

miR-34a-5p 对颞叶癫痫大鼠海马神经元凋亡的影响及其机制

李佳芮, 杨振林, 高 帆, 郭晶晶, 李今子
(延边大学附属医院儿科, 吉林 延吉 133002)

[摘 要] **目的:** 探讨微小 RNA-34a-5p (miR-34a-5p) 对颞叶癫痫大鼠海马组织中神经元凋亡的影响, 并阐明其作用机制。**方法:** 52 只雄性 SD 大鼠随机分为对照组、模型组、miR-34a-5p 抑制剂组和抑制剂阴性对照组, 每组 13 只。采用 PONEMAH 6. X 实验动物遥测平台记录各组大鼠脑电图, 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 法检测各组大鼠海马组织中 miR-34a-5p 表达水平, HE 染色观察各组大鼠海马组织形态表现, TUNEL 法检测各组大鼠海马神经元凋亡率, 免疫组织化学法检测各组大鼠海马组织中 CDK6、p-Rb 和 E2F1 蛋白阳性表达率, Western blotting 法检测各组大鼠海马组织中细胞周期蛋白依赖性激酶 6 (CDK6)、磷酸化视网膜母细胞瘤蛋白 (p-Rb) 和 E2F 转录因子 1 (E2F1) 蛋白表达水平。**结果:** 对照组大鼠无异常表现; 模型组、miR-34a-5p 抑制剂组和抑制剂阴性对照组大鼠出现不同程度流口水、颤抖、血泪、凝视和咀嚼震颤, 随后点头眨眼, 最后有前肢痉挛、直立及跌倒。与对照组比较, 模型组大鼠癫痫发作总时间明显延长 ($P < 0.01$); 与模型组比较, miR-34a-5p 抑制剂组大鼠癫痫发作总时间缩短 ($P < 0.01$); 与 miR-34a-5p 抑制剂组比较, 抑制剂阴性对照组大鼠癫痫发作总时间延长 ($P < 0.01$)。RT-qPCR 法, 与对照组比较, 模型组大鼠海马组织中 miR-34a-5p 表达水平升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, miR-34a-5p 抑制剂组大鼠海马组织中 miR-34a-5p 表达水平降低 ($P < 0.05$); 与 miR-34a-5p 抑制剂组比较, 抑制剂阴性对照组大鼠海马组织中 miR-34a-5p 表达水平升高 ($P < 0.01$)。HE 染色, 与对照组比较, 模型组细胞排列紊乱; 与模型组比较, miR-34a-5p 抑制剂组细胞排列整齐; 与 miR-34a-5p 抑制剂组比较, 抑制剂阴性对照组细胞形态不规整。TUNEL 染色, 与对照组比较, 模型组大鼠海马 CA1 区神经元凋亡率升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与模型组比较, miR-34a-5p 抑制剂组大鼠海马 CA1 区神经元凋亡率降低 ($P < 0.05$); 与 miR-34a-5p 抑制剂组比较, 抑制剂阴性对照组大鼠海马 CA1 区神经元凋亡率升高 ($P < 0.05$)。免疫组织化学法, 与对照组比较, 模型组大鼠海马组织中 CDK6、p-Rb 和 E2F1 蛋白阳性表达率均升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, miR-34a-5p 抑制剂组大鼠海马组织 CA1 区中 CDK6、p-Rb 和 E2F1 蛋白阳性表达率降低 ($P < 0.05$); 与 miR-34a-5p 抑制剂组比较, 抑制剂阴性对照组大鼠海马组织中 CDK6、p-Rb 和 E2F1 蛋白阳性表达率均升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。Western blotting 法, 与对照组比较, 模型组大鼠海马组织中 CDK6、p-Rb 和 E2F1 蛋白表达水平升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, miR-34a-5p 抑制剂组大鼠海马组织中 CDK6、p-Rb 和 E2F1 蛋白表达水平降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与 miR-34a-5p 抑制剂组比较, 抑制剂阴性对照组大鼠海马组织中 CDK6、p-Rb 和 E2F1 蛋白表达水平升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。**结论:** 颞叶癫痫大鼠海马组织中 miR-34a-5p 表达上调, 神经元凋亡率升高, 抑制 miR-34a-5p 表达能减少海马神经元凋亡, 其机制可能与 miR-34a-5p 调控海马组织中 CDK6、p-Rb 和 E2F1 蛋白表达有关。

[关键词] 微小 RNA-34a-5p; 癫痫; 细胞凋亡; 细胞周期蛋白依赖性激酶 6; 磷酸化视网膜母细胞瘤蛋白; E2F 转录因子 1

[收稿日期] 2024-11-14 [录用日期] 2024-12-27

[基金项目] 吉林省科技厅自然科学基金项目 (JJKH20240693KJ); 吉林省卫健委卫生健康科技能力提升项目 (2023J022)

[作者简介] 李佳芮 (1987—), 女, 山东省菏泽市人, 住院医师, 医学硕士, 主要从事神经系统疾病基础和临床方面的研究。

[通信作者] 李今子, 教授, 主任医师, 博士研究生导师 (E-mail: yjzli@ybu.edu.cn)

©《吉林大学学报 (医学版)》编辑部, 开放获取遵循 CC BY-NC-ND 协议。

© Editorial Board of Journal of Jilin University (Medicine Edition). Open access under CC BY-NC-ND license.

