

学校编码: 10384

分类号 \_\_\_\_\_ 密级 \_\_\_\_\_

学号: 24520121153147

UDC \_\_\_\_\_

廈門大學

碩 士 学 位 论 文

**MicroRNA-219 在癫痫发病中的作用及  
机制研究**

**The Role and Mechanism of MicroRNA-219 in  
Epileptogenesis**

唐 荣

指导教师姓名: 郑维红 教授

专 业 名 称: 神经病学

论文提交日期: 2015 年 4 月

论文答辩时间: 2015 年 5 月

学位授予日期:

答辩委员会主席: 潘超

评 阅 人: 关天俊 陈少玫

2015 年 5 月

MicroRNA-219 在癫痫发病中的作用及机制研究

唐荣

指导教师

郑维红

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:** 通过海人酸、匹罗卡品诱导 C57BL/6、ICR 小鼠癫痫持续状态发作, 制造人类颞叶癫痫动物模型, 探讨 microRNA-219 在癫痫发病中的功能通路及调控网络的动态变化, 为癫痫的诊断提供新的依据, 为抗痫药物研制提示新的作用靶点。

**方法:** 用成年雄性 C57BL/6、ICR 小鼠为研究对象, 侧脑室注射海人酸(Kainic acid, KA) 或腹腔注射匹罗卡品诱发小鼠癫痫发作, 建立小鼠癫痫动物模型。24 小时后检测小鼠皮质脑电图改变并运用荧光定量 PCR 方法检测小鼠海马和皮质中 microRNA-219 表达变化情况, 同时运用蛋白免疫印迹方法检测小鼠海马中 CaMK II  $\gamma$ 、NMDAR1 蛋白表达变化情况。收集 8 例颞叶癫痫患者和 6 例对照组患者的脑脊液, 运用荧光定量 PCR 方法检测脑脊液中 microRNA-219 表达变化情况。进一步给予小鼠侧脑室注射 microRNA-219 的特异性拮抗剂 (antagomir-219)、特异性激动剂 (agomir-219)、阴性对照剂 (antagomir-NC、agomir-NC) 以及腹腔注射 NMDA 受体的非竞争性拮抗剂 MK-801, 观察小鼠行为学改变, 同时检测小鼠皮质脑电图改变及海马中 microRNA-219、CaMK II  $\gamma$ 、NMDAR1 表达变化情况。

**结果:** 1. 海人酸或匹罗卡品可诱导小鼠癫痫发作和异常脑电图改变。癫痫组小鼠较对照组小鼠, 海马内 microRNA-219 水平显著降低 (降低 70%), 而皮质中 microRNA-219 水平变化无统计学意义, 海马中 CaMK II  $\gamma$ 、NMDAR1 蛋白表达水平升高。癫痫患者脑脊液中 microRNA-219 水平较对照组也显著降低; 2. microRNA-219 的特异性拮抗剂可诱导小鼠表现出癫痫发作症状和异常脑电图表现。注射 microRNA-219 拮抗剂后, 小鼠海马内 microRNA-219 水平显著降低, 海马中 CaMK II  $\gamma$ 、NMDAR1 蛋白表达水平升高; 3. microRNA-219 的特异性激动剂可使 KA 诱导的癫痫小鼠症状明显好转, 脑电图皮层痫样放电明显受到抑制。可使癫痫小鼠海马内 microRNA-219 恢复到正常水平, CaMK II  $\gamma$ 、NMDAR1 蛋白表达水平降低; 4. NMDA 受体的非竞争性拮抗剂 MK-801 可显著改善 microRNA-219 拮抗剂所诱导小鼠癫痫发作症状和异常脑电图表现。

**结论:** 在小鼠癫痫模型海马和癫痫患者脑脊液中, microRNA-219 表达水平显著下降, microRNA-219 可作为一种早期检测癫痫类疾病的生物标志物,

microRNA-219 通过调节 CaMK II /NMDA 受体信号通路发挥着抑制癫痫发生的重要作用，补充 microRNA-219 可能成为治疗癫痫的一种有效措施。

**关键词：**microRNA-219 癫痫 海人酸 CaMK II  $\gamma$  NMDA 受体

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, ICR mice were induced into status epilepticus by kainic acid or pilocarpine. To explore the dynamic changes of regulatory networks and functional pathways of microRNA-219 in the pathogenesis of epilepsy, and provide new evidence for the diagnosis of epilepsy and new targets for anti-epileptic drug development.

