

• XXXX •

丹菱片调控 circCRIM1/miR-342-3p/SOX6 介导脂肪酸合成改善 肝脏脂质沉积的机制

刘玉¹, 张美菱¹, 宋国¹, 朱敬轩¹, 孙小扉¹, 具星^{1*}, 闵冬雨^{2*}

(1. 辽宁中医药大学, 沈阳 110847; 2. 辽宁中医药大学附属医院, 沈阳 110000)

[摘要] 目的:构建微小RNA-342-3p(miR-342-3p)相关 ceRNA 调控网络,探讨丹菱片(DLT)通过环状RNA半胱氨酸丰富跨膜BMP调节因子1(circCRIM1)/miR-342-3p/SRY-box转录因子6(SOX6)介导脂肪酸合成改善肝脏脂质沉积的分子机制。方法:运用数据库构建miR-342-3p相关ceRNA调控网络,双萤光素酶报告实验验证circCRIM1/miR-342-3p及miR-342-3p/SOX6靶向关系。体内实验中,C57BL/6小鼠为空白组,普通饲料饲养,载脂蛋白E基因敲除(ApoE^{-/-})小鼠随机分为模型组,丹菱片低、中、高剂量组(DLT-L、DLT-M、DLT-H组,340、680、1360 mg·kg⁻¹·d⁻¹)和辛伐他汀组(2.275 mg·kg⁻¹·d⁻¹),饲喂高脂饲料12周构建模型,后4周造模同时灌胃给药;全自动生化分析仪检测小鼠血清脂质和肝功能水平,试剂盒检测小鼠肝脏脂质水平;苏木素-伊红(HE)、油红O染色观察小鼠肝脏组织病理变化;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测小鼠肝脏 circCRIM1、miR-342-3p 表达,Real-time PCR与Wes全自动蛋白质印迹系统检测小鼠肝脏SOX6、过氧化物酶体增殖物激活受体γ(PPARγ)、肝X受体α(LXRα)、固醇调节元件结合蛋白1c(SREBP1c)mRNA及蛋白表达;免疫组化法检测小鼠肝脏组织SOX6表达。体外实验用油酸(OA)诱导HepG2细胞建立脂质沉积模型,将细胞分为空白(CON)组、OA组(400 μmol·L⁻¹ OA)、空白血清(BS)组(400 μmol·L⁻¹ OA+10%空白血清)和DLT组(400 μmol·L⁻¹ OA+10% DLT含药血清),生化试剂盒检测HepG2细胞脂质水平,油红O染色观察HepG2细胞形态学变化;过表达circCRIM1(OE-circCRIM1)、抑制miR-342-3p(miR-342-3p inhibitor)及应用DLT含药血清进行干预,Real-time PCR检测HepG2细胞中circCRIM1、miR-342-3p及相应mRNA表达水平。结果:在体内实验中,与空白组比较,模型组小鼠血清脂质、肝功能和肝脏脂质水平显著异常(P<0.01),肝组织结构改变,空泡和脂滴蓄积增多,circCRIM1显著升高,miR-342-3p显著降低,SOX6、PPARγ、LXRα、SREBP1c mRNA和蛋白表达显著升高(P<0.01);与模型组比较,DLT不同剂量组小鼠血清脂质、肝功能和肝脏脂质水平异常明显改善(P<0.05, P<0.01),肝脏损伤和脂滴蓄积减轻,circCRIM1表达降低,miR-342-3p表达明显升高,SOX6、PPARγ、LXRα、SREBP1c mRNA和蛋白表达明显降低(P<0.05, P<0.01)。在体外实验中,与CON组比较,OA组HepG2细胞脂质水平显著升高(P<0.01),脂滴数量增多,体积变大,circCRIM1、SOX6 mRNA水平显著升高,miR-342-3p显著降低(P<0.01);与OE-NC组比较,OE-circCRIM1组circCRIM1、SOX6 mRNA水平显著升高,miR-342-3p明显降低(P<0.05, P<0.01);与inhibitor NC组比较,miR-342-3p inhibitor组SOX6 mRNA水平显著升高,miR-342-3p显著降低(P<0.01);给予DLT含药血清后上述指标均有所纠正。结论:DLT可通过circCRIM1/miR-342-3p/SOX6调节脂肪酸合成改善肝脏脂质沉积进而防治动脉粥样硬化。

[关键词] 丹菱片; 动脉粥样硬化; 环状RNA半胱氨酸丰富跨膜BMP调节因子1(circCRIM1)/miR-342-3p/SRY-box转录因子6(SOX6); 脂肪酸合成; 肝脏脂质沉积

[中图分类号] R972.6;R285;R289 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(XXXX)XX-0001-12

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20251511

[网络出版地址]

[网络出版日期] XXXX-XX-XX [增强出版附件] 内容详见 <http://www.syfjxzz.com> 或 <http://cnki.net>



Mechanism of Danlou Tablets in Ameliorating Hepatic Lipid Deposition by Regulating circCRIM1/miR-342-3p/SOX6-mediated Fatty Acid Synthesis

LIU Yu¹, ZHANG Meiling¹, SONG Nan¹, ZHU Jingxuan¹, SUN Xiaofei¹, JU Xing^{1*}, MIN Dongyu^{2*}

(1. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Shenyang 110847, China;

[收稿日期] 2025-08-25

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82174114);辽宁省教育厅青年项目(JYTQN2023460)

[第一作者] 刘玉,在读博士,从事中西医结合防治心脑血管疾病研究,E-mail:2711469344@qq.com

[通信作者] *具星,讲师,博士,从事中西医结合防治心血管及代谢性疾病研究,E-mail:753460378@qq.com;

*闵冬雨,主任药师,博士,从事中西医结合防治心脑血管疾病研究,E-mail:mindongyu@163.com

2. The First Affiliated Hospital of Liaoning University of TCM, Shenyang 110000, China)

[Abstract] Objective: This paper aims to construct a ceRNA regulatory network related to microRNA-342-3p (miR-342-3p) and to investigate the molecular mechanism by which Danlou tablets (DLT) ameliorate hepatic lipid deposition by regulating circular RNA cysteine-rich transmembrane BMP regulator 1 (circCRIM1)/miR-342-3p/SRY-box transcription factor 6 (SOX6)-mediated fatty acid synthesis. **Methods:** A ceRNA regulatory network related to miR-342-3p was constructed using databases. The targeting relationships between circCRIM1/miR-342-3p and miR-342-3p/SOX6 were verified using a dual-luciferase reporter assay. *In vivo*, C57BL/6 mice served as the blank control group and were fed a normal diet. Apolipoprotein E-deficient (ApoE^{-/-}) mice were randomly divided into a model group, low-, medium-, and high-dose DLT (DLT-L, DLT-M, DLT-H) groups (340, 680, and 1 360 mg·kg⁻¹·d⁻¹, respectively), and a simvastatin group (2.275 mg·kg⁻¹·d⁻¹). The ApoE^{-/-} mice were fed a high-fat diet for 12 weeks to establish the model, with corresponding intragastric administration during the final four weeks. Serum lipid and liver function levels were measured using a fully automatic biochemical analyzer, and hepatic lipid levels were determined using kits. Histopathological changes in the liver tissue were observed using hematoxylin-eosin (HE) and oil red O staining. The expressions of circCRIM1 and miR-342-3p in liver tissue were detected by real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR). The mRNA and protein expressions of SOX6, peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ), liver X receptor α (LXR α), and sterol regulatory element-binding protein 1c (SREBP1c) in the liver tissue of mice were measured by real-time PCR and the Wes automated Western blot system, respectively. SOX6 protein expression in the liver tissue of mice was also assessed by immunohistochemistry. *In vitro*, a lipid deposition model was established by inducing HepG2 cells with oleic acid (OA). The cells were divided into a control (CON) group, an OA model group (400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ OA), a blank serum (BS) group (400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ OA + 10% BS), and a DLT group (400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ OA + 10% DLT-containing serum). The lipid levels in HepG2 cells were measured using biochemical kits, and cellular morphological changes were observed with oil red O staining. The overexpression of circCRIM1 (OE-circCRIM1), miR-342-3p inhibition (miR-342-3p inhibitor), and DLT-containing serum were used to make the intervention. The expression levels of circCRIM1, miR-342-3p, and their corresponding mRNAs were measured by real-time PCR. **Results:** *In vivo*, compared with those in the CON group, the mice in the model group exhibited significantly abnormal serum lipids, liver function, and hepatic lipid levels ($P<0.01$), along with altered liver tissue structure, increased vacuoles, and increased lipid droplet accumulation. The expression of circCRIM1 was significantly upregulated, while that of miR-342-3p was significantly downregulated. The mRNA and protein expressions of SOX6, PPAR γ , LXR α , and SREBP1c were all significantly increased ($P<0.01$). Compared with those in the model group, mice in all DLT groups with different doses showed significant improvements in serum lipids, liver function, and hepatic lipid levels ($P<0.05$, $P<0.01$), with attenuated liver damage and lipid droplet accumulation. The expression of circCRIM1 was decreased, and the expression of miR-342-3p was significantly increased. The mRNA and protein expressions of SOX6, PPAR γ , LXR α , and SREBP1c were significantly reduced ($P<0.05$, $P<0.01$). *In vitro*, compared with the CON group, the OA group showed significantly increased lipid levels in HepG2 cells ($P<0.01$), with a greater number and larger size of lipid droplets. The mRNA levels of circCRIM1 and SOX6 were significantly elevated, whereas the miR-342-3p level was significantly reduced ($P<0.01$). Compared with the OE-NC group, the OE-circCRIM1 group had significantly higher circCRIM1 and SOX6 mRNA levels and markedly lower miR-342-3p levels ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with the inhibitor NC group, the miR-342-3p inhibitor group showed a significant increase in SOX6 mRNA level and a significant decrease in miR-342-3p ($P<0.01$). These indicators were all corrected following treatment with DLT-containing serum. **Conclusion:** DLT can ameliorate hepatic lipid deposition and thereby prevent and treat atherosclerosis by regulating fatty acid synthesis via the circCRIM1/miR-342-3p/SOX6.

