

· 癫痫专题研究 ·

特发性癫痫患者外周血差异表达 miRNA 分析

扫描二维码
查看更多

仲婷, 景燕, 陆明佳, 党辉, 李红燕

【摘要】 目的 分析特发性癫痫患者外周血差异表达miRNA。方法 选取2019年1月至2020年1月在新疆维吾尔自治区人民医院神经内科治疗的特发性癫痫患者12例为病例组, 选取同期于新疆维吾尔自治区人民医院门诊进行体检的健康者12例为对照组。采集受试者外周血, 采用Illumina HiSeq 2000测序仪进行高通量测序, 采用edgeR软件筛选差异表达miRNA, 采用qPCR检测差异表达miRNA表达水平。结果 共完成24个样本测序。各样本原始序列数据统计分析结果显示, 原始序列中碱基的测序质量值>20的碱基占总碱基的百分比为92.56%~97.32%, 原始序列中碱基的测序质量值>30的碱基占总碱基的百分比为88.01%~93.50%, 碱基G和C的数量总和占总碱基数量的百分比为45.29%~52.09%; 各样本待分析数据统计分析结果显示, 原始序列中碱基的测序质量值>20的碱基占总碱基的百分比为95.87%~98.85%, 原始序列中碱基的测序质量值>30的碱基占总碱基的百分比为95.30%~96.85%, 碱基G和C的数量总和占总碱基数量的百分比为40.38%~47.58%。共检测出146个差异表达miRNA, 与对照组相比, 研究组共有98个miRNA表达上调, 48个miRNA表达下调; 其中差异倍数最大的5个差异表达miRNA分别为hsa-let-7b-3p、hsa-let-7f-1-3p、hsa-miR-92a-1-5p、hsa-miR-219a-2-3p、hsa-miR-6810-3p。扩增曲线分析结果显示, 样本均经历了良好的扩增过程。熔解曲线分析结果显示, 大多数曲线为单峰。病例组hsa-let-7b-3p、hsa-miR-92a-1-5p表达水平低于对照组, hsa-miR-6810-3p表达水平高于对照组 ($P<0.05$)。结论 与健康人相比, 特发性癫痫患者外周血共有98个miRNA表达上调, 48个miRNA表达下调; 其中差异倍数最大的5个差异表达miRNA分别为hsa-let-7b-3p、hsa-let-7f-1-3p、hsa-miR-92a-1-5p、hsa-miR-219a-2-3p、hsa-miR-6810-3p, 且可能只有hsa-let-7b-3p、hsa-miR-92a-1-5p、hsa-miR-6810-3p参与了特发性癫痫的发生发展。

【关键词】 癫痫; 特发性癫痫; 微RNAs; hsa-let-7b-3p; hsa-miR-92a-1-5p; hsa-miR-6810-3p

【中图分类号】 R 256.61 **【文献标识码】** A **DOI:** 10.12114/j.issn.1008-5971.2023.00.179

Differentially Expressed miRNA in Peripheral Blood of Patients with Idiopathic Epilepsy ZHONG Ting, JING Yan, LU Mingjia, DANG Hui, LI Hongyan

Department of Neurology, People's Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region/Xinjiang Clinical Medical Center for Stroke and Rare Neurological Diseases, Urumqi 830000, China

Corresponding author: LI Hongyan, E-mail: lhyxy@126.com

【Abstract】 Objective To analyze differentially expressed miRNA in peripheral blood of patients with idiopathic epilepsy. **Methods** Twelve patients with idiopathic epilepsy who were treated in Department of Neurology, People's Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region from January 2019 to January 2020 were selected as the case group. Twelve healthy subjects who underwent physical examination in the Outpatient Department of People's Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region during the same period were selected as the control group. The peripheral blood of the subjects was collected, and the high-throughput sequencing was performed using Illumina HiSeq 2000 sequencer. The differentially expressed miRNA was screened by edgeR software, and the expression levels of the differentially expressed miRNA were detected by qPCR. **Results** A total of 24 samples were sequenced. The statistical analysis results of raw reads of each sample showed that the bases with sequencing quality value > 20 in the original sequence accounted for 92.56%~97.32% of the total bases. The percentage of bases with the sequencing mass value > 30 to the total bases in the original sequence was 88.01%~93.50%, and the percentage of the sum of the numbers of bases G and C to the total number of bases was 45.29%~52.09%. The statistical analysis results of clean reads of each sample showed that the bases with sequencing quality value > 20 in the original sequence accounted for 95.87%~98.85% of the total bases, the percentage of bases with the sequencing mass value > 30 to the total bases in the original sequence was 95.30%~