**Methods:** We use adult male C57BL/6, ICR mice as research subjects, induced seizures in mice by intracerebroventricular injection of kainic acid (Kainic acid, KA) or intraperitoneal injection of pilocarpine. In order to establish an animal model of epilepsy. Detect changes of mouse cortical EEG and microRNA-219 expression in mouse hippocampus and cortex in use of rt-PCR after 24 hours. Meanwhile detect expression changes of CaMK II $\gamma$ , NMDAR1 protein in mouse hippocampus by western blot. Collecting cerebrospinal fluid of eight cases of temporal lobe epilepsy and six cases of control group. Using real-time PCR method to detect the expression changes of microRNA-219 in cerebrospinal fluid. Mice were further i.c.v. injected with microRNA-219 specific antagonist (antagomir-219), specific agonists (agomir-219), the negative control agent (antagomir-NC, agomir-NC) and were intraperitoneal injected with noncompetitive antagonist (MK-801) of NMDA receptors. Observe behavioral changes of the mice and detect changes of mouse cortical EEG and expression changes of microRNA-219, CaMK II $\gamma$ , NMDAR1 in hippocampal.

**Results:** 1. Kainic acid or pilocarpine can induce seizures and EEG abnormalities in mice. Epileptic mice compared with control mice, the hippocampal microRNA-219 levels was significantly reduced (70%), while the cortical microRNA-219 levels was not significant statistically. CaMK II $\gamma$ , NMDAR1 protein levels elevated in the hippocampus. The levels of microRNA-219 in cerebrospinal fluid of patients with epilepsy had significantly reduced than the control group; 2. The specific antagonist

of microRNA-219 can induce seizures and abnormal EEG in mice. After injection of microRNA-219 antagonist, the levels of microRNA-219 in mouse hippocampus was significantly reduced and the levels of CaMK II  $\gamma$ 、NMDAR1 was increased; 3. The agonist of microRNA-219 can significantly improve symptoms of KA-induced seizures in mice and significantly inhibit cortical abnormal discharge. the levels of microRNA-219 returned to normal in hippocampus of epileptic mouse and the levels of CaMK II  $\gamma$ 、NMDAR1 reduced; 4. Noncompetitive antagonist of NMDA receptor MK-801 can significantly improve the epileptic symptoms and abnormal EEG induced by microRNA-219 antagonist .

**Conclusions:** In the hippocampus of mouse model of epilepsy and cerebrospinal fluid of patients with epilepsy, microRNA-219 expression was significantly decreased. microRNA-219 can be used as a biomarker for early detection of epileptic diseases. microRNA-219 plays an important role in inhibiting the occurrence of epilepsy through modulating the CaMKII/NMDA receptor pathway. supplement of microRNA-219 in epilepsy may provide another anabolic strategy for ameliorating epilepsy.

**Keywords:** microRNA-219 epilepsy KA CaMK II  $\gamma$  NMDA receptor



## 目 录

中文摘要.....	I
英文摘要.....	III
英文缩略词.....	IX
<b>第一章 引言.....</b>	<b>1</b>
1.1 癫痫概述.....	1
1.2 microRNA 概述.....	1
1.3 癫痫患者脑组织中异常表达的 microRNA.....	3
1.4 癫痫动物模型中异常表达的 microRNA.....	4
1.5 microRNA 在癫痫发生发展中的作用.....	4
1.5.1 microRNA 与炎症机制.....	5
1.5.2 microRNA 与神经可塑性.....	6
1.5.3 microRNA 与神经元的凋亡死亡机制.....	7
1.6 microRNA-219 与癫痫相关性 & 本文的立题依据.....	8
1.7 本论文的研究内容与研究意义.....	10
<b>第二章 材料、方法及设计.....</b>	<b>11</b>
2.1 实验材料.....	11
2.1.1 实验设备及仪器.....	11
2.1.2 实验试剂.....	11
2.1.3 实验试剂配制.....	12
2.2 实验方法.....	13
2.2.1 实验动物及分组.....	13
2.2.2 小鼠海马立体定位注射.....	13
2.2.3 海人酸诱导癫痫动物模型的建立及处理.....	14
2.2.4 氯化锂-匹罗卡品诱导癫痫动物模型的建立及处理.....	14
2.2.5 动物标本处理.....	15
2.2.6 患者脑脊液收集.....	15

