

分类号：Q81

单位代码：10363

密 级：公开

学 号：2220520122

基于 miR-146a-5p/SMAD4 探讨五味子醇甲改善
内质网应激防治动脉粥样硬化的作用机制

Exploring the mechanism of action of Schisandrin A
ameliorating endoplasmic reticulum stress against
atherosclerosis based on miR-146a-5p/SMAD4

学生姓名：	周婧
校内导师：	段红（教授）
校外导师：	唐英武
专 业：	生物与医药
研究方向：	生物制药工程

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：周靖

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：

周靖

日期： 2025 年 5 月 15 日

指导教师签名：

段红

日期： 2025 年 5 月 15 日

基于 miR-146a-5p/SMAD4 探讨五味子醇甲改善内质网应激 防治动脉粥样硬化的作用机制

摘 要

动脉粥样硬化（Atherosclerosis, AS）是心血管疾病的关键病理基础，其发病机制复杂，涉及脂质代谢异常、炎症反应、内皮功能障碍、免疫反应以及内质网应激等多种因素。近年来，外泌体（Exosomes）及其携带的微小 RNA（miRNA）在细胞间通讯中的作用逐渐受到关注，尤其是外泌体 miR-146a-5p 在动脉粥样硬化中的调控机制。本研究基于课题组前期工作，深入探讨了中药活性成分五味子醇甲（Schisandrin A, SA）通过干预泡沫细胞源外泌体 miR-146a-5p 的释放，靶向作用于 SMAD4，改善内质网应激介导的细胞凋亡，从而防治动脉粥样硬化的作用机制。主要研究内容如下：

（1）通过利用 THP-1 细胞株，成功构建了模拟 AS 患者体内生理病理过程的泡沫细胞体外模型，通过油红 O 染色和细胞活力检测，验证了五味子醇甲对泡沫细胞形成的抑制作用。随后，利用超滤法提取并鉴定外泌体，发现 ox-LDL 诱导的泡沫细胞分泌的外泌体中 miR-146a-5p 显著上调，而五味子醇甲处理可显著抑制其表达。进一步实验表明，外泌体中 miR-146a-5p 可被有效传递至人脐静脉内皮细胞（HUVEC）中。并介导细胞损伤相关因子 MCP-1、VCAM-1 和 ICAM-1 的表达，而五味子醇甲通过抑制 Exo-miR-146a-5p 释放，减轻了 HUVECs 的炎症反应和损伤。

(2) 通过生物信息学预测和实验验证, 发现 miR-146a-5p 可通过细胞间传递靶向作用于 HUVECs 中 SMAD4 的 3'UTR, 进而抑制其表达。沉默 SMAD4 后, HUVECs 损伤因子的表达显著上升, 而五味子醇甲通过上调 SMAD4 的表达, 抑制了由外泌体 miR-146a-5p 诱导的细胞损伤。

(3) 为了验证 SMAD4 在细胞凋亡中的作用机制。研究发现, 五味子醇甲通过抑制 Exo-miR-146a-5p 靶向调控 SMAD4 的表达水平, 显著降低了内质网应激相关蛋白表达以及凋亡蛋白 Caspase-3 和 Caspase-9 的激活。此外, 使用内质网应激抑制剂 4-苯基丁酸(4-PBA) 联合五味子醇甲处理的外泌体 (SA-Exos) 进一步验证了五味子醇甲的作用机制。结果表明, 五味子醇甲能够通过抑制 Exo-miR-146a-5p 靶向 SMAD4, 缓解内质网应激介导的细胞凋亡, 进而改善动脉粥样硬化。

本研究借助多学科交叉的研究方法, 深入探究了五味子醇甲通过调节泡沫细胞源性外泌体中 miR-146a-5p 的释放, 靶向 SMAD4, 缓解内质网应激介导的细胞凋亡, 从而减轻动脉粥样硬化的作用机制。这一发现不仅为五味子醇甲作为心血管疾病防治药物的应用提供了科学依据, 也为基于外泌体及 miRNA 的中药活性成分研究提供了新的思路和方法, 为动脉粥样硬化的治疗提供了潜在的新靶点和策略, 为中药现代化研究以及心血管疾病的预防和治疗提供了重要的理论依据。

关键词: 动脉粥样硬化, 五味子醇甲, 外泌体, miR-146a-5p,

内质网应激，细胞凋亡

EXPLORING THE MECHANISM OF ACTION OF SCHISANDRIN A AMELIORATING ENDOPLASMIC RETICULUM STRESS AGAINST ATHEROSCLEROSIS BASED ON MIR-146A-5P/SMAD4

ABSTRACT

Atherosclerosis (AS) is an important pathological basis of cardiovascular disease, and its pathogenesis is complex, involving multiple factors such as abnormal lipid metabolism, inflammatory response, endothelial dysfunction, immune response, and endoplasmic reticulum stress. In recent years, the role of exosomes (Exosomes) and the microRNAs (miRNAs) they carry in intercellular communication has been gradually attracting attention, especially the regulatory mechanism of exosomal miR-146a-5p in atherosclerosis. Based on the group's previous work, the present study delved into the mechanism of action of Schisandrin A (SA), an active ingredient of traditional Chinese medicine, in preventing and controlling atherosclerosis by modulating the targeting of SMAD4 by the foam cell-derived exosome miR-146a-5p to ameliorate endoplasmic reticulum stress-mediated cell apoptosis. The main studies are as follows:

- (1) An in vitro model of foam cells was established using the THP-1

cell line to mimic the *in vivo* physiopathological process of AS patients, and the inhibitory effect of Schisandrin A on foam cell formation was verified by oil red O staining and cell viability assay. Subsequently, exosomes were extracted and characterized using ultrafiltration, and it was found that miR-146a-5p was significantly up-regulated in exosomes secreted by ox-LDL-induced foam cells, whereas Schisandrin A treatment significantly inhibited its expression. Further experiments showed that miR-146a-5p in exosomes could be efficiently delivered into human umbilical vein endothelial cells (HUVEC), and mediated the expression of cell injury-associated factors MCP-1, VCAM-1, and ICAM-1, whereas Schisandrin A attenuated the inflammatory response and injury of HUVECs by inhibiting the release of Exo-miR-146a-5p.

(2) Through bioinformatics prediction and experimental validation, miR-146a-5p was found to target the 3'UTR of SMAD4 in HUVECs via cell-to-cell delivery, which in turn inhibited its expression. Silencing of SMAD4 resulted in a significant increase in the expression of damage factors in HUVECs, whereas Schisandrin A inhibited cellular damage induced by exosomal miR-146a-5p by up-regulating the expression of SMAD4.

(3) To verify the mechanism of action of SMAD4 in apoptosis. It was found that Schisandrin A significantly reduced endoplasmic reticulum stress-related protein expression as well as the activation of

apoptotic proteins Caspase-3 and Caspase-9 by inhibiting Exo-miR-146a-5p-targeted modulation of SMAD4 expression levels. In addition, the mechanism of action of Schisandrin A was further verified using the endoplasmic reticulum stress inhibitor 4-phenylbutyric acid (4-PBA) combined with Schisandrin A-treated exosomes (SA-Exos). The results showed that Schisandrin A was able to alleviate endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis by inhibiting Exo-miR-146a-5p targeting of SMAD4, and then ameliorate atherosclerosis.

In the present study, we comprehensively utilized multidisciplinary cross-techniques to investigate the mechanism of action of Schisandrin A methyl by modulating the release of foam cell-derived exo-miR-146a-5p, targeting SMAD4, and alleviating endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis, thereby alleviating atherosclerosis. This finding not only provides a scientific basis for the application of Schisandrin A as a cardiovascular disease prevention and treatment drug, but also provides a new idea and methodology for the research of active ingredients of traditional Chinese medicine based on exosomes and miRNAs, and potential new targets and strategies for the treatment of atherosclerosis, which provides important theoretical support for the research of modernization of traditional Chinese medicine and prevention and treatment of cardiovascular diseases.

KEY WORDS : Atherosclerosis, Schisandrin A, Exosomes, miR-146a-5p, Endoplasmic reticulum stress, Apoptosis

目 录

摘 要	i
ABSTRACT	iv
第 1 章 绪论	1
1.1 动脉粥样硬化	1
1.1.1 脂质代谢异常与动脉粥样硬化	1
1.1.2 炎症反应与动脉粥样硬化	2
1.1.3 内皮功能障碍与动脉粥样硬化	2
1.1.4 免疫反应与动脉粥样硬化	3
1.2 内质网应激	3
1.2.1 内质网应激与动脉粥样硬化	3
1.2.2 内质网应激与细胞凋亡	4
1.3 miRNA 概述	6
1.3.1 miRNA 的作用模式	6
1.3.2 外源性 miRNA	7
1.3.3 miR-146a 的生物学功能	7
1.4 五味子及五味子醇甲的概述	8
1.4.1 五味子	8
1.4.2 五味子醇甲	8
1.5 研究目的及意义	9
第 2 章 泡沫细胞源外泌体 miR-146a-5p 介导内皮细胞损伤及五味子醇甲的干预研究	10
2.1 引言	10
2.2 实验材料	11
2.2.1 实验试剂	11
2.2.2 实验仪器	12
2.3 泡沫细胞体外模型的建立以及五味子醇甲浓度的确定	12
2.3.1 细胞培养	12

2.3.2 五味子醇甲对 THP-1 细胞活力的影响	13
2.3.3 细胞分组	13
2.3.4 油红 O 染色鉴定脂肪堆积	13
2.4 外泌体的收集及表征鉴定	14
2.4.1 超滤法收集上清液中的外泌体	14
2.4.2 外泌体的形态特征观察	14
2.4.3 外泌体粒径的检测	14
2.4.4 外泌体表面特异性标志物的检测	14
2.5 五味子醇甲调控 Exo-miR-146a-5p 保护泡沫细胞源外泌体诱导的 HUVEC 细胞损伤	16
2.5.1 外泌体中 miR-146a-5p 含量检测	16
2.5.2 外泌体的标记追踪	18
2.5.3 五味子醇甲干预泡沫细胞源外泌体诱导的 HUVECs 炎症反应的影响	19
2.5.4 HUVECs 的 miR-146a-5p mimics/inhibitor 转染	19
2.5.5 miR-146a-5p 转染效率检测	20
2.5.6 miR-146a-5p 及五味子醇甲对泡沫细胞源外泌体诱导的 HUVECs 损伤的研究	20
2.6 统计学分析	20
2.7 结果与分析	20
2.7.1 泡沫细胞体外模型的建立及五味子醇甲浓度确定	20
2.7.2 外泌体的表征鉴定	21
2.7.3 五味子醇甲调控 Exo-miR-146a-5p 保护泡沫细胞源外泌体诱导的 HUVECs 损伤	23
2.8 本章小结	26
第 3 章 五味子醇甲通过 Exo-miR-146a-5p 保护内皮细胞的关键靶点研究	28
3.1 引言	28
3.2 实验材料	29
3.2.1 实验试剂	29

3.2.2 实验仪器	30
3.3 五味子醇甲通过外泌体跨细胞调控 SMAD4 的研究	30
3.3.1 miR-146a-5p 靶基因预测	30
3.3.2 五味子醇甲通过 Exo-miR-146a-5p 调控 SMAD4 的水平	30
3.4 五味子醇甲调控 Exo-miR-146a-5p 靶向 SMAD4 保护泡沫细胞源外泌体诱导的 HUVECs 损伤	31
3.4.1 五味子醇甲通过 Exo-miR-146a-5p 靶向调控 SMAD4 水平	31
3.4.2 HUVECs 中沉默靶基因 SMAD4	31
3.4.3 siSMAD4 沉默效率检测	32
3.4.4 SMAD4 及五味子醇甲对泡沫细胞源外泌体诱导的 HUVECs 损伤的研究	33
3.5 统计学分析	33
3.6 结果与分析	33
3.6.1 五味子醇甲通过外泌体调控 SMAD4 表达	33
3.6.2 五味子醇甲通过 Exo-miR-146a-5p 靶向 SMAD4 保护泡沫细胞源外泌体诱导的内皮细胞损伤	34
3.7 本章小结	36
第 4 章 五味子醇甲通过 Exo-miR-146a-5p 靶向 SMAD4 保护内皮细胞的机制研究	38
4.1 引言	38
4.2 实验材料	38
4.2.1 实验试剂	39
4.2.2 实验仪器	39
4.3 五味子醇甲抑制 Exo-miR-146a-5p 对细胞凋亡的作用研究	40
4.3.1 细胞培养及分组	40
4.3.2 免疫荧光观察	40
4.3.3 RT-qPCR 检测 HUVECs 中凋亡基因 caspase3、caspase9 mRNA 表达	41
4.3.4 Western Blot 检测细胞凋亡蛋白 caspase3、caspase9 的表达	41

4.4 五味子醇甲抑制 Exo-miR-146a-5p 对内质网应激通路的作用研究	41
4.4.1 细胞培养及分组	41
4.4.2 RT-qPCR 检测 HUVECs 中内质网应激基因 GRP78、ATF6、PERK、 IRE1 mRNA 表达	42
4.4.3 Western blot 检测细胞中内质网应激蛋白 GRP78、ATF6、PERK、 IRE1 的表达	42
4.5 SMAD4 蛋白对细胞凋亡的调控作用研究	42
4.5.1 细胞培养及分组	42
4.5.2 流式细胞术检测细胞凋亡	42
4.5.3 RT-qPCR 检测 SMAD4 对细胞凋亡基因 caspase3、caspase9 mRNA 表达的影响	43
4.5.4 SMAD4 对细胞凋亡蛋白 caspase3、caspase9 的影响	43
4.6 抑制内质网应激对细胞凋亡影响的研究	43
4.6.1 细胞培养及分组	43
4.6.2 流式细胞术观察	43
4.6.3 Western blot 检测抑制内质网应激对内质网应激蛋白 GRP78、ATF6、 PERK、IRE1 以及凋亡蛋白 CHOP、cle-caspase3 和 cle-caspase9 的 表达	43
4.6.4 免疫共定位检测 GRP78、CHOP 蛋白表达水平	43
4.7 统计学分析	44
4.8 结果与分析	44
4.8.1 五味子醇甲抑制 Exo-miR-146a-5p 对细胞凋亡的影响	44
4.8.2 五味子醇甲抑制 Exo-miR-146a-5p 对内质网应激的影响	46
4.8.3 SMAD4 蛋白对细胞凋亡的调控作用研究	47
4.8.4 抑制内质网应激对细胞凋亡影响的研究	49
4.9 本章小结	52
第 5 章 总结与展望	54
5.1 结论	54
5.2 展望	55

参考文献.....	56
攻读硕士期间发表的论文.....	64
致 谢.....	65

第 1 章 绪论

1.1 动脉粥样硬化

1990 年至 2023 年，全球心血管疾病（Cardiovascular Disease, CVD）患病人数从 2.7 亿例激增至 5.3 亿例，死亡人数从 1210 万增至 1900 多万，伤残调整生命年（DALYs）显著增加^[1]。CVD 仍是我国居民健康的最大威胁之一，其发病率和死亡率始终处于较高水平^[2]。动脉粥样硬化（Atherosclerosis, AS）作为一种慢性炎症性疾病，成为引发心血管疾病发生的重要病理基础，其特征是动脉壁内脂质沉积、炎症细胞浸润以及纤维组织增生，最终导致动脉壁增厚、硬化和管腔狭窄^[3]。

动脉粥样硬化可累及全身多条动脉，涵盖冠状动脉、颈动脉和外周动脉等，严重时可引发心肌梗死、脑卒中、肾功能衰竭和外周动脉疾病等严重并发症^[4]。其发病机制复杂，涉及多种因素，包括脂质代谢异常^[5]、炎症反应^[6]、氧化应激、内皮功能障碍^[7]以及遗传因素等。近年来的研究还发现，微小 RNA (miRNA) 也在动脉粥样硬化的进程中起着重要的作用，可以通过调节炎症反应、脂质代谢和细胞凋亡等途径影响病变的进展^[8]。

1.1.1 脂质代谢异常与动脉粥样硬化

脂质代谢异常是动脉粥样硬化发生与发展的核心机制之一，尤其低密度脂蛋白胆固醇（LDL-C）的代谢异常在此进程中影响很大，被认为是动脉粥样硬化性心血管疾病（ASCVD）的核心致病因素^[9]。LDL-C 颗粒通过内皮细胞的胞吞作用进入动脉壁，在内皮下停留并经过氧化修饰，进而形成氧化型低密度脂蛋白胆固醇（ox-LDL）。巨噬细胞摄取 ox-LDL 后会转化为泡沫细胞，导致动脉壁内泡沫细胞的积聚，进而引发炎症反应和斑块形成^[10]。研究表明，LDL-C 水平的升高与心血管事件的发生率呈正相关。除了 LDL-C，其他脂质代谢异常也与动脉粥样硬化密切相关。例如，富含甘油三酯脂蛋白（TRL）及其残粒胆固醇（RC）也是动脉粥样硬化的重要危险因素。TRL 残粒中的胆固醇可以通过类似 LDL-C 的机制进入动脉壁，促进泡沫细胞的形成^[11]。此外，脂蛋白（a）[Lp（a）]水平的升高也是动脉粥样硬化的独立危险因素，其致病机制包括促进动脉粥样硬化、

血栓形成和炎症反应^[12]。因此，通过饮食控制和增加体力活动的方式来调节脂质代谢异常对控制动脉粥样硬化至关重要，药物治疗也为动脉粥样硬化患者提供选择。

1.1.2 炎症反应与动脉粥样硬化

炎症反应贯穿于动脉粥样硬化的发生、发展以及斑块的不稳定和破裂过程^[13]。近年来的研究表明，炎症不仅参与动脉粥样硬化的早期阶段，还在晚期斑块的不稳定和破裂中发挥重要作用。动脉粥样硬化斑块中存在大量免疫细胞浸润，包括单核/巨噬细胞、T 细胞及 B 细胞等^[14]。这些细胞通过分泌炎症因子如白细胞介素-1 β 、肿瘤坏死因子- α 和趋化因子等，推动炎症反应的持续和加剧。例如，NLRP3 炎症小体的激活可导致白细胞介素-1 β 和白细胞介素-18 的释放，从而参与动脉粥样硬化的发生和发展^[15]。最近的研究还揭示了新的炎症相关靶点。例如，胰岛素样生长因子结合蛋白 6 (IGFBP6) 被发现可以减轻内皮细胞炎症，并在动脉粥样硬化中发挥保护作用。IGFBP6 通过调节 KLF2-MVP-JNK/NF- κ B 信号轴，抑制炎症反应，从而减少动脉粥样硬化的发生^[16]。因此，抑制炎症反应对预防和控制动脉粥样硬化非常重要。

1.1.3 内皮功能障碍与动脉粥样硬化

内皮功能障碍作为早期关键事件，贯穿于动脉粥样硬化的整个病理过程^[17]。内皮细胞功能障碍的主要特征包括内皮源性舒张因子（如一氧化氮，NO）的减少或活性降低，以及血管收缩因子（如内皮素-1）的增加。这种功能失衡导致血管收缩、血小板聚集、白细胞黏附、平滑肌细胞增殖以及氧化应激增加，从而促进动脉粥样硬化斑块的形成和进展^[18]。内皮功能障碍的机制复杂，涉及多种因素。氧化应激和炎症反应是内皮功能障碍的重要驱动因素，它们通过损伤内皮细胞、抑制一氧化氮合成酶（eNOS）活性等方式，进一步加剧内皮功能障碍。此外，血流动力学异常（如低剪切应力）也可导致内皮功能障碍，进而促进动脉粥样硬化的发生^[19]。近年来的研究还表明，内皮细胞与其他细胞（如巨噬细胞、平滑肌细胞）之间的相互作用在动脉粥样硬化中发挥重要作用。例如，内皮细胞功能障碍可诱导巨噬细胞浸润和泡沫细胞形成，进一步加剧炎症反应和斑块不稳定^[20]。因此，改善内皮功能障碍是预防和治疗动脉粥样硬化的重要策略。健康生活方式和药物治疗已被证实可有效改善内皮功能，减轻动脉粥样硬化进展。此外，靶向

炎症因子和调节内皮细胞代谢等新型治疗方法也在不断探索中。

1.1.4 免疫反应与动脉粥样硬化

动脉粥样硬化与免疫反应密切相关，其斑块内存在单核/巨噬细胞、树突状细胞、T 细胞和 B 细胞等多种免疫细胞。这些细胞通过分泌炎症因子和趋化因子，推进炎症反应的持续和加剧^[21]。例如，巨噬细胞在 ox-LDL 诱导后转化为泡沫细胞，进一步释放炎症因子，加剧局部炎症^[22]。此外，T 细胞（尤其是 Th1 细胞）在动脉粥样硬化中也发挥重要作用，其分泌的细胞因子如干扰素- γ 可促进巨噬细胞的激活^[23]。近年来的临床研究为动脉粥样硬化的免疫治疗提供了重要依据。例如，CANTOS 试验表明，通过抑制白细胞介素-1 β 可显著降低心血管事件的发生率^[24]。此外，秋水仙碱等抗炎药物也显示出对动脉粥样硬化患者的保护作用^[25]。这些研究结果表明，靶向炎症因子和免疫细胞的治疗策略具有广阔的应用前景。