[中图分类号] R742.1 [文献标志码] A

Effect of miR-34a-5p on hippocampal neuron apoptosis in rats with temporal lobe epilepsy and its mechanism

LI Jiarui, YANG Zhenlin, GAO Fan, GUO Jingjing, LI Jinzi

(Department of Pediatrics, Affiliated Hospital, Yanbian University, Yanji 133002, China)

ABSTRACT **Objective:** To discuss the effect of microRNA-34a-5p (miR-34a-5p) on the neuron apoptosis in hippocampus tissue of the rats with temporal lobe epilepsy, and to clarify its mechanism. **Methods:** Fifty-two male SD rats were randomly divided into control group, model group, miR-34a-5p inhibitor group, and inhibitor negative control group, and there were 13 rats in each group. The PONEMAH 6. X experimental animal telemetry platform was used to record the electroencephalogram (EEG) of the rats in various groups; real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) was used to detect the expression levels of miR-34a-5p in hippocampus tissue of the rats in various groups; HE staining was used to observe the morphology of hippocampus tissue of the rats in various groups; TUNEL method was used to detect the apoptotic rates of neurons in hippocampus tissue of the rats in various groups; immunohistochemistry method was used to determine the positive expression rates of CDK6, p-Rb, and E2F1 proteins in hippocampus tissue of the rats in various group; Western blotting method was used to detect the expression levels of cyclin-dependent protein kinase 6 (CDK6), phosphorylated retinoblastoma protein (p-Rb), and E2F transcription factor 1 (E2F1) proteins in hippocampus tissue of the rats in various groups. **Results:** No abnormalities were observed in the rats in control group; the rats in model group, miR-34a-5p inhibitor group, and inhibitor negative control group exhibited varying degrees of drooling, trembling, bloody tears, staring, chewing tremors, followed by nodding and blinking, and finally forelimb convulsions, standing upright, and falling. Compared with control group, the total duration of epileptic seizures of the rats in model group was significantly prolonged ($P < 0.01$); compared with model group, the total duration of epileptic seizures of the rats in miR-34a-5p inhibitor group was shortened ($P < 0.01$); compared with miR-34a-5p inhibitor group, the total duration of epileptic seizures of the rats in inhibitor negative control group was prolonged ($P < 0.01$). The RT-qPCR results showed that compared with control group, the expression level of miR-34a-5p in hippocampus tissue of the rats in model group was increased ($P < 0.01$); compared with model group, the expression level of miR-34a-5p in hippocampus tissue of the rats in miR-34a-5p inhibitor group was increased ($P < 0.05$); compared with miR-34a-5p inhibitor group, the expression level of miR-34a-5p in hippocampus tissue of the rats in inhibitor negative control group was increased ($P < 0.01$). The HE staining results showed that compared with control group, the cell arrangement in model group was disordered; compared with model group, the cell arrangement in miR-34a-5p inhibitor group was orderly; compared with miR-34a-5p inhibitor group, the cell morphology in inhibitor negative control group was irregular. The TUNEL staining results showed that compared with control group, the apoptotic rate of neurons in CA1 region of hippocampus tissue of the rats in model group was increased ($P < 0.01$); compared with model group, the apoptotic rate of neurons in CA1 region of hippocampus tissue of the rats in miR-34a-5p inhibitor group was decreased ($P < 0.05$); compared with miR-34a-5p inhibitor group, the apoptotic rate of neurons in CA1 region of hippocampus tissue of the rats in inhibitor negative control group was increased ($P < 0.05$). The immunohistochemistry results showed that compared with control group, the positive expression rates of CDK6, p-Rb and E2F1 proteins in hippocampus tissue of the rats model group were increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); compared with

model group, the positive expression rates of CDK6, p-Rb and E2F1 proteins in hippocampus tissue of the rats in miR-34a-5p inhibitor group were decreased ($P<0.05$); compared with miR-34a-5p inhibitor group, the positive expression rates of CDK6, p-Rb and E2F1 proteins in hippocampus tissue of the rats in inhibitor negative group were increased ($P<0.05$ or $P<0.01$). The Western blotting results showed that compared with control group, the expression levels of CDK6, p-Rb, and E2F1 proteins in hippocampus tissue of the rats in model group were increased ($P<0.01$); compared with model group, the expression levels of CDK6, p-Rb, and E2F1 proteins in hippocampus tissue of the rats in miR-34a-5p inhibitor group were decreased ($P<0.05$ or $P<0.01$); compared with miR-34a-5p antagomir group, the expression levels of CDK6, p-Rb, and E2F1 proteins in hippocampus tissue of the rats in inhibitor negative control group were increased ($P<0.05$ or $P<0.01$). **Conclusion:** The expression of miR-34a-5p is upregulated in the hippocampal tissue of temporal lobe epilepsy rats, and hippocampal neuron apoptosis is increased. Inhibition of miR-34a-5p expression can reduce the hippocampal neuron apoptotic rate, and its mechanism may be related to the regulation of CDK6, p-Rb, and E2F1 protein expressions in the hippocampus tissue by miR-34a-5p.

