

论著·实验研究

MicroRNA-132 拮抗剂对匹罗卡品诱导的幼年大鼠癫痫持续状态的影响

吴天慧^{1,2} 尹飞¹ 彭镜¹ 孔惠敏¹ 李琳红¹

(1. 中南大学湘雅医院儿科, 湖南 长沙 410008; 2. 湖南省儿童医院肾脏风湿科, 湖南 长沙 410007)

【摘要】目的 探讨 microRNA-132 拮抗剂对氯化锂-匹罗卡品诱导的幼年 Sprague-Dawley (SD) 大鼠癫痫持续状态 (SE) 的影响。**方法** 将 3 周龄 SD 大鼠分为癫痫模型组、microRNA-132 拮抗剂组和 microRNA-132 拮抗剂阴性对照组, 每组 15 只。MicroRNA-132 拮抗剂及其阴性对照预处理在造模前 24 h 进行, 利用氯化锂-匹罗卡品建立幼年 SD 大鼠 SE 模型。通过行为学观察各组大鼠 SE 发作潜伏期及 SE 诱导成功率; Lado 幼鼠癫痫评分观察各组大鼠抽搐发作的严重程度; 脑电图监测各组大鼠癫痫样放电的频率及波幅, 并统计各组死亡率。**结果** 在实验各组中, SE 诱导成功率差异无统计学意义 ($P>0.05$); 与 microRNA-132 拮抗剂阴性对照组和癫痫模型组比较, microRNA-132 拮抗剂组大鼠造模以后达到 SE 的潜伏期明显延长 ($P<0.05$), Lado 幼鼠癫痫评分下降 ($P<0.05$), 脑电图显示痫样放电的幅度及频率显著下降 ($P<0.05$), 死亡率稍降低。**结论** microRNA-132 拮抗剂预处理对氯化锂-匹罗卡品诱导的幼年 SD 大鼠 SE 发生和发展具有抑制作用, 抑制 microRNA-132 有可能成为 SE 药物治疗的潜在靶点和新方向。**【中国当代儿科杂志, 2016, 18(10): 1030-1034】**

【关键词】 MicroRNA-132; 拮抗剂; 癫痫持续状态; 大鼠

Effect of a microRNA-132 antagonist on pilocarpine-induced status epilepticus in young rats

WU Tian-Hui, YIN Fei, PENG Jing, KONG Hui-Min, LI Lin-Hong. Department of Pediatrics, Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410008, China (Peng J, Email: pengjing4346@163.com)

Abstract: Objective To study the effect of a microRNA-132 antagonist on lithium-pilocarpine-induced status epilepticus (SE) in young Sprague-Dawley (SD) rats. **Methods** Forty-five 3-week-old SD rats were randomly and equally divided into epilepticus model group, microRNA-132 antagonist group, and microRNA-132 antagonist negative control group. The young SD rat model of SE was established using lithium-pilocarpine. For the microRNA-132 antagonist group and the negative control group, pretreatment was performed 24 hours before the model establishment. Behavioral observation was performed to assess the latency of SE and success rate of induction of SE. The scale of Lado was used to evaluate the seizure severity. Electroencephalography (EEG) was used to assess the frequency and amplitude of epileptiform discharges. The mortality rate was calculated in each group. **Results** There was no significant difference in the success rate of induction of SE between the three groups ($P>0.05$). Compared with the microRNA-132 negative control group and the epilepticus model group, the microRNA-132 antagonist group had significantly prolonged SE latency after model establishment ($P<0.05$), a significantly lower Lado score of seizure ($P<0.05$), significantly lower frequency and amplitude of epileptiform discharges on EEG ($P<0.05$), and a slightly reduced mortality rate. **Conclusions** The treatment with the microRNA-132 antagonist shows an inhibitory effect on the development and progression of lithium-pilocarpine-induced SE in young SD rats. The inhibition of microRNA-132 is likely to be a potential target or direction for drug treatment of SE. **【Chin J Contemp Pediatr, 2016, 18(10): 1030-1034】**

