DOI:10.13210/j.cnki.jhmu.20241016.001
网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/46.1049.R.20241016.1633.002

益肺宣肺降浊方调控miR-485/AIM2炎症小体途径治疗血管性痴呆的机制研究

黄德庆[1,2],任昕怡[2],陈 炜[1],卓桂锋[2],张金枝[2],苏明阳[2],吴 林[3]✉
(1.广西中医药大学第一附属医院,广西 南宁 530023;2.广西中医药大学,广西 南宁 530200;3.广西中医药大学研究生院,广西 南宁 530200)

[**摘要**] **目的**:研究miR-485/黑色素瘤缺乏因子2(AIM2)炎症小体途径在血管性痴呆(VaD)中的作用,并探讨益肺宣肺降浊方治疗VaD的作用机制。**方法**:双侧颈总动脉永久性结扎法建立VaD大鼠模型,分为模型组及益肺宣肺降浊方组,并设假手术组,采用高通量测序分析差异表达的miRNA,并通过在线数据库预测miRNA的靶基因,双萤光素酶报告基因实验进行验证。基于miR-485采用动物实验进一步研究,将同法造模的大鼠分为假手术组、模型组、益肺宣肺降浊方组、miR-485过表达组、益肺宣肺降浊方+miR-485过表达组,并设假手术组。益肺宣肺降浊方组及益肺宣肺降浊方+miR-485过表达组予益肺宣肺降浊汤灌胃,假手术组和模型组大鼠每日予相等体积的生理盐水进行灌胃。miR-485过表达组和益肺宣肺降浊方+miR-485过表达组予注射1.5 μL病毒载体至大鼠双侧海马。采用水迷宫实验评价大鼠学习及空间记忆能力;苏木素-伊红染色及透射电镜观察海马组织形态及神经元超微结构;免疫印迹法检测AIM2、凋亡相关斑点样蛋白(ASC)、胱天蛋白酶1(Caspase-1)、白细胞介素-1β(IL-1β)和IL-18的蛋白表达水平;实时荧光定量聚合酶链式反应分析相关基因的mRNA水平以及miR-485的表达水平。**结果**:miR-485存在于3组大鼠的共同异表达中,*AIM2*是miR-485的靶基因。动物实验发现,假手术组偶见神经元死亡,模型组大鼠海马神经元损伤严重,其余3组神经元损伤较模型组明显改善,其中益肺宣肺降浊方+miR-485过表达组改善最明显。模型大鼠学习及空间记忆能力明显下降,海马组织miR-485水平下降,AIM2、ASC、Caspase-1、IL-1β和IL-18的蛋白水平及mRNA水平升高($P<0.05$);与模型组相比,益肺宣肺降浊方组、miR-485过表达组以及益肺宣肺降浊方+miR-485过表达组的学习及记忆能力均显著改善,并伴随miR-485水平的升高以及AIM2、ASC、Caspase-1、IL-1β和IL-18的蛋白水平及mRNA水平下降($P<0.05$)。**结论**:miR-485能够抑制AIM2炎症小体活化,改善VaD大鼠的学习和记忆能力;益肺宣肺降浊方治疗VaD的作用与调控miR-485/AIM2炎症小体途径、减轻神经炎症及减少神经元死亡有关。

[**关键词**] 益肺宣肺降浊方;血管性痴呆;miR-485;黑色素瘤缺乏因子2炎症小体
[**中图分类号**] R285.5 [**文献标志码**] A [**文章编号**] 2097-5953(2025)17-1281-11

The mechanism of Yifei Xuanfei Jiangzhuo Formula in treating vascular dementia by regulating miR-485/AIM2 inflammasome pathway

HUANG Deqing[1,2], REN Xinyi[2], CHEN Wei[1], ZHUO Guifeng[2], ZHANG Jinzhi[2], SU Mingyang[2], WU Lin[3]✉
(1. *The First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning* 530023, *China*; 2. *Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning* 530200, *China*; 3. *Graduate School of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning* 530200, *China*)

[*Foundation Project*]: *This study was supported by the National Natural Science Foundation of China* (82374387); *Graduate Education Innovation Program of Guangxi University of Traditional Chinese Medicine* (*YCBXJ*2023029); *Guangxi University of Traditional Chinese Medicine's "Qihuang Project" High level Talent Cultivation Project* (202410)

[*Author*]: *HUANG Deqing, Associate Chief Physician, E-mail: huangdq@gxtcmu.edu.cn.*
[*Correspondence to*]: *WU Lin, Ph.D., Professor, E-mail*: 15177775008@139.com.

[基金项目]国家自然科学基金资助项目(82374387);广西中医药大学研究生教育创新计划项目(YCBXJ2023029);广西中医药大学"岐黄工程"高层次人才培育项目(202410)

[作者简介]黄德庆,副主任医师,E-mail:huangdq@gxtcmu.edu.cn。
[通讯作者]吴林,博士,教授,E-mail:15177775008@139.com。

[收稿日期]2024-06-29 [修回日期]2024-10-05 网络出版时间:2024-10-17 09:36:14

Received: 2024-06-29 *Revised*: 2024-10-05 *JHMU*, 2025;31(17):1281-1291

View from specialist: It is creative, and of certain scientific and educational value.

[Abstract] **Objectives**: To explore the regulatory role of miR-485/AIM2 inflammasome pathway in vascular dementia (VaD), and elucidate the mechanism of Yifei Xuanfei Jiangzhuo Formula(YFXF) in treating VaD. **Methods**: A VaD rat models were established by permanent ligation of bilateral common carotid arteries, which was divided into the model group, the YFXF group and the sham group. High-throughput sequencing was used to analyze the differentially expressed miRNAs. The target genes of miR-485 were predicted by TargetScan, miRDB and starBase, and validated by dual luciferase reporter gene experiments. Further study was conducted based on the miR-485, the rats modeled by the same method were divided into the sham group, the model group, the YFXF group, the miR-485 overexpression group, and the YFXF+miR-485 overexpression group, and the sham group. The YFXF group and the YFXF+miR-485 overexpression group were administrated with YFXF by gavage. The sham group and the model group were given equal volumes of physiological saline by gavage on a daily basis. The miR-485 overexpression group and the YFXF+miR-485 overexpression group were injected with 1.5μL of viral vector into the bilateral hippocampus of rats. The water maze experiment was employed to evaluate the learning and spatial memory abilities of rats, H&E staining and transmission electron microscopywere (TEM) were used to observe the morphology of hippocampal tissue. and Western blot was used to detect the protein expression levels of AIM2 and ASC, Caspase-1, IL-1β and IL-18. RT-PCR was used to analyze the mRNA levels of relevant genes as well as the expression levels of miR-485. **Results**: miR-485 exists in the common differential gene expression of 3 groups with AIM2 being its target gene. Animal experiments shows that compared with the sham group, the learning and spatial memory abilities of the model group were significantly reduced, with decreased level of miR-485 in the hippocampus tissue, and the protein levels and mRNA levels of AIM2, ASC, Caspase-1, IL-1β, and IL-18 were increased ($P<0.05$). Compared with the model group, the learning and memory abilities of YFXF group, miR-485 overexpression group and YFXF+miR-485 overexpression group were significantly improved, accompanied by an increase in miR-485 levels in hippocampal tissue, and the protein levels and mRNA levels of AIM2, ASC, Caspase-1, IL-1β, and IL-18 were decreased ($P<0.05$). H&E staining and TEM showed the occasional neuronal death in the sham group, severe hippocampal neuronal damage in the model group, and significant improvement in neuronal damage in the other three groups compared to the model group. Among them, the improvement was most significant in the YFXF+miR-485 overexpression group. **Conclusion**: miR-485 can inhibit the activation of AIM2 inflammasome and improve the learning and memory abilities of rats with VaD. The effect of YFXF in treating VaD is associated with regulating the miR-485/AIM2 inflammasome pathway and reducing neuronal death.