KEYWORDS MicroRNA-34a-5p; Epilepsy; Apoptosis; Cyclin-dependent protein kinase 6; Phosphorylated retinoblastoma protein; E2F transcription factor 1

癫痫是一种以脑神经元异常放电为特征的短暂脑功能障碍性疾病^[1]。全世界范围内癫痫的患者已超过7 000万人, 中国有超1 000万患者^[2]。研究^[1]显示: 癫痫的发病机制主要包括脑部机械性损伤和相关的炎症反应、氧化应激失衡、血脑屏障完整性缺失及神经递质代谢失衡等。早期明确诊断和及时治疗可以改善癫痫患者的生活质量及认知功能^[3-4]。因此, 寻找癫痫早期诊断的特异性生物标志物是目前临床研究面临的重要难题。

细胞周期蛋白依赖性激酶4 (cyclin dependent protein kinase 4, CDK4)、细胞周期蛋白依赖性激酶6 (cyclin dependent protein kinase 6, CDK6)、磷酸化视网膜母细胞瘤蛋白 (phosphorylated retinoblastoma protein, p-Rb) 和 E2F 转录因子1 (E2F transcription factor 1, E2F1) 共同构成 CDK/Cyclin D-pRb-E2F 信号传导级联通路, 在细胞周期调控中起重要作用^[5]。在癫痫大鼠模型中可以观察到海马神经元中 CDK6、p-Rb 和 E2F1 均呈高表达, 表明癫痫可能会诱导细胞周期重启和神经细胞凋亡。微小RNA (microRNA, miRNA) 由长度为19~24个核苷酸的非编码单链RNA分子组成^[6]。miR-34a位于1p36染色体上, 具有独立的转录本, 除肺组织外, miR-34a在几乎所有组织中普遍表达^[7]。miR-34a也可以通过调节基因表达水平, 参与调控细胞的生长、分化和凋亡进程^[8]。研究^[9]显示: 在一些疾病发展过程中, 人血液中的miRNA表达会发生特征性改变, 上述变化有助于疾病的早期诊断,

并可预测病情发展。研究^[10]显示: miR-34a可能在癫痫的发病和进展中发挥重要作用。本研究探讨 miR-34a-5p 在大鼠癫痫发病中的潜在作用机制, 为临床早期诊断癫痫提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物、主要试剂和仪器 健康雄性SD大鼠65只, 6~8周龄, 体质量220~280 g, 均购自延边大学医学院实验动物中心, 且符合无特定病原体标准, 动物使用许可证号: SYXK (吉) 2015-0007。大鼠置于温度为18℃~25℃、相对湿度为55%、光照/黑暗周期为12 h环境中, 自由摄食、饮水, 每笼饲养3只。所有动物实验操作遵循实验动物伦理与规范。一抗和二抗购自上海艾博抗贸易有限公司, miR-34a-5p antagomir 和 antagomir NC 试剂购自广州锐博公司。实时荧光定量PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR) 仪购自中国东盛公司, 脑立体定位仪购自深圳瑞沃德公司。

1.2 实验动物分组和癫痫模型制备^[11] 按照侧脑室注射药物的不同, 将52只大鼠随机分为对照组、模型组、miR-34a-5p抑制剂组和抑制剂阴性对照组, 每组13只。除对照组外, 其他各组大鼠均建立癫痫模型。miR-34a-5p抑制剂组和抑制剂阴性对照组大鼠癫痫模型建立前采用脑立体定位技术进行侧脑室注射, 分别注射 miRNA-34a-5p antagomir 或 antagomir NC 试剂, 注射方法: 给予大鼠体积分数为2%的戊巴比妥 ($50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 施行麻醉后固定于脑立体定位仪上, 分别向左右海马组织中各注

射5 μL 相应试剂。24 h后制备颞叶癫痫模型:经氯化锂($127\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)腹腔注射20 h后,给予阿托品($1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)和匹罗卡品($20\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)。若大鼠的行为反应级别达到IV级或更高,便判定为颞叶癫痫模型成功建立^[12]。癫痫持续状态后1 d取大鼠脑组织进行后续实验。

1.3 各组大鼠行为表现观察 记录各组大鼠在开放环境中的移动距离、移动速度和是否积极探索新环境。同时,观察大鼠是否表现出异常行为,如凝视、反复咀嚼、失去平衡、摔倒或站立不稳等。记录上述异常行为的发生频率和持续时间,并进行比较。

1.4 脑电图观察各组大鼠癫痫发作总持续时间

SD大鼠颞叶癫痫模型建立成功后,从每组中随机选择4只大鼠,采用PONEMAH 6. X系统进行脑电活动监测。具体步骤:首先对大鼠进行麻醉,并将其固定在立体定位仪上,剃去头部毛发并消毒;沿背部中线行3~4 cm切口,分离组织,形成口袋状切口,放置植入装置;暴露颅骨表面后,分别在矢状缝两侧2.0~2.5 mm和人字缝前方2.0~2.5 mm处钻孔;将导线插入并采用丙烯酸树脂固定,最后缝合切口。大鼠苏醒后采用脑电图连续记录,记录时间为1 d,并采用Neuroscore 2.0软件对大鼠癫痫发作的总持续时间进行分析。

1.5 RT-qPCR法检测各组大鼠海马组织中miR-34a-5p表达水平 每组随机选取3只大鼠,采用TRIzol试剂提取海马组织中总RNA,随后采用分光光度计对总RNA进行定量。采用RT-qPCR法检测各组大鼠海马组织中miR-34a-5p表达水平。采用Stepone软件读取各PCR反应Ct值,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算目的基因表达水平。

1.6 HE染色观察各组大鼠海马组织病理形态表现 结束治疗后于各组中随机选取3只大鼠,取出完整的脑组织,将组织标本置于4%甲醛中固定24 h,随后进行石蜡包埋处理,制备厚度为5 μm 切片。切片脱蜡至水处理后,进行HE染色。随后,在显微镜下观察各组大鼠海马组织病理形态表现。