基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金资助项目 (2019D01C149)

作者单位: 830000新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市, 新疆维吾尔自治区人民医院神经内科 新疆脑卒中与神经系统罕见病临床医学研究中心

通信作者: 李红燕, E-mail: lhyxy@126.com

96.85%, and the percentage of the sum of the numbers of bases G and C to the total number of bases was 40.38%–47.58%. A total of 146 differentially expressed miRNAs were detected. Compared with the control group, 98 miRNAs in the study group were up-regulated and 48 miRNAs were down-regulated. Among them, the five differentially expressed miRNAs with the largest difference multiples were hsa-let-7b-3p, hsa-let-7f-1-3p, hsa-miR-92a-1-5p, hsa-miR-219a-2-3p and hsa-miR-6810-3p, respectively. The results of amplification curve analysis showed that all samples had undergone a good amplification process. The results of melting curve analysis showed that most curves were unimodal. The expression levels of hsa-let-7b-3p and hsa-miR-92a-1-5p in the case group were lower than those in the control group, while the expression level of hsa-miR-6810-3p was higher than that in the control group ($P < 0.05$). **Conclusion** Compared with healthy individuals, patients with idiopathic epilepsy have a total of 98 up-regulated miRNAs and 48 down-regulated miRNAs in their peripheral blood. Among them, the five differentially expressed miRNAs with the largest difference multiples are hsa-let-7b-3p, hsa-let-7f-1-3p, hsa-miR-92a-1-5p, hsa-miR-219a-2-3p, and hsa-miR-6810-3p, respectively. Moreover, only hsa-let-7b-3p, hsa-miR-92a-1-5p and hsa-miR-6810-3p might be involved in the occurrence and development of idiopathic epilepsy.

【Key words】 Epilepsy; Idiopathic epilepsy; MicroRNAs; hsa-let-7b-3p; hsa-miR-92a-1-5p; hsa-miR-6810-3p

癫痫是大脑神经元突发性异常放电, 造成大脑功能短暂性障碍的一种慢性病。流行病学调查显示, 全球约有5 000万癫痫患者, 其中我国癫痫患者约占18%, 且新发患者数量正以每年40万~60万的速度增长^[1]。研究证实, 癫痫长期反复发作可改变脑白质结构, 造成不同类型及程度的认知功能损伤, 尤其在记忆、语言、执行、情绪等方面, 而上述任何一种认知功能损伤均可对机体造成不可逆的影响^[2]。目前, 常规抗癫痫药物只可控制2/3患者的病情, 尚不能从根本上改变患者的病理生理状态^[3]。此外, 虽然分子生物学及基因测序技术不断进步, 但特发性癫痫的致病基因尚未被明确^[4]。miRNA是一种小型类似siRNA的分子, 由高等真核生物基因组编码, 其可通过与靶基因mRNA碱基配对并引导沉默复合体降解mRNA或阻碍mRNA翻译而发挥基因调控作用^[5]。而通过分析特发性癫痫患者外周血中差异表达miRNA来寻找其生物标志物, 对早期诊断和治疗特发性癫痫十分重要。本研究旨在分析特发性癫痫患者外周血差异表达miRNA, 以期对特发性癫痫治疗靶点的选择提供理论基础。

1 对象与方法

1.1 研究对象 选取2019年1月至2020年1月在新疆维吾尔自治区人民医院神经内科治疗的特发性癫痫患者12例为病例组。纳入标准: (1)符合特发性癫痫的诊断标准^[6]: 发作期间脑电波显示全身性棘波活动, 并伴有失神、肌肉震颤、阵发性强直等表现; (2)年龄18~36岁; (3)对本研究知情同意。排除标准: (1)颅脑MRI检查显示存在脑器质性、结构性病变者; (2)存在脑血管疾病、头部创伤或颅脑手术史者; (3)合并其他神经类、精神类疾病者; (4)合并其他内、外科疾病者。选取同期于新疆维吾尔自治区人民医院门诊进行体检的健康者12例为对照组。纳入标准: (1)体检结果无明显异常; (2)年龄18~36岁; (3)无癫痫家族史。两组性别、年龄、受教育时间比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表1。本研究已通过新疆维吾尔自治区人民医院伦理委员会审核批准 (KY2019051562), 所有受试者对本研究知情同意。

