

· 论著 · 一次研究 ·

积雪草苷调节miR-29b-3p/FoxO3轴减轻非酒精性脂肪性肝病大鼠肝损伤的影响



谭 洁, 刘 蒙, 田 霞, 韩 峥, 朱庆曦, 占 婷, 陈明涛, 陈爱方, 黄 敏

武汉市第三医院消化内科 (武汉 430060)

【摘要】目的 探究积雪草苷 (ASI) 对大鼠非酒精性脂肪性肝病 (NAFLD) 肝损伤的作用以及对 miR-29b-3p/FoxO3 轴的影响。**方法** 将大鼠随机分为对照组 (Control 组)、模型组 (Model 组)、低剂量 ASI 组 (ASI-L 组)、高剂量 ASI 组 (ASI-H 组)、高剂量 ASI+ 空白质粒组 (ASI-H+Vector 组) 和高剂量 ASI+miR-29b-3p 过表达组 (ASI-H+OV-miR-29b-3p 组), 每组 12 只大鼠。分析大鼠肝指数变化, HE 染色法观察大鼠肝组织病理学变化, 生化分析仪检测大鼠脂代谢指标和反映肝实质损害的指标, ELISA 试剂盒检测氧化应激及炎症细胞因子水平, RT-qPCR 法检测大鼠肝组织中 miR-29b-3p 和 FoxO3 mRNA 水平, Western blot 法检测大鼠肝组织中 FoxO3 和凋亡相关蛋白的表达水平, 双荧光素酶活性验证 miR-29b-3p 与 FoxO3 之间的靶向关系。**结果** 相较于 Control 组, Model 组大鼠肝组织病理损伤程度严重、肝细胞破裂、大量炎性细胞浸润, 肝重量和肝指数增加, 胆固醇 (TC)、甘油三酯 (TG)、谷草转氨酶 (AST)、丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 及丙二醛 (MDA)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6 (IL-6) 水平均显著上升, 超氧化物歧化酶 (SOD) 和过氧化氢酶 (CAT) 活性显著降低, 肝组织中 miR-29b-3p 表达水平和 Caspase 3 蛋白表达水平明显上升, FoxO3 mRNA 表达水平和 FoxO3、Bcl-2 蛋白表达水平均下降; 与 Model 组相比, 随着 ASI 剂量的加大, ASI-L 组、ASI-H 组大鼠肝组织病理损伤程度减轻、肝细胞破裂减少、炎性细胞浸润程度减轻, 肝重量和肝指数逐渐降低, 血清中 TC、TG、AST 和 ALT 水平以及 MDA、TNF- α 、IL-6 水平逐渐下降, SOD 和 CAT 活性逐渐升高, 肝组织中 miR-29b-3p 表达水平及 Caspase 3 蛋白表达量逐渐下降, FoxO3 mRNA 表达水平以及 FoxO3 和 Bcl-2 蛋白表达水平逐渐升高; 而 miR-29b-3p 过表达逆转了 ASI 对 NAFLD 大鼠肝组织的保护作用; 双荧光素酶活性验证了 miR-29b-3p 与 FoxO3 之间存在靶向关系。**结论** ASI 能够增强 NAFLD 大鼠的抗氧化功能、调节脂代谢、减轻机体炎症反应和肝组织病理, 其作用机制可能与下调 miR-29b-3p, 上调 FoxO3 的表达有关。

【关键词】 积雪草苷; 非酒精性脂肪性肝病; 肝损伤; 微小 RNA-29b-3p/ 叉头框蛋白 O3 轴

【中图分类号】 R 575.5 **【文献标识码】** A

Effect of regulating miR-29b-3p/FoxO3 axis by asiaticoside on alleviating liver injury in rats with non-alcoholic fatty liver disease

TAN Jie, LIU Meng, TIAN Xia, HAN Zheng, ZHU Qingxi, ZHAN Ting, CHEN Mingtao, CHEN Aifang, HUANG Min

Department of Gastroenterology, Wuhan Third Hospital, Wuhan 430060, China

Corresponding author: LIU Meng, Email: liumengmike@yeah.net

DOI: 10.12173/j.issn.1004-5511.202501068

通信作者: 刘蒙, 博士, 副主任医师, Email: liumengmike@yeah.net

yxxz.whuznhmedj.com

【Abstract】Objective To investigate the effect of Asiaticoside (ASI) on liver injury in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and its impacts on the microRNA-29b-3p (miR-29b-3p)/forkhead box protein O3 (FoxO3) axis. **Methods** Rats were stochastically grouped into a Control group, a Model group, a low-dose ASI-L group (ASI-L), a high-dose ASI-H group (ASI-H), a high-dose ASI+blank vector group (ASI-H+Vector), and a high-dose ASI+miR-29b-3p over expression group (ASI-H+OV-miR-29b-3p), with 12 rats in each group. The changes in rat liver index were analyzed. HE staining method was applied to observe the pathological changes of liver tissue. Biochemical analyzer was used to detect lipid metabolism indicators and indicators reflecting liver parenchymal damage in rats. The levels of oxidative stress and inflammatory cytokines were detected by the ELISA method. The RT-qPCR method was applied to detect the mRNA levels of miR-29b-3p and FoxO3 in rat liver tissue. The Western blot method was applied to detect the expression levels of FoxO3 and apoptosis-related proteins in rat liver tissue. Dual luciferase activity was applied to validate the targeting relationship between miR-29b-3p and FoxO3. **Results** Compared with the Control group, rats in the Model group showed severe liver tissue damage, liver cell rupture, and extensive infiltration of inflammatory cells, the liver weight and liver index increased, the levels of TC, TG, AST, ALT, MDA, TNF- α , IL-6 obviously increased, the levels of SOD and CAT obviously reduced, the expression level of miR-29b-3p and expression level of Caspase 3 protein in liver tissue obviously increased, the expression level of FoxO3 mRNA and expression levels of FoxO3, Bcl-2 proteins decreased ($P<0.05$). Compared with the model group, as the dose of ASI increased, the degree of liver tissue damage, liver cell rupture, and inflammatory cell infiltration of rats in the ASI-L and ASI-H groups decreased, the liver weight and liver index gradually decreased, the levels of TC, TG, AST, ALT, MDA, TNF- α , IL-6 in serum gradually decreased, the levels of SOD and CAT gradually increased, the expression level of miR-29b-3p and expression level of Caspase 3 protein in liver tissue gradually decreased, the expression level of FoxO3 mRNA and the expression levels of FoxO3 and Bcl-2 proteins gradually increased. miR-29b-3p overexpression reversed the improvement effect of ASI on liver tissue in NAFLD rats. Dual luciferase activity confirmed the targeting relationship between miR-29b-3p and FoxO3. **Conclusion** ASI can enhance the antioxidant function, regulate lipid metabolism, alleviate inflammation and liver tissue damage in NAFLD rats, which may be related to the down-regulation of miR-29b-3p and the up-regulation of FoxO3 expression.

