

神经元癫痫模型 miRNA-212 对 BDNF/TrkB 信号转导通路影响的研究

蔡浩 吴秋静 朱延霞 赵文 李斌 宋毅军

【摘要】 目的 探讨海马神经元癫痫模型转染微小 RNA(miRNA)-212 对脑源性神经营养因子(BDNF)/酪氨酸蛋白激酶 B(TrkB)信号转导通路的影响。**方法** 经体外培养 7 d 的大鼠海马神经元(正常对照组),通过无镁离子细胞外液处理(3 h)方法建立癫痫神经元模型(癫痫模型组),继而以含镁离子正常细胞外液与慢病毒稀释液转染构建 miRNA-212 慢病毒表达载体;免疫荧光双染法、膜片钳技术和免疫印迹法观察转染 miRNA-212 对 BDNF/TrkB 信号转导通路的影响。**结果** 无论是正常海马神经元或癫痫神经元模型,与 BDNF 共培养后其磷酸化 TrkB(pTrkB)/TrkB 比值均显著升高($P = 0.001$),表明 BDNF/TrkB 信号转导通路被激活;转染 miRNA-212 后,癫痫神经元模型 pTrkB/TrkB 比值降低并低于未转染者($P = 0.001$),提示 BDNF/TrkB 信号转导通路受到抑制。**结论** BDNF 具有激活海马神经元 BDNF/TrkB 信号转导通路作用,而转染 miRNA-212 可抑制 BDNF/TrkB 信号转导通路。

【关键词】 癫痫; 海马; 脑源性神经营养因子; 蛋白酪氨酸激酶类; 微 RNAs; 转染; 免疫印迹法; 细胞,培养的

Study of miRNA-212 regulating BDNF/TrkB signaling pathway in epileptic neuron model

CAI Hao¹, WU Qiu-jing², ZHU Yan-xia³, ZHAO Wen⁴, LI Bin³, SONG Yi-jun¹

¹Department of Neurology, ⁴Department of Geriatrics, Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin 300052, China

²Grade 2007, 7-year Graduate School, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

³Department of Neurology, Tianjin Haibin People's Hospital, Tianjin 300280, China

Corresponding author: SONG Yi-jun (Email: songyijun2000@126.com)

【Abstract】 Objective To study the effect of epileptic neuron model after transfection of microRNA(miRNA)-212 on brain-derived neurotrophic factor(BDNF)/tyrosine protein kinase B(TrkB) signaling pathway. **Methods** The primary rat hippocampal neurons were cultivated *in vitro* for 7 d and were randomly divided into 8 groups: control group, epilepsy group, control + BDNF group, epilepsy + BDNF group, control + miRNA-212 group, epilepsy + miRNA-212 group, control + miRNA-212 + BDNF group, epilepsy + miRNA-212 + BDNF group. Epilepsy model of hippocampal neurons were established by being exposed to Mg²⁺ free extracellular fluid for 3 h. And then the neurons were put back into the normal extracellular fluid of magnesium for 2 h and slow virus diluent was dropwise added for transfection, so that miRNA-212 lentiviral vector was structured. Protein was extracted after 48-72 h. BDNF was added into media 10 min before protein was extracted. Immunofluorescence double staining, patch clamp technique and Western blotting were used to observe the effect of miRNA-212 transfection on BDNF/TrkB signaling pathway. **Results** After BDNF was injected, compared with the control group and epilepsy group, the phosphorylated TrkB(pTrkB)/TrkB value was significantly higher in control + BDNF group and epilepsy + BDNF group ($P = 0.001$), suggesting the BDNF/TrkB signaling pathway was activated. After transfection of

doi:10.3969/j.issn.1672-6731.2014.11.010

基金项目:卫计委国家临床重点专科建设项目;天津市应用基础与前沿技术研究计划项目(项目编号:14JCZDJC35400);天津市应用基础与前沿技术研究计划项目(项目编号:14JCYBJC28300);天津市滨海新区卫生局科技重点项目(项目编号:2013BWKZ003)

作者单位:300052 天津医科大学总医院神经内科(蔡浩、宋毅军),保健医疗部(赵文);300070 天津医科大学七年制 2007 级(吴秋静);300280 天津海滨人民医院神经内科(朱延霞,李斌)

通讯作者:宋毅军(Email:songyijun2000@126.com)

miRNA-212, the pTrkB/TrkB value in epilepsy + miRNA-212 + BDNF group was significantly lower than that in epilepsy + BDNF group ($P = 0.001$), suggesting the BDNF/TrkB signaling pathway was suppressed.

Conclusions When hippocampal neurons were transfected miRNA-212, the BDNF/TrkB signaling pathway was suppressed, but BDNF could activate the BDNF/TrkB signaling pathway.

【Key words】 Epilepsy; Hippocampus; Brain - derived neurotrophic factor; Protein - tyrosine kinases; MicroRNAs; Transfection; Immunoblotting; Cells, cultured

This study was supported by National Key Clinical Speciality Construction Project Launched by the National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China, Tianjin Research Program of Application Foundation and Advanced Technology (No. 14JCZDJC35400, 14JCYBJC28300) and Key Support Project of Tianjin Binhai New Area (No. 2013BWKZ003).

