

. 实验研究 .

下调 miR-203 靶向 MEF2C/NF-κB 抑制颞叶癫痫大鼠
海马胶质细胞的活化和炎症反应

许超 王娟 刘锋 梁洁敏 刘伟伟

【摘要】目的 探讨下调 miR-203 对颞叶癫痫大鼠海马胶质细胞活化和炎症反应的影响。**方法** 将 46 只成年 SD 大鼠随机分为假手术组 (n=10)、模型组 (n=12)、阴性对照组 (n=12) 和 miR-203 低表达组 (n=12)。立体定向辅助下,将海人酸注入大鼠左侧海马 CA3 区建立颞叶癫痫模型,miR-203 低表达组和阴性对照组大鼠左侧海马 CA3 区分别注射携带 miR-203 inhibitor 的腺相关病毒和空腺病毒载体,7 d 后取左侧海马组织,PCR 法检测 miR-203 水平,ELISA 法检测炎症因子[白细胞介素-1β(IL-1β)、IL-6 和肿瘤坏死因子α(TNF-α)]水平,免疫印迹法检测肌细胞增强因子 2c(MEF2C)、核因子-κB(NF-κB)p65 蛋白表达,TUNEL 法检测神经元凋亡,GFAP/CD11b/c 免疫荧光染色分析胶质细胞活化。**结果** 模型组大鼠海马组织 miR-203、NF-κB p65 蛋白表达量、炎症因子(IL-1β、IL-6 和 TNF-α)水平明显增高($P<0.05$),MEF2C 蛋白表达量明显降低($P<0.05$),活化的胶质细胞数量、神经元凋亡数量明显增多($P<0.05$)。双荧光素酶报告基因实验显示,MEF2C 是 miR-203 的靶基因。miR-203 表达低表达组大鼠海马组织 miR-203 表达量、NF-κB p65 蛋白表达量、炎症因子(IL-1β、IL-6 和 TNF-α)水平明显降低($P<0.05$),MEF2C 蛋白表达量明显增高($P<0.05$),活化的胶质细胞数量、神经元凋亡数量明显减少($P<0.05$)。**结论** 下调 miR-203,靶向调控 MEF2C/NF-κB 信号通路,抑制颞叶癫痫大鼠海马胶质细胞的活化、神经元凋亡和炎症反应。

【关键词】 颞叶癫痫;miR-203;MEF2C/NF-κB 通路;胶质细胞活化;炎症反应

【文章编号】 1009-153X(2021)06-0449-06 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 742.1; Q 786

Down-regulation of miR-203 inhibits glial cell activation and inflammation in hippocampal tissues of temporal lobe epilepsy rats by targeted regulation of MEF2C/NF-κB pathway

XU Chao¹, WANG Juan¹, LIU Feng¹, LIANG Jie-min¹, LIU Wei-wei². 1. Department of Medicine, Changjiang University, Jingzhou 434023, China; 2. Department of Neurosurgery, The First Affiliated Hospital of Changjiang University, Jingzhou 434000, China

【Abstract】 Objective To explore the effect of down-regulation of miR-203 on the glial cell activation and inflammation in hippocampal tissues of temporal lobe epilepsy rats. **Methods** Forty-six adult SD rats were randomly divided into sham operation group (n=10), model group (n=12), negative control group (n=12) and miR-203 low expression group (n=12). Under stereotactic assistance, kainic acid was injected into the left hippocampus CA3 to establish the temporal lobe epilepsy model. Adeno-associated viral (AAV) integrated with miR-203 inhibitor and AAV vector were injected into the left hippocampal CA3 of the rats in the miR-203 low expression group and the negative control group, respectively. Seven days after the intervention, the left hippocampal tissues were isolated, and the level of miR-203 was detected by PCR, and the inflammatory factors including interleukin-1β (IL-1β), IL-6 and tumor necrosis factor α (TNF-α) were detected by ELISA, the expression levels of myocyte enhancer factor 2c (MEF2C), nuclear factor-κB (NF-κB) p65 protein were detected by immunoblotting method, neuronal apoptosis was detected by TUNEL method, and glial cell activation was detected by GFAP/CD11b/c immunofluorescence staining. **Results** In the hippocampal tissues of rats in model group, the expression levels of miR-203 and NF-κB p65 protein, and the levels of inflammatory factors (IL-1β, IL-6 and TNF-α) were significantly increased ($P<0.05$), and the expression level of MEF2C protein was significantly decreased ($P<0.05$), the numbers of activated glial cells and apoptotic neurons were significantly increased ($P<0.05$). The dual luciferase reporter gene experiment showed that MEF2C was the target gene of miR-203. In the hippocampal tissues of rats in miR-203 low expression group, the expression levels of miR-203 and NF-κB p65 protein, and the levels of inflammatory factors (IL-1β, IL-6 and TNF-α) were significantly reduced ($P<0.05$), the protein expression level of MEF2C was significantly increased ($P<0.05$), and the numbers of activated glial cells and apoptotic neurons were significantly reduced ($P<0.05$). **Conclusions** Down-regulation of miR-203 inhibits the activation of hippocampal glial cells, neuronal apoptosis and inflammatory response in temporal lobe epilepsy rats, which may be by targeted regulation of the MEF2C/NF-κB signaling pathway.