【Keywords】 Asiaticoside; Non-alcoholic fatty liver disease; Liver injury; MicroRNA-29b-3p/forkhead box O3

非酒精性脂肪性肝病 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 是不饮酒或极少饮酒者肝脏脂肪长期积累而形成的一种慢性肝病, 临床表现为脂肪变性、血脂异常^[1]。NAFLD 患者病情中后期会发展为非酒精性肝炎和肝硬化, 大大增加了患肝癌的风险。脂肪堆积引起的脂肪变性或过度脂肪酸氧化会打破细胞内的代谢平衡, 引发线粒体破坏和大量活性氧的产生, 导致氧化应激并激活炎症因子, 最终通过诱导肝细胞凋亡等途径加重局部炎症, 导致 NAFLD 的发生^[2]。目前尚无治疗 NAFLD 的特效药物, 联合用药治疗是最常用的方法, 虽起到一定的疗效, 但长期服用会对肝和肾等器官产生毒性作用, 影响机体代谢功能^[3]。

因此寻求无毒且高效的药物是应对 NAFLD 晚期恶化、减少肝移植的重要举措。积雪草苷 (asiaticoside, ASI) 已被发现在抗氧化、抑制细胞凋亡和减轻脑缺血导致的认知障碍等方面发挥重要作用^[4-5], 并且可以通过调节 Notch 信号通路抑制肝星状细胞的活化进而阻断肝纤维化的进展, 减轻肝损伤^[6]。既往研究发现患有严重 NAFLD 患者的肝脏中许多微小 RNA (miRNAs) 表达失调, 其中 miR-29b-3p 在代谢性疾病、胰岛素抵抗和 II 型糖尿病的各种组织和细胞中显著增加^[7-8]。本研究使用 ENCORI 数据库预测 miR-29b-3p 可能与叉头框蛋白 O3 (forkhead box O3, FoxO3) 存在互补结合位点。研究表明 FoxO3 对甘油三酯的合成以及肝脏

脂代谢具有一定的调节作用,提示 FoxO3 可能与 NAFLD 密切相关^[9]。杨仁国等^[10]指出下调 miR-29b-3p 通过靶向上调 FoxO3 可调节脂代谢、减轻炎症和氧化应激反应。因此 miR-29b-3p/FoxO3 轴可能成为治疗 NAFLD 的重要调控通路。目前,尚无 ASI 通过调控 miR-29b-3p/FoxO3 轴调节脂代谢的研究。本研究通过构建 NAFLD 模型大鼠,旨在探究 ASI 对 NAFLD 大鼠肝损伤及 miR-29b-3p/FoxO3 通路的影响,以期治疗 NAFLD 提供可靠的理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

10 周龄雄性 Wistar 大鼠 (260~300 g) 购自中国科学院 [许可证号: SCXK (京) 2021-0012]。大鼠单独饲养于通风鼠笼中 (湿度 $60\% \pm 5\%$, 温度 $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 12 h 明暗循环)。向所有大鼠提供基础日粮,自由饮水和活动。实验前进行 7 d 的适应性饲养。本研究经武汉市第三医院实验动物伦理委员会审核批准 (批号: 武三医实伦 SY2022-054)。

1.2 药品与试剂

ASI (CAS 号: 125265-68-1, 纯度: $\geq 98\%$) 购自湖北萃园生物科技有限公司; 反转录试剂购自 Takara 公司; HE 染色试剂盒 (货号: LZ-01X9135) 购自上海联祖生物科技有限公司; 丙二醛 (MDA, 货号: 5989)、超氧化物歧化酶 (SOD, 货号: 5966)、过氧化氢酶 (CAT, 货号: 5776) ELISA 试剂盒购自上海研生实业有限公司; 兔抗 FoxO3 单克隆抗体 (货号: AF609)、兔抗 Bcl-2 多克隆抗体 (货号: AB112)、兔抗 Caspase 3 多克隆抗体 (货号: AC030)、兔抗 β -actin 多克隆抗体 (货号: AF5003) 购自上海碧云天生物技术有限公司; 引物序列由北京擎科生物科技有限公司合成; miR-29b-3p 过表达及阴性对照质粒由和元生物技术 (上海) 股份有限公司合成。

