

# 抑制 miRNA-193a-5p 表达对癫痫模型大鼠 海马神经元保护机制研究

周弟弥 甘露 陈琳 周成芳

**【摘要】目的** 探讨抑制 miRNA-193a-5p 表达对癫痫大鼠海马组织神经元损伤和凋亡的保护作用及其在颞叶癫痫发病机制中的作用。**方法** 采用氯化锂-匹罗卡品制备癫痫大鼠模型,随机分为模型组、miRNA-193a-5p 抑制剂组(miRNA-193a-5p antagomir 组)及其阴性对照组(antagomir-NC 组)。分别于建模后第 1、3 和 7 天时记录模型大鼠单位时间内异常脑电波次数;第 7 天经酶联免疫吸附试验检测海马组织炎症因子[白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )]表达变化,化学比色法分析超氧化物歧化酶(SOD)活性、丙二醛(MDA)含量,TUNEL 染色检测神经元凋亡数目,荧光定量聚合酶链反应和 Western blotting 法分别检测 miRNA-193a-5p 和 G 蛋白耦联受体 39(GPR39)mRNA,以及 cleaved Caspase-3、Bax、Bcl-2 和 GPR39 蛋白相对表达量,双荧光素酶报告实验验证 miRNA-193a-5p 与 GPR39 的靶向作用关系。**结果** (1)各项指标在不同处理组和各观察时间点之间的变化差异均具有统计学意义(均  $P = 0.000$ )。与正常对照组相比,模型组、antagomir-NC 组和 miRNA-193a-5p antagomir 组 miRNA-193a-5p 相对表达量(均  $P = 0.000$ ),炎症因子[IL-1 $\beta$ (均  $P < 0.05$ )、IL-6(均  $P = 0.000$ )和 TNF- $\alpha$ (均  $P = 0.000$ )]表达水平,MDA 含量(均  $P < 0.01$ ),神经元凋亡数目(均  $P = 0.000$ ),cleaved Caspase-3(均  $P = 0.000$ )和 Bax 蛋白(均  $P = 0.000$ )相对表达量升高,而 SOD 活性(均  $P < 0.01$ )、Bcl-2 蛋白相对表达量(均  $P = 0.000$ )、GPR39 mRNA(均  $P = 0.000$ )和 GPR39 蛋白(均  $P < 0.01$ )相对表达量降低。与模型组和 antagomir-NC 组相比,miRNA-193a-5p antagomir 组 miRNA-193a-5p 相对表达量(均  $P = 0.000$ ),炎症因子[IL-1 $\beta$ (均  $P = 0.000$ )、IL-6(均  $P = 0.000$ )和 TNF- $\alpha$ (均  $P < 0.01$ )]表达水平,MDA 含量(均  $P = 0.000$ ),神经元凋亡数目(均  $P = 0.000$ ),cleaved Caspase-3(均  $P = 0.000$ )和 Bax 蛋白(均  $P = 0.000$ )相对表达量,以及第 1、3 和 7 天脑电波异常次数减少或降低(均  $P < 0.05$ ),而 SOD 活性(均  $P = 0.000$ )、Bcl-2 蛋白相对表达量(均  $P = 0.000$ )、GPR39 mRNA(均  $P = 0.000$ )和 GPR39 蛋白(均  $P = 0.000$ )相对表达量升高。(2)经双荧光素酶报告实验验证,miRNA-193a-5p mimic 组人胚肾细胞 293T(HEK293T)转染 GPR39-WT 后荧光素酶活性降低且低于 mimic-NC 组( $t = 16.340, P = 0.000$ )。**结论** 抑制 miRNA-193a-5p 表达可以降低癫痫大鼠海马组织氧化应激和炎症反应,抑制海马组织神经元凋亡,其机制可能与靶向上调 GPR39 表达有关。

**【关键词】** 癫痫,颞叶; 海马; 细胞凋亡; 疾病模型,动物

## Effect of inhibiting the expression of miRNA - 193a - 5p on hippocampal neuron protection in epileptic model rats

ZHOU Di-mi, GAN Lu, CHEN Lin, ZHOU Cheng-fang

Department of Neurology, The Second Affiliated Hospital, Hengyang Medical School, University of South China, Hengyang 421001, Hu'nan, China

Corresponding author: ZHOU Di-mi (Email: dyjq3361@163.com)

**【Abstract】Objective** To investigate the effect of inhibiting the expression of miRNA-193a-5p on neuronal damage and apoptosis in hippocampus of epileptic rats, and to explore its role in the pathogenesis of temporal lobe epilepsy. **Methods** Epileptic rat models were prepared with lithium chloride-pilocarpine and randomly divided into model group, miRNA-193a-5p inhibitor group (miRNA-193a-5p antagomir group)

doi:10.3969/j.issn.1672-6731.2023.03.011

基金项目:湖南省医药卫生科研计划项目(项目编号:B2014-056)

作者单位:421001 南华大学衡阳医学院附属第二医院神经内科

通讯作者:周弟弥,Email:dyjq3361@163.com

and negative control group (antagomir-NC group). The frequency of abnormal brainwaves per unit time was recorded at first, 3th and 7th day after model preparation. On the 7th day, the expression of hippocampal inflammatory factors [interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )] were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), the activity of superoxide dismutase (SOD) and the content of malondialdehyde (MDA) were detected by chemical colorimetry, and the number of neuronal apoptosis was calculated by TUNEL staining. The relative expression of miRNA-193a-5p and G-protein coupled receptor 39 (GPR39), and expression of cleaved Caspase-3, Bax, Bcl-2, and GPR39 proteins were detected by fluorescence quantitative polymerase chain reaction (PCR) and Western blotting, respectively. Double luciferase reporter assay confirmed the targeting relationship between miRNA-193a-5p and GPR39.

**Results** 1) There were statistically significant differences in each index in different treatment groups and at each observation time point ( $P = 0.000$ , for all). Compared with normal control group, the relative expression of miRNA-193a-5p in model group, antagomir-NC group and miRNA-193a-5p antagomir group ( $P = 0.000$ , for all), the expression of inflammatory factors [IL-1 $\beta$  ( $P < 0.05$ , for all), IL-6 ( $P = 0.000$ , for all) and TNF- $\alpha$  ( $P = 0.000$ , for all)], the content of MDA ( $P < 0.01$ , for all), the number of apoptosis of neurons ( $P = 0.000$ , for all), the relative expression of cleaved Caspase-3 ( $P = 0.000$ ) and Bax ( $P = 0.000$ ) increased. The relative expression of SOD activity ( $P < 0.01$ , for all), Bcl-2 relative expression ( $P = 0.000$ , for all), GPR39 mRNA ( $P = 0.000$ , for all) and GPR39 protein ( $P < 0.01$ , for all) were decreased. Compared with model group and antagomir-NC group, the relative expression of miRNA-193a-5p in antagomir group ( $P = 0.000$ , for all), the expression of inflammatory cytokines [IL-1 $\beta$  ( $P = 0.000$ , for all), IL-6 ( $P = 0.000$ , for all) and TNF- $\alpha$  ( $P < 0.01$ , for all)], the content of MDA ( $P = 0.000$ , for all), the number of neuronal apoptosis ( $P = 0.000$ , for all), the relative expression of cleaved Caspase-3 ( $P = 0.000$ , for all) and Bax ( $P = 0.000$ , for all), as well as the number of abnormal brain waves at day 1, 3 and 7 ( $P < 0.05$ , for all) were decreased. The relative expression of SOD activity ( $P = 0.000$ , for all), Bcl-2 ( $P = 0.000$ , for all), GPR39 mRNA ( $P = 0.000$ , for all) and GPR39 protein ( $P = 0.000$ , for all) increased. 2) Double luciferase assay showed the luciferase activity of HEK293T cells transfected with miRNA-193a-5p mimic was decreased after transfection of GPR39-WT, and was lower than that of mimic-NC group ( $t = 16.340$ ,  $P = 0.000$ ).