癫痫是由多种病因引起的突然、反复和短暂性中枢神经系统功能失调的慢性神经功能障碍性疾病,以大脑神经元过度同步放电为特征。颞叶癫痫(TLE)是临床最为常见的癫痫类型,大部分为难治性癫痫。癫痫发作引起的脑组织特征性病理改变,包括海马神经元丢失、异常苔藓纤维出芽(MFS)、突触重塑和海马硬化(HS)等。大量研究认为,癫痫发作致苔藓纤维出芽,后者引起的突触重塑形成海马回返性兴奋性环路,造成反复性癫痫发作和长期维持^[1]。脑源性神经营养因子(BDNF)是一种广泛分布于中枢神经系统的神经营养因子,在大脑不同区域发挥促神经元存活、生长发育和分化等作用,同时具有防止神经元死亡的作用,其生物学作用主要通过特异性受体酪氨酸蛋白激酶B(TrkB)介导而实现^[2]。微小RNA(miRNA)是一种长度约为22个核苷酸的内源性非编码蛋白的小分子RNA,通过与靶基因特定序列相互作用,转录后水平降解靶基因或抑制靶基因活性以调节基因表达^[3]。大脑表达多种miRNA,这些miRNA可以调控神经元树突形态、离子通道活动性、神经元迁徙和神经胶质功能。最近的研究表明,miRNA在阿尔茨海默病(AD)、额颞叶痴呆(FTD)、癫痫等多种中枢神经系统疾病中均有重要作用^[3-5],近年来,关于miRNA在癫痫中的作用越来越受到重视。最新观点认为,癫痫发生以及癫痫持续状态(SE)维持和发展的病理学机制均涉及miRNA在一个系统水平上对多种基因和蛋白质的表达进行调控^[6]。研究表明,癫痫持续状态动物模型脑组织miRNA表达水平可发生选择性变化^[7-10]。例如,miRNA-212在胃癌、阿尔茨海默病和额颞叶痴呆的发生与发展过程中的调控机制^[11-13]。由于阿尔茨海默病患者颞叶皮质和海马CA1区神经元miRNA-212表达下调,经过氧化氢预处理的PC12细胞可特异性抑制miRNA-212表达,从而使E1A结合

蛋白P300(EP300)、同源性磷酸酶-张力蛋白(PTEN)和叉头框蛋白O3a(FoxO3a)表达水平升高,尤其是FoxO3a过表达可以导致神经细胞凋亡^[12]。上述3种蛋白质均为磷脂酰肌醇-3激酶(PI3K)/丝氨酸/苏氨酸激酶(AKT)信号转导通路之关键调节因子,而PI3K/AKT通路恰是BDNF/TrkB下游信号转导通路中的重要途径之一。我们课题组前期研究结果显示,颞叶癫痫大鼠海马神经元共差异性表达23个miRNA,其中5个miRNA表达下调、18个表达上调^[10]。上述研究表明,miRNA可能在癫痫发病机制中发挥重要调节作用。为阐明miRNA-212表达变化对癫痫发作的影响,本研究拟通过动物实验阐明miRNA-212对癫痫大鼠海马神经元BDNF/TrkB信号转导通路的调控机制,以为其临床应用提供实验室参考依据。

材料与方 法

一、实验材料

1. 动物来源 健康3月龄Sprague-Dawley(SD)大鼠共20只,体重280~320g,由军事医学科学院实验动物中心提供[合格证号:SCXK-(军)2012-0004]。雌鼠15只、雄鼠5只,常温(26℃)条件下以雌雄比例3:1合笼饲养,自然采光,自由进食、饮水。

2. 试剂与药品 BDNF为美国PeproTech公司产品。DMEM/F12培养基(含质量分数为0.7%氯化钠、0.01%氯化钙和0.4%L-谷氨酰胺等),以及质量分数为20%胎牛血清(FBS)和0.25%胰蛋白酶-乙二胺四乙酸(EDTA)均购自美国Gibco公司。多聚赖氨酸由美国Sigma公司提供。免疫试剂I抗工作液[含兔抗大鼠微管相关蛋白-2(MAP-2)单克隆抗体(1:50,免疫荧光染色)、兔抗大鼠TrkB(1:75)和磷酸化TrkB(pTrkB,1:1000)多克隆抗体(Western

blotting 法)、大鼠抗 β -肌动蛋白(β -actin)单克隆抗体(1:5000)]分别购自美国 Cell Signaling 公司、美国 Santa Cruz 公司和北京中杉金桥生物技术有限公司; II 抗工作液[含异硫氰酸荧光素(FITC)标记山羊抗兔 IgG II 抗(1:50, 免疫荧光染色)、辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔和山羊抗大鼠 IgG II 抗(1:5000, Western blotting 法)]由北京中杉金桥生物技术有限公司提供。Western blotting 发光液为美国 Pierce-HyElone 公司产品。放射免疫沉淀试验(RIPA)细胞裂解液、苯甲基磺酰氟(PMSF)蛋白酶抑制剂,以及膜封闭液均由北京索来宝科技有限公司提供。

3. 实验仪器 Labofoge-400R 台式低温高速离心机和恒温二氧化碳孵化箱均为德国 Heraeus 公司产品。Olympus IX-71 荧光倒置相差显微镜由日本 Olympus 公司提供。Western blotting 检测仪购自美国 BioRad 公司。Syngene G:BOX 化学发光检测系统购自美国 Syngene 公司。