表1 两组一般资料比较

组别	例数	性别 (男/女)	年龄 ($\bar{x} \pm s$, 岁)	受教育时间 ($\bar{x} \pm s$, 年)
对照组	12	7/5	25.5 ± 6.1	9.2 ± 2.9
病例组	12	6/6	26.4 ± 5.4	9.5 ± 3.0
$\chi^2(t)$ 值		0.168	0.383 ^a	0.274 ^a
P 值		0.682	0.706	0.786

注: ^a表示 t 值

1.2 研究方法

1.2.1 外周血采集 采集受试者清晨空腹静脉血5 ml, 1 000 r/min离心5 min (离心半径124 mm) (离心机购自赛默飞世尔科技公司, 型号: mySPIN™ 6 Mini Centrifuge), 取血浆并低温保存。

1.2.2 高通量测序 委托新疆康智睿生物医学技术服务有限公司协助完成血浆高通量测序。采用Trizol法提取血浆样本中的总RNA, 在分光光度计230、260、280 nm波长下测定RNA吸光度, 并计算RNA浓度; 采用琼脂糖凝胶电泳确定样品RNA纯度及完整性; 采用NanoDrop ND-1000定量样品中总RNA质量^[7]。取1 μ g总RNA并使用T4 RNA连接酶进行催化, 使用连接酶分别连接3'端及5'端miRNA测序接头, 将随机引物反转为第一链cDNA; 采用RT-PCR (PCR 11~12个循环) 扩增, 采用变性聚丙烯酰胺凝胶 (1.0 mm, 10孔, 购自赛默飞世尔科技公司, 货号: EC68752BOX) 进行电泳纯化, 生成sRNA文库, 采用Picogreen荧光染料法 (微型荧光仪购自北京原平皓生物技术有限公司, 型号: TBS380) 对sRNA的质量进行定量分析; 采用Illumina cBot簇生成系统进行桥式PCR扩增, 生成克隆簇; 采用Illumina HiSeq 2000测序仪按照TruSeq Rapid Small RNA cluster试剂盒说明书进行高通量测序, 获得原始序列数据和样品待分析数据。除去sRNA序列接头及低质量 (原始序列中碱基的测序质量值 >30 的碱基占总碱基的百分比 $>80\%$ 、接头污染比例 $\leq 1\%$ 、有效序列长度 ≥ 50 bp、数据的有效比对率 $>70\%$) 的序列, 保留长度 ≥ 18 nt的序列读数。

1.2.3 差异表达miRNA筛选 采用Off-LineBasecaller软件分

析并读取碱基序列,将原始序列数据处理后,获取高通量测序发现的miRNA的丰度信息。采用edgeR软件筛选差异表达miRNA,其筛选条件为 $|\log_2FC| \geq 1$ 且 $P < 0.05$;选取差异倍数最大的5位差异表达miRNA。

1.2.4 差异表达miRNA表达水平检测 采用qPCR检测差异表达miRNA表达水平。采用PrimerPremier 5.0软件并根据目标miRNA或基因进行引物设计(见表1)。将混合液(反转录buffer 2.0 μ l+上游引物0.2 μ l+下游引物0.2 μ l+脱氧核糖核苷酸三磷酸0.1 μ l)置于70 $^{\circ}$ C干热浴器中3 min,取出后立即进行冰水浴,冷却至室温;加入莫洛尼鼠白血病病毒反转录酶0.5 μ l,37 $^{\circ}$ C水浴60 min;随后立即95 $^{\circ}$ C干热浴3 min,置于-80 $^{\circ}$ C冰箱待测。配置PCR溶液:SYBR Green 1染料10 μ l+上游引物1 μ l+下游引物1 μ l+dNTP 1 μ l+Taq聚合酶2 μ l+待测样品cDNA 5 μ l+双蒸水30 μ l,将上述试剂混合后以6 000 r/min离心10 min(离心半径6 cm)。将配置好的PCR溶液置于RT-PCR仪上进行PCR扩增。PCR条件:93 $^{\circ}$ C预变性2 min,后按照93 $^{\circ}$ C 1 min、55 $^{\circ}$ C 1 min、72 $^{\circ}$ C 1 min进行40个循环,72 $^{\circ}$ C延伸7 min。同时绘制目标miRNA或基因的扩增曲线和溶解曲线以检验差异表达miRNA的引物特异性。使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算差异表达miRNA表达水平。