[Key words] Yifei Xuanfei Jiangzhuo Formula; Vascular dementia; micro RNA-485(miR-485); AIM2 inflammasome

血管性痴呆(vascular dementia, VaD)约占所有痴呆患者的20%,而在亚洲和发展中国家,VaD占所有痴呆患者比例则高达30%[1]。中国作为全世界痴呆患者人数最多的国家,60岁及以上人群中VaD的年发病率为5.14%[2,3]。VaD患者可出现记忆力下降、思维迟钝、定向功能和执行功能障碍以及情绪和性格变化等临床表现,不仅严重损害患者身心健康,还会给患者家庭带来沉重经济和精神压力[4]。遗憾的是,目前VaD的发病机制仍未完全明确[5-7],且尚无公认的用于治疗VaD的特效药物[8,9]。故研究VaD的发病机制,探索有效的治疗靶点,对VaD的防治具有重要的现实意义。

研究表明,参与转录后调控的微小RNA(microRNA,miRNA)在多种细胞功能中发挥着重要的调控作用[10,11],在疾病的治疗中显示出巨大的潜力[12]。课题组前期研究发现益肺宣肺降浊方能改善VaD患者的认知功能和生活自理能力[13],但其作用机制仍待进一步阐明。本研究建立VaD大鼠模型,并分为模型组及益肺宣肺降浊方干预组,同时以假手术组作为对照,通过高通量测序发现miR-485是上述3组大鼠海马组织的共同差异表达基因之一。进一步通过在线数据库预测及查阅文献发现[14],黑色素瘤缺乏因子2(absent in melanoma 2,AIM2)可能是miR-485的靶基因。而近期一项研究发现AIM2炎症小体介导了VaD的典型病理改变和认知功能障碍[15]。因此,本课题组围绕miR-485和AIM2以及炎症小体相关蛋白进行验证和研究,以期为VaD潜在的治疗靶点提供线索,也为益肺宣肺降浊方的临床应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF级SD大鼠购自长沙天勤生物技术有限公司,生产许可证号:SCXK(湘)2019-0014。最终进入统计分析的大鼠数量为72只,雌雄各半,体重(260±20) g。本研究通过广西中医药大学实验动物福利伦理委员会审核(批准编号:DW20240319-025)。

1.2 药品和试剂

宣肺益肺降浊方(Yifei Xuanfei Jiangzhuo Formula,YFXF)由黄芪15 g,人参15 g,麦冬15 g,桔梗10 g,苦杏仁10 g,三七粉15 g,苏子15 g,石菖蒲15 g,酒大黄6 g组成。本研究采用中药免煎颗粒,采用生理盐水配制药液,均由广西中医药大学第一附属医院提供。

Trizol LS总RNA提取试剂盒(货号19201ES60)购自翌圣生物科技(上海)股份有限公司;Lipofectamine2000转染试剂(货号11668019)购自美国Thermo Fisher公司;双萤光素酶报告基因检测试剂盒(货号LM028)购自上海联迈生物工程有限公司;AIM2抗体(货号63660S)、ASC(货号Ab249023)、Caspase-1(货号Ab286125)、IL-1β(货号503502)和IL-18(货号Ab253708)均购自北京百奥创新科技有限公司。苏木素-伊红染液(货号BIR615)购自北京博尔西科技有限公司。

1.3 仪器

XR-XM101型Morris水迷宫(上海欣软公司)、DW-2000型脑立体定位仪(成都仪器厂)、Novaseq 6000型测序平台(美国Illumina公司)、PowerPac Universal型电泳仪(美国Biotek公司)、WSE-4025半干转膜仪(日本ATTO公司)、Light cycler 96型荧光定量PCR仪(瑞士Roche公司)、Multiskan Sky酶标仪(美国Thermo Fisher公司),DM500型光学显微镜(德国Leica公司)。

1.4 模型制备

大鼠腹腔注射3%戊巴比妥(45 mg/kg)进行麻醉,根据文献及课题组前期研究,采用双侧颈总动脉永久性结扎法建立VaD大鼠模型[16]。假手术组大鼠仅分离双侧颈总动脉,不进行动脉结扎。以水迷宫定位航行试验筛选造模成功的大鼠[17]。

1.5 miRNA高通量测序

取8只造模成功的大鼠,通过对大鼠进行编号及计算机产生随机序列的方法,随机分为模型组及益肺宣肺降浊方组,并另取4只大鼠设为假手术组。益肺宣肺降浊方组按照前期研究的最佳给药浓度即5 $g\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$予益肺宣肺降浊汤灌胃[18]。假手术组和模型组大鼠每日予灌喂相等体积的生理盐水。干预4周后,予腹腔注射3%戊巴比妥麻醉后处死,取双侧海马组织,研磨成浆,按照Trizol LS试剂盒说明取RNA,检测RNA纯度及完整性后,制备RNA文库。使用Illumina Novaseq 6000测序平台的PE150模型进行miRNA测序。剔除低质量的基因及筛除不表达的基因,做标准化处理后运用DRAGEN Germline Pipeline软件对3组样本的测序数据进行分析,以$|\log2FC|\geqslant1$、$P<0.05$为标准进行差异表达基因的筛选[19]。同时进行主成分分析(principal component analysis,PCA)并绘制韦恩图及火山图。

1.6 miRNA目标靶基因的预测

通过TargetScan数据库(https://www.targetscan.org/vert_80/)、miRDB数据库(https://mirdb.org/)以及starBase(https://rnasysu.com/encori/index.php)数据库预测miR-485的靶基因,分析miR-485和靶基因的靶向关系,并确定其与靶基因3′ UTR的结合位点。

