

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学号: 24520141153539

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

长链非编码 RNA AK035610 在癫痫发病中
的作用及机制研究

The Role of the Long Non-Coding RNA AK035610 in
Epileptogenesis

指导教师姓名: 姚 一 张云武 教授

专 业 名 称: 外科学

论文提交日期: 2017 年 4 月

论文答辩时间: 2017 年 5 月

学位授予日期:

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2017 年 5 月

长链非编码 RNA AK035610 在癫痫发病中的作用与机制研究

指导教师 姚一 张云武 教授

厦门大学

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

摘要

目的: 使用海藻酸 (Kainic acid ,KA) 诱导 C57BL/6 小鼠产生癫痫样发作以模拟人类颞叶癫痫的发作状态,通过基因芯片方法筛选出异常表达的长链非编码 RNA (lncRNA)。选择并探讨其中一个 lincRNA-AK035610 及其靶基因 *INHBA* 在癫痫发病中的参与及调控机制,从而为癫痫的诊断和药物研发提供新的思路及生物学靶点。

方法: 使用 6-8 周 C57BL/6 雄性小鼠,通过腹腔注射海藻酸构建癫痫发作小鼠模型,分离癫痫发作小鼠和对照小鼠的海马,提取 RNA 后使用长链非编码 RNA 基因芯片进行分析,对癫痫小鼠中发生异常表达的 lncRNA,特别是位于基因之间的 LincRNA 进行筛选和聚类分析。通过实时荧光定量 PCR 的生物学方法进行验证表达。针对其中一个 lncRNA, lincRNA-AK035610 及其靶基因 *Inhba*, 进一步在细胞模型和癫痫病人组织中进行验证。使用 *INHBA* 重组蛋白处理神经元细胞以及给予小鼠侧脑室注射,证明其保护作用。

结果: 1. 海藻酸可以诱导小鼠产生癫痫样发作,行为发作的同时可以检测到相应的异常脑电。基因芯片分析筛选出 13 条异常表达的 lincRNA,通过实时荧光定量 PCR 验证 lincRNA-AK035610 及 lincRNA-AK015830 具有明显异常表达。选取 lincRNA-AK035610 为主要研究对象进一步开展研究。生物信息学分析显示 AK035610 位于 *INHBA* 基因下游。我们研究结果发现: 1. 在癫痫发作小鼠模型海马组织中 lincRNA-AK035610 及 *Inhba* 表达均明显上调,在小鼠皮层组织中, lincRNA-AK035610 也有明显上升趋势,但是未观察到明显统计学差异,而 *INHBA* 基因在小鼠皮层组织中也呈明显升高。2. 在人群中 lincRNA-AK035610 的同源位点被认为是 *INHBA* 基因的 splicing variant 1 的 3' UTR 的一部分。

但是在对照组病人中 lincRNA-AK035610 同源位点的表达和 *INHBA* CDS 的表达之间没有明显相关性,而在癫痫组病人的脑组织中具有很好的相关性,提示癫痫病人中 *INHBA* 的表达以 splicing variant 1 为主要形式; 3. lincRNA-AK035610 在神经元细胞的亚细胞定位在细胞核内; 4. 重组 *INHBA* 蛋白可以抑制海藻酸诱导的凋亡,并且可以抑制 NMDA 受体的 NR2B 亚基的表达,从而对神经元起到保护作用; 5. 侧脑室注射重组 *INHBA* 蛋白可以降低海藻酸诱导的小鼠癫痫发作的行为

学等级，同时可以减少小鼠的异常脑电并延长海藻酸诱导的癫痫发作的潜伏期。

结论：在小鼠癫痫发作模型中及颞叶癫痫患者手术标本中，lincRNA-AK035610 及靶基因 *Inhba* 均明显升高，并且只在癫痫患者手术标本中呈相关性，而在非癫痫病人中无明显相关，提示 *INHBA* 表达的改变可以作为癫痫诊断的生物学标记，并且重组 *INHBA* 可以缓解癫痫症状并对神经元起到保护作用，可能成为潜在的新的癫痫治疗药物。

关键词：长链非编码 RNA (lncRNA)； 癫痫； 活化素 A

厦门大学博硕士论文摘要库

Abstract

Objective: In order to establish an animal model of human temporal lobe epilepsy, C57BL / 6 mice were induced into epileptic seizures by kainic acid. To explore the dynamic changes of regulatory networks and functional pathways of lincRNA in the pathogenesis of epilepsy, and provide new evidence for the diagnosis of epilepsy and new targets for anti-epileptic drug development.