**Conclusions** Inhibiting the expression of miRNA-193a-5p can reduce the expression of oxidative stress and inflammation in the hippocampus of epileptic rats, and inhibit hippocampal neuron apoptosis. The mechanism may be related to the targeted up-regulation of GPR39 expression.

**【Key words】** Epilepsy, temporal lobe; Hippocampus; Apoptosis; Disease models, animal

This study was supported by Medical and Health Scientific Research Plan Project of Hu'nan (No. B2014-056).

**Conflicts of interest:** none declared

癫痫是儿童常见的神经系统疾病,发育性和癫痫性脑病(DEE)引起的脑损伤通常伴有认知功能障碍、记忆障碍、情绪异常等<sup>[1]</sup>,其中有20%~30%的患儿经标准抗癫痫发作药物(ASM)治疗后病情仍无法缓解,故称之为耐药性癫痫<sup>[2]</sup>。颞叶癫痫(TLE)是耐药性癫痫的最常见类型,致痫灶主要位于颞叶及其内侧,通常需手术切除,然而手术后仍有许多患儿临床症状未得到有效改善,因此探究癫痫的病理生理学机制对研发安全有效的新型抗癫痫发作药物至关重要。全基因组表达谱(DGE)分析表明,癫痫发病机制涉及数百种基因表达异常,诸如编码离子通道基因,以及与突触重塑、炎症、神经胶质细胞增生或神经元死亡相关的基因<sup>[3]</sup>;而微小RNA(miRNA)表达失调则参与癫痫的发生与发展,从而影响大脑兴奋性和颞叶癫痫的病理生理学特征<sup>[4]</sup>。有研究显示,miRNA-193a-5p表达水平升高与脑组

织损伤存在显著相关性,且在癫痫患者中呈异常高表达<sup>[5]</sup>,但具体机制尚未明确。G蛋白耦联受体39(GPR39)是G蛋白耦联受体(GPCRs)家族的整合膜蛋白,参与调节机体多种生理生化过程,对癫痫发作具有保护作用<sup>[6]</sup>。本研究通过制备颞叶癫痫大鼠模型,探究抑制miRNA-193a-5p表达对海马神经元的保护作用及其可能机制,以为颞叶癫痫的靶向治疗提供理论依据。

## 材料与方 法

### 一、实验材料

1. 实验动物 健康清洁级雄性 Sprague-Dawley (SD)大鼠共65只,8周龄,体质量200~250g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司[许可证号:SCXK(湘)2014-0012]。于室温22℃、相对湿度50%、12h-12h昼夜循环照明环境中饲养,自由摄

食、饮水,适应性饲养 1 周后进行动物实验。本研究经南华大学附属第二医院伦理委员会审核批准(审批号:N/A00251)。

2. 试剂与仪器 (1)主要药品与试剂:人胚肾细胞 293T (HEK293T)由美国模式培养物集存库(ATCC)提供,miRNA-193a-5p 抑制剂(miRNA-193a-5p antagomir)及其阴性对照 antagomir-NC、miRNA-193a-5p 模拟物(miRNA-193a-5p mimic)及其阴性对照 mimic-NC 均为广州锐博生物科技有限公司产品,氯化锂(纯度 $\geq 99.98\%$ ,规格 100 g;批号 310468)和盐酸匹罗卡品(纯度 $\geq 98.00\%$ ,规格 5 g;批号 P6503)购自美国 Sigma 公司,阿托品(纯度 $\geq 98.00\%$ ,规格 5 mg;批号 H41021257)和地西洋(纯度 $\geq 97.00\%$ ,规格 10 mg;批号 H41020631)购自天津药业集团,苯甲基磺酰氟(PMSF)、放射免疫沉淀法(RIPA)细胞裂解液、超氧化物歧化酶(SOD)活性检测试剂盒和丙二醛(MDA)检测试剂盒为上海碧云天生物技术有限公司产品,TUNEL 凋亡检测试剂盒由北京索莱宝科技有限公司提供,白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、白细胞介素-6(IL-6)和肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒购自奥地利 Bender MedSystems 公司, FastQuant RT Kit (With gDNase)试剂盒为北京天根生化科技公司产品,实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)试剂盒由大连宝生物公司提供,双荧光素酶报告系统试剂盒、TRIzol 试剂和 Lipofectamine 3000 转染试剂购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司。I 抗工作液[包括兔抗人 Bcl-2 抗体(规格 100  $\mu$ l,滴度 1:1000)、兔抗人 Bax 抗体(规格 40  $\mu$ l,滴度 1:1000)、兔抗人 cleaved Caspase-3 抗体(规格 100  $\mu$ l,滴度 1:500)和兔抗人甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(规格 100  $\mu$ l,滴度 1:1000),以及兔抗人 GPR39 抗体(规格 50  $\mu$ l,滴度 1:500)]分别购自英国 ABCAM 公司和美国 Novus 公司;辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔 IgG II 抗由英国 ABCAM 公司提供。(2)主要仪器与设备:710N 微量注射器购自瑞士 HAMILTON 公司,BL-420 生物机能实验系统由成都泰盟电子有限公司提供,Bio-RAD 550 酶标仪为德国 Bio-RAD 公司产品,BX51-M 镜相显微镜为日本 Olympus 公司产品,7500 荧光定量 PCR 仪购自美国 ABI 公司,GloMax 96 微孔发光检测仪由美国 Promega 公司提供,Tanon 2500 凝胶成像系统购自上海天能科技有限公司。

## 二、实验方法

1. 模型制备与分组 (1)Racine 行为学分级标准<sup>[7]</sup>:0 级,停止抽搐或无反应;I 级,嘴部、眼部或面部节律性抽动;II 级,点头或甩尾等颈部肌肉抽搐;III 级,单侧前肢阵挛或抽搐;IV 级,双侧前肢阵挛或抽搐;V 级,四肢阵挛或强直,达 IV 级者为模型制备成功。(2)模型制备:采用随机数字表法共选择 50 只大鼠,腹腔注射氯化锂(125 mg/kg),10~18 h 后腹腔注射溴化甲基阿托品(10 mg/kg),30 min 后腹腔注射匹罗卡品(30 mg/kg);余 15 只大鼠腹腔注射等体积生理盐水,作为正常对照组(对照组)。模型大鼠出现癫痫持续状态后 1 h,腹腔注射地西洋(10 mg/kg)终止发作,若大鼠首次腹腔注射匹罗卡品后 30 min 行为学分级未达 IV 级,可继续腹腔注射匹罗卡品(10 mg/kg),以 3 次为限。若建模过程中大鼠死亡,及时补充以保证分组时对动物数量的要求。本组大鼠模型制备成功率 90%(45/50)。(3)脑电图监测:分别于模型制备后第 1、3 和 7 天行脑电图监测,记录单位时间内异常脑电发放次数,每次持续 1 h。(4)实验分组:建模成功大鼠采用随机数字表法分为模型组、antagomir-NC 组、miRNA-193a-5p antagomir 组,每组各 15 只。于模型制备成功次日,antagomir-NC 组和 miRNA-193a-5p antagomir 组大鼠分别以微量注射器经侧脑室缓慢注射 antagomir-NC (10 mg/kg)和 miR-193a-5p antagomir(10 mg/kg)各 20  $\mu$ l,连续注射 7 d 后行海马炎症因子、氧化应激产物、神经元凋亡率以及 GPR39 蛋白等与颞叶癫痫发病机制相关调控因子检测。