1.3 实验方法

1.3.1 动物造模

经过 7 d 的适应性喂养后,参考相关文献^[11]建立 NAFLD 模型大鼠。高脂饲料 (65.55% 基础日粮、20.00% 猪油、10.00% 蔗糖、4.00% 胆固醇、0.25% 胆酸盐、0.20% 甲基硫脲嘧啶) 持续饲喂 5 周。大鼠出现体重增加、肝指数上升、肝组织

发生病理变化、血清脂质代谢指标异常,则视为造模成功^[12]。

1.3.2 分组及给药

将 72 只大鼠随机分为 6 组,每组 12 只。
①对照组 (Control), 喂食基础日粮、灌胃生理盐水; ②模型组 (Model), 构建 NAFLD 模型、灌胃生理盐水; ③ ASI 低剂量组 (ASI-L), 构建 NAFLD 模型、灌胃 15 mg/kg 的 ASI; ④ ASI 高剂量组 (ASI-H), 构建 NAFLD 模型、灌胃 30 mg/kg 的 ASI; ⑤ 高剂量 ASI+ 空白质粒组 (ASI-H+Vector), 构建 NAFLD 模型、灌胃 30 mg/kg 的 ASI, 尾静脉注射 100 μL 空白质粒; ⑥ 高剂量 ASI+miR-29b-3p 过表达质粒组 (ASI-H+OV-miR-29b-3p), 构建 NAFLD 模型、灌胃 30 mg/kg 的 ASI, 尾静脉注射 100 μL miR-29b-3p 过表达质粒。ASI 和生理盐水的灌胃剂量参考相关文献^[13], 每日一次; 质粒每 3 d 注射一次,连续 4 周。

1.4 指标检测及方法

1.4.1 肝指数检测

取样前一天对所有大鼠禁食不禁水,采样当天对各组大鼠称重并进行腹主动脉取血; 安乐死后分离大鼠肝脏并称重。肝脏指数表示为肝脏质量占体重的百分比。

1.4.2 血清炎症细胞因子和氧化应激水平检测

对大鼠进行腹主动脉采血,离心取上清。一部分使用 Selectra ProM 全自动生化分析仪检测胆固醇 (TC)、甘油三酯 (TG)、谷草转氨酶 (AST) 和丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 水平。另取部分血清,先按照 ELISA 试剂盒的说明稀释标准液,经加样、孵育、洗涤,加生物素化检测抗体、孵育、洗涤,加 HRP 标记亲和素、孵育、洗涤,显色、终止反应后于酶标仪上读数。根据标准曲线计算 MDA、SOD、CAT、TNF- α 、IL-6 水平。

1.4.3 HE 染色

取大鼠肝脏组织,一部分在 10% 福尔马林溶液中固定 24 h,乙醇梯度脱水、石蜡包埋、切片、HE 染色,在光学显微镜下观察肝组织形态; 另一部分组织于 -80°C 下冷冻保存。

1.4.4 RT-qPCR

取冻存肝组织 (每组 6 只), Trizol 法提取总 RNA 并测定浓度,定量后分别进行 RNA 的反

转录和实时荧光定量 PCR 反应。通过熔融曲线图确认引物是否特异。使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算目的基因的相对表达水平。*miR-29b-3p* 的上游引物: 5'-AGTTGGGTGGAGGCTCTCC-3', 下游引物: 5'-GCGACGAGCAAAAAGCTTGT-3'; *FoxO3* 的上游引物: 5'-ATGGCAGAGGCACCAGCC-3', 下游引物: 5'-CAAAGCTGGCTACCAGGCTGA-3'; *GAPDH* 的上游引物: 5'-GGTGAAGGTCGGAGTCAACG-3', 下游引物: 5'-CAAAGTTGTCATGGATGACC-3'。

1.4.5 Western blot

取冻存肝组织(每组 6 只), 加入蛋白裂解液充分反应, 提取并定量总蛋白(BCA 法)。蛋白经变性、SDS-PAGE 电泳分离、转膜、封闭后, 膜分别与 *FoxO3* (1:1 000)、*Bcl-2* (1:500)、*Caspase 3* (1:1 000)、 β -actin (1:1 000) 一抗在 4℃ 下孵育过夜, TBST 洗膜后添加 HRP 标记的山羊抗兔二抗 IgG (1:1 000), 室温孵育 1 h。可视化处理后 Image J 软件进行灰度分析。

1.4.6 miR-29b-3p 和 FoxO3 靶向关系验证

ENCORI 数据库预测 *miR-29b-3p* 和 *FoxO3* 之间存在的结合位点, 分别构建野生型质粒 *FoxO3*-WT 和突变型质粒 *FoxO3*-MUT, 将 *OV-miR-29b-3p*、*miR-NC* 分别与构建的野生型或突变型质粒共转染到人胚肾细胞 HEK293T (货号: 62494, 诺安基因科技有限公司) 中培养 48 h, 检测荧光酶活性。

1.5 统计学分析

使用 SPSS 24.0 软件对实验数据进行统计学分析, 并用 GraphPad Prism 9 软件绘制相关图片。经 Shapiro-Wilk 检验, 计量资料均符合正态分布, 以均数和标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。两组间比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析和 SNK-*q* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠肝指数变化

相较于 Control 组, Model 组大鼠肝质量和肝指数显著升高 ($P < 0.05$); 相较于 Model 组, ASI-L 组、ASI-H 组大鼠肝质量和肝指数显著降低 ($P < 0.05$); 相较于 ASI-H+Vector 组, ASI-H+OV-miR-29b-3p 组大鼠肝质量和肝指数显著升高 ($P < 0.05$), 见图 1。