【Key words】 Temporal lobe epilepsy; miR-203; MEF2C/NF-κB pathway; Activation of glial cells; Inflammation

颞叶癫痫是成人最常见的药物难治性癫痫^[1-4], 长期发作会造成严重脑损害^[5]。中枢神经系统内的星形胶质细胞与小胶质细胞在癫痫发生过程中有重要作用^[6]。肌细胞增强因子 2c (myocyte enhancer factor 2C, MEF2C) 被认为是调节癫痫的重要转录因子之一, 可调控多种受体和信号通路的表达^[7]。研究证实, miR-203 可抑制 MEF2C 的表达^[8]。本研究通过建立颞叶癫痫大鼠模型, 探讨 miR-203 在颞叶癫痫疾病中的作用以及对 MEF2C/NF- κ B 通路的影响, 为深入阐述颞叶癫痫的发病机制以及治疗提供新的方向。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组 健康成年雄性 SD 大鼠 60 只, 8 周龄, 体重 200~220 g, 购自北京维通利华实验动物科技有限公司[许可证编号 SCXK(京)2016-0006]。随机分为假手术组、模型组、阴性对照组、miR-203 抑制剂组。

1.2 大鼠癫痫模型的制作 随机选择 10 只大鼠作为假手术组, 其余 50 只大鼠采用文献[9]报道方法制作癫痫模型。用 1%戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔注射麻醉大鼠后, 固定于立体定位仪上。以前囟为参考点, 分别确定前、后囟在操纵器 Z 轴上的标度。用微量注射器将 2.5 μ l (0.5 μ g/ μ l) 海人酸注入大鼠左侧海马 CA3 区。假手术组相同部位注入等量的生理盐水。造模时 14 只大鼠死亡, 将剩余 36 只存活大鼠随机分为模型组、阴性对照组和 miR-203 抑制组, 每组 12 只。

1.3 干预方法 由上海基因化学有限公司构建一个携带 miR-203 inhibitor 的腺相关病毒(adeno-associated viral, AAV), 阴性对照为空白 AAV 载体。AAV-miR-203 的滴度为 1.0×10^{12} , 通过微量注射器以 0.2 μ l/min 的速度注入左侧海马背侧(前额后 3.12 mm, 中线外侧 3.0 mm, 前额腹侧 3.4 mm)和海马腹侧(前额后 5.04 mm, 中线外侧 5.0 mm, 前额腹侧 6.4 mm), 每个位置注射 3 μ l。

1.4 取材 干预 7 d 后, 3%戊巴比妥钠(50 mg/kg)麻醉大鼠后, 4%多聚甲醛灌注固定, 断头取脑。取出右侧海马背侧组织 CA3 区域, 每组随机选择 6 只大鼠海马组织, 4 $^{\circ}$ C 下在研钵中进行组织匀浆, 用于提取 miRNA 和总蛋白; 另外 6 只大鼠组织用 4%多聚甲醛固定 24 h, 用石蜡包埋, 制备组织蜡块。