二、实验方法

1. 新生大鼠海马神经元体外培养 (1)体外培养:新生(<24 h)SD 大鼠迅速冰上处死,以提前预冷的质量分数为 75%乙醇溶液浸泡 2 min,断头取脑、分离双侧海马组织,置解剖液中剔除脑膜和血管、剪碎海马组织,置培养皿中。经质量分数为 0.125%胰蛋白酶 2 ml 完全消化,置 DMEM/F12 培养基终止消化并吹打计数;接种于直径为 6 cm 培养皿、细胞密度为 $4 \times 10^6/\text{ml}$,恒温二氧化碳孵化箱中连续培养 7 d。(2)癫痫神经元模型制备:将经体外培养 7 d 的海马神经元置无镁离子细胞外液中处理 3 h 制备癫痫神经元模型,再重新置含镁离子正常细胞外液中培养 2 h、转染,滴加慢病毒稀释液 20 μl ,转染 48~72 h 后提取总蛋白质。BDNF 各组于蛋白质提取前 10 min 滴加 100 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的 BDNF 2 μl 。(3)分组:采用完全随机化分组法分为正常对照组、癫痫模型组(癫痫组)、正常海马神经元与 BDNF 共培养组(正常+BDNF 组)、癫痫模型海马神经元与 BDNF 共培养组(癫痫+BDNF 组)、正常海马神经元与 miRNA-212 共培养组(正常+miRNA-212 组)、癫痫模型海马神经元与 miRNA-212 共培养组(癫痫+miRNA-212 组)、正常海马神经元与 miRNA-212 和 BDNF 共培养组(正常+miRNA-212+BDNF 组)、癫痫模型海马神经元与 miRNA-212 和 BDNF 共培养组(癫痫+miRNA-212+BDNF 组),共 8 组。

2. 微管相关蛋白-2 与 4',6-二脒基-2-苯基吡啶免疫荧光双染法鉴定海马神经元 经体外培养的海马神经元接种于 6 孔板,每孔细胞密度 $1 \times 10^6/\text{ml}$,培养 7 d 后以质量分数为 4%多聚甲醛溶液室温下固定 15 min,磷酸盐缓冲液冲洗 5 min($\times 3$ 次),质量分数为 0.3% Triton X-100 通透、磷酸盐缓冲液冲洗 5 min($\times 3$ 次);滴加山羊血清工作液封闭 30 min、吸净,滴加兔抗大鼠 MAP-2 单克隆抗体(1:50)4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,室温孵育 1 h、磷酸盐缓冲液冲洗 5 min($\times 3$ 次);滴加 FITC 标记山羊抗兔 IgG II 抗(1:50)避光室温放置 25~30 min,磷酸盐缓冲液冲洗 5 min($\times 3$ 次)、4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)染胞核,室温放置 5 min、磷酸盐缓冲液冲洗 5 min($\times 3$ 次)。甘油封片,荧光倒置相差显微镜采集图像。

3. 膜片钳技术检测海马神经元痫样放电 采用膜片钳放大器识取癫痫神经元模型的电压信号,并经 Digidata 1440A 转换器(美国 MDC 公司)转换后输入计算机,分别采用 Clampex 7.0 软件、Fetchan 6.0 软件和 Origin 5.0 软件分析制图,记录正常对照组和癫痫组海马神经元放电情况。

4. 构建 miRNA-212 慢病毒表达载体 采用 Trizol 法提取转染细胞总 RNA, NanoDrop 法检测其摩尔浓度和纯度,琼脂糖凝胶电泳鉴定总 RNA 完整性。逆转录聚合酶链反应(rt-PCR)对 miRNA-212 序列行 EcoRI、BamHI 和 Lentivector 质粒载体双酶切、回收片段,按摩尔浓度 3:1 行 10 μl 体系连接反应,16 $^{\circ}\text{C}$ 水浴连接条件下过夜构成重组质粒。将 10 μl 连接产物和 22 μl 0.10 mmol/L 氯化钙、11 μl 1 \times 柠檬酸缓冲液 100 μl 混合,于连接产物混合物中快速滴加 DH5 α 感受态宿主菌,混匀、冰浴 5 min, 42 $^{\circ}\text{C}$ 下热休克 90 s、再冰浴 5 min;取 100 μl 转化菌液,37 $^{\circ}\text{C}$ 、培养 1 h,然后培养皿倒置过夜;碱法少量提取质粒,完成重组质粒的鉴定;将质粒导入人胚肾细胞 293(HEK293),转染 48~72 h 收集上清,分装置-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱长期保存。

5. Western blotting 法检测 pTrkB 和 TrkB 表达变化 于体外培养的海马神经元经 RIPA 细胞裂解液裂解后收集细胞,超声波粉碎,于离心半径 5 cm、转速 15 000 r/min 高速离心 15 min,取上清液,与上样缓冲液共同煮沸制备蛋白质样品。取等量样品经十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离、聚偏二氟乙烯(PVDF)膜转膜、膜封闭液封闭 1 h,分别滴加大鼠抗 β -肌动蛋白单克隆抗体(1:

