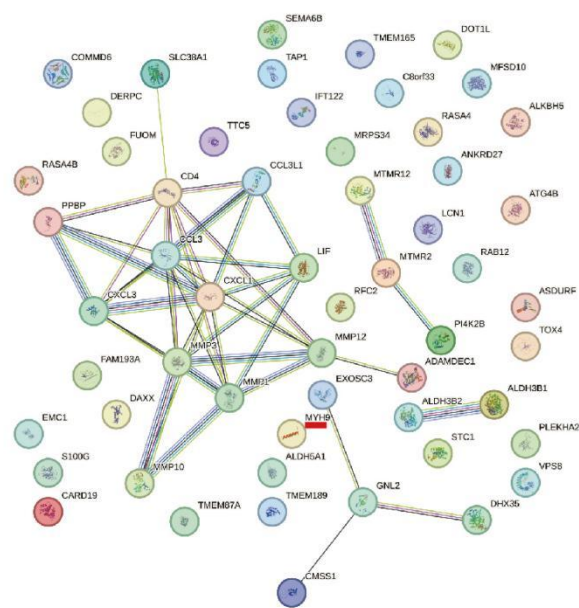


图 2-13 差异基因 PPI 网络图
Figure 2-13 Differential gene PPI network diagram

2.8 本章小结

近些年，心血管疾病导致人类死亡的比率不断上升，而 AS 与心血管系统疾病之间紧密相连，因此，研究 AS 的发病机制是大环境的必然趋势^[84]。AS 作为一种炎症性疾病，是导致不稳定冠状动脉综合征和心源性猝死的重要原因之一^[85]。大量研究表明，AS 是由低密度脂蛋白(LDL)积聚而引起的血管炎性疾病，其易于在循环血液中沉积在内膜上，血小板和白细胞等分化成巨噬细胞^[85]。而这些 LDL 颗粒会被识别并且修饰，促使巨噬细胞转变成泡沫细胞。因此，本研究为寻找 AS 发病及进展机制，建立 ox-LDL 诱导的 THP-1 巨噬细胞模型是最基础且重要的一个环节。在前人研究的表述中已经总结出 THP-1 巨噬细胞的建立方法，即先后用 PMA 和 ox-LDL 进行孵育诱导使其转变为泡沫细胞，进一步探讨了调控外泌体释放中的作用机制在 AS 中的作用。采用超滤法提取外泌体，提出外泌体表面不容易破碎，较完整，随后根据粒径、透射电镜、蛋白免疫印迹法对外泌体进行表征性鉴定，所提取出为外泌体。并采用油红 O 染色观察红色脂质堆积情况，说明模型构建成功。

为探讨靶标蛋白调控泡沫细胞释放机制研究，本章研究主要综合蛋白质组学和生物信息学方法，采用蛋白质组学对 Control 组、ox-LDL 组及 ox-LDL+SC 组进行分析，深入解析差异蛋白的功能。通过 DAVID(<https://david.ncifcrf.gov/>)对 Control 和 ox-LDL 组与 ox-LDL 组和 ox-LDL+SC 组中的差异蛋白进行功能聚类研究，结果揭示了其差异蛋

白在内质网到高尔基体的囊泡介导运输、细胞核、蛋白质结合的富集。通过 KEGG 信号通路富集分析,结果发现富集在胆固醇代谢、氨基糖和核苷酸糖代谢等,以及脂质和动脉粥样硬化、肌动蛋白细胞骨架的调节等通路,这些通路可能与 SC 调控外泌体释放治疗 AS 的作用机制密切相关。综合差异蛋白分析,我们共鉴定出 6152 个蛋白,以 $FC>2$ 倍且 $Pvalue<0.05$ 为标准,我们筛选出 423 个上调蛋白和 648 个下调蛋白。SC 处理后,发现 54 个上调蛋白和 302 个下调蛋白。其中 25 个上调蛋白和 32 个下调蛋白在 Venn 图分析中显示重叠,进一步利用 STRING 数据库(<https://www.string-db.org/>)进行 PPI 分析,MYH9(NMMHC IIA)是差异蛋白之一,在囊泡的形成和运输中发挥关键作用。因此初步确定 MYH9 与 AS 的发病以及 SC 的干预途径密切相关,极可能成为 SC 调控外泌体释放的潜在关键靶标蛋白。

近年来,NMMHC IIA 在细胞囊泡分泌、运输和胞吐方面发挥着越来越重要的作用^[86]。NMMHC IIA 是肌球蛋白 II 超家族的成员,通过与细胞内的肌动蛋白结合发挥分子马达的作用。综上所述,实验结合蛋白质组学预测结果,这表明 NMMHC IIA 可能是调控外泌体释放的潜在关键靶标蛋白,这一发现为 AS 中外泌体研究提供了新的视角,为 AS 疾病早期治疗和预防提供了重要的理论依据和潜在策略。

第3章 NMMHC IIA-HSP70 相互作用对巨噬细胞外泌体释放的调控作用及五味子丙素的干预研究

3.1 引言

五味子为木兰科植物五味子的干燥成熟果实,近年来其在动脉粥样硬化(AS)等心血管疾病防治中的作用备受关注^[87]。中医理论认为,五味子具有益气生津、宁心安神的功效,常用于治疗心血管疾病^[88]。临床研究表明,在心肌梗死恢复期患者的常规治疗基础上加用五味子颗粒,可显著改善心功能并缓解焦虑情绪,体现了其医疗与保健的双重价值^[89]。因此,五味子被广泛应用于高血压、冠心病、病毒性心肌炎、肺心病及心力衰竭等疾病的防治,并取得了确切的疗效^[90]。五味子丙素(SC)是从五味子中提取的一种联苯环辛二烯类木脂素,具有显著的心脑血管保护作用^[91]。研究发现,五味子丙素能够有效缓解高脂饮食诱导的 AS 小鼠模型中的动脉炎症反应,并通过激活 NF- κ B 通路抑制血管内皮氧化应激,从而保护心脑血管内皮的稳定性^[92]。此外,课题组前期研究进一步证实,五味子及其活性成分 SC 在 AS 等心血管疾病的治疗中展现出良好的潜力,为相关疾病的药物研发提供了重要的科学依据^[93]。

非肌肉肌球蛋白 IIA(NMMHC IIA)是肌球蛋白 II 超家族的一员,可与 actin 结合构成细胞中的分子马达,维持细胞稳态,参与炎症、囊泡运输、内吞和胞吐等多种生理和病理过程^[94]。NMMHC IIA 作为囊泡或外泌体释放的关键蛋白之一,同时也是中药治疗疾病的潜在靶点,中药活性成分可通过调节 NMMHC IIA 及其相互作用蛋白,发挥治疗疾病的作用。SC 通过 NMMHC IIA 调节 NF- κ B 信号通路防治心脑血管疾病;人参皂苷 Rg1 通过 NMMHC IIA-HSP90 相互作用,抑制外周血中 exosome-miR-21 释放,促进 TIMP3 蛋白表达,促进 MMPs 蛋白降解,具有治疗颅脑损伤的潜力^[86]。外泌体从形成到融合发挥作用的过程一直是当今研究热点,外泌体通过形成(典型代表蛋白:人四旋蛋白, TSPAN6)、释放(典型代表蛋白:非肌肉肌球蛋白 IIA, NMMHC IIA)、转运蛋白(典型代表蛋白:热休克蛋白 70, HSP70),外泌体的细胞内组装和运输由热休克蛋白(Hsc70、Hsp70、Hsp 90)进行^[95]。然而,在脂质紊乱性 AS 疾病中,巨噬细胞 NMMHC IIA 调节外泌体释放的相互作用蛋白、途径、机制及参与 AS 的发生、发展过程尚未见报道。

本章节通过免疫荧光共定位观察外泌体释放情况,此外,使用 NMHCM IIA 抗体进

行钩钩，采用免疫共沉淀-银染-质谱技术，研究 NMMHC IIA 在外泌体释放调控中的相互作用，为了进一步支持这一发现，通过 WB 检测巨噬细胞胞内及外泌体蛋白并进行分析，最后通过 SC 干预且干扰 NMHCM IIA 探测靶蛋白对外泌体释放行为和途径进行分析。综上所述，这些发现揭示了 NMMHC IIA 可能与 HSP70 相互作用，从而 SC 通过调控巨噬细胞外泌体的释放，为 AS 的外泌体研究提供了新的视角。

3.2 实验材料

3.2.1 实验试剂

表 3-1 实验试剂

Table3-1 Experimental reagents

主要试剂	厂家
甲醛	西陇科学股份有限公司
冰醋酸	国药集团化学试剂有限公司
硝酸银	上海精科化学试剂有限公司
无水乙醇	上海碧云天生物技术有限公司
4%多聚甲醛	上海碧云天生物技术有限公司
MYH9 antibody	武汉三鹰生物技术有限公司
TSG101 antibody	Abcam
HSP70 antibody	Abcam
β -actin antibody	武汉三鹰生物技术有限公司
RPMI 1640 培养基	赛默飞世尔科技公司
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
ECL 发光显影液	诺唯赞生物科技股份有限公司
ox-LDL	奕元生物技术有限公司
RIPA 裂解液	上海碧云天生物技术有限公司
牛血清蛋白	上海麦克林生化科技有限公司
Protein A+G Agarose	上海碧云天生物技术有限公司
SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液	上海碧云天生物技术有限公司
抗荧光猝灭剂(含 DAPI)	苏州优逸兰迪生物科技有限公司
Tris	上海麦克林生化科技有限公司
蛋白酶磷酸酶抑制剂混合物	上海碧云天生物技术有限公司
二甲基亚砷	国药集团化学试剂有限公司

甘氨酸	上海麦克林生化科技有限公司
过硫酸铵	上海麦克林生化科技有限公司
特级南美胎牛血清	苏州双洙生物科技有限公司
青链霉素-新霉素三抗	上海逍鹏生物科技有限公司
磷酸盐缓冲液(PBS), pH7.4	塞维尔生物科技有限公司
多聚赖氨酸	Biosharp
通用型抗体稀释液	苏州新赛美生物技术有限公司

3.2.2 实验仪器

表 3-2 实验仪器

Table3-2 The list of experimental reagents and instruments

仪器名称	厂家
-80℃低温冰箱	Thermo Fisher
超纯水仪	Sartorius
超净台	Farma Scientific
倒置荧光显微镜	德国 Leica
共聚焦显微镜	日本 Olympus
高速冷冻离心机	Sartorius
接触式化学发光成像仪	上海易亨特
JIMBIO iCytal 细胞计数仪	江苏卓微生物科技有限公司
ZEAL WAY 高压灭菌锅	致微仪器有限公司
超滤离心管	德国 Sartorius 公司
HH-2 恒温水浴锅	江苏荣华仪器制造有限公司
灭菌锅	Zealway
Infinite200 酶标仪	瑞士 Tecan 公司
二氧化碳恒温箱	美国 Thermo 公司
制冰机	Grant

3.3 泡沫细胞体外模型的建立

3.3.1 细胞培养

方法同上 2.3.1。

3.3.2 细胞分组及给药

方法同上 2.3.1.5。

3.4 SC 干预 NMMHC IIA-HSP70 相互作用调节巨噬细胞中外泌体的释放

3.4.1 免疫荧光共定位观察外泌体释放行为

提前一夜将多聚赖氨酸铺小皿，照一夜紫外。将 THP-1 细胞按照 1.5×10^5 个/皿接种于共聚焦小皿，经终浓度 100 ng/mL PMA 诱导 24 h，倒掉培养基，经终浓度 100 μ g/mL Lox-LDL 诱导巨噬细胞 48 h 后，进行荧光染色。

(1) 拿出共聚焦小皿，轻轻吸出血中的培养液，加入 PBS 清洗 3 次，不断摇晃，洗去杂物。

(2) 皿中加入 100 μ L 固定液(4 °C)，固定 30 min。

(3) 洗涤固定液，用 PBS 洗涤 3 遍，每次 5 min。

(4) 加去垢剂 0.2% TritonX-100，适量处理 5 min。

(5) 洗涤，用 PBS 洗涤 3 遍，每次 5 min。

(6) 加 5% BSA(PBS 配置)进行封闭，封闭 1 h。

(7) 孵育一抗，加入适量一抗过夜，置于 4 °C 摇床上，不断摇晃。所需一抗 NMMHC IIA(比例 1 : 300)和 TSG101(比例 1 : 300)。

(8) 将过夜的一抗回收，并用 PBS 洗涤 3 遍，每次 5 min。

(9) 孵育二抗，用免疫荧光二抗(兔抗和鼠抗)处理 1 h(比例 1 : 400)。

(10) 吸出二抗，用 PBS 洗涤 3 遍，每次 5 min。

(11) 用含 DAPI 抗荧光淬灭剂封片后在荧光显微镜下观察结果并进行图像采集。

3.4.2 免疫共沉淀联合质谱研究蛋白互作

3.4.2.1 免疫共沉淀

提前一夜将多聚赖氨酸铺小皿，照一夜紫外，将 THP-1 细胞按照 2.0×10^6 个/皿接种于小皿，经终浓度 100 ng/mL PMA 诱导 24 h，倒掉培养基，经终浓度 100 μ g/mL Lox-LDL 诱导巨噬细胞 48 h 后。

(1) 拿出小皿，将上清轻轻吸走，加入 PBS 清洗 2 次，适当即可。

(2)加裂解液，每皿加入 150 μL 裂解液。

(3)轻轻晃动添加了裂解液的培养皿，确保裂解液能全面且均匀地与贴壁细胞相互接触。完成上述操作后，把培养皿置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的冰箱中，冷冻 10 min。

(4)从冰箱拿出培养皿，放置冰上动作要快，用干净的刮刀将细胞刮于培养皿的一处，后用枪将细胞碎片和裂解液移至 1.5 mlEP 管中。

(5)把 EP 管放在小型涡旋混合仪上进行短暂涡旋处理，之后将其放置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的冰箱内静置 40 min，期间 20 min 时从冰箱拿出来震荡一次。

(6)拿出 EP 管，放入高速离心机 12000 rpm 离心 5 min，提前预冷 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

(7)取出 EP 管，吸取上清液并定量计算体积。

(8)取 96 孔板先加入 BCA(A 液 : B 液=50 : 1)标曲，从样品中取出 2 μL +18 μL PBS+200 μL BCA 加入每孔，随后放入 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 烘箱中孵育 30 min，在酶标仪内，于 562 nm 的波长条件下对蛋白样品进行检测，而后依据预先绘制的标准曲线，对该蛋白样品的浓度数值展开计算。

(9)向蛋白溶液中加入 6 μL 相对应的抗体 MYH9，并将封口膜封好进行 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 摇晃过夜。

(10)次日，准备 EP 管，加入 40 μL Protein A+G Agarose 并用 PBS 洗涤，摇晃 5 min， $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，3000 rpm 离心 5 min，重复处理 3 次。

(11)将结合过夜抗原抗体 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，3000 rpm 离心 3 min，将上清加入到 Protein A+G Agarose 中，摇晃 4 h。