1.7 TUNEL法检测各组大鼠海马神经元凋亡率

将固定的海马组织在石蜡中包埋后切片,厚度为5 μm 。将海马组织切片脱蜡至水,加入3% H_2O_2 和蛋白酶K孵育30 min后,加入50 μL TUNEL反应混合物,37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育60 min。DAPI染色10 min,采用倒置显微镜观察各组大鼠海马组织中

神经细胞的凋亡情况,计算细胞凋亡率。细胞凋亡率=染色阳性细胞数/细胞总数 $\times 100\%$ 。

1.8 免疫组织化学法检测各组大鼠海马组织中CDK6、p-Rb和E2F1蛋白阳性表达率 将各组大鼠的海马组织制备成厚度为5 μm 的切片。按照试剂盒操作步骤依次烤片、脱蜡、水合、抗原修复、灭活内源性酶和封闭内源性生物素、血清封闭、一抗孵育、滴加反应增强液、滴加二抗、DAB显色、复染、脱水及封片后,置于显微镜下观察,以棕黄色部分为DAB显色阳性。采用Image J软件进行图像分析,检测各组大鼠海马组织中CDK6、p-Rb和E2F1蛋白阳性表达率。目的蛋白阳性表达率=蛋白表达阳性细胞数/总细胞数 $\times 100\%$ 。

1.9 Western blotting法检测各组大鼠海马组织中CDK6、p-Rb和E2F1蛋白表达水平 各组中随机选取3只大鼠,取3对海马组织,按照100:1的比例加入细胞裂解液提取蛋白后进行蛋白定量。制备电泳凝胶,进行SDS-PAGE电泳。将转膜后的NC膜用脱脂奶粉封闭1~2 h,然后采用PBST溶液按照1:1 000的比例稀释CDK6、p-Rb和E2F1,4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育过夜。采用TBST溶液清洗后,加入二抗并在室温下避光孵育2 h,最后通过显影仪观察条带。采用Image J软件分析CDK6、p-Rb和E2F1蛋白条带灰度值,以 β -actin为内参,计算目的蛋白表达水平。目的蛋白表达水平=目的蛋白条带灰度值/内参蛋白条带灰度值。

1.10 统计学分析 采用SPSS 26.0统计软件进行统计学分析。采用GraphPad Prism 9.5软件对各组数据进行正态性检验,各组大鼠癫痫发作总时间、海马组织中miR-34a-5p表达水平、细胞凋亡率、海马组织中CDKb、p-Rb和E2F1蛋白阳性表达率及表达水平均符合正态分布,以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间样本均数比较采用单因素方差分析,2组间样本均数比较采用两立样本 t 检验,组间样本均数两两比较采用LSD- t 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠癫痫行为学表现 对照组大鼠的行为无变化,注射匹罗卡品后,模型组、miR-34a-5p抑制剂组和抑制剂阴性对照组大鼠开始表现出外周胆碱能反应:流口水、颤抖、血泪,凝视、咀嚼震颤,随后点头眨眼,最后有前肢痉挛,直立及跌倒。按照Racine癫痫发作分级标准^[11],已达到

IV级及IV级以上。

2.2 各组大鼠脑电图表现 对照组大鼠脑电图无癫痫放电；模型组大鼠脑电图尖峰幅度明显增大、癫痫发作总时间明显延长 ($P<0.01$)；与模型组比较，miR-34a-5p抑制剂组大鼠脑电图尖峰幅度较模型组明显降低，癫痫发作总时间缩短 ($P<0.01$)；与miR-34a-5p抑制剂组比较，抑制剂阴性对照组大鼠癫痫发作总时间延长 ($P<0.01$)。见图1和2。

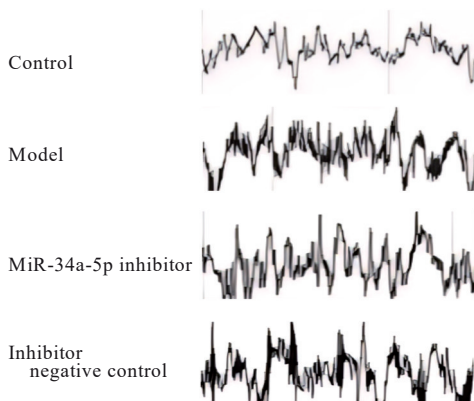
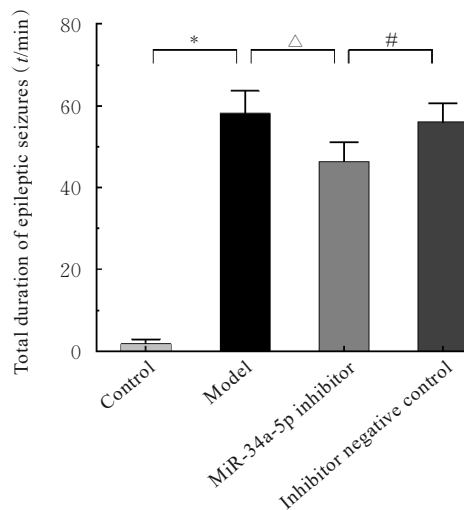


图1 各组大鼠脑电图波形

Fig. 1 Electroencephalogram waves of rats in various groups



* $P<0.01$ vs control group; $\Delta P<0.01$ vs model group; # $P<0.01$ vs miR-34a-5p inhibitor group.