1.5 实时荧光定量 PCR 检测海马组织 miR-203 水平 取海马 CA3 区组织匀浆, 用 TRIzol 试剂(大连宝生

生物科技有限公司)提取 miRNA 并逆转录得到 cDNA。使用 Applied Biosystems 7500 实时 PCR 系统进行 PCR 引物扩增, 循环条件为 95 $^{\circ}$ C 10 min, 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 60 s, 共 40 个循环。用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法进行量化分析。

1.6 ELISA 法检测海马组织炎症因子水平 取海马 CA3 区组织匀浆, 用 ELISA 试剂盒(上海碧云天有限公司)检测白细胞介素(interleukin, IL)-1 β 、IL-6 和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)TNF- α 含量。

1.7 免疫荧光染色法检测 将蜡块进行冠状面切片, 经干燥、洗涤、渗透, 5%山羊血清封闭, 并与胶质纤维性原纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP; 1:500; 英国 Abcam 公司)和 CD11b/c(1:100; 英国 Abcam 公司)共同孵育过夜。免疫标记切片用与 Alexa Fluor 594 或 Alexa Fluor 488 结合的山羊抗鼠二抗清洗和孵化。DAPI 复染核, 使用 Image J 软件进行人工计数。

1.8 TUNEL 染色 按 TUNEL 试剂盒(武汉博士德公司)说明进行染色。取冠状面切片脱蜡至水, 室温下用含 0.1% Triton X-100 的 PBS 洗涤 5 min。组织干燥后, 加入 50 ml 反应混合液(酶浓缩液: 标记溶液=1:9), 然后在 37 $^{\circ}$ C 黑暗的湿箱中孵育 1 h, 置于荧光显微镜下观察, 选取 5 个随机视野($\times 100$)。凋亡率=凋亡细胞/总细胞数 $\times 100\%$ 。

1.9 免疫印迹法检测蛋白表达 取海马 CA3 区组织匀浆, 冰上裂解、粉碎、离心, 取上清, 定量蛋白浓度。10% SDS-PAGE 电泳分离后, 转至 PVDF 膜。用 5%牛血清白蛋白封闭液封闭 2 h。分别加入 NF- κ B p65 及 MEF2C 蛋白抗体(1:500; 英国 Abcam 公司)孵育过夜。用山羊抗小鼠 IgG 二抗孵育 1 h 后, 显影, 对蛋白条带进行半定量分析。

1.10 双荧光素酶报告基因分析 用 TargetScan 数据库(http://www.targetscan.org/vert_72/)预测 miR-203 的潜在目标后, 使用 overlapPCR 法扩增得到含有 miR-203 结合位点的 MEF2C 野生型和突变型全长。构建 pmirGLO-NC 及 pmirGLO-MEF2C 重组载体。用 Lipofectamine TM2000 将重组报告载体和 miR-203 mimics 或 miR-NC 转染入 HEK293T 细胞中培养 24 h 后, 采用 DualGlo 双荧光素酶检测系统检测各组的荧光强度。

1.11 统计学处理 用 SPSS 21.0 软件进行处理; 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析和 LSD-t 检验; 以 $P < 0.05$ 代表差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 海马组织 miR-203 的表达变化 与假手术组(1.00±0.04)相比,模型组(3.45±0.27)和阴性对照组(3.53±0.08)大鼠海马组织 miR-203 表达量明显升高($P<0.05$),而模型组和阴性对照组无统计学差异($P>0.05$)。与模型组和阴性对照组相比,miR-203 抑制剂组海马组织 miR-203 相对表达量(1.60±0.03)明显降低($P<0.05$)。

2.2 海马组织炎症因子的含量变化 与假手术组相比,模型组和阴性对照组大鼠海马组织 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平均显著增加($P<0.05$),而模型组和阴性对照组无统计学差异($P>0.05$)。与模型组和阴性对照组相比,miR-203 抑制剂组大鼠海马组织 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平显著降低($P<0.05$)。见图 1。

2.3 海马组织星型胶质细胞和小胶质细胞的活化情况 与假手术组相比,模型组和阴性对照组 GFAP 和 CD11b/c 阳性细胞数量明显增多,而模型组和阴性对照组无统计学差异($P>0.05$),说明海马区放射层星形胶质细胞或小胶质细胞呈高度活化状态。与模型组和阴性对照组相比,miR-203 抑制剂组大鼠海马组织 GFAP 和 CD11b/c 阳性细胞数量明显减少($P<0.05$)。见图 2。