1.7 双萤光素酶报告基因实验验证*AIM2*是miR-485的靶基因

采用pmir-GLO载体(Promega公司)构建*AIM2*基因3′ UTR重组质粒,然后合成miR-485模拟物及miR-485阴性对照物。由赛业生物公司购入HEK293T细胞作为工具细胞,分为AIM2野生型组(AIM2-WT)及AIM2突变型组(AIM2-MUT),AIM2突变型组根据miR-485与AIM2的结合位点进行突变。运用Lipofectamine2000转染试剂分别将重组质粒载体+miR-485模拟物和重组质粒载体+阴性对照物共转HEK293T细胞,实现miR-485过表达并形成miR-485阴性对照。另设pmir-GLO组作为参照,该组只转染miR-485模拟物及miR-485阴性对照物到HEK293T细胞。转染24 h后收集细胞并裂解处理。根据试剂盒说明,采用双萤光素酶报告分析系统进行萤光素酶活性测定。

1.8 动物实验部分

1.8.1 分组、造模与干预 大鼠按“1.4”部分所述的方法进行造模及随机分组,将造模成功的大鼠分为模型组(MOD)、益肺宣肺降浊方组(YFXF)、miR-485过表达组(miR-485 overexpression组)、益肺宣肺降浊方+miR-485过表达组(YFXF+miR-485 overexpression),并设置假手术组(SHAM),每组均为12只。确保各组基线可比后给予相应的干预措施。其中,YFXF组及YFXF+miR-485 overexpression组按照“1.5”部分予益肺宣肺降浊灌胃。SHAM组和MOD组大鼠予相等体积的生理盐水进行灌胃。上述灌胃实施4周。miR-485 overexpression组和YFXF+miR-485 overexpression组运用重组腺病毒载体(上海吉凯基因医学科技股份有限公司提供),于分组后干预的第1天和第14天,采用立体定位显微注射法分别注射1.5 μL病毒载体(2×10^9 TU/mL滴度)至大鼠双侧海

马[20]，达到大鼠miR-485过表达。

1.8.2 水迷宫实验 药物干预4周后采用水迷宫实验对各组大鼠的学习和记忆能力进行评价，包括定位航行实验和空间探索实验[21]。定位航行测试：将水迷宫分为4个象限。把平台置于第二象限，注入清水使水位没过平台，加入二氧化钛，以达到从水面上看不到平台。将大鼠依照一、二、三、四象限的顺序依次放入水中，记录大鼠从入水到爬上平台所需时间，即逃避潜伏期。若大鼠在60 s内不能找到平台，则引导大鼠进入平台位置，让大鼠在平台上停留15 s，再将其取出、擦干。连续训练5 d。空间搜索测试：完成定位航行测试后，撤走平台，将大鼠从第四象限放入水中，分别记录各组大鼠跨越原来平台的次数以及目标象限停留时间。

1.8.3 取材 水迷宫实验结束后，大鼠麻醉后，开胸暴露心脏，将灌注针头插入左心室，剪开右心耳，快速灌注生理盐水，灌注后于冰上断头取脑，在大脑中下1/3交界处完整剥离双侧海马。将一部分海马组织迅速放入－80 ℃冰箱中保存，后续用于免疫印迹检测、实时荧光定量聚合酶链式反应检测，另一部分海马组织用4%的多聚甲醛固定，并置于4 ℃冰箱保存，后续用于苏木精-伊红（hematoxylin-eosin staining，H&E）染色检测。

1.8.4 海马组织病理形态检测 海马组织切片取出后，每只大鼠选3张切片，经脱蜡、水化后进行H&E染色，脱水、封片后采用光学显微镜观察，主要观察并分析海马组织细胞形态和结构变化，并进行图像采集。

1.8.5 透射电镜分析 大鼠海马置于电镜固定液中修成小块，后放入4 ℃电镜固定液中固定2 h。用0.1 mol/L PBS漂洗3次后置于1%锇酸固定液中固定2 h，再次用0.1 mol/L PBS漂洗3次后进行包埋处理。梯度酒精脱水、浸泡、固化处理后制作超薄切片并用铀铅进行双染色，放置于2%醋酸铀饱和酒精溶液中15 min，枸橼酸铅浸泡15 min，在干燥室温条件下过夜。采用透射电镜观察各组大鼠海马区神经元超微结构。

1.8.6 AIM2炎症小体相关蛋白和基因水平检测 将提取大鼠海马蛋白，根据BCA法测定蛋白浓度，调配蛋白浓度，使各样品所含蛋白量一致。按试剂盒说明书进行操作，采用免疫印迹法检测凋亡相关斑点样蛋白（apoptosis-associated speck-like protein containing，ASC）、胱天蛋白酶1（Caspase-1）、白细胞介素-1β（IL-1β）和白细胞介素-18（IL-18）。内参按此方法进行检测，采用灰度值进行分析。提取海马组织总RNA，紫外分光法分析RNA浓度和纯度。将总RNA逆转录合成cDNA。设计并合成相关目的基因引物，然后进行实时荧光定量聚合酶链式反应（RT-PCR），分析相关基因的mRNA水平以及miR-485的表达水平。其中*miR-485*选择*U6*作为内参，其他选择*GAPDH*作为内参。引物序列见表1。

表1 引物序列

Tab 1 Primer sequence

引物	序列（5′-3′）	长度（dp）
AIM2	上游 ACAAAGGCAGTGGGAACAAG	20
	下游 AAGGAAAACTTCCTGACGCC	20
ASC	上游 ACTGTGCTTAGAGACATGGGC	21
	下游 TGGTCCACAAAGTGTCCTGTT	21
Caspase-1	上游 CCGTGGAGAGAAACAAGGAG	20
	下游 GGACAGGATGTCTCCAGGAC	20
IL-1β	上游 CTCTCTCCTTTCAGGGCCAA	20
	下游 GAGAGGCCTGGCTCAACAAA	20
IL-18	上游 CCGCAGTAATACGGAGCA	18
	下游 CCTTCACAGATAGGGTCA	18
miR-485	上游 CCAAGCTTCACCCATTCCTAACAGGAC	27
	下游 CGGGATCCGTAGGTCAGTTACATGCATC	28
U6	上游 CGGGGACATCCGATAAAATTGGAACG	26
	下游 CGATTTGTGCGTGTCATCCTTGC	23
GAPDH	上游 TGTGAGGGAGATGCTCAGTG	20
	下游 TGTTCCTACCCCCAATGTGT	20