Methods: C57BL / 6 male mice (6-8 weeks) were used as the main tools. The epileptic seizures mice model was established by intraperitoneal injection of kainic acid. The long non-coding RNA gene microarray was used to detect the abnormalities in the hippocampus of seizures. The expression of lincRNA-AK035610 was confirmed by real-time quantitative PCR. And the nearby gene *Inhba* of lincRNA-AK035610 was predicted by bioinformatics to verify. The expression of lincRNA-AK035610 and *INHBA* was verified by real-time quantitative PCR and immunoblotting in the temporal lobe brain tissue of TLE patients. *INHBA* recombinant protein is injected into the lateral ventricles of mice induced by KA mouse behavior and EEG changes were observed.

Results: 1. kainic acid can induce epileptic seizures in mice, and the corresponding abnormal EEG can be detected simultaneously. LincRNA-AK035610 and lincRNA-AK015830 had abnormal expression in the epileptic seizures mice model, and we selected lincRNA-AK035610 as the main research object for the following study; 2. The expression of lincRNA-AK035610 and *Inhba* in hippocampus of KA-induced mouse model were significantly up-regulated, and increase in cortical tissues, but no significant statistical difference was observed. The *Inhba* gene is significantly increased in the hippocampus and cortex tissues of modle mice. The expression of splicing variant 1 and *INHBA* was similar to the mouse model of epilepsy, but there was no significant correlation between *INHBA* splicing variant 1 3'UTR and *INHBA* in the control group Epilepsy patients have a good correlation in the brain tissue; 3.The subcellular localization of lincRNA-AK035610 in neuronal cells is located in the nucleus; 4. Recombinant *INHBA* protein can reduce

KA-induced apoptosis ; 5. Supplement of INHBA alleviates KA-induced seizure to reduce the abnormal EEG level change and prolong the latency time of seizures induced by KA.

Conclusion: lincRNA-AK035610 (splicing variant 1) and *INHBA* were significantly increased in the mouse model of seizure and temporal lobe epilepsy patients. And only in the TLE patients brain specimens have significant correlation. It can be used as a biomarker of epilepsy diagnosis, and try to design target drugs for epilepsy treatment.

Keywords: long non-coding RNA ; Epilepsy ; *INHBA*

目 录

中文摘要.....	I
英文摘要.....	III
英文缩略词.....	IX
第一章 前言.....	1
1.1 癫痫概述.....	1
1.2 长链非编码 RNA 的概述.....	1
1.3 LncRNA 参与神经系统的复杂调节.....	3
1.4 LncRNA 在神经系统中的作用机制.....	4
1.5 LncRNA 在神经发育及神经系统疾病.....	5
1.5.1 LncRNA 与神经系统发育.....	5
1.5.2 LncRNA 与神经元分化.....	6
1.5.3 LncRNA 与突触重塑.....	7
1.5.4 LncRNA 与神经系统疾病.....	8
1.6 LincRNA-AK035610 与癫痫相关性 & 本文的立题依据.....	11
1.7 本论文的研究内容与研究意义.....	13
第二章 实验材料与amp;方法.....	14
2.1 实验材料.....	15
2.1.1 实验设备及仪器.....	15
2.1.2 实验试剂.....	16
2.1.3 实验试剂配制.....	16
2.2 实验方法.....	17
2.2.1 KA 诱导癫痫动物模型的建立及处理.....	17
2.2.2 小鼠海马立体定位注射.....	17
2.2.3 颞叶癫痫患者脑组织收集.....	18
2.2.4 小鼠原代神经元分离与培养.....	19
2.2.5 Lipofectamine™ 2000 转染.....	19