2. 酶联免疫吸附试验和化学比色法检测海马炎症因子与氧化应激产物表达变化 每组分别随机选择 8 只大鼠,断头取脑分离海马组织,于-80  $^{\circ}$ C 保存备用。取适量海马组织,加入预冷磷酸盐缓冲液研磨,制备组织匀浆,4  $^{\circ}$ C、离心半径 10 cm、转速 5000 r/min 离心 15 min,取上清液。(1)酶联免疫吸附试验(ELISA):参照试剂盒说明书,于 96 孔板滴入上清液 50  $\mu$ l 和辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG II 抗 100  $\mu$ l,37  $^{\circ}$ C 孵育 1 h,以含 0.05% Tween 20 的磷酸盐缓冲液冲洗( $\times 5$ 次);每孔加入 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)/过氧化氢底物 50  $\mu$ l,37  $^{\circ}$ C 避光孵育 15 min,加入反应终止液 50  $\mu$ l,酶标仪测定 450 nm 波长处光密度(OD)值,参照标准曲线计算海马组织 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  表达水平。(2)化学比色法:参照试剂盒说明书,依次加入 SOD 检测缓冲液

158  $\mu\text{l}$ 、氯化硝基四氮唑蓝(NBT)1  $\mu\text{l}$ 和过氧化氢酶溶液 1  $\mu\text{l}$ 至 96 孔板,滴加反应启动工作液和上清液 20  $\mu\text{l}$ ,37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 30 min,酶标仪测定 560 nm 波长处 OD 值,代表海马组织 SOD 活性。将 MDA 检测工作液 0.20 ml 和上清液 0.10 ml 混匀,沸水浴 15 min,快速冷却至室温,离心半径 10 cm、转速 800 r/min 离心 10 min,取上清液 200  $\mu\text{l}$ 至 96 孔板中,酶标仪测定 540 nm 波长处 OD 值,代表海马组织 MDA 含量。

3. TUNEL 染色检测海马神经元凋亡数目 各处理组剩余 7 只大鼠断头取脑分离海马组织,以质量分数 4% 多聚甲醛溶液固定 24 h,常规制备石蜡切片。按照 TUNEL 试剂盒说明书,将石蜡切片置于二甲苯和梯度乙醇溶液中脱蜡至水,加入蛋白酶 K 工作液,37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 15 min,磷酸盐缓冲液洗涤后进行封闭,滴加末端脱氧核糖核酯转移酶(TdT)反应液 100  $\mu\text{l}$ ,37  $^{\circ}\text{C}$  避光孵育 1 h,终止反应后以体积分数为 0.3% 的过氧化氢溶液灭活内源性过氧化物酶活性,滴加 Streptavidin-HRP 工作液 100  $\mu\text{l}$ ,37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 1 min,磷酸盐缓冲液洗涤后滴加二氨基联苯胺(DAB)显色液,室温条件下反应 1 min,去离子水漂洗 3 次、苏木素染色 30 s,磷酸盐缓冲液漂洗 3 次,脱水、透明、封片。光学显微镜下随机选取 5 个中倍视野( $\times 200$ )计数神经元凋亡数目,胞核呈深褐色为凋亡细胞。

4. 荧光定量聚合酶链反应检测 miRNA-193a-5p 和 GPR39 mRNA 相对表达量 取适量-80  $^{\circ}\text{C}$  冻存的海马组织,加入总 RNA 提取试剂 TRIzol 1 ml 研磨均匀后移至 1.50 ml EP 管,室温静置 5 min;加入三氯甲烷 0.20 ml,振荡 15 s,室温静置 3 min,于 4  $^{\circ}\text{C}$ 、离心半径 10 cm、转速 12 000 r/min 离心 15 min;取上层水相至 EP 管,加入异丙醇 0.50 ml,静置 10 min 后离心 10 min,弃上清液,加入 75% 乙醇溶液 1 ml 洗涤 RNA 沉淀,于 4  $^{\circ}\text{C}$ 、离心半径 10 cm、转速 8000 r/min 离心 5 min,弃上清液,干燥 5 min,加入无 RNase 水重悬 DNA 沉淀,55  $^{\circ}\text{C}$  静置 10 min,核酸检测仪检测 GPR39 mRNA 浓度及纯度,置-20  $^{\circ}\text{C}$  保存。按照 FastQuant RT 试剂盒说明书进行逆转录,将总 RNA 逆转录为 cDNA,再按照 TB GreenPremix Ex Taq 试剂盒说明书行荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR),miRNA-193a-5p 正向引物序列为 5'-CGCCGTGTTTACCGTCCCA-3'、反向引物序列为 5'-CAGCCACAAAAGAGCACAAT-3',内参照物 U6 正向引物序列为 5'-AAAAGTCAACT

ACCCAAGAAA-3'、反向引物序列为 5'-AAGGTCGGGCAGGAAGAG-3',GPR39 正向引物序列为 5'-TCCTCATGGCTTCATCCAGT-3'、反向引物序列为 5'-CTTCGAACCTCAGGGACATGG-3',内参照物 GAPDH 正向引物序列为 5'-CTGCACCACCAACTGCTTAG-3'、反向引物序列为 5'-TGATGGCATGGACTGTGG-3';反应体系包括 TB Green Premix Ex Taq II 10  $\mu\text{l}$ 、正向和反向引物各 0.80  $\mu\text{l}$ 、ROX Reference Dye 0.40  $\mu\text{l}$ 、模板 DNA 2  $\mu\text{l}$ 、灭菌水 6  $\mu\text{l}$ ,共 20  $\mu\text{l}$ ;反应条件为 95  $^{\circ}\text{C}$  30 s 预变性循环 1 次,95  $^{\circ}\text{C}$  变性 3 s、62  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s,共循环 40 次。采用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  法计算 miRNA-193a-5p 和 GPR39 mRNA 相对表达量。

5. Western blotting 法检测目的蛋白相对表达量 取适量-80  $^{\circ}\text{C}$  冻存的海马组织,加入 RIPA 细胞裂解液(蛋白酶抑制剂 PMSF 和磷酸酶抑制剂体积比 1:100)提取总蛋白,冰浴匀浆 30 min,于 4  $^{\circ}\text{C}$ 、离心半径 10 cm、转速 12 000 r/min 离心 5 min,取上清液 10  $\mu\text{l}$ ,加入磷酸盐缓冲液至 20  $\mu\text{l}$ ;于 96 孔板中加入 BCA 工作液 200  $\mu\text{l}$ ,室温静置 2 h,酶标仪测定 562 nm 波长处 OD 值。十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)提取总蛋白,聚偏氟乙烯(PVDF)转膜,体积分数为 5% 的牛血清白蛋白封闭 1 h,滴加 I 抗工作液,4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜,TBST 溶液洗膜,滴加辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG II 抗(1:1000),室温孵育 2 h,ECL 化学显色,凝胶成像系统观察蛋白条带,采用 ImagePro 6.0 软件量化分析,以 GAPDH 作为内参照物,计算目的蛋白相对表达量。