Key words: MicroRNA-132; Antagonist; Status epilepticus; Rats

〔收稿日期〕2016-05-17; 〔接受日期〕2016-08-12

〔基金项目〕国家自然科学基金 (81371434)。

〔作者简介〕吴天慧, 女, 博士研究生, 副主任医师。

〔通信作者〕彭镜, 女, 副教授。

癫痫持续状态 (status epilepsy, SE) 或称癫痫状态, 是癫痫连续发作之间意识未完全恢复又频繁再发, 或发作持续 30 min 以上不自行停止。SE 是癫痫发作的一种特殊形式, 是需要紧急处理的一种严重状态。大约 10%~20% 的儿童癫痫病人至少有一次 SE 发作, 所以更是儿科常见的急诊疾患之一。

MicroRNA 是近年来发现的一类新的调控家族, 与神经发育以及成人神经生物网络的多基因调控相关, 如 microRNA-132 与神经外向性生长有关, 而 microRNA-134 在神经突触的调节中起了重要作用, 提示这些神经源性 microRNA 与突触可塑性等神经功能关系密切^[1-3]。已有学者发现在癫痫发生后, 不同海马组织中 microRNAs 的表达改变不同^[4-5], 其中 microRNA-132 和 microRNA-134 在这些脑组织及体液中呈现异常表达, 提示其可能作为癫痫等脑损伤后的生物学标记。在一些癫痫患者中, 持续癫痫发作伴随的海马组织中 microRNA-132 表达水平增加, 可能导致神经形态学的改变, 引起神经元的过度兴奋和大脑认知功能障碍^[6]。前期本课题组也发现在幼年内侧颞叶癫痫 (MTLE) 大鼠模型各期 microRNA-132 呈现持续性表达增高, 提示 microRNA-132 与 MTLE 的发生发展关系密切^[7]。细胞实验证实, 在体外培养原代神经元中, 通过有效干预改变 microRNA-132 的表达, 可对神经细胞突触形态及细胞兴奋性产生影响, 过度表达的 microRNA-132 可导致神经突触重塑和树突出芽, 增加兴奋性电流, 促进神经元细胞的异常放电^[8-9]。但目前国内外缺乏在体干扰 microRNA-132 对癫痫发生、发展影响的研究, 对于干扰时机、给药方式更缺乏系统的研究。MicroRNA 拮抗剂是一类经过特殊化学修饰的 microRNA 拮抗剂, 通过与体内成熟的 microRNA 强竞争性结合, 阻止 microRNA 靶基因 mRNA 的互补配对, 达到抑制 microRNA 功能的作用。在前期的研究中, microRNA 拮抗剂干预神经系统最常采用侧脑室注射方法^[7-10]。因此, 结合国内外研究进展和本课题组的前期工作基础, 本研究采用氯化锂-匹罗卡品诱导建立幼年 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 SE 模型, 在造模前侧脑室注射 microRNA-132 拮抗剂下调 microRNA-132 水平, 观察 microRNA-132 拮抗剂对大鼠 SE 发生的影响,

探讨调控 microRNA-132 对大鼠癫痫发作的在体影响, 为后续机制研究奠定良好的基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

MicroRNA-132 拮抗剂及拮抗剂阴性对照购买自广州瑞博生物科技有限公司 (产品 ID: miR111645)。MicroRNA-132 拮抗剂以冻干粉的形式保存于 -20℃~-80℃, 使用前用 RNase-free H₂O (上海信然生物科技有限公司) 稀释, 分装保存, 尽量不要超过 5 次反复冻融。

匹罗卡品 (美国 Sigma-Aldrich 公司); 氯化锂 (美国 Genview 公司); 脑电图记录仪 (日本 Olympus 公司); 脑立体定位仪、微量注射器、套管针 (深圳瑞沃德公司); 微型手持式颅钻 (STRONG90, 韩国 SAESHIN 公司)。

1.2 实验动物分组

3 周龄雄性 SD 大鼠购自中南大学湘雅医学院实验动物中心, 随机分为癫痫模型组、microRNA-132 拮抗剂组、microRNA-132 拮抗剂阴性对照组, 在置管至建模前存活的大鼠进入研究, 如期间死亡予以剔除, 并分批次同步补充至每组 15 只。