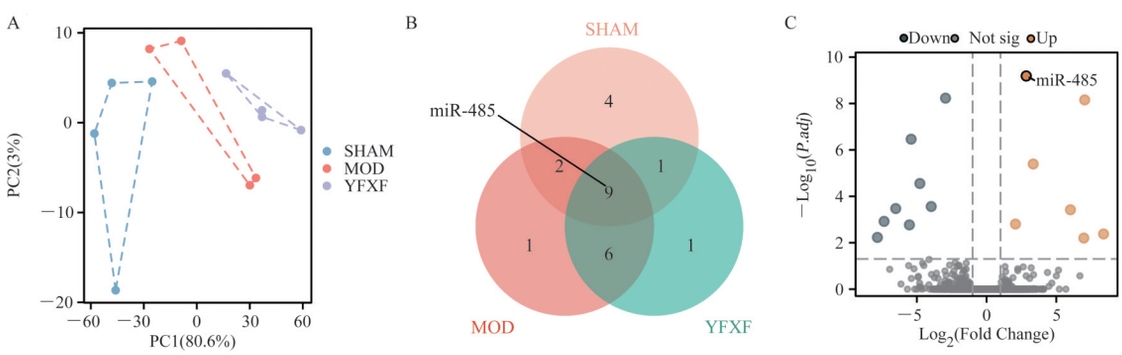
1.9 统计学处理

采用Excel软件录入数据，采用R（4.2.1）版本进行统计分析。计量资料符合正态分布且方差齐时，多组间比较采用One-way ANOVA检验；符合正态分布但方差不齐时采用Welch one-way ANOVA检验，不符合正态分布时采用Kruskal-Wallis检验；相关性分析采用Peason法进行。以上统计学检验水准α=0.05。统计结果采用ggplot2包进行可视化处理。

2 结果

2.1 miR-485在VaD模型中低表达，在益肺宣肺降浊方组高表达

PCA图纵坐标体现3%差异，表明数据存在较大差异；红色点、蓝色点和紫色点离散程度大，代表3个组之间存在差异，见图1A。韦恩图显示，miR-485存在于假手术组、模型组和益肺宣肺降浊方组大鼠的共同差异表达中，见图1B。其中和模型组大鼠对比，miR-485在益肺宣肺降浊方组大鼠海马组织的表达水平均发生了明显上调，见图1C。



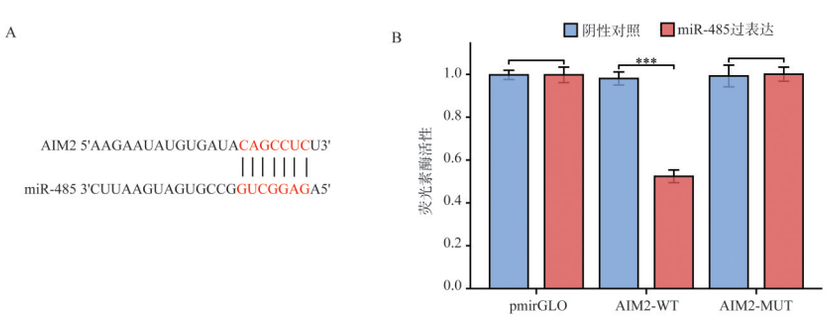
A：PCA结果，PCA以样本分布情况表现样本间关系。不同组别样本分布在不同二维空间区域，同组样本分布相对集中。样本PCA聚类距离近表明样本越相似。横坐标代表PCA降维后第1个主成分，纵坐标代表PCA降维后的第2个主成分，括号内代表主成分解释的比例；B：3组大鼠海马组织miRNA共同差异表达韦恩图；C：模型组大鼠和益肺宣肺降浊方组大鼠差异miRNA火山图

图1 各组大鼠海马组织差异表达miRNA筛选结果

Fig 1 Results of differentially expressed miRNA screening in hippocampal tissue of rats in each group

2.2 *AIM2*是*miR-485*的靶基因

通过TargetScan、miRDB及starBase在线数据库对*miR-485*的靶基因进行预测，结果发现*miR-485*与*AIM2*具有结合区域，见图2A。双萤光素酶报告基因实验发现，在含有野生型*AIM2*和过表达*miR-485*的萤光素酶报告质粒共转染HEK293T细胞后，*AIM2*野生型组萤光素酶报告质粒活性明显低于阴性对照组（$t=-10.701$，$P<0.001$），而AIM2突变组则未见组间差异（$t=0.13788$，$P>0.05$），见图2B。



A：预测结果提示*miR-485*与*AIM2*具有结合靶点；B：萤光素酶实验发现*AIM2*是*miR-485*的靶基因，$^{***}P<0.001$

图2 双萤光素酶报告基因实验结果

Fig 2 Results of the dual-luciferase reporter gene assay

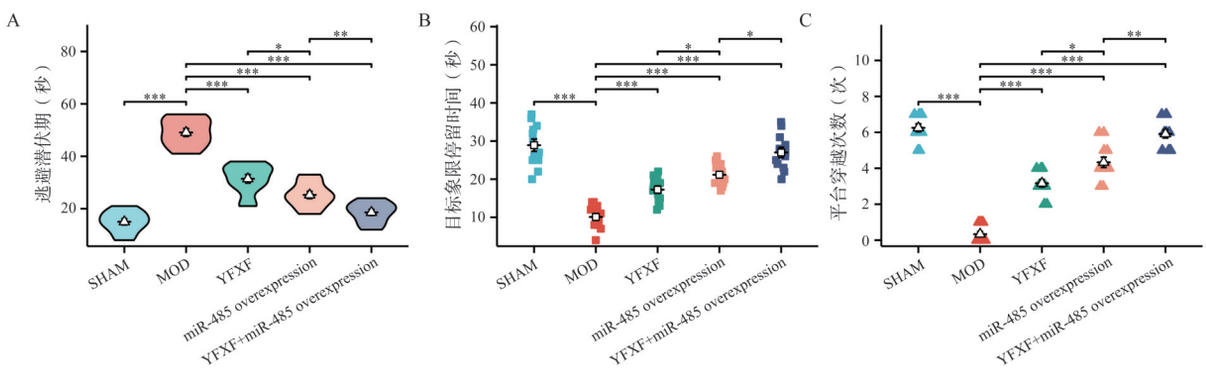
2.3 动物实验结果

2.3.1 miR-485及益肺宣肺降浊方能够改善VaD大鼠学习及空间记忆能力

与SHAM组大鼠比较，MOD组逃避潜伏期明显延长（$P<0.001$）。与MOD组对比，其余3组大鼠逃避潜伏期均显著缩短（$P<0.001$），且miR-485 overexpression组短于

YFXF 组（$P<0.05$），YFXF＋miR-485 overexpression 组短于 miR-485 overexpression 组（$P<0.01$）。见图 3A、表 2。

大鼠空间搜索测试结果如图 3、4 所示。分析发现，与 SHAM 组比较，MOD 组大鼠在目标象限停留时间及穿越平台次数均明显减少，（$P<0.001$）。与 MOD 组对比，其余 3 组大鼠目标象限停留时间及穿越平台次数明显增加（$P<0.001$），且 YFXF＋miR-485 overexpression 组高于 miR-485 overexpression 组（$P<0.05$），miR-485 overexpression 组高于 YFXF 组（$P<0.05$）。见图 3B、3C、表 2。



