

文章编号:1003-2754(2020)02-0154-04

癫痫患者外周血 miR-134 表达及意义

王晓爽, 国琦, 朱亚飞, 樊雪梅, 刘松岩

摘要: **目的** 探讨 miR-134 在癫痫患者外周血中是否存在差异表达,及其表达的意义。**方法** 使用 Trizol 提取癫痫患者血清中 RNAs,进行逆转录及实时荧光定量 PCR 检测样本中 miR-134 表达量,根据病程、发作时限、发作频率及特殊癫痫综合征将病例进行亚组分析。**结果** 与对照组相比,癫痫组外周血 miR-134 表达量显著升高;在长病程组及急性发作组中明显升高。在不同发作频率组、特殊癫痫综合征组中无差异表达。**结论** miR-134 在癫痫患者外周血中表达量与病程、发作时限相关,提示 miR-134 表达与神经元放电程度和损伤严重性相关,可以成为癫痫血清学标志物进行深入研究。

关键词: miRNAs; miR-134; 突触重塑; 颞叶癫痫

中图分类号:R742.1

文献标识码:A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



MiR-134 expression in peripheral blood in patients with epilepsy WANG Xiaoshuang, GUO Qi, ZHU Yafei, et al. (Department of Neurology, China-Japan Union Hospital of Jilin University, Changchun 130033, China)

Abstract: **Objective** To investigate the difference and significance in the expression of miR-134 in peripheral blood of patients with epilepsy. **Methods** Trizol was used to extract serum RNAs of patients with epilepsy, NCode™ VILO™ micromas cDNA short Kit and Express Sybr® those™ micromas qRT-PCR Kits were used to reverse transcriptions and real-time fluorescent quantitative PCR to detect the expression of miR-134. All cases were grouped according to the course of disease, seizure frequency, onset time limit, brain electrical activity and special epilepsy syndrome. **Results** Compared with control group, the expression of miR-134 in peripheral blood of epilepsy group is significantly increased, it is obviously higher in long course group and acute group. The expression of miR-134 in different seizure frequency group and special epilepsy syndrome group has no difference. **Conclusion** The expression of miR-134 in peripheral blood of patients with epilepsy was significantly increased while it was affected by the length of disease and the duration of seizure. In addition, the expression of miR-134 in peripheral blood of patients with epilepsy was positively correlated with the degree of discharge and severity of damage, indicating that miR-134 could be a biomarker for epilepsy.

Key words: MiRNAs; MiR-134; Synaptic plasticity; Temporal lobe epilepsy

癫痫(epilepsy, EP)是由多种原因导致的脑部神经元高度同步化异常放电的临床综合征。癫痫病因错综复杂。目前控制癫痫发作仍以抗癫痫药物为主,其次为手术治疗^[1],仍有一部分最终发展为难治性癫痫。随着分子遗传学发展,近年来癫痫的分子病因已得到全面揭示^[2,3]。研究表明微小核糖核酸(miRNAs)在癫痫发生中发挥重要作用^[4]。miRNA参与树突棘、突触可塑性调节^[5],神经元坏死、凋亡、神经胶质细胞增生、异常通路形成以及炎症反应等病理生理过程^[6],调节皮质发育及脑功能^[7],从而参与癫痫发生及调控^[8]。miR-134是脑内一类特殊miRNA,对癫痫发生过程中多个病理生理过程起重要调控作用^[9],参与调控癫痫^[10]、卒中^[11]等多种神经系统疾病。miR-134在癫痫患者外周血是否存在差异表达,能否作为一种生物学标志物应用于预测细胞损伤、癫痫诊断、治疗以及预后评估,是目前研究的热点。

1 对象与方法

1.1 研究对象 病例随机采集于吉林大学中日联谊医院门诊及病区2013年12月-2017年12月就诊的癫痫患者,根据脑电图及临床表现均符合国际抗癫痫联盟癫痫诊断标准者为癫痫组(120例),同时选择年龄、性别相匹配的健康人为对照组(70例),癫痫组根据病程、发作时限、发作频率、特殊癫痫综合征分为4个组,再进一步进行亚组分析(见表1)。癫痫组排除标准:年龄>80岁,中枢神经系统感染性疾病如单纯疱疹病毒性脑炎、颅内占位性病变、边缘叶脑炎;严重心脏、肝脏、肾脏、内分泌系统疾病者;妊娠及哺乳期妇女、严

收稿日期:2019-12-11;修订日期:2020-01-30

基金项目:吉林省科技发展计划项目(20180311075yy);吉林省卫生科研人才专项项目(2019scz044)