2.4 海马组织神经元凋亡情况 与假手术组相比,模型组和阴性对照组大鼠海马 TUNEL 阳性细胞数量明显增多($P<0.05$),而模型组和阴性对照组无统计学差异($P>0.05$)。与模型组和阴性对照组相比,miR-203 抑制剂组大鼠海马 TUNEL 阳性细胞数量则明显减少($P<0.05$)。见图 3。

2.5 海马组织 MEF2C/NF- κ B 通路相关蛋白表达情况 与假手术组相比,模型组和阴性对照组大鼠海马

组织 MEF2C 蛋白表达量显著降低($P<0.05$)、NF- κ B p65 蛋白表达量明显升高($P<0.05$);而模型组和阴性对照组无统计学差异($P>0.05$)。与模型组和阴性对照组相比,miR-203 抑制剂组大鼠海马组织 MEF2C 蛋白表达量显著升高、NF- κ B p65 蛋白表达量明显降低($P<0.05$)。见图 4。

2.6 miR-203 靶基因预测及双荧光素酶报告基因分析 与模拟对照组比较,miR-203 mimics 和野生型 MEF2C(MEF2C-3' UTR-WT)共转染可明显抑制荧光素酶活性($P<0.05$),但与突变型 MEF2C 共转染则对荧光素酶活性无影响($P>0.05$)。见图 5。

3 讨 论

神经胶质细胞的激活和增生是目前已经明确的癫痫病理特征之一,会改变血脑屏障的完整性、离子和神经递质的稳态,进而引起炎症反应,导致神经兴奋过度 and 癫痫活动的产生和扩散。微小核糖核酸是调节下游编码基因转录和翻译的重要介质,并且在癫痫的病因和发展中起关键的作用。文献报道,子痫前期 miR-203 表达的增加,会促进炎症反应^[10];沉默 miR-203 表达,可以上调甘氨酸受体- β 的表达,对慢性癫痫小鼠有一定的治疗作用^[11]。本研究采用大鼠海马内注射海人酸建立癫痫动物模型,使用 AAV 构建 AAV-miR-203 inhibitor,并注入左侧海马区沉默 miR-203 的表达,结果显示 miR-203 低表达组大鼠海马组织神经元凋亡数量明显减少,MEF2C 蛋白表达水平明显上调,NF- κ B p65 蛋白表达水平明显降低,炎症因子分泌明显减少。这说明下调 miR-203 表达,可能通过调节 MEF2C 相关信号通路的转导,抑制海马胶质细胞的激活。

神经胶质细胞对维持神经元的生存环境起着重要的作用。当星形胶质细胞对谷氨酸或 γ 氨基丁酸的摄取能力发生改变时,可导致癫痫发作,主要病理改变包括海马硬化、神经元丢失以及脑组织内星形胶质细胞和小胶质细胞细胞增生^[12]。当癫痫发作时,GFAP 表达明显增加,同时伴随着星形胶质细胞异常活化^[13]。与星形胶质细胞有所不同的是,在颞叶癫痫潜伏期时,小胶质细胞 CD11b/c 已经出现高表达,同时细胞增殖活性明显增加。本研究发现模型组大鼠海马组织星形胶质细胞和小胶质细胞都出现异常活化现象,GFAP 或 CD11b/c 阳性表达细胞数量明显增多;抑制 miR-203 表达后,GFAP 或 CD11b/c 阳性表达细胞数量均明显减少。除此以外,模型组大鼠神经元凋亡明显,这也是颞叶癫痫诱导神经元

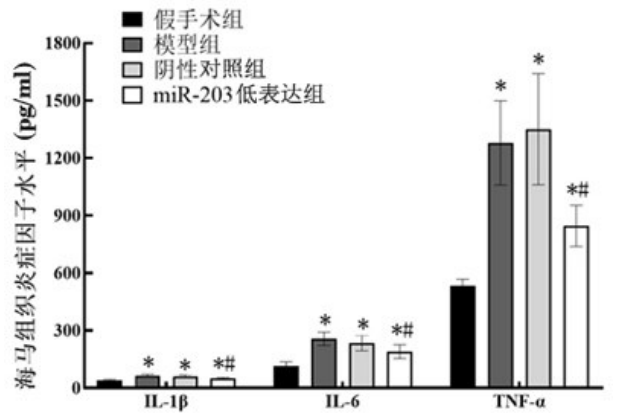


图 1 各组大鼠海马组织炎症因子的含量比较
与假手术组相比,* $P<0.05$;与模型组相比,# $P<0.05$;IL-1 β . 白细胞介素-1 β ;IL-6. 白细胞介素-6;TNF- α . 肿瘤坏死因子- α