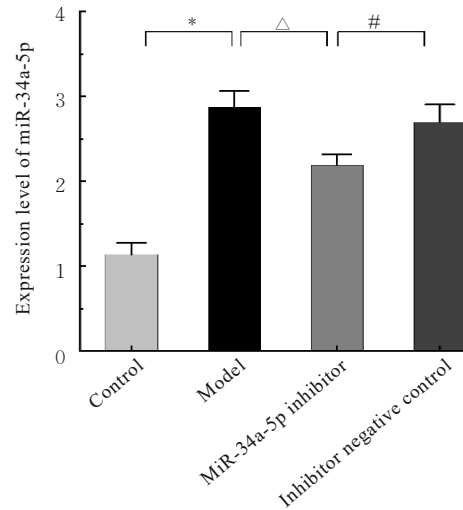
图2 各组大鼠癫痫发作总时间

Fig. 2 Total durations of epileptic seizures of rats in various groups

2.3 各组大鼠海马组织中 miR-34a-5p 表达水平

与对照组比较，模型组大鼠海马组织中 miR-34a-5p 表达水平明显升高 ($P<0.01$)；与模型组比较，

miR-34a-5p 抑制剂组大鼠海马组织中 miR-34a-5p 表达水平降低 ($P<0.05$)；与 miR-34a-5p 抑制剂组比较，抑制剂阴性对照组大鼠海马组织中 miR-34a-5p 表达水平明显升高 ($P<0.01$)。见图3。



* $P<0.01$ vs control group; $\Delta P<0.05$ vs model group; # $P<0.01$ vs miR-34a-5p inhibitor group.

图3 RT-qPCR法检测各组大鼠海马组织中 miR-34a-5p 表达水平

Fig. 3 Expression levels of miR-34a-5p in hippocampus tissue of rats in various groups detected by RT-qPCR method

2.4 各组大鼠海马组织病理形态表现 HE染色结果显示：对照组大鼠海马组织CA1区中细胞数较多，形态规整，排列整齐紧密；与对照组比较，模型组大鼠海马CA1区小锥体细胞数量明显减少，细胞间隙明显增大，细胞形态不规整，排列不整齐，部分细胞核消失，少数锥体细胞固缩浓染，部分细胞脱落，排列稀疏；miR-34a-5p抑制剂组虽然表现出小锥体细胞数量减少和细胞间隙增大，但与模型组比较，miR-34a-5p抑制剂组大鼠海马组织中细胞形态规整，排列相对整齐；与miR-34a-5p抑制剂组比较，抑制剂阴性对照组大鼠海马组织中细胞排列紊乱、稀释。见图4。

2.5 各组大鼠海马CA1区神经元凋亡率 与对照组比较，模型组大鼠海马组织CA1区神经元凋亡率升高 ($P<0.01$)；与模型组比较，miR-34a-5p抑制剂组大鼠海马CA1区神经元凋亡率降低 ($P<0.05$)；与miR-34a-5p抑制剂组比较，抑制剂阴性对照组大鼠海马CA1区神经元凋亡率升高 ($P<0.05$)。见图5和6。

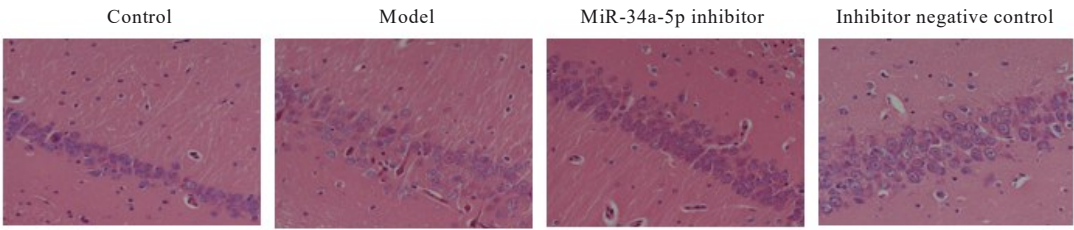


图 4 各组大鼠海马组织病理形态表现(HE, ×400)

Fig. 4 Pathomorphology of cells in hippocampus tissue of rats in various groups(HE, ×400)

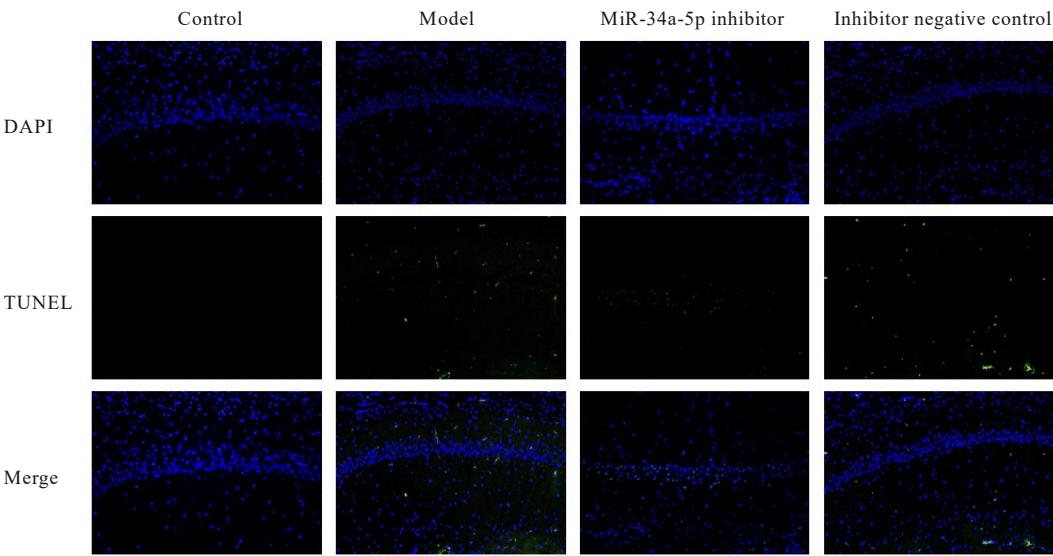
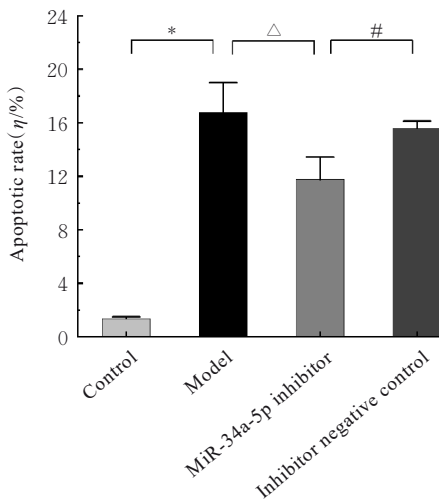