1.3 侧脑室置管及脑电图电极定位

采用立体脑定位仪, 以实验动物前囟中点为参照点, 在前囟中点旁移 1.2 cm, 后移 0.6 cm, 深度 4.1 cm 置入套管针, 牙科水泥固定。海马电极定位为前囟中点旁移 2.5 mm, 后移 3.8 mm, 颅骨下 3.8 mm。小脑参考电极定位为正中中线人字缝后 1 mm 突破颅骨即可。

1.4 MicroRNA-132 拮抗剂预处理

在侧脑室成功置管后 1 周、建模前 24 h, microRNA-132 拮抗剂组和 microRNA-132 拮抗剂阴性对照组大鼠固定于脑立体定位仪上, 采用微量注射器分别向侧脑室置管内注射 microRNA-132 拮抗剂、microRNA-132 拮抗剂阴性对照, 剂量为 50 μL (20 nmol/mL)^[4,10], 癫痫模型组则同步给予生理盐水 50 μL。

1.5 动物建模

各组 SD 大鼠腹腔注射氯化锂 125 mg/kg, 18~20 h 后腹腔注射匹罗卡品 (50 mg/kg), 诱导

至癫痫发作^[11]，根据 Lado 幼鼠癫痫评分判定癫痫发作的程度，达到 Lado 幼鼠癫痫发作分级标准 4~7 级（表 1）并持续 2 h 即为 SE^[12]。给予 SE 大鼠水合氯醛 300 mg/kg 腹腔注射终止发作，解救前死亡者剔除，解救成功者纳入进一步研究。

表 1 Lado 幼鼠癫痫发作分级标准

分级	状态
0 级	无发作
1 级	机械性咀嚼
2 级	连续性点头
3 级	单侧前肢阵挛
3.5 级	前肢交替阵挛
4 级	双侧前肢阵挛、后退
5 级	双侧前肢阵挛、后退、摔倒
6 级	狂奔嘶叫
7 级	强直发作

1.6 行为学观察

通过行为学观察统计潜伏期时长，将实验大鼠从注射致痫药物开始到出现行为学 Lado 分级 4 级及以上痫性发作所需时间定义为潜伏期。Lado 幼鼠癫痫评分评价大鼠抽搐严重程度，统计死亡率。

1.7 脑电图观察癫痫放电

监测时长为注射四罗卡品后约 3 h，达到 SE 后 90 min 终止。

1.8 统计学分析

采用 SPSS 17.0 统计软件包对数据进行统计学分析，计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，多组计量资料的比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用 SNK-*q* 检验， $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SE 模型制备结果

各组给予氯化锂诱导后，注射四罗卡品 5~30 min，动物开始出现机械性咀嚼、连续性点头、单侧前肢阵挛、前肢交替阵挛，随后出现双侧前肢阵挛、后退、摔倒，最后出现狂奔嘶叫、强直

发作。癫痫模型组、microRNA-132 拮抗剂组及其阴性对照组分别有 8、9、9 只大鼠达到 SE，诱导成功，成功率分别为 53% (8/15)、60% (9/15)、60% (9/15)，各组间比较差异无统计学意义 ($\chi^2 = 5.42$, $P > 0.05$)。

2.2 各组大鼠抽搐潜伏期时长

各组潜伏期比较差异有统计学意义 ($F = 4.72$, $P < 0.05$)。MicroRNA-132 拮抗剂组潜伏期 (56.9 ± 2.7 min) ($n = 9$) 较其阴性对照组 (51.4 ± 1.7 min) ($n = 9$)、癫痫模型组 (52.2 ± 2.3 min) ($n = 8$) 明显延长 ($P < 0.05$)，癫痫模型组和 microRNA-132 拮抗剂阴性对照组之间比较，差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.3 各组大鼠抽搐 Lado 评分

Lado 评分结果显示：各组 Lado 评分比较差异有统计学意义 ($F = 5.16$, $P < 0.05$)。MicroRNA-132 拮抗剂预处理后，SD 大鼠的 Lado 评分为 5.3 ± 1.0 分 ($n = 9$)，较癫痫模型组 (5.8 ± 0.8 分) ($n = 8$) 及其阴性对照组 (5.7 ± 0.8 分) ($n = 9$) 均有下降 ($P < 0.05$)；而其阴性对照组与癫痫模型组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.4 脑电图监测