6. 双荧光素酶报告实验验证 miRNA-193a-5p 与 GPR39 的靶向作用关系 采用 TargetScanHuman 网站([http://www.targetscan.org/vert\\_71/](http://www.targetscan.org/vert_71/))预测 miRNA-193a-5p 与 GPR39 的靶向结合位点,并构建 miRNA-193a-5p 结合位点的野生型 GPR39(GPR39-WT)和突变型 GPR39(GPR39-MUT)荧光素酶报告基因质粒。将 HEK293T 细胞以细胞密度为  $10 \times 10^3$  个/孔接种至 24 孔板中,采用 Lipofectamine 3000 转染试剂将 GPR39-WT 和 GPR39-MUT 质粒分别与 miRNA-193a-5p mimic 或 mimic-NC 共转染至 HEK293T 细胞,48 h 后 RIPA 裂解缓冲液裂解,按照检测试剂盒说明书操作,顺序添加荧光素酶分析试剂,微孔板发光检测仪检测荧光强度,计算荧光素酶活性(相对荧光素酶活性 = 萤火虫荧光素酶活性/肾素荧光

**表 1** 不同处理组大鼠海马组织 miRNA-193a-5p 相对表达量的比较( $\bar{x} \pm s$ )

**Table 1.** Comparison of expression of miRNA-193a-5p in hippocampus of rats among different groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	动物数	miRNA-193a-5p
对照组(1)	8	1.00 ± 0.09
模型组(2)	8	8.67 ± 0.61
antagomir-NC 组(3)	8	8.59 ± 0.81
miRNA-193a-5p antagomir 组(4)	8	3.43 ± 0.47
<i>F</i> 值		328.810
<i>P</i> 值		0.000

**表 2** 不同处理组大鼠海马组织 miRNA-193a-5p 相对表达量的两两比较

**Table 2.** Pairwise comparison of expression level of miRNA-193a-5p in hippocampus of rats in different groups

组间两两比	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
(1):(2)	25.661	0.000
(1):(3)	25.372	0.000
(1):(4)	8.120	0.000
(2):(3)	0.291	0.925
(2):(4)	17.539	0.000
(3):(4)	17.251	0.000

素酶活性)。

### 三、统计分析方法

采用 SPSS 21.0 统计软件进行数据处理与分析。通过 Shapiro-Wilk 检验进行正态性检验,呈正态分布的计量资料以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用两独立样本的 *t* 检验、单因素方差分析或重复测量设计的方差分析,两两比较用 Bonferroni 法。以 *P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

## 结 果

不同处理组大鼠海马组织 miRNA-193a-5p 相对表达量差异具有统计学意义(*P* = 0.000, 表 1), 其中, 模型组、antagomir-NC 组和 miRNA-193a-5p antagomir 组 miRNA-193a-5p 相对表达量高于对照组(均 *P* = 0.000), miRNA-193a-5p antagomir 组相对表达量低于模型组和 antagomir-NC 组(均 *P* = 0.000), 而模型组与 antagomir-NC 组之间差异无统计学意义(*P* = 0.925, 表 2)。

不同处理组大鼠各观察时间点单位时间内脑电图异常次数差异有统计学意义(均 *P* = 0.000; 表 3, 4), 其中, 第 1、3 和 7 天 miRNA-193a-5p antagomir

**表 3** 不同处理组大鼠各观察时间点单位时间内脑电图异常次数的比较( $\bar{x} \pm s$ , 次)

**Table 3.** Comparison of abnormal times of EEG per unit time of rats among different groups ( $\bar{x} \pm s$ , times)

组别	动物数	第 1 天	第 3 天	第 7 天
模型组(1)	15	3.13 ± 0.62	5.60 ± 0.78	8.20 ± 0.58
antagomir-NC 组(2)	15	3.07 ± 0.28	5.40 ± 0.45	7.93 ± 0.33
miRNA-193a-5p antagomir 组(3)	15	2.40 ± 0.13	3.47 ± 0.27	3.67 ± 0.66

**表 4** 不同处理组大鼠各观察时间点单位时间内脑电图异常次数的重复测量设计的方差分析表

**Table 4.** ANOVA of repeated measurement design of abnormal times of EEG per unit time of rats in different groups at different observation time points

变异来源	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i> 值	<i>P</i> 值
处理因素	178.533	2	89.267	323.207	0.000
测量时间	313.600	2	156.800	567.724	0.000
处理 × 测量时间	69.467	4	17.367	62.879	0.000
组间误差	34.800	126	0.276		
组内误差	104.267	130	0.802		

**表 5** 不同处理组大鼠同一观察时间点单位时间内脑电图异常次数的两两比较

**Table 5.** Pairwise comparison of abnormal times of EEG per unit time of rats in different groups at the same observation time point

组间两两比	第 1 天		第 3 天		第 7 天	
	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
(1):(2)	0.249	0.809	0.628	0.543	1.144	0.276
(1):(3)	3.259	0.014	7.299	0.000	14.583	0.000
(2):(3)	6.139	0.000	10.402	0.000	16.329	0.000

组脑电图异常次数少于模型组和 antagomir-NC 组(均 *P* < 0.05), 而模型组与 antagomir-NC 组差异无统计学意义(均 *P* > 0.05, 表 5)。

不同处理组大鼠海马炎症因子(IL-1β、IL-6 和 TNF-α)表达水平以及 SOD 活性和 MDA 含量均差异具有统计学意义(均 *P* = 0.000, 表 6)。其中, 模型组、antagomir-NC 组和 miRNA-193a-5p antagomir 组的 IL-1β(均 *P* < 0.05)、IL-6(均 *P* = 0.000)和 TNF-α(均 *P* = 0.000)表达水平以及 MDA 含量(均 *P* < 0.01)高于对照组, SOD 活性低于对照组(均 *P* < 0.01); miRNA-193a-5p antagomir 组的 IL-1β(均 *P* = 0.000)、IL-6(均 *P* = 0.000)和 TNF-α(均 *P* < 0.01)表达水平以及 MDA 含量(均 *P* = 0.000)均低于模型组和 antagomir-NC 组, 而 SOD 活性高于模型组和 antagomir-NC 组(均 *P* = 0.000), antagomir-NC 组与模

**表 6** 不同处理组大鼠海马组织炎症因子表达水平和氧化应激活性产物含量的比较( $\bar{x} \pm s$ )**Table 6.** Comparison of inflammatory factors and oxidative stress active products in hippocampus of rats among different groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	动物数	IL-1 $\beta$ (pg/mg)	IL-6(pg/mg)	TNF- $\alpha$ (pg/mg)	SOD(U/mg)	MDA(nmol/mg)
对照组(1)	8	301.56 $\pm$ 22.54	130.25 $\pm$ 13.23	14.05 $\pm$ 2.67	153.56 $\pm$ 15.34	4.98 $\pm$ 0.85
模型组(2)	8	515.37 $\pm$ 37.64	271.22 $\pm$ 19.69	35.28 $\pm$ 4.05	51.05 $\pm$ 17.12	16.20 $\pm$ 2.77
antagomir-NC组(3)	8	498.62 $\pm$ 48.95	255.94 $\pm$ 20.47	33.86 $\pm$ 5.67	47.66 $\pm$ 13.08	15.79 $\pm$ 2.04
miRNA-193a-5p antagomir组(4)	8	360.08 $\pm$ 25.79	189.26 $\pm$ 15.54	25.15 $\pm$ 3.54	116.65 $\pm$ 14.82	8.67 $\pm$ 1.25
<i>F</i> 值		70.363	110.212	44.839	93.308	68.726
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