1.3 统计学方法 所有数据采用Excel录入,采用GraphPad Prism 7.00软件包进行数据分析及制图。计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用两独立样本t检验;计数资料以相对数表示。双侧检验水准: $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 高通量测序结果 共完成24个样本测序。各样本原始序列数据统计分析结果显示,原始序列数据为10 811 542~14 865 039个,原始测序量(碱基数目)为810 865 650~1 094 213 755个,误差率为0.026 1%~0.035 1%,原始序列中碱基的测序质量值 >20 的碱基占总碱基的百分比为92.56%~97.32%,原始序列中碱基的测序质量值 >30 的碱基占总碱基的百分比为88.01%~93.50%,碱基G和C的数量总和占总碱基数量的百分比为45.29%~52.09%。各样本样品待分析数据统计分析结果显示,样品待分析数据为10 714 978~14 226 434个,过滤后得到的测序量(碱基数目)为231 280 458~305 545 866个,误差率为0.022 5%~0.032 0%,原始序列中碱基的测序质量值 >20 的碱基占总碱基的百分比为95.87%~98.85%,原始序列中碱基的测序质量值 >30 的碱基占总碱基的百分比为

95.30%~96.85%,碱基G和C的数量总和占总碱基数量的百分比为40.38%~47.58%,见表2。

2.2 差异表达miRNA筛选结果 共检测出146个差异表达miRNA,与对照组相比,研究组共有98个miRNA表达上调,48个miRNA表达下调;其中差异倍数最大的5个差异表达miRNA分别为hsa-let-7b-3p、hsa-let-7f-1-3p、hsa-miR-92a-1-5p、hsa-miR-219a-2-3p、hsa-miR-6810-3p,见表3。

2.3 差异表达miRNA表达水平检测结果 扩增曲线分析结果显示,样本均经历了良好的扩增过程,见图1。溶解曲线分析结果显示,大多数曲线为单峰,见图2。病例组hsa-let-7b-3p、hsa-miR-92a-1-5p表达水平低于对照组,hsa-miR-6810-3p表达水平高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$);两组hsa-let-7f-1-3p、hsa-miR-219a-2-3p表达水平比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),见表4。

3 讨论

研究指出, $>80\%$ 的人类基因在转录时会产生大量的miRNA等多种非编码RNA,并通过影响靶基因转录、翻译及蛋白质修饰等过程而影响后生动物的生物学过程^[8-9]。其中miRNA在脑发育和神经可塑性等方面发挥的作用已得到充分证实^[10-12]。本研究旨在分析特发性癫痫患者外周血差异表达miRNA。

本研究各样本原始序列数据统计分析结果显示,原始序列中碱基的测序质量值 >20 的碱基占总碱基的百分比为92.56%~97.32%,原始序列中碱基的测序质量值 >30 的碱基占总碱基的百分比为88.01%~93.50%,碱基G和C的数量总和占总碱基数量的百分比为45.29%~52.09%;各样本样品待分析数据统计分析结果显示,原始序列中碱基的测序质量值 >20 的碱基占总碱基的百分比为95.87%~98.85%,原始序列中碱基的测序质量值 >30 的碱基占总碱基的百分比为95.30%~96.85%,碱基G和C的数量总和占总碱基数量的百分比为40.38%~47.58%,提示测序样本碱基分布比较均匀,可用于后续分析。

本研究结果显示,共检测出146个差异表达miRNA,与对照组相比,研究组共有98个miRNA表达上调,48个miRNA表达下调;其中差异倍数最大的5个差异表达miRNA分别为hsa-let-7b-3p、hsa-let-7f-1-3p、hsa-miR-92a-1-5p、hsa-miR-219a-2-3p、hsa-miR-6810-3p。扩增曲线分析结果显示,样本均经历了良好的扩增过程;溶解曲线分析结果显示,大多数曲线为单峰;说明检测样本的特异性和稳定性比较好,且扩增产物纯度和可靠性比较高。

表1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因	正向引物序列(5'-3')	反向引物序列(5'-3')
U6	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGT	GCACTGGATACGACAAAATATGGAAC
hsa-miR-6810-3p	TCCCCTGCTCCCTTGTTC	GGTCTTTACGGTACCCAAT
hsa-miR-219a-2-3p	GTCCAGAAATTGTGGCTGGAC	GCAGGTCAGGATATTC
hsa-miR-92a-1-5p	CGCAGAGGTTGGGATCGGTTG	CAGGTCCAGTTTTTTTTTTTTTTAGCATTG
hsa-let-7f-1-3p	GCGCGTATACAATCTATTGC	AGTGCAGGGTCCGAGGTATT
hsa-let-7b-3p	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTA	GCCCTATACAACCTACTGC