(12)取出 EP 管， $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，3000 rpm 离心 3 min，从管中取出 90 μL 加入 18 μL 6 $\times$ loading 煮 5 min，得到 Post-IP。

(13)将剩下的沉淀部分加入 PBS 反复清洗 3 次，每管加入 50 μL 2 $\times$ loading，煮 5 min 得到 Co-IP。

3.4.2.2 银染

(1)电泳步骤同 2.4.4.2(1~3)。

(2)固定：凝胶在 ddH₂O 中荡洗后，加入固定液(100 ml50%无水乙醇+25 ml 冰醋酸+56 ml0.04%甲醛+20 ml ddH₂O)轻摇，漂洗 3 次，20 min 每次，保鲜膜封好。

(3)50%无水乙醇洗涤：乙醇中轻摇漂洗 3 次，20 min 每次。

(4)预处理：0.02%Na₂S₂O₃ 中轻摇 1 min。

(5)ddH₂O 洗涤：漂洗 3 次，20 s 每次。

(6)染色：染色液(取 0.8 ml20%AgNO₃+72 ml0.04%甲醛)中轻摇染色 20 min(锡箔纸包裹避光)。

(7)ddH₂O 洗涤：漂洗 3 次，20 s 每次。

(8)显色：显色液(25 ml12%Na₂CO₃+24 ml0.04%甲醛+1 ml0.02%Na₂S₂O₃)中轻摇漂洗清晰，约 30 s(锡箔纸包裹避光)。

(9)ddH₂O 洗涤：漂洗 3 次，20 s 每次。

(10)终止：终止液中轻摇 10 min，凝胶拍照扫描。

3.4.2.3 质谱分析

银染后的胶条切割，每个 SDS-PAGE 泳道可分为 6-8 份(每个条带不超过 1.5 cm)，每份胶条需单独放置入一个离心管中，加入 200-300 μL 超纯水保湿，大约覆盖 1/6 的胶条，并记录好割胶部位的分子量范围，用冰袋或者干冰运输至华盈生物质谱产品线进行分析。

3.4.2.4 Western blot 法检测 IP 蛋白

方法同上 2.4.4.2。

3.4.3 Western blot 法检测细胞与上清液中相关蛋白表达水平

方法同上 2.4.4.2。

3.4.4 干扰 NMMHC IIA 后与 HSP70 相互作用调节巨噬细胞外泌体的释放

3.4.4.1 敲除 NMMHC IIA

据我们早期研究报道^[86]，siRNAs 序列(5' -GAGGCAAUGAUCACUGACUdTdT-3' 5' -AGUCAGUGAUCAUUGCCUCdTdT-3')由上海吉荧生物技术有限公司设计和生产。

3.4.4.2 巨噬细胞干扰靶蛋白 NMMHC IIA 分组及给药

提前一夜将多聚赖氨酸铺小皿，照一夜紫外，将 THP-1 细胞按照 30%密度接种于小皿，经终浓度 100 ng/mLPMMA 诱导 24 h。转染分组：siNMMHC IIA NC+100 μg/mLox-LDL、siNMMHC IIA +100 μg/mLox-LDL、siNMMHC IIA +100 μg/mLox-LDL+1 μM SC。转染步骤如下：

(1)将 2.5 nM 的小 RNA 冻干粉进行瞬时离心，随后向其中加入 125 μL 的 DEPC 水，配制成浓度为 20 μM 的储存液，妥善保存并分装。

(2)取 6 个 EP 管，加入 250 μL 的 OPTI - MEM 无血清稀释液中。

(3)配制 RNA 稀释液，取(2)中 3 个 EP 管，分别加入 10 μ LsiNMMHC IIA NC、10 μ LsiNMMHC IIA、10 μ LsiNMMHC IIA。

(4)配制 Celopener 稀释液，取(2)中 3 个 EP 管，分别加入 5 μ LCelopener 液体混匀，静置 5 min。

(5)将 RNA 稀释液与 Celopener 稀释液两者混匀，静置 15 min 后，加入小皿中并加入 1.5 ml 无血清培养基。

(6)将小皿放入培养箱 6 h，取出换液并造模给药，步骤同 2.3.1.5。

3.4.4.3 提取干扰靶蛋白 NMMHC IIA 后细胞蛋白

方法同 3.3.3.1(1~8)。

(1)对剩余的样品按照体积 5 : 1 的比例加入 6 $\times$ loading。

(2)将加好的样品放入离心机顺离，使离心管内壁的样品甩下。

(3)将样品放入恒温金属浴锅中 100 $^{\circ}$ C煮蛋白 7 min。

(4)取出样品蛋白放入-20 $^{\circ}$ C冰箱。

3.4.4.4 干扰靶蛋白 NMMHC IIA 后免疫荧光共定位观察外泌体释放行为

方法同 3.3.2

3.5 统计学方法

将数据导入 GraphPad Prism 8.0.2 进行计算和处理，并通过 Student *t* 检验或 ANOVA 分析检测数据的显著性。结果以平均值 $\pm$ 标准误 ($\bar{X} \pm \text{SEM}$) 的形式表示。*P* 值 <0.05 ($P<0.05$) 被认为是显著性差异并由(*)表示，而 *P* 值 <0.01 ($P<0.01$) 的显著性水平由(**)表示。

3.6 结果与分析

3.6.1 免疫荧光法观察 SC 干预泡沫细胞对外泌体释放行为的影响

采用免疫荧光法观察 THP-1 细胞经过 SC 处理后的外泌体分泌状况。TSG101 为外泌体标志性蛋白，根据荧光的强弱，可辨别外泌体囊泡释放情况。如图，结果表明，空白组囊泡释放行为较弱，其荧光强度较弱，模型组在 ox-LDL 的刺激下，外泌体囊泡的释放增加，细胞表面 TSG101 蛋白含量增高，因而细胞膜表面荧光强度较强，而给药组能有效抑制外泌体释放，荧光强度变弱。因此，SC 能够有效抑制 THP-1 细胞在 ox-LDL

刺激下释放外泌体能力。NMMHC IIA 在空白组中含量较低，荧光强度较弱，模型组中，外泌体囊泡的释放增加，NMMHC IIA 蛋白含量增加，而给药组能有效抑制外泌体释放，荧光强度变弱，即 SC 通过 NMMHC IIA 蛋白影响外泌体的释放。

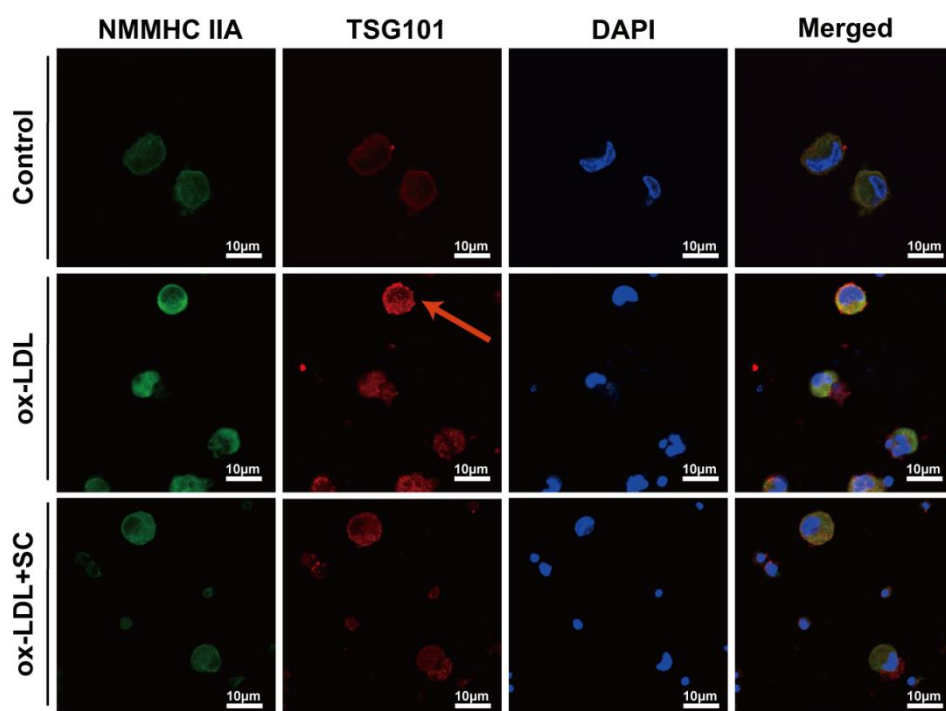


图 3-1 免疫荧光观察 ox-LDL 对外泌体释放行为及 SC 干预($\times 600$)

Figure 3-1 Immunofluorescence observation of ox-LDL exosome release behaviour and SC intervention ($\times 600$)

3.6.2 免疫共沉淀联合质谱研究 NMMHC IIA 相互作用蛋白 HSP70

3.6.2.1 免疫共沉淀-银染钩钩 NMMHC IIA 相互作用蛋白

此外，我们通过免疫共沉淀方法使用 NMMHC IIA 抗体进行钩钩相互作用蛋白 HSP70，蛋白相互作用调控外泌体的释放。结果表明，初步认定 NMMHC IIA 相互作用蛋白可能是 HSP70。

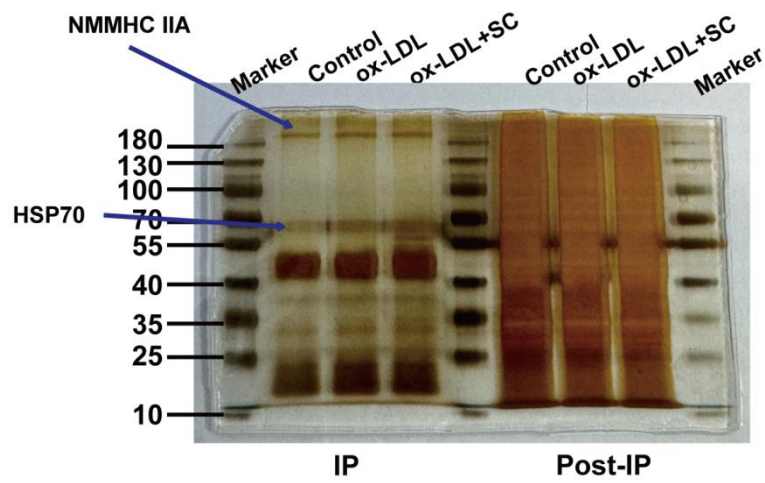


图 3-2 免疫共沉淀-银染识别 NMMHC IIA 相互作用蛋白 HSP70

Figure 3-2 CO-Immunoprecipitation-silver staining recognises the NMMHC IIA-interacting protein HSP70

3.6.2.2 质谱鉴定 NMMHC IIA 相互作用蛋白 HSP70

用亲和层析吸附法捕获相关蛋白，并用质谱法进行分析。质谱检测分析，显示氨基酸序列，并与数据库中的胞外囊泡标记蛋白 HSP70 进行比较，进一步鉴定出 NMMHC IIA 相互作用蛋白为 HSP70。

DFSALSQLQDTQELLQEENR	TRIPKIQKLL
SMEAEMIQLQEELAAAER	VNQIGSVTESLQACK
IAQLEEELEEEQGNTTELINDR	TTPSYVAFTDTER
LQQLFNHTMFILEQEYQR	IINEPTAAAIAYGLDKK
QLLQANPILEAFGNAK	QATKDAGTIAGLNVLR
NMMHC IIA	HSP70

图 3-3 质谱分析 NMMHC IIA 和 HSP70 蛋白肽序列

Figure 3-3 Mass spectrometry analysis of NMMHC IIA and HSP70 protein peptide sequences

3.6.2.3 Western blot 法检测 IP 蛋白

为进一步验证 IP 蛋白中 HSP70 是否表达，我们采用 Western blot 法对提取的免疫共沉淀蛋白进行分析，结果如图显示，NMMHC IIA 和 HSP70 均有所表达，经 ox-LDL 刺激后，巨噬细胞中 IIA 与 HSP70 蛋白含量逐渐增加，再次验证 NMMHC IIA 相互作用蛋白为 HSP70。

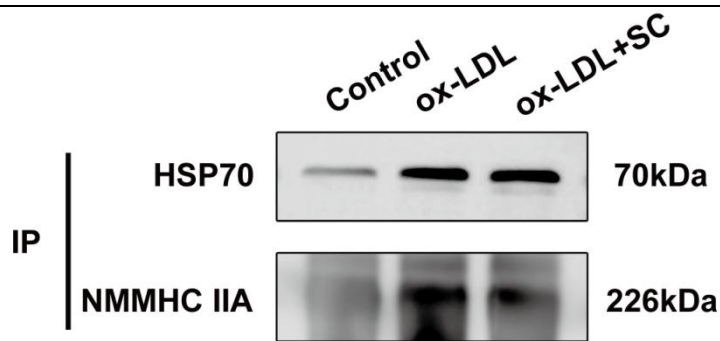


图 3-4 Western blot 检测 IP 蛋白中 NMMHC IIA 和 HSP70 的表达

Figure 3-4 Western blot detection of NMMHC IIA and HSP70 expression in IP proteins

3.6.3 Western blot 法检测五味子丙素通过 NMMHC II 和 HSP70 相互作用调控外泌体释放

TSG101 是外泌体表面标志物，在外泌体的生成过程中发挥着关键作用，使用 Western blot 法检测上清液和细胞中外泌体表面标志物表达情况，结果如图显示，在上清液中 SC 组中标志蛋白的表达明显低于 ox-LDL 组，此结果表明在 SC 作用下，TSG101 标志蛋白的表达降低，其代表上清液中外泌体的减少，即 SC 抑制外泌体的释放。在细胞中，SC 组中标志蛋白的表达明显低于 ox-LDL 组，进一步提示 SC 能够抑制外泌体的释放。进一步探讨 SC 干预 NMMHC IIA 蛋白影响外泌体释放作用，上清液和细胞中结果如图显示，ox-LDL 刺激后 NMMHC IIA 与 HSP70 蛋白含量逐渐增加，SC 干预后蛋白含量逐渐减少，HSP70 和 NMMHC IIA 在 SC 作用下的表达行为一致，提示在 NMMHC IIA 和 HSP70 相互作用下可以调控外泌体的释放，SC 可通过 NMMHC IIA 和 HSP70 相互作用抑制外泌体的释放。