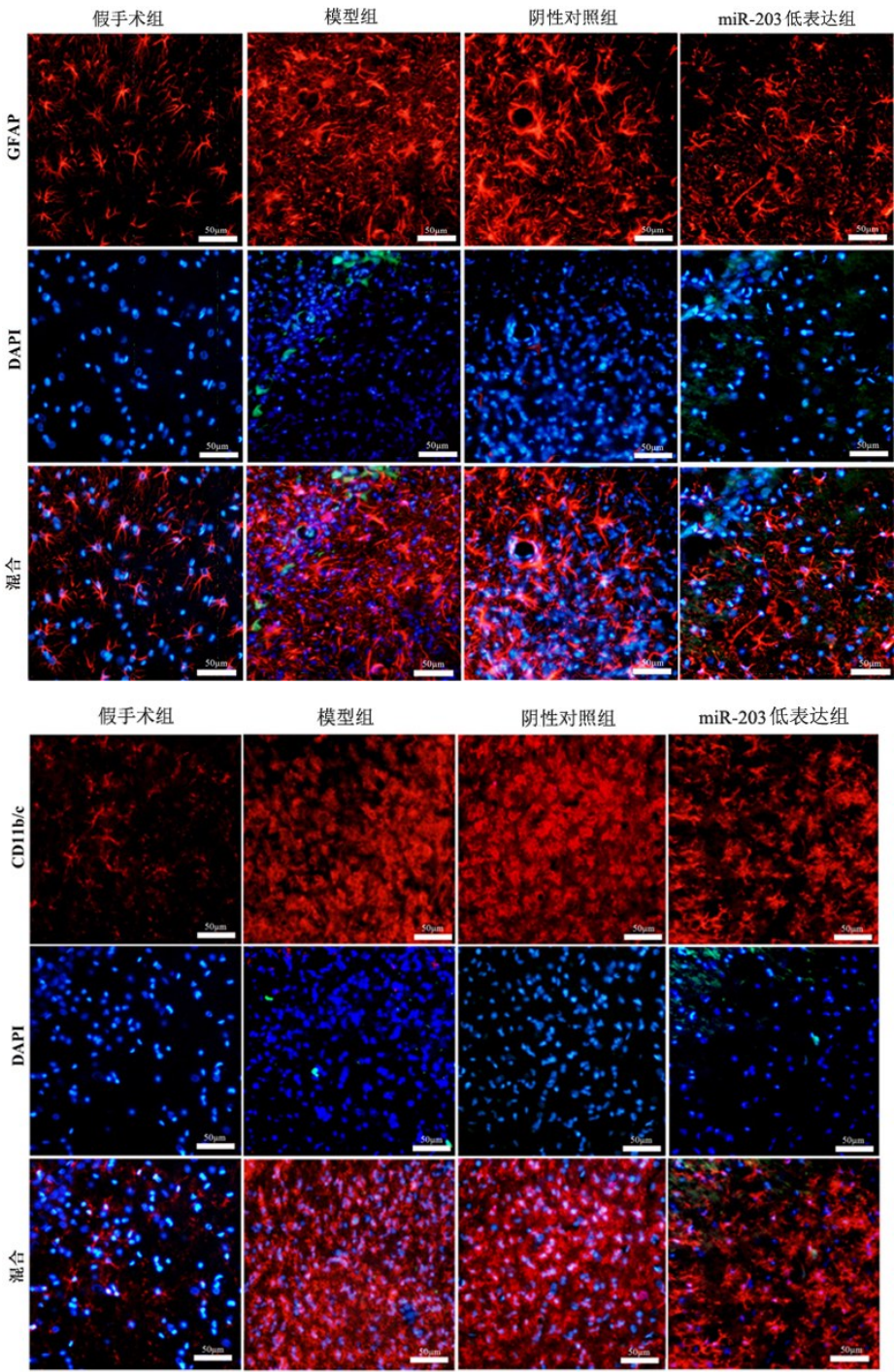
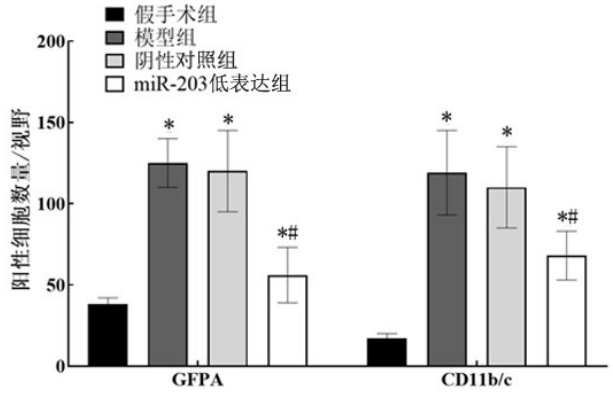