2.2.7 细胞培养与处理.....	16
2.2.8 小鼠脑电图记录和行为学观察.....	16
2.2.9 RNA 提取及逆转录和荧光定量 PCR 实验.....	16
2.2.10 蛋白免疫印迹实验.....	18
2.2.11 数据统计分析.....	20
<b>2.3 实验设计.....</b>	<b>20</b>
2.3.1 microRNA-219 的特异性拮抗剂 (antagomir-219) 处理小鼠.....	20
2.3.2 microRNA-219 特异性激动剂 (agomir-219) 处理小鼠.....	21
2.3.3 NMDA 受体的非竞争性拮抗剂 MK-801 处理小鼠.....	21
<b>第三章 实验结果.....</b>	<b>23</b>
3.1 在 KA 诱导的癫痫动物模型及细胞模型和颞叶癫痫患者的脑脊液中, microRNA-219 表达水平显著降低.....	23
3.2 在匹罗卡品诱导的癫痫动物模型中, microRNA-219 表达水平显著降低, CaMK II $\gamma$ 和 NR1 表达水平升高.....	25
3.3 拮抗 microRNA-219 可诱导小鼠癫痫发作和异常脑电图并且增加 CaMK II $\gamma$ 和 NR1 水平.....	27
3.4 microRNA-219 激动剂可改善 KA 诱导的癫痫发作和异常脑电图及 CaMK II $\gamma$ 和 NR1 变化水平.....	29
3.5 NMDA 受体拮抗剂 MK-801 可改善 microRNA-219 拮抗剂诱导的癫痫发作.....	31
<b>第四章 讨论.....</b>	<b>32</b>
<b>第五章 实验结论.....</b>	<b>34</b>
<b>第六章 展望.....</b>	<b>35</b>
<b>参考文献.....</b>	<b>37</b>
<b>致谢.....</b>	<b>48</b>
<b>附录.....</b>	<b>49</b>

## Table of Contents

<b>Abstract in Chinese</b> .....	I
<b>Abstract in English</b> .....	III
<b>Abbreviation Index</b> .....	IX
<b>Chapter 1 Introduction</b> .....	1
<b>1.1 Epilepsy Overview</b> .....	1
<b>1.2 microRNA Overview</b> .....	1
<b>1.3 Abnormal expression of microRNA in Brain tissue of patients with epilepsy</b> 3	
<b>1.4 Abnormal expression of microRNA in Animal models of epilepsy</b> .....	4
<b>1.5 The role of microRNA in development of epilepsy</b> .....	4
1.5.1 microRNA and inflammatory mechanisms.....	5
1.5.2 microRNA and neuroplasticity.....	6
1.5.3 microRNA and Mechanisms of neuronal apoptosis and death.....	7
<b>1.6 microRNA-219 correlated with epilepsy and Project basis of this article</b> .....	8
<b>1.7 Contents and Research significance of this article</b> .....	10
<b>Chapter 2 Materials, Methods and Design</b> .....	11
<b>2.1 Experimental Materials</b> .....	11
2.1.1 Experimental Instrument and Equipment.....	11
2.1.2 Experimental Reagent.....	11
2.1.3 Experimental Reagent preparation.....	12
<b>2.2 Experimental Methods</b> .....	13
2.2.1 Experimental animals and grouping.....	13
2.2.2 Hippocampus stereotactic injection in mice.....	13
2.2.3 Establishment and treatment of KA-induced animal model of epilepsy.....	14
2.2.4 Establishment and treatment of Pilo-induced animal model of epilepsy.....	14
2.2.5 Processing of animal specimens.....	15
2.2.6 Collecting cerebrospinal fluid of patients.....	15
2.2.7 Cell culture and treatment.....	16