IL-1 $\beta$ , interleukin-1 $\beta$ , 白细胞介素-1 $\beta$ ; IL-6, interleukin-6, 白细胞介素-6; TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor- $\alpha$ , 肿瘤坏死因子- $\alpha$ ; SOD, superoxide dismutase, 超氧化物歧化酶; MDA, malonaldehyde, 丙二醛。The same for Table 7

**表 7** 不同处理组大鼠海马组织炎症因子表达水平和氧化应激活性产物含量的两两比较**Table 7.** Pairwise comparison of inflammatory factors and oxidative stress active products in hippocampus of rats in different groups

组间两两比	IL-1 $\beta$		IL-6		TNF- $\alpha$		SOD		MDA	
	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
(1):(2)	12.111	0.000	16.120	0.000	10.276	0.000	13.529	0.000	11.940	0.000
(1):(3)	11.157	0.000	14.372	0.000	9.594	0.000	13.972	0.000	11.506	0.000
(1):(4)	3.315	0.015	6.749	0.000	5.376	0.000	4.870	0.002	3.928	0.003
(2):(3)	0.949	0.964	1.748	0.549	0.688	0.999	0.447	0.997	0.437	0.985
(2):(4)	8.797	0.000	9.374	0.000	4.906	0.000	8.655	0.000	8.016	0.000
(3):(4)	7.848	0.000	7.626	0.000	4.218	0.001	9.102	0.000	7.579	0.000

型组之间各项指标差异无统计学意义(均  $P > 0.05$ , 表 7)。

不同处理组大鼠海马组织神经元凋亡数目以及 cleaved Caspase-3、Bax 和 Bcl-2 蛋白相对表达量差异具有统计学意义(均  $P = 0.000$ , 表 8)。其中, 模型组、antagomir-NC 组和 miRNA-193a-5p antagomir 组神经元凋亡数目(均  $P = 0.000$ )以及 cleaved Caspase-3(均  $P = 0.000$ )和 Bax(均  $P = 0.000$ )蛋白相对表达量高于对照组, Bcl-2 蛋白相对表达量低于对照组(均  $P = 0.000$ ); miRNA-193a-5p antagomir 组神经元凋亡数目(均  $P = 0.000$ )以及 cleaved Caspase-3(均  $P = 0.000$ )和 Bax(均  $P = 0.000$ )蛋白相对表达量低于模型组和 antagomir-NC 组, Bcl-2 蛋白相对表达量高于模型组和 antagomir-NC 组(均  $P = 0.000$ ; 表 9; 图 1, 2)。

不同处理组大鼠海马组织 GPR39 mRNA 和 GPR39 蛋白相对表达量差异具有统计学意义(均  $P = 0.000$ , 表 10)。其中, 模型组、antagomir-NC 组和 miRNA-193a-5p antagomir 组 GPR39 mRNA(均  $P = 0.000$ )和 GPR39 蛋白(均  $P < 0.01$ )相对表达量低于

对照组; miRNA-193a-5p antagomir 组 GPR39 mRNA(均  $P = 0.000$ )和 GPR39 蛋白(均  $P = 0.000$ )相对表达量高于模型组和 antagomir-NC 组(表 11, 图 3)。

与 mimic-NC 组相比, miRNA-193a-5p mimic 组在转染 GPR39-WT 的 HEK293T 细胞中荧光素酶活性降低( $P = 0.000$ ), 而在转染 GPR39-MUT 的 HEK293T 细胞中荧光素酶活性组间差异无统计学意义( $P = 0.541$ ; 表 12, 图 4)。

## 讨 论

颞叶癫痫是一种起源于颞叶内侧(海马), 以长期反复出现的自发性癫痫发作为特征的中枢神经系统疾病, 是临床最为常见的癫痫发作类型, 其中 50%~70% 患者为耐药性癫痫。颞叶癫痫的典型病理改变为海马硬化(HS), CA1 和 CA3 区神经元丢失、神经胶质增生等<sup>[8]</sup>, 但其潜在的病理学机制尚不明确。因此, 深入了解颞叶癫痫的病理生理学机制对制定治疗策略及新药研发至关重要。

miRNA 是一种微小型内源性非编码 RNA, 对转录后的基因表达起重要调控作用<sup>[9]</sup>。单个 miRNA

**表 8** 不同处理组大鼠海马组织神经元凋亡数目及相关蛋白相对表达量的比较( $\bar{x} \pm s$ )

**Table 8.** Comparison of the number of neuronal apoptosis and the relative expression of related proteins in hippocampus of rats among different groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	动物数	神经元凋亡数目*(个)	cleaved Caspase-3	Bax	Bcl-2
对照组(1)	8	100.00 ± 10.26	0.23 ± 0.05	0.36 ± 0.03	0.87 ± 0.03
模型组(2)	8	238.40 ± 21.04	1.10 ± 0.02	1.29 ± 0.08	0.16 ± 0.07
antagomir-NC组(3)	8	228.13 ± 19.53	1.04 ± 0.08	1.21 ± 0.06	0.15 ± 0.03
miRNA-193a-5p antagomir组(4)	8	153.60 ± 17.78	0.57 ± 0.03	0.64 ± 0.05	0.53 ± 0.04
<i>F</i> 值		96.100	434.320	430.205	398.312
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000	0.000

\*Only 7 rats underwent TUNEL staining to detect the number of neuronal apoptosis in hippocampus, 仅有 7 只大鼠进行 TUNEL 染色检测海马神经元凋亡数目