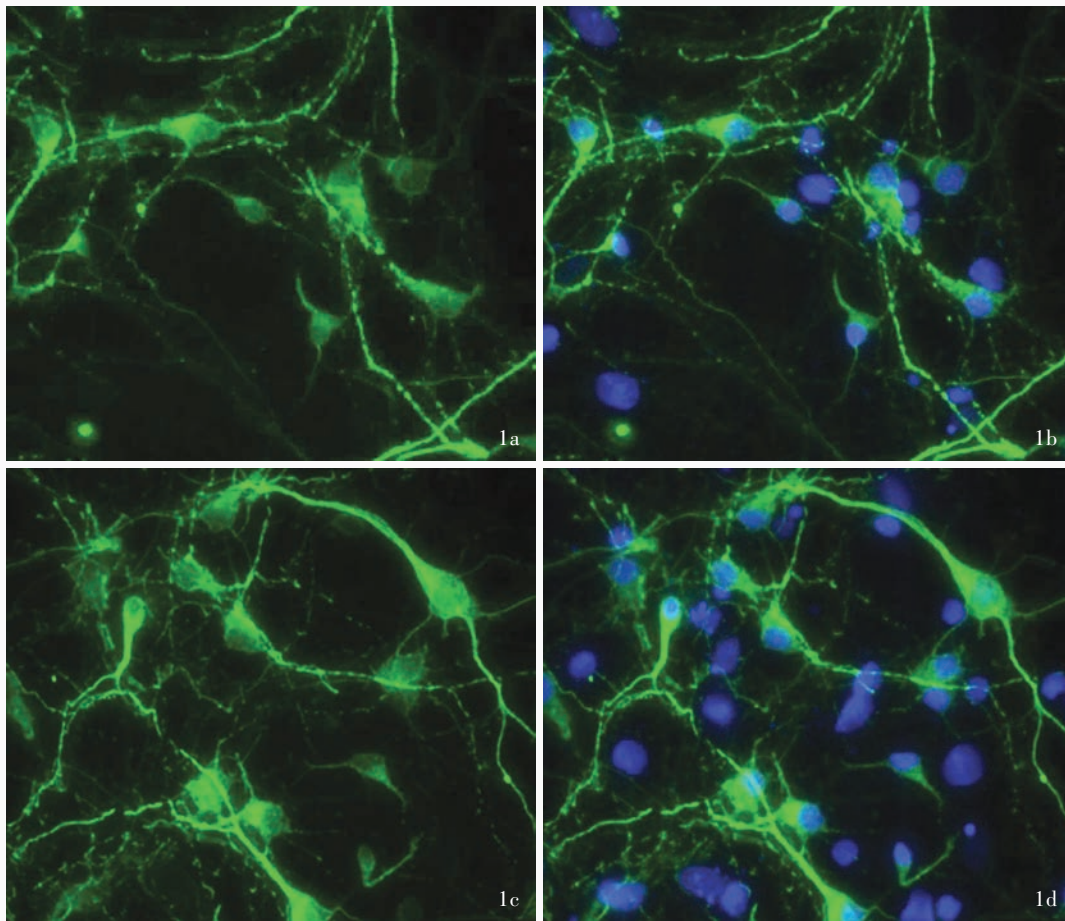


图 1 体外培养第 7 天时荧光倒置相差显微镜观察所见 $\times 400$ 1a 对照组大鼠海马神经元胞体丰满, 周围光晕明显, 突起交织成稀疏的网络(绿色荧光代表 MAP-2 阳性神经元) MAP-2 染色 1b 正常对照组大鼠海马神经元胞体丰满, 周围光晕明显, 突起交织成稀疏的网络(绿色荧光代表 MAP-2 阳性神经元、蓝色荧光代表 DAPI 阳性细胞核) MAP-2 与 DAPI 双染色 1c 癫痫组大鼠海马神经元形态未见明显异常(绿色荧光代表 MAP-2 阳性神经元) MAP-2 染色 1d 癫痫组大鼠海马神经元形态未见明显异常(绿色荧光代表 MAP-2 阳性神经元、蓝色荧光代表 DAPI 阳性细胞核) MAP-2 与 DAPI 双染色

Figure 1 Fluorescent inverted phase contrast microscopy findings on the morphology of rat hippocampal neurons after original generation for 7 d. $\times 400$ Hippocampal neurons in control group had great soma and obvious halo around. Protuberances interwove into a sparse network (green fluorescence indicated MAP-2-positive neurons, Panel 1a). MAP-2 staining Hippocampal neurons in control group had great soma and obvious halo around. Protuberances interwove into a sparse network (green fluorescence indicated MAP-2-positive neurons and blue fluorescence indicated DAPI-positive nuclei, Panel 1b). MAP-2 and DAPI double staining Hippocampal neurons in epilepsy group presented no abnormal morphology (green fluorescence indicated MAP-2-positive neurons, Panel 1c). MAP-2 staining Hippocampal neurons in epilepsy group presented no abnormal morphology (green fluorescence indicated MAP-2-positive neurons and blue fluorescence indicated DAPI-positive nuclei, Panel 1d). MAP-2 and DAPI double staining

5000)、兔抗大鼠 TrkB(1:75)和 pTrkB(1:1000)多克隆抗体, 4℃过夜、滴加山羊抗大鼠和山羊抗兔 IgG II 抗(1:5000), 化学发光检测系统成像。