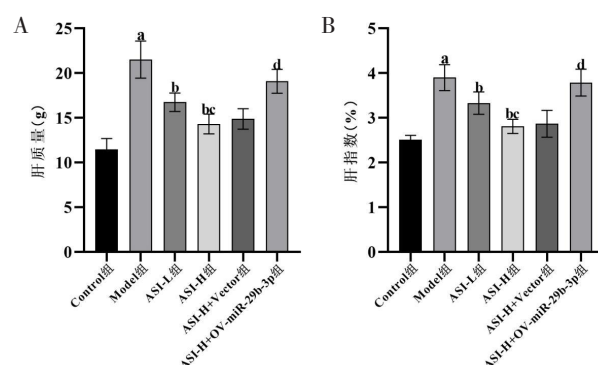


图1 各组大鼠肝质量及肝指数比较 ($n=12$)

Figure 1. Comparison of liver weight and liver index in different groups of rats ($n=12$)

注: A. 各组大鼠肝质量比较; B. 各组大鼠肝指数比较; ^a与 Control 组比较, $P < 0.05$; ^b与 Model 组比较, $P < 0.05$; ^c与 ASI-L 组比较, $P < 0.05$; ^d与 ASI-H+Vector 组比较, $P < 0.05$ 。

2.2 大鼠血清生化指标水平变化

相较于 Control 组, Model 组大鼠脂代谢指标 (TC、TG) 水平和反映肝实质损害指标 (AST、ALT) 均明显升高 ($P < 0.05$); 相较于 Model 组, ASI-L 组、ASI-H 组大鼠 TC、TG 水平和 AST、ALT 水平均显著降低, 且随着 ASI 剂量增加, 下降幅度加大 ($P < 0.05$); 相较于 ASI-H+Vector 组, ASI-H+OV-miR-29b-3p 组大鼠血清中以上各指标均显著升高 ($P < 0.05$), 见图 2。

2.3 大鼠血清氧化应激及炎症因子水平变化

相较于 Control 组, Model 组大鼠血清中 MDA、IL-6 和 TNF- α 水平明显增加, SOD、CAT 活性明显下降 ($P < 0.05$); 相较于 Model 组, 随着 ASI 剂量的增大, ASI-L 组、ASI-H 组大鼠血清中 MDA、IL-6 和 TNF- α 水平显著降低, SOD、CAT 活性显著升高 ($P < 0.05$); 相较于 ASI-H+Vector 组, ASI-H+OV-miR-29b-3p 组大鼠血清中 MDA、IL-6 和 TNF- α 水平明显增加, SOD、CAT 活性明显下降 ($P < 0.05$), 见图 3。

2.4 大鼠肝组织病理变化

Control 组肝细胞分布均匀, 胞质染色均匀, 未见脂肪变性和脂肪空泡。Model 组视野下可见常规病理脂肪空泡, 肝脂肪变性较严重, 炎症细胞浸润增多。随着 ASI 剂量的增加, ASI-L、ASI-H 组大鼠肝细胞内脂肪空泡数明显减少, 肝脂肪变性程度及炎症细胞浸润程度减轻。ASI-H+OV-miR-29b-3p 组相较于 ASI-H+Vector 组大鼠肝组织病理损伤更重, 见图 4。

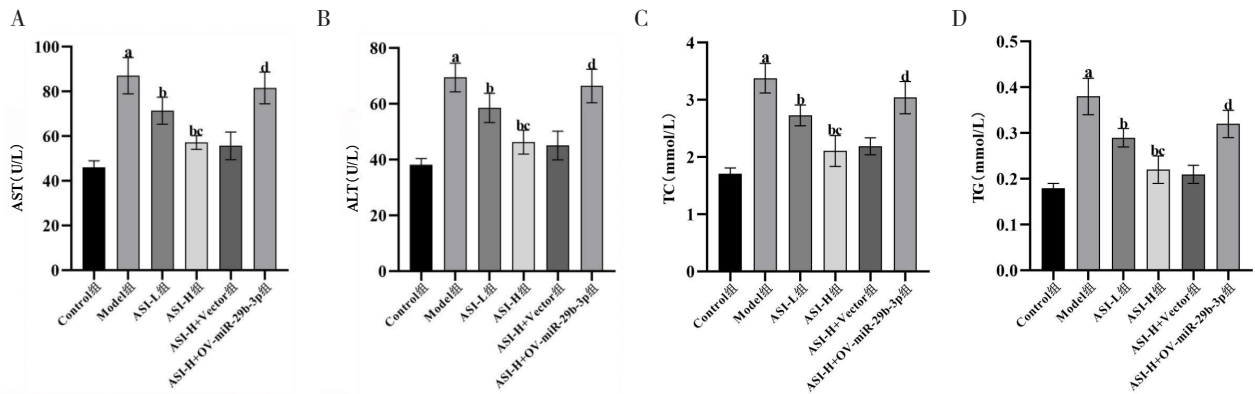


图2 各组大鼠血清生化指标水平比较 (n=12)

Figure 2. Comparison of serum biochemical indexes in different groups of rats (n=12)

注：A.各组大鼠血清AST含量比较；B.各组大鼠血清ALT含量比较；C.各组大鼠血清TC含量比较；D.各组大鼠血清TG含量比较；^a与Control组比较， $P < 0.05$ ；^b与Model组比较， $P < 0.05$ ；^c与ASI-L组比较， $P < 0.05$ ；^d与ASI-H+Vector组比较， $P < 0.05$ 。