[Keywords] Danlou tablets; atherosclerosis; regulating circular RNA cysteine-rich transmembrane BMP regulator 1 (circCRIM1)/miR-342-3p/SRY-box transcription factor 6 (SOX6); fatty acid synthesis; hepatic lipid deposition

据《中国心血管健康与疾病报告 2024 概要》显示,心血管疾病(CVD)已成为我国城乡居民的首要死亡原因,2021年我国 CVD 死亡构成比在农村与城市分别高达 48.98% 和 47.35%,疾病负担严峻^[1]。动脉粥样硬化(AS)是以血管内膜下脂质沉积为始动因素,由多重免疫炎症细胞介导的慢性病理过程。其特征为纤维斑块形成,最终可致管腔狭窄、急性血栓事件及血管适应不良性重塑^[2]。肝脏在代谢和炎症稳态中起着核心作用,与 AS 形成发展密

切相关。肝脏内甘油三酯(TG)等过度沉积,导致肝脏局部病理改变,还影响循环中致粥样硬化脂蛋白的合成、分泌,加剧血脂异常。此外,肝脏脂质沉积常伴随低度慢性炎症状态和胰岛素抵抗,这些病理因素通过释放促炎细胞因子、加剧氧化应激等途径,直接作用于管壁,加速 AS 病变的进程^[3-4]。

微小 RNA(miRNA)是一类内源性的短链非编码 RNA,不具备蛋白质编码潜能,而是在转录后水平对基因表达进行精细调控,在 AS 等多种疾病病

理生理过程中起关键性作用^[5-6]。长链非编码RNA与环状RNA(circRNA)等竞争性内源RNA(ceRNA)能够作为“miRNA海绵”通过其携带的miRNA反应元件竞争性结合miRNA,有效降低作用于靶信使RNA(mRNA)的miRNA水平,间接上调mRNA的表达,构成“ceRNA-miRNA-mRNA”调控网络,该调控网络的功能稳态对维持机体正常生理过程至关重要^[7]。miR-342-3p能够通过抑制糖酵解来延缓肝癌进程,并通过调控巨噬细胞炎症与脂质代谢来抑制动脉粥样硬化^[8-9]。糖酵解异常、慢性炎症和脂质代谢紊乱是AS及其相关心血管并发症进展的核心机制^[10-11],这提示miR-342-3p可能为延缓AS及相关心血管疾病进展的潜在治疗靶点。

中医药因其多成分、多靶点、多通路协同作用的特点及良好的安全性,在AS及相关心血管疾病的干预中展现出独特优势。中医认为,脾失健运,痰浊内生,继而导致膏脂转输障碍,日久生瘀,痰瘀互结,痹阻脉络是AS的病因病机。丹菱片(DLT)具有宽胸通阳、化痰散结、活血化瘀的功效,在改善血脂紊乱、保护血管内皮、减轻胰岛素抵抗和脂肪合成等方面具有显著作用^[12-13]。因此,本研究构建miR-342-3p相关ceRNA网络,并运用体内外实验进行验证,阐明DLT是否可通过环状RNA半胱氨酸丰富跨膜BMP调节因子1(circCRIM1)/miR-342-3p/SRY-box转录因子6(SOX6)影响脂肪酸合成缓解肝脏脂质沉积,从而为防治AS提供实验依据。

1 材料

1.1 实验动物及细胞 8只雄性C57BL/6小鼠和45只雄性载脂蛋白E基因敲除(ApoE^{-/-})小鼠,体质量(20±2)g,10只Sprague-Dawley(SD)大鼠,体质量(250±10)g,购自辽宁长生生物技术有限公司,合格证号SCXK(辽)2020-0001。动物于辽宁中医药大学屏障环境内饲养。人HepG2细胞购自于中国医学科学院细胞库,细胞编号为SCSP-510,传代至第5代时选取生长状态良好的细胞用于后续实验。

1.2 伦理 研究方案经辽宁中医药大学实验动物伦理委员会审批,编号21000062024188。

1.3 药物及试剂 丹菱片(吉林康乃尔药业有限公司,批号20230906,规格0.3g/片);辛伐他汀(浙江海正药业股份有限公司,批号H20010676,规格10mg/片);荧光素酶检测试剂盒(美国Promega公司,货号E1910);TG、总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)试剂盒(四川迈克生物科技股份有限公司,货号分别

为0721023、0521037、0721049、0621014);丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)试剂盒(北京九强生物技术股份有限公司,货号分别为GS001G、GS011G);TG、游离脂肪酸(NEFA)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所有限公司,货号分别为A110-1-1、A042-2-1);4%多聚甲醛(上海源叶生物科技有限公司,货号R20479);苏木素-伊红(HE)染色、改良油红O染色试剂盒、油红O染色试剂盒(细胞专用)(北京索莱宝科技有限公司,货号分别为G1120、G1261、G1262);聚合酶链式反应(PCR)引物由北京赛百盛基因技术有限公司合成,Ultrapure RNA Kit、HiFi-Script gDNA Removal cDNA Synthesis Kit、UltraSYBR Mixture (Low ROX)、miRNA cDNA Synthesis Kit、miRNA qPCR Assay Kit(江苏康为世纪生物科技股份有限公司,货号分别为CW0581M、CW2582M、CW2601M、CW2141S、CW2142S);聚氰基丙烯酸正丁酯(BCA)蛋白定量试剂盒(杭州弗德生物科技有限公司,货号FD2001);SOX6、 β -肌动蛋白(β -actin)(武汉三鹰生物技术有限公司,货号分别为14010-1-AP、66009-1-Ig);过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ)、肝X受体 α (LXR α)、固醇调节元件结合蛋白1c(SREBP1c)(北京博奥森生物技术有限公司,货号分别为bsm-52220R、bsm-54023R、bs-1402R);Modified Eagle Medium(MEM)培养基(上海达特希尔生物科技有限公司,货号C3050-0500);特级胎牛血清(Pr)(浙江百迪生物科技有限公司,货号F801-500);1×磷酸盐缓冲液(PBS)(北京兰杰柯科技有限公司,货号BL302A);油酸(OA)(上海阿拉丁生化科技股份有限公司,货号112-80-1);胰蛋白酶[赛澳美细胞技术(北京)有限公司,货号CPT101.02]。

1.4 仪器 TBA-120FR型全自动生化分析仪(日本Hitachi公司);ASP6025型全自动脱水机、EG1150H型包埋机、RM2235型冰冻切片机(德国Leica公司);M8型数字扫描成像系统(德国Precipoint公司);ThermoST16R型高速冷冻离心机、NanoDrop2000型超微量分光光度计(美国赛默飞世尔科技公司);WES全自动蛋白表达分析系统(美国Protein Simple公司);Quant Studio 3型实时荧光定量PCR仪(美国Applied Biosystems公司)。

2 方法

2.1 miR-342-3p相关ceRNA网络构建 运用circBank数据库(<http://www.circBank.cn/>)和RNA

交互组百科全书数据库(Starbase, <https://rnasysu.com/encori>) 预测 miR-342-3p 可能靶向的 circRNA^[14], 运用微小 RNA 靶基因数据库(miRDB, <http://mirdb.org>) 和靶标扫描数据库(TargetScan, <http://www.targetscan.org>) 预测 miR-342-3p 可能靶向的 mRNA^[15], 对预测结果取交集, 保留 2 个数据库都存在的 circRNA 和 mRNA 构建并可视化呈现 miR-342-3p 相关 ceRNA 网络。

2.2 双荧光素酶报告基因实验检测 circCRIM1 与 miR-342-3p, miR-342-3p 与 SOX6 的靶向关系 通过 Starbase 数据库预测 circCRIM1 与 miR-342-3p 的潜在结合位点, TargetScan 数据库预测 miR-342-3p 与 SOX6 mRNA 的潜在结合位点。将含 circCRIM1 野生型(WT)或突变型(MUT)结合序列的双荧光素酶报告载体分别与 miR-342-3p mimics 或 NC mimics 共转染至 293T 细胞中, 培养 24 h 后检测荧光素酶活性, 以验证 circCRIM1 与 miR-342-3p 的靶向关系。miR-342-3p 与 SOX6 的靶向关系用上述相同方法检测。