三、统计分析方法

采用 SPSS 19.0 统计软件进行数据处理与分析。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, Levene 法行方差齐性检验, 多个样本均数的比较采用析因设计资料的方差分析, 两两比较行 LSD-*t* 检验。以 $P \leq 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、免疫荧光双染法鉴定海马神经元

经免疫荧光双染法分析, 与正常对照组相比, 经体外培养 7 d 的癫痫组大鼠海马神经元形态未见明显异常(图 1)。

二、膜片钳技术检测海马神经元痫样放电

与正常对照组相比, 癫痫组大鼠海马神经元自发性放电频率明显增加($P = 0.001$; 表 1, 图 2), 证实

表 1 癫痫组与正常对照组大鼠海马神经元自发性放电频率的比较($\bar{x} \pm s$, Hz)

Table 1. Comparison of the frequency of neuronal spontaneous discharge between control group and epilepsy group ($\bar{x} \pm s$, Hz)

Group	N	Frequency
Control	9	0.45 ± 0.05
Epilepsy	9	1.86 ± 0.19*

*Levene test, $F = 6.983$, $P = 0.018$. Adjusted $t = -20.305$, $P = 0.001$

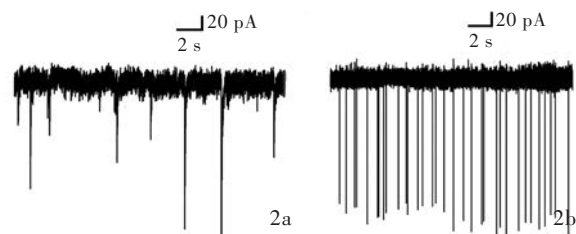


图 2 膜片钳技术检测正常对照组和癫痫组大鼠海马神经元自发性放电 2a 正常对照组大鼠海马神经元偶见自发性放电 2b 癫痫组大鼠海马神经元呈持续强直高频爆发的自发性放电

Figure 2 Patch clamp technique was used to test the spontaneous discharge of rat hippocampal neurons in control group and epilepsy group. Hippocampal neurons in control group had spontaneous discharge by accident (Panel 2a). Hippocampal neurons in epilepsy group showed spontaneous discharge of continuous rigidity and high-frequency burst (Panel 2b).

该模型为海马神经元癫痫模型。

三、Western blotting 法检测海马神经元 pTrkB 和 TrkB 表达变化

各组大鼠海马神经元 pTrkB 和 TrkB 表达检测结果显示,加入 BDNF 后 pTrkB/TrkB 比值差异有统计学意义($P = 0.001$),加入 miRNA-212 后 pTrkB/TrkB 比值差异有统计学意义($P = 0.001$),而 BDNF 与 miRNA-212 之间不存在交互作用($P = 0.134$;表 2,3);正常 + BDNF 组大鼠海马神经元 pTrkB/TrkB 比值高于正常对照组、癫痫 + BDNF 组高于癫痫组、癫痫 + miRNA-212 + BDNF 组高于癫痫 + miRNA-212 组,但均低于癫痫 + BDNF 组(表 2,3;图 3)。

讨 论

BDNF 是一种主要分布于中枢神经系统的神经营养因子,具有维持神经元存活和促进生长分化之功能。TrkB 为 BDNF 特异性功能受体^[2],共有 3 种亚型,分别为 1 个全长型(TrkB.FL)和 2 个截短型(TrkB.T1 和 TrkB.T2)^[14]。这 3 种亚型的配体识别区和跨膜信号转导区结构相同,但仅全长型具有完整

的胞内受体酪氨酸蛋白激酶区,因此虽然截短型亦可与 BDNF 结合,但并不能激活其下游信号转导。对多种癫痫持续状态动物模型的研究证实,癫痫发作后 BDNF 和 TrkB 表达水平,以及分布均会随发作时间的不同而出现变化,提示 BDNF 与癫痫的发生发展有着密切关系^[15]。近年来,Hou 等^[16]采用免疫组织化学染色和免疫印迹法对颞叶癫痫患者海马齿状回和 CA3 区 BDNF/TrkB 信号转导通路表达变化进行观察,发现其表达水平显著升高;而经抗癫痫药物(AEDs)丙戊酸治疗后,其表达水平明显下降,提示 BDNF/TrkB 信号转导通路存在致病作用。Wang 等^[17]的研究结果显示,脑室内注射环噻嗪前预先注射 TrkB 抑制剂 K252a 或特异性 TrkB 受体抗体,可显著抑制环噻嗪诱导的癫痫样电活动。而且,经体外培养的海马神经元急性予以 TrkB 抑制剂 K252a 可抑制其癫痫样电活动爆发和动作电位点燃,表明 BDNF/TrkB 信号转导通路激活对环噻嗪诱导的癫痫样电活动至关重要。BDNF 与甲基化 CpG 结合蛋白 2(MeCP2)关系密切,BDNF 是由 MeCP2 调控的下游靶分子^[18],经体外培养的 Rett 综合征模型鼠皮质神经元 MeCP2 过表达可使 BDNF 表达水平升高^[19];反之,MeCP2 功能缺失(携带 MeCP2 T308 突变)小鼠脑组织 BDNF 表达下调^[18],证实 MeCP2 对 BDNF 的表达变化具有调控作用。MeCP2 与 miRNA-212 可以相互抑制,二者共同调控 BDNF 的表达变化。研究显示,敲除 HEK293 细胞 MeCP2 基因后,其内 miRNA-212 表达水平即升高;若于培养细胞中加入 DNA 甲基转移酶抑制剂 5-Aza-dC 则可抑制 DNA 甲基化状态,减少 MeCP2 对基因表达的抑制作用,从而增加 miRNA-212 表达水平^[20]。大鼠 PC12 细胞转染 miRNA-212 后,总 MeCP2 表达水平下降;若转染经锁核酸(LNA)修饰的反义寡核苷酸序列,则能够特异性抑制 miRNA-212 表达,聚合酶链反应显示长链 3'-非翻译区(UTR)MeCP2 表达水平升高^[20],提示 miRNA-212 具有抑制 MeCP2 表达之功效。