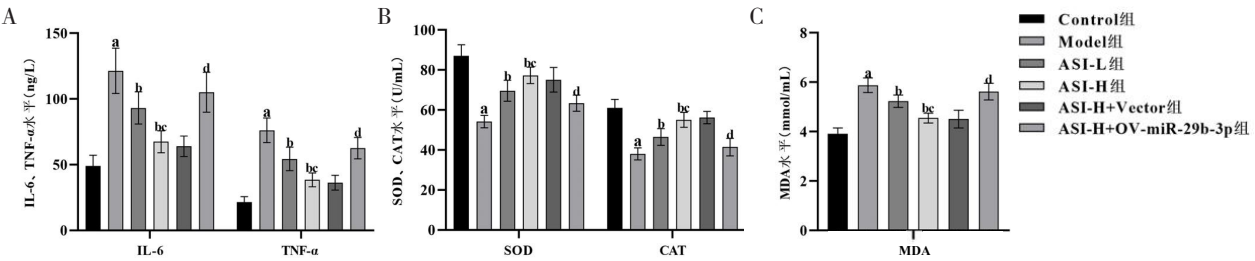


图3 各组大鼠血清氧化应激及炎症因子水平比较 (n=12)

Figure 3. Comparison of serum levels of oxidative stress and inflammatory factors in different groups of rats (n=12)

注：A.各组大鼠血清IL-6和TNF-α水平比较；B.各组大鼠血清SOD、CAT活性比较；C.各组大鼠血清MDA含量比较；^a与Control组比较， $P < 0.05$ ；^b与Model组比较， $P < 0.05$ ；^c与ASI-L组比较， $P < 0.05$ ；^d与ASI-H+Vector组比较， $P < 0.05$ 。

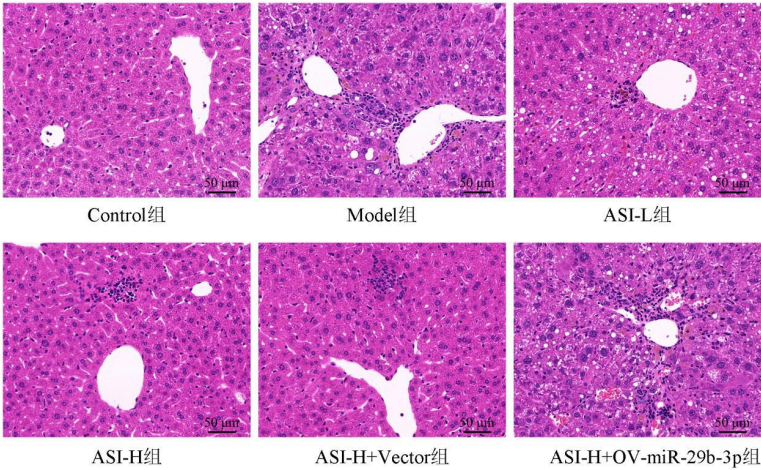


图4 各组大鼠肝组织HE染色 (n=12)

Figure 4. HE staining of liver tissue in different groups of rats (n=12)

注：标尺.50 μm；放大比例.×200。

2.5 大鼠肝组织中miR-29b-3p和FoxO3 mRNA表达水平

相较于Control组，Model组大鼠肝组织中miR-29b-3p表达升高，FoxO3 mRNA降低 ($P < 0.05$)，miR-29b-3p与FoxO3具有负相关性 ($r =$

-0.751 , $P < 0.05$)；相较于Model组，随着ASI剂量的增加，ASI-L组、ASI-H组大鼠肝组织中miR-29b-3p表达水平逐渐降低，FoxO3 mRNA表达水平逐渐升高 ($P < 0.05$)；相较于ASI-H+Vector组，ASI-H+OV-miR-29b-3p组miR-

29b-3p 表达水平显著升高, FoxO3 mRNA 表达水平明显降低 ($P < 0.05$), 见图 5。

2.6 大鼠肝组织中FoxO3及凋亡相关蛋白表达变化

相较于 Control 组, Model 组大鼠肝组织中 FoxO3 和 Bcl-2 蛋白表达水平均显著降低, Caspase 3 蛋白表达量明显升高 ($P < 0.05$); 相较于 Model 组, 随着 ASI 剂量的增加, ASI-L 组、ASI-H 组大鼠肝组织中 FoxO3 和 Bcl-2 蛋白表达水平均显著升高, Caspase 3 蛋白表达量明显降低 ($P < 0.05$); 相较于 ASI-H+Vector 组, ASI-H+OV-miR-29b-3p 组大鼠肝组织中 FoxO3 和 Bcl-2 蛋白表达水平明显降低、Caspase 3 蛋白表

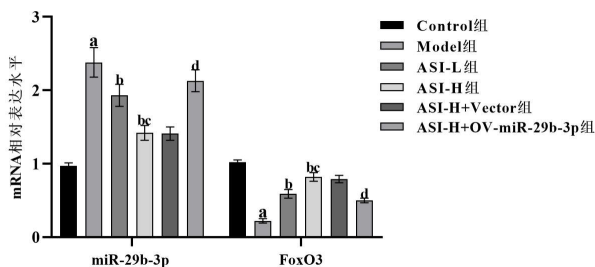


图5 各组大鼠肝组织中miR-29b-3p和FoxO3 mRNA 表达水平比较 (n=6)

Figure 5. Comparison of mRNA expression levels of miR-29b-3p and FoxO3 in liver tissues of rats in different groups (n=6)

注: ^a与Control组比较, $P < 0.05$; ^b与Model组比较, $P < 0.05$; ^c与ASI-L组比较, $P < 0.05$; ^d与ASI-H+Vector组比较, $P < 0.05$ 。