图2 各组大鼠海马组织GFAP和CD11b/c免疫荧光染色分析(×400)
与假手术组相比,* $P<0.05$;与模型组相比,# $P<0.05$



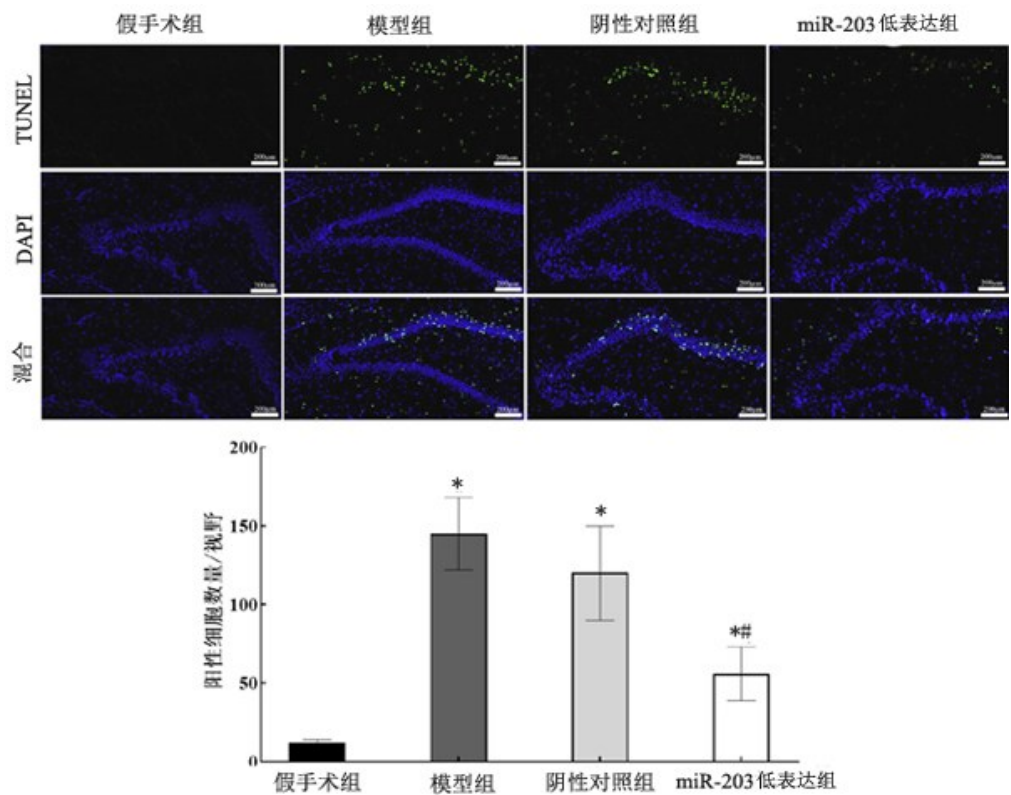


图3 各组大鼠海马组织神经元凋亡情况(×100)
与假手术组相比,* $P<0.05$;与模型组相比,# $P<0.05$

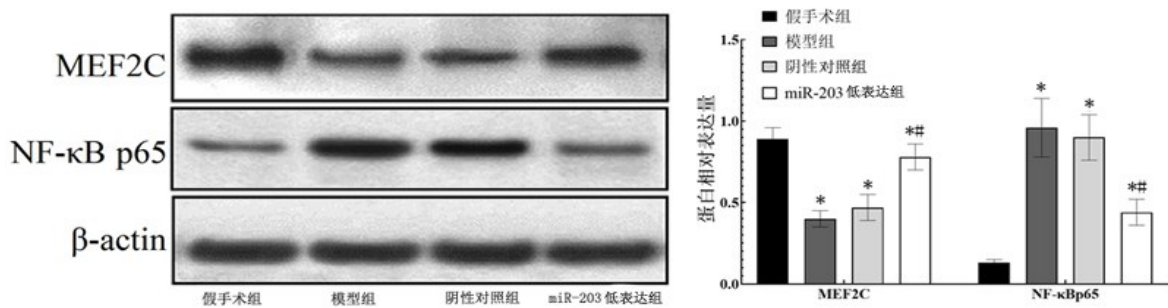


图4 各组大鼠海马组织 MEF2C、NF-κB p65 蛋白表达情况
与假手术组相比,* $P<0.05$;与模型组相比,# $P<0.05$

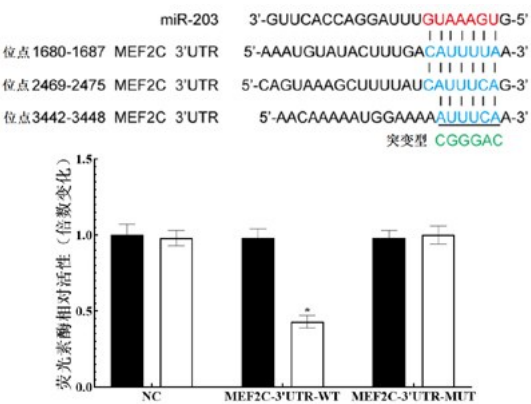


图5 生物信息学和双荧光素酶报告基因分析 miR-203 和 MEF2C mRNA 的靶向关系

损伤的重要机制之一,而 miR-203 低表达组大鼠海马组织神经元细胞凋亡数量显著减少。这说明抑制 miR-203 表达可减轻癫痫引起的海马组织神经元损伤。

另外,小胶质细胞和星形胶质细胞过度活化共同产生大量炎症细胞因子^[14],而炎症因子的大量分泌,一方面会进一步增加神经元的兴奋性,提高癫痫的易感性;另一方面,也是引起神经元凋亡的重要原因之一^[15]。因而,控制炎症因子的释放也许是颞叶癫痫的治疗手段之一。本研究模型组大鼠观察到的促炎性细胞因子水平的增加;下调 miR-203 表达,明显降低 IL-1β、IL-6、TNF-α 水平,说明抑制 miR-203