既往研究表明,BDNF 通过激活其受体 TrkB 而使海马神经元兴奋性增加,诱发颞叶癫痫^[21-22]。基于上述理论,我们选择全长型 TrkB 和 pTrkB 以探讨癫痫发作后外源性 BDNF 的神经保护作用是否与 TrkB 磷酸化过程激活有关。本研究结果显示:正常 + BDNF 组大鼠海马神经元 pTrkB/TrkB 比值明显升高且为正常对照组的 2 倍,癫痫 + BDNF 组 pTrkB/TrkB 比值也显著高于癫痫组,但明显低于正常 +

表 2 不同处理组大鼠海马神经元 pTrkB/TrkB 比值的比较 ($\bar{x} \pm s$, 相对灰度值)

Table 2. Comparison of pTrkB/TrkB ratio among 8 groups ($\bar{x} \pm s$, relative gray value)

Group	N	pTrkB/TrkB	Group	N	pTrkB/TrkB
Control	6	1.00 ± 0.00	Control + miRNA-212	6	0.60 ± 0.05
Epilepsy	6	0.66 ± 0.07	Epilepsy + miRNA-212	6	0.36 ± 0.06
Control + BDNF	6	2.11 ± 0.15	Control + miRNA-212 + BDNF	6	0.87 ± 0.09
Epilepsy + BDNF	6	1.02 ± 0.12	Epilepsy + miRNA-212 + BDNF	6	0.91 ± 0.51

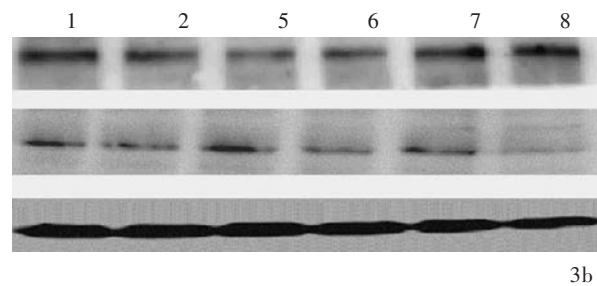
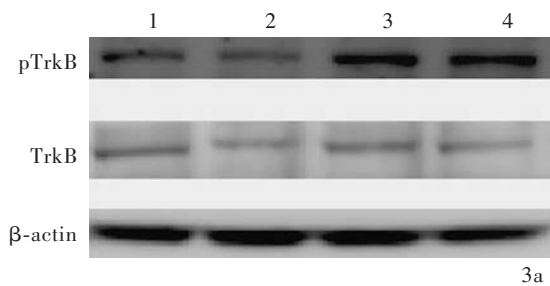
TrkB, tyrosine protein kinase B, 酪氨酸蛋白激酶 B; pTrkB, phosphorylated TrkB, 磷酸化酪氨酸蛋白激酶 B; BDNF, brain-derived neurotrophic factor, 脑源性神经营养因子

表 3 不同处理组大鼠海马神经元 pTrkB/TrkB 比值的析因设计资料的方差分析表

Table 3. Factorial ANOVA of pTrkB/TrkB ratio in 8 groups

Source of variation	SS	df	MS	F value	P value
BDNF	3.936	1	3.936	29.183	0.001
miRNA-212	3.147	1	3.147	23.315	0.001
BDNF × miRNA-212	0.315	1	0.315	2.336	0.134
Error	5.939	44	0.315		
Total variation	55.884	48			

TrkB, tyrosine protein kinase B, 酪氨酸蛋白激酶 B; pTrkB, phosphorylated TrkB, 磷酸化酪氨酸蛋白激酶 B; BDNF, brain-derived neurotrophic factor, 脑源性神经营养因子



1: control, 正常对照组; 2: epilepsy, 癫痫组; 3: control + BDNF, 正常 + BDNF 组; 4: epilepsy + BDNF, 癫痫 + BDNF 组; 5: control + miRNA-212, 正常 + miRNA-212 组; 6: epilepsy + miRNA-212, 癫痫 + miRNA-212 组; 7: control + miRNA-212 + BDNF, 正常 + miRNA-212 + BDNF 组; 8: epilepsy + miRNA-212 + BDNF, 癫痫 + miRNA-212 + BDNF 组。TrkB, tyrosine protein kinase B, 酪氨酸蛋白激酶 B; pTrkB, phosphorylated TrkB, 磷酸化酪氨酸蛋白激酶 B; β-actin, β-肌动蛋白