2.3 动物模型建立 本研究选用雄性 C57BL/6 小鼠作为空白组, 45 只雄性 ApoE^{-/-} 小鼠构建模型。所有动物经 1 周适应性饲养后, 空白组继续予以普通饲料, ApoE^{-/-} 小鼠则予以 12 周高脂饮食构建模型^[16]。肝脏 HE 染色发现小鼠肝索结构紊乱, 肝细胞显著肿胀胞质被巨大脂滴空泡占据认为造模成功^[16]。于第 9 周开始, 将 ApoE^{-/-} 小鼠随机分为模型组、DLT 低、中、高剂量组 (DLT-L、DLT-M、DLT-H 组) 及辛伐他汀组, 各组动物每日灌胃给药, 给药剂量参考临床等效剂量并经体表面积法换算^[17]: DLT-L、DLT-M、DLT-H 组组分别给予 DLT 340、680、1 360 mg·kg⁻¹·d⁻¹, 辛伐他汀组给予辛伐他汀 2.275 mg·kg⁻¹·d⁻¹, 空白组和模型组每日按同体积生理盐水灌胃, 持续干预 4 周。末次给药后 12 h 禁食不禁水, 行腹主动脉取血与肝脏取材, 血清静置 1 h 后 2 500 r·min⁻¹, 4 °C 离心 15 min (离心半径 10 cm, 下同); 肝脏组织一份固定于 4% 多聚甲醛, 另一份与血清一同在 -80 °C 下冻存。

2.4 小鼠血脂及肝功能水平检测 取冻存的小鼠血清样本, 应用全自动生化分析仪测定其血脂相关指标 TG、TC、LDL-C、HDL-C 水平与肝功能指标 ALT、AST 水平。

2.5 小鼠肝脏脂质水平检测 称取于冰上解冻的肝脏样本约 0.1 g, 加入 9 倍体积的预冷生理盐水, 通过组织匀浆仪制备成匀浆液, 在 4 °C, 2 500 r·min⁻¹

离心 10 min。取其上清液, 严格依照相应检测试剂盒的说明进行后续操作。

2.6 小鼠肝脏组织病理形态学变化观察 HE 染色: 小鼠肝脏组织块经全自动脱水机进行梯度乙醇脱水和二甲苯透明化, 随后包埋于石蜡中。将制备的蜡块切成 5 μm 厚的连续切片, 经脱蜡复水后, 采用标准 HE 染色法显示细胞和组织结构, 最后以中性树胶封固, 在光学显微镜下观察并采集图像。油红 O 染色: 固定后的组织则先经 20% 及 30% 蔗糖溶液梯度冷冻保护, 再进行冷冻包埋与切片。切片复温后用油红 O 染液标记脂滴, 并以苏木素轻度复染细胞核, 采用中性树胶封片后, 在显微镜下观察肝细胞内脂滴的分布、大小与数量并采集图像。

2.7 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR) 评估 circCRIM1、miR-342-3p 及相关 mRNA 在小鼠肝脏组织中表达水平 取肝组织 0.05 g 提取总 RNA, 将 RNA 作为模板合成第一链 cDNA, miR-342-3p 则先在 37 °C 下进行 Poly(A) 加尾反应, 再逆转录成特异性 cDNA。PCR 扩增反应以 cDNA 为模板采用两步法程序进行: 首先 95 °C 初始变性 10 min; 随后进入 40 个扩增循环 (95 °C 变性 15 s, 60 °C 退火/延伸 60 s)。基因的相对表达量依据 2^{-ΔΔC_t} 算法进行标准化计算, PCR 引物由北京赛百盛基因技术有限公司合成。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
circCRIM1	上游 CGGGAGAGTGTGTGACCTC	20
	下游 GGAGAGAACCGCACTTCACA	
SOX6	上游 CTGAGCAACTGCAGGACTGA	145
	下游 TTGCTTTGCTTCCTTCTGCG	
PPAR γ	上游 GGTGTGATCTTAACTGCCGGA	110
	下游 CCCAAACCTGATGGCATTGTG	
LXR α	上游 GCAGGACCAGCTCCAAGTAG	98
	下游 GGAACATCAGTGGGTCTGTGG	
SREBP1c	上游 GGCTCTGGAACAGACACTGG	80
	下游 TGAGCTGGAGCATGTCTTCG	
β -actin	上游 GGTCGTCGACAACGGCTC	117
	下游 ATTCCCACCATCACACCCTGG	
miR-342-3p	上游 TCTCACACAGAAATCGCACCCGT	23
	下游 通用引物	
U6	上游 GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT	25
	下游 通用引物	

2.8 免疫组化法检测小鼠肝脏 SOX6 蛋白表达水平 小鼠肝脏组织切片进行脱蜡、复水及抗原修复,与 SOX6(1:500)一抗于 4 °C 条件下进行过夜孵育,继而与辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗(1:1 000)结合。利用 3,3'-二氨基联苯胺(DAB)显色系统使阳性信号呈现棕褐色,并以苏木素标记细胞核,对切片进行常规脱水、透明处理并用中性树脂封固,以备镜检。

2.9 Wes 全自动蛋白表达分析系统检测相关蛋白在小鼠肝脏组织中表达水平 提取肝脏组织的蛋白裂解液,利用 BCA 法测定其浓度,配置样本,3 μ L 每孔上样,一抗用 Antibody Diluent II 稀释:SOX6、PPAR γ 、LXR α 、SREBP1c(1:75), β -actin(1:100)。2 500 r \cdot min⁻¹,离心 5 min(离心半径 18 cm),上机检测。

2.10 空白血清及 DLT 含药血清制备 10 只 SD 大鼠随机分为空白组和 DLT 组,给予 DLT 组大鼠 DLT 溶液灌胃每天 2 次,403 mg \cdot kg⁻¹ \cdot d⁻¹,空白组大鼠每天给予 2 次等体积生理盐水灌胃,连续 1 周。末次灌胃 2 h 后腹主动脉取血,静置 1 h,在 4 °C,3 000 r \cdot min⁻¹离心 10 min,取上清于水浴锅 56 °C 灭活 30 min,分装并置于 -80 °C 冰箱备用。

2.11 HepG2 细胞脂质水平检测 用 OA 诱导 HepG2 细胞建立脂质沉积模型。当细胞密度达到 70%~80% 时,将 HepG2 细胞分为空白(CON)组、OA 组(400 μ mol \cdot L⁻¹ OA)、空白血清(BS)组(400 μ mol \cdot L⁻¹ OA+10% 空白血清)和 DLT 组(400 μ mol \cdot L⁻¹ OA+10% DLT 含药血清),OA、10% 空白血清和 10%DLT 含药血清干预 24 h^[18]。各组细胞干预结束后吸取培养液,1 000 r \cdot min⁻¹离心 10 min,取上清根据 TG 和 NEFA 检测试剂盒说明书进行测定。

2.12 HepG2 细胞脂质沉积形态学观察 将对数增长的 HepG2 细胞制成细胞悬液均匀种植于 12 孔板中,待细胞贴壁后分为 CON 组、OA 组、BS 组和 DLT 组干预培养 24 h,使用油红 O 染色试剂盒染色后置于显微镜下观察并拍照。

2.13 Real-time PCR 检测 HepG2 细胞 circCRIM1、miR-342-3p 及相关 mRNA 表达 利用 Lipofectamine™ 3000 将质粒转染到 HepG2 细胞中,将 HepG2 细胞分为 CON 组、OA 组、OE-NC 组(400 μ mol \cdot L⁻¹ OA+OE-NC)、OE-circCRIM1 组(400 μ mol \cdot L⁻¹ OA+OE-circCRIM1),Real-time PCR 法检测 circCRIM1、miR-342-3p、SOX6 表达水平;将