图 5 各组大鼠海马 CA1 区神经元凋亡形态表现(TUNEL, ×200)

Fig. 5 Apoptotic morphology of neurons in hippocampus CA1 area of rats in various groups(TUNEL, ×200)



* $P < 0.01$ vs control group; $\Delta P < 0.05$ vs model groups; # $P < 0.05$ vs miR-34a-5p inhibitor group.

图 6 各组大鼠海马 CA1 区神经元凋亡率

Fig. 6 Apoptotic rates of neurons in hippocampus CA1 area of rats in various groups

2.6 各组大鼠海马组织中 CDK6、p-Rb 和 E2F1 蛋白阳性表达率 与对照组比较, 模型组大鼠海马组织中 CDK6、p-Rb 和 E2F1 蛋白阳性表达率均升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与模型组比较, miR-34a-5p 抑制剂组大鼠海马组织 CA1 区中 CDK6、p-Rb 和 E2F1 蛋白阳性表达率降低 ($P < 0.05$); 与 miR-34a-5p 抑制剂组比较, 抑制剂阴性对照组大鼠海马组织中 CDK6、p-Rb 和 E2F1 蛋白阳性表达率均升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见图 7 和表 1。

2.7 各组大鼠海马组织中 CDK6、p-Rb 和 E2F1 蛋白表达水平 与对照组比较, 模型组大鼠海马组织中 CDK6、p-Rb 和 E2F1 蛋白表达水平均升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, miR-34a-5p 抑制剂组大鼠海马组织中 CDK6、p-Rb 和 E2F1 蛋白表达水平降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与 miR-34a-5p 抑制剂组比较, 抑制剂阴性对照组大鼠海马组织中 CDK6、p-Rb 和 E2F1 蛋白表达水平升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见图 8 和表 2。

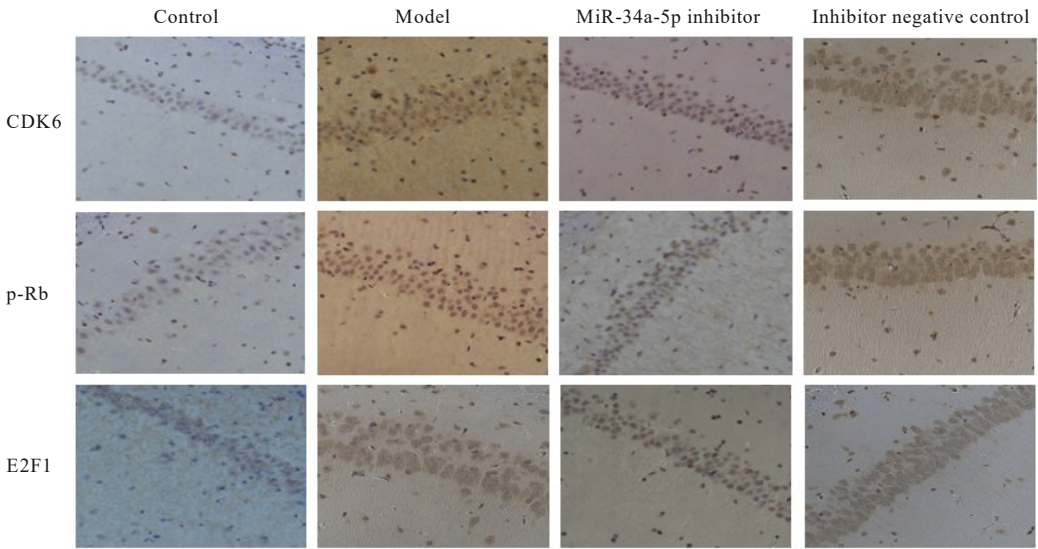


图7 各组大鼠海马组织中CDK6、p-Rb和E2F1蛋白表达情况(免疫组织化学,×400)

Fig. 7 Expressions of CDK6, p-Rb, and E2F1 proteins in hippocampus tissue of rats in various groups (Immunohistochemistry, ×400)

表1 各组大鼠海马组织中CDK6、p-Rb和E2F1蛋白阳性表达率

Tab. 1 Positive expression rates of CDK6, p-Rb, and E2F1 proteins in hippocampus tissue of rats in various groups

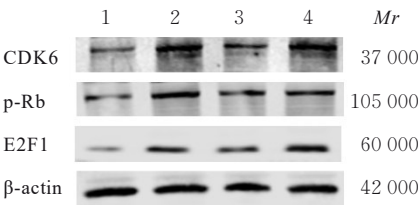
($n=3, \bar{x} \pm s, \eta/\%$)

Group	Positive expression rate		
	CDK6	p-Rb	E2F1
Control	7.51±2.35	5.31±0.83	3.29±1.03
Model	25.23±1.70*	15.67±1.58**	11.85±1.54**
MiR-34a-5p inhibitor	17.48±2.90 [△]	10.80±1.85 [△]	7.69±1.15 [△]
Inhibitor negative control	29.24±2.97 ^{##}	14.65±1.23 [#]	10.86±1.02 [#]

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared with control group; [△] $P<0.05$ compared with model group; [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$ compared with miR-34a-5p inhibitor group.