1.2 内质网应激

内质网应激（Endoplasmic Reticulum Stress, ERS）是指由于内质网内蛋白质折叠异常或折叠压力增加，使未折叠或错误折叠蛋白在内质网内堆积，从而引发的一种细胞应激反应^[26]。内质网是细胞内承担蛋白质合成、折叠和修饰的重要细胞器，维持内质网的稳态对于细胞的正常功能至关重要。

1.2.1 内质网应激与动脉粥样硬化

内质网应激在动脉粥样硬化的发生和发展中扮演着关键角色。慢性内质网应激通过多种机制促进动脉粥样硬化病变的形成和进展。一方面，内质网应激能够激活炎症信号通路，如 NF- κ B 和 NLRP3 炎症体，从而促进炎症因子的释放，加剧动脉粥样硬化病变。另一方面，内质网应激诱导的细胞凋亡对动脉粥样硬化斑块不稳定起重要作用，如通过 CHOP 通路诱导巨噬细胞凋亡，增加斑块的坏死核心^[27]。此外，内质网应激会影响脂肪代谢相关基因的表达，导致脂质积累和低密度脂蛋白胆固醇（LDL-C）的氧化，进一步促进动脉粥样硬化的发展^[28]。这些机制相互作用，破坏脂质代谢，影响细胞功能，并最终影响动脉粥样硬化斑块的形成和稳定性。

总体而言，内质网应激在动脉粥样硬化进程中作用关键，其通过激活炎症反应、诱导细胞凋亡和扰乱脂质代谢等多种机制促进动脉粥样硬化病变的形成和进展。进一步探究它们之间的相互关系，可以为该疾病的预防和治疗提供更具创新

性的思路和方法。

1.2.2 内质网应激与细胞凋亡

1.2.2.1 细胞凋亡

细胞凋亡是基因调控下的程序性细胞死亡过程，与坏死不同，它是一种有序的、主动的死亡方式，通常不会引起炎症反应。细胞凋亡在维持生物体内环境稳态、发育以及疾病发生发展中具有重要作用。在动脉粥样硬化中，细胞凋亡扮演着复杂的双重角色。一方面，内皮细胞、血管平滑肌细胞（VSMCs）和巨噬细胞的凋亡在疾病早期可减少斑块形成；另一方面，在晚期可引起斑块破裂和不稳定。例如，氧化应激诱导的内皮细胞凋亡是动脉粥样硬化发病的重要机制之一，而巨噬细胞凋亡产物的积累则会促进斑块的不稳定和破裂^[29]。

细胞凋亡的特征包括细胞体积缩小、细胞核染色质凝聚、细胞膜出现泡状突起、DNA 片段化、细胞膜磷脂酰丝氨酸外翻、线粒体膜电位降低以及 Caspase 家族蛋白的激活。这些特征使得细胞凋亡可以通过多种方法进行检测，如 Annexin V-FITC/PI 双染法、Caspase 凋亡核心分子检测以及形态学观察等。近年来，针对细胞凋亡的治疗策略逐渐成为动脉粥样硬化研究的热点。通过调节凋亡相关信号通路、抑制凋亡关键分子的活性以及利用外泌体等手段调节细胞凋亡，有望为动脉粥样硬化的治疗提供新的思路。

1.2.2.2 内质网应激诱导的凋亡

为了应对内质网应激，细胞进化出了一种保守的适应机制，即未折叠蛋白反应（Unfolded Protein Response, UPR）。UPR 通过三条主要的信号通路（IRE1、PERK 和 ATF6）来维持内质网内蛋白质折叠能力与需求之间的平衡^[30]。这些通路通过减少蛋白质合成、增强内质网折叠能力以及上调降解未折叠蛋白的途径来缓解内质网应激。然而，当应激强度超过 UPR 的适应能力时，细胞将启动凋亡程序^[31]。内质网应激诱导细胞凋亡的机制主要涉及以下几个方面：

（1）CHOP 介导的凋亡途径：CHOP（C/EBP 同源蛋白）作为一种关键的内质网应激诱导转录因子，在细胞应对内质网应激时发挥着重要的调控作用。内质网应激时，CHOP 的表达显著上调，并通过多种机制促进细胞凋亡。一方面，CHOP 通过调节 Bcl-2 家族蛋白的表达，降低抗凋亡蛋白 Bcl-2 和 Mcl-1 的水平，同时上调促凋亡蛋白 Bax 和 Bak 的表达，从而激活线粒体凋亡途径^[32]。另一方

面, CHOP 可以上调死亡受体 DR4 和 DR5 的表达, 进而激活细胞凋亡^[33]。此外, CHOP 通过诱导内质网氧化酶 1 α (ERO1 α) 的表达, 调节内质网钙稳态, 使钙离子在线粒体内大量聚集, 激活线粒体凋亡途径。其表达还受到 PERK-eIF2 α -ATF4 信号通路的调控, 内质网应激时, PERK 激活后使 eIF2 α 磷酸化, 促进 ATF4 的翻译, 进而诱导 CHOP 的表达^[34]。此外, CHOP 通过上调 TRB3 的表达, 抑制 Akt 的活性, 解除其对 Bcl-2 家族蛋白的保护作用, 进一步促进细胞凋亡。

(2) Caspase 12 的激活: Caspase-12 是内质网膜上的半胱氨酸蛋白酶, 在内质网应激时被激活, 是内质网应激诱导细胞凋亡的关键因素。当发生内质网应激时, 内质网中的钙离子释放增加, 与钙离子结合位点结合后, 激活 Calpain, 进而裂解并激活 Caspase-12。激活后的 Caspase-12 能够进一步激活下游的 Caspase-9 和 Caspase-3, 引发细胞凋亡^[35]。此外, Caspase-12 的激活与多种疾病产生密切相关。例如, 在肝纤维化过程中, Caspase-12 介导的细胞凋亡参与了肝细胞的坏死凋亡以及肝星状细胞 (HSCs) 的活化和凋亡调控^[36]。在四氯化碳诱导的大鼠肝纤维化模型中, Caspase-12 的激活水平在肝纤维化的进展期和逆转恢复期表现出不同的变化趋势, 提示其在肝纤维化的不同阶段可能发挥不同的作用^[37]。这些研究结果表明, Caspase-12 在内质网应激诱导的细胞凋亡中发挥核心作用, 并为相关疾病治疗提供了潜在靶点。

(3) IRE1 介导的凋亡信号: IRE1 (肌醇需求酶 1) 是内质网应激中 UPR 的关键传感器之一, 其激活后可以通过多种途径诱导细胞凋亡。IRE1 是一种内质网膜上的 I 型跨膜蛋白, 兼具激酶和内切酶活性。在内质网应激条件下, IRE1 通过其激酶活性激活下游的 ASK1, 进而激活 JNK 信号通路。JNK 的激活可以导致 Bcl-2 家族蛋白的磷酸化, 从而促进细胞凋亡^[38]。此外, IRE1 还可以通过其内切酶活性切割 XBP1 (X 盒结合蛋白 1) mRNA, 产生剪接型 XBP1(sXBP1), sXBP1 作为转录因子能够影响多种基因的表达, 进而控制细胞的存活或凋亡。IRE1 的激活还可以通过调节 IRE1 依赖性衰减 (RIDD) 途径降解特定的 mRNA, 从而影响细胞的代谢和应激反应^[39]。IRE1 介导的凋亡信号在多种疾病中发挥重要作用。如在肿瘤细胞中, IRE1 的激活可以促进细胞凋亡, 从而抑制肿瘤的生长。在神经退行性疾病中, IRE1 的异常激活可能导致神经元的凋亡^[40]。此外,

IRE1 在代谢性疾病中也扮演重要角色，其激活可以影响胰岛 β 细胞的功能^[41]。

(4) ATF6 介导的凋亡信号：ATF6（激活转录因子 6）是内质网应激的关键传感器之一，其在细胞应对内质网应激时通过调节多种基因的表达发挥重要作用^[42]。内质网应激时，ATF6 从内质网膜转移到高尔基体，在 S1P 和 S2P 蛋白酶的作用下被切割，释放出具有转录活性的 ATF6 片段。这些片段能够调控多种基因的表达，从而影响细胞的存活和凋亡。ATF6 通过激活 CHOP 表达调控促凋亡基因转录并促进细胞凋亡，同时调节 Bcl-2 家族蛋白表达，降低抗凋亡蛋白 Bcl-2 水平，上调促凋亡蛋白 Bax 表达，进而增加线粒体膜通透性，促使细胞色素 C 释放，最终激活 Caspase 级联反应。ATF6 还参与自噬与凋亡的交叉调控，并与其他信号通路（如 mTOR 通路）相互作用，共同调节细胞的存活和凋亡^[43]。

1.3 miRNA 概述

微小 RNA（miRNA）是一类小型内源性非编码 RNA，由大约 20-24 个核苷酸组成，广泛分布于真核生物中，能够以完全或部分互补的方式与目标 mRNA 的 3'-非翻译区（3'UTR）结合，抑制 mRNA 翻译或促其降解，从而在转录后水平调控基因表达^[44]。miRNA 的发现可以追溯到 1993 年，当时科学家在线虫中首次发现了第一个 miRNA——lin-4^[45]。2024 年，Victor Ambros 和 Gary Ruvkun 因在 miRNA 领域的开创性工作荣获诺贝尔生理学或医学奖，这标志着 miRNA 在基因调控中的关键作用得到了广泛认可。随着研究的深入，越来越多的 miRNA 被发现，其在生物体内的功能也逐渐被揭示。miRNA 在细胞周期调控、代谢过程以及免疫应答等多种生理功能中发挥着重要作用，其异常表达与癌症和心血管疾病等多种疾病的发生发展密切相关。因此，miRNA 被称为重要的调控因子，在疾病诊断和防治中极具应用潜力。

1.3.1 miRNA 的作用模式

miRNA 的作用模式复杂且多样化，其核心机制主要通过与靶基因 mRNA 的 3'UTR 结合来实现基因表达的转录后调控。这一调控过程主要包括两个方面：翻译抑制和 mRNA 降解^[46]。当 miRNA 与 mRNA 的 3'UTR 部分或完全互补结合后，能够阻止翻译起始或延长，从而抑制蛋白质的合成。除此之外，miRNA 还可以招募核酸外切酶，直接导致 mRNA 的降解。这种双重调控机制使得 miRNA 在细胞内基因表达的精细调控中发挥着关键作用^[47]。

miRNA 形成了一个复杂的调控网络,与 DNA、RNA 和蛋白质等各种生物大分子相互作用,调控着人体内的许多生物过程。miRNA 与靶基因的相互作用非常复杂,单个 miRNA 既可同时调控多个靶基因,也可被多个 miRNA 共同调控,形成多层次的调控体系^[48]。因此,深入研究 miRNA 的作用模式,有助于深入理解其在细胞生理病理中的功能,揭示其在疾病中的关键机制,为疾病诊疗和预防提供新依据和靶点。

1.3.2 外源性 miRNA

外源性 miRNA 是一类来源于细胞外的非编码 RNA 分子,主要通过食物、植物、微生物或细胞外囊泡(如外泌体)摄取进入生物体。近年来,外源性 miRNA 因其在跨物种基因调控、疾病治疗和药物递送中的潜在应用而备受关注^[49]。这些 miRNA 能够通过食物摄取进入人体,例如金银花中的 miR2911,已被证实具有抗病毒和免疫调节作用^[50]。此外,外泌体作为一种天然的纳米载体,能够高效地传递外源性 miRNA,保护其免受降解,并在宿主细胞中发挥生物效应。研究表明,外源性 miRNA 在体内可发挥抗炎、免疫调节和抗肿瘤等作用,例如鱼腥草衍生的外泌体样纳米颗粒中的特定 miRNA(如 miR858a 和 miR858b)显示出显著的抗病毒活性^[51]。

总之,外源性 miRNA 作为一种新兴的跨物种基因调控因子,在疾病治疗和药物递送中展现出巨大的潜力。深入研究外源性 miRNA,可揭示其在疾病机制中的作用,为疾病早诊和治疗提供新思路。

1.3.3 miR-146a 的生物学功能

miR-146a 是一种长度约为 22 个核苷酸的大型单链非编码 RNA 分子,广泛参与细胞增殖、分化、凋亡及免疫反应等生物学过程。它通过与靶 mRNA 结合,抑制其翻译或促进其降解,从而在转录后水平调节基因表达^[52]。作为最早被发现参与免疫调节的 miRNA 之一,miR-146a 在多种免疫细胞中表达,通过靶向 IRAK1 和 TRAF6 等关键信号分子调节 NF- κ B 等炎症信号通路,并参与免疫细胞分化与功能调控,如在 T 细胞介导的免疫反应中控制 Th1 细胞分化^[53]。其异常表达与多种疾病密切相关,在类风湿关节炎、系统性红斑狼疮等自身免疫性疾病中,miR-146a 表达上调,通过调节炎症信号通路进而影响疾病的发展进程;在肿瘤学领域,它调控肿瘤细胞的增殖、侵袭和转移;在诸如阿尔茨海默症等神经

退行性疾病中，miR-146a 可以通过调节 A β 沉积和 tau 蛋白过度磷酸化影响神经元功能^[54]。

鉴于 miR-146a 在疾病中的关键作用，其作为生物标志物和治疗靶点的潜力巨大。因此对其生物功能的深入研究有助于阐明其在各种生理和病理过程中的作用机制，并为相关疾病的治疗和预防提供新的知识和思路。

1.4 五味子及五味子醇甲的概述

1.4.1 五味子

五味子 (*Schisandra chinensis*) 是一种落叶木质藤本植物，其果实呈不规则球形或长圆形，颜色偏红或偏紫，皮肉酸甜、核中咸硬，五味俱全，因而得名^[55]。五味子性温，其味苦甘，主打肺、心、肾三经，具有收敛固涩的功效，有助于益气补肾、宁心安神^[56]。在中医临床中，五味子常用于治疗久咳虚喘、津伤口渴、内热消渴、心悸失眠等症状，常与罂粟壳、山药、知母等药材配伍使用。现代药理学研究表明，五味子富含木脂素类、挥发油类等多种化学成分，这些成分赋予了五味子保护肝脏、抗氧化、调节中枢神经系统、镇咳、祛痰、强心、镇静、抗菌、抗癌等多种药理作用^[57]。此外，五味子还对消化系统、心血管系统等有积极影响^[58]。

总体而言，五味子作为传统中药材，药用价值丰富，应用前景广阔。深入研究其药理作用和活性成分，揭示药效机制，可为其临床应用提供科学依据，也为保健领域发展筑牢理论基础。

1.4.2 五味子醇甲

五味子醇甲 (Schisandrin A, SA) 是中药五味子的主要活性成分之一，近年来的研究表明其在多个系统中具有广泛的药理作用，尤其在中枢神经系统中表现出显著的调节功能，包括镇静催眠、抗抑郁、改善学习记忆能力以及对神经退行性疾病的潜在预防和治疗作用^[59]。研究表明，其具有保肝、抗炎、抗氧化等多种药理活性，能够增强肝细胞对毒性物质的抵抗能力，减少炎症因子的产生与释放，同时通过清除自由基，有效减轻氧化应激对细胞的损伤。此外，五味子醇甲还可通过特定的信号通路改善性功能障碍。在动脉粥样硬化的防治方面，五味子醇甲展现出显著的潜力。它可以通过抑制血管平滑肌细胞的异常增殖和迁移，有效减轻动脉粥样硬化斑块的形成。同时，五味子醇甲还能够调节血脂代谢，降低有害

胆固醇水平，提高有益胆固醇水平，从而改善血脂异常。动物模型研究进一步证实，五味子醇甲能够显著减轻主动脉斑块的形成，具有保护血管内皮功能的作用，促进血管生成，改善冠状动脉血流^[60]。

五味子醇甲是一种具有多种生物活性的天然植物化合物，对健康有益，可作为预防和治疗心血管疾病的潜在药物或膳食补充剂，但其体内代谢和作用机制仍有待进一步研究，以期为临床应用提供更坚实的理论依据。

1.5 研究目的及意义

在课题组前期工作基础上，本研究主要探讨五味子醇甲通过调控泡沫细胞源外泌体 miR-146a-5p 的释放靶向作用于 SMAD4，进而改善内质网应激的作用机制，揭示其在动脉粥样硬化防治中的潜在价值。研究重点聚焦于五味子醇甲对血管内皮细胞损伤、细胞凋亡以及内质网应激信号通路的调控作用，为动脉粥样硬化的“炎症-代谢-应激”交互网络提供新理论支撑，深化对脂质代谢异常、炎症反应与细胞器应激协同致病机制的理解。五味子醇甲通过多靶点调控（抑制泡沫细胞形成、改善内皮细胞功能、减轻 ERS 相关凋亡）展现整合治疗优势，为开发兼具降脂、抗炎、稳定斑块功能的中药衍生创新药物提供先导化合物，推动中西医结合防治体系的构建。揭示通过膳食途径调控内源性基因表达的可能性，为功能性食品开发提供理论依据，也为中药活性成分通过调控外泌体及 miRNA 干预疾病的机制研究提供了新的思路和方法，有助于推动中药现代化研究的发展，为心血管疾病的治疗提供新的策略和靶点。

第2章 泡沫细胞源外泌体 miR-146a-5p 介导内皮细胞损伤及五味子醇甲的干预研究

2.1 引言

动脉粥样硬化 (Atherosclerosis, AS) 是一种以动脉壁内脂质沉积和炎性细胞浸润为特征的慢性炎症性疾病, 其病变过程涉及血管内皮细胞 (VECs) 损伤、平滑肌细胞增殖、泡沫细胞形成以及炎症反应等多个环节^[61]。VECs 损伤是动脉粥样硬化早期病变的关键因素, 其功能障碍可导致血管内皮屏障完整性受损, 促进脂质和炎性细胞进入动脉壁, 从而加速动脉粥样硬化的发展^[62]。其损伤指标如单核细胞趋化蛋白-1 (MCP-1)、细胞间黏附分子-1 (ICAM-1) 和血管细胞黏附分子-1 (VCAM-1) 的水平升高, 反映了内皮细胞的激活状态以及炎症反应的不断加剧^[63]。近年来, 随着对动脉粥样硬化发病机制研究的深入, 炎症反应在其中的作用愈发受到关注。炎症不仅参与动脉粥样硬化病变的早期形成, 还贯穿于斑块的进展和破裂过程中。

在动脉粥样硬化的防治研究中, 中药成分因其多靶点、多途径的作用特点而受到广泛关注^[64]。五味子醇甲是从五味子中分离得到的一种木脂素类化合物, 具备抗炎和免疫调节等多种药理活性。现代药理学发现五味子醇甲能够通过多种机制保护心血管系统, 包括抑制氧化应激、减轻炎症反应以及改善血管内皮功能。然而, 其在动脉粥样硬化防治中的具体作用机制尚不完全明确。

外泌体 (Exosomes) 是细胞分泌的直径约为 50-200 nm 脂质囊泡, 能够携带蛋白质、脂质和核酸等生物分子在细胞间传递信息^[65]。外泌体在多种生理和病理过程中作用重要, 包括炎症反应、免疫应答、细胞凋亡和血管生成等^[2]。近年来, 外泌体携带的 miRNA 在动脉粥样硬化中的作用逐渐受到关注。miR-146a-5p 是一种在多种炎症相关疾病中发挥调控作用的 miRNA, 其在动脉粥样硬化中的作用机制也逐渐受到关注^[66]。近年来研究发现, miR-146a-5p 在 AS 患者体内的表达水平显著升高, 提示其可能在该疾病的发生发展中扮演重要角色^[67]。然而, 目前对于 miR-146a-5p 在 AS 中如何影响血管内皮细胞 (特别是人脐静脉内皮细胞, HUVECs) 功能以及其具体作用机制仍不清楚, 这限制了其作为 AS 诊断生物标

志物的直接应用。鉴于此，本课题在前期研究的基础上，以 HUVECs 为研究对象，深入探讨 Exo-miR-146a-5p 在 AS 中对 HUVECs 损伤的影响及其潜在作用机制。

2.2 实验材料

2.2.1 实验试剂

表 2-1 实验试剂

Table 2-1 Experimental reagents

主要试剂	厂家
0.45 μ m PVDF 膜	Sigma-Aldrich
4%多聚甲醛	福建飞净生物
VCAM-1 antibody	武汉三鹰生物
ICAM-1 antibody	武汉三鹰生物
MCP-1 antibody	武汉三鹰生物
β -actin antibody	武汉三鹰生物
改良油红 O 染色试剂盒	上海碧云天生物
五味子醇甲	南京源植生物
BCA 蛋白浓度测定试剂盒	武汉三鹰生物
DMEM 高糖培养基	Gibico
ECL 发光显影液	南京诺唯赞
Marker	武汉三鹰生物
RIPA 裂解液	上海碧云天生物
SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液	上海碧云天生物
人源 IL-1 β ELISA 试剂盒	南京翼飞雪生物
人源 TNF- α ELISA 试剂盒	南京翼飞雪生物
蛋白酶磷酸酶抑制剂混合物	上海碧云天生物
青霉素-链霉素混合液（双抗）	以色列生物
Celopener 转染液	上海吉荧生物
CD63 antibody	正能生物
Trizol 提取试剂盒	上海碧云天生物
cDNA 合成试剂盒	上海碧云天生物
SYBR Green 试剂盒	上海碧云天生物
RPMI 1640 培养液	Hyclony
胎牛血清	以色列生物
通用型抗体稀释液	苏州新赛美