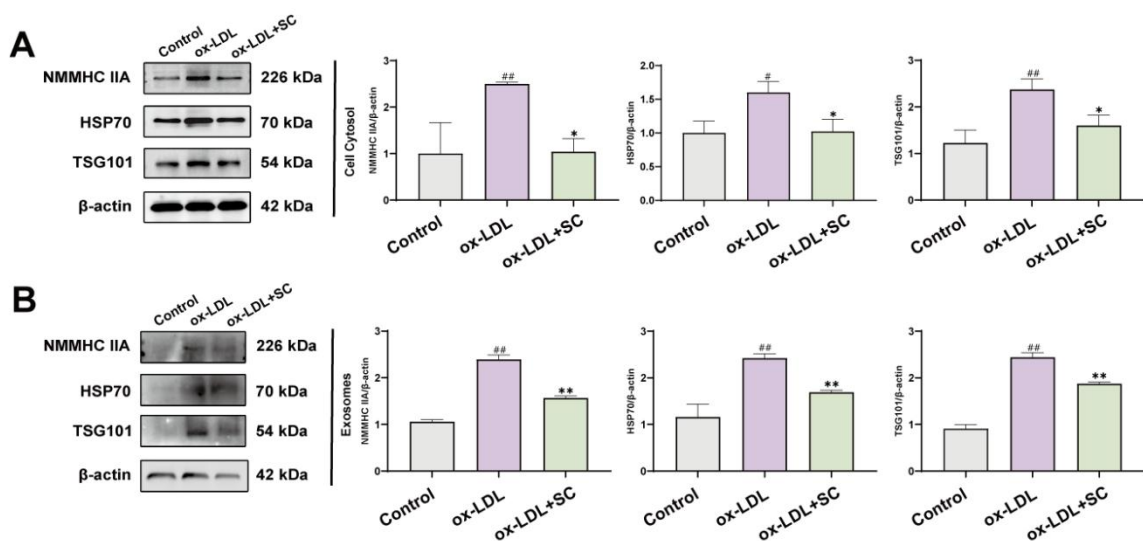


图 3-5 Western blot 检测细胞和上清液中 SC 对外泌体表面标志物 TSG101、NMMHC IIA 与 HSP70

Figure 3-5 Effect of SC on the expression of exosomal surface markers TSG101, NMMHC IIA and HSP70 in cells and supernatants detected by Western blot

注：A 细胞中 TSG101、NMMHC IIA 与 HSP70 的表达；B 细胞上清中 TSG101、NMMHC IIA 与 HSP70 的表达。与正常对照组比较， $^{\#}P<0.05$ ， $^{##}P<0.01$ ；与 ox-LDL 组比较， $^{*}P<0.05$ ， $^{**}P<0.01$ 。

3.6.4 五味子丙素通过干扰 NMMHC IIA 后与 HSP70 相互作用调节巨噬细胞外泌体的释放

3.6.4.1 siNMMHC IIA 干扰效率检测

为进一步验证 NMMHC IIA 对其靶蛋白影响，通过干扰靶蛋白 NMMHC IIA，采用 Western blot 法检测 NMMHC IIA 的干扰效率。结果如图显示，与 siNMMHC IIA NC 组相比，干扰 NMMHC IIA 后，NMMHC IIA 的表达水平明显降低；与 siNMMHC IIA 组相比，SC 干预后能够更加显著降低 NMMHC IIA 的表达水平。结果提示，SC 干预能够抑制靶蛋白的表达。

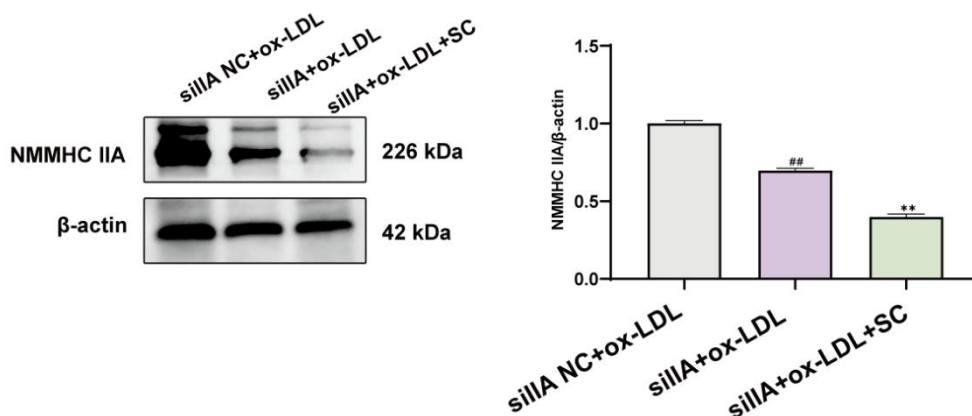


图 3-6 Western blot 检测细胞中 NMMHC IIA 干扰效率

Figure 3-6 Effect of SC on the expression of exosomal surface markers TSG101, NMMHC IIA and HSP70 in cells and supernatants detected by Western blot

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

3.6.4.2 siNMMHC IIA 干扰后 HSP70 及 TSG101 的表达水平

干扰 NMMHC IIA 后，结果如图显示，与 siNMMHC IIA NC 组相比，干扰 NMMHC IIA 后，HSP70 的表达水平明显降低；与 siNMMHC IIA 组相比，SC 干预后能够更加显著降低 HSP70 的表达水平。随后并对外泌体标志性蛋白 TSG101 进行检测，与 siNMMHC IIA NC 组相比，干扰 NMMHC IIA 后，TSG101 的表达水平明显降低；与 siNMMHC IIA 组相比，SC 干预后 TSG101 的表达水平降低更显著。结果提示，干扰 NMMHC IIA 后能够抑制相互作用蛋白 HSP70 的表达，SC 干预后进一步抑制了外泌体的释放。

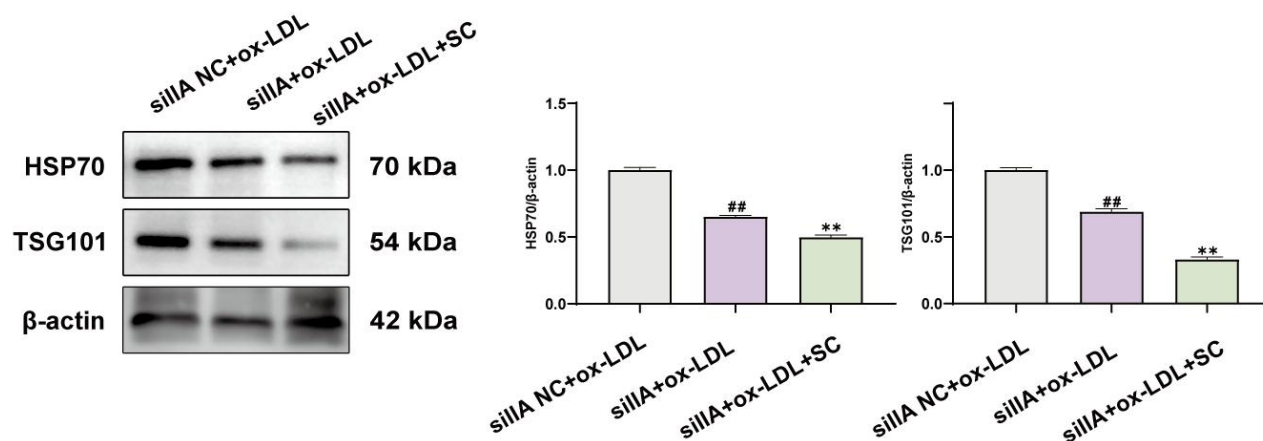


图 3-7 Western blot 检测细胞中干扰 NMMHC IIA 后对外泌体表面标志物 TSG101 与 HSP70 表达的影响

Figure 3-7 Effect of western blot on the expression of exosome surface marker TSG101 and HSP70 after interference with NMMHC IIA in cells

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

3.6.4.3 五味子丙素干预 siNMMHC IIA 后免疫荧光共定位观察外泌体释放行为

免疫荧光法观察干扰 NMMHC IIA 经过 SC 处理后的外泌体分泌状况。结果如图所示，siNMMHC IIA NC 组囊泡释放行为很强，其荧光强度大，细胞表面 TSG101 蛋白含量高，siNMMHC IIA 组外泌体囊泡的释放逐渐降低，TSG101 蛋白含量降低，与 siNMMHC IIA 组相比给药组更能有效抑制外-泌体释放，荧光强度弱。因此，SC 通过干扰 NMMHC IIA 具有显著抑制 THP-1 细胞在 ox-LDL 刺激下释放外泌体能力。

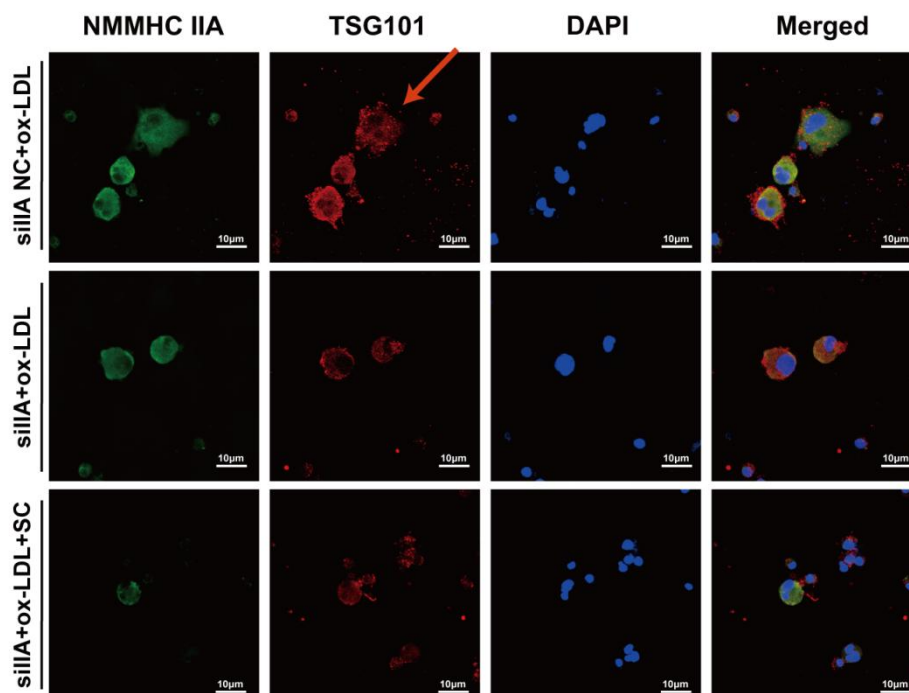


图 3-8 免疫荧光观察干扰 NMMHC IIA 后对外泌体释放行为及 SC 干预($\times 600$)

Figure 3-8 Immunofluorescence observation of exosome release behaviour after interference with NMMHC IIA and SC intervention ($\times 600$)

3.7 本章小结

近些年深入研究表明,外泌体通过清除细胞内物质,维持细胞内稳态,介导细胞间的通信,在各种病理和生理过程中发挥着重要作用^[96]。外泌体和囊泡运输、胞吞胞吐是近年来生物医学领域重要的研究热点,心血管疾病导致人类死亡的比率不断上升,而AS与心血管系统疾病之间关系密切,因此,研究AS的发生发展过程是大环境的必然趋势^[97]。AS作为一种炎症性疾病,是导致不稳定冠状动脉综合征和心源性猝死的重要原因之一。SC是从五味子中分离得到的联苯环辛二烯类木脂素,据文献报道,SC具有很好的心脑血管保护作用。此外,课题组前期研究也证实,五味子及其活性成分SC在保护AS等心血管疾病具有较好的治疗潜力。本研究探究SC如何通过调节靶标蛋白来控制外泌体的释放。

NMMHC IIA是中药治疗疾病的潜在靶点,在细胞囊泡的分泌、运输和胞质胞吐作用中的关键作用正在受到关注^[94]。中药活性成分可通过调节NMMHC IIA及其相互作用蛋白,发挥治疗疾病的作用。通过第二章蛋白质组学预测NMMHC IIA是差异蛋白之一,提示它可能是SC调节外泌体释放的潜在关键靶蛋白。在AS病理条件下,本研究中通过共定位实验检测外泌体标志蛋白TSG101的表达来鉴定外泌体的释放量,显示SC通过干预泡沫细胞抑制外泌体的释放行为。免疫共沉淀-银染-质谱结果显示,NMMHC IIA相互作用蛋白是HSP70,并进一步通过免疫印迹表达验证,结果显示一致。为探讨SC对NMMHC IIA与HSP70相互作用共同调节外泌体释放。对细胞蛋白以及上清液中外泌体蛋白进行免疫印迹检测,结果提示在药物作用下,NMMHC IIA和HSP70在细胞和上清液中的表达行为一致,推测SC能够抑制NMMHC IIA的表达来影响HSP70的生成,并且能够抑制外泌体的释放。HSP70作为外泌体膜上的热休克蛋白,可以与囊泡膜蛋白相互作用,作为分子伴侣,促进囊泡与靶膜的融合,并在突触释放过程中调节外泌体的释放。此外,HSP70可以参与外泌体中的蛋白质折叠和稳定。进一步对靶蛋白NMMHC IIA干扰,采用免疫荧光共定位及免疫印迹实验,结果显示抑制了外泌体释放。研究表明,NMMHC IIA和HSP70可以通过相互作用共同调节细胞外泌体的释放,这一发现为AS中的外泌体研究提供了一个新的视角。

通过寻找与 NMMHC IIA 相互作用介导的细胞各种生物学变化的蛋白成为目前广泛的研究热点。越来越多的研究证实了它在人类健康中的重要作用，包括其对静脉血栓形成的关键调节等方面的工作。即 SC 能够通过干预 NMMHC IIA 和 HSP70 相互作用来调控外泌体的释放，为中药及其活性成分干预蛋白-蛋白相互作用调控疾病研究提供理论和方法学借鉴。

第 4 章 五味子丙素对敲除 MYH9 基因改善动脉粥样硬化机制研究

4.1 引言

动脉粥样硬化作为一种全身性、进展性心血管系统疾病，不仅会导致冠心病、中风等严重心脑血管事件，还常常伴随外周动脉疾病、肾动脉狭窄和其他泛血管病变，其特征是动脉壁上动脉粥样硬化斑块进行性累积^[98]。内皮细胞(ECs)作为血管壁的第一道屏障，在维持血管稳态中起关键作用，内皮稳态的破坏是 AS 的早期阶段，其功能障碍会导致血管通透性增加、炎症反应加剧和脂质沉积，进而促进斑块形成^[99]。

目前广泛认可的发病机制是“损伤反应假说”，该假说认为 AS 的发生始于内皮细胞的功能损伤^[100]。内皮细胞特异性分子-1(ESM-1)是一种由血管内皮细胞分泌的可溶性蛋白聚糖，在炎症条件下促进单核细胞与内皮细胞的粘附，同时刺激血管平滑肌细胞迁移和增殖，是内皮功能障碍的新型生物标志物^[101]。此外，细胞间黏附分子-1(ICAM-1)和血管细胞黏附分子-1(VCAM-1)也在内皮损伤中起关键作用，ICAM-1 在受损内皮表面高表达，触发 AS，而 VCAM-1 在炎症条件下促进白细胞与内皮细胞的粘附，加剧血管损伤^[102]。已研究证据表明，在 AS 病理中观察到这些黏附分子的表达，其基因敲除可以防止易患 AS 的小鼠病变的发展^[103]。

本研究对动脉粥样硬化条件下泡沫细胞源外泌体(巨噬细胞组、泡沫细胞组、泡沫细胞+SC 组及干扰 NMMHC IIA NC 组、干扰 NMMHC IIA 组、干扰 NMMHC IIA+SC 组)对心血管内皮损伤、功能、靶点及机制研究，证实 SC 干预及干扰靶蛋白对心血管内皮细胞损伤具有显著的保护作用。体内通过建立了 ApoE^{-/-}小鼠模型和 MYH9^{+/-}ApoE^{-/-}小鼠模型，探讨小鼠中 NMMHC IIA-HSP70 相互作用的干预情况和功能评价以及 SC 的治疗潜力，并测定测定主动脉血管组织内皮中 TNF- α 、IL-1 β 、ICAM-1、VCAM-1、MCP-1 表达水平。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，从而验证其在动脉粥样硬化疾病中的实用价值，更是预防全身性心血管疾病的迫切任务。