2.2.6 LncRNA 原位杂交.....	19
2.2.7 免疫荧光.....	20
2.2.8 小鼠脑电图记录和行为学观察.....	21
2.2.9 动物标本处理.....	21
2.2.10 RNA 抽提和纯化及 RT-PCR 检测.....	21
2.2.11 蛋白质免疫印迹.....	24
2.2.12 数据统计分析.....	26
第三章 实验结果.....	23
3.1 海藻酸诱导的癫痫小鼠模型与对照组小鼠海马及皮层组织中长链非编码 RNA 的芯片检测和结果分析.....	27
3.2 海藻酸诱导的癫痫小鼠模型与对照组小鼠海马组织及海藻酸处理神经元细胞中 lincRNA-AK035610 及靶基因 <i>Inhba</i> 表达情况和结果分析	27
3.3 LincRNA-AK035610 定位在神经元细胞核内.....	29
3.4 神经元细胞中敲低 lincRNA-AK035610 后 <i>Inhba</i> 的表达以及重组 INHBA 蛋白处理神经元后的细胞信号改变.....	30
3.5 癫痫病人中 lincRNA-AK035610 同源序列 splicing variant 1 及 <i>INHBA</i> 的表达情况及结果分析.....	30
3.6 INHBA 的重组蛋白可以改善 KA 诱导的小鼠癫痫样发作.....	32
3.7 重组 INHBA 蛋白可以减少海藻酸诱导的神经元凋亡.....	33
3.8 补充数据.....	33
第四章 讨论.....	35
第五章 实验结论.....	38
参考文献.....	39

Table of Contents

Abstract in Chinese.....	I
Abstract in English.....	III
Abbreviation Index.....	IX
Chapter 1 Introduction.....	1
1.1 Epilepsy Overview.....	1
1.2 LncRNA Overview.....	1
1.3 LncRNAs contribute to the intricate regulation of the CNS.....	3
1.4 A complex transcriptional portfolio within the CNS.....	4
1.5 LncRNAs in the brain.....	5
1.5.1 LncRNAs in brain development.....	5
1.5.2 LncRNA in neuron differentiation.....	6
1.5.3 LncRNAs in synaptic plasticity.....	7
1.5.4 LncRNAs in CNS disorders.....	8
1.6 LincRNA-AK035610 correlated with epilepsy	11
1.7 Contents and Research significance of this article.....	13
Chapter 2 Materials, Methods and Design.....	14
2.1 Experimental Materials.....	15
2.1.1 Experimental Instrument and Equipment.....	15
2.1.2 Experimental Reagent.....	16
2.1.3 Experimental Reagent preparation.....	16
2.2 Experimental Methods.....	17
2.2.1 Establishment and treatment of KA-induced animal model of epilepsy.....	17
2.2.2 Lateral ventricle stereotactic injection in mice.....	17
2.2.3 Collecting Surgical specimens of TLE patients.....	18
2.2.4 Cell culture and treatment.....	19
2.2.5 Lipofectamine TM 2000 transfection.....	19
2.2.6 LncRNA FISH.....	19

2.2.7 Immunofluorescence.....	12
2.2.8 EEG recording and behavioral observation in mice.....	21
2.2.9 Processing of animal and patient specimens.....	21
2.2.9 RNA extraction reverse transcription and quantitative PCR experiments.....	21
2.2.10 Western blot experiments.....	24
2.2.11 Data statistics.....	26
Chapter 3 Results.....	27
3.1 KA-induced epilepsy mouse model and control group mice hippocampus and cortical tissue in the long non-coding RNA chip detection and results analysis .	27
3.2 LincRNA-AK035610 and <i>Inhba</i> level is increased in KA-induced seizure models.....	27
3.3 LincRNA-AK035610 is localized in the nucleus of neuronal cells.....	29
3.4 Supplement of INHBA induces lincRNA-AK035610 decrease.....	30
3.5 splicing variant 1 and <i>inhba</i> level is increased in TLE patients.....	30
3.6 Supplement of INHBA alleviates KA-induced seizure.....	32
3.7 Supplement of INHBA can reduce KA-induced neuronal apoptosis.....	33
3.8 Supplement data.....	33
Chapter 4 Discussion.....	35
Chapter 5 Conclusion.....	38
Reference.....	39