作者单位:(吉林大学中日联谊医院神经内科,吉林 长春 130033)

通讯作者:刘松岩, E-mail: yan1966@163.com

重智能障碍不能合作者。正常对照组纳入标准:近期常规体检包括心电图、胸片、超声无异常;血常规、血生化及肝肾功无明显异常;无发作性症状、无癫痫家族史、无外伤史;无难产、脑炎、高热惊厥史。

1.2 主要试剂 miR-134、U6引物购于上海生物工程公司; Trizol 购于 Ambion[®] 公司; NCode[™] VILO[™] miRNA cDNA Synthesis Kit and Express Sybr[®] Green ER[™] miRNA qRT-PCR Kits 购于 Invitrogen。

1.3 设计引物 根据 miRBase 寻找 miR-134 成熟体序列(MIMAT0000134)委托上海生物工程公司合成 hsa-miR-134-5p RT-Primer 序列为 5'-GTCG-TATCCAGTGCAGGTCGCCGAGGTATTCGCACTGGAT-ACGACCCCTCTG-3' 及随机对照 U6RT-Primer 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'。

1.4 实验方法

1.4.1 外周血采集及保存 各组于清晨空腹采集肘静脉血液,所取标本经处理后,于 -80 °C 冰箱保存。

1.4.2 RNA 的提取、逆转录及 qPCR (1) RNA 的提取:经裂解、分层、沉淀、洗涤、干燥、溶解等步骤提取 RNA;(2) RNA 浓度测定:使用 NANO-DROP-2000 可见分光光度计对所得样本进行浓度及纯度测定,记录 RNA 浓度和 OD260/OD280 值,比值在 1.9 ~ 2.0 之间是表示 RNA 纯度高,将样本保存于 -20 °C 冰箱;(3)将 RNA 逆转录为 cDNA 逆转录反应条件如下:37 °C 60 min;95 °C 5 min;冷却至 4 °C;(4)实时荧光定量 PCR 每个样品设 3 个重复,以 U6 snRNA 作为内参。qPCR 反应条件:50 °C, 2 min;95 °C, 2 min;95 °C, 15 s, 60 °C, 1 min, 40 个循环;60 °C ~ 95 °C 温度范围内记录溶解曲线。反应结束后确认 Real Time PCR 的扩增曲线和溶解曲线,根据 miR-134 的 CT、U6CT 值,得出相对表达量 (RQ, Relative Quantity) $RQ = 2^{-\Delta\Delta CT}$ 。

1.5 统计学处理 使用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析,符合正态分布和方差齐性的计量资料采用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组间均数比较采用方差分析,组间两两均数比较采用 LSD 法,两组均数之间比较采用 *t* 检验。分类资料采用 χ^2 检验。*P* 值 < 0.05 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 一般临床资料比较 两组间性别、年龄差异均无统计学意义(均 *P* > 0.05)(见表 2)。

2.2 癫痫患者外周血 miR-134 表达 对提取得 RNA 进行琼脂糖凝胶电泳,总 RNA 电泳图显示无杂带,表明 RNA 无降解(见图 1)。miR-134 及 U6 扩增曲线平滑,溶解曲线单峰(见图 2)。统计学分析显示,对照组(0.88 ± 0.37)、癫痫组(2.38 ± 0.47),与对照组相比,癫痫组外周血 miR-134 表达量显著升高,差异具有统计学意义 *t* = -22.92, *P* = 0.000(见图 3)。

2.3 病程对癫痫患者外周血 miR-134 表达影响 比较病程对外周血 miR-134 表达量影响,对照组(0.88 ± 0.37)、病程 ≤ 1 y 组(1.94 ± 0.39)、病程 > 1 y 组(2.56 ± 0.37),病程 > 1 y 组与病程 ≤ 1 y 组相比明显升高,差异具有统计学意义, *P* = 0.000,病程对癫痫患者外周血 miR-134 表达量有影响,病程长 miR-134 表达量增高(见图 4)。

2.4 发作时限对癫痫患者外周血 miR-134 表达量影响 比较发作时限对癫痫患者外周血 miR-134 表达量影响,正常对照组(0.88 ± 0.37)、非急性发作组(1.92 ± 0.35)、急性发作组(2.42 ± 0.46),与非急性发作组相比,急性发作组明显升高,差异具有统计学意义 *P* = 0.000,发作时限对癫痫患者外周血 miR-134 表达量有影响,急性发作组 miR-134 表达量增高(见图 5)。