兔抗	武汉三鹰生物
鼠抗	武汉三鹰生物
胰蛋白酶	以色列生物
细胞膜染色试剂盒	贝博生物

2.2.2 实验仪器

表 2-2 实验主要仪器

Table 2-2 Main instruments of the experiment

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
倒置荧光显微镜	Leica
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
实时荧光定量 PCR 仪	美国 Applied Biosystems 公司
JIMBIO iCytal 细胞计数仪	江苏卓微生物科技有限公司
涡旋振荡器	海门市其林贝尔
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以及五味子醇甲浓度的确定

2.3.1 细胞培养

将 THP-1 细胞在 37 °C 水浴箱中复苏, 1000 r/min 离心 4 min。弃上清, 加入 1 mL 含 10% 血清的 RPMI-1640 培养液, 混匀细胞沉淀。将细胞悬液转移到 T25 瓶中, 补充完全培养液至 4 mL, 37 °C、5% CO₂ 条件下培养。当细胞覆盖率达到 85% 以上时, 1000 r/min 离心 4 min, 弃上清, 加入 1 mL 完全培养液, 按 1:2 比例传代。

HUVECs 在 37 °C 水浴箱中复苏, 1000 r/min 离心 3 min, 弃上清。将细胞转移到含有 8 mL 完全 DMEM 培养基 (含 10% 胎牛血清和 1% 抗生素) 的 100 mm 培养皿中。在 37 °C、5% CO₂ 的饱和湿度环境中培养, 待细胞形成 80% 覆盖率的致密单层后, 每 2 至 3 d 按 1:4 比例传代。

2.3.2 五味子醇甲对 THP-1 细胞活力的影响

将对数生长期的 THP-1 细胞以 2×10^4 个/孔的密度接种于 96 孔板中, 用 100 mg/mL 的 PMA 诱导其贴壁, 设置不同干预组: 五味子醇甲浓度分别为 0、0.1、0.2、1、5、10、25、50、100 μ M, 每组设置 3 个复孔。培养 24 h 后加入 10% 体积比的 CCK-8 试剂, 避光孵育 2 h, 用酶标仪在 450 nm 波长处测定 OD 值。

2.3.3 细胞分组

将 THP-1 细胞随机分为三组: Control 组 (100 mg/mL PMA 诱导, 在无血清 RPMI-1640 培养基中培养)、ox-LDL 组 (100 mg/mL PMA 诱导, 在含 100 μ g/mL ox-LDL 的无血清 RPMI-1640 培养基中培养)、SA (1 μ M) 组 (100 mg/mL PMA 诱导, 在含 1 μ M SA 和 100 μ g/mL ox-LDL 的无血清 RPMI-1640 培养基中培养)。在 37 °C、5% CO₂ 条件下培养 48 h 后收集刺激后的细胞, 并观察其形态学变化。

将 HUVECs 在不完全 DMEM 培养基培养 24 h 后, 饥饿处理并被保存以备后续实验使用。随后, 将 HUVECs 被分为三组。K-Exos 组 (用标准培养条件下培养的巨噬细胞所分泌外泌体刺激 HUVECs)。M-Exos 组 (将 HUVECs 与经过 100 μ g/mL ox-LDL 处理的巨噬细胞分泌的外泌体共培养)。SA-Exos 组 (将 1 μ M 五味子醇甲干预以及 100 μ g/mL ox-LDL 刺激的巨噬细胞分泌外泌体共同作用于 HUVECs)。

2.3.4 油红 O 染色鉴定脂肪堆积

缓慢吸去细胞培养液, PBS 洗涤 1 次。加入 4% 多聚甲醛固定液固定 10 min, PBS 漂洗 2 次。吸去染色洗涤液, 加入适量油红 O 染色工作液, 染色 15 min。去除油红 O 染色工作液, 加入适量染色洗涤液, 静置 30 s, 然后去除染色洗涤液, 用 PBS 洗涤 20 s。加入适量 PBS 均匀覆盖细胞即可, 显微镜下观察泡沫细胞内脂滴染色情况并拍照。

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外泌体

参考文献方法^[68]进行如下提取：收集泡沫细胞培养上清液约 100 mL，分装至 5 个 15 mL 离心管中，然后在 4 °C、4000 r/min 的条件下离心 10min 以去除细胞。接着，将离心管再次置于离心机中，在 12000 r/min 下离心 30 min，收集上清液并进行过滤。将过滤后的上清液移入 15 mL、100 kD 的超滤管中，以 4000 r/min 的转速进行超滤，直至上清液体积减少至 20-50 μ l。接着，加入 100 μ l PBS 溶液，再次进行超滤，此过程重复三次。超滤完成后，向超滤膜中加入 0.5 mL PBS 溶液以悬浮外泌体，然后将外泌体悬浮液转移到 1.5 mL 的 EP 管中，并存放于 -80 °C 的冰箱中以备后续处理。

2.4.2 外泌体的形态特征观察

根据参考文献实验方法处理外泌体样本^[69]，在室温条件下，将少量外泌体悬液滴在载样铜网上，静置 3 min。使用滤纸轻轻吸干液体，滴加 3% 磷钨酸溶液。随后向铜网上滴加负染液，5 min 后再次用滤纸吸干并干燥铜网。将干燥的铜网置于透射电子显微镜下观察并拍摄外泌体的形态电镜照片。随机选择 10 个外泌体进行粒径测量。

2.4.3 外泌体粒径的检测

使用 Zetasizer Nano-ZS90 粒度仪测量外泌体的粒径。取适量外泌体悬液并加入 PBS 溶液稀释 100 倍并混合均匀。按照仪器操作使用说明，取 100 μ l 稀释后的样品加入样品池中，进行外泌体粒径的检测^[70]。

2.4.4 外泌体表面特异性标志物的检测

(1) 蛋白提取

将 RIDA 裂解液 A 与蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂按 100:1:1 比例混合，加入 3 mL 冷 PBS 洗涤培养皿 2-3 次，吸干最后一次液体。向每个培养皿加入 60 μ L 裂解液，轻轻摇匀后放入 -80 °C 冰箱冷冻 10 min。在冰上刮取蛋白，确保刮净且操作时间不超过 3 min，转移至 EP 管中并轻轻涡旋混匀。将 EP 管置于 4 °C 冰箱裂解 30 min，同时读板底并配制 BCA 工作液（A 液:B 液=50:1）。裂解后，4 °C、12000 r/min 离心 5 min，吸取上清液转移至新 EP 管并记录体积。每个样品取 4 μ L 备用，向剩余样品中加入 Loading 缓冲液后短暂离心，100 °C 孵育 7 min，最后

置于-20℃冰箱保存。

(2) 蛋白定量

在 96 孔板中加入 PBS (同标准曲线制备), 每孔加入 2 μ L 预留样品, 再加入 BCA 工作液。将板置于 37℃培养箱孵育 30 min, 随后在酶标仪 562 nm 波长处测 OD 值, 根据标准曲线计算样品蛋白浓度。

(3) SDS-PAGE 电泳

制胶: 加入 10%分离胶至距玻璃板顶端 1 cm 处, 液面上加蒸馏水防气泡, 静置 40 min。吸去蒸馏水, 加入堆积胶至满溢, 插入梳子, 再静置 40 min。放入电泳缓冲液, 竖直拔去梳子。上样: 解冻待上样蛋白和 Marker, 加入电泳槽缓冲液, 依次将蛋白样品加入梳齿中, 前后泳道分别加入多量和少量 Marker。跑胶: 将电泳箱置于 4℃冰箱, 80 V 恒压电泳至 Marker 分层后, 改用 120 V 恒压, 蛋白迁移至底部(绿线下)后停止, 断电。

(4) 转膜

撬开玻璃板, 切下目标蛋白所在区域。裁剪四层滤纸和 PVDF 膜, 用甲醇活化 PVDF 膜 5 min 后浸入转膜液中。按照“4×滤纸-凝胶-PVDF 膜-4×滤纸”的顺序叠放, 卡紧膜板, 加满转膜液, 低温下以 200 mA 恒流进行转膜, 时间根据目标蛋白的分子量确定。

(5) 封闭

用 TBST 溶液将 PVDF 膜洗涤 3 次, 每次 8 min, 放入含有 5%脱脂奶粉的 TBST 溶液中, 室温下摇床震荡 120 min 封闭, 再次用 TBST 洗膜 3 次, 每次 8 min。

(6) 一抗孵育

用 5% BSA 稀释一抗 (CD63 单克隆抗体), 滴加于 PVDF 膜上, 封膜并注入相应抗体, 封膜时尽量避免小气泡或把气泡挤到膜的边缘, 4℃冰箱过夜。

(7) 二抗孵育

回收一抗, 将 PVDF 膜浸泡于稀释后的二抗中, 室温摇床缓慢摇晃 120 min, 洗涤后放入含 HRP 标记的羊抗兔二抗中, 室温下摇床缓慢摇晃 2 h, 回收二抗, 用 TBST 洗膜 3 次, 每次 8 min。

(8) ECL 显色

将 Buffer 显色液按 A 液: B 液为 1:1 混合配制, 滴加于 PVDF 膜上, 置于

化学发光仪上观察并拍摄照片。

(9) 结果分析

用 Image J 软件将目的蛋白及内参蛋白的条带进行灰度数字化, 比较蛋白的表达水平。

2.5 五味子醇甲调控 Exo-miR-146a-5p 保护泡沫细胞源外泌体诱导的 HUVEC 细胞损伤

2.5.1 外泌体中 miR-146a-5p 含量检测

2.5.1.1 外泌体总 miRNA 的提取

使用 miRNA 提取试剂盒从外泌体中提取 miRNA, 具体步骤为: 收集外泌体悬液并离心得到沉淀物, 用 150 μ l PBS 重悬后加入 450 μ l miRNA Reagent A 混匀静置; 再加入 200 μ l miRNA Reagent B 混匀离心, 取 550 μ l 上清液至 1.5 mL EP 管中, 加入 200 μ l 无水乙醇混匀后室温静置; 离心 10 min, 取 650 μ l 上清液至新 EP 管, 加入 350 μ l 异丙醇混匀离心 2 min, 弃上清; 用 700 μ l 异丙醇洗涤吸附柱, 离心 2 min 弃上清, 再用 500 μ l 无水乙醇洗涤并离心, 弃上清; 最后无溶液状态下离心 2 min 去除残留乙醇, 将吸附柱转移至 1.5 mL EP 管, 挥发乙醇后加入 30 μ l 无 Rnase 的 TE 缓冲液, 静置离心 2 min 收集 miRNA。

2.5.1.2 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 2-3 反应液组分

Table 2-3 Components of reaction solution

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

(2) 按表温度时间条件在逆转录 PCR 仪内进行加 A 反应:

表 2-4 PCR 中加 A 反应条件

Table 2-4 Reaction conditions for adding A to PCR

温度	时间
37 $^{\circ}$ C	30 min
85 $^{\circ}$ 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 2-5 反应组分

Table 2-5 Reaction components

成分	体积
10×TaqMan miRNA RT Primer	2 μ l
10×TaqMan miRNA RT Solution B	2 μ l
H ₂ O	11 μ l

(4) 按表设置在 PCR 仪上进行反转录反应:

表 2-6 反转录条件

Table 2-6 Reverse transcription conditions

温度	时间
30 °C	5 min
55 °C	60 min
95 °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 μ l 的 cDNA 用于 TaqMan hsa-miR-146a-5p miRNA 定量 PCR 试剂盒检测。

2.5.1.3 TaqMan 荧光定量 PCR

利用 TaqMan qPCR Kit 对反转录的 cDNA 进行 Real-Time PCR 检测, 选择 TaqMan RNU6B miRNA 定量 PCR 试剂盒作为内参。通过 TaqMan 探针检测泡沫细胞中 Exo-miR-146a-5p 的表达量, 以得出其相对表达水平。反应体系按表 2-5 在冰上配置, 所有样品均设三个复孔。

(1) 根据表组分配制 20 μ l PCR 反应体系:

表 2-7 PCR 反应液体系

Table 2-7 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	1-2.5 μ l
ddH ₂ O	Up to 20 μ l

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。

(2) 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, 15 min

Stage 2: 95 °C, 10 s; 60 °C, 60 s, 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-146a-5p 基因表达的相对定量分析:

处理组 $\Delta CT = CT(\text{目的基因, 待测样本}) - CT(\text{内参基因, 待测样本})$

未处理组 $\Delta CT = CT(\text{目的基因, 对照样本}) - CT(\text{内参基因, 对照样本})$

$\Delta\Delta CT = \text{处理组}\Delta CT - \text{未处理组}\Delta CT$

表达倍数 $= 2^{-\Delta\Delta CT}$

2.5.2 外泌体的标记追踪

(1) 取 100 μL 待测外泌体样品,用 1 mL Diluent C 溶液稀释混匀。

(2) 向配制好的外泌体 Diluent C 溶液中加入 4 μL PKH67 染料,充分混匀,室温避光孵育 5 min。

(3) 孵育结束后,加入 100 μL FBS 终止染色。

(4) 通过超速离心法,提取溶液中的外泌体,即为 PKH67 标记的外泌体。

(5) 将 PKH67 标记的外泌体加入至 HUVECs 的完全培养基中,充分混匀后,再用 0.22 μm 滤膜过滤。

(6) 将 HUVECs 按 1×10^5 的密度接种在 20 mm 共聚焦培养皿中,观察细胞密度达到 30%-40%后换液,加入含有 PKH67 标记外泌体的完全培养基继续培养,共培养时间分别为 0、1、2 和 4 h。

(7) 每个培养皿中加入 500 μL 4%多聚甲醛固定细胞 15 min。

(8) 固定结束后,吸尽 4%多聚甲醛,用 PBS 清洗 2 次,每次 5 min。

(9) 加入 DiR 染料标记细胞膜,在 37 °C 条件下避光孵育 1 h。

(10) 孵育结束后,吸尽 DiR 染料,PBS 漂洗 2 次,每次 5 min,再加入 500 μL DAPI 染细胞核 10 min,随后用 PBS 清洗 2 次,每次 5 min。最后,加入封片液进行封片。荧光显微镜下观察 HUVECs 对 PKH67 标记外泌体的摄取情况。

2.5.3 五味子醇甲干预泡沫细胞源外泌体诱导的 HUVECs 炎症反应的影响

细胞按实验分组处理，每组设 3 个复孔，孵育 24h 后收集细胞上清液。使用翼飞雪生物科技有限公司的 ELISA 试剂盒进行炎性因子测定，操作步骤如下：

(1) 标准品稀释：在酶标包被板上设 10 个标准品孔，通过倍比稀释法制备不同浓度的标准品，包括 IL-1 β (18、12、6、3、1.5 ng/L) 和 TNF- α (300、200、100、50、25 ng/L)。

(2) 加样：设置空白孔和待测样品孔，向待测样品孔中加入 40 μ L 样品稀释液和 10 μ L 待测样品，实现 5 倍稀释。

(3) 温育：封板后在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 30 min。

(4) 洗涤：揭去封板膜，弃去液体，甩干，加满洗涤液，静置 30 s 后弃去，重复 5 次，拍干。

(5) 加酶：除空白孔外，每孔加入 50 μ L 酶标试剂。

(6) 再次温育：同步骤 3。

(7) 再次洗涤：同步骤 5。

(8) 显色：每孔加入 50 μ L 显色剂 A 和 50 μ L 显色剂 B, 37 $^{\circ}$ C 避光显色 15 min。

(9) 终止反应：每孔加入 50 μ L 终止液，蓝色变为黄色。

(10) 测定：以空白孔调零，450 nm 波长下测量各孔的吸光度 (OD 值)，测定应在终止反应后 15 min 内完成。

2.5.4 HUVECs 的 miR-146a-5p mimics/inhibitor 转染

在 6 孔板中提前一天铺 HUVECs，确保转染时细胞密度约为 30%，每孔加 1.5 mL 含血清培养基。实验分为以下组别：mimics NC+M-Exos 组 (miR-146a-5p mimics NC 与 ox-LDL 外泌体)、mimics +M-Exos 组 (miR-146a-5p mimics 与 ox-LDL 外泌体)、mimics +SA-Exos 组 (miR-146a-5p mimics 与 1 μ M SA 处理的 ox-LDL 外泌体)、inhibitor NC+M-Exos 组 (miR-146a-5p inhibitor NC 与 ox-LDL 外泌体)、inhibitor+M-Exos 组 (miR-146a-5p inhibitor 与 ox-LDL 外泌体)、inhibitor+SA-Exos 组 (miR-146a-5p inhibitor 与 1 μ M SA 处理的 ox-LDL 外泌体)。

转染具体步骤具体为：用 125 μ l 无 RNase 水将 2.5 nM 小 RNA 冻干粉配成 20 μ M 储存液，分装保存；取 10 μ l 小 RNA 加入 250 μ l OPTI-MEM 稀释液混匀，制备 RNA 稀释液。其次，取 5 μ l Celopener 加入 250 μ l OPTI-MEM 稀释液混匀，

室温静置 5 min，制备 Celopener 稀释液。然后，将两者混合，室温静置 15 min，制备转染复合物。将 500 μ l 复合物滴加至含 1.5 mL 全培养基的细胞上，轻轻晃动混合均匀。最后，将细胞置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱中培养 24 h，转染后 6 h 更换培养基。

2.5.5 miR-146a-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 2.5.1。

2.5.6 miR-146a-5p 及五味子醇甲对泡沫细胞源外泌体诱导的 HUVECs 损伤的研究

Western Blot 实验过程同 2.4.4。

2.6 统计学分析

使用 GraphPad Prism 10 软件对实验数据进行分析并绘制图表，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）表现。

2.7 结果与分析

2.7.1 泡沫细胞体外模型的建立及五味子醇甲浓度确定

2.7.1.1 THP-1 细胞向巨噬细胞分化过程中的形态学变化

经 100 ng/mL PMA 处理 24 h 后，THP-1 细胞在光镜下观察显示体积增大，形态从圆形变为多角形，且更易于贴壁和伸展触角，表明 THP-1 细胞已成功分化为巨噬细胞。

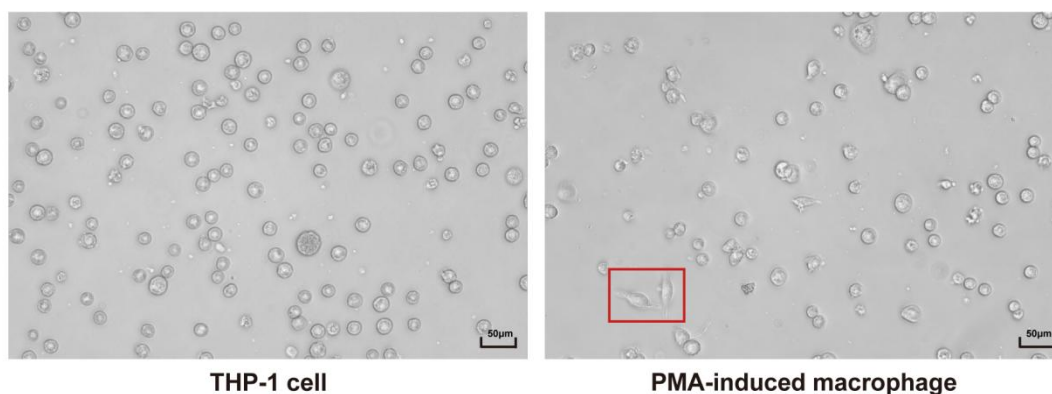


图 2-1 THP-1 细胞经 PMA 诱导后的形态变化 ($\times 200$)

Figure 2-1 Morphological changes of THP-1 cells induced by PMA ($\times 200$)

2.7.1.2 不同浓度五味子醇甲对细胞活力影响

给药 24 h 后结果显示, 与对照组细胞活力比较, 五味子醇甲浓度在 50 μM 和 100 μM 时对 THP-1 细胞毒性明显, 具有显著性差异 ($P<0.01$), 0-25 μM 范围内细胞毒性作用较小, 无显著差异。因此, 本研究后续的实验均选定 1 μM 作为五味子醇甲实验剂量。

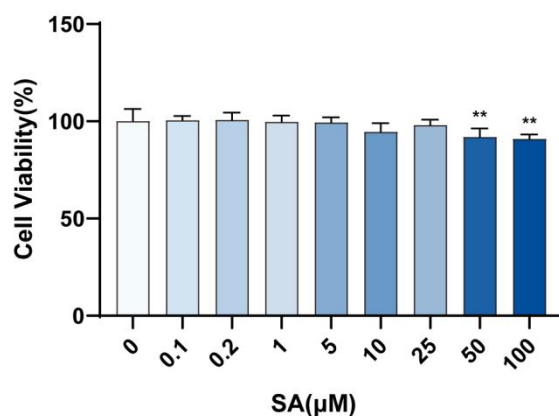


图 2-2 CCK8 检测细胞毒性

Figure 2-2 CCK8 detection of cytotoxicity

2.7.1.3 油红 O 染色观察脂质堆积情况

在 ox-LDL 诱导下, 巨噬细胞经过 48 h 刺激后, 油红 O 染色结果显示细胞内出现明显的红色脂质沉积, 形态变为椭圆形或不规则, 特征与泡沫细胞相符。相比之下, 未处理的 Control 组细胞未显示红色颗粒。而在 ox-LDL 诱导后经五味子醇甲处理, 细胞内红色脂质减少, 表明五味子醇甲能抑制 ox-LDL 诱导的脂质堆积。