通过脑电图监测观察到，在诱导 SE 后，各组大鼠脑电图均可见到高波幅尖波、棘波发放，分析 SE 后 30 min 脑电图结果显示（图 1），microRNA-132 拮抗剂组的大鼠脑电图尖波放电频率及放电幅度均明显低于癫痫模型组及 microRNA-132 拮抗剂阴性对照组 ($P < 0.05$)，而癫痫模型组与 microRNA-132 拮抗剂阴性对照组的放电频率及幅度比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 2。

2.5 各组大鼠死亡情况

SE 诱导成功后通过观察各期的大鼠死亡情况发现，在 SE 后短时间 (7 d) 内，各组均有不同程度的死亡，癫痫模型组、microRNA-132 拮抗剂及其阴性对照组分别死亡 2、2、3 只，在 21 d 内，癫痫模型组、microRNA-132 拮抗剂及其阴性对照组分别死亡 3、2、3 只，21 d 后至 56 d 内，癫痫模型组、microRNA-132 拮抗剂及其阴性对照组大鼠均无新发死亡。

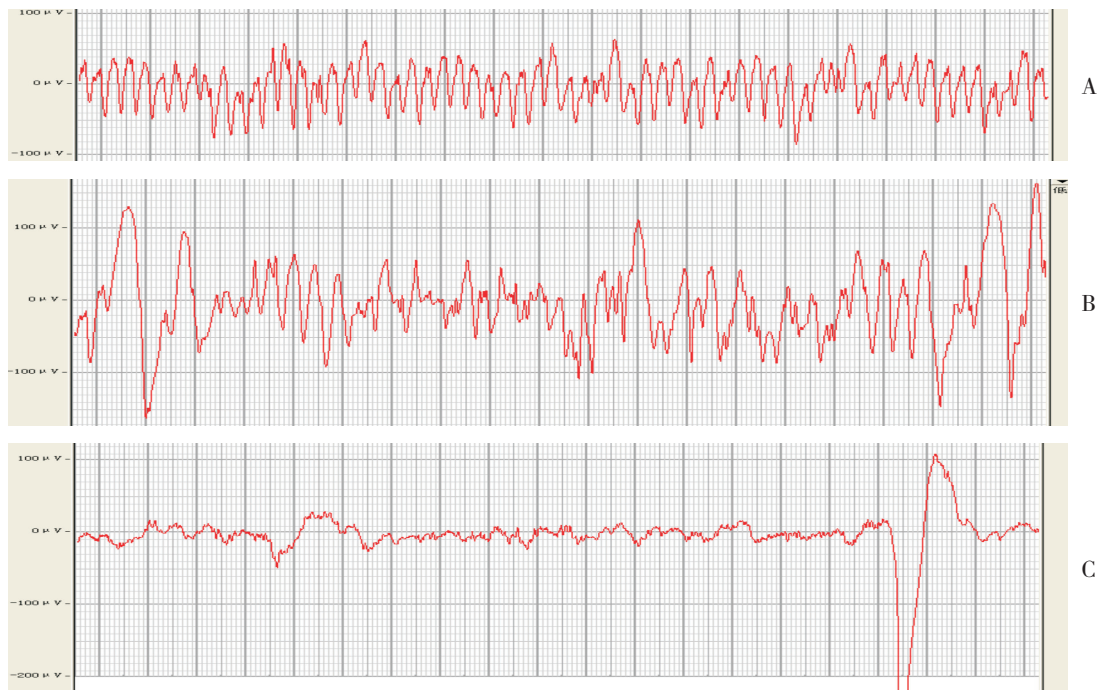


图 1 各组脑电图监测结果 A: 癫痫模型组; B: microRNA-132 拮抗剂阴性对照组; C: microRNA-132 拮抗剂组。
脑电图记录参数为 200 ms/div、100 μ V、0.02 s、30 Hz。

表 2 各组大鼠放电频率与放电幅度比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	放电频率 (次/min)	放电幅度 (μ V)
癫痫模型组	8	32.2 $\pm$ 5.0	106 $\pm$ 34
microRNA-132 拮抗剂 阴性对照组	9	31.1 $\pm$ 3.6	87 $\pm$ 16
microRNA-132 拮抗剂组	9	18.9 $\pm$ 2.6 ^{a,b}	36 $\pm$ 16 ^{a,b}
F 值		4.98	-5.84
P 值		0.02	0.01