4.2 实验材料

4.2.1 实验试剂

表 4-1 实验试剂

Table 4-1 Experimental reagents

主要试剂	厂家
0.45 μm PVDF 膜	德国 Merck
苏木精-伊红染液	上海碧云天生物技术有限公司
油红 O 染色试剂	上海碧云天生物技术有限公司
水合氯醛	上海麦克林生化科技有限公司
4%多聚甲醛	上海碧云天生物技术有限公司
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
DMEM 高糖培养基	赛默飞世尔科技公司
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
ECL 发光显影液	诺唯赞生物科技股份有限公司
异氟烷	江苏恒丰强生生物技术有限公司
RIPA 裂解液	上海碧云天生物技术有限公司
牛血清蛋白	上海麦克林生化科技有限公司
超声耦合剂	青岛海诺生物工程有限公司
SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液	上海碧云天生物技术有限公司
Tris	上海麦克林生化科技有限公司
蛋白酶磷酸酶抑制剂混合物	上海碧云天生物技术有限公司
二甲基亚砷	国药集团化学试剂有限公司
甘氨酸	上海麦克林生化科技有限公司
过硫酸铵	上海麦克林生化科技有限公司
特级南美胎牛血清	苏州双洙生物科技有限公司
青链霉素-新霉素三抗	上海逍鹏生物科技有限公司
磷酸盐缓冲液(PBS), pH7.4	塞维尔生物科技有限公司
OCT 包埋胶	上海睿铂赛
PKH67 染色试剂盒	上海贝博生物科技有限公司
抗荧光猝灭剂(含 DAPI)	苏州优逸兰迪生物科技有限公司

人白细胞介素-1 β (IL-1 β)ELISA 试剂盒	南京翼飞雪生物科技有限公司
人肿瘤坏死因子 α (TNF- α)ELISA 试剂盒	南京翼飞雪生物科技有限公司
通用型抗体稀释液	苏州新赛美生物技术有限公司
高脂高胆固醇纯化型饲料	协同医药生物工程有限公司
羟甲基纤维素钠	上海麦克林生化科技有限公司

4.2.2 实验仪器

表 4-2 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	上海易亨特
共聚焦显微镜	日本 Olympus
多普勒彩超仪	飞依诺科技股份有限公司
二氧化碳恒温箱	美国 Thermo 公司
SomnoSuite™数字式小动物呼吸麻醉机	美国 Kent Scientific
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	德国 Leica
超薄切片机	德国 Leica
HH-2 恒温水浴锅	江苏荣华仪器制造有限公司
制冰机	Grant

4.3 五味子丙素调控 exosome-siNMMHC IIA 保护 ox-LDL 诱导的 HUVECs 损伤研究

4.3.1 细胞培养

4.3.1.1 细胞复苏

从-80℃冰箱中取出装有 HUVECs 的冻存管，放置在 37℃水浴锅中速融后，向冻存管中加入 1 ml 含有 10%的特级南美胎牛血清和 1%的青链霉素-新霉素三抗的 DMEM 高糖培养基，反复轻轻吹打均匀后，1100 rpm 离心 4 min。弃去上清后，加入 1mL 完全

培养基至沉淀中，轻轻吹打混匀，将混悬液铺在直径为 100 mm 的培养皿内，加入 6 mL 完全培养基摇匀，置于在 37 °C 和 5% CO₂ 条件下在培养箱中培养。

4.3.1.2 细胞传代

将 HUVECs 在含有 10% 特级南美胎牛血清和 1% 的青链霉素-新霉素三抗的 DMEM 高糖培养基中培养，在 37 °C 和 5% CO₂ 条件下在培养箱中培养，待细胞长满培养皿中 80%-90% 时，将细胞转至 10 mL 离心管中，1100 rpm 的离心 4 min。弃上清，加入 1 mL 完全培养基至沉淀中，将细胞接种到新的培养皿中(1:3 传代)。

4.3.1.3 细胞冻存

方法同 2.3.1.3。

4.3.2 细胞分组及给药

将 HUVECs 长满至 80%-90% 时随机分为 exosome-空白组(将正常培养条件下巨噬细胞分泌外泌体刺激 HUVECs)；exosome-模型组(将泡沫细胞+100 µg/mL Lox-LDL 组分泌外泌体刺激 HUVECs)；exosome-给药组(将泡沫细胞+100 µg/mL Lox-LDL+1 µM SC 组分泌外泌体刺激 HUVECs)；exosome-siNMMHC IIA NC 组(将泡沫细胞 siNMMHC IIA NC+100 µg/mL Lox-LDL 组分泌外泌体刺激 HUVECs)；exosome-siNMMHC IIA 组(将泡沫细胞 siNMMHC IIA +100 µg/mL Lox-LDL 组分泌外泌体刺激 HUVECs)；exosome-siNMMHC IIA+给药组(将泡沫细胞 siNMMHC IIA+100 µg/mL Lox-LDL+1 µM SC 组分泌外泌体刺激 HUVECs)。

4.3.3 ELISA 检测泡沫细胞源外泌体对 HUVECs 上清液炎症因子的表达情况

按照 exosome-空白组、exosome-模型组、exosome-给药组细胞分组培养 24 h 后，收集细胞上清每组设置 3 个复孔，ELISA 试剂盒购自南京翼飞雪生物科技有限公司，实验步骤如下：

(1) 分别设置标准孔与样本孔，于标准孔内添加 50 µL 各浓度的标准品。

(2) 取 10 µL 待测样品注入样品孔，接着加入 40 µl 样本稀释液；而空白孔不做任何添加操作。

(3) 而空白孔不做任何处理，取 100 µL 辣根过氧化物酶(HRP)标记的检测抗体，逐孔加入标准孔和样品孔之中，随即用封板膜对孔进行封闭处理，37 °C 烘箱中孵育 60 min。

(4) 孵育结束，将 96 孔板中的液体倒弃并甩干，接着用洗涤液对板洗涤 5 次，每次

洗在吸水纸上完甩干，最后一次拍干。

(5)每孔加入底物 50 μL ，37 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中避光孵育 15 min。

(6)取 50 μL 终止液加入，以此终止反应进程。接着，在 450 nm 波长下对各孔的吸光度(OD 值)进行测量。

4.3.4 PKH-67 检测对泡沫细胞释放的外泌体追踪研究

按照贝博生物细胞膜染色试剂盒说明书操作，实验步骤如下：

(1)试剂配制：从冰箱中取出 PKH67 试剂，静置至室温后离心，用稀释液 B 将 PKH67 探针稀释 10 倍，再用 PBS 缓冲液将稀释过的染料进行 25 倍稀释，配置成染色工作液。

(2)将制备好的待测细胞 exosome-siNMMHC IIA NC 组用 100 μL 染色工作液重悬，细胞浓度为 10^7 个/mL。

(3)在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中孵育 5 min，再于 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min。

(4)离心后弃去上清液，收集细胞，用 PBS 洗涤细胞 2 次。

(5)随后将细胞铺在共聚焦小皿中培养 24 h。

(6)第二天，倒掉培养基，PBS 清洗，多聚甲醛固定 30 min。再用 PBS 洗 3 次，每次 3 min，然后加入含 DAPI 抗荧光猝灭剂 2 min 后，用 PBS 清洗 3 次，每次 3 min。随后用倒置荧光观察。

4.3.5 Western blot 法检测五味子丙素对 ox-LDL 诱导的 HUVECs 损伤的研究

方法同上 2.4.4.2。

4.4 五味子丙素调控 MYH9 基因敲除小鼠动脉粥样硬化损伤研究

4.4.1 MYH9+Apoe-KO 小鼠的构建

课题组已与赛业生物科技有限公司合作，采用 CRISPR/Cas9 技术构建。

4.4.2 动物实验分组及造模

5-7 周龄 SPF 级健康雄性 ApoE^{-/-}及 MYH9^{+/-}-ApoE^{-/-}小鼠，体重 18-22 g，为期一周的适应性饲养，在此期间，动物可自主摄取食物与水分。ApoE^{-/-}小鼠被分为 3 组，MYH9^{+/-}-ApoE^{-/-}小鼠被分为 2 组，每组 6 只。

分为 ApoE^{-/-} NC 组(正常饲料喂养)、ApoE^{-/-}模型组(高脂饲料喂养)、ApoE^{-/-}给药组(高脂饲料喂养+20 mg/kg SC)、MYH9^{+/-}-ApoE^{-/-}模型组(高脂饲料喂养)、MYH9^{+/-}-ApoE^{-/-}给药组(高脂饲料喂养+20 mg/kg SC)。正常饲料组喂养 12 周, 高脂饮食组喂养 12 周, 给药组造模 8 周后进行 20 mg/kg SC 灌胃, 每天一次, 进行 28 天。

4.4.3 动物样本采集

13 周后对小鼠实施 12 小时禁食处理, 经注射水合氯醛进行麻醉。随后进行小鼠眼眶采血操作, 将采集的血液离心, 吸取上层血清转移至 EP 管内, 收集心脏、主动脉放置于-80 °C冰箱中保存。

4.4.4 动物体重变化

每隔 2 周对小鼠体质量测量一次, 在此期间, 观察各组小鼠的精神状态、皮毛是否具有光泽、活动表现以及体质量的变化情况等。

4.4.5 多普勒超声评估小鼠血流速度

异氟烷气麻小鼠, 将已麻醉小鼠以仰卧姿势固定在动物操作台上胸肌及颈部裸露, 脱毛并涂上超声耦合剂。将探头放置于鼠右胸侧, Mark 点朝向鼠头部, 探头尾端向鼠右侧倾斜, 倾斜约 45°, 测出颈动脉血流及主动脉弓血流。

4.4.6 血管组织病理学观察 HE 染色

提前一夜开冰冻切片机, 照一夜紫外。将血管组织从-80 °C冰箱中取出, 用生理盐水冲洗后用 OCT 包埋胶固定在切片托上, 顺时针转动切片厚度为 10 μm, 随后进行 HE 染色, 实验步骤如下:

- (1) 用 4%多聚甲醛将切片血管组织固定 20 min。
- (2) 使用 PBS 清洗切片, 洗去切片上的多聚甲醛。
- (3) 随后使用苏木素进行染色 3 min。
- (4) 使用蒸馏水冲洗 1-2 s, 洗去残余的苏木素染液。
- (5) 用伊红染料进行染色 1 min。
- (6) 最后进行梯度脱水, 75%酒精 15 s, 95%酒精 15 s, 无水乙醇 15 s。
- (7) 使用正置荧光显微镜观察玻片, 并进行图像采集。

4.4.7 血管组织油红 O 染色

从-80 °C冰箱中取出血管切片，放置至室温进行油红 O 染色，实验步骤同 2.3.1.7。

4.4.8 免疫荧光法观察 NMMHC IIA 和 TSG101 共定位观察外泌体释放行为

从-80 °C冰箱中取出血管切片，放置至室温进行免疫荧光染色共定位，实验步骤同 3.4.1。

4.4.9 Western blot 法检测 MYH9+Apoe-KO 小鼠 NMMHC IIA 与 HSP70 的表达

从-80 °C冰箱中取出血管组织，放置至室温恢复室温后用 PBS 清洗 2 遍，将组织放入-80 °C冰箱冷冻 10 min，取出加入 100 μ L 裂解液研钵进行研磨，再加入 100 μ L 裂解液，继续研磨。随后实验步骤方法同上 2.4.4.2。

4.4.10 Western blot 法检测 MYH9+Apoe-KO 小鼠损伤蛋白的表达

从-80 °C冰箱中取出血管组织，放置至室温恢复室温后用 PBS 清洗 2 遍，将组织放入-80 °C冰箱冷冻 10 min，取出加入 100 μ L 裂解液研钵进行研磨，再加入 100 μ L 裂解液，继续研磨。随后实验步骤方法同上 2.4.4.2。

4.5 统计学方法

将数据导入 GraphPad Prism 8.0.2 进行计算和处理，并通过 Student *t* 检验或 ANOVA 分析检测数据的显著性。结果以平均值 $\pm$ 标准误 ($\bar{X} \pm \text{SEM}$) 的形式表示。*P* 值 <0.05 ($P<0.05$) 被认为是显著性差异并由(*)表示，而 *P* 值 <0.01 ($P<0.01$) 的显著性水平由(**)表示。

4.6 结果与分析

4.6.1 五味子丙素调控泡沫细胞源外泌体保护 ox-LDL 诱导的 HUVECs 损伤研究

4.6.1.1 ELISA 检测泡沫细胞源外泌体对 HUVECs 上清液炎性因子 TNF- α 和 IL-1 β 表达情况

为探讨不同组外泌体及 SC 对血管内皮细胞炎症因子的表达水平,采用 ELISA 检测 HUVECs 上清液中 TNF- α 和 IL-1 β 表达。结果如图所示,与 exosome-空白组相比,exosome-模型组炎症因子的表达水平显著升高;与 exosome-模型组相比,SC 干预后能够更加显著降低炎症因子的表达水平。结果提示,SC 干预能够显著降低 HUVECs 炎症因子的表达。

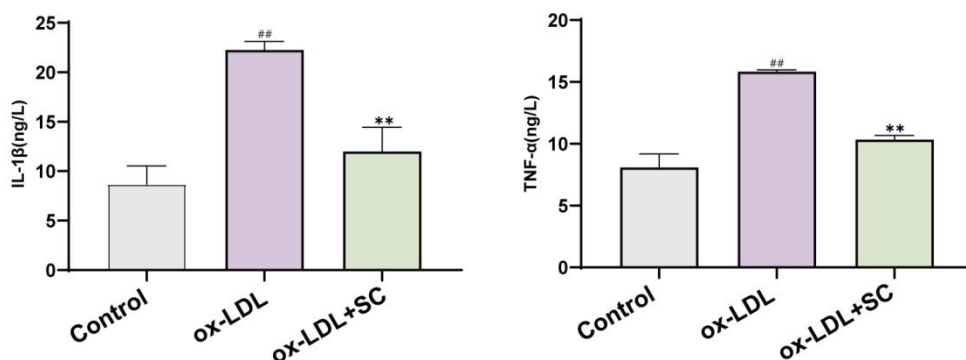


图 4-1 ELISA 检测 HUVECs 上清中 TNF- α 和 IL-1 β 炎症因子的表达

Figure 4-1 Expression of TNF- α and IL-1 β inflammatory factors in the supernatants of HUVECs detected by ELISA