HepG2 细胞分为 CON 组、OA 组、inhibitor NC 组(400 μ mol \cdot L⁻¹ OA+inhibitor NC)、miR-342-3p inhibitor 组(400 μ mol \cdot L⁻¹ OA+miR-342-3p inhibitor),Real-time PCR 法检测 miR-342-3p、SOX6 表达水平;将 HepG2 细胞分为 CON 组、OA 组、OE-NC+inhibitor NC 组(400 μ mol \cdot L⁻¹ OA+OE-NC+inhibitor NC)、OE-NC+inhibitor NC+DLT 组(400 μ mol \cdot L⁻¹ OA+OE-NC+inhibitor NC+10% DLT 含药血清)、OE-circCRIM1+inhibitor NC 组(400 μ mol \cdot L⁻¹ OA+OE-circCRIM1+inhibitor NC)、OE-circCRIM1+inhibitor NC+DLT 组(400 μ mol \cdot L⁻¹ OA+OE-circCRIM1+inhibitor NC+10% DLT 含药血清)、OE-circCRIM1+miR-342-3p inhibitor 组(400 μ mol \cdot L⁻¹ OA+OE-circCRIM1+miR-342-3p inhibitor)、OE-circCRIM1+miR-342-3p inhibitor+DLT 组(400 μ mol \cdot L⁻¹ OA+OE-circCRIM1+miR-342-3p inhibitor+10% DLT 含药血清),Real-time PCR 法检测 miR-342-3p 及相关 mRNA 表达水平。收集各组细胞提取总 RNA,将 RNA 作为模板合成第一链 cDNA,miR-342-3p 则先在 37 °C 下进行 Poly(A)加尾反应,再逆转录成特异性 cDNA。PCR 扩增反应以 cDNA 为模板采用两步法程序进行:首先 95 °C 初始变性 10 min;随后进入 40 个扩增循环(95 °C 变性 15 s,60 °C 退火/延伸 60 s)。基因的相对表达量依据 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 算法进行标准化计算,PCR 引物由北京赛百盛基因技术有限公司合成。引物序列见表 2。

2.14 统计学方法 采用 GraphPad Prism 9.5.0 软件进行统计分析。所有定量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 的形式呈现。多组间差异性比较通过单因素方差分析进行检验,并以 $P < 0.05$ 作为差异具有统计学意义的判断标准。

3 结果

3.1 ceRNA 网络构建 circBank 数据库预测得 miR-342-3p 靶向的 circRNA 11 个,Starbase 数据库得预测 miR-342-3p 靶向的 circRNA 307 个,两个数据库取交集共获得 circRNA 3 个。TargetScan 数据库获得与 miR-342-3p 结合的 mRNA 319 个,miRDB 数据库获得与 miR-342-3p 结合的 mRNA 598 个,两个数据库取交集获得 mRNA 120 个,运用 Cytoscape 软件将结果进行可视化展示。见增强出版附加材料。

3.2 circCRIM1/miR-342-3p/SOX6 间靶向关系验证结果 Starbase 显示,circCRIM1 与 miR-342-3p 存在

表2 引物序列

Table 2 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
circCRIM1	上游 GCCTTCCCTGCTACTTGTG	20
	下游 AGAGCTTCCAAAGGCTAGGG	
SOX6	上游 AACACGGCAGCAAATGGAC	128
	下游 CATGTGACCCTGAACCTGGA	
PPAR γ	上游 CGACCAGCTGAATCCAGAGT	146
	下游 AACCTGGGCGGTTGATTTG	
LXR α	上游 CTTGAGTCACGGTGATGCT	107
	下游 TTGGCAAAGTCTCCCGGTT	
SREBP1c	上游 CTGACCGACATCGAAGGTGA	173
	下游 CCAGCATAGGGTGGGTCAAAA	
β -actin	上游 CCTTCCTTCCTGGGCATGG	192
	下游 GATCTTCATTGTGCTGGGTGC	
miR-342-3p	上游 CAGGGAGGCGTGATCACTG	20
	下游通用引物	
U6	上游 GGAACGATACAGAGATTAGC	20
	下游通用引物	

结合位点, TargetScan显示, miR-342-3p与SOX6存在结合位点。与circCRIM1 WT+NC mimics组比较, miR-342-3p mimics显著减弱了circCRIM1 WT报告基因的荧光信号($P<0.01$), 但对circCRIM1 MUT无影响, 表明二者存在直接结合。同样, SOX6也是miR-342-3p的靶基因: miR-342-3p mimics抑制了SOX6 WT的荧光素酶活性($P<0.01$), 而SOX6 MUT的活性则不受影响。即miR-342-3p与SOX6存在靶向关系。见表3、表4、增强出版附加材料。

表5 DLT对AS小鼠血清脂质及肝功能的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 5 Effect of DLT on serum lipid and liver function in AS mice ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	TC/mmol·L ⁻¹	TG/mmol·L ⁻¹	LDL-C/mmol·L ⁻¹	HDL-C/mmol·L ⁻¹	ALT/U·L ⁻¹	AST/U·L ⁻¹
空白组		2.89±0.14	1.08±0.09	0.28±0.09	2.74±0.32	53.25±5.02	84.33±3.41
模型组		21.44±0.83 ¹⁾	3.48±0.22 ¹⁾	3.36±0.56 ¹⁾	1.53±0.18 ¹⁾	77.81±7.63 ¹⁾	123.94±6.05 ¹⁾
DLT-L组	340	16.82±1.17 ³⁾	2.57±0.27 ³⁾	2.64±0.42 ²⁾	1.80±0.21	71.99±6.13	110.16±7.84 ³⁾
DLT-M组	680	14.51±0.55 ³⁾	1.96±0.14 ³⁾	2.41±0.48 ³⁾	1.94±0.15 ²⁾	65.10±4.49 ³⁾	103.82±6.30 ³⁾
DLT-H组	1 360	10.07±0.85 ³⁾	1.64±0.24 ³⁾	1.94±0.44 ³⁾	2.09±0.32 ³⁾	60.90±5.80 ³⁾	97.64±4.19 ³⁾
辛伐他汀组	2.275	12.02±1.19 ³⁾	1.95±0.11 ³⁾	2.24±0.33 ³⁾	1.96±0.16 ³⁾	62.13±5.05 ³⁾	100.34±5.96 ³⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.01$;与模型组比较²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$ (表6-表8同)

3.4 DLT对AS小鼠肝脏脂质水平的影响 与空白组比较, 模型组小鼠肝脏TG、NEFA水平显著升高($P<0.01$);与模型组比较, DLT各剂量组及辛伐他汀组小鼠肝脏NEFA水平显著降低($P<0.01$), DLT-M

表3 circCRIM1与miR-342-3p靶向关系结果($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 3 Targeting relationship between circCRIM1 and miR-342-3p ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	相对荧光素酶活性/%
circCRIM1 WT+NC mimics组	1.00±0.04
circCRIM1 WT+miR-342-3p mimics组	0.62±0.02 ¹⁾
circCRIM1 MUT+NC mimics组	0.99±0.04
circCRIM1 MUT+miR-342-3p mimics组	1.01±0.05

注:与circCRIM1 WT+NC mimics组比较¹⁾ $P<0.01$

表4 miR-342-3p与SOX6靶向关系结果($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 4 Targeting relationship between miR-342-3p and SOX6 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	相对荧光素酶活性/%
SOX6 WT+NC mimics组	1.00±0.01
SOX6 WT+miR-342-3p mimics组	0.80±0.01 ¹⁾
SOX6 MUT+NC mimics组	1.01±0.02
SOX6 MUT+miR-342-3p mimics组	0.98±0.05

注:与SOX6 WT+NC mimics组比较¹⁾ $P<0.01$

3.3 DLT对AS小鼠血清脂质及肝功能水平的影响 与空白组比较, 模型组小鼠呈现出显著的血脂紊乱与肝功能损伤, 血清TG、TC、LDL-C、ALT、AST水平显著升高($P<0.01$), HDL-C水平显著降低($P<0.01$);与模型组比较, DLT-L组小鼠血清TC、TG、LDL-C、AST水平明显降低($P<0.05, P<0.01$), DLT-M组、DLT-H组及辛伐他汀组小鼠血清TC、TG、LDL-C、ALT、AST水平显著降低($P<0.01$), HDL-C水平明显升高($P<0.05, P<0.01$), 各项指标的改善程度与DLT给药剂量呈正相关, 存在剂量依赖效应。见表5。

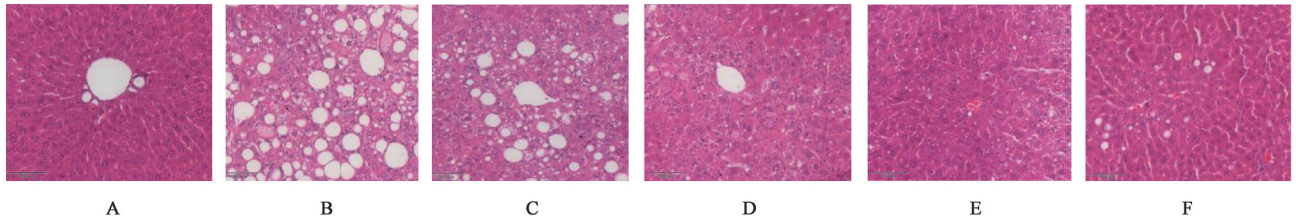
组、DLT-H组及辛伐他汀组小鼠肝脏TG水平显著降低($P<0.01$)。且随着DLT给药剂量的增加, 其降低肝脏脂质水平的作用愈发显著, 表明DLT的治疗效果呈现出剂量依赖性关系。见表6。

表6 DLT对AS小鼠肝脏脂质水平的影响 ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	TG	NEFA
空白组		1.55±0.14	0.179±0.015
模型组		3.21±0.22 ¹⁾	0.643±0.022 ¹⁾
DLT-L组	340	3.07±0.35	0.540±0.039 ³⁾
DLT-M组	680	2.58±0.25 ³⁾	0.362±0.025 ³⁾
DLT-H组	1 360	2.37±0.18 ³⁾	0.296±0.027 ³⁾
辛伐他汀组	2.275	2.54±0.26 ³⁾	0.324±0.030 ³⁾