**表 9** 不同处理组大鼠海马组织神经元凋亡数目及相关蛋白相对表达量的两两比较

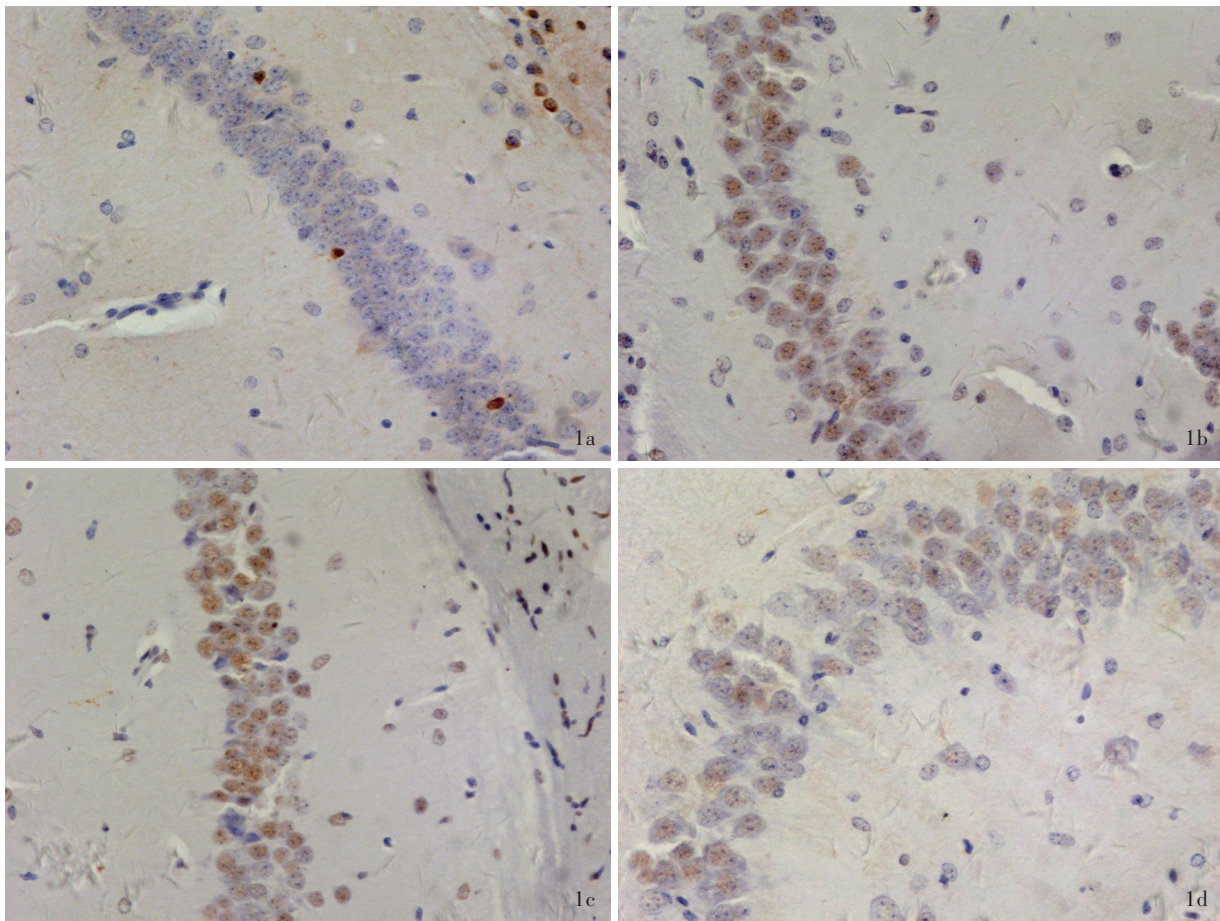
**Table 9.** Pairwise comparison of the number of neuronal apoptosis and the relative expression of related proteins in hippocampus of rats in different groups

组间两两比	神经元凋亡数目		cleaved Caspase-3		Bax		Bcl-2	
	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
(1):(2)	14.672	0.000	31.140	0.000	30.371	0.000	29.250	0.000
(1):(3)	13.578	0.000	28.957	0.000	26.130	0.000	29.421	0.000
(1):(4)	5.683	0.000	12.122	0.000	9.145	0.000	13.926	0.000
(2):(3)	1.089	0.999	2.181	0.235	2.613	0.092	0.164	0.999
(2):(4)	8.991	0.000	19.021	0.000	21.230	0.000	15.322	0.000
(3):(4)	7.902	0.000	16.837	0.000	16.981	0.000	15.487	0.000

可以靶向多种 mRNA, 并通过调控转录后的基因表达以调节细胞增殖活性, 应对外部刺激或内环境变化。miRNA 在所有细胞类型中均可表达, 是诸多生理过程必不可少的主要调节因子, 如发育、免疫反应、昼夜节律和细胞凋亡等, 其表达失调可对细胞甚至整个机体产生深远影响<sup>[10]</sup>, 故 miRNA 可能成为某些疾病的潜在生物学标志物。研究显示, miRNA 在神经元发育中起重要调节作用, 并参与颞叶癫痫发生发展过程<sup>[11]</sup>。动物实验显示, 颞叶癫痫模型大鼠海马组织多种 miRNAs 表达异常, 如 miRNA-54、miRNA-365-5p、miRNA-423-3p 和 miRNA-455-3p 表达上调, miRNA-138、miRNA-222 和 miRNA-296-5p 表达下调<sup>[12-13]</sup>, 特别是 miRNA-193a-5p 在颞叶癫痫患者和模型大鼠中显著上调<sup>[5]</sup>。对颞叶癫痫伴或不伴海马硬化患者 DNA 甲基化谱检测的研究显示, miRNA-193a-5p 是一种甲基化敏感的 miRNA<sup>[14]</sup>, 可能与癫痫患者神经元增殖、凋亡的调控密切相关, 但其在颞叶癫痫发病机制中的作用尚不十分明确。miRNA 通过抑制靶基因的表达发挥生物学作用, 如 miRNA-19b-3p 通过靶向 F-肌动蛋白结合蛋白促进

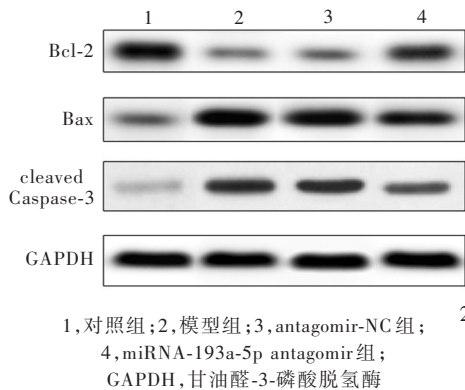
慢性束缚应激诱导的异常突触可塑性和认知功能障碍<sup>[15]</sup>。miRNA-193a-5p mimic 为 miRNA 模拟物, 可模拟细胞中成熟 miRNA 过表达情况, 以增强对内源性 miRNA 的调控作用。本研究以氯化锂-匹罗卡品癫痫大鼠模型探究模型大鼠体内 miRNA-193a-5p 水平变化对海马组织的损伤作用, 并进一步观察 miRNA-193a-5p 抑制剂(miRNA-193a-5p antagomir) 对体内 miRNA-193a-5p 表达水平的调控作用, 结果显示: 不同处理组大鼠海马组织 miRNA-193a-5p 相对表达量( $F = 328.810, P = 0.000$ ) 差异均有统计学意义; 模型组大鼠海马组织 miRNA-193a-5p 相对表达量高于对照组( $P = 0.000$ ), 而 miRNA-193a-5p antagomir 组相对表达量则明显低于模型组和 antagomir-NC 组(均  $P = 0.000$ )。

GPR39 作为膜蛋白受体, 包含 7 个  $\alpha$ -螺旋组成的跨膜结构域, 胞内含有 G 蛋白结合区, 外界因子通过与 G 蛋白耦联, 向胞内传递信号, 进而发挥重要生理作用, GPR39 表达失调可导致多种疾病<sup>[16]</sup>。目前已有多种美国食品与药品管理局(FDA) 批准的药物以 G 蛋白耦联受体为靶点, 通过促进或抑制其信号



**图 1** 光学显微镜观察所见 TUNEL 染色 中倍放大 1a 对照组大鼠海马组织仅见少量凋亡细胞 1b 模型组大鼠海马组织凋亡细胞数目明显增多 1c antagomir-NC 组大鼠海马组织凋亡细胞数目明显增多 1d miRNA-193a-5p antagomir 组大鼠海马组织凋亡细胞数目明显减少

**Figure 1** Light microscopy findings TUNEL staining Median power magnified Only a small amount of apoptosis was seen in the hippocampus of the rats in the normal control group (Panel 1a). The number of apoptotic cells in the hippocampus of the rats in the model group was significantly increased (Panel 1b). The number of apoptotic cells in the hippocampus of the antagomir-NC group was significantly higher (Panel 1c). The number of apoptotic cells in the hippocampus of the miRNA-193a-5p antagomir group was significantly reduced (Panel 1d).