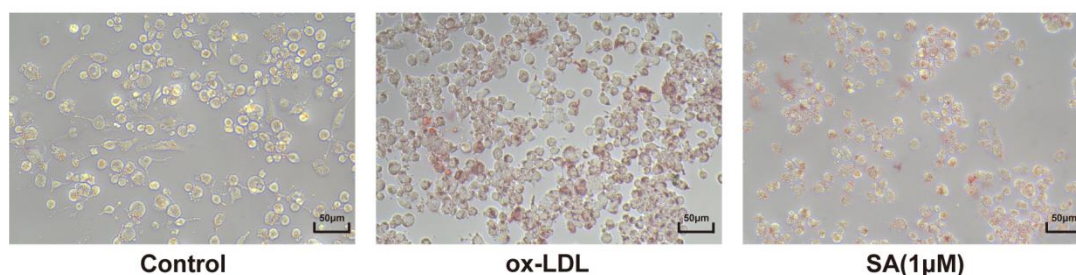


图 2-3 油红 O 染色泡沫细胞的形态 ($\times 200$)

Figure 2-3 Morphology of oil red O stained foam cells ($\times 200$)

2.7.2 外泌体的表征鉴定

2.7.2.1 TEM 观察外泌体形态

通过超滤法收集的上清液中外泌体在 TEM 下观察显示外泌体形态特征为圆形或椭圆形，具有完整的膜结构，与外泌体的理论形态特征相符。

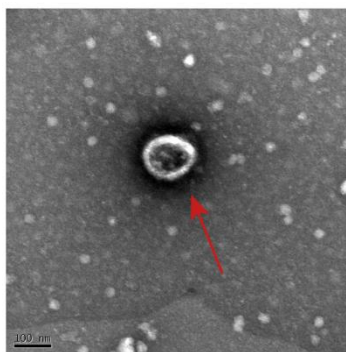


图 2-4 TEM 下 exosome 的超微结构图
Figure 2-4 Ultrastructure of exosome in the TEM

2.7.2.2 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，其粒径分布如图显示，外泌体粒径主要集中在 50-200 nm 范围内，与理论上外泌体粒径大小相符，确认超滤法成功收集了细胞上清中外泌体。

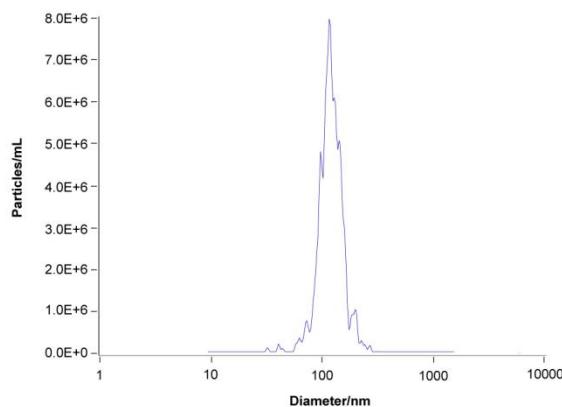


图 2-5 外泌体粒径大小分布图
Figure 2-5 Size distribution of exosomes

2.7.2.3 Western Blot 鉴定细胞上清中外泌体标志物

外泌体通常在其表面表达 CD9、CD63、CD81 等特异性蛋白标志物^[71]。为了验证提取的外泌体的纯度和完整性，采用 Western blot 技术检测了标志蛋白 CD63 的表达情况。结果显示，CD63 蛋白在提取的外泌体中呈现明显表达。这进一步证实了泡沫细胞上清中确实富含外泌体，表明此提取方法是有效且可靠的。

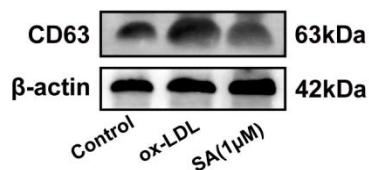


图 2-6 泡沫细胞上清外泌体标志物 CD63

Figure 2-6 Exosome marker CD63 in foam cell supernatant

2.7.3 五味子醇甲调控 Exo-miR-146a-5p 保护泡沫细胞源外泌体诱导的 HUVECs 损伤

2.7.3.1 泡沫细胞中 miR-146a-5p 的表达水平

为了探究五味子醇甲如何调节外泌体中 miRNA 水平, Taqman 探针法显示, 在 ox-LDL 处理后, 泡沫细胞上清液外泌体中 miR-146a-5p 显著上调 ($P < 0.01$), 而经 1 μM 五味子醇甲处理后显著抑制了泡沫细胞上清液外泌体中 miR-146a-5p 的释放 ($P < 0.01$)。这一结果揭示了五味子醇甲在调节 Exo-miR-146a-5p 表达方面的潜力, 为后续实验提供了重要研究基础。

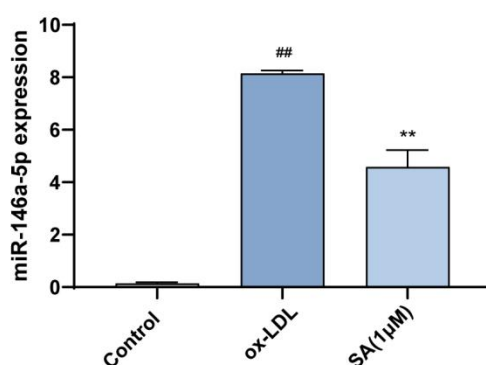


图 2-7 Exosome-miR-146a-5p 的表达水平

Figure 2-7 Exosome-miR-146a-5p expression level

2.7.3.2 PKH67 进行外泌体示踪

为了探究外泌体在细胞间的传递和摄取情况, 采用 PKH67 荧光染料对外泌体进行标记, 与 HUVECs 共培养 24 h 即可见外泌体进入细胞内并部分进入细胞核中, 蓝色激光下外泌体呈现绿色荧光, 紫外光下 HUVECs 细胞核呈现蓝色荧光, 绿色荧光部分与蓝色荧光重合。

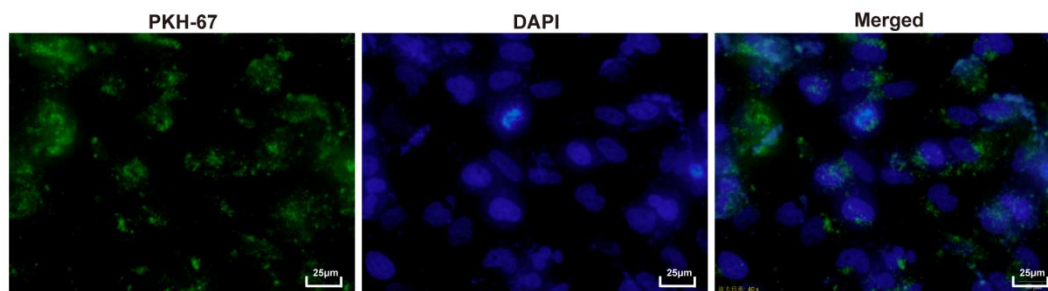
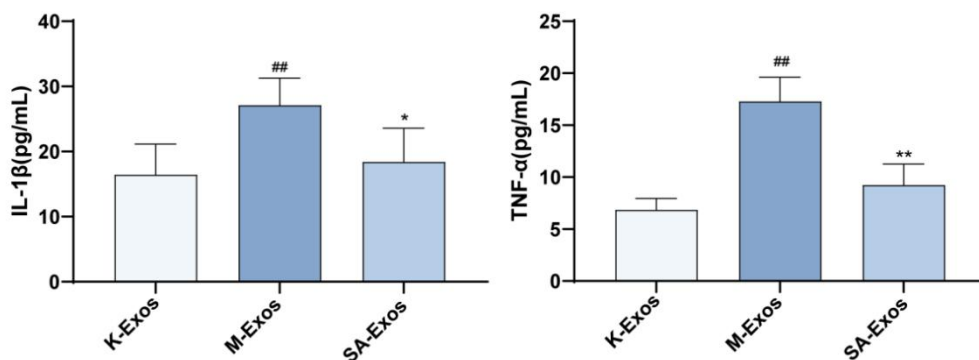


图 2-8 HUVECs 吞噬 PKH67 荧光标记的外泌体

Figure 2-8 Phagocytosis of PKH67 fluorescently labeled exosomes by HUVECs

2.7.3.3 ELISA 检测 HUVECs 中炎症因子含量

为研究不同组外泌体对 HUVEC 细胞炎症因子表达的影响, 使用 ELISA 试剂盒检测了 HUVECs 上清液中 IL-1 β 和 TNF- α 水平。结果显示, 与 K-Exos 组相比, ox-LDL 诱导 M-Exos 组细胞上清中 IL-1 β 和 TNF- α 水平显著上升 ($P < 0.01$)。而与 M-Exos 组相比, 五味子醇甲处理后降低了上清液中 IL-1 β ($P < 0.05$) 和 TNF- α ($P < 0.01$) 的水平。研究表明, 五味子醇甲对 Exo-miR-146a-5p 的抑制作用能够降低 HUVECs 中炎症因子的表达水平, 进而有效缓解炎症反应。

图 2-9 ELISA 检测 HUVECs 上清液中 TNF- α 和 IL-1 β 的表达水平Figure 2-9 Expression levels of TNF- α and IL-1 β in the supernatant of HUVECs were detected by ELISA

2.7.3.4 RT-qPCR 检测 miR-146a-5p 转染效率

为验证 miR-146a-5p 转染效果, 通过 RT-qPCR 检测转染效率。结果显示, 与 mimics NC+M-Exos 组相比, miR-146a-5p mimics 显著提升了 miR-146a-5p 的表达, 而五味子醇甲处理能在一定程度上降低其表达 ($P < 0.01$)。相反, 与 inhibitor NC+M-Exos 组相比, miR-146a-5p inhibitor 显著降低了 miR-146a-5p 的表达, 且

五味子醇甲干预后能进一步降低其水平 ($P < 0.01$)。这些结果证实了 miR-146a-5p 转染的成功及其表达受五味子醇甲的调控。

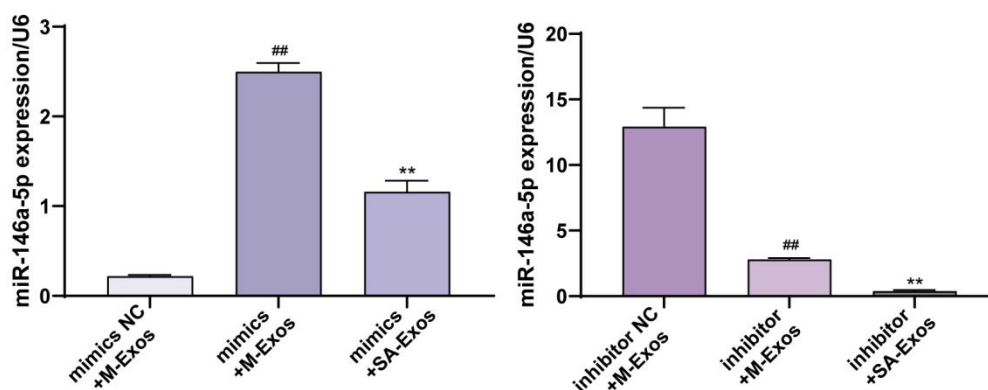


图 2-10 miR-146a-5p 表达水平

Figure 2-10 Expression level of miR-146a-5p

2.7.3.5 Western Blot 检测 miR-146a-5p 及五味子醇甲对泡沫细胞源外泌体诱导的 HUVECs 损伤影响

为探究 miR-146a-5p 及五味子醇甲对泡沫细胞源外泌体诱导的 HUVECs 损伤的影响, 通过 Western Blot 分析了转染 miR-146a-5p 后 HUVECs 中损伤因子 MCP-1、VCAM-1、ICAM-1 的表达。结果显示, 与 mimics NC+M-Exos 组相比, miR-146a-5p mimics 转染显著提高了这些因子的表达, 而五味子醇甲干预降低了它们的表达。相反, miR-146a-5p inhibitor 处理可以降低这些因子的水平, 且五味子醇甲进一步增强了这一效应。这些结果表明, miR-146a-5p 在 HUVECs 的损伤中起关键作用, 且五味子醇甲能有效减轻这种损伤。

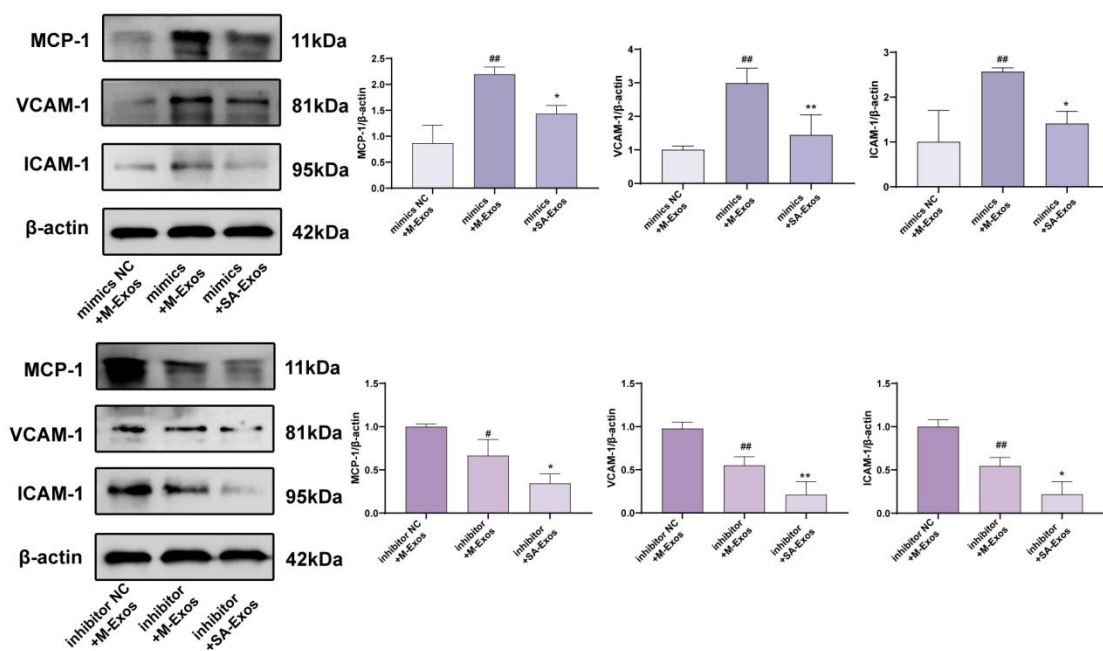


图 2-11 转染 miR-146a-5p 后血管内皮细胞损伤蛋白的表达

Figure 2-11 Expression of damage protein in vascular endothelial cells after transfetction of miR-146a-5p

2.8 本章小结

动脉粥样硬化斑块中，泡沫细胞是关键病理细胞，主要源于血管平滑肌细胞和血液单核细胞。在动脉粥样硬化早期，单核细胞分化为巨噬细胞，穿过内皮进入内膜，摄取大量脂蛋白胆固醇和胆固醇酯后，细胞内脂质积累，进而转化为泡沫细胞^[72]。因此，本实验采用 ox-LDL 诱导巨噬细胞，使其内积累大量脂质，形成泡沫细胞，从而建立泡沫细胞体外模型。目前，用于建立泡沫细胞体外模型的细胞种类繁多。查阅文献发现，猪主动脉平滑肌细胞、小鼠腹腔巨噬细胞、人类 U937 细胞、人类 THP-1 细胞和人类 HepG2 细胞等均被广泛用于相关研究^[73]。本研究选用人类 THP-1 细胞株作为细胞源，其在病理生理特征上与 AS 患者体内的细胞较为接近，因此，基于 THP-1 细胞株构建的泡沫细胞体外模型，为深入研究动脉粥样硬化的发病机制提供了有力工具。采用超滤法提取外泌体，该方法提取的外泌体较为完整，经透射电子显微镜、纳米粒度分析仪和蛋白印迹检测证实为外泌体，为后续实验中检测外泌体中 miR-146a-5p 表达量提供了可靠的理论依据。

近年来，miRNA 在药物研究及疾病靶点防治方面备受关注，尤其在 AS 防治中，miRNA 基因治疗已成为研究热点^[3]。其中，miR-146a-5p 与多种免疫炎症

疾病密切相关，并在巨噬细胞、单核细胞等多种免疫和炎症细胞中高度表达。研究表明巨噬细胞在受到 ox-LDL 刺激后，miR-146a-5p 的表达会发生显著变化。因此，本实验检测了所建立的泡沫细胞上清液中 miR-146a-5p 的释放情况。

实验采用 THP-1 细胞系模拟 AS 患者体内生理病理过程，并成功建立泡沫细胞体外模型。光镜观察发现，在被油红 O 染色的 ox-LDL 组细胞中，有明显的红色脂质颗粒。探针分析测定泡沫细胞上清中的外泌体 miR-146a-5p 表达，结果表明，ox-LDL 组外泌体中 miR-146a-5p 的表达水平明显高于 Control 组，提示 miR-146a-5p 与 AS 的发病机制之间可能存在潜在联系。

为了进一步明确外泌体 miR-146a-5p 对 HUVECs 损伤的影响，本实验采用 miR-146a-5p mimics 和 inhibitor 介导 HUVECs。实验结果显示，外泌体 miR-146a-5p mimics 介导的 MCP-1、VCAM-1 和 ICAM-1 的表达水平在 HUVECs 中显著高于巨噬细胞分泌外泌体介导的水平，而转染 miR-146a-5p inhibitor 的 HUVECs 中，MCP-1、VCAM-1 和 ICAM-1 的表达水平明显降低。这表明外泌体 miR-146a-5p 能够介导 HUVECs 损伤。

综上所述，本实验结果表明，五味子醇甲通过抑制泡沫细胞中 miR-146a-5p 的表达，从而保护血管内皮细胞损伤。这一发现为 AS 疾病的早期治疗和预防提供了新的生物标志物 miR-146a-5p，也为未来基于 miRNA 的靶向治疗策略提供了重要的理论依据。

第3章 五味子醇甲通过 Exo-miR-146a-5p 保护内皮细胞的关键靶点研究

3.1 引言

外泌体是细胞分泌的纳米级囊泡，通常存在于体液中，是细胞间通信的重要介质^[74]。近年来，外泌体中携带的非编码 RNA（如 miRNA）因其在跨细胞调控中的关键作用而备受关注。miRNA 是一类小型内源性非编码 RNA 分子，可通过与目标 mRNA 结合并抑制其翻译或促进其降解来调控基因表达。

研究表明，外泌体中的 miRNA 可以通过细胞间的传递，实现跨细胞调控，影响受体细胞的生物学功能。例如，胃癌细胞分泌的外泌体中的环状 RNA circATP8A1 通过与 miR-1-3p 的竞争性结合，激活 STAT6 通路，诱导巨噬细胞的 M2 极化，从而促进肿瘤进展^[18]。此外，植物源性外泌体样纳米颗粒中的 miRNA 也显示出对病毒和人类转录本的显著跨界调节作用^[75]。这些研究揭示了外泌体 miRNA 在多种生理和病理过程中发挥重要作用。在机制研究方面，低聚糖四糖被发现能够与小肠上皮细胞膜上的 HSP90 β 结合，从而重编程外泌体 miRNA 的表达谱，并通过 miRNA 调控肠道微生物群^[76]。这一发现不仅揭示了外泌体 miRNA 在细胞间通信中的新功能，还为研究外泌体 miRNA 的靶向调控提供了新的视角。

在前期实验中，研究发现 ox-LDL 可刺激巨噬细胞转化为泡沫细胞，泡沫细胞分泌的外泌体明显多于巨噬细胞且外泌体中 miR-146a-5p 的含量也显著上升。进一步研究发现，外泌体可将 miR-146a-5p 转运到 HUVECs 中，导致黏附分子 ICAM-1、VCAM-1 以及趋化因子 MCP-1 的表达增加，从而造成 HUVECs 损伤。然而，目前尚不清楚外泌体中 miR-146a-5p 是如何作用于 HUVECs 的。

在本研究中，将重点探讨外泌体分泌的 miRNA 如何通过靶向作用调控特定靶蛋白，从而发挥其生物学功能。基于上述发现，本实验以正常巨噬细胞分泌的外泌体被用作对照组（K-Exos 组），并利用泡沫细胞分泌的外泌体来研究 Exo-miR-146a-5p 对 HUVECs 的靶向作用。