3.5 DLT对AS小鼠肝脏组织形态学的影响 HE染色结果显示,空白组小鼠肝脏肝小叶结构完整,肝细胞索围绕中央静脉呈放射状规整排列,细胞核圆形居中,胞质染色均一;与空白组比较,模型组小

鼠肝脏表现出重度的弥漫性大泡性脂肪变性,肝细胞索结构紊乱,肝细胞显著肿胀呈气球样变,胞质被巨大脂滴空泡占据,导致细胞核受压移位;与模型组比较,DLT各剂量组及辛伐他汀组小鼠肝脏病理损伤有不同程度改善,肝细胞肿胀程度减轻,巨大脂肪滴数量锐减,以微脂滴为主,肝细胞索紊乱状态亦趋于规整。油红O染色结果显示,空白组肝细胞胞浆内未见橘红色脂滴蓄积,肝细胞形态正常,肝窦结构清晰规整;与空白组比较,模型组小鼠肝细胞胞浆内弥漫大小不一的橘红色脂滴,肝细胞体积增大,肝窦结构紊乱、边界不清;与模型组比较,DLT各剂量组及辛伐他汀组小鼠肝内脂质沉积现象得到显著抑制,脂滴数量及体积有所减少,肝细胞肿胀程度减轻,肝窦结构完整性部分恢复。见图1、图2。



注:A.空白组;B.模型组;C.DLT-L组;D.DLT-M组;E.DLT-H组;F.辛伐他汀组(图2同)

图1 DLT对AS小鼠肝脏形态学的影响(HE,×400)

Fig. 1 Effect of DLT on liver morphology of AS mice (HE,×400)

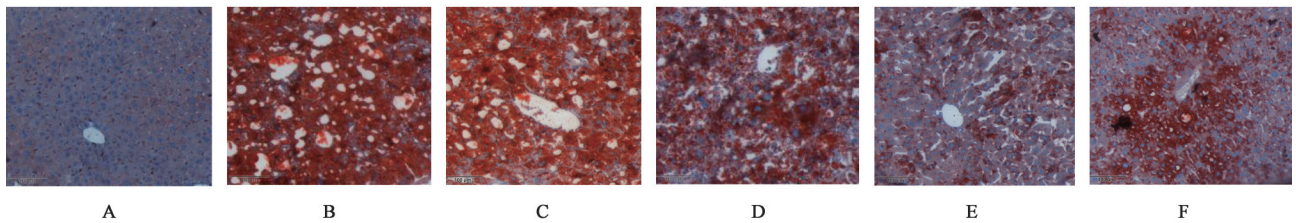


图2 DLT对AS小鼠肝脏脂质沉积状况变化的影响(油红O,×400)

Fig. 2 Effect of DLT on changes in liver lipid deposition in AS mice (oil red O,×400)

3.6 DLT对AS小鼠肝脏组织相关基因表达的影响 与空白组比较,模型组小鼠肝脏组织circCRIM1、SOX6、PPAR γ 、LXR α 、SREBP1c mRNA表达显著升高($P<0.01$),miR-342-3p表达显著降低($P<0.01$);与模型组比较,各干预组小鼠肝脏组织circCRIM1表达显著降低($P<0.01$),miR-342-3p表达显著升高($P<0.01$),SOX6、PPAR γ 、SREBP1c mRNA表达明显降低($P<0.05, P<0.01$),DLT中、高剂量组LXR α mRNA表达显著降低($P<0.01$)。见表7。

3.7 各组AS小鼠肝脏组织SOX6蛋白表达的影响 与空白组比较,模型组SOX6蛋白表达显著升高;与模型组比较,DLT不同剂量组和辛伐他汀组

小鼠肝脏组织SOX6蛋白表达有不同程度降低。见图3。

3.8 DLT对AS小鼠肝脏组织相关蛋白表达的影响 与空白组比较,模型组小鼠肝脏组织SOX6、PPAR γ 、LXR α 、SREBP1c蛋白表达显著升高($P<0.01$);与模型组比较,DLT不同剂量组和辛伐他汀组小鼠肝脏组织SOX6、PPAR γ 、LXR α 、SREBP1c蛋白表达明显降低($P<0.05, P<0.01$)。见表8、图4。

3.9 DLT对各组HepG2细胞脂质水平的影响 与CON组比较,OA组细胞TG、NEFA水平显著升高($P<0.01$);与OA组比较,BS组细胞TG、NEFA水平无明显变化,排除了大鼠血清自身对脂质水平的影响,DLT组细胞TG水平明显降低($P<0.05$),NEFA

表7 DLT对AS小鼠肝脏组织circCRIM1, miR-342-3p, SOX6, PPAR γ , LXR α , SREBP1c mRNA水平的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 7 Effect of DLT on circCRIM1, miR-342-3p, and mRNAs of SOX6, PPAR γ , LXR α , and SREBP1c in hepatic tissue of different groups of AS mice ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	circCRIM1	miR-342-3p	SOX6	PPAR γ	LXR α	SREBP1c
空白组		1.00±0.07	1.00±0.08	1.00±0.11	1.00±0.05	1.00±0.04	1.00±0.07
模型组		5.49±0.28 ¹⁾	0.20±0.02 ¹⁾	4.95±0.06 ¹⁾	4.39±0.11 ¹⁾	3.35±0.13 ¹⁾	3.79±0.30 ¹⁾
DLT-L组	340	4.13±0.15 ³⁾	0.57±0.01 ³⁾	2.06±0.11 ³⁾	3.35±0.32 ³⁾	3.29±0.07	3.27±0.28 ²⁾
DLT-M组	680	2.43±0.17 ³⁾	0.61±0.06 ³⁾	1.50±0.09 ³⁾	2.48±0.08 ³⁾	2.01±0.14 ³⁾	2.71±0.08 ³⁾
DLT-H组	1 360	1.22±0.12 ³⁾	0.84±0.05 ³⁾	1.20±0.07 ³⁾	1.06±0.02 ³⁾	1.75±0.07 ³⁾	1.28±0.01 ³⁾
辛伐他汀组	2.275	1.59±0.07 ³⁾	0.79±0.06 ³⁾	1.21±0.03 ³⁾	1.90±0.02 ³⁾	1.76±0.10 ³⁾	1.30±0.06 ³⁾

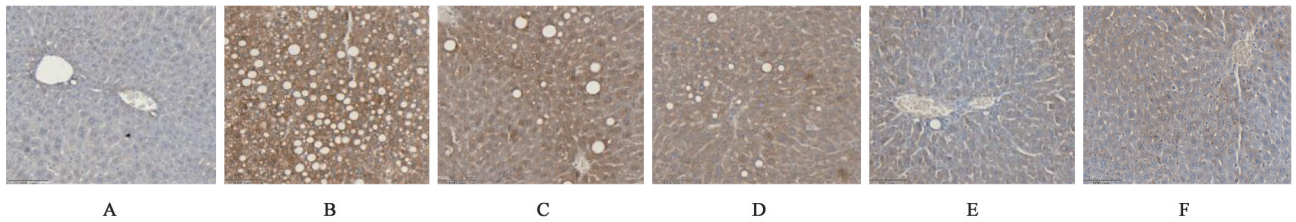


图3 DLT对AS小鼠肝脏组织SOX6蛋白表达变化的影响(免疫组化, ×400)

Fig. 3 Effect of DLT on expression of SOX6 protein in liver tissue of AS mice (IHC×400)

表8 DLT对AS小鼠肝脏组织SOX6, PPAR γ , LXR α , SREBP1c蛋白水平的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 8 Effect of DLT on levels of SOX6, PPAR γ , LXR α and SREBP1c in liver tissue of AS mice ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	SOX6/ β -actin	PPAR γ / β -actin	LXR α / β -actin	SREBP1c/ β -actin
空白组		0.28±0.03	0.21±0.02	0.23±0.04	0.27±0.02
模型组		0.99±0.07 ¹⁾	0.45±0.03 ¹⁾	1.01±0.08 ¹⁾	0.95±0.06 ¹⁾
DLT-L组	340	0.83±0.03 ²⁾	0.35±0.04 ²⁾	0.55±0.06 ³⁾	0.82±0.05 ²⁾
DLT-M组	680	0.75±0.04 ³⁾	0.34±0.03 ³⁾	0.34±0.05 ³⁾	0.68±0.04 ³⁾
DLT-H组	1 360	0.59±0.06 ³⁾	0.26±0.02 ³⁾	0.28±0.04 ³⁾	0.32±0.05 ³⁾
辛伐他汀组	2.275	0.73±0.05 ³⁾	0.29±0.03 ³⁾	0.33±0.02 ³⁾	0.55±0.03 ³⁾