图 3 Western blotting 法检测不同处理组大鼠海马神经元 pTrkB、TrkB 和内参照物 β-肌动蛋白表达变化 3a 正常对照组、癫痫组、正常 + BDNF 组、癫痫 + BDNF 组的比较 3b 正常对照组、癫痫组、正常 + miRNA-212 组、癫痫 + miRNA-212 组、正常 + miRNA-212 + BDNF 组、癫痫 + miRNA-212 + BDNF 组的比较

Figure 3 Western blotting was used to detect pTrkB, TrkB and β-actin in 8 groups. Comparison of control group, epilepsy group, control + BDNF group and epilepsy + BDNF group (Panel 3a). Comparison of control group, epilepsy group, control + miRNA-212 group, epilepsy + miRNA-212 group, control + miRNA-212 + BDNF group and epilepsy + miRNA-212 + BDNF group (Panel 3b).

BDNF 组; 而癫痫 + miRNA-212 + BDNF 组 pTrkB/TrkB 比值明显低于癫痫 + BDNF 组, 但高于癫痫 + miRNA-212 组。综上所述, 癫痫状态下 BDNF/TrkB 信号转导通路处于抑制状态, 通过加入外源性 BDNF 可激活该通路, 改善其抑制状态。通过转染 miRNA-212 下调 BDNF 表达可加剧 BDNF/TrkB 信号转导通路的抑制状态。miRNA-212 可通过 BDNF/TrkB 信号转导通路对癫痫的发生与发展产生影响, 但具体作用机制尚不十分清楚, 随着对 BDNF/TrkB 信号转导通路作用机制和癫痫发病机制的进一步认识, 将为颞叶癫痫的治疗提供新的思路和方法。

参 考 文 献

[1] Chang BS, Lowenstein DH. Epilepsy. N Engl J Med, 2003, 349: 1257-1266.
 [2] Yoshii A, Constantine-Paton M. BDNF induces transport of PSD-95 to dendrites through PI3K - AKT signaling after NMDA

receptor activation. Nat Neurosci, 2007, 10:702-711.
 [3] Hébert SS, Wang WX, Zhu Q, Nelson PT. A study of small RNAs from cerebral neocortex of pathology-verified Alzheimer's disease, dementia with lewy bodies, hippocampal sclerosis, frontotemporal lobar dementia, and non-demented human controls. J Alzheimers Dis, 2013, 35:335-348.
 [4] Jimenez-Mateos EM, Henshall DC. Epilepsy and microRNA. Neuroscience, 2013, 238:218-229.
 [5] Deng YY, Hou DR, Tian M, Li W, Feng XL. β-amyloid peptide deposition and expression of related miRNAs in the cerebellum of a mouse model of Alzheimer's disease. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao, 2014, 34:323-328. [邓炎尧, 侯德仁, 田密, 李维, 奉夏露. AD 模型小鼠海马和小脑 Aβ 的沉积与相关 miRNAs 表达的变化. 南方医科大学学报, 2014, 34:323-328.]
 [6] Huntzinger E, Izaurralde E. Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. Nat Rev Genet, 2011, 12:99-110.
 [7] Jimenez-Mateos EM, Engel T, Merino-Serrais P, McKiernan RC, Tanaka K, Mouri G, Sano T, O'Tuathaigh C, Waddington JL, Prenter S, Delanty N, Farrell MA, O'Brien DF, Conroy RM, Stallings RL, DeFelipe J, Henshall DC. Silencing microRNA-134 produces neuroprotective and prolonged seizure-suppressive effects. Nat Med, 2012, 18:1087-1094.