**图 2** Western blotting 检测显示,模型组、antagomir-NC 组和 miRNA-193a-5p antagomir 组 Bcl-2 蛋白相对表达量均低于对照组, Bax 和 cleaved Caspase-3 蛋白相对表达量高于对照组;miRNA-193a-5p antagomir 组 Bcl-2 蛋白相对表达量高于模型组和 antagomir-NC 组, Bax 和 cleaved Caspase-3 蛋白相对表达量均低于模型组和 antagomir-NC 组

**Figure 2** Western blotting showed the relative expression of Bcl-2 in the hippocampus of rats in the model group, antagomir-NC group and miRNA-193a-5p antagomir group were lower than those in the normal control group, while the relative expression of Bax and cleaved Caspase-3 proteins were higher than those in the normal control group; the relative expression of Bcl-2 protein in the miRNA-193a-5p antagomir group was higher than that in the model group and antagomir-NC group, while the relative expression of Bax and cleaved Caspase-3 proteins was lower than those in the model group and antagomir-NC group.

转导而发挥药物疗效<sup>[17]</sup>。GPR39 广泛表达于额叶皮质、杏仁核和海马组织等脑组织<sup>[18-19]</sup>, 研究显示, 因抑郁症自杀的患者海马和大脑皮质 GPR39 表达

水平下降<sup>[20]</sup>。采用免疫荧光法检测小鼠海马组织, 发现正常小鼠海马组织神经元高度富集 GPR39, 敲除 GPR39 基因可减弱 SH-SY5Y 细胞系中锌离子感



**表 10** 不同处理组大鼠海马组织 GPR39 mRNA 和 GPR39 蛋白相对表达量的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

**Table 10.** Comparison of relative expression of GPR39 mRNA and GPR39 protein in hippocampus of rats among different groups ( $\bar{x} \pm s$ )

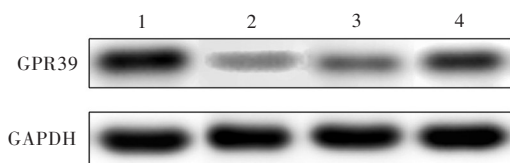
组别	动物数	GPR39 mRNA	GPR39 蛋白
对照组(1)	8	1.00 ± 0.07	0.64 ± 0.04
模型组(2)	8	0.36 ± 0.03	0.21 ± 0.05
antagomir-NC 组(3)	8	0.41 ± 0.08	0.24 ± 0.07
miRNA-193a-5p antagomir 组(4)	8	0.70 ± 0.04	0.54 ± 0.04
<i>F</i> 值		175.403	115.805
<i>P</i> 值		0.000	0.000

GPR39, G-protein coupled receptor 39, G 蛋白耦联受体 39。The same for Tables below

**表 11** 不同处理组大鼠海马组织 GPR39 mRNA 和 GPR39 蛋白相对表达量的两两比较

**Table 11.** Pairwise comparison of relative expression of GPR39 mRNA and GPR39 protein in hippocampus of rats in different groups

组间两两比	GPR39 mRNA		GPR39 蛋白	
	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
(1):(2)	20.210	0.000	15.360	0.000
(1):(3)	18.781	0.000	14.288	0.000
(1):(4)	9.598	0.000	3.930	0.004
(2):(3)	1.425	0.999	1.072	0.999
(2):(4)	10.605	0.000	11.434	0.000
(3):(4)	9.186	0.000	10.362	0.000



1, 对照组; 2, 模型组; 3, antagomir-NC 组; 4, miRNA-193a-5p antagomir 组; GPR39, G 蛋白耦联受体 39; GAPDH, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶

**图 3** Western blotting 检测显示, 模型组、antagomir-NC 组和 miRNA-193a-5p antagomir 组大鼠海马组织 GPR39 mRNA 和 GPR39 蛋白相对表达量均低于对照组, miRNA-193a-5p antagomir 组 GPR39 mRNA 和 GPR39 蛋白相对表达量均高于模型组和 antagomir-NC 组

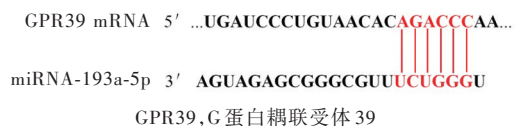
**Figure 3** Western blotting showed relative expression level of GPR39 mRNA and GPR39 protein in hippocampus of rats in the model group, antagomir-NC group and miRNA-193a-5p antagomir group were lower than those in the normal control group, while relative expression of GPR39 mRNA and GPR39 protein in hippocampus of rats in the miRNA-193a-5p antagomir group was higher than those in the model group and antagomir-NC group.

应受体活性, 抑制神经元代谢<sup>[21]</sup>, GPR39 通过上调 cAMP 应答元件结合蛋白(CREB)-脑源性神经营养因子(BDNF)的表达, 抑制促凋亡蛋白表达, 同时可

**表 12** miRNA-193a-5p mimic 组与 mimic-NC 组转染 HEK293T 细胞荧光素酶活性的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

**Table 12.** Comparison of luciferase activity of transfected HEK293T cells between miRNA-193a-5p mimic group and mimic-NC group ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	重复次数	GPR39-WT	GPR39-MUT
mimic-NC 组	3	1.00 ± 0.04	1.01 ± 0.01
miRNA-193a-5p mimic 组	3	0.25 ± 0.07	1.00 ± 0.02
<i>t</i> 值		16.340	0.668
<i>P</i> 值		0.000	0.541



**图 4** TargetScan 软件预测 miRNA-193a-5p 与 GPR39 mRNA 靶向结合位点位于 GPR39 mRNA 3'-非翻译区 684~690 区域(红色区域所示)

**Figure 4** TargetScan software predicted the targeted binding site of miRNA-193a-5p and GPR39 mRNA in the 3'-UTR terminal 684-690 region of GPR39 mRNA (red area indicates).

通过上调抗凋亡蛋白表达水平对皮质酮诱导的细胞损伤发挥神经保护作用<sup>[22]</sup>。上述研究均表明, GPR39 对中枢神经系统具有一定保护作用。本研究不同处理组大鼠海马组织 GPR39 mRNA ( $F = 175.403, P = 0.000$ ) 和 GPR39 蛋白 ( $F = 115.805, P = 0.000$ ) 相对表达量差异均具有统计学意义, 模型组大鼠海马组织 GPR39 mRNA ( $P = 0.000$ ) 和 GPR39 蛋白 ( $P < 0.01$ ) 相对表达量低于对照组, 而 miRNA-193a-5p antagomir 组 GPR39 mRNA 和 GPR39 蛋白相对表达量均高于模型组和 antagomir-NC 组(均  $P = 0.000$ )。

本研究成功构建抑制 miRNA-193a-5p 表达的颞叶癫痫大鼠模型, 经观察表明, 模型组海马组织异常高表达 miRNA-193a-5p, 双荧光素酶报告实验证实 miRNA-193a-5p 可与 GPR39 的 3' 非翻译区(UTR) 结合, 靶向调控 GPR39 基因; 且模型组 GPR39 mRNA 和 GPR39 蛋白相对表达量降低而抑制 miRNA-193a-5p 表达后, GPR39 mRNA 和 GPR39 蛋白相对表达量升高, 提示 miRNA-193a-5p 可靶向负向调控 GPR39 表达; 此外, 抑制 miRNA-193a-5p 表达后, 海马组织氧化应激指标 MDA 含量降低, 炎症反应指标 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  表达水平降低, 神经元凋亡数目减少。脑电图检查显示, 模型组大鼠脑功能异常, 抑制 miRNA-193a-5p 表达后, 大鼠脑功能