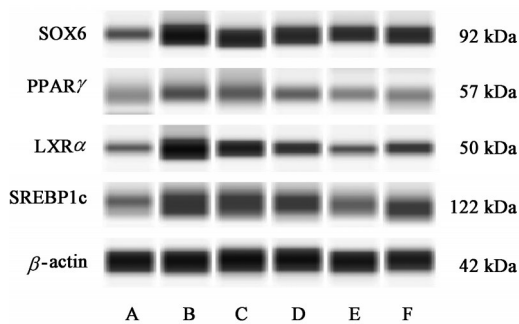


图4 各组AS小鼠肝脏组织SOX6, PPAR γ , LXR α , SREBP1c蛋白表达电泳

Fig. 4 Electrophoresis of SOX6, PPAR γ , LXR α , and SREBP1c protein expression in liver tissue of AS mice in each group

水平显著降低($P<0.01$)。见表9。

3.10 各组HepG2细胞形态学变化 油红O染色结果显示, OA组HepG2细胞中红色脂滴的大小和数量较CON组显著上升, 与OA组比较, 给予大鼠空白血清后细胞中脂滴大小和数量差异无统计学意义, 给予

表9 DLT含药血清对HepG2细胞TG、NEFA水平的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

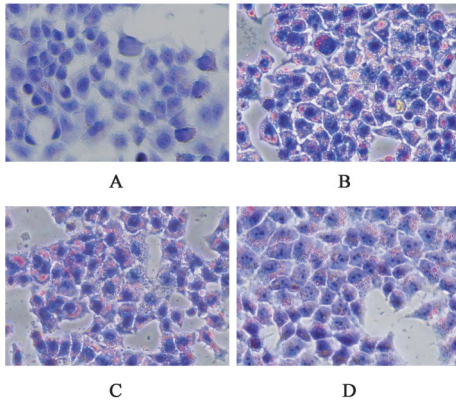
Table 9 Effects of DLT-containing serum on TG and NEFA levels in HepG2 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量	TG/mmol·L ⁻¹	NEFA/ μ mol·L ⁻¹
CON组		0.12±0.03	46.45±9.08
OA组	400 μ mol·L ⁻¹	0.43±0.01 ¹⁾	358.17±16.84 ¹⁾
BS组	400 μ mol·L ⁻¹ +10%	0.45±0.03	355.67±11.22
DLT组	400 μ mol·L ⁻¹ +10%	0.34±0.02 ²⁾	153.99±9.37 ³⁾

注: 与CON组比较¹⁾ $P<0.01$; 与OA组比较²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$

DLT含药血清后细胞中脂滴数量和大小明显减小。见图5。

3.11 circCRIM1过表达对各组HepG2细胞circCRIM1、miR-342-3p、SOX6 mRNA表达的影响 与CON组比较, OA组细胞circCRIM1、SOX6表达显著升高($P<0.01$), miR-342-3p表达显著降低($P<0.01$); 与OE-NC组比较, OE-circCRIM1



注:A.CON组;B.OA组;C.BS组;D.DLT组

图5 DLT对HepG2细胞形态学的影响(油红O,×400)

Fig. 5 Morphological changes of HepG2 cells in each group (Oil Red O, ×400)

组细胞 circCRIM1、SOX6 表达显著升高 ($P<0.01$), miR-342-3p 表达明显降低 ($P<0.05$)。见表 10。

表 10 circCRIM1 过表达对各组 HepG2 细胞 circCRIM1、miR-342-3p、SOX6 mRNA 表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 10 Effect of circCRIM1 overexpression on expression of circCRIM1, miR-342-3p, and SOX6 mRNA in HepG2 cells of each group ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	circCRIM1	miR-342-3p	SOX6
CON组		1.00±0.10	1.00±0.09	1.00±0.08
OA组	400	1.89±0.18 ¹⁾	0.63±0.06 ¹⁾	2.33±0.26 ¹⁾
OE-NC组	400	1.95±0.27	0.69±0.07	2.32±0.40
OE-circCRIM1组	400	2.73±0.26 ¹⁰⁾	0.47±0.05 ²⁾	4.10±0.38 ³⁾

注:与CON组比较¹⁾ $P<0.01$;与OE-NC组比较²⁾ $P<0.05$,³⁾ $P<0.01$

3.12 miR-342-3p 干扰对各组 HepG2 细胞 miR-342-3p、SOX6 mRNA 表达的影响 与 CON 组比较,OA 组细胞 miR-342-3p 表达显著降低 ($P<0.01$), SOX6 表达显著升高 ($P<0.01$); 与 inhibitor NC 组比较, miR-342-3p inhibitor 组细胞 miR-342-3p 表达显著降低 ($P<0.01$), SOX6 表达显著升高 ($P<0.01$)。见表 11。

3.13 DLT 对 HepG2 细胞相关基因表达变化的影响 与 OA 组比较,DLT 组细胞 miR-342-3p 表达显著升高 ($P<0.01$), SOX6、PPAR γ 、LXR α 、SREBP1c mRNA 表达明显降低 ($P<0.05$, $P<0.01$), OE-NC+inhibitor NC 组相关基因表达无明显变化;与 DLT 组比较,OE-NC+inhibitor NC+DLT 组相关基因表达无明显变化;与 OE-NC+inhibitor NC 组比较,OE-circCRIM1+inhibitor NC 组细胞 miR-342-3p 表达明显降低 ($P<0.05$), SOX6、PPAR γ 、LXR α 、SREBP1c

表 11 miR-342-3p 干扰对各组 HepG2 细胞 miR-342-3p、SOX6 mRNA 表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 11 Effect of miR-342-3p interference on expression of miR-342-3p and SOX6 mRNA in HepG2 cells of each group ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	miR-342-3p	SOX6
CON组		1.00±0.04	1.00±0.04
OA组	400	0.81±0.07 ¹⁾	1.72±0.05 ²⁾
inhibitor NC组	400	0.75±0.03	1.66±0.09
miR-342-3p inhibitor组	400	0.46±0.02 ²⁾	1.92±0.04 ²⁾

注:与CON组比较¹⁾ $P<0.01$;与inhibitor NC组比较²⁾ $P<0.01$

mRNA 表达显著升高 ($P<0.01$); 与 OE-circCRIM1+inhibitor NC 组比较, OE-circCRIM1+inhibitor NC+DLT 组细胞 DLT 组细胞 miR-342-3p 表达明显升高 ($P<0.05$), SOX6、PPAR γ 、LXR α 、SREBP1c mRNA 表达显著降低 ($P<0.01$), OE-circCRIM1+miR-342-3p inhibitor 组细胞 miR-342-3p 表达显著降低 ($P<0.01$), SOX6、PPAR γ 、LXR α 、SREBP1c mRNA 表达显著升高 ($P<0.01$); 与 OE-circCRIM1+miR-342-3p inhibitor 组比较, OE-circCRIM1+miR-342-3p inhibitor+DLT 组细胞 miR-342-3p 表达显著升高 ($P<0.01$), SOX6、PPAR γ 、LXR α 、SREBP1c mRNA 表达显著降低 ($P<0.01$)。见表 12。

4 讨论

AS 在中医学中并无对应病名,根据其胸闷心痛、心悸气短等临床证候,可归属于“胸痹”“心悸”等范畴,多由年老体衰,脏气虚损,或饮食不节,过食醇酒厚味,损伤脾胃,运化失司,津液不布,湿聚成痰,痰浊阻滞脉道,血行不畅,久则成瘀,痰瘀互结,痹阻脉络,发而为病。《临证指南医案》有云:“久病入络,必有瘀血”,病程日久,痰浊痹阻,易致血瘀;《血证论》亦载:“瘀血不行,则水积为痰”,痰浊瘀血互为因果,相互搏结,痹阻脉络,为 AS 核心病机,故防治应以化痰祛瘀为要。丹萎片源自《金匱要略》之瓜蒌薤白白酒汤,由加以化裁而成^[19]。方中瓜蒌甘寒清润,宽胸散结,涤痰化浊,直击病所;薤白辛温通阳,下气行滞,宣痹散结,为君药;丹参、川芎、赤芍、郁金、黄芪活血化瘀通络,补气,为臣药;葛根化气生血,骨碎补补肾活血,佐之泽泻泻湿降浊,诸药合用,共奏化痰祛瘀、通阳散结之功^[20],契合 AS 病机。本研究通过饲喂 ApoE^{-/-}小鼠高脂饲料构建 AS 模型,结果显示模型组小鼠血脂异常、肝功能损伤及肝脏脂质水平明显异常,肝脏组织出现明显脂肪空泡,脂质沉积等病理改变。经不同剂量