表2 两组原始序列数据、样品待分析数据统计分析
Table 2 Statistical analysis of raw reads and clean reads of the two groups

样本编号	原始序列数据统计分析						样品待分析数据统计分析					
	原始序列数据(个)	原始测序量(碱基数目)(个)	误差率(%)	原始序列中碱基的测序质量值>20的碱基占总碱基的百分比(%)	原始序列中碱基的测序质量值>30的碱基占总碱基的百分比(%)	碱基C和C的数量总和占总碱基数量的百分比(%)	样品待分析数据(个)	过滤后得到的测序量(碱基数目)(个)	误差率(%)	原始序列中碱基的测序质量值>20的碱基占总碱基的百分比(%)	原始序列中碱基的测序质量值>30的碱基占总碱基的百分比(%)	碱基C和C的数量总和占总碱基数量的百分比(%)
A1	11 741 241	880 593 075	0.026 4	97.04	93.29	47.85	11 688 821	251 960 803	0.023 6	98.44	95.70	41.73
A2	11 864 774	889 858 050	0.035 0	92.59	88.34	50.23	11 808 281	251 504 363	0.022 9	98.79	96.39	40.99
A3	11 030 705	827 302 875	0.026 1	97.19	93.50	50.51	10 981 131	234 995 591	0.023 1	98.72	96.12	41.49
A4	10 943 004	820 725 300	0.028 9	96.11	91.12	47.94	10 901 437	234 949 946	0.023 1	98.74	96.18	42.30
A5	10 811 542	810 865 650	0.030 4	95.15	90.46	49.55	10 763 309	231 280 458	0.023 3	98.60	96.06	42.95
A6	13 397 520	1 004 814 000	0.026 7	97.06	92.92	45.29	13 334 239	285 908 205	0.023 0	98.75	96.29	42.15
A7	11 843 241	826 102 485	0.027 8	97.01	91.20	47.55	13 208 221	280 360 281	0.023 2	97.01	96.02	41.05
A8	12 756 413	889 052 780	0.026 9	97.23	92.31	49.52	10 843 652	258 412 036	0.025 1	95.87	95.30	42.11
A9	13 064 127	987 236 810	0.027 5	96.84	93.14	48.93	11 508 742	249 785 103	0.029 3	96.85	95.98	40.38
A10	13 780 294	1 012 368 455	0.028 1	96.92	90.05	50.15	11 623 084	234 703 987	0.022 5	98.41	96.05	42.63
A11	12 068 402	950 146 875	0.026 7	97.10	91.43	50.37	10 870 158	239 654 812	0.023 1	98.03	96.12	42.21
A12	10 978 653	898 071 625	0.027 4	95.67	92.46	48.68	10 953 201	253 201 456	0.032 0	98.68	96.34	41.56
B1	10 850 864	813 814 800	0.026 5	97.07	93.15	48.36	10 788 578	232 318 203	0.023 1	98.70	96.19	43.36
B2	11 756 807	881 760 525	0.035 1	92.56	88.24	51.34	11 719 075	250 162 938	0.023 1	98.74	96.22	41.13
B3	11 804 193	885 314 475	0.026 2	97.23	93.41	49.21	11 749 377	252 454 956	0.022 9	98.81	96.44	42.26
B4	10 856 661	814 249 575	0.030 6	95.05	90.31	52.09	10 714 978	235 336 107	0.023 5	98.42	95.84	47.58
B5	14 309 525	1 073 214 375	0.030 2	95.37	90.42	50.61	14 226 434	305 545 866	0.023 3	98.64	96.01	42.01
B6	12 831 115	962 333 625	0.026 1	97.23	93.50	47.13	12 757 336	274 796 360	0.022 8	98.85	96.48	43.87
B7	12 904 753	987 420 525	0.028 7	97.01	92.43	49.28	14 023 664	301 875 960	0.023 8	98.26	96.13	45.02
B8	13 840 725	1 094 213 755	0.031 2	97.32	89.67	48.92	12 304 586	293 214 054	0.023 2	98.71	95.96	42.35
B9	11 098 672	990 351 075	0.027 9	96.37	90.34	49.76	10 823 687	236 456 879	0.023 3	98.77	96.85	41.66
B10	11 340 847	997 201 725	0.034 7	94.31	91.20	51.84	11 889 520	252 021 463	0.022 8	98.36	96.29	43.21
B11	14 865 039	1 012 871 855	0.027 1	95.65	88.01	50.37	11 965 302	269 384 675	0.023 0	98.43	96.11	47.29
B12	12 672 345	823 402 525	0.032 4	95.96	90.54	52.05	10 930 485	245 632 107	0.023 7	98.22	96.07	41.95