注: a 示与癫痫模型组比较, $P < 0.05$; b 示与 microRNA-132 拮抗剂阴性对照组比较, $P < 0.05$ 。

3 讨论

MicroRNA 是微小非编码 RNA, 参与各种生物的分化、增殖及凋亡等生理、病理过程。MicroRNA-132 被认为是神经源性 microRNA^[13], 在大鼠、小鼠及人类的中枢神经系统均 100% 保守表达, 与正常神经分化、生长及扩展以及突触重塑等诸多神经功能有关。

MicroRNA-132 表达具有突触优势, 既往发现成熟的 microRNA-132 在海马齿状回区域神经元高度表达, 在胚胎后期神经元树突区域或者成年大脑的突触碎片均有表达; 除了成熟体, microRNA-132

前体也在轴突富集^[8-9]。MicroRNA-132 表达增加能促进锥体细胞和颗粒细胞向神经元的成熟, 促使颗粒神经元分化成熟。在培养的原代神经元中, microRNA-132 富集于轴突, 作为调节轴突延伸发展的正性调节因子, 作用于轴突局部, 调节 Rasal mRNA, 促进轴突延伸, 与神经元形态和突触可塑相关, 是调节突触活动的神经结构和功能的可塑性的重要因素^[13-14]。

有研究发现 microRNA-132 表达异常与神经系统的许多疾病相关^[13-16]。同时, 在多种 MTLE 模型中, microRNA-132 均表达上调, 认为其与癫痫的发生、发展有关系^[14-16]。有观点认为 MTLE 发生时, 急性期存在大量神经元的丢失, 同时, 星形胶质细胞和小胶质细胞大量增生从而对癫痫的反复发作产生长期的影响, 由于大量神经元丢失, 星形胶质细胞、小胶质细胞增生, 海马硬化发生^[7,17]。在体外培养原代神经元中, 过度表达 microRNA-132 导致神经突触重塑和树突出芽, 增加兴奋性电流, 对神经元细胞的异常放电有影响^[8-9]。也有研究在诱导癫痫前给予干预, 使用 microRNA-132 拮抗剂, 抑制 microRNA132 的表达, 可减少 SE 后海马 CA3 区域的神经元细胞死亡^[4,13-14]。在本研究中我们通过侧脑室注射 microRNA-132 拮抗剂预处理后建立

SE模型,从脑电图来看,其放电频率和幅度均低于癫痫模型组,可能与此有关。

本课题组发现在幼年MTLE大鼠模型microRNA-146a、155及132的表达有改变,尤其是microRNA-132呈现持续性表达增高,提示microRNA-132与MTLE的发生发展关系密切。Huang等^[10]发现在氯化锂-匹罗卡品模型中急性期microRNA-132表达上调,而慢性期表达下调,所以认为抑制microRNA-132的表达可能是起神经保护性作用。而既往的实验通过沉默microRNA-132基因或使用拮抗剂改变microRNA-132的表达,会对神经系统造成改变。在培养的海马轴突中,敲除microRNA-132减少轴突的延伸,而过度表达则促进其延伸^[18]。清除体内的microRNA-132,与突触长度和宽度减少有关,而且使得突触转运受损^[1,19]。在本研究中,我们通过使用microRNA-132拮抗剂干预后,期望改变体内microRNA-132的水平,我们观察到注射microRNA-132拮抗剂的幼年SD大鼠诱导SE,其急性期死亡率低于对照组,可以证实microRNA-132拮抗剂对癫痫疾患存在保护作用,但由于为小样本资料,结果仍值得商榷。而通过比较microRNA-132拮抗剂组达到SE的潜伏期长于癫痫模型组,总体死亡率低于癫痫模型组,可以推测microRNA-132拮抗剂可能通过某些信号途径调节,减少神经元的死亡而发挥神经保护作用,而相关机制的研究,亦是我们进一步的研究方向。

综上所述,通过使用microRNA-132拮抗剂,对氯化锂-匹罗卡品诱导的幼年SD大鼠发生SE具有抑制作用,因此抑制microRNA-132的表达有可能成为SE药物治疗的潜在靶点和新方向。

[参 考 文 献]