$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$，$^{***}P<0.001$

图 3　各组大鼠学习以及空间记忆的情况

Fig 3　The learning and spatial memory performance of rats in each group

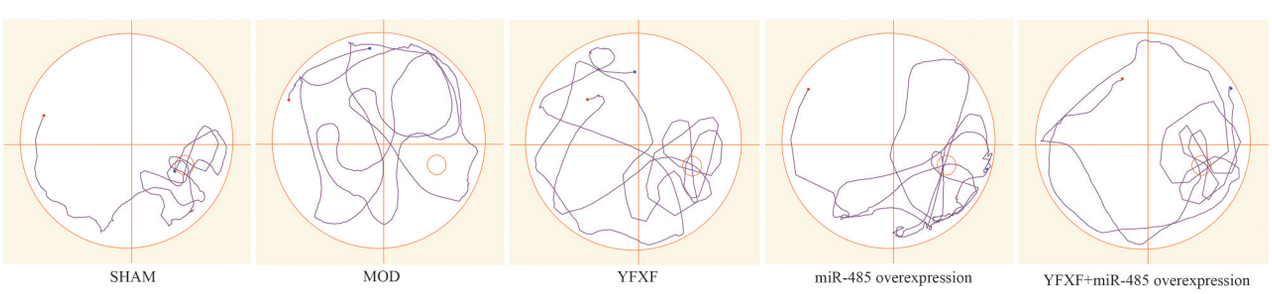
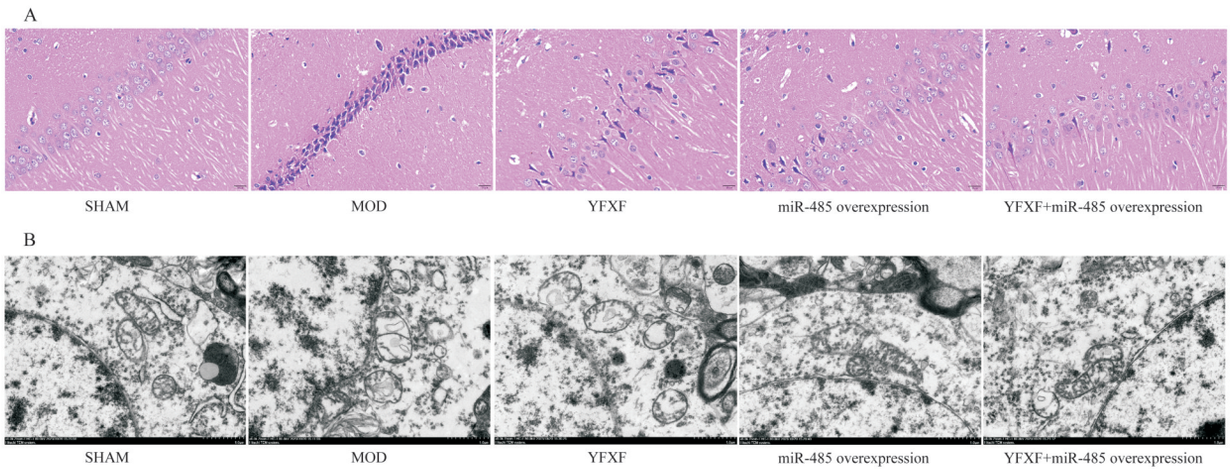


图 4　各组大鼠空间搜索测试轨迹图

Fig 4　Trajectory maps of spatial search tests for each group of rats

2.3.2　miR-485 过表达及益肺宣肺降浊方能够减少 VaD 大鼠海马神经元死亡及减轻神经元超微结构损伤　HE 染色后显微镜观察发现，SHAM 组大鼠海马结构基本正常，形态完整，锥体细胞排列整齐，染色均匀，偶见个别神经元死亡，表现为神经元固缩和深染。MOD 组大鼠海马损伤严重，锥体细胞减少，较多神经元出现固缩、深染。与 MOD 组对比，其余 3 组大鼠海马组织的神经元固缩、深染数量均明显减少，其中 miR-485 overexpression 组优于 YFXF 组，YFXF＋miR-485 overexpression 组神经元死亡的数量最少，见图 5A。透视电镜显示，SHAM 组大鼠海马神经元细胞线粒体数量基本正常，核膜未见断裂及溶解现象，内质网结构正常，线粒体结构基本完整。MOD 组大鼠海马大量神经元细胞固缩，电子密度增高，线粒体严重水肿且数量明显减少，局部外膜断裂，核膜多处断裂，核型不规则。与 MOD 组相比，YFXF 组神经元超微结构损伤减轻，而 miR-485 overexpression 组及 YFXF＋miR-485 overexpression 组改善更为明显。结果见图 5B。

2.3.3　miR-485 过表达及益肺宣肺降浊方均能够抑制 VaD 大鼠 AIM2、ASC、caspase-1、IL-1β 及 IL-18 的蛋白及 mRNA 水平　MOD 组大鼠海马组织中的 AIM2、ASC、caspase-1、IL-1β 及 IL-18 蛋白及 mRNA 水平较 SHAM 组均显著升高（$P<0.05$）。与 MOD 组相比，其余 3 组大鼠海马组织的 AIM2、ASC、caspase-1、IL-1β 及 IL-18 的蛋白及 mRNA 水平均显著降低（$P<0.05$），其中 miR-485 overexpres-