注：A为对照组，B为病例组

表3 5位差异倍数最大的差异表达miRNA

Table 3 Five differentially expressed miRNA with the largest multiples of difference

miRNA	FC (B/A)	log ₂ FC (B/A)	P值	校正P值
hsa-let-7b-3p	28.342	4.824 870 187	<0.001	<0.001
hsa-let-7f-1-3p	24.187	4.596 184 626	<0.001	0.042
hsa-miR-92a-1-5p	18.620	4.218 778 943	0.002	0.118
hsa-miR-219a-2-3p	16.290	4.025 932 969	0.003	0.183
hsa-miR-6810-3p	15.176	3.923 732 227	<0.001	0.025

注：A为对照组，B为病例组

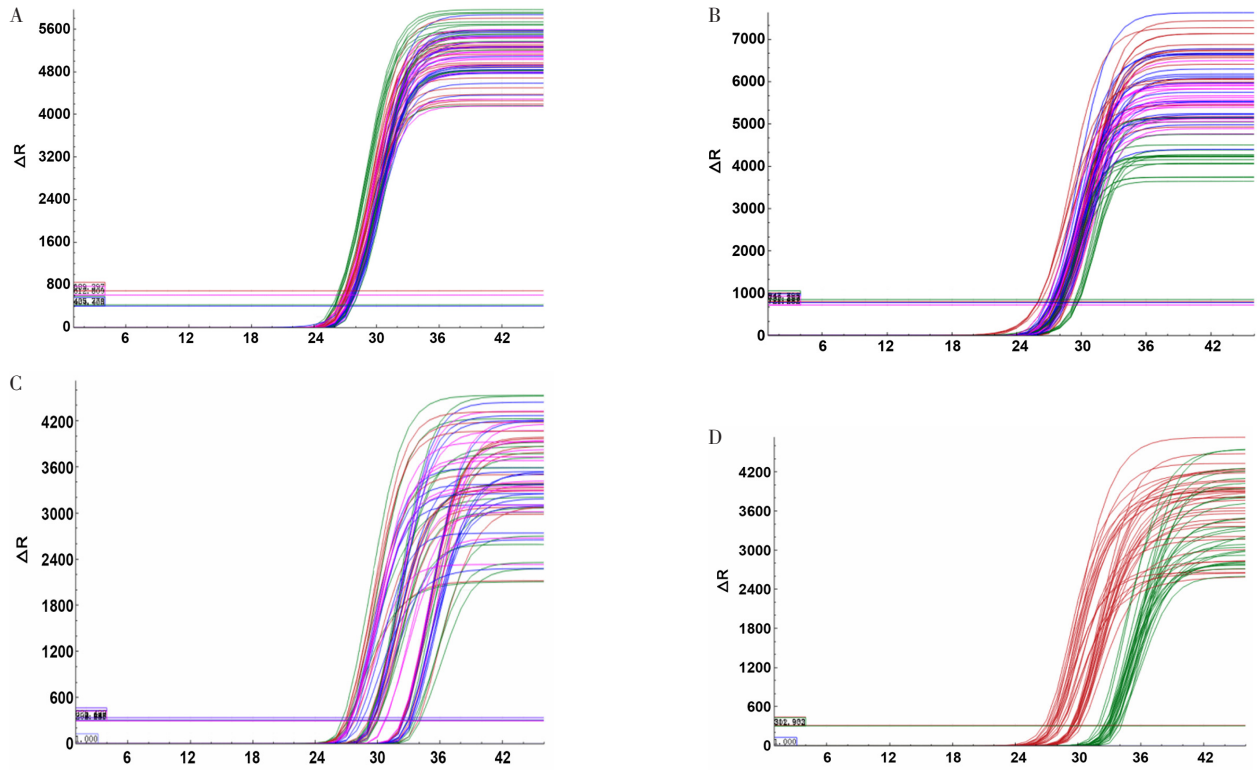
文献指出，cAMP反应元件结合蛋白（cAMP response element binding protein, CREB）对癫痫发生及持续状态的调节作用可能与has-let-7b-3p有关；CREB可通过磷酸化转为活性结构，进而启动多种基因的转录，并通过多条途径调控神经元功能，从而促进神经元兴奋、发育和重塑^[13-16]。本研究结果显示，病例组has-let-7b-3p表达水平低于对照组，提示has-let-7b-3p在特发性癫痫患者中表达下调，且其可能在