注: 与正常对照组比较, ^{##} $P < 0.01$; 与 ox-LDL 组比较, ^{**} $P < 0.01$ 。

4.6.1.2 PKH-67 检测对泡沫细胞释放的外泌体追踪 HUVECs 研究

为探究外泌体在细胞间的传递和摄取情况,使用绿色荧光染料 PKH-67 研究了泡沫细胞来源的外泌体进入 HUVECs, 采用 PKH67 荧光标记对外泌体进行表征验证。荧光 PKH-67 标记的外泌体在荧光显微镜下显示绿色, 而 DAPI 标记的 HUVECs 显示蓝色。培养 24 h 后, 外泌体进入 HUVECs, 结果如图所示, 绿色荧光明显, 结果说明泡沫细胞来源的外泌体成功很好的进入了 HUVECs。

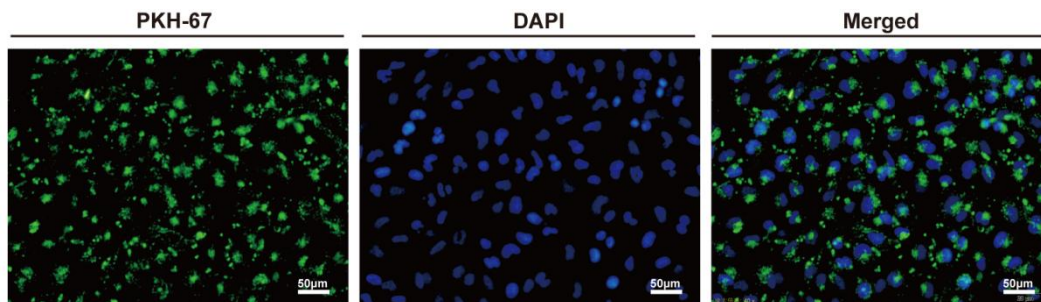


图 4-2 HUVEC 细胞摄取 PKH-67 荧光标记的外泌体($\times 200$)

Figure 4-2 Uptake of PKH-67 fluorescently labeled exosomes by HUVEC cells($\times 200$)

4.6.1.3 Western blot 法检测泡沫细胞源外泌体对 HUVECs 损伤研究

为验证泡沫细胞源外泌体对 HUVECs 损伤机制研究,采用 Western blot 法检测损伤因子 MCP-1、ICAM-1、VCAM-1 的表达水平影响。结果如图所示,如图 A,与 exosome-

空白组相比, *exosom*-模型组 HUVECs 的 MCP-1、ICAM-1、VCAM-1 的表达水平显著升高, 与 *exosome*-模型组相比, *exosom*-给药组 HUVECs 的 MCP-1、ICAM-1、VCAM-1 的表达水平显著降低; 如图 B, 与 *exosome*-siNMMHC IIA NC 组相比, *exosom*-siNMMHC IIA 组 HUVECs 的 MCP-1、ICAM-1、VCAM-1 的表达水平有明显降低趋势, 与 *exosome*-siNMMHC IIA 组相比, *exosom*-siNMMHC IIA+给药组 HUVECs 的 MCP-1、ICAM-1、VCAM-1 的表达水平显著降低。以上结果提示, 是 *exosom*-模型组引起 HUVECs 的损伤, 干扰 NMMHC IIA 靶蛋白后具有抑制 HUVECs 的损伤, SC 干预后具有明显的保护作用, 抑制细胞损伤。

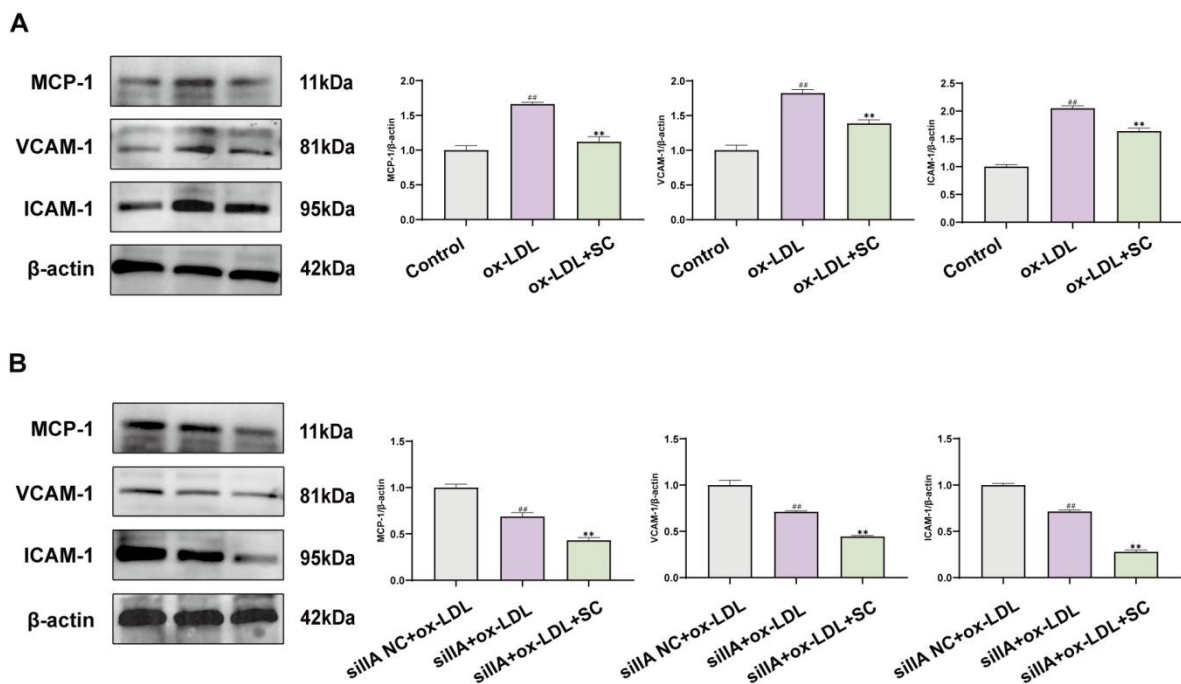


图 4-3 敲除靶蛋白 NMMHC IIA 后血管内皮细胞损伤蛋白的表达

Figure 4-3 Expression of vascular endothelial cell injury proteins after knockdown of the target protein NMMHC IIA

注: A 血管内皮细胞 ox-LDL 刺激后损伤蛋白表达与 HSP70 的表达; B 血管内皮细胞中敲除 NMMHC IIA 后损伤蛋白表达。与正常对照组比较, ^{##} $P<0.01$; 与 ox-LDL 组比较, ^{**} $P<0.01$; 与正常 NC 组比较, ^{##} $P<0.01$; 与干扰组比较, ^{**} $P<0.01$ 。

4.6.2 五味子丙素调控 MYH9 基因敲除小鼠动脉粥样硬化损伤研究

4.6.2.1 高脂喂养及五味子丙素对小鼠体质量的影响

在实验中, 结果如图所示, 正常饲料喂养组的小鼠活动正常, 皮毛呈现出光亮的色泽, 体重变化未出现显著改变。高脂饲料喂养组小鼠精神状态稍差, 体重逐渐上升且体

型肥胖，与正常饲料喂养组相比远远高于正常饲料组，SC 灌胃后，小鼠体重相比模型组有所下降。

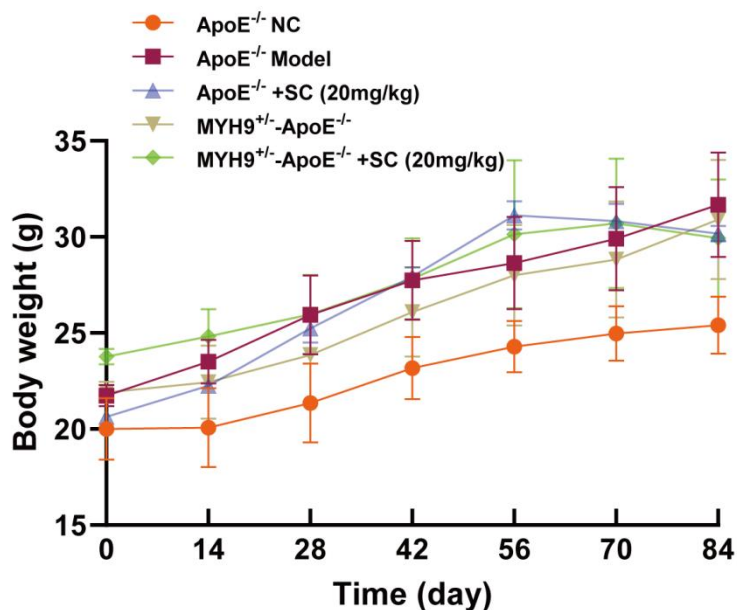


图 4-4 高脂喂养各组小鼠体重变化

Figure 4-4 Changes in body weight of mice in high-fat feeding groups

4.6.2.2 多普勒超声评估小鼠血流速度

为了探究 NMMHC IIA 以及 SC 在动脉粥样硬化中的作用及其对心脏功能的影响，通过多普勒超声技术，我们对小鼠的主动脉弓和颈动脉血流速度进行了精确测量。结果如图所示，ApoE^{-/-} NC 组和 MYH9^{+/-}-ApoE^{-/-}给药组的血流速度均维持在正常范围内，分别为主动脉弓 100-130 cm/s 和颈动脉 40-60 cm/s。相比之下，ApoE^{-/-}模型组的血流速度显著降低，表明动脉粥样硬化的发展导致血管狭窄或功能障碍。值得注意的是，ApoE^{-/-}给药组和 MYH9^{+/-}-ApoE^{-/-}模型组相较于 ApoE^{-/-}模型组血流速度有所回升，尤其是 MYH9^{+/-}-ApoE^{-/-}给药组，其血流速度的改善更为显著，其说明 SC 及靶基因敲除对动脉粥样硬化有一定改善作用。

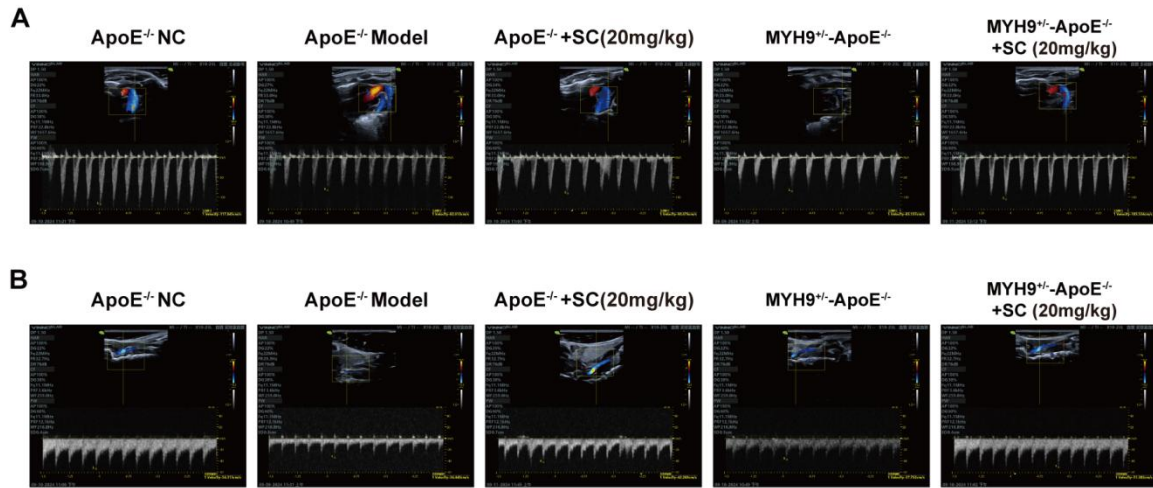


图 4-5 各组小鼠的主动脉弓和颈动脉血流速度图

Figure 4-5 Velocity maps of aortic arch and carotid artery blood flow in each group of mice

注：A 各组小鼠主动脉弓血流；B 各组小鼠颈动脉血流。

4.6.2.3 五味子丙素调控 MYH9 基因敲除小鼠血管组织病理学观察 HE 染色

为了进一步观察血管的斑块形成及病变程度，我们剥离主动脉血管外层脂肪，进行 HE 染色观察。结果如图所示，与 ApoE^{-/-} NC 组相比，ApoE^{-/-} 模型组斑块形成明显，血管内膜明显增厚，内皮层破坏严重；与 ApoE^{-/-} 模型组相比，ApoE^{-/-} 给药组斑块稍微减轻；与 ApoE^{-/-} 给药组相比，MYH9^{+/-}-ApoE^{-/-} 模型组斑块程度相差不大；与 MYH9^{+/-}-ApoE^{-/-} 模型组相比，MYH9^{+/-}-ApoE^{-/-} 给药组斑块减轻程度明显，无明显斑块。结果提示，动脉粥样硬化模型造模成功，SC 及靶基因敲除小鼠对斑块有一定改善作用。

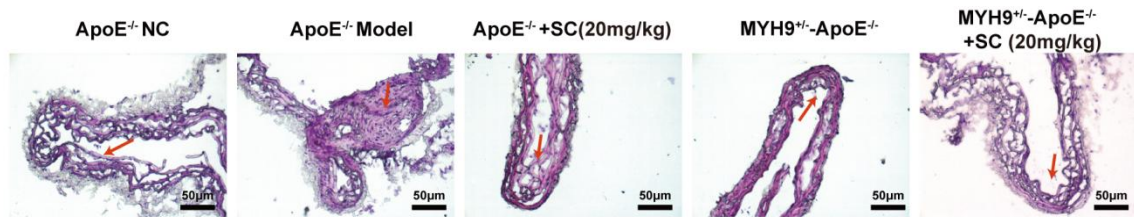


图 4-6 各组小鼠病理学观察 HE 染色(×200)

Figure 4-6 Pathological observation of mice in each group HE staining (×200)

4.6.2.4 五味子丙素调控 MYH9 基因敲除小鼠血管组织脂质堆积观察

脂质堆积也是动脉粥样硬化一个关键因素，通过油红 O 染色观察脂质堆积。结果如图所示，与 ApoE^{-/-} NC 组相比，ApoE^{-/-} 模型组脂质沉积较为明显；与 ApoE^{-/-} 模型组相比，SC 干预后脂质堆积减轻；与 ApoE^{-/-} 相比，MYH9^{+/-}-ApoE^{-/-} 组的病理改变有所缓解，且在 SC 干预后，脂质堆积的改善更为显著。这些结果表明，MYH9 基因敲除和 SC 干预对于改善血管健康具有积极作用。

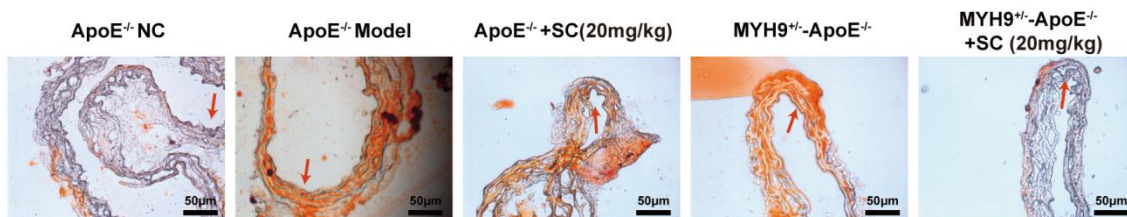


图 4-7 各组小鼠油红 O 染色(×200)