达量明显升高 ($P < 0.05$), 见图 6。

2.7 靶向关系验证

miR-29b-3p 和 FoxO3 存在靶向结合位点。FoxO3-WT+OV-miR-29b-3p 组细胞相对荧光素酶活性显著下降 ($P < 0.05$), 见图 7 和表 1。

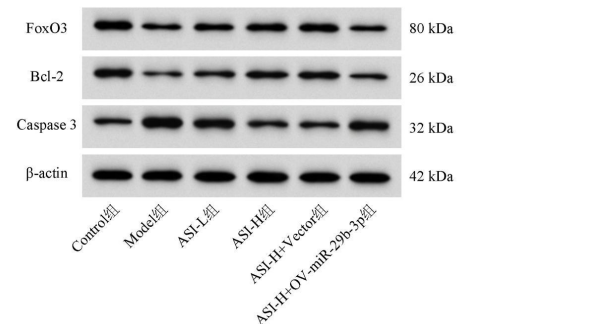


图6 各组大鼠肝组织中FoxO3和凋亡蛋白表达水平及定量分析 (n=6)

Figure 6. Comparison of FoxO3 and apoptotic protein expression levels in liver tissues of rats in different groups (n=6)

注: ^a与Control组比较, $P < 0.05$; ^b与Model组比较, $P < 0.05$; ^c与ASI-L组比较, $P < 0.05$; ^d与ASI-H+Vector组比较, $P < 0.05$ 。

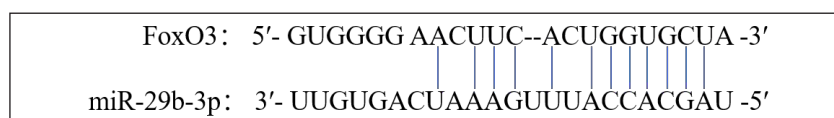


图7 miR-29b-3p和FoxO3的互补位点

Figure 7. Complementary sites of miR-29b-3p and FoxO3

表1 miR-29b-3p和FoxO3的靶向关系验证
Table 1. Verification of the targeting relationship between miR-29b-3p and FoxO3

组别	FoxO3-WT	FoxO3-MUT
miR-NC组	1.02 ± 0.02	1.02 ± 0.01
OV-miR-29b-3p组	0.53 ± 0.04	1.01 ± 0.03
t值	26.838	0.775
P值	0.001	0.457

3 讨论

NAFLD 是一种病理机制复杂的慢性疾病。研究表明, NAFLD 患者肝组织存在明显的炎症反应

与氧化应激损伤, 但其具体病理机制尚未完全阐明。在临床治疗中, 该病多采用药物联合干预的方案, 然而由于疗效欠佳且机体易产生耐药性, 不仅造成了沉重的经济负担, 还严重影响患者及其家庭的生活质量。因此, 积极探寻经济安全、无副作用的药物, 对患者个体及整个社会而言具有重要意义。ASI 是一种来源于积雪草的化合物, 具有抗肿瘤、调节机体能量代谢等广泛生理活性^[14-15]。Wei 等^[16]研究指出 ASI 可通过降低机体炎症和氧化应激反应缓解 NAFLD 进展, 但目前关于 ASI 改善 NAFLD 的具体作用机制还不清楚。

肝脏中脂质积累引起的脂代谢紊乱是导致

NAFLD 的重要诱因。血清中 AST、ALT 是反映肝实质损害的重要指标。其中 ALT 最为敏感, 报告指出即便肝细胞少量坏死, ALT 的含量也会成倍增加^[17]。TC、TG 水平是临床上检测机体脂代谢异常的常用参考指标, 其水平升高时可诱发心血管疾病^[18]。本研究结果显示 NAFLD 大鼠肝脏质量和肝指数、血清中 TC、TG、AST、ALT 水平均显著提高, 且肝组织病理程度严重, 提示 NAFLD 建模成功。经 ASI 干预治疗后上述指标均有明显好转, 表明 ASI 可调节脂代谢、改善肝脂肪变性和肝损伤。

既往研究表明 ASI 改善疾病的途径可通过调节多种信号轴, 如 ASI 通过激活 AMPK/Nrf2 通路发挥对糖尿病心肌病心脏的保护作用^[19]; ASI 通过调节 miR-635/HMGA1 轴诱导内质网应激, 发挥抗癌功效^[20]。miRNAs 在多种疾病中发挥重要作用, 相关研究通过微阵列分析认为 miRNAs 可能参与 NAFLD 的发病机制, 其中 miR-29b-3p 在 NAFLD 患者中异常高表达^[7]。目前 miR-29b-3p 已被发现在调节脂代谢和肝纤维化方面发挥重要作用^[10]。miR-29b-3p 与多种核苷酸的 3'-非翻译区结合负调节相关功能基因的表达, 从而发挥生物学功能。本研究预测发现 FoxO3 与 miR-29b-3p 存在互补位点, 且通过双荧光素酶报告基因实验进行了验证。FoxO3 参与 NAFLD 发展中的脂质代谢、炎症反应和纤维化^[21], 其含量提高可增强抗氧化酶活性, 减轻 NAFLD 机体炎症和氧化应激损伤^[22]。肝脏中脂质的积累会破坏氧化还原系统的平衡, 导致氧化应激反应加剧、细胞凋亡^[2]。目前已有研究表明 miR-122-5p 通过靶向 FoxO3 改善饮食诱导的 NAFLD 炎症和氧化应激损伤^[23]。但关于 miR-29b-3p 靶向 FoxO3 在 NAFLD 中还未有研究, 因此 miR-29b-3p/FoxO3 轴可能成为治疗 NAFLD 的关键通路。本研究结果显示 NAFLD 大鼠机体氧化应激和炎症反应加剧、肝组织 FoxO3 蛋白表达下调、miR-29b-3p 水平及 Caspase 3 蛋白表达上调; 而随着 ASI 治疗后, 大鼠氧化应激和炎症反应减轻, 肝组织 miR-29b-3p 水平逐渐下降、FoxO3 及 Bcl 2 蛋白表达量逐渐升高, 提示 ASI 可下调 miR-29b-3p 的表达进而上调 FoxO3 mRNA 的表达, 发挥抗氧化、抗炎、改善肝损伤的功效。本研究在高剂量 ASI 干预的同时尾静脉注射 miR-29b-3p 过表达质