- [1] Lambert TJ, Storm DR, Sullivan JM. MicroRNA132 modulates short-term synaptic plasticity but not basal release probability in hippocampal neurons[J]. PLoS One, 2010, 5(12): e15182.
- [2] Numakawa T, Richards M, Adachi N, et al. MicroRNA function and neurotrophin BDNF[J]. Neurochem Int, 2011, 59(5): 551-558.
- [3] Henshall DC. microRNAs in the pathophysiology and treatment of status epilepticus[J]. Front Mol Neurosci, 2013, 6: 37.
- [4] Jimenez-Mateos EM, Bray I. miRNA expression profile after status epilepticus and hippocampal neuroprotection by targeting miR-132[J]. Am J Pathol, 2011, 179(5): 2519-2532.
- [5] McKiernan RC, Jimenez-Mateos EM, Bray I, et al. Reduced mature microRNA levels in association with dicer loss in human temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis[J]. PLoS One, 2012, 7(5): e35921.
- [6] Shaltiel G, Hanan M, Wolf Y, et al. Hippocampal microRNA-132 mediates stress -inducible cognitive deficits through its acetylcholinesterase target[J]. Brain Struct Funct, 2013, 218(1): 59-72.
- [7] Peng J, Omran A, Ashhab MU, et al. Expression patterns of miR-124, miR-134, microRNA-132, and miR-21 in an immature rat model and children with mesial temporal lobe epilepsy[J]. J Mol Neurosci, 2013, 50(2): 291-297.
- [8] Vo N, Klein ME, Varlamova O, et al. A cAMP-response element binding protein-induced microRNA regulates neuronal morphogenesis[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(45): 16426-16431.
- [9] Wayman GA, Lee YS, Tokumitsu H, et al. Calmodulin- kinases: modulators of neuronal development and plasticity[J]. Neuron, 2008, 59(6): 914-931.
- [10] Huang Y, Guo J, Wang Q, et al. MicroRNA-132 silencing decreases the spontaneous recurrent seizures[J]. Int J Clin Exp Med, 2014, 7(7): 1639-1649.
- [11] 甘娜,尹飞,孔惠敏,等. IL-1 β 和NF- κ B在慢性内侧颞叶癫痫模型中的相互作用[J]. 神经解剖学杂志, 2013, 29(6): 637-643.
- [12] Gan N, Yang L, Omran A, et al. Myeloid-related protein 8, an endogenous ligand of Toll-like receptor 4, is involved in epileptogenesis of mesial temporal lobe epilepsy via activation of the nuclear factor- κ B pathway in astrocytes[J]. Mol Neurobiol, 2014, 49(1): 337-351.
- [13] Magill ST, Cambronne XA, Luikart BW, et al. microRNA-132 regulates dendritic growth and arborization of newborn neurons in the adult hippocampus[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107(47): 20382-20387.
- [14] Luikart BW, Bensen AL, Washburn EK, et al. miR-132 mediates the integration of newborn neurons into the adult dentate gyrus[J]. PLoS One, 2011, 6(5): e19077.
- [15] Guo J, Wang H, Wang Q, et al. Expression of p-CREB and activity-dependent miR-132 in temporal lobe epilepsy[J]. Int J Clin Exp Med, 2014, 7(5): 1297-1306.
- [16] Miller BH, Zeier Z, Xi L, et al. MicroRNA-132 dysregulation in schizophrenia has implications for both neurodevelopment and adult brain function[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012, 109(8): 3125-3130.
- [17] Freiman TM, Eismann-Schweimler J, Frotscher M, et al. Granule cell dispersion in temporal lobe epilepsy is associated with changes in dendritic orientation and spine distribution[J]. Exp Neurol, 2011, 229(2): 332-338.
- [18] Hancock ML, Preitner N, Quan J. MicroRNA-132 is enriched in developing axons, locally regulates Rasa1 mRNA, and promotes axon extension[J]. J Neurosci, 2014, 34(1): 66-78.
- [19] Bicker S, Lackinger M, Weiß K, et al. MicroRNA-132, -134, and -138: a microRNA troika rules in neuronal dendrites[J]. Cell Mol Life Sci, 2014, 71(20): 3987-4005.

(本文编辑: 万静)