表 12 各组 HepG2 细胞 miR-342-3p, SOX6, PPAR γ , LXR α , SREBP1c mRNA 水平变化 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 12 Change in expression levels of miR-342-3p, SOX6, PPAR γ , LXR α , and SREBP1c mRNA in HepG2 cells of each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	浓度	miR-342-3p	SOX6	PPAR γ	LXR α	SREBP1c
OA 组	400 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	1.00 \pm 0.05	1.00 \pm 0.10	1.00 \pm 0.08	1.01 \pm 0.16	1.00 \pm 0.07
DLT 组	400 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ +10%	1.32 \pm 0.05 ²⁾	0.60 \pm 0.05 ²⁾	0.63 \pm 0.04 ²⁾	0.70 \pm 0.05 ¹⁾	0.40 \pm 0.03 ²⁾
OE-NC+inhibitor NC 组	400 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	0.93 \pm 0.03	0.98 \pm 0.12	0.91 \pm 0.07	0.93 \pm 0.01	0.88 \pm 0.11
OE-NC+inhibitor NC+DLT 组	400 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ +10%	1.35 \pm 0.04	0.62 \pm 0.07	0.53 \pm 0.06	0.54 \pm 0.07	0.34 \pm 0.03
OE-circCRIM1+inhibitor NC 组	400 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	0.79 \pm 0.02 ³⁾	1.28 \pm 0.09 ⁴⁾	1.33 \pm 0.06 ⁴⁾	1.34 \pm 0.11 ⁴⁾	1.35 \pm 0.10 ⁴⁾
OE-circCRIM1+inhibitor NC+DLT 组	400 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ +10%	0.94 \pm 0.02 ⁵⁾	0.92 \pm 0.02 ⁶⁾	0.81 \pm 0.09 ⁶⁾	0.95 \pm 0.05 ⁶⁾	0.94 \pm 0.06 ⁶⁾
OE-circCRIM1+miR-342-3p inhibitor 组	400 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	0.41 \pm 0.07 ⁶⁾	1.54 \pm 0.10 ⁶⁾	2.03 \pm 0.16 ⁶⁾	1.65 \pm 0.14 ⁶⁾	1.82 \pm 0.12 ⁶⁾
OE-circCRIM1+miR-342-3p inhibitor+DLT 组	400 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ +10%	0.73 \pm 0.05 ⁷⁾	1.08 \pm 0.03 ⁷⁾	1.5 \pm 0.17 ⁷⁾	1.29 \pm 0.11 ⁷⁾	1.28 \pm 0.12 ⁷⁾

注:与 OA 组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与 OE-NC+inhibitor NC 组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$;与 OE-circCRIM1+inhibitor NC 组比较⁵⁾ $P < 0.05$,⁶⁾ $P < 0.01$;与 OE-circCRIM1+miR-342-3p inhibitor 组比较⁷⁾ $P < 0.01$

DLT 溶液干预后,小鼠血清血脂、肝功能指标和肝脏内脂质含量呈剂量依赖性改善,HE 和油红 O 染色结果进一步表明 DLT 治疗能有效减轻肝脏脂质蓄积,可见 DLT 对 AS 小鼠的血脂异常和肝脏脂质紊乱具有一定的纠正作用。

miRNA 可通过 ceRNA 网络在多种疾病的发生发展和治疗中扮演关键角色^[21-22]。miR-342-3p 是 miR-342 家族的成员,其基因编码于人类 14 号染色体的 14q32 区域^[23]。现有研究揭示其可能与 AS 的发生发展相关:在 AS 模型中,上调 miR-342-3p 能靶向降低 Ch1311 表达抑制内皮细胞炎症和血管平滑肌细胞激活;且 miR-342-3p 模拟物能有效抑制 THP-1 单核细胞的脂质摄取,减缓泡沫细胞的形成^[9,24]。因此本研究运用浏览器预测到 miR-342-3p 可能靶向 circRNA 3 个和 mRNA 120 个,据此构建 miR-342-3p 相关 ceRNA 调控网络图。在该网络中,本研究重点关注了 circCRIM1 与 SOX6。既往研究证实,敲低 circCRIM1 表达能够显著减轻脑缺血再灌注造成的神经元凋亡,防止脑组织活性氧产生和氧化应激失衡^[25],而氧化应激几乎参与并加速 AS 进展的全程,故 circCRIM1 可能是动脉粥样硬化及其相关心脑血管疾病的潜在生物标志物。转录因子 SOX6 是 SOX 蛋白家族的 D 组成员,其被证实能够通过促进脂肪生成引起肥胖继而引发肥胖相关代谢性疾病^[26],这与 AS 的代谢紊乱基础密切相关。本研究发现在 AS 模型小鼠的肝脏组织及 OA 诱导的 HepG2 细胞中, circCRIM1 与 SOX6 mRNA 表达上调, miR-342-3p 表达下调;经 DLT 干预后,以上分子表达有所逆转。在 OA 诱导的 HepG2 细胞中,过表达 circCRIM1 可使 miR-342-3p 下调并促进 SOX6 mRNA 表达;干扰 miR-342-3p 后, SOX6 mRNA 表达

上调。结合双荧光素酶报告基因实验表明 circCRIM1 可作为 miR-342-3p 的海绵分子, SOX6 是 miR-342-3p 的靶基因。

研究发现,转录因子 SOX6 可通过激活成脂调节因子 PPAR γ 来调节脊椎动物物种的脂肪生成^[26]。PPAR γ 是脂质代谢的主要调节因子,它能刺激血浆脂联素浓度增加,促进肝脏和骨骼肌中的游离脂肪酸氧化,改善胰岛素敏感性,减少肝脏中的葡萄糖生成^[27];然而, PPAR γ 也会促进前脂肪细胞分化和脂肪酸合成,导致体质量增加、血脂异常升高^[28]。PPAR γ 通常与视黄醛 X 受体(RXR)形成异源二聚体,激活靶基因 LXR α 的转录来调控脂质代谢^[29]。随后, LXR α 与 RXR 结合,并作用于 SREBP1 启动子,调控其表达^[30]。作为下游关键效应分子, SREBP1 的亚型 SREBP1c 是调控脂肪酸从头合成与肝脏脂肪生成的关键转录因子,其活性直接影响肝脏 TG 水平^[31]。本研究发现:AS 小鼠肝脏组织中 PPAR γ 、LXR α 、SREBP1c mRNA 和蛋白表达显著升高,给与不同剂量 DLT 可有效逆转上述分子异常表达。在 OA 诱导 HepG2 细胞构建脂质沉积的基础上过表达 circCRIM1、干扰 miR-342-3p 后 PPAR γ 、LXR α 、SREBP1c mRNA 水平升高, DLT 含药血清可逆转上述结果,这表明 DLT 可能通过 circCRIM1/miR-342-3p/SOX6 介导脂肪酸合成减轻肝脏脂质沉积,进而改善 AS。