Figure 4-7 Oil red O staining of mice in each group (×200)

4.6.2.5 免疫荧光法观察血管组织 NMMHC IIA 和 TSG101 共定位观察外泌体释放行为

体外实验已表明 NMMHC IIA 是控制细胞外泌体分泌中的潜在作用靶点,我们在体内也进行了验证。为此,我们采用免疫荧光法研究了 NMMHC IIA 与 TSG101 的共定位,结果如图所示, $ApoE^{-/-}$ 模型组与 $ApoE^{-/-}$ NC 组相比, NMMHC IIA 与 TSG101 荧光强度表达明显升高,外泌体释放强度增加;与 $ApoE^{-/-}$ 模型组相比, $ApoE^{-/-}$ 给药组荧光强度减弱,外泌体释放强度降低; $MYH9^{+/-}$ - $ApoE^{-/-}$ 模型组与 $ApoE^{-/-}$ 模型组相比荧光强度减弱,能够降低 NMMHC IIA 与 TSG101 荧光强度的表达;与 $MYH9^{+/-}$ - $ApoE^{-/-}$ 模型组相比, $MYH9^{+/-}$ - $ApoE^{-/-}$ 给药组 SC 干预后 NMMHC IIA 与 TSG101 荧光强度显著减弱,结果提示敲除 MYH9 基因及 SC 干预能够显著抑制外泌体释放能力。

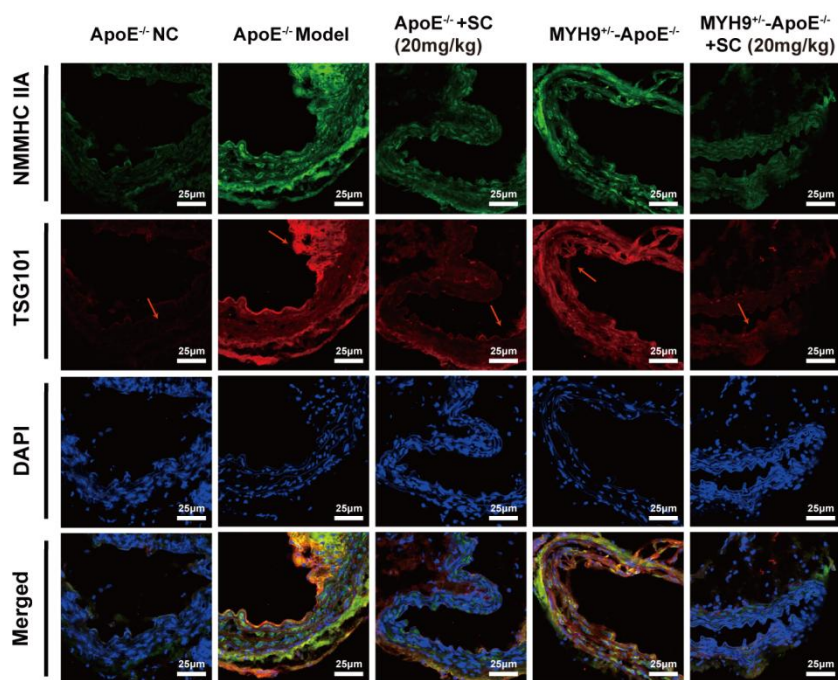


图 4-8 NMMHC IIA 和 TSG101 在各组小鼠血管中的免疫荧光共定位(×400)

Figure 4-8 Immunofluorescence co-localisation of NMMHC IIA and TSG101 in blood vessels of various groups of mice (×400)

4.6.2.6 Western blot 法检测 MYH9+Apoe-KO 小鼠 NMMHC IIA 与 HSP70 的表达

通过 Western blot 检测不同组血管组织中 NMMHC IIA 和 HSP 70 的表达,发现敲除 MYH9 后 NMMHC IIA 和 HSP70 蛋白表达水平降低, TSG101 外泌体标志蛋白的表达降低, SC 干预后 NMMHC IIA 和 HSP70 蛋白表达极显著降低。结果提示, NMMHC IIA 和 HSP 70 的相互作用共同调节小鼠中外泌体的释放,具有一定预防动脉粥样硬化疾病作用。

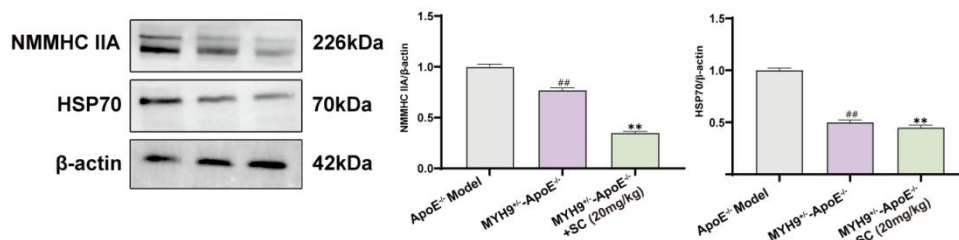


图 4-9 Western blot 分析各组小鼠血管中 NMMHC IIA 和 HSP70 的表达

Figure 4-9 Western blot analysis of NMMHC IIA and HSP70 expression in the blood vessels of various groups of mice

注: 与 ApoE^{-/-}模型组比较, ## $P<0.01$; 与 MYH9^{+/-}-ApoE^{-/-}模型组比较, ** $P<0.01$ 。

4.6.2.7 Western blot 法检测 MYH9+ApoE-KO 小鼠损伤蛋白的表达

为验证体内敲除靶基因 MYH9 对损伤机制研究,采用 Western blot 法检测损伤因子 MCP-1、ICAM-1、VCAM-1 的表达水平影响。结果如图所示,如图 A,与 ApoE^{-/-} NC 组相比, ApoE^{-/-}模型组中的 MCP-1、ICAM-1、VCAM-1 的表达水平显著升高,与 ApoE^{-/-}模型组相比, ApoE^{-/-}给药组中的 MCP-1、ICAM-1、VCAM-1 的表达水平显著降低;如图 B,与 ApoE^{-/-}模型组相比, MYH9^{+/-}-ApoE^{-/-}模型组中的 MCP-1、ICAM-1、VCAM-1 的表达水平有明显降低趋势,与 MYH9^{+/-}-ApoE^{-/-}模型组相比, MYH9^{+/-}-ApoE^{-/-}给药组中的 MCP-1、ICAM-1、VCAM-1 的表达水平显著降低。以上结果提示,是高脂饲料 ApoE^{-/-}模型组引起血管损伤,敲除 MYH9 靶基因后具有抑制血管损伤因子改善动脉粥样硬化, SC 干预后具有明显的保护作用,抑制损伤。

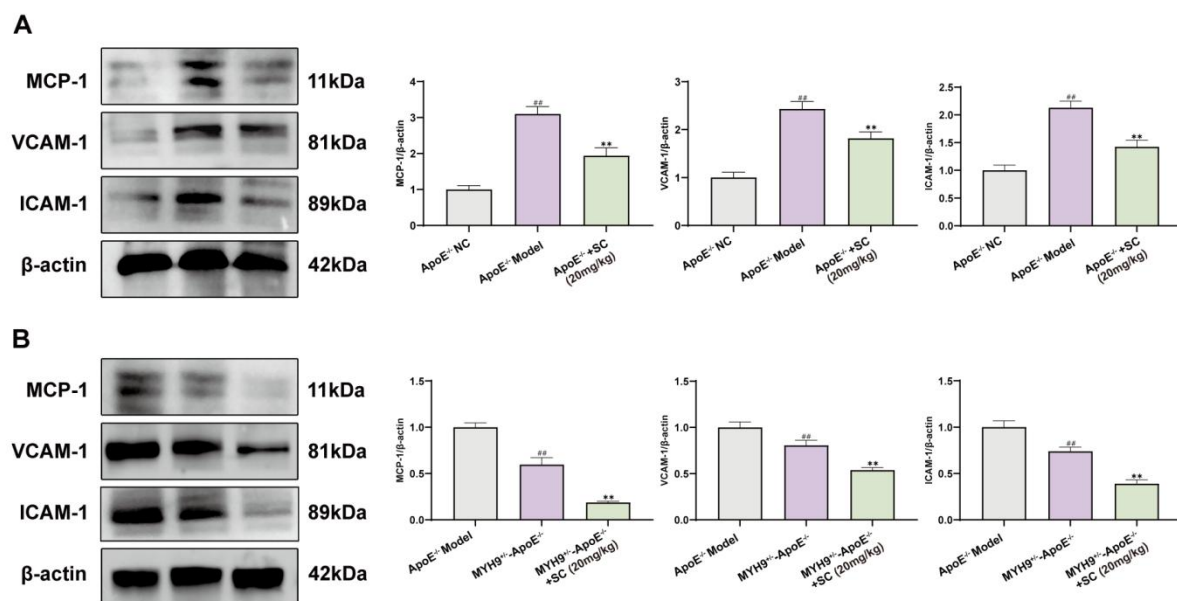


图 4-10 Western blot 分析各组小鼠血管中损伤蛋白的表达

Figure 4-10 Western blot analysis of the expression of injury proteins in the blood vessels of mice in each group

注: A 各组小鼠高脂喂养后损伤蛋白的表达; B 各组小鼠敲除 MYH9 后损伤蛋白表达。与 ApoE^{-/-} NC 组比较, ^{##} $P<0.01$; 与 ApoE^{-/-}模型组比较, ^{**} $P<0.01$; 与 ApoE^{-/-}模型组比较, ^{##} $P<0.01$; 与 MYH9^{+/-}-ApoE^{-/-}模型组比较, ^{**} $P<0.01$ 。

4.7 本章小结

大量研究表明,炎症反应和内皮损伤是导致 AS 发病的最主要早期机制^[102]。炎症反应在 AS 的发生和发展中起着核心作用,炎症细胞和炎症介质的参与促进了血管壁的损伤和斑块的形成,内皮损伤则导致内皮功能障碍,增加了血管通透性,促进了脂质沉积和炎症细胞的浸润,这两种机制相互作用,共同推动了 AS 的进展^[102, 104]。因此,针对炎症反应和内皮损伤的干预策略可能成为预防和治疗动脉粥样硬化的重要方向。

MYH9 在内皮细胞中表达,参与细胞骨架的重组和细胞力学信号的传导,MYH9 的功能异常可能导致内皮细胞屏障功能受损,增加血管通透性,促进炎症因子和脂质的浸润,从而加速 AS 的发生^[105]。本章通过体内外实验探讨了五味子丙素(SC)及其调控 MYH9 基因敲除对动脉粥样硬化(AS)的保护作用及其机制。体外实验表明,SC 能够显著抑制泡沫细胞源外泌体诱导的血管内皮细胞(HUVECs)炎症反应和损伤,降低炎症因子(TNF- α 、IL-1 β)及黏附分子(MCP-1、ICAM-1、VCAM-1)的表达。同时,SC 通过调控 NMMHC IIA-HSP70 相互作用,抑制外泌体的释放,从而减轻内皮细胞损伤。体内实验进一步证实,通过构建 ApoE^{-/-} NC 组(正常饲料喂养)、ApoE^{-/-} 模型组(高脂饲料喂养)、

ApoE^{-/-} 给药组(高脂饲料喂养+20 mg/kg SC)、MYH9^{+/-}-ApoE^{-/-}模型组(高脂饲料喂养)、MYH9^{+/-}-ApoE^{-/-}给药组(高脂饲料喂养+20 mg/kg SC)小鼠进行验证改善 AS 疾病。SC 干预及 MYH9 基因敲除能够显著改善高脂饮食诱导的 ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化病变,减少斑块形成和脂质堆积,并降低血管炎症和损伤蛋白的表达。此外,SC 通过抑制 NMMHC IIA 与 HSP70 的相互作用,减少外泌体释放,从而发挥抗 AS 作用。这些结果表明,SC 通过调控 MYH9 基因及其相关信号通路,显著改善动脉粥样硬化病变。

综上所述,实验证明干扰 NMMHC IIA 可通过抑制泡沫细胞释放外泌体,降低血管内皮细胞损伤。通过敲除 MYH9 基因为 AS 早期预防及诊断提供了新的生物标志物。

第 5 章 总结与展望

5.1 结论

中药活性成分 SC 干预 NMMHC IIA 和 HSP70 相互作用来调控巨噬细胞外泌体的释放, 通过体内外实验在 AS 条件下, 敲除靶蛋白及 SC 干预跨细胞调控, 进而起到预防防止 AS 疾病作用。整合蛋白质组学和生物信息学方法来确定 MYH9(NMMHC IIA)是 SC 调节巨噬细胞囊泡释放的关键靶点, 研究了 SC 对巨噬细胞 NMMHC IIA 与 HSP70 相互作用的影响改善 AS 机制探究。揭示了 SC 防治 AS 性心血管疾病的作用靶点、特色与信号途径, 为 SC 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, 也为中药活性成分干预蛋白-蛋白相互作用调控疾病研究提供方法学借鉴。

主要发现总结如下:

- (1)蛋白质组学和生物信息学方法预测抗 AS 靶点 MYH9(NMMHC IIA)。
- (2)SC 通过调控 NMMHC IIA-HSP70 相互作用抑制外泌体释放。
- (3)SC 通过抑制外泌体释放改善内皮细胞损伤以及炎症反应。
- (4)SC 通过调控 MYH9 基因改善动脉粥样硬化病变, 减少斑块形成和脂质堆积, 并降低血管炎症和损伤蛋白的表达。
- (5)综合利用生物学、中药学等多交叉学科技术方法, 多层次阐明五味子丙素调控脂质代谢异常下动脉粥样硬化形成及进展的作用机制。

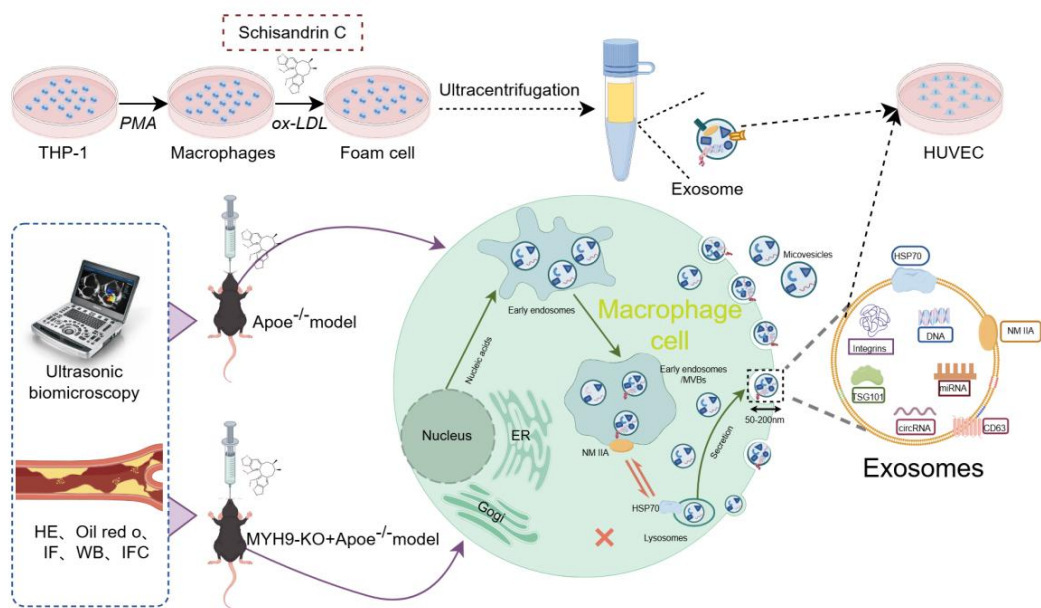


图 5-1 五味子丙素通过干预 NMMHC IIA 与 HSP70 相互作用介导外泌体分泌防治动脉粥样硬化机制图

Figure 5-1 Mechanisms of atherosclerosis prevention and treatment by Schisandra chinensis by interfering with exosome secretion mediated by NMMHC IIA and HSP70 interactions Figure