粒, 结果显示由于 miR-29b-3p 的高表达, FoxO3 mRNA 表达水平下调, ASI 对 NAFLD 大鼠肝脏氧化应激、炎症反应及脂代谢的改善作用被逆转, 进一步证明 ASI 对 NAFLD 肝保护的作用与 miR-29b-3p/FoxO3 轴有关。ASI 已被广泛用于治疗多种疾病, 如体外已用于人角膜上细胞的损伤修复治疗^[24]。奥贝胆酸等传统药物治疗 NAFLD 给患者带来瘙痒、加速肝功能衰竭等不良反应^[25], 而目前 ASI 用于治疗 NAFLD 大鼠无不良反应, 可能具有临床治疗前景。

综上, ASI 可增强 NAFLD 大鼠抗氧化和抗炎能力、调节脂代谢、改善肝组织病理, 其作用机制可能与 miR-29b-3p/FoxO3 轴有关。本研究仍存在不足之处: 未明确 ASI 治疗 NAFLD 大鼠的最佳药物干预剂量, 且关于 ASI 是通过直接或间接调节 miR-29b-3p 的表达也有待进一步研究。

伦理声明: 本研究经武汉市第三医院实验动物伦理委员会审核批准 (批号: 武三医实伦SY2022-054)

作者贡献: 实验操作: 占婷、陈明涛、陈爱方、黄敏; 数据采集: 田霞; 数据分析: 韩峥、朱庆曦; 实验设计及论文撰写: 谭洁; 论文指导: 刘蒙
数据获取: 本研究中使用和 (或) 分析的数据可联系通信作者获取

利益冲突声明: 无

致谢: 不适用

参考文献

- 1 Rong L, Zou J, Ran W, et al. Advancements in the treatment of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2023, 13(1): 1-18. DOI: [10.3389/fendo.2022.1087260](https://doi.org/10.3389/fendo.2022.1087260).
- 2 Guo X, Yin X, Liu Z, et al. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) pathogenesis and natural products for prevention and treatment[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(24): 15489-15506. DOI: [10.3390/ijms232415489](https://doi.org/10.3390/ijms232415489).
- 3 Raza S, Rajak S, Upadhyay A, et al. Current treatment paradigms and emerging therapies for NAFLD/NASH[J]. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2021, 26(2): 206-237. DOI: [10.2741/4892](https://doi.org/10.2741/4892).
- 4 Fan L, Li X, Liu T. Asiaticoside inhibits neuronal apoptosis and promotes functional recovery after spinal cord injury in rats[J]. *J Mol Neurosci*, 2020, 70(12): 1988-1996. DOI: [10.1007/s12031-020-01601-z](https://doi.org/10.1007/s12031-020-01601-z).
- 5 Guo M, Xu J, Wang S, et al. Asiaticoside reduces autophagy and improves memory in a rat model of dementia through mTOR