3 讨论

癫痫是一种常见的神经系统疾病,以反复无预警的癫痫发作为主要特征。发作时,大脑中的神经元异常放电导致短暂的脑功能障碍,表现为意识丧失、肌肉抽搐、感觉异常或行为突变^[13]。癫痫的成因多样,包括遗传因素、脑部感染、创伤、中枢神经系统疾病以及某些药物和毒素的影响。癫痫的确切病因尚未明确^[14]。癫痫通常依赖于药物治疗^[15]。目前,癫痫的研究仍在持续进展中,改进



Lane 1: Control group; Lane 2: Model group; Lane 3: MiR-34a-5p inhibitor group; Lane 4: Inhibitor negative control group.

图8 各组大鼠海马组织中CDK6、p-Rb和E2F1蛋白表达电泳图

Fig. 8 Electrophoregram of expressions of CDK6, p-Rb, and E2F1 proteins in hippocampus tissue of rats in various groups

表2 各组大鼠海马组织中CDK6、p-Rb和E2F1蛋白表达水平

Tab. 2 Expression levels of CDK6, p-Rb, and E2F1 proteins in hippocampus tissue of rats in various groups ($n=3, \bar{x} \pm s$)

Group	CDK6	p-Rb	E2F1
Control	0.34±0.13	0.22±0.10	0.16±0.04
Model	1.12±0.10*	0.88±0.12*	0.50±0.04*
MiR-34a-5p inhibitor	0.70±0.09 ^{△△}	0.61±0.11 [△]	0.32±0.04 ^{△△}
Inhibitor negative control	0.97±0.06 [#]	0.97±0.08 [#]	0.48±0.03 ^{##}

* $P<0.01$ compared with control group; [△] $P<0.05$, ^{△△} $P<0.01$ compared with model group; [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$ compared with miR-34a-5p inhibitor group.

现有的治疗方法,并开发新的预防策略十分必要。本研究结果显示:癫痫大鼠脑电图可见癫痫波形,HE染色结果显示癫痫大鼠细胞损害较正常大鼠严重,均表明癫痫模型造模成功,TUNEL染色结果也证实癫痫持续状态后海马组织中神经元凋亡增多。

miR-34a-5p属于miR-34家族的一部分,在许多生物学过程中起关键调节作用^[16]。本研究结果显示:在癫痫状态后,大鼠海马组织中miR-34a-5p表达水平升高,给予miR-34a-5抑制剂处理后,大鼠海马组织中神经元凋亡率降低,细胞排列较癫痫组明显改善,表明miR-34a-5抑制剂能够有效地抑制由癫痫引起的脑损伤。根据来自啮齿动物模型中的11项基于阵列的分析研究和2项RNA-Seq分析研究的数据,miR-34a属于常见的上调基因^[17-18],与本研究结果一致。

CDK6是p-Rb途径的重要部分,其基因位于7q21。CDK6基因含有7个外显子,其与Cyclin D结合,形成复合物,在细胞周期蛋白依赖性激酶的协同作用下,其下游Rb磷酸化,从而达到对其转录调节因子E2F1的脱抑制^[19]。研究^[20]显示:CDK6是参与调控成人大脑中增殖和神经元分化之间转换的重要调节因子之一。Rb蛋白是由Rb1基因编码的一种肿瘤抑制蛋白,最早因其与视网膜母细胞瘤的发生相关而得名。研究^[21]显示:Rb蛋白的状态可能影响神经元的存活和功能,进而影响神经网络的稳定性。E2F1是一种关键的转录因子,控制细胞周期进程和细胞凋亡。研究^[22-23]显示:在Rb蛋白抑制下,E2F1处于非活化状态。当Rb被磷酸化后,E2F1激活并促进细胞周期基因的表达。E2F1也能启动凋亡相关基因的表达,其具体作用取决于细胞与其他信号的相互调节^[24]。本研究结果显示:miR-34a-5p抑制剂能降低大鼠海马组织中CDK6、p-Rb和E2F1蛋白的表达,上述蛋白是细胞周期调控的关键因子,其过度表达与多种细胞类型的异常增殖和凋亡存在关联。miR-34a-5p通过调控CDK6、p-Rb和E2F1蛋白表达水平,抑制癫痫引起的神经元损伤。本研究采用PONEMAH 6.X实验动物遥测平台记录的脑电图结果进一步验证了miR-34a-5p抑制剂对癫痫发作的控制效果。

综上所述,癫痫大鼠海马组织中miR-34a-5p水平升高,而miR-34a-5p抑制剂可能通过调节海马中的凋亡因子,从而减轻神经元的损伤。在大鼠

癫痫持续状态后,癫痫大鼠海马组织神经元中CDK6、p-Rb和E2F1蛋白表达水平升高,表明miR-34a-5p可调节海马组织中的神经元凋亡,其机制可能与miR-34a-5p调控海马组织中CDK6、p-Rb及E2F1蛋白表达有关。因此,靶向miR-34a-5p可能为癫痫的早期诊断与临床干预提供新的研究方向。