2.5 发作频率对癫痫患者外周血 miR-134 表达量影响 比较发作频率对癫痫患者外周血 miR-134 表达量影响,对照组(0.88 ± 0.37)、频繁发作组(2.37 ± 0.49)、发作控制不良组(2.39 ± 0.48)、发作控制良好组(2.38 ± 0.46);频繁发作组、发作控制不良组、发作控制良好组 3 组相比, *F* = 0.013, *P* = 0.987,无统计学差异(见图 6)。

2.6 特殊癫痫综合征对癫痫患者外周血 miR-134 表达量影响 比较特殊癫痫综合征(颞叶癫痫)对癫痫患者外周血 miR-134 表达量影响,对照组(0.88 ± 0.37)、非颞叶癫痫组(2.39 ± 0.47)、颞叶癫痫组(2.36 ± 0.48),颞叶癫痫组与非颞叶癫痫组相比, *P* = 0.764 > 0.05,差异无统计学意义(见图 7)。

表 1 实验分组

组别	癫痫亚组(120 例)	
病程组	病程 ≤ 1 y 组(35 例)	病程 > 1 y 组(85 例)
发作时限组	非急性发作组(47 例)	急性发作组(73 例)
发作频率组	频繁发作组(38 例)	发作控制良好组(26 例);发作控制不良组(29 例)
癫痫综合征组	颞叶癫痫组(40 例)	非颞叶癫痫组(80 例)

注:急性发作组:标本采集时 3 d 内存在临床癫痫发作者;非急性发作组:标本采集 3 m 内无临床癫痫发作者;频繁发作组:发作次数 ≥ 4 次/m;发作控制不良组:1 次/m ≤ 发作次数 < 4 次/m;发作控制良好组:发作次数 ≤ 1 ~ 2 次/y,不符合入组标准者排除

表 2 研究对象分组及基本资料

临床特征	癫痫组 (n = 120)	对照组 (n = 70)	t 值/ χ^2 值	P 值
性别(男/女)	65/55	40/30	0.16	$P = 0.69^b$
年龄(岁)	36.67 ± 8.86	36.99 ± 10.26	0.23	$P = 0.82^a$
病程(年)	6.68 ± 10.03	-	-	-