综上所述, DLT 可以通过调控 circCRIM1/miR-342-3p/SOX6 信号轴,下调关键转录因子 SOX6 的表达,进而抑制 PPAR γ 介导的肝脏脂肪酸从头合成减轻肝脏脂质沉积,最终改善 AS 病理进程。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 中国心血管健康与疾病报告2024概要[J]. 中国循环杂志, 2025,40(6):521-559.
Report on cardiovascular health and diseases in China 2024: An updated summary[J]. Chin Circ J, 2025, 40(6): 521-559.
- [2] 刘妍宏,麻益荣,赖俊宇,等. 动脉粥样硬化程序性细胞死亡及中药复方干预研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2026, 32(12):320-330.
LIU Y H, MA Y R, LAI J Y, et al. Research progress on programmed cell death of atherosclerosis and intervention of traditional Chinese medicine compound[J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2026, 32(12): 320-330.
- [3] 赵美,张永,罗雅琪,等. 基于转录组与代谢组学联合分析探讨加减酸梅汤治疗代谢相关脂肪性肝病作用机制[J]. 中药药理与临床, 2024, 40(9):23-30.
ZHAO M, ZHANG Y, LUO Y Q, et al. Mechanism of modified Suanmei decoction in the treatment of MAFLD based on transcriptomics and metabolomics [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 2024, 40(9): 23-30.
- [4] TEN HOVE M, PATER L, STORM G, et al. The hepatic lipidome: From basic science to clinical translation [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2020, 159: 180-197.
- [5] CHEN W, WU X, HU J, et al. The translational potential of miR-26 in atherosclerosis and development of agents for its target genes ACC1/2, COL1A1, CPT1A, FBP1, DGAT2, and SMAD7[J]. Cardiovasc Diabetol, 2024, 23(1): 21.
- [6] 黄家容,张凤蕊,平芬. miRNA在阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征中的作用研究进展[J]. 解放军医学杂志, 2023, 48(6):735-741.
HUANG J R, ZHANG F R, PING F. Research progress on the role of miRNA in obstructive sleep apnea hypopnea syndrome [J]. Med J Chin PLA, 2023, 48(6): 735-741.
- [7] TAY Y, RINN J, PANDOLFI P P. The multilayered complexity of ceRNA crosstalk and competition [J]. Nature, 2014, 505(7483): 344-352.
- [8] LIU W, KANG L, HAN J, et al. miR-342-3p suppresses hepatocellular carcinoma proliferation through inhibition of IGF-1R-mediated Warburg effect [J]. Onco Targets Ther, 2018, 11: 1643-1653.
- [9] WANG L, XIA J W, KE Z P, et al. Blockade of NEAT1 represses inflammation response and lipid uptake via modulating miR-342-3p in human macrophages THP-1 cells [J]. J Cell Physiol, 2019, 234(4): 5319-5326.
- [10] 韩维维,王博,钟晴,等. 18 β -甘草次酸通过PGK1糖酵解途径抑制oxLDL诱导的血管内皮细胞凋亡研究[J]. 天然产物研究与开发, 2024, 36(3): 478-484.
HAN W W, WANG B, ZHONG Q, et al. 18 β -Glycyrrhetic acid inhibits oxLDL-induced apoptosis of vascular endothelial cells through PGK1 glycolysis pathway [J]. Nat Prod Res Dev, 2024, 36(3): 478-484.
- [11] 刘莲,胡杭,甘露. 脂肪源性外泌体在动脉粥样硬化病理进展中的作用[J]. 生理学报, 2023, 75(2):241-247.
LIU L, HU H, GAN L. The role of adipose-derived exosomes in the pathological progression of atherosclerosis [J]. Acta Physiol Sin, 2023, 75(2): 241-247.
- [12] 朱敬轩,陈文娜,宋囡,等. 丹蒾片对ApoE^{-/-}小鼠肝脏脂质沉积自噬及脂质代谢的调节作用[J]. 时珍国医国药, 2023, 34(2):269-272.
ZHU J X, CHEN W N, SONG N, et al. Regulatory effects of Danlou tablet on hepatic lipid deposition, autophagy and lipid metabolism in ApoE^{-/-} mice [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2023, 34(2): 269-272.
- [13] 庞雅芬,黄明,李琳,等. 丹蒾片降低db/db小鼠肝脏脂肪生成及炎症反应改善胰岛素抵抗的作用研究[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(12):3320-3327.
PANG Y F, HUANG M, LI L, et al. Effect of Danlou tablets on alleviating hepatic adipogenesis, inflammatory response, and insulin resistance in db/db mice [J]. Chin J Chin Mater Med, 2022, 47(12): 3320-3327.
- [14] LIU M, WANG Q, SHEN J, et al. Circbank: A comprehensive database for circRNA with standard nomenclature [J]. RNA Biol, 2019, 16(7): 899-905.
- [15] 吴亚柳,马玉,于曼丽,等. 基于HepG2细胞胰岛素抵抗模型探讨miR-7-5p对Itch基因的靶向作用[J]. 中国病理生理杂志, 2018, 34(7):1317-1322, 1328.
WU Y L, MA Y, YU M L, et al. Targeting effect of miR-7-5p on itch gene based on an insulin resistance model in HepG2 cells [J]. Chin J Pathophysiol, 2018, 34(7): 1317-1322, 1328.
- [16] 万俊阳,宋囡,张明香,等. 绞股蓝皂苷调控铁死亡途径对ApoE^{-/-}小鼠肝脏脂质沉积的影响及机制研究[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2022, 24(3): 1158-1165.
WAN J Y, SONG N, ZHANG M X, et al. Effects of gypenosides regulating iron death pathway on lipid deposition in the liver of Apo E^{-/-} mice and its mechanism [J]. Mod Tradit Chin Med Mater Med World Sci Technol, 2022, 24(3): 1158-1165.
- [17] 陈怡琴,杨娇,裴文丽,等. 黑逍遥散对APP/PS1小鼠认知障碍及其肠道菌群的调节作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2025, 31(19):191-201.
CHEN Y Q, YANG J, PEI W L, et al. Regulatory effect of Hei Xiaoyao San on cognitive impairment and gut microbiota in APP/PS1 mice [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2025, 31(19): 191-201.
- [18] ZHU J, SONG N, WANG J X, et al. Mechanism of action of Danlou tablets affecting MAFLD via KEAP1-mediated oxeiptosis [J]. J Ethnopharmacol, 2025, 344: 119521.
- [19] 邓婕,杨志军,杨秀娟,等. 基于痰瘀相关理论探析痰瘀同治干预高脂血症作用机制的研究进展[J]. 中国中医基础医学杂志, 2025, 31(4): 721-726.
DENG J, YANG Z J, YANG X J, et al. Research progress on the mechanism of phlegm and stasis co-treatment in intervening with hyperlipidemia based on the theory of phlegm-stasis correlation [J]. J Basic Chin Med, 2025, 31(4): 721-726.

- [20] 杨光,周思远,王阶,等. 基于转录组学与网络药理学整合策略分析稳定性冠心病痰瘀互结证的标志物靶点[J]. 中国中药杂志,2023,48(7):1908-1915.
YANG G, ZHOU S Y, WANG J, et al. Analysis of biomarker targets for phlegm and blood stasis syndrome in stable coronary heart disease based on an integrated strategy of transcriptomics and network pharmacology [J]. Chin J Chin Mater Med, 2023, 48(7): 1908-1915.
- [21] 付长龙,林艳铭,兰书洁,等. 透骨消痛胶囊调控 Malat1 与 miR-16-5p 的 ceRNA 减轻骨关节炎软骨细胞“胆固醇-铁”代谢紊乱的机制[J]. 中国中药杂志,2025,doi: 10.13422/j.cnki.syfjx.20250905.
FU C L, LIN Y M, LAN S J, et al. Mechanism of Tougu Xiaotong capsule in alleviating "cholesterol-iron" metabolism disorder in osteoarthritis chondrocytes by regulating the ceRNA of Malat1 and miR-16-5p [J]. Chin J Chin Mater Med, 2025, doi: 10.13422/j.cnki.syfjx.20250905.
- [22] WU X, SUI Z, ZHANG H, et al. Integrated analysis of lncRNA-mediated ceRNA network in lung adenocarcinoma [J]. Front Oncol, 2020, 15(10):554759.
- [23] 周健飞,陈泰起,龙尚丽,等. 血清 IL-17A、miR-342-3p 与 2 型糖尿病肾病严重程度及预后的关系[J]. 分子诊断与治疗杂志,2023,15(5):737-741.
ZHOU J F, CHEN T Q, LONG S L, et al. Relationship between serum IL-17A, miR-342-3p and the severity and prognosis of type 2 diabetic nephropathy [J]. J Mol Diagn Ther, 2023, 15(5): 737-741.
- [24] JUNG Y Y, KIM K C, PARK M H, et al. Atherosclerosis is exacerbated by chitinase-3-like-1 in amyloid precursor protein transgenic mice [J]. Theranostics, 2018, 8(3): 749-766.
- [25] HU T, LI D, FAN T, ZHAO X, et al. CircCRIM1/microRNA-141-3p/thioredoxin-binding protein axis mediates neuronal apoptosis after cerebral ischemia-reperfusion [J]. Environ Toxicol, 2023, 38(12):2845-2856.
- [26] LEOW S C, POSCHMANN J, TOO P G, et al. The transcription factor SOX6 contributes to the developmental origins of obesity by promoting adipogenesis [J]. Development, 2016, 143(6):950-961.
- [27] 王磊,潘蕴,万利花,等. 基于 PI3K/Akt 通路探讨黄连知母汤治疗 2 型糖尿病的作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2025,31(21):168-177.
WANG L, PAN Y, WAN L H, et al. Exploration of the mechanism of Huanglian Zhimu decoction in treating type 2 diabetes mellitus based on the PI3K/Akt pathway [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2025, 31(21): 168-177.
- [28] 刘雪梅,王伯初,邓超,等. 二代抗精神病药物介导脂代谢紊乱的机制研究进展[J]. 中国药理学杂志, 2016, 51(3): 172-176.
LIU X M, WANG B C, DENG C, et al. Research progress on the mechanisms of lipid metabolism disorders mediated by second-generation antipsychotic drugs [J]. Chin Pharm J, 2016, 51(3): 172-176.
- [29] 李青松,李晓晨,王晓萌,等. 中医药干预 PPAR γ 信号通路改善高脂血症的研究进展[J]. 中华中医药杂志, 2025, 40(4):1851-1855.
LI Q S, LI X C, WANG X M, et al. Research progress on the intervention of traditional Chinese medicine in hyperlipidemia by regulating the PPAR γ signaling pathway [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2025, 40(4): 1851-1855.
- [30] 陈昕,李小雪,俞佳利,等. 益气活血化痰方对 ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化的影响[J]. 中成药, 2022, 44(4):1086-1092.
CHEN X, LI X X, YU J L, et al. Effects of Yiqi Huoxue Huatan formula on atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2022, 44(4): 1086-1092.
- [31] 全德森,柯尊丽,张远哲,等. 六味降脂汤对 NAFLD 大鼠肝脏脂肪酸代谢及 LXR α -SREBP-1c-FAS 信号通路的影响[J]. 中成药, 2023, 45(2):406-414.
QUAN D S, KE Z L, ZHANG Y Z, et al. Effects of Liuwei Jiangzhi decoction on hepatic fatty acid metabolism and the LXR α -SREBP-1c-FAS signaling pathway in NAFLD rats [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2023, 45(2): 406-414.

[责任编辑 顾雪竹]