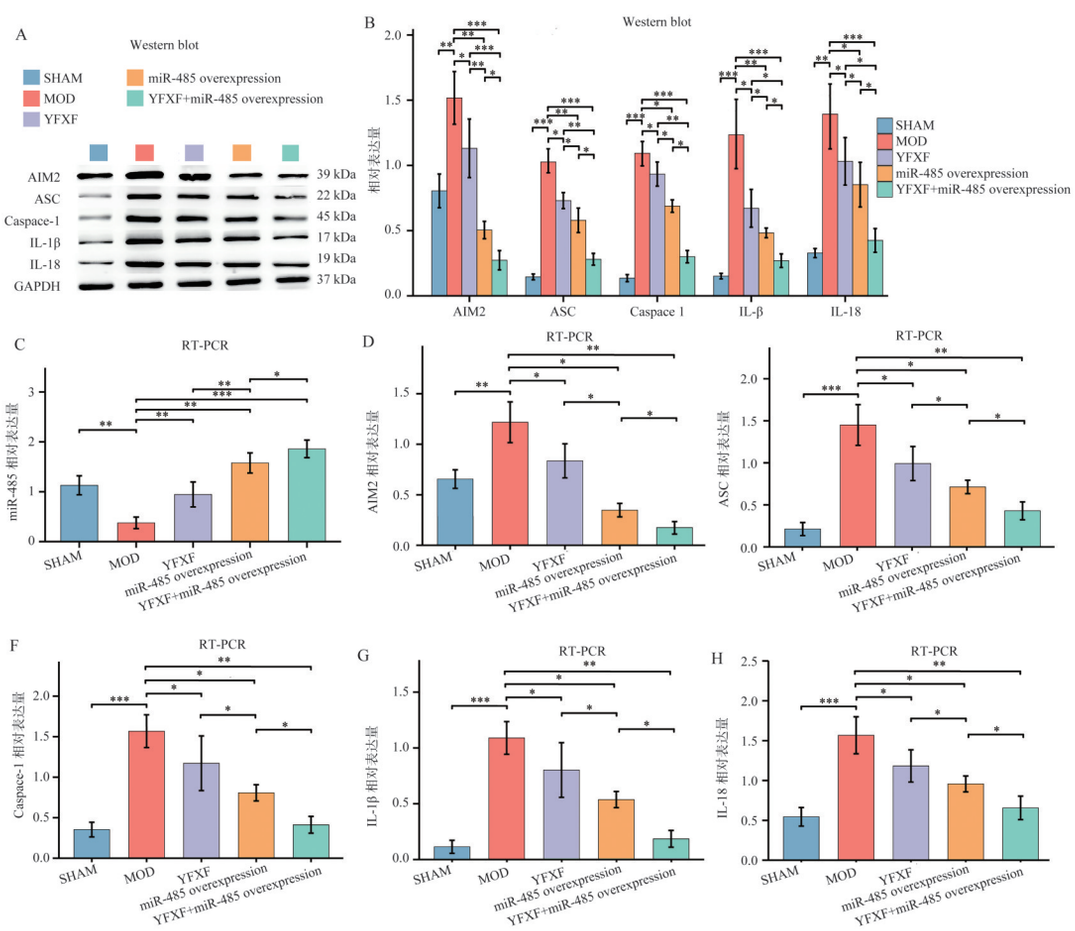


A:H&E染色(×200,标尺:20 μm);B:透射电镜(×6 000,标尺:1 μm)

图5　各组大鼠海马组织H&E染色及透射电镜结果

Fig 5　H&E staining and TEM results of hippocampal tissue in rats from each group

sion组低于YFXF组($P<0.05$),YFXF+miR-485 overexpression组低于miR-485 overexpression组($P<0.05$)。见图6A、6B、D~H。



$^{*}P<0.05$,$^{**}P<0.01$,$^{***}P<0.001$

图6　各组大鼠海马组织中miR-485水平以及AIM2、ASC、caspase-1、IL-1β及IL-18的蛋白及基因水平情况

Fig 6　The levels of miR-485 as well as the protein and gene expression levels of AIM2, ASC, caspase-1, IL-1β and IL-18 in hippocampal tissue of rats from each group

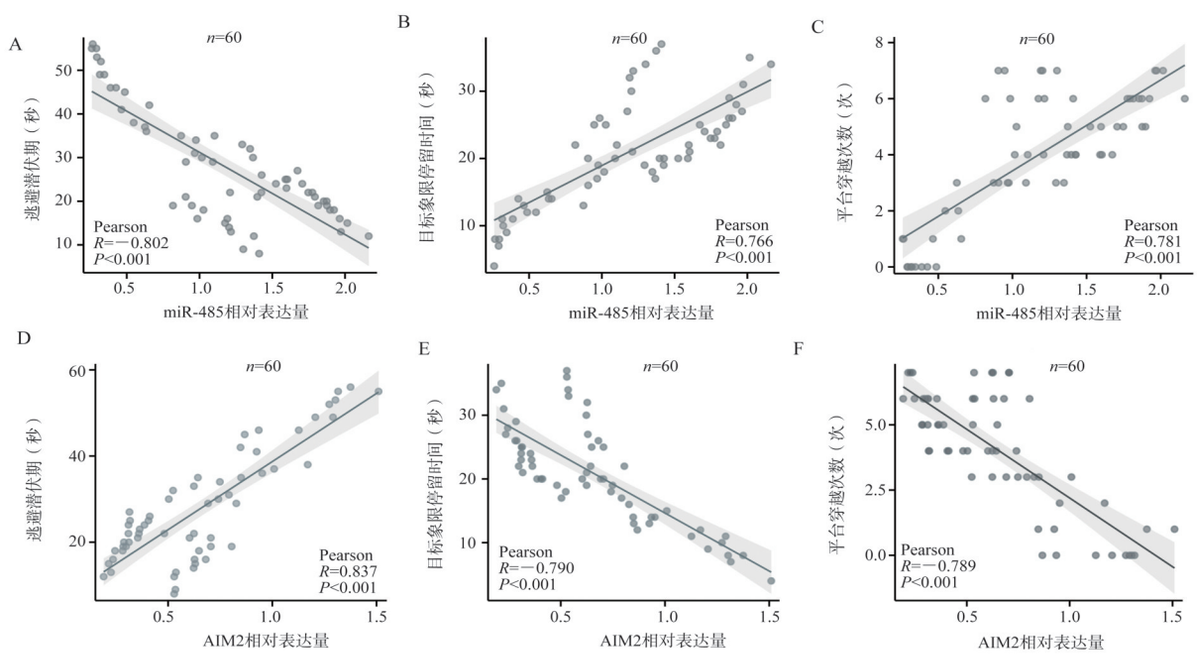
miR-485的表达水平趋势则与上述结果相反。MOD组大鼠海马组织中的miR-485水平均较SHAM组显著降低（$P<0.01$）。其余3组的miR-485水平较MOD组均显著升高（$P<0.01$）；且miR-485 overexpression组高于YFXF组（$P<0.05$），YFXF＋miR-485 overexpression组高于miR-485 overexpression组（$P<0.05$）。见图6C。

表2　各组大鼠学习以及空间记忆的情况

Tab 2　The learning and spatial memory performance of rats in each group

组别	逃避潜伏期(s)	目标象限停留时间(s)	平台穿越次数
SHAM	15.00±4.02	28.91±5.55	6.25±0.75
MOD	49.08±5.16	10.08±3.02	0.33±0.49
YFXF	31.41±5.55	17.25±3.28	3.17±0.72
miR-485 overexpression	25.25±4.73	21.17±2.86	4.33±0.98
YFXF＋miR-485 overexpression	18.58±3.87	27.00±4.65	5.92±0.79
F	97.477	43.589	50.090
P	<0.001	<0.001	<0.001

2.3.4　miR-485及AIM2与大鼠学习和空间记忆能力的存在较强相关性　miR-485与大鼠逃避潜伏期呈负相关（$R=-0.802$，$P<0.001$），与大鼠目标象限停留时间及平台穿越次数呈正相关（$R=0.766$，$P<0.001$；$R=0.781$，$P<0.001$）。AIM2与大鼠逃避潜伏期呈正相关（$R=0.837$，$P<0.001$），与大鼠目标象限停留时间及平台穿越次数呈负相关（$R=-0.790$，$P<0.001$；$R=-0.789$，$P<0.001$）。见图7。



相关系数R的绝对值代表相关程度，0～0.3代表弱或者不相关，0.3～0.5代表弱相关，0.5～0.8代表中等程度相关，0.8～1代表强相关，结合P值分析相关性是否具有统计学意义

图7　miR-485、AIM2与大鼠逃避潜伏期、目标象限停留时间及平台穿越次数的相关性分析

Fig 7　Correlation analysis between miR-485, AIM2, and the escape latency, target quadrant dwell time, and platform crossing frequency in rats