异常得到缓解。由此可见,抑制 miRNA-193a-5p 表达可以通过抑制颞叶癫痫大鼠海马组织氧化应激和炎症反应,减少神经元凋亡,进而改善海马神经元功能。未来将进一步探讨 miRNA-193a-5p 靶向调控 GPR39 基因共同影响颞叶癫痫的发展机制,为颞叶癫痫的治疗提供可靠的理论依据。此外,本研究还通过体外细胞实验证实 miRNA-193a-5p 可靶向负调控 GPR39 mRNA 表达,从细胞水平阐述 miRNA 调控下游靶基因进而影响细胞行为的过程。

综上所述,一方面,通过 miRNA-193a-5p 靶向下调 GPR39 基因表达以发挥调控神经元凋亡作用;另一方面,通过抑制 miRNA-193a-5p 表达以降低氯化物-匹罗卡品诱导的颞叶癫痫脑电波异常反应,抑制海马组织氧化应激和炎症反应,减少癫痫发作导致的海马神经元凋亡,具有神经保护作用,有可能成为颞叶癫痫的新的治疗靶点,从而解决药物难治性问题。

利益冲突 无

#### 参 考 文 献

- [1] Josephson CB, Jetté N. Psychiatric comorbidities in epilepsy [J]. *Int Rev Psychiatry*, 2017, 29:409-424.
- [2] López González FJ, Rodríguez Osorio X, Gil-Nagel Rein A, Carreño Martínez M, Serratos Fernández J, Villanueva Haba V, Donaire Pedraza AJ, Mercadé Cerdú JM. Drug-resistant epilepsy: definition and treatment alternatives [J]. *Neurologia*, 2015, 30:439-446.
- [3] Pitkänen A, Lukasiuk K. Mechanisms of epileptogenesis and potential treatment targets [J]. *Lancet Neurol*, 2011, 10:173-186.
- [4] Korotkov A, Broekaart DWM, Banchaewa L, Pustjens B, van Scheppingen J, Anink JJ, Baayen CJ, Idema S, Gorter AJ, van Vliet AEJ, Aronica E. miRNA-132 is overexpressed in glia in temporal lobe epilepsy and reduces the expression of proepileptogenic factors in human cultured astrocytes [J]. *Glia*, 2020, 68:60-75.
- [5] Baloun J, Bencurova P, Totkova T, Kubova H, Hermanova M, Hendrych M, Pail M, Pospisilova S, Brazdil M. Epilepsy miRNA profile depends on the age of onset in humans and rats [J]. *Front Neurosci*, 2020, 14:924.
- [6] Gilad D, Shorer S, Ketzef M, Friedman A, Sekler I, Aizenman E, Hershinkel M. Homeostatic regulation of KCC2 activity by the zinc receptor mZnR/GPR39 during seizures [J]. *Neurobiol Dis*, 2015, 81:4-13.
- [7] Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II: motor seizure [J]. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 1972, 32:281-294.
- [8] Reyes-Garcia SZ, Scorza CA, Araújo NS, Ortiz-Villatoro NN, Jardim PA, Centeno R, Yacubian TME, Faber J, Cavalheiro AE. Different patterns of epileptiform-like activity are generated in the sclerotic hippocampus from patients with drug-resistant temporal lobe epilepsy [J]. *Sci Rep*, 2018, 8:7116.
- [9] Sherstyuk VV, Medvedev SP, Elisaphenko EA, Vaskova EA, Ri MT, Vyatkin YV, Saik OV, Shtokalo DN, Pokushalov EA, Zakian SM. Genome-wide profiling and differential expression of microRNA in rat [J]. *Sci Rep*, 2017, 7:2787.
- [10] Brennan GP, Henshall DC. microRNAs in the pathophysiology of epilepsy [J]. *Neuroscience letters*, 2017, 8:15-20.
- [11] Hu K, Xie Y, Zhang C, Ouyang DS, Long HY, Sun DN, Long LL, Feng L, Li Y, Xiao B. MicroRNA expression profile of the hippocampus in a rat model of temporal lobe epilepsy and miR-34a-targeted neuroprotection against hippocampal neuron cell apoptosis post-status epilepticus [J]. *BMC Neurosci*, 2012, 13:115.
- [12] Li MM, Jiang T, Sun Z, Zhang Q, Tan CC, Yu JT, Tan L. Genome-wide microRNA expression profiles in hippocampus of rats with chronic temporal lobe epilepsy [J]. *Sci Rep*, 2014, 4:4734.
- [13] Ashhab MU, Omran A, Gan N, Kong H, Peng J, Yin F. microRNAs (9, 138, 181A, 221, and 222) and mesial temporal lobe epilepsy in developing brains [J]. *Transl Neurosci*, 2013, 4:357-362.
- [14] Miller-Delaney SF, Bryan K, Das S, Bray IM, Reynolds JP, Gwinn R, Stallings RL, Henshall DC. Differential DNA methylation profiles of coding and non-coding genes define hippocampal sclerosis in human temporal lobe epilepsy [J]. *Brain*, 2015, 138:616-631.
- [15] Chen J, Liu C, Xu M, Zhu J, Xia Z. Upregulation of miR-19b-3p exacerbates chronic stress-induced changes in synaptic plasticity and cognition by targeting Drebrin [J]. *Neuropharmacology*, 2022, 207:108951.
- [16] Davis CM, Bah TM, Zhang WH, Nelson JW, Golgotiu W, Nie X, Alkayed FN, Young JM, Woltjer RL, Silbert LC, Grafe MR, Alkayed NJ. GPR39 localization in the aging human brain and correlation of expression and polymorphism with vascular cognitive impairment [J]. *Alzheimers Dement (NY)*, 2021, 7:12214.
- [17] Yang D, Zhou Q, Labroska V, Qin S, Darbalaei S, Wu Y, Yuliantie E, Xie L, Tao H, Cheng J, Liu Q, Zhao S, Shui W, Jiang Y, Wang MW. G protein-coupled receptors: structure- and function-based drug discovery [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6:7.
- [18] Młyniec K, Trojan E, Ślusarczyk J, Głombik K, Basta-Kaim A, Budziszewska B, Skrzyszewski J, Siwek A, Holst B, Nowak G. Immune malfunction in the GPR39 zinc receptor of knockout mice: its relationship to depressive disorder [J]. *J Neuroimmunol*, 2016, 291:11-17.
- [19] Jackson VR, Nothacker HP, Civelli O. GPR39 receptor expression in the mouse brain [J]. *Neuroreport*, 2006, 17:813-816.
- [20] Myniec K, Doboszewska U, Szewczyk B, Sowa-Kuśma M, Misztak P, Piekoszewski W, Trela F, Ostachowicz B, Nowak G. The involvement of the GPR39-Zn(2+)-sensing receptor in the pathophysiology of depression: studies in rodent models and suicide victims [J]. *Neuropharmacology*, 2014, 79:290-297.
- [21] Besser L, Chorin E, Sekler I, Silverman WF, Atkin S, Russell JT, Hershinkel M. Synaptically released zinc triggers metabotropic signaling via a zinc-sensing receptor in the hippocampus [J]. *J Neurosci*, 2009, 29:2890-2901.
- [22] Mo F, Tang Y, Du P, Shen Z, Yang J, Cai M, Zhang Y, Li H, Shen H. GPR39 protects against corticosterone-induced neuronal injury in hippocampal cells through the CREB-BDNF signaling pathway [J]. *J Affect Disord*, 2020, 272:474-484.

(收稿日期:2022-08-15)

(本文编辑:柏钰)