表达在控制颞叶癫痫的炎症反应中也起着积极的作用。

MEF2 转录因子家族在许多生理和病理过程中发挥关键作用,包括神经发育、心脏发育、神经退行性疾病和癌症等^[16]。MEF2C 在中枢神经元系统中呈高表达,具有反式激活作用和 DNA 结合活性,通过调节内皮细胞的 NF- κ B 表达,进而抑制炎症反应^[17]。NF- κ B 与是细胞中具有多向转录调节作用的一种蛋白质^[18]。炎症因子可激活 NF- κ B p65,进而刺激成纤维细胞、内皮细胞等分泌 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 等炎症因子,最终导致炎症反应发生、发展。何乾超等^[19]研究表明 NF- κ B 信号通路激活与癫痫发作密切相关。本研究证实 miR-203 对于 MEF2C 基因的转录翻译有一定的靶向抑制作用,miR-203 低表达组大鼠海马组织 MEF2C 蛋白表达量显著升高,同时 NF- κ B p65 蛋白表达量明显降低。这说明下调 miR-203 对于 MEF2C/NF- κ B 信号通路有一定的调控作用。这可能是下调 miR-203 表达保护海马组织胶质神经元损伤和抑制炎症反应的重要机制之一。

综上所述,miR-203 在颞叶癫痫大鼠海马组织中表达上调,抑制 miR-203 表达后,可通过靶向调节下游 MEF2C/NF- κ B 信号通路,抑制颞叶癫痫大鼠海马胶质细胞的活化和炎症反应。