利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

李佳芮参与研究设计的初步构思、实验方案的制定和论文撰写,杨振林参与文献研究和论文修改,高帆和郭晶晶参与数据的统计学分析,李今子参与论文审阅和修改。

[参考文献]

- [1] 王一晰,黄柏玮.癫痫相关诱发机制及治疗方法的研究进展[J].中国实用神经疾病杂志,2024,27(9):1168-1172.
- [2] BEGLEY C, WAGNER R G, ABRAHAM A, et al. The global cost of epilepsy: a systematic review and extrapolation[J]. *Epilepsia*, 2022, 63(4): 892-903.
- [3] KWAN P, ARZIMANOGLOU A, BERG A T, et al. Definition of drug resistant epilepsy: consensus proposal by the ad hoc task force of the ILAE commission on therapeutic strategies[J]. *Epilepsia*, 2010, 51(6): 1069-1077.
- [4] LEE S A, KIM M J, LEE H W, et al. The effect of recurrent seizures on cognitive, behavioral, and quality-of-life outcomes after 12 months of monotherapy in adults with newly diagnosed or previously untreated partial epilepsy[J]. *Epilepsy Behav*, 2015, 53: 202-208.
- [5] AL-KHALAF H H, COLAK D, AL-SAIF M, et al. p16 (INK4a) positively regulates cyclin D1 and E2F1 through negative control of AUF1[J]. *PLoS One*, 2011, 6(7): e21111.
- [6] KROL J, LOEDIGE I, FILIPOWICZ W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay[J]. *Nat Rev Genet*, 2010, 11(9): 597-610.
- [7] HO P T B, CLARK I M, LE L T T. microRNA-based diagnosis and therapy[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(13): 7167.
- [8] SALIMINEJAD K, KHORRAM KHORSHID H R, SOLEYMANI FARD S, et al. An overview of microRNAs: Biology, functions, therapeutics, and analysis methods[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(5): 5451-5465.
- [9] JUCHNICKA I, KUŹMICKI M, NIEMIRA M, et al.

- miRNAs as predictive factors in early diagnosis of gestational diabetes mellitus [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2022, 13: 839344.
- [10] HU K, XIE Y Y, ZHANG C, et al. microRNA expression profile of the hippocampus in a rat model of temporal lobe epilepsy and miR-34a-targeted neuroprotection against hippocampal neurone cell apoptosis post-status epilepticus [J]. *BMC Neurosci*, 2012, 13: 115.
- [11] 郑微微, 高帆, 杨振林, 等. 新型抗癫痫药Q808对颞叶癫痫大鼠的改善作用及其机制 [J]. *吉林大学学报 (医学版)*, 2024, 50(5): 1243-1249.
- [12] CURIA G, LONGO D, BIAGINI G, et al. The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy [J]. *J Neurosci Methods*, 2008, 172(2): 143-157.
- [13] BEARDEN D J, STASENKO A, PRENTICE F, et al. Mapping cognition in epilepsy: from the lab to the clinic [J]. *Epilepsy Curr*, 2024: 15357597241280485.
- [14] PERUCCA P, BAHLO M, BERKOVIC S F. The genetics of epilepsy [J]. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2020, 21: 205-230.
- [15] TOMSON T, ZELANO J, DANG Y L, et al. The pharmacological treatment of epilepsy in adults [J]. *Epileptic Disord*, 2023, 25(5): 649-669.
- [16] FU J J, IMANI S, WU M Y, et al. MicroRNA-34 family in cancers: role, mechanism, and therapeutic potential [J]. *Cancers (Basel)*, 2023, 15(19): 4723.
- [17] RIVADENEIRA D B, MAYHEW C N, THANGAVEL C, et al. Proliferative suppression by CDK4/6 inhibition: complex function of the retinoblastoma pathway in liver tissue and hepatoma cells [J]. *Gastroenterology*, 2010, 138(5): 1920-1930.
- [18] KOROTKOV A, MILLS J D, GORTER J A, et al. Systematic review and meta-analysis of differentially expressed miRNAs in experimental and human temporal lobe epilepsy [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 11592.
- [19] TOPACIO B R, ZATULOVSKIY E, CRISTEA S, et al. Cyclin D-Cdk4, 6 drives cell-cycle progression *via* the retinoblastoma protein's C-terminal helix [J]. *Mol Cell*, 2019, 74(4): 758-770.
- [20] BEUKELAERS P, VANDENBOSCH R, CARON N, et al. Cdk6-dependent regulation of G(1) length controls adult neurogenesis [J]. *Stem Cells*, 2011, 29(4): 713-724.
- [21] ROUFAYEL R, MEZHER R, STOREY K B. The role of retinoblastoma protein in cell cycle regulation: an updated review [J]. *Curr Mol Med*, 2021, 21(8): 620-629.
- [22] MANDIGO A C, YUAN W, XU K X, et al. RB/E2F1 as a master regulator of cancer cell metabolism in advanced disease [J]. *Cancer Discov*, 2021, 11(9): 2334-2353.
- [23] 丛明, 单伟, 石玉秀. CDK4-p RB-E2F1通路在创伤后应激障碍大鼠杏仁核神经细胞凋亡中的作用 [J]. *中国医科大学学报*, 2021, 50(7): 608-611.
- [24] WU T Y, JIANG F L, WU F, et al. E2F1 and E2F7 regulate gastric cancer cell proliferation, respectively, through transcriptional activation and transcriptional repression of MYBL2 [J]. *J Biol Chem*, 2025, 301(1): 108027.