注:a. 独立样本 t 检验的 P 值;b. χ^2 检验的 P 值;“-”无相关数据

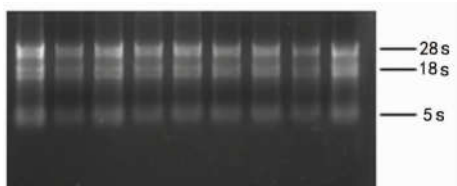


图 1 总 RNA 电泳图

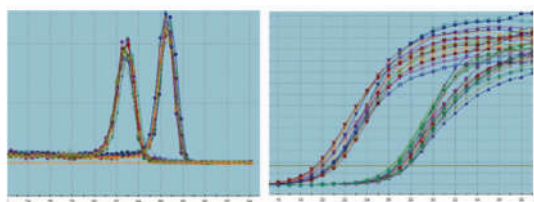


图 2 miR-134、U6 溶解曲线及扩增曲线

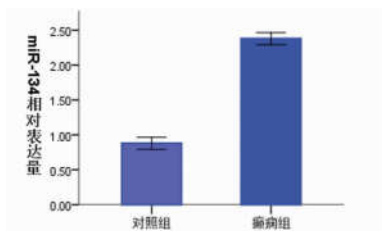


图 3 癫痫患者外周血 miR-134 相对表达量,与对照组相比,癫痫组明显升高 $P = 0.000$

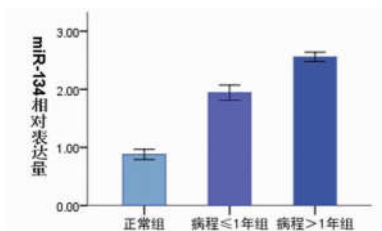


图 4 癫痫患者外周血 miR-134 在不同病程组中表达,病程长表达量增高 $P = 0.000$

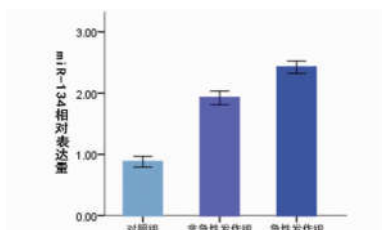


图 5 癫痫患者外周血 miR-134 在不同发作时限组中表达,急性发作组表达量升高 $P = 0.000$

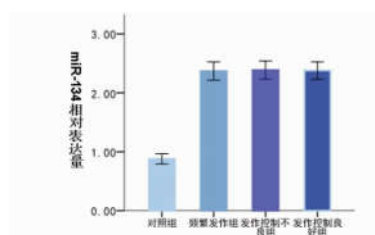


图 6 癫痫患者外周血 miR-134 在不同发作频率组中表达,发作频率对表达量无影响 $P = 0.987$

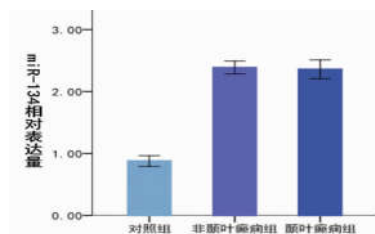


图 7 癫痫患者外周血 miR-134 在特殊癫痫综合征组中表达,特殊癫痫综合征(颞叶癫痫)对表达量无影响 $P = 0.764$

3 讨论

miR-134 是脑内含量丰富的一类特殊 microRNA,广泛分布于海马神经元和树突,在中枢神经系统中发挥重要调控作用^[12]。树突棘大小、密度及形态变化是影响癫痫发作的重要因素^[13]。Schratt 等^[14]在研究 miRNA 与树突棘之间联系时发现,miR-134 对树突棘大小及数量起调节作用,大鼠海马神经元中 miR-134 高表达,通过 Limk1 对树突棘大小起调节作用,miR-134 过表达,使树突棘变小,miR-134 对树突棘的体积具有负向调节作用,从而影响突触强度及突触可塑性。当皮质神经元膜去极化时,miR-134 前体水平显著增加^[15]。由此推断癫痫患者外周血 miR-134 表达量存在差异,本实验结果中在对癫痫组和对照组比较时发现癫痫组外周血 miR-134 表达量明显升高,支持此推断,表明 miR-134 在外周血中稳定表达,这种差异表达提示 miR-134 可作为生物标志物深入细致研究,进一步探明其差异表达在癫痫调控中的意义。此种差异表达可能机制为神经元去极化导致 miR-134 水平明显升高,通过转录后调节机制,调节相关靶蛋白,参与突触可塑性调控,促使异常兴奋性环路形成,最终参与癫痫发生发展。外周血 miR-134 稳定及差异表达,提示 miR-

134 可能成为癫痫诊断、监测药物敏感性、评估预后等特异性生物学标记物,为新药开发提供理论支撑,为癫痫治疗带来新的希望。

突触重塑、异常网络形成既可能是癫痫反复发作原因,也可能是癫痫反复发作的兴奋性毒性结果。我们的实验结果得出癫痫患者外周血 miR-134 表达量在长病程组中明显升高,推测外周血 miR-134 表达量可以在一定程度上反映突触重塑、神经异常网络形成等病理改变,外周血 miR-134 表达量变化可能为观察脑损伤新的视角,为早期发现神经元损伤提供新的途径,进而评估患者预后情况。

大量实验表明^[16],miR-134 与痫性发作有明显时限性,在无镁细胞外液诱导癫痫持续状态(Status epilepticus,SE)离体细胞模型中,模型制备成功后 72 h,miR-134 表达升高,在应用 miR-134 抑制剂处理的细胞中 SE 放电频率较对照组明显降低,神经元树突棘密度减少。Jimenez-Mateos 等^[17]研究发现,在制备动物癫痫模型前 24 h,侧脑室注射 antagomirs 抑制 miR-134 表达,结果显示海马神经元破坏明显减少,癫痫发作频率明显减少。SE 可引起 miR-134 在海马表达增加,有研究表明在实验动物的海马和难治性癫痫患者的颞叶皮质中 miR-134 的表达水平增高^[18]。在鼠 SE 模型中,应用 miRNA 拮抗剂诱导使 miR-134 表达量下降,鼠癫痫自发性癫痫的发生率明显下降,颞叶癫痫的病理特征有所减轻,海马 CA₃ 锥体神经元中树突棘密度降低,增加海马 CA₃ 锥体神经元棘突的体积,产生了有效的抗惊厥作用^[19]。抑制大鼠海马 miR-134 能够减轻 SE 发作,可以缩短癫痫发作的潜伏期,缩短 SE 发作时间^[20]。由此推测癫痫发作时限、发作频率、特殊癫痫综合征与外周血 miR-134 表达量相关,癫痫发作急性期、发作越频繁,miR-134 表达量越高,以及颞叶癫痫综合征、miR-134 的表达量升高,来评估颞叶癫痫反复发作的易感性,成为诊断特殊癫痫综合征的辅助检查之一。本实验结果显示,癫痫患者急性发作组 miR-134 表达量明显升高,支撑上述推断。但外周血 miR-134 在不同发作频率以及特殊癫痫综合征表达量无明显差异,得出上述结果可能因样本量较小有关,需要扩大样本量进一步研究。