3.2 实验材料

3.2.1 实验试剂

表 3-1 实验试剂

Table 3-1 Experimental reagents

主要试剂	厂家
0.45 μm PVDF 膜	Sigma-Aldrich
4%多聚甲醛	福建飞净生物
SMAD4 antibody	武汉三鹰生物
VCAM-1 antibody	武汉三鹰生物
ICAM-1 antibody	武汉三鹰生物
MCP-1 antibody	武汉三鹰生物
β -actin antibody	武汉三鹰生物
五味子醇甲	南京源植生物
BCA 蛋白浓度测定试剂盒	武汉三鹰生物
DMEM 高糖培养基	Gibico
ECL 发光显影液	南京诺唯赞
Marker	武汉三鹰生物
RIPA 裂解液	上海碧云天生物
SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液	上海碧云天生物
蛋白酶磷酸酶抑制剂混合物	上海碧云天生物
青霉素-链霉素混合液（双抗）	以色列生物
Celopener 转染液	上海吉荧生物
Trizol 提取试剂盒	上海碧云天生物
cDNA 合成试剂盒	上海碧云天生物
SYBR Green 试剂盒	上海碧云天生物
RPMI 1640 培养液	Hyclony
胎牛血清	以色列生物
通用型抗体稀释液	苏州新赛美
兔抗	武汉三鹰生物
鼠抗	武汉三鹰生物
胰蛋白酶	以色列生物

3.2.2 实验仪器

表 3-2 实验主要仪器

Table 3-2 Main instruments of the experiment

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
倒置荧光显微镜	Leica
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
实时荧光定量 PCR 仪	美国 Applied Biosystems 公司
HH-2 恒温水浴锅	江苏省金坛市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
涡旋振荡器	海门市其林贝尔
制冰机	Grant

3.3 五味子醇甲通过外泌体跨细胞调控 SMAD4 的研究

3.3.1 miR-146a-5p 靶基因预测

利用生物信息学方法鉴定 miR-146a-5p 的靶基因。使用 miRanda (<http://www.microrna.org/>)、TargetScan (https://www.targetSAan.org/vert_80/) 和 PicTar (<http://pictar.mdc-berlin.de/>) 等预测工具来预测 miR-146a-5p 的靶基因。选择“Human species”，输入“has-miR-146a-5p”，提交后开始靶基因预测。

3.3.2 五味子醇甲通过 Exo-miR-146a-5p 调控 SMAD4 的水平

3.3.2.1 细胞分组

HUVECs 分组同 2.3.3。

3.3.2.2 免疫荧光检测 SMAD4 水平

HUVECs 以 1.5×10^5 个/皿的密度接种于共聚焦小皿中，培养 24 h 后，弃去培养基并用 PBS 清洗。接着，加入无血清培养基与外泌体混合培养 24 h，以备进行免疫荧光染色。染色步骤如下：

- (1) 吸出培养液，用 1 mL PBS 清洗细胞 3 次，每次 8 min，摇晃去除杂物。
- (2) 使用 100 μ l 固定液固定细胞 30 min。
- (3) 固定后，用 PBS 洗去多余固定液。
- (4) 用 0.2% Triton X-100 处理细胞 15 min 以增强膜通透性。
- (5) 用 PBS 清洗 3 次，每次 5 min。
- (6) 配置 5% BSA 于 PBS 中，室温封闭非特异性蛋白 1 h。
- (7) 稀释一抗 SMAD4 至适当比例，滴加于细胞表面，4 $^{\circ}$ C 过夜。
- (8) 次日回收一抗，用 PBS 清洗 3 次，每次 5 min。
- (9) 加入免疫荧光二抗（稀释比例 1:400），避光孵育 1 h。
- (10) 吸出二抗，用 PBS 清洗 3 次。
- (11) 将 DAPI 稀释至 1:1 比例于 PBS 中，滴加于细胞上，孵育 5 min。
- (12) 用 PBS 清洗 3 次，每次 5 min。
- (13) 加入抗荧光淬灭剂，保护荧光信号。
- (14) 染色完成后，使用激光共聚焦显微镜观察并采集图像。

3.3.2.3 Western Blot 检测 SMAD4 蛋白的表达

Western Blot 实验过程同 2.4.4。

3.4 五味子醇甲调控 Exo-miR-146a-5p 靶向 SMAD4 保护泡沫细胞源 外泌体诱导的 HUVECs 损伤

3.4.1 五味子醇甲通过 Exo-miR-146a-5p 靶向调控 SMAD4 水平

Western Blot 实验过程同 2.4.4。

3.4.2 HUVECs 中沉默靶基因 SMAD4

提前一天将 HUVECs 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 μ l。转染实验分组设置：siSMAD4 NC+M-Exos 组（siSMAD4 NC+ox-LDL 外泌体）、siSMAD4+M-Exos 组（siSMAD4 +ox-LDL 外泌体）、siSMAD4+SA-Exos 组（siSMAD4+ox-LDL+1 μ M SA 外泌体）。接种细胞时，每孔接种的细胞数量尽量保持一致，尽量使细胞在各孔的表面平均分布。

转染过程同 2.5.4。

3.4.3 siSMAD4 沉默效率检测

RT-qPCR 检测 SMAD4 基因的表达

(1) 总 RNA 提取

在六孔板中每孔加入 1 mL Trizol 试剂裂解细胞,转移至离心管后室温静置 5 min。按每 1 mL Trizol 加入 0.2 mL 氯仿,混匀后室温静置 2-3 min, 4 °C、12000 r 离心 15 min, 吸取上层无色水相(含总 RNA)至新管。按每 1 mL Trizol 加入 0.5 mL 异丙醇,混匀后室温静置 10 min 沉淀 RNA, 4 °C、12000 r 离心 10 min, 弃去上清液。按每 1 mL Trizol 加入 1 mL 75%乙醇(DEPC 水配制)洗涤沉淀,4 °C、7500 r 离心 5 min, 弃去上清液, 短暂离心吸尽残留液体。RNA 沉淀略干后, 加入 20 μ L DEPC 水溶解, 样品置于-80 °C冰箱保存。

(2) cDNA 合成

实验按照 cDNA 第一链快速合成试剂盒(去基因组)进行。将 1 μ g 总 RNA 与 1 μ L gDNA Eraser 和 8 μ L 无 DNase/RNase 水混合, 42 °C 孵育 5 min, 冰上冷却, 得到基因组 DNA 去除反应液。取 10 μ L 该反应液, 加入 10 μ L 2 $\times$ 1st Strand cDNA Synthesis Super Mix, 混匀后短暂离心, 50 °C 孵育 15 min, 75 °C 孵育 5 min 以失活酶。取 1 μ L 合成的 cDNA 用于后续 PCR 实验。

(3) 荧光定量 PCR 检测相对表达量

①以 18S rRNA 为内参基因, 人源 SMAD4 mRNA 引物均由通用生物科技有限公司合成。

表 3-3 引物序列
Table 3-3 Primers sequence

Primer name	Sequence(5' to 3')
18S-F	AAACGGCTACCACATCCAAG
18S-R	CCTCCAATGGATCCTCGTTA
SMAD4-F	ATGGATACGTGGACCCTTCT
SMAD4-R	GTCGATGACACTGACGCAAA

②将引物稀释至 10 μ M, 设计 96 孔板的上样顺序, 每个样品设置 5 个复孔。

③在 20 μ L 反应体系中, 分别加入以下试剂: cDNA 模板 1 μ L, 正向引物 0.5 μ L, 反向引物 0.5 μ L, 2 $\times$ SYBR Green Fast qPCR Master Mix-LR 10 μ L, DEPC 水 8 μ L。

④实验在 Real Time PCR 扩增仪上进行。

⑤Real-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

3.4.4 SMAD4 及五味子醇甲对泡沫细胞源外泌体诱导的 HUVECs 损伤的研究

Western Blot 实验过程同 2.4.4。

3.5 统计学分析

统计学分析同 2.6。

3.6 结果与分析

3.6.1 五味子醇甲通过外泌体调控 SMAD4 表达

3.6.1.1 miR-146a-5p 靶基因预测

为了鉴定外泌体跨 HUVECs 中 miR-146a-5p 的靶基因，综合运用了三种生物信息学工具（Miranda、proMiR 和 PicTar）进行预测，以筛选出一组潜在的共同靶基因。分析结果显示，SMAD4 基因的 3'UTR 区域（5'-AACUGGA-3'）在不同物种间具有高度保守性，这提示其可能是 miR-146a-5p 的潜在靶点。进一步预测表明，miR-146a-5p 的结合位点位于 SMAD4 基因 3'UTR 的第 390-397 位核苷酸序列。



图 3-1 miR-146a-5p 的靶基因预测

Figure 3-1 Target gene prediction of miR-146a-5p

3.6.1.2 五味子醇甲通过外泌体调控 SMAD4 水平

为探讨五味子醇甲可以通过外泌体靶向调控 HUVECs 中 SMAD4 的水平，研究通过免疫荧光和 Western Blot 技术探讨了五味子醇甲对 HUVECs 中 SMAD4 表达的影响。结果显示，与 K-Exos 组相比，M-Exos 诱导的 HUVECs 中 SMAD4 的荧光强度和蛋白表达水平均降低（ $P < 0.01$ ），而五味子醇甲干预则显著增强了 SMAD4 的荧光强度以及提高了蛋白表达水平（ $P < 0.01$ ）。综合免疫荧光和 Western Blot 结果，五味子醇甲可以增加靶基因 SMAD4 的表达。

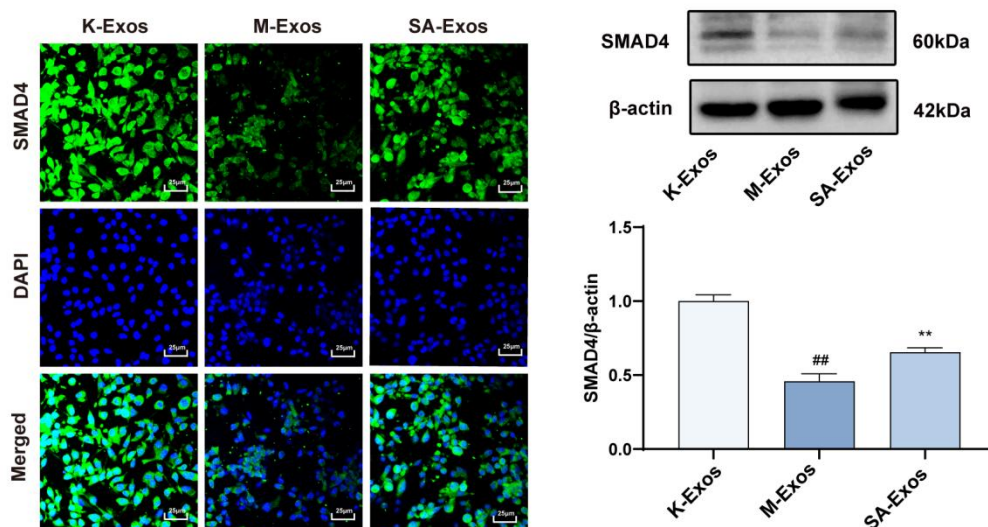


图 3-2 五味子醇甲通过外泌体调控 SMAD4 的水平
Figure 3-2 SA regulates SMAD4 levels through exosome

3.6.2 五味子醇甲通过 Exo-miR-146a-5p 靶向 SMAD4 保护泡沫细胞源外泌体诱导的内皮细胞损伤

3.6.2.1 五味子醇甲通过 Exo-miR-146a-5p 靶向调控 SMAD4 水平

为确定 miR-146a-5p 对靶蛋白 SMAD4 的影响，通过 Western Blot 分析了转染 miR-146a-5p 后 SMAD4 的蛋白表达。结果显示，与 mimics NC+M-Exos 组相比，miR-146a-5p mimics 降低了靶蛋白 SMAD4 的表达水平 ($P<0.01$)，而五味子醇甲处理能够部分恢复其表达 ($P<0.05$)。相对地，与 inhibitor NC+M-Exos 组相比，miR-146a-5p inhibitor 显著提高了靶蛋白 SMAD4 的表达水平 ($P<0.01$)，且五味子醇甲干预后进一步增强了这一效应 ($P<0.01$)。这些结果揭示了 SMAD4 的表达与 miR-146a-5p 的表达水平呈负相关。

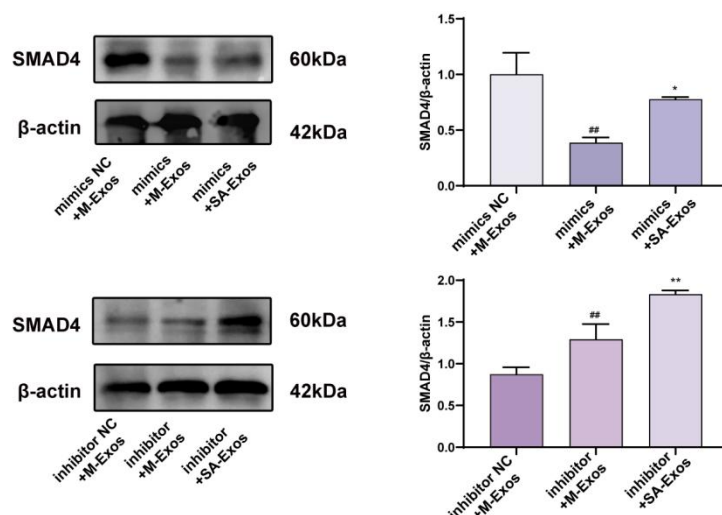


图 3-3 Exo-miR-146a-5p 靶向调控 SMAD4 的水平

Figure 3-3 Exo-miR-146a-5p targeted regulation of SMAD4 levels

3.6.2.2 siSMAD4 沉默效率检测

为探究靶基因 SMAD4 的功能,通过 siRNA 技术干扰靶基因 SMAD4 的表达,并利用 RT-qPCR 检测干扰效果。结果显示,与 siSMAD4 NC+M-Exos 组相比,siSMAD4 处理显著降低了 SMAD4 的表达水平 ($P<0.01$)。而在 siSMAD4 处理的基础上,五味子醇甲干预显著提高了 SMAD4 的表达 ($P<0.01$),表明五味子醇甲能够上调 SMAD4 的表达水平。

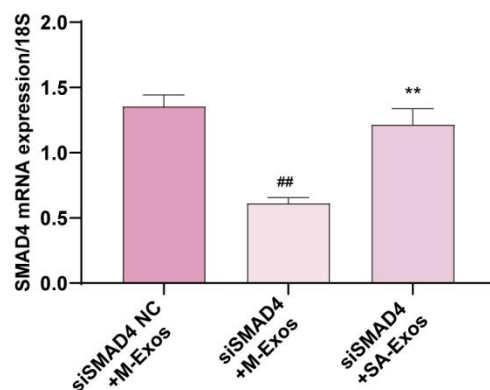


图 3-4 SMAD4 的表达水平

Figure 3-4 Expression levels of SMAD4

3.6.2.3 SMAD4 及五味子醇甲对泡沫细胞诱导的 HUVECs 损伤的研究

为了研究靶基因 SMAD4 和五味子醇甲对泡沫细胞源外泌体诱导的 HUVECs 损伤的影响,通过 Western Blot 检测了沉默靶基因 SMAD4 后 HUVECs 中损伤因

子 MCP-1、VCAM-1 以及 ICAM-1 的表达。实验结果表明, 与 siSMAD4 NC+M-Exos 组相比, 沉默 SMAD4 导致这些损伤因子的表达水平在泡沫细胞源外泌体诱导的 HUVECs 中显著上升 ($P<0.01$), 说明 SMAD4 的上调能够抑制细胞损伤。进一步的研究发现, 五味子醇甲干预显著降低了这些损伤因子的表达, 证实了五味子醇甲通过抑制 Exo-miR-146a-5p 靶向 SMAD4 的上调, 可以抑制 HUVECs 的损伤。

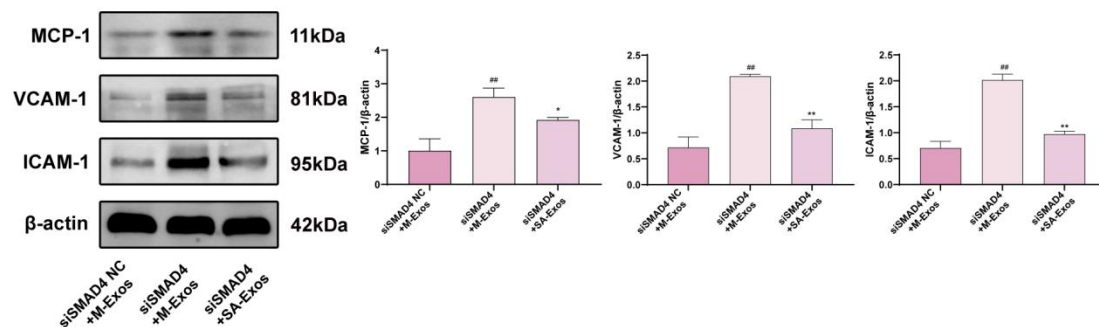


图 3-5 沉默 SMAD4 后血管内皮细胞损伤蛋白的表达

Figure 3-5 Expression of vascular endothelial injury protein after silencing SMAD4

3.7 本章小结

近年来, miRNAs 与 SMADs 家族成员的相互作用成为研究热点, 尤其是 miR-146a-5p 与 SMAD4 信号通路的相互作用已得到初步阐述。通过 miRNA 靶基因预测网站分析, 发现 SMAD4 是 miR-146a-5p 的下游靶点, 其 mRNA 的 3'UTR 区的第 390-397 位核苷酸序列与 miR-146a-5p 高度匹配, 表明二者具有很强的相关性。进一步通过转染实验证明, miR-146a-5p mimics 能够显著降低 SMAD4 表达水平, 而 miR-146a-5p inhibitor 能够显著升高 SMAD4 表达水平, 证实 miR-146a-5p 能够抑制 SMAD4 的表达。通过干扰 SMAD4, 检测内皮损伤因子 ICAM-1、VCAM-1 和 MCP-1 的蛋白表达水平, 证实了五味子醇甲通过降低泡沫细胞来源外泌体中的 miR-146a-5p, 上调 SMAD4 表达, 从而发挥抗内皮细胞损伤的作用。

综上所述, 泡沫细胞来源的外泌体中携带的 miRNA 能够通过跨细胞作用靶向 HUVECs 中的 SMAD4 蛋白。这种靶向作用通过精准调控 SMAD4 这一关键靶蛋白的表达水平, 进而发挥其生物学功能, 揭示了外泌体 miRNA 在细胞间信息传递和功能调控中的重要作用。而五味子醇甲通过调节外泌体中的 miRNA 靶

向作用，上调 SMAD4 蛋白的表达，从而减轻内皮细胞损伤。这一发现不仅为五味子醇甲的药理作用机制提供了新的理论支持，还为开发针对心血管疾病的新疗法提供了潜在的靶点和创新方向，具有重要的临床应用前景。

第4章 五味子醇甲通过 Exo-miR-146a-5p 靶向 SMAD4 保护内皮细胞的机制研究

4.1 引言

细胞凋亡是一种由基因调控的程序性细胞死亡过程，在生物体的发育、组织修复以及免疫调节中发挥重要作用。与细胞坏死不同，细胞凋亡是一个有序的过程，伴随着细胞体积减小、细胞核染色质凝聚、DNA 断裂以及细胞膜破裂等形态学和生化变化^[77]。细胞凋亡的机制复杂，涉及线粒体通路、死亡受体通路和内质网通路等多个信号通路。其中，内质网通路与内质网应激密切相关，当内质网功能受损时，会通过激活 C/EBP 同源蛋白（CHOP）等分子引发凋亡信号^[78]。

内质网应激是指细胞内质网腔内未折叠或错误折叠蛋白的积累，导致内质网功能紊乱而引发的应激反应^[79]。内质网是细胞中蛋白质合成、折叠与分泌的重要场所，当其功能受到干扰时，会激活 UPR，试图恢复内质网的稳态。在应激初期，细胞通过上调分子伴侣蛋白（如 GRP78）和激活信号转导通路（如 ATF6、PERK、IRE1）来缓解应激。然而，如果应激持续或过于强烈，细胞会启动凋亡程序，导致细胞死亡。

在前期实验中，本研究发现五味子醇甲可以抑制 Exo-miR-146a-5p 靶向调节 SMAD4 的表达水平，从而发挥抗内皮细胞损伤的作用。然而，目前尚不清楚 HUVECs 损伤是否由内质网应激引发的细胞凋亡所引起。

基于上述发现，本实验以正常巨噬细胞分泌的外泌体作为对照组（K-Exos 组），并利用泡沫细胞分泌的外泌体来研究 Exo-miR-146a-5p 对 HUVECs 凋亡和内质网应激的影响。此外，本实验还探讨了 Exo-miR-146a-5p 的靶基因 SMAD4 在细胞凋亡中的作用机制。为了进一步验证内质网应激与细胞凋亡之间的关系，研究采用了 4-苯基丁酸（4-PBA）作为内质网应激抑制剂，通过抑制内质网应激通路来观察其对细胞凋亡的影响。