5.2 展望

(1)外泌体成分复杂，本研究尚未详细探讨其具体分子功能及 SC 如何通过调节外泌体中的分子机制实现跨细胞调控。未来研究将深入分析外泌体中分子机制及其在细胞间通讯中的作用。

(2)虽然本研究证实了 NMMHC IIA 与 HSP70 在外泌体释放中的相互作用，仅停留在细胞层面，体内没有深入研究囊泡释放机制研究，未来可进一步解析 NMMHC IIA 与 HSP70 的结合位点进行探讨。

参考文献

- [1] 武洪方, 于静, 袁晓璞, 等. 血府逐瘀汤调控 cAMP/PKA/PPAR γ 信号通路对动脉粥样硬化大鼠炎性损伤的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2025,36(02):168-174.
- [2] Michos E D, McEvoy J W, Blumenthal R S. Lipid Management for the Prevention of Atherosclerotic Cardiovascular Disease[J]. N Engl J Med, 2019,381(16):1557-1567.
- [3] Xu S, Ilyas I, Little P J, et al. Endothelial Dysfunction in Atherosclerotic Cardiovascular Diseases and Beyond: From Mechanism to Pharmacotherapies[J]. Pharmacol Rev, 2021,73(3):924-967.
- [4] 彭超杰, 南淞华, 吴林柯, 等. 茯苓杏仁甘草汤调控巨噬细胞极化抑制动脉粥样硬化病变的进展[J]. 中国比较医学杂志, 2024,34(10):38-46.
- [5] Yalcinkaya M, Fotakis P, Liu W, et al. Cholesterol accumulation in macrophages drives NETosis in atherosclerotic plaques via IL-1 β secretion[J]. Cardiovasc Res, 2023,119(4):969-981.
- [6] Sterpetti A V. Inflammatory Cytokines and Atherosclerotic Plaque Progression. Therapeutic Implications[J]. Curr Atheroscler Rep, 2020,22(12):75.
- [7] Blagov A V, Markin A M, Bogatyreva A I, et al. The Role of Macrophages in the Pathogenesis of Atherosclerosis[J]. Cells, 2023,12(4).
- [8] Li W, Sama A E, Wang H. Role of HMGB1 in cardiovascular diseases[J]. Curr Opin Pharmacol, 2006,6(2):130-135.
- [9] Kruth H S. Fluid-phase pinocytosis of LDL by macrophages: a novel target to reduce macrophage cholesterol accumulation in atherosclerotic lesions[J]. Curr Pharm Des, 2013,19(33):5865-5872.
- [10] Zhu J, Liu B, Wang Z, et al. Exosomes from nicotine-stimulated macrophages accelerate atherosclerosis through miR-21-3p/PTEN-mediated VSMC migration and proliferation[J]. Theranostics, 2019,9(23):6901-6919.
- [11] De Meyer G R Y, Zurek M, Puylaert P, et al. Programmed death of macrophages in atherosclerosis: mechanisms and therapeutic targets[J]. Nat Rev Cardiol, 2024,21(5):312-325.
- [12] Pekayvaz K, Gold C, Hoseinpour P, et al. Mural cell-derived chemokines provide a protective niche to safeguard vascular macrophages and limit chronic inflammation[J]. Immunity, 2023,56(10):2325-2341.
- [13] Ma C, Li Y, Tian M, et al. G α Regulates Macrophage Foam Cell Formation During Atherosclerosis[J]. Circ Res, 2024,134(7):e34-e51.
- [14] Wang B, Tang X, Yao L, et al. Disruption of USP9X in macrophages promotes foam cell formation and atherosclerosis[J]. J Clin Invest, 2022,132(10).
- [15] Jiang H, Zhou Y, Nabavi S M, et al. Mechanisms of Oxidized LDL-Mediated Endothelial Dysfunction and Its Consequences for the Development of Atherosclerosis[J]. Front Cardiovasc Med, 2022,9:925923.
- [16] Ji M, Wei Y, Ye Z, et al. In Vivo Fluorescent Labeling of Foam Cell-Derived Extracellular Vesicles as Circulating Biomarkers for In Vitro Detection of Atherosclerosis[J]. J Am Chem Soc, 2024,146(14):10093-10102.
- [17] Fan L, Liu J, Hu W, et al. Targeting pro-inflammatory T cells as a novel therapeutic approach to potentially resolve atherosclerosis in humans[J]. Cell Res, 2024,34(6):407-427.
- [18] Song J, Zhang Y, Frieler R A, et al. Itaconate suppresses atherosclerosis by activating a Nrf2-dependent antiinflammatory response in macrophages in mice[J]. J Clin Invest, 2024,134(10):4601-4615.

- 2023,134(3).
- [19] Tisch N, Mogler C, Stojanovic A, et al. Caspase-8 in endothelial cells maintains gut homeostasis and prevents small bowel inflammation in mice[J]. *EMBO Mol Med*, 2022,14(6):e14121.
- [20] Ramalingam P, Poulos M G, Lazzari E, et al. Chronic activation of endothelial MAPK disrupts hematopoiesis via NF κ B dependent inflammatory stress reversible by SCGF[J]. *Nat Commun*, 2020,11(1):666.
- [21] Theofilis P, Sagris M, Oikonomou E, et al. Inflammatory Mechanisms Contributing to Endothelial Dysfunction[J]. *Biomedicines*, 2021,9(7).
- [22] Fang F, Wang E, Fang M, et al. Macrophage-based pathogenesis and theranostics of vulnerable plaques[J]. *Theranostics*, 2025,15(4):1570-1588.
- [23] Su Z, Wang J, Xiao C, et al. Functional role of Ash2l in oxLDL induced endothelial dysfunction and atherosclerosis[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2024,81(1):62.
- [24] Zhang Y, Li J, Xu R, et al. Nogo-B mediates endothelial oxidative stress and inflammation to promote coronary atherosclerosis in pressure-overloaded mouse hearts[J]. *Redox Biol*, 2023,68:102944.
- [25] Shi L, Li Y, Xu X, et al. Brown adipose tissue-derived Nrg4 alleviates endothelial inflammation and atherosclerosis in male mice[J]. *Nat Metab*, 2022,4(11):1573-1590.
- [26] Wang Z, Niu K, Wu Y, et al. A dual Keap1 and p47(phox) inhibitor Ginsenoside Rb1 ameliorates high glucose/ox-LDL-induced endothelial cell injury and atherosclerosis[J]. *Cell Death Dis*, 2022,13(9):824.
- [27] Pan H, Ho S E, Xue C, et al. Atherosclerosis Is a Smooth Muscle Cell-Driven Tumor-Like Disease[J]. *Circulation*, 2024,149(24):1885-1898.
- [28] Zhang S, Lin H, Wang J, et al. Sensing ceramides by CYSLTR2 and P2RY6 to aggravate atherosclerosis[J]. *Nature*, 2025.
- [29] Dong Y, Wang B, Du M, et al. Targeting Epsins to Inhibit Fibroblast Growth Factor Signaling While Potentiating Transforming Growth Factor-beta Signaling Constrains Endothelial-to-Mesenchymal Transition in Atherosclerosis[J]. *Circulation*, 2023,147(8):669-685.
- [30] 刘爱宁, 杨文刚, 鞠树红, 等. 不同剂量瑞舒伐他汀对实验性动脉粥样硬化大鼠过氧化及血管平滑肌增生的影响[J]. *河北医科大学学报*, 2015,36(02):133-136.
- [31] Zhang F, Tang J, Lai Y, et al. Smooth muscle cell Piezo1 is essential for phenotypic switch and neointimal hyperplasia[J]. *Br J Pharmacol*, 2025.
- [32] 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.
- [33] Lee R C, Feinbaum R L, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*[J]. *Cell*, 1993,75(5):843-854.
- [34] Shao J, Zaro J, Shen Y. Advances in Exosome-Based Drug Delivery and Tumor Targeting: From Tissue Distribution to Intracellular Fate[J]. *Int J Nanomedicine*, 2020,15:9355-9371.
- [35] Tang X, Leng M, Tang W, et al. The Roles of Exosome-Derived microRNAs in Cardiac Fibrosis[J]. *Molecules*, 2024,29(6).
- [36] Abdelsalam M, Ahmed M, Osaid Z, et al. Insights into Exosome Transport through the Blood-Brain Barrier and the Potential Therapeutic Applications in Brain Diseases[J]. *Pharmaceutics (Basel)*, 2023,16(4).
- [37] Kalluri R, LeBleu V S. The biology, function, and biomedical applications of exosomes[J]. *Science*, 2020,367(6478).
- [38] Zhu J, Liu B, Wang Z, et al. Exosomes from nicotine-stimulated macrophages accelerate

- atherosclerosis through miR-21-3p/PTEN-mediated VSMC migration and proliferation[J]. *Theranostics*, 2019,9(23):6901-6919.
- [39] Isaac R, Reis F C G, Ying W, et al. Exosomes as mediators of intercellular crosstalk in metabolism[J]. *Cell Metab*, 2021,33(9):1744-1762.
- [40] Liu Y, Wang M, Yu Y, et al. Advances in the study of exosomes derived from mesenchymal stem cells and cardiac cells for the treatment of myocardial infarction[J]. *Cell Commun Signal*, 2023,21(1):202.
- [41] Wang C, Li Z, Liu Y, et al. Exosomes in atherosclerosis: performers, bystanders, biomarkers, and therapeutic targets[J]. *Theranostics*, 2021,11(8):3996-4010.
- [42] Li C, Fang F, Wang E, et al. Engineering extracellular vesicles derived from endothelial cells sheared by laminar flow for anti-atherosclerotic therapy through reprogramming macrophage[J]. *Biomaterials*, 2025,314:122832.
- [43] Xu C, Zhang Z, Liu N, et al. Small extracellular vesicle-mediated miR-320e transmission promotes osteogenesis in OPLL by targeting TAK1[J]. *Nat Commun*, 2022,13(1):2467.
- [44] Sahoo S, Adamiak M, Mathiyalagan P, et al. Therapeutic and Diagnostic Translation of Extracellular Vesicles in Cardiovascular Diseases: Roadmap to the Clinic[J]. *Circulation*, 2021,143(14):1426-1449.
- [45] Ni H, Ge Y, Zhuge Y, et al. LncRNA MIR181A1HG Deficiency Attenuates Vascular Inflammation and Atherosclerosis[J]. *Circ Res*, 2025.
- [46] Han C, Yang J, Zhang E, et al. Metabolic labeling of cardiomyocyte-derived small extracellular-vesicle (sEV) miRNAs identifies miR-208a in cardiac regulation of lung gene expression[J]. *J Extracell Vesicles*, 2022,11(10):e12246.
- [47] 林蓓佑, 李平. 外泌体相关微 RNA 在急性心肌梗死中的研究进展[J]. *医学综述*, 2018,24(19):3756-3760.
- [48] 乔树雅, 田田. 干细胞外泌体用于缺血性疾病治疗的研究进展[J]. *药学进展*, 2023,47(11):817-828.
- [49] Woo S, Kyung D, Lee S H, et al. TXNIP Suppresses the Osteochondrogenic Switch of Vascular Smooth Muscle Cells in Atherosclerosis[J]. *Circ Res*, 2023,132(1):52-71.
- [50] Li L, Zhang F, Zhang J, et al. Identifying Serum Small Extracellular Vesicle MicroRNA as a Noninvasive Diagnostic and Prognostic Biomarker for Ovarian Cancer[J]. *ACS Nano*, 2023,17(19):19197-19210.
- [51] Liang Q, Gao Y, Tan H, et al. Effects of four Si-Wu-Tang's constituents and their combination on irradiated mice[J]. *Biol Pharm Bull*, 2006,29(7):1378-1382.
- [52] Wang C, Wu H, Xing Y, et al. Endothelial-derived extracellular microRNA-92a promotes arterial stiffness by regulating phenotype changes of vascular smooth muscle cells[J]. *Sci Rep*, 2022,12(1):344.
- [53] Ma L, Liu Y, Liu C, et al. lncRNA, miRNA, and mRNA of plasma and tumor-derived exosomes of cardiac myxoma-related ischaemic stroke[J]. *Sci Data*, 2025,12(1):91.
- [54] Puthanveetil P, O'Hagan K P. miR-133a-A Potential Target for Improving Cardiac Mitochondrial Health and Regeneration After Injury[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2022,80(2):187-193.
- [55] Moghaddam A S, Afshari J T, Esmaceli S, et al. Cardioprotective microRNAs: Lessons from stem cell-derived exosomal microRNAs to treat cardiovascular disease[J]. *Atherosclerosis*, 2019,285:1-9.
- [56] Izzotti A, Calin G A, Arrigo P, et al. Downregulation of microRNA expression in the lungs of rats exposed to cigarette smoke[J]. *FASEB J*, 2009,23(3):806-812.