【参考文献】

- [1] Zhang R, Ren Y, Liu C, *et al.* Temporal-spatial characteristics of phase-amplitude coupling in electrocorticogram for human temporal lobe epilepsy [J]. Clin Neurophysiol, 2017, 128(9): 1707-1718.
- [2] 罗 磊,朱海涛,徐宏浩,等. 脑磁图累积源成像在药物难治性颞叶癫痫术前评估中的应用[J]. 中国临床神经外科杂志, 2021, 26(2): 72-76.
- [3] 张 明,魏剑波,黄志刚. 颞叶癫痫发作间期 PET-CT 与 VEEG 检查对致痫灶的诊断价值比较[J]. 中国临床神经外科杂志, 2020, 25(1): 10-12.
- [4] 贾延增,杨朋范,林 巧,等. 选择性杏仁核-海马切除术对内颞叶癫痫病人神经心理学的影响[J]. 中国临床神经外科杂志, 2018, 23(11): 711-713.
- [5] 王丽丽,张 宁,王桂松,等. 脂肪间充质干细胞移植对颞叶癫痫大鼠血清及海马组织 SOD 和 MDA 的影响[J]. 江苏医药, 2020, 46(2): 113-115.
- [6] 乔丽娜,杨海龙,谭连红,等. 耳穴经皮电刺激对颞叶癫痫大鼠癫痫发作频率与海马区胶质细胞活性及炎性因子的影响[J]. 针刺研究, 2017, 42(3): 189-196.
- [7] Correia de Sousa M, Gjorgjieva M, Dolicka D, *et al.* Deciphering miRNAs' Action through miRNA Editing [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(24): 6249.
- [8] 秦忠宗,邓一帆,祝 刚,等. MicroRNA-203 对胶质母细胞瘤干细胞生物学特性的作用研究[J]. 贵州医药, 2016, 40(7): 699-700, 785.
- [9] 张 川,申长虹. 大鼠海人酸颞叶癫痫模型及病理和致病机制研究[J]. 中华实验外科杂志, 2003, 20(10): 918-919.
- [10] Liu F, Wu K, Wu W, *et al.* miR-203 contributes to pre-eclampsia via inhibition of VEGFA expression [J]. Mol Med Rep, 2018, 17(4): 5627-5634.
- [11] Lee ST, Jeon D, Chu K, *et al.* Inhibition of miR-203 Reduces Spontaneous Recurrent Seizures in Mice [J]. Int J Mol Sci, Mol Neurobiol, 2017, 54(5): 3300-3308.
- [12] 袁振宇,薛国芳. 癫痫后小胶质细胞与炎症的关系及研究进展 [J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2020, 22(10): 1113-1115.
- [13] 黄 熠,王晓明. 神经胶质细胞在癫痫发病机制中的作用研究进展 [J]. 中国现代医学杂志, 2020, 28(8): 67-69.
- [14] Rana A, Musto AE. The role of inflammation in the development of epilepsy [J]. J Neuroinflammation, 2018, 15(1): 144.
- [15] Mulero MC, Huxford T, Ghosh G. NF- κ B, I κ B, and IKK: integral components of immune system signaling [J]. Adv Exp Med Biol, 2019, 1172: 207-226.
- [16] Yuan F, Qiu ZH, *et al.* MEF2C loss-of-function mutation associated with familial dilated cardiomyopathy [J]. Clin Chem Lab Med, 2018, 56(3): 502-511.
- [17] Borlot F, Whitney R, Cohn RD, *et al.* MEF2C-related epilepsy: Delineating the phenotypic spectrum from a novel mutation and literature review [J]. Seizure, 2019, 67(4): 86-90.
- [18] Sun SC. The non-canonical NF- κ B pathway in immunity and inflammation [J]. Nat Rev Immunol, 2017, 17(9): 545-558.
- [19] 何乾超,林洁洁,高玉广,等. 柴胡疏肝汤对癫痫大鼠 miRNA132、NF- κ B 表达的影响[J]. 中国民族民间医药, 2020, 29(4): 21-25.

(2020-12-17 收稿, 2021-04-07 修回)