英汉缩略语名词对照

英文缩写	英文全称	中文全称
KA	Kainic acid	海藻酸
lncRNA	long non-coding RNA	长链非编码 RNA
mRNA	Messenger ribonucleic acid	信使 RNA
INHBA	Activin Beta-A Chain	激活素 A
INHBB	Inhibin, Beta B	抑制素 B
NMDA	N-Methyl-D-Aspartic Acid	N-甲基-D-天门冬氨酸
TGF	transforming growth factor	转化生长因子
FISH	hybridization in situ	原位杂交
EP	Epilepsy	癫痫
MIE	Medically intractable epilepsy	药物难治性癫痫
LTP	Long-term potentiation	长时程增强
EEG	Electroencephalogram	脑电图
TLE	Temporal lobe epilepsy	颞叶癫痫
WB	Western Blot	免疫印迹实验
MFS	Mossy fiber sprout	苔藓纤维出芽
DAB	Diaminobenzidine	二氨基联苯胺
DEPC	Diethyl pyrocarbonate	焦炭酸二乙酯
mg	Milligram	毫克
μ g	Microgram	微克

min	Minutes	分钟
ml	Milliliter	毫升
μ l	Microlitre	微升
h	hour	小时
kg	Kilogram	千克
m	month	月

厦门大学博硕士学位论文摘要库

第一章 前言

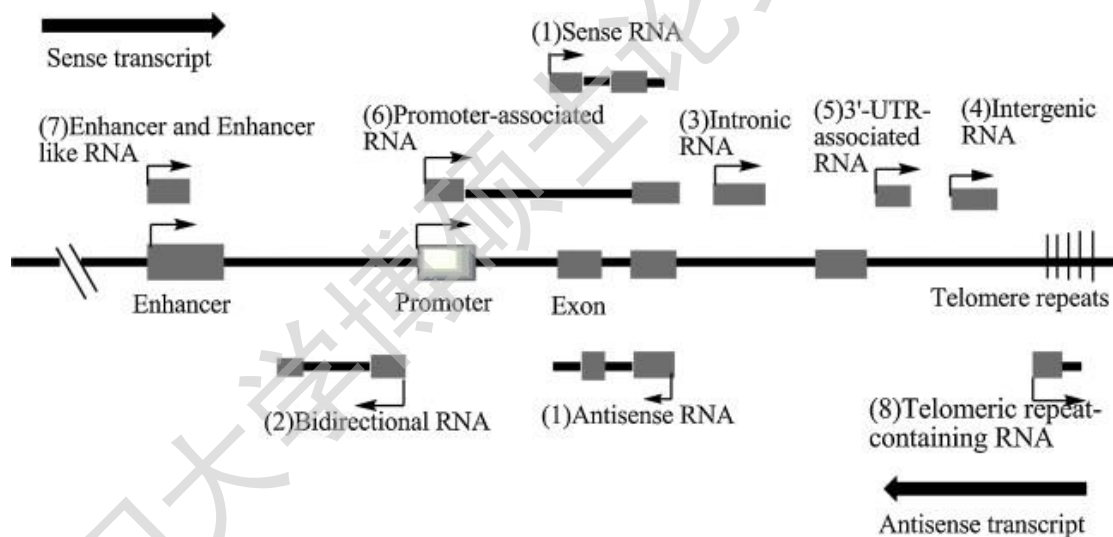
1.1 癫痫概述

癫痫是一种常见的神经系统慢性疾病，该疾病是由于多种原因导致神经元高度同步异常放电，引起短暂的脑功能异常，并表现出相应的神经生理学、行为学及社会学的后果，临床表现以具有发作性、短暂性、重复性和刻板性为特征^[1]。癫痫影响全世界超过 5000 万人，我国约有 960 万的患者，并且每年有 60-70 万新发病例^[1, 2]。在幼年期的的大脑中，由于大脑处于发育阶段，神经元突触及各种神经环路处于形成阶段，大脑对神经元的反复异常放电及痫性发作非常敏感，可导致患者发育减缓，智力下降等改变^[3]。常用的抗癫痫药物只能控制约三分之二的癫痫患者发作，且不能从根本上解决患者的病理生理学状态^[4]。另外三分之一为药物难治性癫痫，抗癫痫药物治疗效果不佳。难治性癫痫发病机制涉及多种病因及诱因，如在遗传因素中 mTOR 基因突变可导致结节性硬化症，并伴发癫痫发作，且部分患者癫痫发作抗癫痫药物控制不佳^[5-7]。除了遗传因素之外，一些癫痫基因以及调节癫痫基因的相关基因的表达紊乱，可以调控下游的信号传导通路，在分子水平、细胞水平以及神经环路引起各种神经生物学的改变^[2, 8]，如神经炎症、离子通路改变、突触重塑、神经元坏死与凋亡、胶质细胞增生等引起神经环路的改变，最终导致癫痫的反复发作^[9-12]。在我们对难治性癫痫进行外科治疗时发现，尽管部分患者致痫病灶被完全切除，但是因长期痫样放电、反复癫痫发作引起的易化区又形成新的致痫灶^[13]。人们对于患者癫痫引起的脑组织改变只能针对已发生的病理改变进行研究，如海马硬化，无法满足对癫痫病理生理学的动态观察，也无法更加深入的了解其具体机制^[14]。因此，结合人体和动物模型，体内以及离体研究，成为现阶段研究的主题。