-
- [57] Liu J, Wei E, Wei J, et al. MiR-126-HMGB1-HIF-1 Axis Regulates Endothelial Cell Inflammation during Exposure to Hypoxia-Acidosis[J]. *Dis Markers*, 2021,2021:4933194.
 - [58] 马清济, 陈亮, 潘美宇. 冠状动脉计算机断层扫描血管造影对老年急性冠状动脉综合征患者斑块特征的诊断效能及对预后的预测价值[J]. *中华老年多器官疾病杂志*, 2024,23(01):32-37.
 - [59] Liu D, Cornel E J, Du J. Renoprotective Angiographic Polymersomes[J]. *ADVANCED FUNCTIONAL MATERIALS*, 2021,31(1):13.
 - [60] Feng C, Xiong Z, Sun X, et al. Beyond antioxidation: Harnessing the CeO(2) nanoparticles as a renoprotective contrast agent for in vivo spectral CT angiography[J]. *Biomaterials*, 2023,299:122164.
 - [61] Nurmohamed N S, Danad I, Jukema R A, et al. Development and Validation of a Quantitative Coronary CT Angiography Model for Diagnosis of Vessel-Specific Coronary Ischemia[J]. *JACC Cardiovasc Imaging*, 2024,17(8):894-906.
 - [62] 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]. *Biomed Pharmacother*, 2018,99:537-542.
 - [63] Olas B. Cardioprotective Potential of Berries of *Schisandra chinensis* Turcz. (Baill.), Their Components and Food Products[J]. *Nutrients*, 2023,15(3).
 - [64] Xu H, Wang W, Li X, 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]. *Chem Biodivers*, 2023,20(12):e202301298.
 - [65] Chun J N, Cho M, So I, et al. The protective effects of *Schisandra chinensis* fruit extract and its lignans against cardiovascular disease: a review of the molecular mechanisms[J]. *Fitoterapia*, 2014,97:224-233.
 - [66] Wang Z, Xie S, Li L, et al. Schisandrin C inhibits AKT1-regulated cell proliferation in A549 cells[J]. *Int Immunopharmacol*, 2024,142(Pt A):113110.
 - [67] 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]. *Phytother Res*, 2019,33(3):779-790.
 - [68] 张旻昱, 吴宏伟, 许利平, 等. 五味子及其活性成分治疗心脑血管疾病药理作用的研究进展[J]. *中国中药杂志*, 2018,43(08):1536-1546.
 - [69] Takanche J S, Lee Y, Kim J, et al. Anti-inflammatory and antioxidant properties of Schisandrin C promote mitochondrial biogenesis in human dental pulp cells[J]. *Int Endod J*, 2018,51(4):438-447.
 - [70] Tu B, Song K, Zhou Z, et al. SLC31A1 loss depletes mitochondrial copper and promotes cardiac fibrosis[J]. *Eur Heart J*, 2025.
 - [71] 任佳, 徐菱, 许孙红, 等. 五味子丙素缓解高脂饮食喂养 ApoE^{-/-}小鼠的动脉粥样硬化与炎症[J]. *中国药理学通报*, 2020,36(05):698-702.
 - [72] Bian W, Jing X, Yang Z, et al. Downregulation of LncRNA NORAD promotes Ox-LDL-induced vascular endothelial cell injury and atherosclerosis[J]. *Aging (Albany NY)*, 2020,12(7):6385-6400.
 - [73] Ganz P, Heidecker B, Hveem K, et al. Development and Validation of a Protein-Based Risk Score for Cardiovascular Outcomes Among Patients With Stable Coronary Heart Disease[J]. *JAMA*, 2016,315(23):2532-2541.
 - [74] Sabatine M S. Using Aptamer-Based Technology to Probe the Plasma Proteome for

- Cardiovascular Disease Prediction[J]. JAMA, 2016,315(23):2525-2526.
- [75] Helgason H, Eiriksdottir T, Ulfarsson M O, et al. Evaluation of Large-Scale Proteomics for Prediction of Cardiovascular Events[J]. JAMA, 2023,330(8):725-735.
- [76] Lin S, Zhou T, Cai S, et al. Proteomic characteristics of saliva in patients with different subgroups of IgG4-RD[J]. Front Immunol, 2022,13:1026921.
- [77] Liang Y, Duan L, Lu J, et al. Engineering exosomes for targeted drug delivery[J]. Theranostics, 2021,11(7):3183-3195.
- [78] Li Y, Wu J, Liu J, et al. Artificial exosomes for translational nanomedicine[J]. J Nanobiotechnology, 2021,19(1):242.
- [79] Xiao M, Zhang J, Chen W, et al. M1-like tumor-associated macrophages activated by exosome-transferred THBS1 promote malignant migration in oral squamous cell carcinoma[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2018,37(1):143.
- [80] Asleh K, Negri G L, Spencer Miko S E, et al. Proteomic analysis of archival breast cancer clinical specimens identifies biological subtypes with distinct survival outcomes[J]. Nat Commun, 2022,13(1):896.
- [81] Zou W, Lai M, Zhang Y, et al. Exosome Release Is Regulated by mTORC1[J]. Advanced Science, 2019,6(3):n/a-n/a.
- [82] Yang D, Zhang W, Zhang H, et al. Progress, opportunity, and perspective on exosome isolation - efforts for efficient exosome-based theranostics[J]. Theranostics, 2020,10(8):3684-3707.
- [83] 任振军, 黄丽娜. 骨髓间充质干细胞源外泌体对急性肺损伤大鼠肺泡巨噬细胞 M1/M2 极化的影响及其机制[J]. 江苏大学学报(医学版), 2024,34(06):514-521.
- [84] Boren J, Packard C J, Binder C J. Apolipoprotein B-containing lipoproteins in atherogenesis[J]. Nat Rev Cardiol, 2025.
- [85] Huang Z, Shen S, Han X, et al. Macrophage DCLK1 promotes atherosclerosis via binding to IKKbeta and inducing inflammatory responses[J]. EMBO Mol Med, 2023,15(5):e17198.
- [86] Zhai K, Duan H, Wang W, et al. Ginsenoside Rg1 ameliorates blood-brain barrier disruption and traumatic brain injury via attenuating macrophages derived exosomes miR-21 release[J]. Acta Pharm Sin B, 2021,11(11):3493-3507.
- [87] Zhang Z, Yang W, Chen J, et al. Efficacy and mechanism of Schisandra chinensis active component Gomisins A on diabetic skin wound healing: network pharmacology and in vivo experimental validation[J]. J Ethnopharmacol, 2025,337(Pt 1):118828.
- [88] 余黄合, 李鑫, 杨珍, 等. 中药五味子药理作用研究进展[J]. 环球中医药, 2019,12(07):1133-1138.
- [89] Wang X, Li Q, Sui B, et al. Schisandrin A from Schisandra chinensis Attenuates Ferroptosis and NLRP3 Inflammasome-Mediated Pyroptosis in Diabetic Nephropathy through Mitochondrial Damage by AdipoR1 Ubiquitination[J]. Oxid Med Cell Longev, 2022,2022:5411462.
- [90] Rybníkar M, Smejkal K, Zemlicka M. Schisandra chinensis and its phytotherapeutical applications[J]. Ceska Slov Farm, 2019,68(3):95-118.
- [91] Duan H, Li H, Liu T, et al. Exploring the Molecular Mechanism of Schisandrin C for the Treatment of Atherosclerosis via the PI3K/AKT/mTOR Autophagy Pathway[J]. ACS Omega, 2024,9(30):32920-32930.
- [92] Shen X, Yang H, Yang Y, et al. The cellular and molecular targets of natural products against metabolic disorders: a translational approach to reach the bedside[J]. MedComm (2020), 2024,5(8):e664.
- [93] Zhai K, Deng L, Wu Y, et al. Extracellular vesicle-derived miR-146a as a novel crosstalk

- mechanism for high-fat induced atherosclerosis by targeting SMAD4[J]. J Adv Res, 2024.
- [94] Lv Y, Hong D, Fu L, et al. NMMHC IIA triggered lipid metabolize reprogramming resulting in vascular endothelial cellular tight junction injury[J]. Mol Biol Rep, 2022,49(4):2805-2819.
- [95] 杨玉轩, 王医术, 李法平, 等. 非肌细胞肌球蛋白IIA 在肿瘤中的研究进展[J]. 中国实验诊断学, 2020,24(01):175-178.
- [96] Xu M, Ji J, Jin D, et al. The biogenesis and secretion of exosomes and multivesicular bodies (MVBs): Intercellular shuttles and implications in human diseases[J]. Genes Dis, 2023,10(5):1894-1907.
- [97] Wang C, Li Z, Liu Y, et al. Exosomes in atherosclerosis: performers, bystanders, biomarkers, and therapeutic targets[J]. Theranostics, 2021,11(8):3996-4010.
- [98] Sarkar D, Singh S K. Decabromodiphenyl ether (BDE-209) exposure to lactating mice perturbs steroidogenesis and spermatogenesis in adult male offspring[J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2021,209:111783.
- [99] Dong Y, Wang B, Du M, et al. Targeting Epsins to Inhibit Fibroblast Growth Factor Signaling While Potentiating Transforming Growth Factor-beta Signaling Constrains Endothelial-to-Mesenchymal Transition in Atherosclerosis[J]. Circulation, 2023,147(8):669-685.
- [100] 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 Cardiovasc Med, 2019,29(1):22-26.
- [101] 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 Sci, 2021,264:118721.
- [102] Huang Z, Shen S, Han X, et al. Macrophage DCLK1 promotes atherosclerosis via binding to IKKbeta and inducing inflammatory responses[J]. EMBO Mol Med, 2023,15(5):e17198.
- [103] He Y, Li S, Jiang L, et al. Palmitic Acid Accelerates Endothelial Cell Injury and Cardiovascular Dysfunction via Palmitoylation of PKM2[J]. Adv Sci (Weinh), 2025,12(5):e2412895.
- [104] 李彦红, 索传涛, 王春红, 等. 血管内皮损伤相关因子对老年 NSTEMI 患者 PCI 术后不良临床转归的预测价值[J]. 中国老年学杂志, 2025,45(05):1029-1032.
- [105] 李骄阳, 刘晟男, 赵雨欣, 等. S100A10 对巨噬细胞介导的炎症及迁移的影响[J]. 中国免疫学杂志, 2024,40(11):2257-2261.

攻读硕士期间学术成果

[1] 基于网络药理学探讨五味子丙素通过抑制血管内皮细胞凋亡参与动脉粥样硬化机制研究.中国现代应用药学（一作接收）

[2] Zhou J ,**Shi Y** ,Bao Z , et al.Schisandrin A Ameliorates Endoplasmic Reticulum Stress Mediated Apoptosis in Metabolic Associated Fatty Liver Disease[J/OL].Food Science and Human Wellness,2025.（共一作，IF=7，一区，Top）

[3] Duan H, Wang W, **Shi Y**, Wang L, Khan GJ, Luo M, Zhou J, Yang J, He C, Li F, Hu H, Zhai K. Anti-colorectal cancer actions of Glycyrrhiza uralensis Fisch. and its underlying mechanism via HPLC integration and network pharmacological approaches. Phytomedicine. 2025.（IF=6.7，一区）

[4] 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.（IF=7，一区，Top）

[5] Kefeng Zhai*, Liangle Deng, Yuxuan Wu, Han Li, Jing Zhou, **Ying Shi**, Jianhu Jia, Wei Wang, Sihui Nian, Ghulam Jilany Khan, Hesham R. El-Seedi, Hong Duan*, Lili Li*, Zhaojun Wei*. Extracellular vesicle-derived miR-146a as a novel crosstalk mechanism for high-fat induced atherosclerosis by targeting SMAD4. Journal of Advanced Research, 2024.（IF= 11.4，一区，Top）

[6] Hong Duan[#], Han Li[#], Tianyi Liu, Yuan Chen, Mengmeng Luo, **Ying Shi**, Jing Zhou, Marwan M. A. Rashed, Kefeng Zhai*, Lili Li*, Zhaojun Wei*. Exploring the molecular mechanism of Schisandrin C for the treatment of atherosclerosis via PI3K/AKT/mTOR autophagy pathway. ACS Omega, 2024（IF=3.7，三区）

[7] Wang W[#], Li H[#], **Shi Y**, Zhou J, Khan GJ, Zhu J, Liu F, Duan H*, Li L*, Zhai K*. Targeted intervention of natural medicinal active ingredients and traditional Chinese medicine on epigenetic modification: Possible strategies for prevention and treatment of atherosclerosis. Phytomedicine, 2024.（IF=7.9，一区，Top）

[8]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.

致谢

岁月如矢，要说起时间，那真的是用言语来不及其表达。心中的迷茫与坚定不断交织，回首来路，满心都是对过往点滴的感恩，也为此刻的自己激动与骄傲，此时此刻我很想疯狂的大叫一声，是放松的声音，是卸下精神上的一根神经。

2022年6月1日，我很清楚的记得这个日子，这是我收到安徽工程大学研究生录取通知书的日子，那一天一大早我接到中国邮政的电话，我一路小跑去，激动与喜悦如汹涌的潮水，将我彻底淹没，那一刻，世界仿佛都为我而静止。当时过来人和我谈，研究生只有你收到录取通知书和毕业的那一刻是开心的，那一刻，我不管那么多，我也要闯一闯。

初入安徽工程大学的第一年，时光如同春日的溪流，平缓而悠然。没有繁重的压力，除了日常上课，还拥有许多闲适的时光。到了十月份，迎来了导师学生双选的重要时刻，那一刻，我心中没有丝毫犹豫，毅然决然地选择了我的本科导师——翟老师。回想起本科时，我不过是个平平无奇的学生，那时的我，甚至从未有过考研的想法。直至我有幸遇到翟老师，是他为我开启了一扇全新的大门，给予我尝试的机会，不断鼓励我勇敢去考。从那以后，他便成为了我学术道路上熠熠生辉的启明星，照亮我前行的每一步。这一年的时光转瞬即逝，如白驹过隙。在安工程的这段日子里，我满心都是感恩。张国强副院长和王玲玲辅导员，他们给予我的关怀与帮助，我铭记于心。张副院长十分慈爱，在我为实验初期的困难而烦恼时，他总是温和地安慰我：“嗯，没事，刚开始做实验都是这样的，万事开头难。”这些话语如暖流，一次次驱散我内心的焦虑。王玲玲辅导员也时刻关心着我，尽管她偶尔会嗔怪：“我这孩子咋回事，这么粗心”，但我深知，这每一句看似责备的话语背后，都饱含着她深深的关怀。

研二那年，我回到了宿州学院，有幸与师姐和同门同住。其中，李晗师姐对我的帮助，我更是没齿难忘。当时，课题难度极大，我屡屡碰壁，深陷其中难以自拔，数次在崩溃的边缘。是李晗师姐，她不厌其烦，亲手带着我一遍又一遍地梳理研究思路，攻克一个又一个难关。在她的悉心教导下，我逐渐掌握了方法，在学术的道路上稳步前行。她不仅教会了我专业知识，更用实际行动让我懂得了坚持与专注的力量。我还有个很了不起的博士师兄汪威，我从他的身上学到了很多，他在学术领域取得的斐然成绩令人钦佩不已。每当我在课题研究中遭遇瓶颈，思维陷入僵局，感觉前路迷茫时，他总是能及时出现。他凭借着深厚的专业知识储备和丰富的科研经验，很有耐心的和我谈研究思路，

帮我打开新的局面，他很爱说别难过小施颖。还有可爱师妹李杰，萌萌，在我很忙的时候她们会先说一句需要帮忙吗？然后勤快的来帮我。我最应该感谢是我的翟导，我清楚的知道我的坏脾气，我每次估计也给他气的不轻，他严谨的治学态度，让我明白学术不是一蹴而就的事业，而是需要日复一日的深耕细作，虽说他严厉但是他对我们也就和他的孩子一样。

而在这一路的拼搏中，家人始终是最坚实的后盾。他们默默承担起生活的琐碎，用无尽的包容和理解，给予我毫无保留的支持，让我能心无旁骛地投身于学术研究。还有我的对象，在我因压力而焦虑不安时，总是听我的烦恼，陪伴鼓励我坚持下去。你们的爱与支持，是我在艰难时刻坚持的动力源泉。

站在硕士生涯的终点，往昔的奋斗与成长如电影般在脑海中不断放映，而在这感慨万千的时刻，我最想做的，便是向给予我支持与帮助的人们，献上我最诚挚的谢意。