3 讨论

VaD的病理、生理学基础是大脑持续低灌注血流[22]，发病机制可能与炎症、神经元损伤、胆碱能系统功能障碍、脑白质病变及氧化应激等有关[23,24]。但不管是持续低灌注状态还是重建血流导致的再灌注损伤，大脑中都存在严重的炎症状态，即神经性炎症[25]。控制神经性炎症被认为是治疗VaD的新突破点[26,27]。研究发现，在VaD病理发生过程中，AIM2可识别胞质中的双链DNA，并通过招募ASC与Caspase-1前体（pro-Caspase-1）组成AIM2炎症小体蛋白复合物。AIM2炎症小体组装完成后，招募并激活Caspase-1，进而通过裂解白细胞介素-1β前体（pro-IL-1β）和白细胞介素-18前体（pro-IL-18），促进IL-1β和IL-18的成熟与释放，导致下游的神经炎症反应，并会引起胶质细胞极化以及脑白质病变，最终引起VaD的典型病理改变和认知功能障碍。同时，这些效应蛋白也启动多种细胞死亡途径，如凋亡、焦亡和继发性坏死。提示靶向抑制AIM2炎症小体很可能是VaD潜在的治疗途径，但目前仍缺乏能用于临床AIM2靶向抑制措施[28,29]。

目前，在理解miRNA的生物功能、编码miRNA的基因结构、靶向miRNA的序列特异性等方面取得诸多研究成果，为miRNA作为新的疾病治疗策略提供了很好的基础[10,11]。本研究通过miRNA的测序分析发现，*miR-485*是VaD模型组和假手术组大鼠的差异表达基因，同时也是VaD模型组和益肺宣肺降浊方组的差异表达基因，提示*miR-485*在VaD的发病及治疗中具有重要调节作用。在线数据库预测及双萤光素酶报告基因实验发现*AIM2*是*miR-485*的靶基因，提示益肺宣肺降浊方可能是通过调控*miR-485/AIM2*而发挥治疗VaD作用的。

VaD属于中医“痴呆”的范畴，课题组认为，肺气虚损、肺脏功能失调在痴呆的发生发展中起着重要的作用，治疗上需重视益肺气以补五脏之不足，复肺之宣降以消体内痰浊瘀血浊毒，并制定益肺宣肺降浊方进行治疗。前期临床研究发现，益肺宣肺降浊方能够有效改善VaD患者认知功能，提高患者日常生活能力[3]，基础研究发现该方能够改善VaD大鼠学习记忆能力，减少海马神经元死亡[16]。目前国内外尚未见有通过调控miR-485/AIM2炎症小体途径治疗VaD的相关研究报道。基于本研究miRNA测序分析结果和双萤光素酶报告基因实验结果，故本项目组采用动物实验验证miR-485/AIM2炎症小体途径在VaD中的作用，并验证益肺宣肺降浊方的干预作用及miR-485的负性调控作用。

本研究动物实验发现，在VaD大鼠模型组中，AIM2炎症小体激活并产生明显的神经炎症，表现为AIM2、ASC、Caspase-1的蛋白及基因表达水平明显升高，炎症因子IL-1β及IL-18含量显著增加。益肺宣肺降浊方及miR-485均能够显著抑制AIM2的基因和蛋白水平，同时ASC、Caspase-1的表达水平也随之下降，IL-1β及IL-18的水平也受到了明显的抑制，海马神经元死亡数量减少，线粒体损伤减轻，大鼠空间探索逃避潜伏期明显缩短，空间记忆能力得到明显的改善。本研究进一步验证了AIM2炎症小体在VaD发病中的关键作用，并发现miR-485能够负性调控AIM2炎症小体活化而发挥治疗VaD的作用。相关性分析提示，作为上游的miR-485及AIM2水平与VaD大鼠的学习能力及空间记忆能力具有较强的相关性，提示上调miR-485或抑制AIM2水平均能改善VaD大鼠的预后，进一步为VaD潜在的治疗靶点提供了线索和依据。同时本研究还发现益肺宣肺降浊方很可能是通过上调miR-485，抑制AIM2炎症小体活化，减轻神经炎症而发挥治疗作用的。本研究中，大鼠接受miR-485过表达处理后，大鼠海马组织miR-485水平能够明显升高，并高于假手术组，说明本研究miR-485过表达处理达到了预期目标。值得注意的是，在miR-485过表达基础上联合益肺宣肺降浊方能进一步提高大鼠海马组织的miR-485水平，并进一步抑制AIM2的基因及蛋白水平，提示益肺宣肺降浊方及miR-485对AIM2的抑制可能具有协同作用。同时，miR-485及益肺宣肺降浊方均能减轻VaD大鼠神经元线粒体结构的损伤程度，提示其作用机制可能还与线粒体能量代谢有关，这仍需要进一步的研究进行探讨。

综上所述，miR-485能够负性调控VaD大鼠海马组织的AIM2水平，抑制AIM2炎症小体活化，减轻神经炎症，减少神经元死亡，改善VaD大鼠的学习和空间记忆能力。益肺宣肺降浊方治疗VaD的作用与调控miR-485/AIM2炎症小体途径有关。

作者贡献度说明：

黄德庆：实验设计、动物实验、论文撰写；任昕怡：高通量测序、双萤光素酶报告基因实验、论文核修；陈炜：实验指导、论文审校；卓桂锋：动物实验、统计分析；张金枝：动物实验、数据收集；苏明阳：动物实验、收据收集；吴林：实验设计、指导项目实施、论文审校。

所有作者声明不存在利益冲突关系。

参考文献

1 Yang Y, Zhao X, Zhu Z, et al. Vascular dementia: A microglia's perspective[J]. Ageing Res Rev, 2022, 81: 101734.

2 林爽,王传杰,吴毅. 血管性痴呆[J]. 国际脑血管病杂志, 2023,31(7):529-534.
Lin S, Wang CJ, Wu Y. Vascular dementia[J]. Int J Cerebrovasc Dis, 2023, 31(7): 529-534.

3 Jia L, Quan M, Fu Y, et al. Group for the project of dementia situation in China. Dementia in China: Epidemiology, clinical management, and research advances[J]. Lancet Neurol,2020, 19(1): 81-92.

4 Bir SC, Khan MW, Javalkar V, et al. Emerging concepts in vascular dementia: A review[J]. J Stroke Cerebrovasc Dis,2021, 30(8): 105864.

5 Fu P, Chen Y, Wu M, et al. Effect of ferroptosis on chronic cerebral hypoperfusion in vascular dementia[J]. Exp Neurol, 2023, 370: 114538.

6 Tournier BB, Sorce S, Marteyn A, et al. CCR5 deficiency: Decreased neuronal resilience to oxidative stress and increased risk of vascular dementia[J]. Alzheimers Dement, 2023, 25: 1-27.