- signaling pathway regulation[J]. *Mol Med Rep*, 2021, 24(3): 645–656. DOI: [10.3892/mmr.2021.12284](#).
- 6 Xiao X, Zhang Q. Asiaticoside conveys an antifibrotic effect by inhibiting activation of hepatic stellate cells via the Jagged-1/Notch-1 pathway[J]. *J Nat Med*, 2023, 77(1): 128–136. DOI: [10.1007/s11418-022-01653-y](#).
- 7 Nie J, Li CP, Li JH, et al. Analysis of nonalcoholic fatty liver disease microRNA expression spectra in rat liver tissues[J]. *Mol Med Rep*, 2018, 18(3): 2669–2680. DOI: [10.3892/mmr.2018.9268](#).
- 8 Dalgaard LT, Sørensen AE, Hardikar AA, et al. The microRNA-29 family: role in metabolism and metabolic disease[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2022, 323(2): C367–C377. DOI: [10.1152/ajpcell.00051.2022](#).
- 9 Wang L, Zhu X, Sun X, et al. FoxO3 regulates hepatic triglyceride metabolism via modulation of the expression of sterol regulatory-element binding protein 1c[J]. *Lipids Health Dis*, 2019, 18(1): 197–208. DOI: [10.1186/s12944-019-1132-2](#).
- 10 杨仁国, 罗婷婷, 贺微微. miR-29b-3p 靶向 FoxO3 基因改善非酒精性脂肪肝预后的初步研究 [J]. 重庆医科大学学报, 2022, 47(9): 1005–1011. [Yang RG, Luo TT, He WW. miR-29b-3p regulates lipid metabolism and fibrosis by targeting IGF-1 in non-alcoholic fatty liver disease[J]. *Journal of Chongqing Medical University*, 2022, 47(9): 1005–1011.] DOI: [10.3969/j.issn.1671-7856](#).
- 11 Wang S, Sheng F, Zou L, et al. Hyperoside attenuates non-alcoholic fatty liver disease in rats via cholesterol metabolism and bile acid metabolism[J]. *J Adv Res*, 2021, 34(1): 109–122. DOI: [10.1016/j.jare.2021.06.001](#).
- 12 孙红爽, 李鹏霖, 刘永双, 等. 大黄素对大鼠非酒精性脂肪肝及肝组织 11 β -羟基类固醇脱氢酶 1 表达的影响 [J]. 实验动物科学, 2022, 39(3): 22–26, 32. [Sun HS, Li PL, Liu YS, et al. Effects of emodin on the expression of 11 β -hydroxy steroid dehydrogenase 1 in nonalcoholic fatty liver and liver tissue of rats[J]. *Journal of Experimental Animal Science*, 2022, 39(3): 22–26, 32.] DOI: [10.3969/j.issn.1006-6179.2022.03.005](#).
- 13 王迎迎, 顾永政. 积雪草苷对代谢相关脂肪性肝病大鼠 Nrf2、ROS 通路表达的影响 [J]. 现代药物与临床, 2024, 39(4): 810–815. [Wang YY, Gu YZ. Effects of asiaticoside on the expression of Nrf2 and ROS pathways in rats with metabolism-related fatty liver disease[J]. *Modern Medicine and Clinic*, 2024, 39(4): 810–815.] DOI: [10.7501/j.issn.1674-5515.2024.04.002](#).
- 14 Liu X, Liu T, Yang K, et al. Antifatigue Effect of asiaticoside in mice by attenuating oxidative stress[J]. *Discov Med*, 2023, 35(176): 275–282. DOI: [10.24976/Discov.Med.202335176.28](#).
- 15 Ma Y, Wen J, Wang J, et al. Asiaticoside antagonizes proliferation and chemotherapeutic drug resistance in hepatocellular carcinoma (HCC) Cells[J]. *Med Sci Monit*, 2020, 26(1): 1–11. DOI: [10.12659/MSM.924435](#).
- 16 Wei Y, Zhang Y, Zhan B, et al. Asiaticoside alleviated NAFLD by activating Nrf2 and inhibiting the NF- κ B pathway[J]. *Phytomedicine*, 2025, 136(1): 1–12. DOI: [10.1016/j.phymed.2024.156317](#).
- 17 Tamber SS, Bansal P, Sharma S, et al. Biomarkers of liver diseases[J]. *Mol Biol Rep*, 2023, 50(9): 7815–7823. DOI: [10.1007/s11033-023-08666-0](#).
- 18 Yang K, Chen J, Zhang T, et al. Efficacy and safety of dietary polyphenol supplementation in the treatment of non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review and Meta-analysis[J]. *Front Immunol*, 2022, 13(1): 1–21. DOI: [10.3389/fimmu.2022.949746](#).
- 19 Xu C, Xia L, Xu D, et al. Cardioprotective effects of asiaticoside against diabetic cardiomyopathy: activation of the AMPK/Nrf2 pathway[J]. *J Cell Mol Med*, 2024, 28(2): e18055–e18068. DOI: [10.1111/jcmm.18055](#).
- 20 Zhang C, Ji X, Chen Z, et al. Asiaticoside suppresses gastric cancer progression and induces endoplasmic reticulum stress through the miR-635/HMGA1 axis[J]. *J Immunol Res*, 2022, 2022(1): 1–12. DOI: [10.1155/2022/1917585](#).
- 21 Malladi N, Lahamge D, Somwanshi BS, et al. Paricalcitol attenuates oxidative stress and inflammatory response in the liver of NAFLD rats by regulating FOXO3a and NF κ B acetylation[J]. *Cell Signal*, 2024, 121(1): 1–11. DOI: [10.1016/j.cellsig.2024.111299](#).
- 22 Zhou J, Li W, Chi X, et al. Inhibition of mmu_circ_0009303 improves metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease by regulating lipid metabolism and oxidative stress[J]. *Endocr J*, 2025, 72(1): 79–91. DOI: [10.1507/endocrj.EJ24-0008](#).
- 23 Hu Y, Peng X, Du G, et al. MicroRNA-122-5p inhibition improves inflammation and oxidative stress damage in dietary-induced non-alcoholic fatty liver disease through targeting FOXO3[J]. *Front Physiol*, 2022, 13(1): 1–12. DOI: [10.3389/fphys.2022.803445](#).
- 24 支晓雯, 李兵. 积雪草苷在高糖诱导人角膜上皮细胞损伤修复中的作用及机制研究 [J]. 眼科新进展, 2024, 44(5): 360–364. [Zhi XW, Li B. Study on the role and mechanism of asiaticoside in the repair of human corneal epithelial cell damage induced by high glucose[J]. *Recent Advances in Ophthalmology*, 2024, 44(5): 360–364.] DOI: [10.13389/j.cnki.rao.2024.0070](#).
- 25 Fiorucci S, Di Giorgio C, Distrutti E. Obeticholic acid: an update of its pharmacological activities in liver disorders[J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2019, 256(1): 283–295. DOI: [10.1007/164_2019_227](#).

收稿日期: 2025 年 01 月 13 日 修回日期: 2025 年 03 月 19 日

本文编辑: 李绪辉 曹 越

引用本文: 谭洁, 刘蒙, 田霞, 等. 积雪草苷调节 miR-29b-3p/FoxO3 轴减轻非酒精性脂肪性肝病大鼠肝损伤的影响 [J]. 医学新知, 2025, 35(10): 1165–1172. DOI: [10.12173/j.issn.1004-5511.202501068](#).

Tan J, Liu M, Tian X, et al. Effect of regulating miR-29b-3p/FoxO3 axis by asiaticoside on alleviating liver injury in rats with non-alcoholic fatty liver disease[J]. *Yixue Xinzhi Zazhi*, 2025, 35(10): 1165–1172. DOI: [10.12173/j.issn.1004-5511.202501068](#).