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
三氯甲烷	上海化学试剂有限公司
异丙醇	上海化学试剂有限公司
无水乙醇	上海化学试剂有限公司
DEPC 水	南京凯基生物有限公司
qRT-PCR 反应体系	上海 Takara 公司
Caspase3 antibody	Cell signing
Cle-Caspase3 antibody	Cell signing
Caspase9 antibody	Cell signing
Cle-Caspase9 antibody	Cell signing
CHOP antibody	武汉三鹰生物
GRP78 antibody	武汉三鹰生物
ATF6 antibody	武汉三鹰生物
IRE1 antibody	武汉三鹰生物
PERK antibody	武汉三鹰生物
β -actin antibody	武汉三鹰生物
Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒	南京翼飞雪生物
ECL 发光显影液	南京诺唯赞
SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液	上海碧云天生物
蛋白酶磷酸酶抑制剂混合物	上海碧云天生物
青霉素-链霉素混合液（双抗）	以色列生物
胎牛血清	以色列生物
通用型抗体稀释液	苏州新赛美
兔抗	武汉三鹰生物
鼠抗	武汉三鹰生物
胰蛋白酶	以色列生物

4.2.2 实验仪器

表 4-2 实验主要仪器

Table 4-2 Main instruments of the experiment

仪器名称	厂家
-80℃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
倒置荧光显微镜	Leica
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
实时荧光定量 PCR 仪	美国 Applied Biosystems 公司
HH-2 恒温水浴锅	江苏省金坛市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
涡旋振荡器	海门市其林贝尔
制冰机	Grant
流式细胞仪	安捷伦

4.3 五味子醇甲抑制 Exo-miR-146a-5p 对细胞凋亡的作用研究

4.3.1 细胞培养及分组

HUVECs 分组同 2.3.3。

4.3.2 免疫荧光观察

HUVECs 以 1.5×10^5 个/皿的密度接种于共聚焦小皿中，培养 24 h 后，弃去培养基并用 PBS 清洗。接着，加入无血清培养基与外泌体混合培养 24 h，以备进行免疫荧光染色。染色步骤如下：

- (1) 吸出培养液，用 1 mL PBS 清洗细胞 3 次，每次 8 min，摇晃去除杂物。
- (2) 使用 100 μ l 固定液固定细胞 30 min。
- (3) 固定后，用 PBS 洗去多余固定液。
- (4) 用 0.2% Triton X-100 处理细胞 15 min 以增强膜通透性。

- (5) 用 PBS 清洗 3 次，每次 5 min。
- (6) 配置 5% BSA 于 PBS 中，室温封闭非特异性蛋白 1 h。
- (7) 稀释一抗 CHOP 至适当比例，滴加于细胞表面，4 °C 过夜。
- (8) 次日回收一抗，用 PBS 清洗 3 次，每次 5 min。
- (9) 加入免疫荧光二抗（稀释比例 1:400），避光孵育 1 h。
- (10) 吸出二抗，用 PBS 清洗 3 次。
- (11) 将 DAPI 稀释至 1:1 比例于 PBS 中，滴加于细胞上，孵育 5 min。
- (12) 用 PBS 清洗 3 次，每次 5 min。
- (13) 加入抗荧光淬灭剂，保护荧光信号。
- (14) 染色完成后，使用激光共聚焦显微镜观察并采集图像。

4.3.3 RT-qPCR 检测 HUVECs 中凋亡基因 caspase3、caspase9 mRNA 表达

RT-qPCR 实验过程同 3.4.3。

内参为 18s，人源 caspase3、caspase9 mRNA 引物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')
caspase3-F	TGCAGCAAACCTCAGGGAAA
caspase3-R	TCAAACCATTTTAGGAAGTTGGCA
caspase9-F	CTTCGTTTCTGCGAACTAACAGG
caspase9-R	GCACCACTGGGGTAAGGTTT
18S-F	AAACGGCTACCACATCCAAG
18S-R	CCTCCAATGGATCCTCGTTA

4.3.4 Western Blot 检测细胞凋亡蛋白 caspase3、caspase9 的表达

Western Blot 实验过程同 2.4.4。

4.4 五味子醇甲抑制 Exo-miR-146a-5p 对内质网应激通路的作用研究

4.4.1 细胞培养及分组

HUVECs 分组同 2.3.3。

4.4.2 RT-qPCR 检测 HUVECs 中内质网应激基因 GRP78、ATF6、PERK、IRE1 mRNA 表达

RT-qPCR 实验过程同 3.4.3。

以 18s 为内参对照，人源 GRP78、PERK、IRE1、ATF6 mRNA 引物均由通用生物科技有限公司合成。

表 4-4 引物序列
Table 4-4 Primers sequence

Primer name	Sequence(5' to 3')
GRP78-F	CATCACGCCGTCCTATGTCG
GRP78-R	CGTCAAAGACCGTGTTCTCG
PERK-F	ACGATGAGACAGAGTTGCGAC
PERK-R	ATCCAAGGCAGCAATTCTCCC
IRE1-F	CACAGTGACGCTTCCTGAAAC
IRE1-R	GCCATCATTAGGATCTGGGAGA
ATF6-F	TCCTCGGTCAGTGGACTCTTA
ATF6-R	CTTGGGCTGAATTGAAGGTTTTG
18S-F	AAACGGCTACCACATCCAAG
18S-R	CCTCCAATGGATCCTCGTTA

4.4.3 Western blot 检测细胞中内质网应激蛋白 GRP78、ATF6、PERK、IRE1 的表达

Western Blot 实验过程同 2.4.4。

4.5 SMAD4 蛋白对细胞凋亡的调控作用研究

4.5.1 细胞培养及分组

转染 SMAD4 的 HUVECs 培养过程同 3.4.2。

4.5.2 流式细胞术检测细胞凋亡

收集细胞培养液至离心管备用，用不含 EDTA 的胰酶消化细胞至脱落，加入培养基去除贴壁细胞并重悬，重新放入离心管中。以 1000 r 的转速离心 5 min，沉淀细胞。吸除上清，在 4 °C 下用 1 mL 预冷的 PBS 重悬细胞，再次离心沉淀并吸除上清。将 Binding Buffer 按 1:9 稀释，即 2 mL 10×Binding Buffer : 18 mL 去离子水。将细胞重悬于 1×PBS 至浓度 $1-5 \times 10^6/\text{mL}$ ，取 100 μL 细胞悬液至 5 mL

流式管中,加入 5 μ L Annexin V/FITC,混匀后室温避光孵育 5 min,再加入 5 μ L 碘化丙锭溶液 (PI) 和 400 μ L PBS,立即进行流式细胞计数检测。

4.5.3 RT-qPCR 检测 SMAD4 对细胞凋亡基因 caspase3、caspase9 mRNA 表达的影响

RT-qPCR 实验过程同 3.4.3。

4.5.4 SMAD4 对细胞凋亡蛋白 caspase3、caspase9 的影响

Western Blot 实验过程同 2.4.4。

4.6 抑制内质网应激对细胞凋亡影响的研究

4.6.1 细胞培养及分组

将 HUVECs 在不完全 DMEM 培养基培养 24 h 后,饥饿处理并被保存以备后续实验使用。随后,将 HUVECs 被分为四组。M-Exos 组 (将 HUVECs 与经过 100 μ g/mL ox-LDL 处理的巨噬细胞分泌的外泌体共培养)、M-Exos+4-PBA 组 (将 HUVECs 与经过 100 μ g/mL ox-LDL 处理的巨噬细胞分泌的外泌体共培养并加入 4-PBA)、SA-Exos 组 (将 1 μ M 五味子醇甲干预以及 100 μ g/mL ox-LDL 刺激的巨噬细胞分泌外泌体共同作用于 HUVECs)、SA-Exos+4-PBA 组 (将 1 μ M 五味子醇甲干预以及 100 μ g/mL ox-LDL 刺激的巨噬细胞分泌外泌体共同作用于 HUVECs 并加入 4-PBA)。

4.6.2 流式细胞术观察

实验方法同 4.5.2。

4.6.3 Western blot 检测抑制内质网应激对内质网应激蛋白 GRP78、ATF6、PERK、IRE1 以及凋亡蛋白 CHOP、cle-caspase3 和 cle-caspase9 的表达

Western Blot 实验过程同 2.4.4。

4.6.4 免疫共定位检测 GRP78、CHOP 蛋白表达水平

(1) 培养好的细胞用 PBS 洗涤 3 次,每次 5 min。每孔加入 1mL 4%多聚甲醛室温固定 15 min,用 4℃预冷的 PBS 洗涤 3 次,每次 5 min。

(2) 每孔加入 1 mL 0.1-0.5%Triton-X-100,室温通透 30 min。PBS 洗涤 3 次,每次 5 min。

(3) 1%-3%BSA 封闭液室温封闭 30 min。

(4) 用封闭液稀释一抗 CHOP(1:200)、GRP78(1:200)混合液 4 ℃孵育过夜。

TBST 洗涤细胞 3 次，每次 5 min。

(5) 用两种二抗混合液室温避光孵育 2 h。TBST 洗涤细胞 3 次，每次 5 min。

(6) DAPI 室温孵育细胞 1-5 min。PBS 洗涤 3 次，每次 5 min。

(7) 滴加抗荧光猝灭剂，并盖上盖玻片，保证样本上没有气泡。

(8) 染色完成后，使用激光共聚焦显微镜观察并采集图像。

4.7 统计学分析

统计学分析同 2.6。

4.8 结果与分析

4.8.1 五味子醇甲抑制 Exo-miR-146a-5p 对细胞凋亡的影响

4.8.1.1 免疫荧光检测 CHOP 蛋白表达

为了探究五味子醇甲是否通过抑制泡沫细胞中 Exo-miR-146a-5p 来发挥其抗细胞凋亡作用，从而改善动脉粥样硬化，通过免疫荧光技术检测了 HUVECs 中凋亡蛋白 CHOP 的表达水平，以评估五味子醇甲的抗凋亡效应。CHOP 是一种关键的转录因子，在细胞凋亡过程中发挥着重要作用。结果显示，与 K-Exos 组相比，经 M-Exos 诱导的细胞中 CHOP 的表达显著增加。然而，与 M-Exos 组相比，五味子醇甲干预的 SA-Exos 组的 CHOP 表达水平显著降低。以上结果表明，五味子醇甲能够调节 CHOP 的表达水平，抑制泡沫细胞源外泌体诱导的细胞凋亡，从而对 HUVECs 起到保护作用。

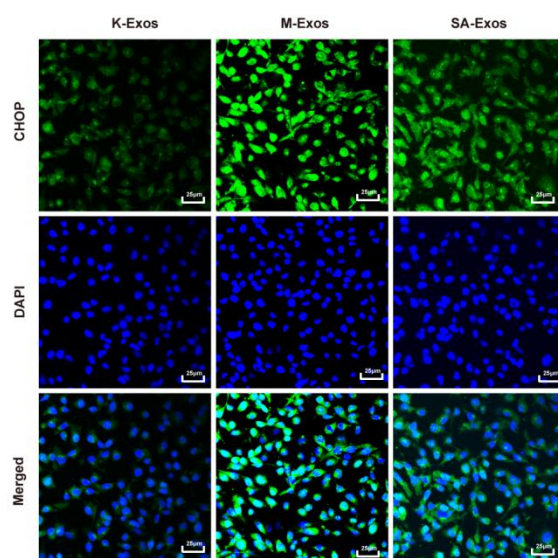


图 4-1 免疫荧光观察凋亡蛋白 CHOP 的表达

Figure 4-1 Expression of the apoptotic protein CHOP by immunofluorescence

4.8.1.2 五味子醇甲通过外泌体调控细胞凋亡中 caspase3、caspase9 的水平

细胞凋亡是一个由多种基因严格调控的复杂过程。在正常细胞中, Caspase 家族蛋白通常以非活化的酶原形式存在。当细胞接收到凋亡信号时, 这些蛋白会被激活, 生成剪切形式的 caspase 蛋白, 进而引发凋亡蛋白酶的级联反应^[80]。CHOP 的上调能够间接激活 caspase 家族蛋白, 如 caspase 3 和 caspase 9。为了进一步验证五味子醇甲抑制 Exo-miR-146a-5p 对细胞凋亡的影响, 采用 Western blot 技术检测了 caspase 3 和 caspase 9 的激活情况。在 HUVECs 中, 经 M-Exos 处理的细胞中 caspase 3 和 caspase 9 的剪切水平显著高于 K-Exos 组细胞 ($P<0.01$)。而经五味子醇甲干预后, 与 M-Exos 组相比, caspase 3 和 caspase 9 的剪切水平显著降低 ($P<0.01$)。同时, 采用 RT-qPCR 技术检测了细胞中凋亡相关基因 caspase 3 和 caspase 9 的 mRNA 表达水平, 结果与 Western Blot 一致。上述结果表明, 五味子醇甲可能通过抑制 caspase 3 和 caspase 9 的激活, 发挥其抗细胞凋亡的作用, 从而对动脉粥样硬化起到改善作用。

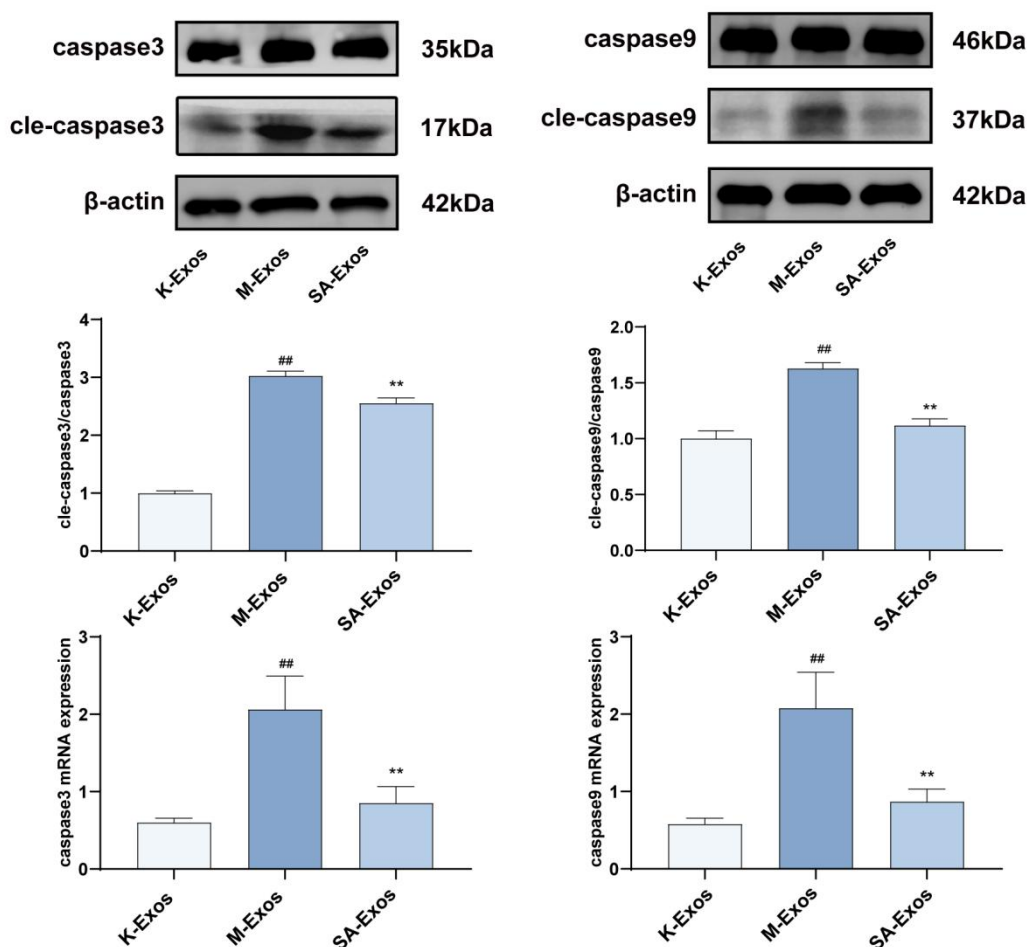


图 4-2 凋亡蛋白 caspase3、caspase9 及其 mRNA 的表达

Figure 4-2 Expression of apoptotic proteins caspase3, caspase9 and their mRNAs

4.8.2 五味子醇甲抑制 Exo-miR-146a-5p 对内质网应激的影响

4.8.2.1 RT-qPCR 检测 HUVECs 中内质网应激基因 GRP78、ATF6、PERK、IRE1 mRNA 表达

通过前期实验,已初步证实五味子醇甲抑制 Exo-miR-146a-5p 能够保护内皮细胞凋亡,但其是如何保护细胞凋亡的还尚不清楚。细胞凋亡不仅是细胞自主调控的结果,也可能由内质网应激的过度激活所触发。因此猜想五味子醇甲干预的 Exo-miR-146a-5p 会抑制内质网应激通路的激活,为了验证这一猜想,通过 RT-PCR 检测了 HUVECs 中内质网应激基因 GRP78、ATF6、PERK、IRE1 中 mRNA 水平,结果显示,与 K-Exos 组相比, M-Exos 组内质网应激基因 GRP78、ATF6、PERK、IRE1 中 mRNA 水平显著升高 ($P < 0.01$),在五味子醇甲干预后,GRP78、ATF6、PERK、IRE1 中 mRNA 水平明显下降 ($P < 0.01$)。以上结果说明内质网应激可能是五味子醇甲抑制 Exo-miR-146a-5p 保护内皮细胞凋亡的关键途径。

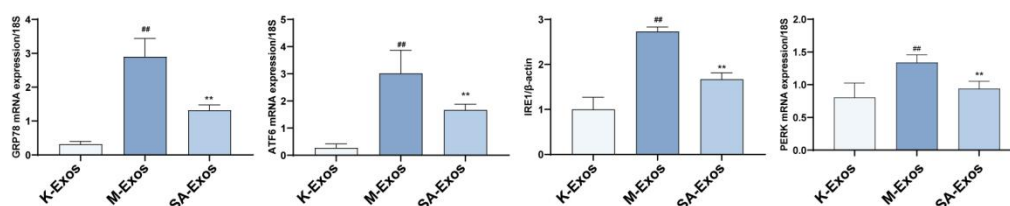


图 4-3 内质网应激相关基因 GRP78、ATG6、IRE1、PERK mRNA 的表达

Figure 4-3 Expression of endoplasmic reticulum stress-related genes GRP78, ATF6, IRE1, and PERK mRNAs

4.8.2.2 Western blot 检测细胞中内质网应激蛋白 GRP78、ATF6、PERK、IRE1 的表达

内质网在真核细胞中具有多种重要功能,包括蛋白质的折叠与分泌、脂质合成以及维持 Ca^{2+} 稳态等^[81]。此外,内质网还能够感知外界刺激,并通过启动未折叠蛋白反应 (Unfolded Protein Response, UPR) 来应对内质网应激状态。GRP78、ATF6、PERK 和 IRE1 α 是内质网应激的关键标志蛋白。GRP78 作为分子伴侣参与蛋白质折叠,其表达水平的升高通常指示内质网应激的发生。而 ATF6、PERK 和 IRE1 α 则是 UPR 的主要信号转导通路的启动因子。在内质网应激状态下,这些蛋白的表达水平会显著上调,进而激活一系列下游信号通路,调控细胞对内质网应激的适应性反应^[82]。为了进一步验证五味子醇甲干预的 Exo-miR-146a-5p 可

以抑制内皮细胞中的内质网应激，采用 Western blot 检测了 GRP78、ATF6、PERK 和 IRE1 的蛋白表达水平。结果显示，经五味子醇甲处理后，GRP78、ATF6、PERK 和 IRE1 的蛋白水平较 M-Exos 诱导组显著下降 ($P < 0.01$)。这一结果表明，在五味子醇甲的作用下，Exo-miR-146a-5p 的下调能够有效抑制内皮细胞中的内质网应激。

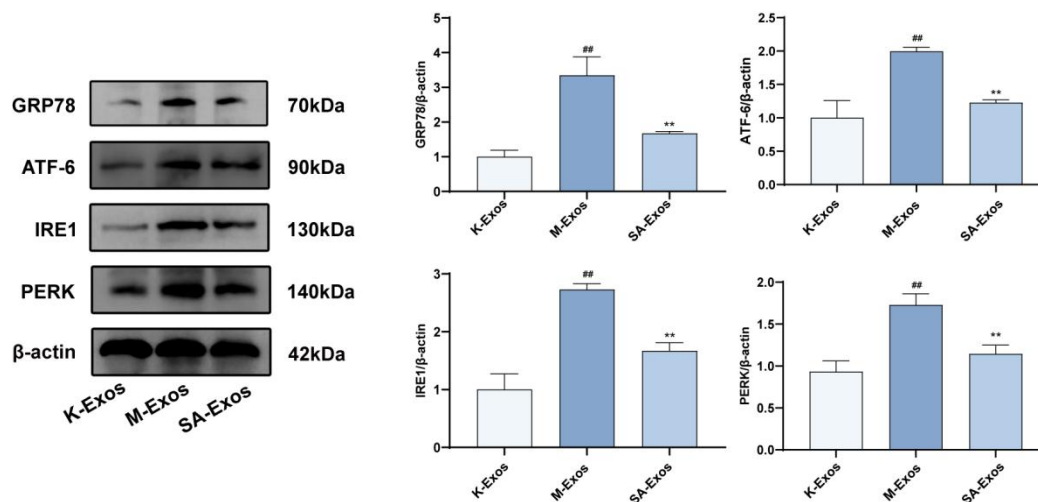


图 4-4 内质网应激信号通路蛋白的表达

Figure 4-4 Expression of endoplasmic reticulum stress signaling pathway proteins

4.8.3 SMAD4 蛋白对细胞凋亡的调控作用研究

4.8.3.1 流式细胞术观察

SMAD4 是转化生长因子 β (TGF- β) 信号通路中的关键转录因子，广泛参与细胞增殖、分化、凋亡及肿瘤发生等生物学过程。近年来，研究发现 SMAD4 在细胞凋亡中发挥重要作用，其通过调控 caspase3 等凋亡相关蛋白的表达，调节细胞凋亡^[83]。为了探究 SMAD4 对细胞凋亡的调节作用，采用流式细胞术检测了干扰 SMAD4 以及给药处理后细胞凋亡的变化。与 siSMAD4 NC+M-Exos 组相比，在 siSMAD4+M-Exos 组中，细胞凋亡率显著升高，早期凋亡细胞 (Annexin V-FITC 阳性，PI 阴性) 和晚期凋亡细胞 (Annexin V-FITC 和 PI 双阳性) 的比例均高于 siSMAD4 NC+M-Exos 组。这表明 SMAD4 的缺失促进了细胞凋亡的发生。在 siSMAD4+SA-Exos 组中，细胞整体凋亡率有所下降，提示药物处理抵消了 SMAD4 缺失部分的凋亡效应，进一步证实了五味子醇甲抑制 Exo-miR-146a-5p 靶向调控 SMAD4 在细胞凋亡的关键作用。这些结果表明，SMAD4 在细胞凋亡中发挥重要的调节作用。