7 孙瑞,殷歌,梁萌,等. 血管性认知损害的病理生理学机制[J]. 国际脑血管病杂志,2021,29(8):613-618.
Sun R, Yin G, Liang M, et al. Pathophysiological mechanism of vascular cognitive impairment[J]. Int J Cerebrovasc Dis, 2021, 29(8): 613-618.

8 Inoue Y, Shue F, Bu G, et al. Pathophysiology and probable etiology of cerebral small vessel disease in vascular dementia and Alzheimer's disease[J]. Mol Neurodegener,2023,11;18(1): 46.

9 马华萍,韩振蕴,常泽,等. 血管性认知障碍指南质量评价[J]. 中国全科医学,2022,25(9): 1039-1046.
Ma HP, Han ZY, Chang Z, et al. Quality assessment of guidelines for vascular cognitive impairment using the AGREE Ⅱ[J]. Chin General Pract, 2022, 25(9): 1039-1046.

10 Tang L. Recapitulating miRNA biogenesis in cells[J]. Nat Methods, 2022, 19(1): 35.

11 Cui Y, Qi Y, Ding L, et al. MiRNA dosage control in development and human disease[J]. Trends Cell Biol, 2024, 34(1): 31-47.

12 Shang R, Lee S, Senavirathne G, et al. MicroRNAs in action: Biogenesis, function and regulation[J]. Nat Rev Genet, 2023, 24(12): 816-833.

13 王晋平,唐农,古联,等. 益肺宣肺降浊胶囊治疗轻中度血管性痴呆的临床研究[J]. 中医药导报,2016,22(6): 71-73.
Wang JP, Tang N, Gu L, et al. Clinical study of Yifei Xuanfei Jiangzhuo capsule on mild-to-moderate vascular dementia[J]. Guid J Tradit Chin Med Pharm, 2016, 22(6): 71-73.

14 Liang J, Wang Q, Li JQ, et al. Long non-coding RNA MEG3 promotes cerebral ischemia-reperfusion injury through increasing pyroptosis by targeting miR-485/AIM2 axis[J]. Exp Neurol, 2020, 325: 113139.

15 Poh L, Fann DY, Wong P, et al. AIM2 inflammasome mediates hallmark neuropathological alterations and cognitive impairment in a mouse model of vascular dementia[J]. Mol Psychiatry,2021, 26(8): 4544-4560.

16 朱健敏,陈炜,匡龙娇,等. 益肺宣肺降浊方调控小胶质细胞极化改善血管性痴呆神经炎症的机制研究[J]. 时珍国医国药, 2024, 35(5): 1132-1137.
Zhu JM, Chen W, Kuang LJ, et al. Study on the mechanism of VD neuroinflammation by regulating microglial polarization[J]. Lishizhen Med Materia Med Res, 2024, 35(5): 1132-1137.

17 赵梓婷,张秀丽,刘桐赫,等. 基于NMDAR调控线粒体自噬探讨滋肾活血方对血管性痴呆大鼠海马氧化应激损伤的保护作用[J]. 北京中医药大学学报, 2023, 46(8): 1128-1138.
Zhao ZT, Zhang XL, Liu TH, et al. Exploring the protective effect of Zishen Huoxue Formula on oxidativestress injury in the hippocampus of vascular dementia rats based on NMDAR-regulated mitophagy[J]. J Beijing Univ Tradit Chin Med, 2023, 46(8): 1128-1138.

18 陈炜,朱小敏,胡跃强,等. 益肺宣肺降浊方通过EGFR调节PI3K/Akt-MAPK/Erk通路改善血管性痴呆大鼠的记忆[J]. 中华中医药学刊, 2023, 41(8): 46-50, 266-269.
Chen W, Zhu XM, Hu YQ, et al. Yifei Xuanfei Jiangzhuo prescription improves memory of vascular dementia rats by EGFR regulating PI3K/Akt-MAPK/Erk pathway[J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2023, 41(8): 46-50,266-269.

19 Zanjirband M, Baharlooie M, Safaeinejad Z, et al. Transcriptomic screening to identify hub genes and drug signatures for PCOS based on RNA-Seq data in granulosa cells[J]. Comput Biol Med, 2023, 154: 106601.

20 Luo YW, Xu Y, Cao WY, et al. Insulin-like growth factor 2 mitigates depressive behavior in a rat model of chronic stress[J]. Neuropharmacology, 2015, 89: 318-324.

21 卓桂锋,陈炜,张金枝,等. 益肺宣肺降浊方抗血管性痴呆的作用机制研究[J]. 中国药房, 2024, 35(18):

2207-2212.
Zhuo GF, Chen W, Zhang JZ, et al. Study on the mechanism of Yifei xuanfei jiangzhuo formula against vascular dementia[J]. Chin Pharm, 2024, 35(18): 2207-2212.

22 Inoue Y, Shue F, Bu G, et al. Pathophysiology and probable etiology of cerebral small vessel disease in vascular dementia and Alzheimer's disease[J]. Mol Neurodegener, 2023, 18(1): 46.

23 Tournier BB, Sorce S, Marteyn A, et al. CCR5 deficiency: Decreased neuronal resilience to oxidative stress and increased risk of vascular dementia[J]. Alzheimers Dement, 2024,20(1): 124-135.

24 Gordon R, Albornoz EA, Christie DC, et al. Inflammasome inhibition prevents α-synuclein pathology and dopaminergic neurodegeneration in mice[J]. Sci Transl Med, 2018, 10(465): eaah4066.

25 Belkhelfa M, Beder N, Mouhoub D, et al. The involvement of neuroinflammation and necroptosis in the hippocampus during vascular dementia[J]. J Neuroimmunol, 2018, 320: 48-57.

26 张红,解忠祥,车峰远.炎症因素在血管性痴呆中的作用[J].中国老年学杂志,2022,5:1230-1234.
Zhang H, Xie ZX, Che FY. The role of inflammatory factors in vascular dementia[J]. Chin J Gerontol, 2022, 5: 1230-1234.

27 陈粤瑛,宋晓楠,杨树龙.炎症相关因子在血管性痴呆发病机制中的作用[J].中国生物化学与分子生物学报,2019,7:693-699.
Chen YY, Song XN, Yang SL. The role of inflammation-related factors in the pathogenesis of vascular dementia[J]. Chin J Biochem Mol Biol, 2019, 7: 693-699.

28 田晨,徐晓宏,吴红英,等.炎症小体AIM2信号通路调控及其潜在抑制剂的研究进展[J].现代药物与临床,2022,37(11):2641-2646.
Tian C, Xu XH, Wu HY, et al. Advances on regulation of inflammasome AIM2-related signaling pathways and its potential inhibitors[J]. Drugs Clin, 2022, 37(11): 2641-2646.

29 Kim H, Seo JS, Lee SY, et al. AIM2 inflammasome contributes to brain injury and chronic post-stroke cognitive impairment in mice[J]. Brain Behav Immun, 2020, 87: 765-776.

[本文编辑] 谭贝加 宋睿璞 朱 昊