表4 两组差异表达miRNA表达水平比较(̄x ± s)

Table 4 Comparison of expression levels of differentially expressed miRNA between the two groups

组别	例数	hsa-let-7b-3p	hsa-let-7f-1-3p	hsa-miR-92a-1-5p	hsa-miR-219a-2-3p	hsa-miR-6810-3p
对照组	12	1.08 ± 0.34	1.02 ± 0.20	1.02 ± 0.19	1.03 ± 0.31	1.12 ± 0.21
病例组	12	0.39 ± 0.19	1.08 ± 0.26	0.49 ± 0.31	0.96 ± 0.46	2.03 ± 0.92
t值		6.275	0.743	5.712	0.476	4.280
P值		<0.001	0.465	<0.001	0.639	<0.001

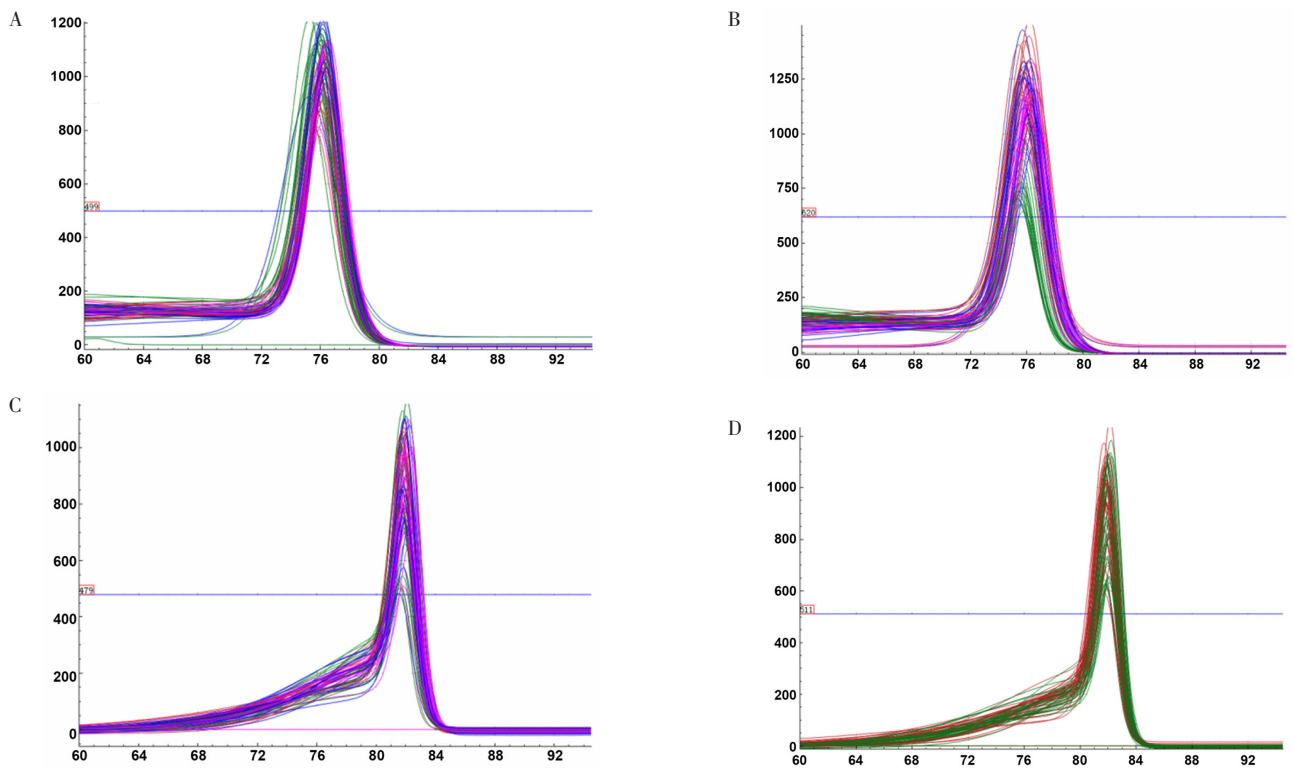
特发性癫痫的发病机制中发挥作用。has-miR-92a-1-5p是脑特异性miRNA，其可参与N-甲基-D-天冬氨酸谷氨酸受体信号传导，调控哺乳动物脑源性神经营养因子及其酪氨酸激酶的表达水平，从而影响大脑功能^[17-18]。本研究结果显示，病例组hsa-miR-92a-1-5p表达水平低于对照组，其原因尚不清楚，需要进一步研究分析。一项基因分型分析研究指出，miR-6810-3p可能参与突触信号发生及传导、神经元分化及投射过程，且其与黄斑变性及神经退行性疾病直接相关^[19]。