综上所述,我们的实验结果发现癫痫组外周血 miR-134 表达量明显升高,与病程、发作时限相关,提示 miR-134 表达与神经元放电程度和损伤严重性相关,可为我们进一步研究 miR-134 作为生物标志物以及应用 miR-134 抑制剂保护神经元提供理论支持;在癫痫急性发作组及长病程组高表达可能为癫痫预后判断、疗效评估提供帮助。

[参考文献]

- [1] Kawai K. Epilepsy surgery: current status and ongoing challenges [J]. *Neurol Med Chir*, 2015, 55(5): 357-366.
- [2] El Achkar CM, Olson HE, Poduri A, et al. The genetics of the epilepsies [J]. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 2015, 15(7): 39.
- [3] Lee BI, Heo K. Epilepsy: new genes, new technologies, new insights [J]. *Lancet Neurol*, 2014, 13(1): 7-9.
- [4] Henshall DC, Hamer HM, Pasterkamp RJ, et al. MicroRNAs in epilepsy: pathophysiology and clinical utility [J]. *Lancet Neurol*, 2016, 15(13): 1368-1376.
- [5] Ye Y, Xu H, Su X, et al. Role of MicroRNA in governing synaptic plasticity [J]. *Neural Plast*, 2016, 4959523.
- [6] Gaudet AD, Fonken LK, Watkins LR, et al. MicroRNAs: Roles in regulating neuroinflammation [J]. *Neuroscientist*, 2018, 24(3): 221-245.
- [7] Barca-Mayo O, De Pietri Tonelli D. Convergent microRNA actions coordinate neocortical development [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2014, 71(16): 2975-2995.
- [8] Henshall DC. MicroRNA and epilepsy: profiling, functions and potential clinical applications [J]. *Curr Opin Neurol*, 2014, 27(2): 199-205.
- [9] Ma Y, Ramachandran A, Ford N, et al. Remodeling of dendrites and spines in the C1q knockout model of genetic epilepsy [J]. *Epilepsia*, 2013, 54(7): 1232-1239.
- [10] Jimenez-Mateos EM, Engel T, Merino-Serrais P, et al. Silencing microRNA-134 produces neuroprotective and prolonged seizure-suppressive effects [J]. *Nat Med*, 2012, 18(7): 1087-1094.
- [11] Liu W, Wu J, Huang J, et al. Electroacupuncture regulates hippocampal synaptic plasticity via mir-134-mediated limk1 function in rats with ischemic stroke [J]. *Neural Plast*, 2017, 2017: 9545646.
- [12] Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, et al. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(12): 5003-5008.
- [13] Konietzny A, Bar J, Mikhaylova M. Dendritic actin cytoskeleton: structure, functions, and regulations [J]. *Front Cell Neurosci*, 2017, 11(11): 147.
- [14] Schratz GM, Tuebing F, Nigh EA, et al. A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development [J]. *Nature*, 2006, 439(7074): 283-289.
- [15] Zito K, Knott G, Shepherd GM, et al. Induction of spine growth and synapse formation by regulation of the spine actin cytoskeleton [J]. *Neuron*, 2004, 44(2): 321-334.
- [16] Wang XM, Jia RH, Wei D, et al. MiR-134 blockade prevents status epilepticus like-activity and is neuroprotective in cultured hippocampal neurons [J]. *Neuroscience*, 2014, 272(20): 20-25.
- [17] Jimenez-Mateos EM, Engel T, Merino-Serrais P, et al. Silencing microRNA-134 produces neuroprotective and prolonged seizure-suppressive effects [J]. *Nat Med*, 2012, 18(7): 1087-1094.
- [18] Gallo A, Tandon M, Alevizos I, et al. The majority of microRNAs detectable in serum and saliva is concentrated in exosomes [J]. *PLoS One*, 2012, 7(3): e30679.
- [19] Jimenez-Mateos EM, Engel T, Merino-Serrais P, et al. Antagomirs targeting microRNA-134 increase hippocampal pyramidal neuron spine volume in vivo and protect against pilocarpine-induced status epilepticus [J]. *Brain Struct Funct*, 2015, 220(4): 2387-2399.
- [20] 王小木, 贾瑞华, 姜 墨, 等. 抑制 miR-134 治疗大鼠癫痫持续状态实验研究 [J]. *中华神经外科疾病研究杂志*, 2018, 17(4): 327-331.