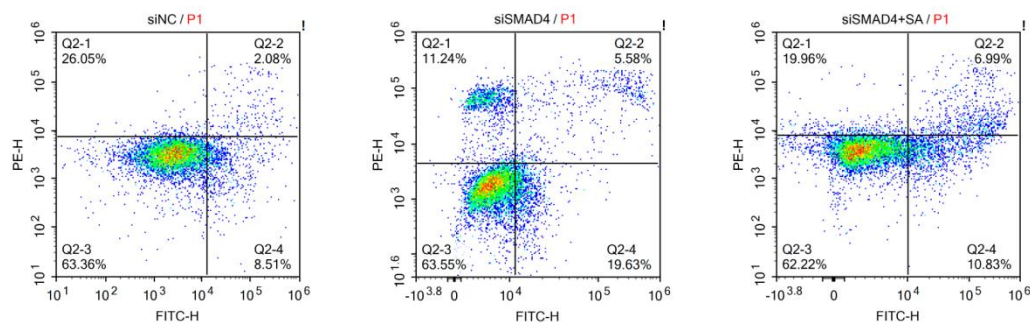


图 4-5 流式细胞术检测 SMAD4 对凋亡的调控作用

Figure 4-5 Regulation of apoptosis by SMAD4 detected by flow cytometry

4.8.3.2 五味子醇甲通过 Exo-miR-146a-5p 靶向 SMAD4 调控细胞凋亡中 caspase3、caspase9 的水平

为探讨靶基因对下游凋亡蛋白的影响，采用 Western Blot 检测干扰靶基因 SMAD4 后对下游凋亡蛋白的影响，结果表明与 siSMAD4 NC+M-Exos 组相比，干扰 SMAD4 后，cle-caspase3、cle-caspase9 蛋白表达升高，提示干扰 SMAD4 可引发细胞凋亡；与 siSMAD4+M-Exos 组相比，siSMAD4+SA-Exos 组细胞中 cle-caspase3、cle-caspase9 蛋白显著下降。提示五味子醇甲可通过提高靶蛋白 SMAD4 的表达来保护内皮细胞凋亡，从而改善动脉粥样硬化。RT-qPCR 检测干扰靶基因 SMAD4 后下游凋亡基因 caspase3 和 caspase9 的 mRNA 表达水平，也得到了类似的结果。

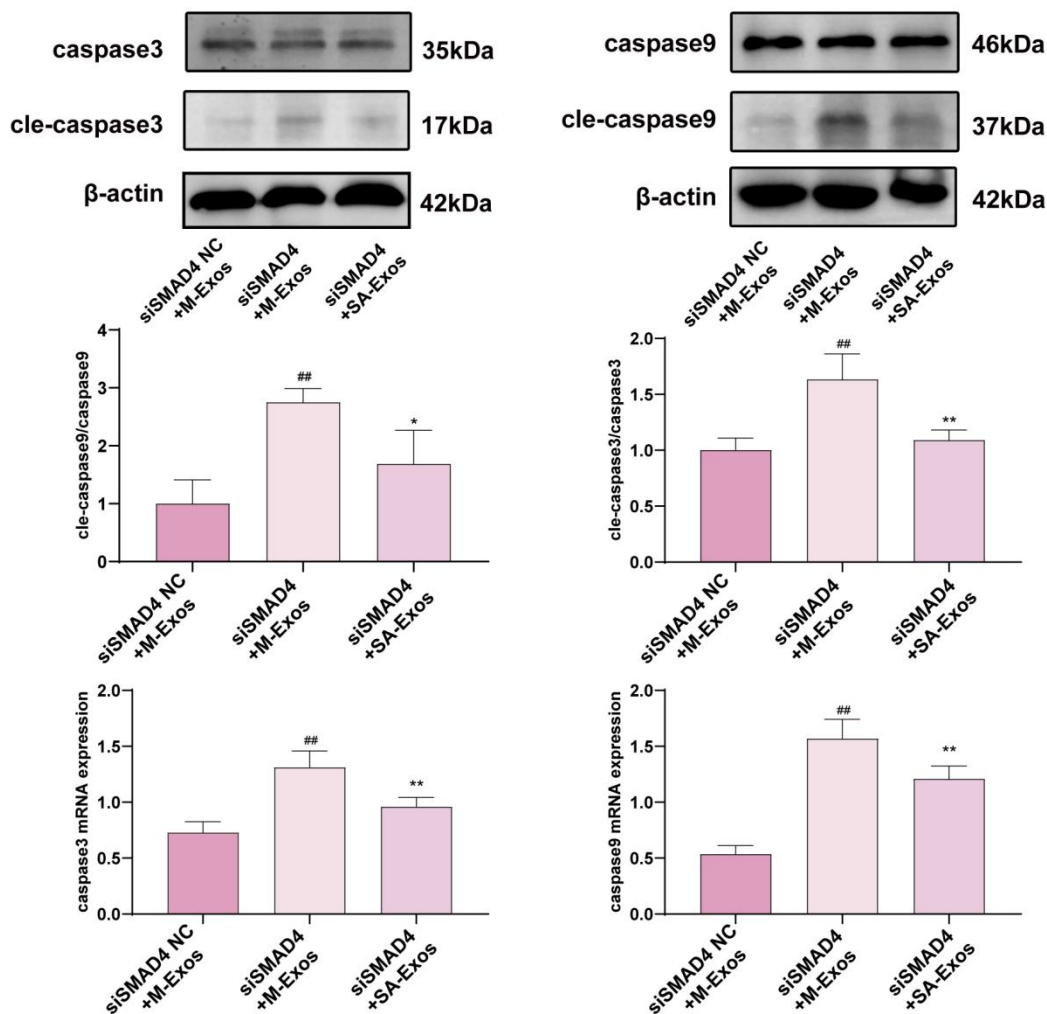


图 4-6 Western blot 检测 SMAD4 对凋亡蛋白 caspase3、caspase9 及其 mRNA 的调控作用

Figure 4-6 Western blot detection of SMAD4 regulation of apoptotic proteins caspase3, caspase9 and their mRNAs

4.8.4 抑制内质网应激对细胞凋亡影响的研究

4.8.4.1 流式细胞术观察

4-PBA 是一种内质网应激抑制剂，具有多种生物学作用，主要通过抑制内质网应激发挥其保护作用。为了评估内质网应激是否是五味子醇甲通过抑制 Exo-miR-146a-5p 表达来保护细胞免受凋亡的主要机制，采用不同来源的外泌体联合 4-PBA 处理 HUVECs。流式细胞术结果显示，与 M-Exos 作用相比，M-Exos+4-PBA 组和 SA-Exos 组都能在一定程度上抑制细胞凋亡的发生，而在 SA-Exos 与 4-PBA 联合处理下细胞凋亡率抑制的更为显著。

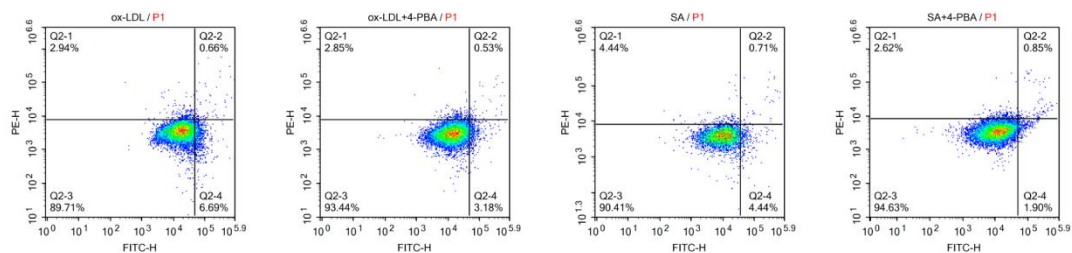


图 4-7 流式细胞术检测抑制内质网应激对细胞凋亡影响

Figure 4-7 Effects of inhibition of endoplasmic reticulum stress on apoptosis detected by flow cytometry

4.8.4.2 Western blot 检测抑制内质网应激对内质网应激和细胞凋亡蛋白的表达影响

采用 Western Blot 检测抑制内质网应激对细胞凋亡的影响，结果显示，与 M-Exos 组相比，M-Exos+4-PBA 组和 SA-Exos 组中内质网应激标志蛋白 GRP78、ATF6、PERK 和 IRE1 的表达水平有所降低；而五味子醇甲与 4-PBA 联合处理的 SA-Exos+4-PBA 组中，相关蛋白的表达水平降低更为显著。同时不同组外泌体在 4-PBA 联合处理下调亡相关蛋白 CHOP、cle-caspase3 和 cle-caspase9 的蛋白表达水平也相应降低了。结果表明，五味子醇甲可能通过调控 Exo-miR-146a-5p 的表达进而抑制内质网应激，从而发挥对细胞凋亡的保护作用。

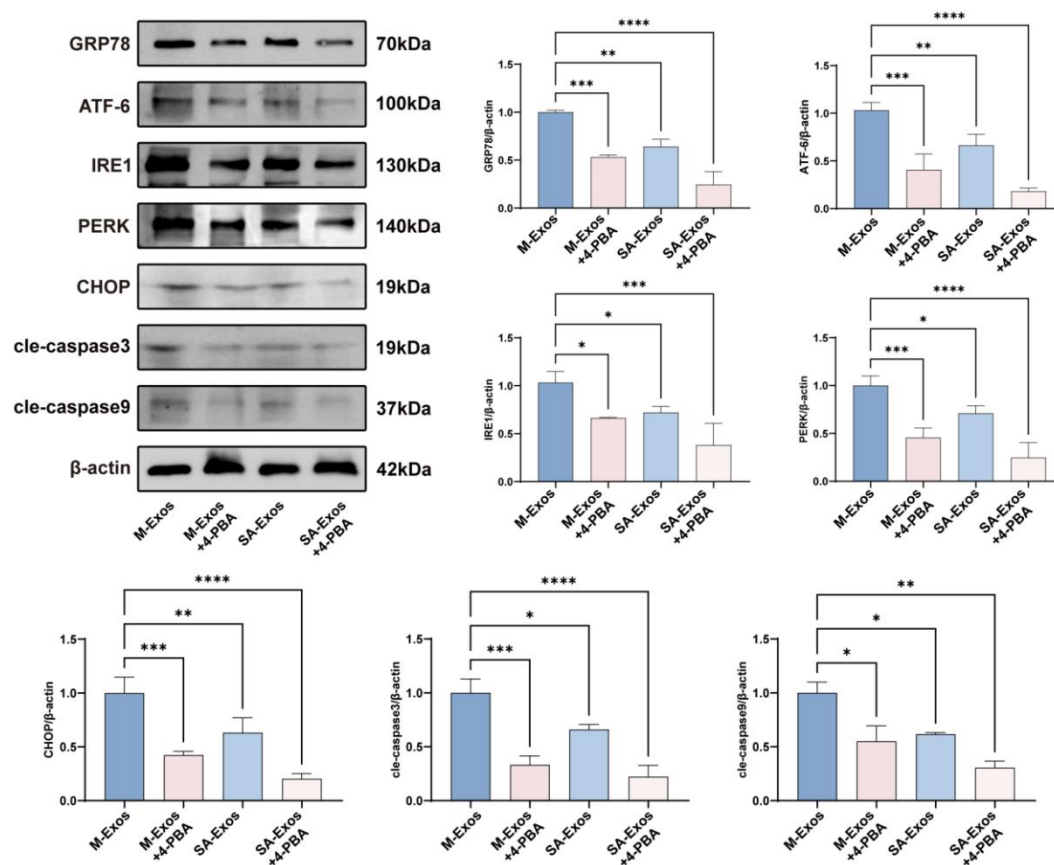


图 4-8 通过 4-PBA 抑制内质网应激后, 检测外泌体对 GRP78、ATF6、IRE1、PERK 和凋亡标志基因 CHOP 及 cle-caspase3, cle-caspase 9 蛋白表达的影响

Figure 4-8 Effects of exosomes on protein expression of GRP78, ATF6, IRE1, PERK and apoptosis marker genes CHOP and cle-caspase3, cle-caspase 9 were examined after inhibition of endoplasmic reticulum stress by 4-PBA

4.8.4.3 免疫共定位检测 GRP78、CHOP 蛋白表达水平

为了进一步验证五味子醇甲是否通过调控 Exo-miR-146a-5p 的表达抑制内质网应激, 进而发挥对细胞凋亡的保护作用, 采用免疫荧光共染色技术, 对处理后的细胞中 GRP78 和 CHOP 的共定位关系进行了检测。结果显示, 在 M-Exos 组细胞中, GRP78 和 CHOP 的荧光信号强度最强, 且分布范围更广, 表明内质网应激的激活, 同时 CHOP 的荧光信号与 GRP78 的分布区域高度重叠。相比之下, 在 M-Exos+4-PBA 和 SA-Exos 组中, GRP78 的表达显著下调, 其荧光信号强度减弱且分布范围变窄, 表明内质网应激被有效抑制。此外, CHOP 的表达水平也有所下降, 其荧光信号与 GRP78 的分布区域依然高度重叠。值得注意的是, 在 SA-Exos+4-PBA 组中, GRP78 和 CHOP 的表达下调最为显著, 荧光信号强度变化最为明显。这些结果表明, 在内质网应激条件下, GRP78 和 CHOP 在细胞内

质网区域发生显著的共定位。这种共定位可能反映了 GRP78 和 CHOP 在内质网应激反应中的协同作用，提示五味子醇甲通过调控 Exo-miR-146a-5p 的表达抑制内质网应激，进而发挥对细胞凋亡的保护作用。

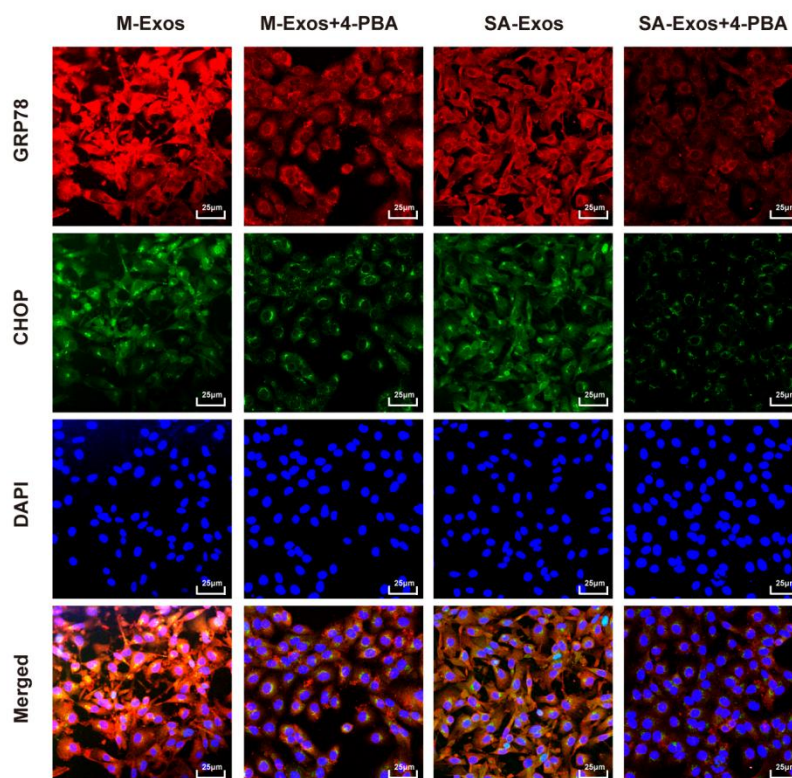


图 4-9 免疫共定位检测 GRP78、CHOP 蛋白表达水平

Figure 4-9 Immunolocalization detection of GRP78, CHOP protein expression levels

4.9 本章小结

大量研究表明，许多天然产物及其衍生物通过保护内质网应激而具有改善心血管疾病的作用。同时，内质网应激介导凋亡的标志物 CHOP 和一系列 caspase 蛋白也被激活，表明内质网应激的促凋亡通路被触发。本研究聚焦于天然产物五味子的活性成分五味子醇甲，探讨其通过跨细胞调控改善动脉粥样硬化的潜在机制。在前期研究中，已发现五味子醇甲可通过靶向 SMAD4 发挥抗动脉粥样硬化作用。SMAD4 在细胞凋亡中扮演关键角色，其调控机制可能与内质网应激密切相关。本研究进一步深入探究了内质网应激与细胞凋亡之间的联系，并验证了五味子醇甲的干预机制。

首先，通过不同组外泌体干预 HUVECs，检测了内质网应激和凋亡相关蛋白

的表达。结果显示，五味子醇甲干预可显著抑制内质网应激，并保护细胞免受凋亡损伤。这一发现为后续机制研究奠定了基础。随后，为确认五味子醇甲是否通过 SMAD4 介导细胞凋亡，采用 SMAD4 基因干扰技术，进一步检测细胞凋亡情况。结果表明，五味子醇甲的作用机制确实依赖于 SMAD4 的调控，且内质网应激是其介导细胞凋亡的关键通路。最后通过联合使用 4-PBA 和五味子醇甲处理的外泌体（SA-Exos），进一步验证了五味子醇甲抑制 Exo-miR-146a-5p 改善动脉粥样硬化的作用机制。研究结果表明，五味子醇甲通过靶向 SMAD4 抑制内质网应激介导的细胞凋亡，从而发挥抗动脉粥样硬化效果。

综上所述，本研究揭示了五味子醇甲通过跨细胞靶向调控 SMAD4，抑制内质网应激介导的细胞凋亡，进而改善动脉粥样硬化的分子机制。这一发现不仅为五味子醇甲的临床应用提供了理论依据，也为动脉粥样硬化的治疗提供了新的靶点和思路。未来，研究将进一步探索该机制在体内模型中的应用潜力，为心血管疾病的有效干预提供新的策略。

第 5 章 总结与展望

5.1 结论

本研究围绕动脉粥样硬化的发病机制，深入探讨了中药活性成分五味子醇甲通过调控泡沫细胞源外泌体 miR-146a-5p 靶向 SMAD4，改善内质网应激，从而防治动脉粥样硬化的作用机制。研究结果揭示了五味子醇甲在抗动脉粥样硬化中的多靶点、多途径作用特点，为中药现代化研究和心血管疾病的防治提供了重要的理论支持。

主要结论如下：

（1）通过体外泡沫细胞模型和人脐静脉内皮细胞实验，证实五味子醇甲能够通过抑制泡沫细胞源外泌体 miR-146a-5p 的释放，显著改善 ox-LDL 诱导的血管内皮细胞损伤以及炎症反应。

（2）揭示了 miR-146a-5p 与 SMAD4 之间的靶向调控关系，并通过沉默 SMAD4 和五味子醇甲干预实验，进一步验证了 SMAD4 在内皮细胞损伤中的保护作用。结果表明，五味子醇甲通过上调 SMAD4 的表达，显著抑制了由外泌体 miR-146a-5p 诱导的细胞损伤和凋亡。

（3）探讨了内质网应激在动脉粥样硬化中的作用机制，发现五味子醇甲能够通过抑制 Exo-miR-146a-5p 靶向 SMAD4，缓解内质网应激介导的细胞凋亡，从而改善内皮细胞损伤引起的动脉粥样硬化。