---

2.2.8 EEG recording and behavioral observation in mice.....	16
2.2.9 RNA extraction 、 reverse transcription and quantitative PCR experiments.	16
2.2.10 Western blot experiments.....	18
2.2.11 Data statistics.....	20
<b>2.3 Experimental Design.....</b>	<b>20</b>
2.3.1 the specific antagonist of microRNA-219 (antagomir-219) treated mice.....	20
2.3.2 the specific agonist of microRNA-219 (agomir-219) treated mice.....	21
2.3.3 Noncompetitive NMDA receptor antagonist MK-801 treated mice.....	21
<b>Chapter 3 Results.....</b>	<b>23</b>
3.1 microRNA-219 level is decreased in KA-induced seizure models and in CSF specimens from TLE patients.....	23
3.2 microRNA-219 level is decreased and CaMKII $\gamma$ and NR1 level is increased in Pilo-induced seizure models.....	25
3.3 Silencing of microRNA-219 induces seizure-like EEG and increases CaMKII $\gamma$ and NR1 levels.....	27
3.4 Supplement of microRNA-219 alleviates KA-induced seizure like EEG and CaMKII $\gamma$ and NR1 level change.....	29
3.5 MK-801 treatments alleviate seizures induced by microRNA-219 antagomir.....	31
<b>Chapter 4 Discussion.....</b>	<b>32</b>
<b>Chapter 5 Conclusion.....</b>	<b>34</b>
<b>Chapter 6 Outlook.....</b>	<b>35</b>
<b>Reference.....</b>	<b>37</b>
<b>Acknowledgement.....</b>	<b>48</b>
<b>Appendix.....</b>	<b>49</b>

## 英汉缩略语名词对照

英文缩写	英文全称	中文全称
KA	Kainic acid	海人酸
Pilo	Pilocarpine	匹罗卡品
MiRNA	MicroRNA	小 RNA
mRNA	Messenger ribonucleic acid	信使核糖核酸
Ca	Calcium	钙
NMDA	N-Methyl-D-Aspartic Acid	N-甲基-D-天门冬氨酸
CaMK	Calmodulin dependent protein kinase	钙调素依耐性蛋白 激酶
EP	Epilepsy	癫痫
IE	Intractable epilepsy	难治性癫痫
LTP	Long-term potentiation	长时程增强
EEG	Electroencephalogram	脑电图
CSF	Cerebrospinal fluid	脑脊液
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

$\mu$ g	Microgram	微克
min	Minutes	分钟
ml	Milliliter	毫升
$\mu$ l	Microlitre	微升
d	day	天
h	hour	小时
kg	Kilogram	千克
m	month	月

## 第一章 前言

### 1.1 癫痫概述

癫痫是一种常见的神经系统疾患,其特点是多种原因导致的脑部神经元高度同步化异常放电引起短暂性脑功能失调,并出现相应的神经生物学、心理学以及社会学等方面的后果,临床表现具有发作性、短暂性、重复性和刻板性的特点。流行病学资料显示癫痫的发病率为(50-70)/10万,患病率约为5%,死亡率为(1.3~3.6)/10万,为一般人群的2~3倍<sup>[1]</sup>。目前全世界约有5000万癫痫患者,我国约有900万以上癫痫患者,其中每年新发65-70万例。由于缺乏有效的预防和治疗措施,大约30%癫痫患者发展为难治性癫痫(Intractable epilepsy, IE),我国的难治性癫痫患者至少在200万以上,各种抗癫痫药物治疗均难以获得满意的疗效<sup>[2]</sup>。难治性癫痫的发病机制涉及多种原因,除了遗传和环境因素以外,癫痫相关基因表达的调控紊乱可能导致癫痫发病相关基因的表达改变,这些刺激因素导致了一系列分子、细胞及神经网络改变的级联反应,在这一动态过程中,出现离子通道改变、炎症、苔藓纤维出芽(Mossy fiber sprout, MFS)、突触重组、神经元坏死与凋亡,胶质细胞增生等解剖结构的改变,进而形成了海马齿状回区的异常兴奋性环路,最终导致反复发作的难治性癫痫<sup>[3-7]</sup>。在近年来对难治性癫痫患者的治疗中发现,多种临床应用的新药的使用并没有有效的改善癫痫的预后,同时研究也发现3种以上的药物联合应用却很少表现出足够的疗效。因此新的癫痫治疗观点认为,如何调节癫痫发生的细胞分子过程,对其进行疾病修饰治疗是目前癫痫治疗中亟待解决的问题<sup>[8]</sup>,从新的角度去探索癫痫发生过程中发生改变的分子和细胞内作用机制已成为新的治疗靶点的研究焦点<sup>[9]</sup>。