- [8] Pichardo-Casas I, Goff LA, Swerdel MR, Athie A, Davila J, Ramos-Brossier M, Lapid-Volosin M, Friedman WJ, Hart RP, Vaca L. Expression profiling of synaptic microRNAs from the adult rat brain identifies regional differences and seizure-induced dynamic modulation. *Brain Res*, 2012, 1436:20-33.
- [9] McKiernan RC, Jimenez-Mateos EM, Sano T, Bray I, Stallings RL, Simon RP, Henshall DC. Expression profiling the microRNA response to epileptic preconditioning identifies miR-184 as a modulator of seizure-induced neuronal death. *Exp Neurol*, 2012, 237:346-354.
- [10] Song YJ, Tian XB, Zhang S, Zhang YX, Li X, Li D, Cheng Y, Zhang JN, Kang CS, Zhao W. Temporal lobe epilepsy induces differential expression of hippocampal miRNAs including let-7e and miR-23a/b. *Brain Res*, 2011, 1387:134-140.
- [11] Jiping Z, Ming F, Lixiang W, Xiuming L, Yuqun S, Han Y, Zhifang L, Yundong S, Shili L, Chunyan C, Jihui J. MicroRNA-212 inhibits proliferation of gastric cancer by directly repressing retinoblastoma binding protein 2. *J Cell Biochem*, 2013, 114:2666-2672.
- [12] Wong HK, Veremeyko T, Patel N, Lemere CA, Walsh DM, Esau C, Vanderburg C, Krichevsky AM. De-repression of FOXO3a death axis by microRNA - 132 and - 212 causes neuronal apoptosis in Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet*, 2013, 22:3077-3092.
- [13] Chen-Plotkin AS, Unger TL, Gallagher MD, Bill E, Kwong LK, Volpicelli-Daley L, Busch JI, Akle S, Grossman M, Van Deerlin V, Trojanowski JQ, Lee VM. TMEM106B, the risk gene for frontotemporal dementia, is regulated by the microRNA - 132/212 cluster and affects progranulin pathways. *J Neurosci*, 2012, 32:11213-11227.
- [14] Miyata K, Omori N, Uchino H, Yamaguchi T, Isshiki A, Shibasaki F. Involvement of the brain-derived neurotrophic factor/TrkB pathway in neuroprotective effect of cyclosporin A in forebrain ischemia. *Neuroscience*, 2001, 105:571-578.
- [15] Gill R, Chang PK, Prenosil GA, Deane EC, McKinney RA. Blocking brain-derived neurotrophic factor inhibits injury-induced hyperexcitability of hippocampal CA3 neurons. *Eur J Neurosci*, 2013, 38:3554-3566.
- [16] Hou X, Wang X, Zhang L. Conditional downregulation of brain-derived neurotrophic factor and tyrosine kinase receptor B blocks epileptogenesis in the human temporal lobe epilepsy hippocampus. *Neurol India*, 2010, 58:29-34.
- [17] Wang Y, Qi JS, Kong S, Sun Y, Fan J, Jiang M, Chen G. BDNF-TrkB signaling pathway mediates the induction of epileptiform activity induced by a convulsant drug cyclothiazide. *Neuropharmacology*, 2009, 57:49-59.
- [18] Chang Q, Khare G, Dani V, Nelson S, Jaenisch R. The disease progression of MeCP2 mutant mice is affected by the level of BDNF expression. *Neuron*, 2006, 49:341-348.
- [19] Klein ME, Liroy DT, Ma L, Impey S, Mandel G, Goodman RH. Homeostatic regulation of MeCP2 expression by a CREB-induced microRNA. *Nat Neurosci*, 2007, 10:1513-1514.
- [20] Im HI, Hollander JA, Bali P, Kenny PJ. MeCP2 controls BDNF expression and cocaine intake through homeostatic interactions with microRNA-212. *Nat Neurosci*, 2010, 13:1120-1127.
- [21] Nissenkorn A, Gak E, Vecsler M, Reznik H, Menascu S, Ben Zeev B. Epilepsy in Rett syndrome: the experience of a National Rett Center. *Epilepsia*, 2010, 51:1252-1258.
- [22] Scharfman HE, Goodman JH, Sollas AL, Croll SD. Spontaneous limbic seizures after intrahippocampal infusion of brain-derived neurotrophic factor. *Exp Neurol*, 2002, 174:201-214.

(收稿日期:2014-10-22)

中国脑血管病大会2015征文通知

为进一步提高我国脑血管病诊断与治疗水平,积极推动我国脑血管病规范化预防和治疗,由中华医学会、中华医学会神经病学分会主办,中华医学会神经病学分会脑血管病学组、江苏省医学会、江苏省医学会神经病学分会承办的“中国脑血管病大会2015”拟定于2015年4月9-11日在江苏省南京市召开。届时将邀请国内外著名脑血管病专家做专题报告。会议重点内容包括:脑血管病急性期治疗、脑血管病一二级预防、脑血管病影像学诊断与评价、血管内介入治疗、出血性脑血管病诊断与治疗、少见脑血管病诊断与治疗、脑血管病基础与转化医学、神经康复、病例讨论及最新指南解读。会议将密切结合实践与指南、基础与临床,倡导跟着指南行动、兼顾普及与提高,围绕脑血管病领域最新热点和迫切需要解决的问题以专题讲座、论文发言、讨论与争鸣、视频演示等多种形式进行交流。欢迎全国同道积极参会和投稿。参会者将授予国家级继续医学教育I类学分。

1. 征文内容 脑卒中流行病学与危险因素研究;脑卒中预防;缺血性卒中病因与发病机制;脑卒中评价与诊断;神经、血管影像学特殊少见、疑难病例及病理报告;短暂性脑缺血发作和轻型卒中;脑卒中急救及组织管理体系;脑卒中急性期并发症处理及护理;脑卒中后康复;缺血性卒中急性期治疗;介入、外科治疗脑出血;蛛网膜下隙出血;血管性认知损害/痴呆;静脉系统脑血管病;脑卒中基础研究及转化医学;脑血管病遗传研究;脑血管病规范化诊断与治疗(循证医学、指南、规范等)。

2. 征文要求 尚未在国内外学术会议和公开刊物上发表的论文摘要1份,字数800~1000字,请按照背景与目的、材料与方法、结果、结论四部分格式书写,并于文题下注明作者姓名、工作单位、邮政编码、联系方式、Email地址,以及通讯作者和联系方式。入选论文将刊登于会议论文集汇编中,并推荐至相关脑血管病杂志发表。

3. 投稿方式 会议仅接受网络投稿,请登录大会网站 www.cmaccvd.org 在线注册提交。

4. 截稿日期 2015年1月15日。

5. 联系方式 北京市东城区东四西大街42号226室中华医学学术会务部。邮政编码:100710。联系人:张悦,陈华雷(网络投稿咨询,18600959473)。联系电话:(010)85158559,89292552-839。传真:(010)65123754。Email: cmaccvd@cma.org.cn。详情请登录大会网站 www.cmaccvd.org。