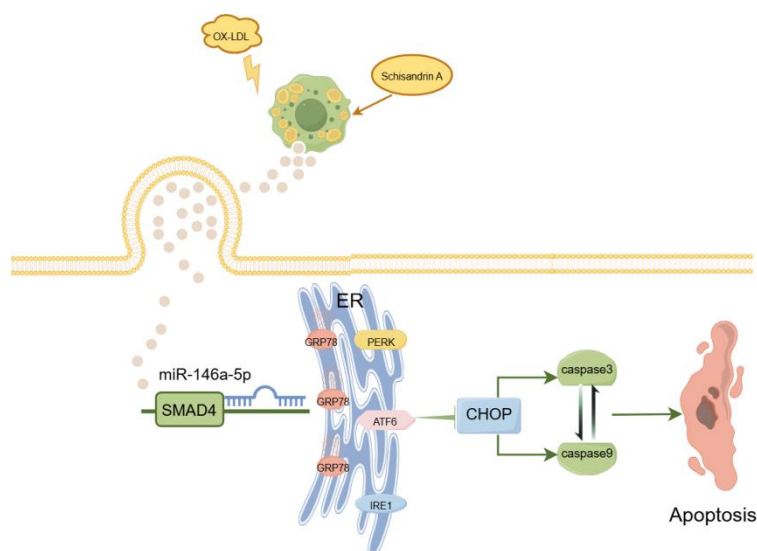


图 5-1 五味子醇甲通过 Exo-miR-146a-5p 靶向 SMAD4 保护内皮细胞损伤分子机制图
Figure 5-1 Molecular mechanism of protection against endothelial cell damage by Schisandra A via Exo-miR-146a-5p targeting of SMAD4

5.2 展望

(1) 尽管本文在体外细胞模型中验证了五味子醇甲的作用机制，但未涉及体内动物模型的实验验证。未来的研究将聚焦于体内模型的验证，探索五味子醇甲在动脉粥样硬化动物模型中的作用机制，进一步确认其临床应用潜力。

(2) 研究中仅使用了泡沫细胞源外泌体 (M-Exos)，未涉及其他细胞来源的外泌体 (如血管平滑肌细胞、内皮细胞等) 对动脉粥样硬化的影响。动脉粥样硬化是一个多细胞参与的过程，不同细胞来源的外泌体可能具有不同的作用机制。未来研究可扩展外泌体的来源，分析不同细胞类型分泌的外泌体在动脉粥样硬化中的作用，揭示其在细胞间通讯中的复杂性。

(3) 研究未涉及五味子醇甲的药物递送系统，难以解决其在体内生物利用度低、靶向性差等问题。未来可以结合纳米技术、脂质体等药物递送系统，开发高效的五味子醇甲递送载体，提高其在动脉粥样硬化治疗中的应用潜力。

参考文献

- [1] Center For Cardiovascular Diseases The Writing Committee Of The Report On Cardiovascular Health And Diseases In China N. Report on cardiovascular health and diseases in China 2023: An updated summary[J]. Biomedical and environmental sciences: BES, 2024, 37(9): 949-992.
- [2] Zhang Z, Zou Y, Song C, etc. Advances in the study of exosomes in cardiovascular diseases[J]. Journal of Advanced Research, 2024, 66: 133-153.
- [3] Abulsoud A I, Elshaer S S, Rizk N I, etc. Unraveling the miRNA puzzle in atherosclerosis: Revolutionizing diagnosis, prognosis, and therapeutic approaches[J]. Current Atherosclerosis Reports, 2024, 26(8): 395-410.
- [4] 苟于芬, 王宏宇. 动脉粥样硬化的免疫机制与治疗的研究进展[J]. 心血管病学进展, 2024, 45(10): 912-917.
- [5] Canesi F, Mateo V, Couchie D, etc. A thioredoxin-mimetic peptide exerts potent anti-inflammatory, antioxidant, and atheroprotective effects in ApoE2.ki mice fed high fat diet[J]. Cardiovascular Research, 2019, 115(2): 292-301.
- [6] Couchie D, Vaisman B, Abderrazak A, etc. Human plasma thioredoxin-80 increases with age and in ApoE-/- mice induces inflammation, angiogenesis, and atherosclerosis[J]. Circulation, 2017, 136(5): 464-475.
- [7] 郭慧葛, 孙四玉, 林飞, 等. circRNA/miRNA/mRNA 的生物学功能及其对动脉粥样硬化的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2022, 31(1): 80-87.
- [8] 刘庚鑫, 张格第, 郭敏, 等. MicroRNA 与慢性肾脏病并发动脉粥样硬化相关性与中医药干预研究进展[J]. 科学技术与工程, 2024, 24(6): 2177-2186.
- [9] Mhaimeed O, Burney Z A, Schott S L, etc. The importance of LDL-C lowering in atherosclerotic cardiovascular disease prevention: Lower for longer is better[J]. American Journal of Preventive Cardiology, 2024, 18: 100649.
- [10] 马莹莹, 傅继华. 脂质、炎症在动脉粥样硬化发展机制中的研究进展[J]. 医学研究与教育, 2019, 36(2): 1-7.
- [11] 和静, 房中则, 杨颖, 等. 血浆中脂质代谢分子与颈动脉粥样硬化斑块、传统

- 心血管危险因素及膳食因素的关系[J]. 北京大学学报(医学版), 2024, 56(4): 722-728.
- [12] 高子浚, 王宇辰, 杨文艺. 脂蛋白(a)与动脉粥样硬化性心血管疾病[J]. 国际心血管病杂志, 2024, 51(1): 21-24.
- [13] Ajoolabady A, Pratico D, Lin L, etc. Inflammation in atherosclerosis: Pathophysiology and mechanisms[J]. Cell Death & Disease, 2024, 15(11): 817.
- [14] Lin A, Miano J M, Fisher E A, etc. Chronic inflammation and vascular cell plasticity in atherosclerosis[J]. Nature Cardiovascular Research, 2024, 3(12): 1408-1423.
- [15] 孟庆雯, 刘华江, 易泓汝, 等. Nlrp3 炎症小体在动脉粥样硬化中的作用机制和靶向炎症治疗的研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 2024, 32(1): 79-86.
- [16] Su M, Zhao W, Jiang H, etc. Endothelial IGFBP6 suppresses vascular inflammation and atherosclerosis[J]. Nature Cardiovascular Research, 2025, 4(2): 145-162.
- [17] 梁天, 李飞, 刘超. 内皮细胞功能障碍与动脉粥样硬化的研究进展[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2024, 26(12): 1504-1507.
- [18] Shi Y, Zhang J, Li Y, etc. Engineered mesenchymal stem/stromal cells against cancer[J]. Cell Death & Disease, 2025, 16(1): 113.
- [19] Cao R, Sun R, Ye Y, etc. Low shear stress-induced blockage of autophagic flux impairs endothelial barrier and facilitates atherosclerosis in mice[J]. Experimental Cell Research, 2024, 439(1): 114071.
- [20] Xu S, Ilyas I, Little P J, etc. Endothelial dysfunction in atherosclerotic cardiovascular diseases and beyond: From mechanism to pharmacotherapies[J]. Pharmacological Reviews, 2021, 73(3): 924-967.
- [21] 马元婧, 邱润泽, 袁冬平, 等. 动脉粥样硬化中炎症免疫反应的研究进展[J]. 现代免疫学, 2017, 37(6): 509-512.
- [22] Pan X, Xu H, Ding Z, etc. Guizhitongluo tablet inhibits atherosclerosis and foam cell formation through regulating Piezo1/NLRP3 mediated macrophage pyroptosis[J]. Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology, 2024, 132: 155827.

- [23] Chen J, Xiang X, Nie L, etc. The emerging role of Th1 cells in atherosclerosis and its implications for therapy[J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 13: 1079668.
- [24] Lutgens E, Atzler D, Döring Y, etc. Immunotherapy for cardiovascular disease[J]. *European Heart Journal*, 2019, 40(48): 3937-3946.
- [25] Tucker B, Goonetilleke N, Patel S, etc. Colchicine in atherosclerotic cardiovascular disease[J]. *Heart (British Cardiac Society)*, 2024, 110(9): 618-625.
- [26] Zhao N, Liu D, Song H, etc. Identification of critical endoplasmic reticulum stress-related genes in advanced atherosclerotic plaque[J]. *Scientific Reports*, 2025, 15(1): 2107.
- [27] Hai H, Ming-xing T, Chan D. Chop 调控内质网应激介导细胞凋亡的机制[J]. *中国预防兽医学报*, 2019, 41(2): 219-219.
- [28] 朱康宁, 郭凤霞, 高岚. NF- κ B/NLRP3 通路对动脉粥样硬化小鼠脂质沉积及自噬相关蛋白表达的影响[J]. *中华神经医学杂志*, 2022, 21: 580-586.
- [29] 李金阳, 姚剑挺, 盛思琪, 等. 细胞凋亡和有效吞噬在动脉粥样硬化斑块中的作用[J]. *基础医学与临床*, 2018, 38(4): 548-552.
- [30] Zhou Z Y, Wu L, Liu Y F, etc. IRE1 α : From the function to the potential therapeutic target in atherosclerosis[J]. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2024, 479(5): 1079-1092.
- [31] Transmission of unfolded protein response—a regulator of disease progression, severity, and spread in virus infections[J]. *mBio*, 2024, 16(2).
- [32] Czabotar P E, Garcia-Saez A J. Mechanisms of BCL-2 family proteins in mitochondrial apoptosis[J]. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 2023, 24(10): 732-748.
- [33] Gojo S, Kami D, Sano A, etc. Sephin1 suppresses ER stress-induced cell death by inhibiting the formation of PP2A holoenzyme[J]. *Cell Death & Disease*, 2025, 16(1): 117.
- [34] Zobeydi A M, Mousavi Namavar S N, Sadeghi Shahdani M, etc. Mitigating doxorubicin-induced hepatotoxicity in male rats: The role of aerobic interval training and curcumin supplementation in reducing oxidative stress, endoplasmic

- reticulum stress and apoptosis[J]. *Scientific Reports*, 2025, 15(1): 6604.
- [35] Puebla-Huerta A, Huerta H, Quezada-Gutierrez C, etc. Calcium (Ca^{2+}) fluxes at mitochondria-ER contact sites (MERCs) are a new target of senolysis in therapy-induced senescence (TIS)[J]. *Npj Aging*, 2025, 11(1): 11.
- [36] Somnay K, Wadgaonkar P, Sridhar N, etc. Liver fibrosis leading to cirrhosis: Basic mechanisms and clinical perspectives[J]. *Biomedicines*, 2024, 12(10): 2229.
- [37] Liu H, Wang Z, Nowicki M J. Caspase-12 mediates carbon tetrachloride-induced hepatocyte apoptosis in mice[J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2014, 20(48): 18189-18198.
- [38] Matsuzawa A. Physiological roles of ASK family members in innate immunity and their involvement in pathogenesis of immune diseases[J]. *Advances in Biological Regulation*, 2017, 66: 46-53.
- [39] Barton B M, Son F, Verma A, etc. IRE1 α -XBP1 safeguards hematopoietic stem and progenitor cells by restricting pro-leukemogenic gene programs[J]. *Nature Immunology*, 2025, 26(2): 200-214.
- [40] Liao M, Long X, Chen Y, etc. PARP9 exacerbates apoptosis and neuroinflammation via the PI3K pathway in the thalamus and hippocampus and cognitive decline after cortical infarction[J]. *Journal of Neuroinflammation*, 2025, 22(1): 43.
- [41] Fei L, Wenjie L, Yanan C, etc. Identification of a novel unfolded protein response related signature for predicting the prognosis of acute myeloid leukemia[J]. *Scientific Reports*, 2025, 15(1): 6705.
- [42] Sun M H, Jiang W J, Li X H, etc. ATF6 aggravates apoptosis in early porcine embryonic development by regulating organelle homeostasis under high-temperature conditions[J]. *Zoological Research*, 2023, 44(5): 848-859.
- [43] Yu H, Wang C, Qian B, etc. GRINA alleviates hepatic ischemia-reperfusion injury-induced apoptosis and ER-phagy by enhancing HRD1-mediated ATF6 ubiquitination[J]. *Journal of Hepatology*, 2025: S0168-8278(25)00019-4.

- [44] 艳杨, 鹏陈. miRNA 与动脉粥样硬化相关性研究进展[J]. *Advances in Clinical Medicine*, 2022, 12: 877.
- [45] Xu Z, Wang Z, Wang L, etc. Essential function of transmembrane transcription factor MYRF in promoting transcription of miRNA lin-4 during *C. elegans* development[J]. *eLife*, 2024, 12: RP89903.
- [46] Li X, Zhong S, Li C, etc. RNA helicase Brr2a promotes miRNA biogenesis by properly remodelling secondary structure of pri-miRNAs[J]. *Nature Plants*, 2024, 10(10): 1532-1547.
- [47] Rumpel N, Riechert G, Schumann J. miRNA-mediated fine regulation of TLR-induced M1 polarization[J]. *Cells*, 2024, 13(8): 701.
- [48] Maji R K, Leisegang M S, Boon R A, etc. Revealing microRNA regulation in single cells[J]. *Trends in genetics: TIG*, 2025: S0168-9525(24)00317-2.
- [49] Fang X, Gao F, Zheng L, etc. Reduced microRNA-744 expression in mast cell-derived exosomes triggers epithelial cell ferroptosis in acute respiratory distress syndrome[J]. *Redox Biology*, 2024, 77: 103387.
- [50] 韩婷婷, 乐郭, 申元英. MicroRNAs 调控宿主抗病毒天然免疫的研究进展[J]. *Advances in Microbiology*, 2019, 08: 15.
- [51] Gu L, Lai Y, Zhang G, etc. Genome-wide identification of the *rehmannia glutinosa* miRNA family and exploration of their expression characteristics caused by the replant disease formation-related principal factor[J]. *Genes*, 2024, 15(9): 1239.
- [52] Long Y, Liu J, Wang Y, etc. The complex effects of miR-146a in the pathogenesis of alzheimer's disease[J]. *Neural Regeneration Research*, 2025, 20(5): 1309-1323.
- [53] 熊慧琳, 何涛宏, 贺平. 不同疾病活动度炎症性肠病患者血清 microRNA-146a-5p、microRNA-145 水平的变化及与免疫调节的相关性[J]. *中国现代医学杂志*, 2024, 34(10): 72-77.
- [54] 谭俊龙, 郑明霞, 刘湘宁, 等. miR-146a 的功能及其靶基因的研究进展[J]. *生命科学*, 2020, 32(4): 387-395.
- [55] Yang K, Qiu J, Huang Z, etc. 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.
- [56] Olas B. Cardioprotective potential of berries of schisandra chinensis turcz. (baill.), their components and food products[J]. Nutrients, 2023, 15(3): 592.
- [57] 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.
- [58] 齐雁辉, 赵彩玉. 五味子的现代药理作用研究进展[J]. 中国医药指南, 2011, 9(26): 43-44.
- [59] Wang X, Wang X, Yao H, etc. A comprehensive review on schisandrin and its pharmacological features[J]. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, 2024, 397(2): 783-794.
- [60] 许晴, 李智, 万梅绪, 等. 基于细胞膜色谱技术的人参皂苷及五味子木脂素与血管内皮生长因子受体的作用分析[J]. 药物评价研究, 2021, 44(11): 2379-2384.
- [61] Duan H, Khan G J, Shang L J, etc. Computational pharmacology and bioinformatics to explore the potential mechanism of schisandra against atherosclerosis[J]. Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association, 2021, 150: 112058.
- [62] Mu X, Liu S J, Zheng L Y, etc. The long coiled-coil protein NECC2 regulates oxLDL-induced endothelial oxidative damage and exacerbates atherosclerosis development in apolipoprotein E ^{-/-} mice[J]. Free Radical Biology & Medicine, 2024, 216: 106-117.
- [63] 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(5): 698-702.
- [64] Yu H C, Bai Q R, Guo J J, etc. Elucidating hydroxysafflor yellow a's multi-target mechanisms against alcoholic liver disease through integrative pharmacology[J]. Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology, 2024, 134: 155956.

- [65] Han J, Kang X, Su Y, etc. Plasma exosomes from patients with coronary artery disease promote atherosclerosis via impairing vascular endothelial junctions[J]. Scientific Reports, 2024, 14(1): 29813.
- [66] Zhang H, Wang Y, Feng K, etc. MiR-146a-5p-enriched exosomes inhibit M1 macrophage activation and inflammatory response by targeting CD80[J]. Molecular Biology Reports, 2024, 51(1): 1133.
- [67] Tanashyan M M, Raskurazhev A A, Shabalina A A, etc. Differential pattern of circulating MicroRNA expression in patients with intracranial atherosclerosis[J]. Biomedicines, 2025, 13(2): 514.
- [68] Klymiuk M C, Balz N, Elashry M I, etc. Exosomes isolation and identification from equine mesenchymal stem cells[J]. BMC veterinary research, 2019, 15(1): 42.
- [69] Xie H, Yao J, Wang Y, etc. 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.
- [70] Jin J, Shi Y, Gong J, etc. 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.
- [71] Fan Y, Pionneau C, Cocozza F, etc. 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.
- [72] 李晨, 李蓉, 李立. 动脉粥样硬化研究:缘起、观点及发展趋势[J]. 临床医学进展, 2022, 12(5): 4934-4950.
- [73] Cao H, Jia Q, Yan L, etc. 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.
- [74] Zhai K, Deng L, Wu Y, etc. Extracellular vesicle-derived miR-146a as a novel crosstalk mechanism for high-fat induced atherosclerosis by targeting SMAD4[J]. Journal of Advanced Research, 2024: S2090-1232(24)00355-2.

- [75] 韩菲, 马小梅, 石旭柳, 等. 柑橘属植物来源的外泌体样纳米颗粒及其疾病治疗研究进展[J]. 中草药, 2024, 55(19): 6768-6778.
- [76] Li T, Liu Y, Duan T, etc. Nondigestible stachyose binds membranous HSP90 β on small intestinal epithelium to regulate the exosomal miRNAs: A new function and mechanism[J]. Cell Metabolism, 2025, 37(2): 345-360.e6.
- [77] Gollowitzer A, Pein H, Rao Z, etc. Attenuated growth factor signaling during cell death initiation sensitizes membranes towards peroxidation[J]. Nature Communications, 2025, 16(1): 1774.
- [78] Zappa F, Muniozguren N L, Conrad J E, etc. The integrated stress response engages a cell-autonomous, ligand-independent, DR5-driven apoptosis switch[J]. Cell Death & Disease, 2025, 16(1): 101.
- [79] Penna C, Pagliaro P. Endothelial dysfunction: Redox imbalance, NLRP3 inflammasome, and inflammatory responses in cardiovascular diseases[J]. Antioxidants, 2025, 14(3): 256.
- [80] Ghorbani N, Yaghubi R, Davoodi J, etc. How does caspases regulation play role in cell decisions apoptosis and beyond[J]. Molecular and Cellular Biochemistry, 2024, 479(7): 1599-1613.
- [81] 张倩雯, 刘兴会. 内质网应激与疾病的关系研究进展[J]. 重庆医科大学学报, 2024, 49(11): 1345-1349.
- [82] 王立堃, 李桃, 徐芬芬. 未折叠蛋白响应的激活机制[J]. 生物化学与生物物理进展, 2023, 50(5): 877-891.
- [83] Večurková I, Stupák M, Kaťuchová J, etc. Expression of individual members of the TGF- β /SMAD signalling pathway in the progression and survival of patients with colorectal carcinoma[J]. Scientific Reports, 2024, 14(1): 27442.

攻读硕士期间发表的论文

[1] **Jing Zhou**, Ying Shi, Zuzhen Bao, Mengmeng Luo, Jie Li, Marwan M.A.Rashed, Suowen Xu, Jianhua Yang, Hong Duan, Henggui Hu, Kefeng Zhai, Schisandrin a ameliorates endoplasmic reticulum stress mediated apoptosis in metabolic associated fatty liver disease. Food Science and Human Wellness (2025).

[2] W. Wang, H. Li, Y. Shi, **J. Zhou**, G.J. Khan, J. Zhu, F. Liu, H. Duan, L. Li, K. Zhai, Targeted intervention of natural medicinal active ingredients and traditional Chinese medicine on epigenetic modification: Possible strategies for prevention and treatment of atherosclerosis, Phytomedicine 122 (2024) 155139.

[3] K. Zhai, L. Deng, Y. Wu, H. Li, **J. Zhou**, Y. Shi, J. Jia, W. Wang, S. Nian, G. Jilany Khan, H. R. El-Seedi, H. Duan, L. Li, Z. Wei, Extracellular vesicle-derived miR-146a as a novel crosstalk mechanism for high-fat induced atherosclerosis by targeting SMAD4. J Adv Res, S2090-1232(24)00355 – 2 (2024).

致 谢

在研究生生涯中，我收获颇丰，感恩每一位给予我帮助与支持的人。

首先，感恩导师段红老师，学术上悉心指导，生活中关怀备至，让我在迷茫时拨云见日，于挫折中砥砺前行。感谢翟老师严格要求，严谨治学，让我在挑战中成长，为学术之路筑牢根基。

感谢男友小许，是他给予我温暖与力量，让我在忙碌与困难中不再孤单。感谢实验室伙伴，我们携手共进，相互支持，让研究生生活充满温暖与乐趣。亦感恩安工程的师生，跨越学校为我助力，这份情谊弥足珍贵。

感谢自己，虽历经挫折，却始终不屈不挠，坚守初心。未来，我定会不忘初心，砥砺前行，不负韶华。

最后，向参加论文答辩的评审老师们致以诚挚感谢，感谢您在百忙之中为我指点迷津。感恩所有帮助我的人，是你们让我在研究生岁月中不断成长。

致谢人：周婧

2025 年 3 月

安徽工程大学