### 1.2 microRNA 概述

近年来发现,DNA携带的遗传信息在转录成mRNA后,可能还会受到microRNA(miRNA)的影响,之后才翻译为蛋白质。对人类基因的研究发现,约占人类基因总数1%的miRNA,参与调控了10%以上的基因产生的蛋白<sup>[10]</sup>。miRNA是一类长度为19-23个核苷酸的内源性非编码单链小分子RNA。miRNA的产生首先是基因组DNA在RNA聚合酶II作用下产生初级miRNA(pri-miRNA),然后,

pri-miRNA 在细胞核内被 RNA 酶 III 家族中的 Drosha 酶切割成具有发夹状结构的前体 miRNA (pre-miRNA)。该前体被 Exportin-5 蛋白从核内转运到细胞质中, 被 Dicer 酶复合体剪切成双链 miRNA, 双链 miRNA 被解旋酶解开后形成成熟的单链 miRNA。成熟 miRNA 与 RNA 诱导的基因沉默复合物 (RNA induced silencing complex, RISC) 进行选择结合, 形成 RISC 复合物, 该复合物与靶 mRNA 上 3' 端非翻译区 (3' -untranslated regions, 3' -UTR) 碱基互补配对结合, 对靶基因 mRNA 进行直接降解或抑制, 从而调控基因的表达<sup>[11,12]</sup> (详见示意图)。目前实验研究已证实单个 miRNA 可调控多个靶 mRNA, 同时有一半的 mRNA 受一个或多个 miRNA 的调控<sup>[13,14]</sup>。近年来有关 miRNA 在基因转录后水平调控的研究得到了广泛关注, 已成为生命科学领域的研究热点之一<sup>[15]</sup>。

在脊椎动物体内, miRNA 在大脑中的表达显著多于其他器官, 在胚胎期、发育成熟期中均有 miRNA 表达并参与了决定细胞命运的各项生理和病理过程, miRNA 以复杂网络调控的方式参与生物体生理过程。对在生理条件下神经系统中 miRNA 分布、表达和功能的研究表明, miRNA 通过调节多种基因的表达, 广泛参与对神经元发育、细胞成熟与迁移、髓鞘形成、突触发育成熟和可塑性、胶质疤痕形成、神经性疼痛、神经修复和再支配等多种生理病理过程, miRNA 生成异常或其功能通路发生障碍在神经退行性疾病、精神病和脑肿瘤等的发生发展中发挥关键作用, 这也为我们进一步研究它们在神经系统发育和各种疾病过程中的作用提供了线索<sup>[16]</sup>。目前在神经元中已经发现有多种 miRNA, 它们对基因表达的转录后调控在神经发生, 突触可塑性及神经系统疾病的发生发展中起着重要的作用。研究发现其中一部分在神经元发育及分化时表达, 而另一部分在成熟神经元及突触中表达, 同时脑内丰富表达的 miRNA 也可能通过对靶基因表达的转录后调控参与突触功能及可塑性调控过程。对物种间高度保守的 miRNA 调控通路的预测和研究对神经系统功能和疾病治疗新靶点的发现有着重大意义<sup>[17-20]</sup>。



Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts 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](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.