1.2 长链非编码 RNA 的概述

长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 是指长度大于 200bp 核苷酸序列的，并且不表现出编码任何蛋白质潜能的一类 RNA 序列。随着生物信息学的发展，在哺乳动物基因组中发现了一些不能编码蛋白质的核苷酸序列，起初认为是细胞转录时的“噪音”^[15, 16]。然而随着研究的进展，在小鼠胚胎干细胞中，使用短发夹 RNA (shRNA) 对 lncRNA 进行沉默导致显著的基因表达变化，这意味

着大多数 lncRNA 是功能性的^[17]。在近年来的研究中 lncRNA 已被证明参与不同的任务，如染色质调制，转录后和翻译后调控，蛋白复合体组织和细胞信号转导等^[18]。由于它们的生化和功能多样性，lncRNA 可能在神经发育和神经障碍中发挥重要作用，同样脑中 lncRNA 表达的精确时空模式支持了这种可能性^[19]。事实上，多种 lncRNA 已经被证实参与各种神经生长发育等过程^[20, 21]。然而，随着研究的进展，发现这些核苷酸序列尽管不能编码蛋白质，但是在基因转录、翻译以及蛋白质的后期修饰都可以起到关键作用^[15, 22, 23]。现在普遍认为至少 80% 的人类基因组在转录时，会产生大量的小分子 RNA (MicroRNA) 和长链非编码 RNA (LncRNA)^[24-26]。在对这些非编码 RNA 的研究过程中发现，它们几乎影响后动物生物学的每一个方面，且可以分为有义，反义，双向，内含子型或相对于附近的编码蛋白质基因的基因间等 8 种非编码 RNA 形式^[27-32] (下图 1)。



(图 1: 长链非编码的分类)

在之前对非编码RNA中的研究中，MicroRNA对基因表达的转录后调控在神经发生，突触可塑性重塑及神经系统疾病中起着重要的作用已经在很多文献中被验证^[2, 33, 34]。在我们的研究中主要关注另外一种非编码RNA，长链非编码RNA，也同样被证明在神经系统的发育、神经元突触的可塑性、疾病的发生和发展的进程中起到关键的作用^[21]。与MicroRNA的负向调节转录相比，lncRNA的调控机制更加复杂多样，主要包括：(1) 通过在蛋白编码基因上游启动子区发生转录，干扰下游基因的表达；(2) 通过抑制RNA聚合酶 II 或者介导染色质重构以及组蛋白修饰，影响下游基因表达；(3) 通过与蛋白编码基因的转录本形成互补双链，进而干扰

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士学位论文摘要库