注: A为hsa-miR-6810-3p, B为hsa-miR-219a-2-3p, C为hsa-miR-92a-1-5p、hsa-let-7f-1-3p, D为hsa-let-7b-3p

图1 差异表达miRNA的扩增曲线

Figure 1 Amplification curve of differentially expressed miRNA



注: A为hsa-miR-6810-3p, B为hsa-miR-219a-2-3p, C为hsa-miR-92a-1-5p、hsa-let-7f-1-3p, D为hsa-let-7b-3p

图2 差异表达miRNA的熔解曲线

Figure 2 Fusion curve of differentially expressed miRNA

本研究结果显示, 病例组hsa-miR-6810-3p表达水平高于对照组, 提示hsa-miR-6810-3p表达水平升高可能与特发性癫痫有关, 其有可能作为特发性癫痫的生物标志物。本研究结果还显示, 两组hsa-let-7f-1-3p、hsa-miR-219a-2-3p表达水平比较, 差异无统计学意义, 分析原因可能与受试者的个体差异和本研究样本量较小等因素有关, 后期需设计同质化的前瞻性研究以进一步评估hsa-let-7f-1-3p、hsa-miR-219a-2-3p在特发性癫痫中的意义。

综上所述, 与健康人相比, 特发性癫痫患者外周血共有98个miRNA表达上调, 48个miRNA表达下调; 其中差异倍数最大的5个差异表达miRNA分别为hsa-let-7b-3p、hsa-let-7f-1-3p、hsa-miR-92a-1-5p、hsa-miR-219a-2-3p、hsa-miR-6810-3p, 且可能只有hsa-let-7b-3p、hsa-miR-92a-1-5p、hsa-miR-6810-3p参与了特发性癫痫的发生发展。但本研究在发现差异表达miRNA后, 并未做针对性的小鼠敲低实验, 不能提供其调控机制的完整证据链, 期待后续研究增加基础研究以进一步深入探讨。

作者贡献: 仲婷进行文章的构思与设计、文章的可行性分析、文献/资料收集, 撰写论文; 仲婷、景燕、陆明佳进行论文的修订; 党辉、李红燕负责文章的质量控制和审核; 李红燕对文章整体负责, 监督管理。

本文无利益冲突。

参考文献

- [1] 杨春兰, 张艺宁, 任洁钊. 基于DTI的颞叶癫痫患者认知功能研究综述 [J]. 北京工业大学学报, 2021, 47 (1): 76-84. DOI: 10.11936/bjtxb2019040019.
- [2] LENCK-SANTINI P P, SAKKAKI S. Alterations of neuronal dynamics as a mechanism for cognitive impairment in epilepsy [J]. *Curr Top Behav Neurosci*, 2022, 55: 65-106. DOI: 10.1007/7854_2020_193.
- [3] 李峥辉. 长链非编码RNA AK035610在癫痫发病中的作用及机制研究 [D]. 厦门: 厦门大学, 2017.
- [4] PERUCCA P, BAHLO M, BERKOVIC S F. The genetics of epilepsy [J]. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2020, 21: 205-230. DOI: 10.1146/annurev-genom-120219-074937.
- [5] 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. DOI: 10.3390/ijms20246249.
- [6] SCHEFFER I E, BERKOVIC S, CAPOVILLA G, et al. ILAE classification of the epilepsies: position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology [J]. *Epilepsia*, 2017, 58 (4): 512-521. DOI: 10.1111/epi.13709.
- [7] 蔡尚, 杨咏强, 郭旗, 等. 胸部肿瘤患者外周血microRNA表达与急性放射性肺炎相关性研究 [J]. *原子能科学技术*, 2021, 55 (S2): 440-447. DOI: 10.7538/yzk.2021.zhuankan.0162.
- [8] WANG Y, XIAO S M, ZHOU S J, et al. High glucose aggravates cholesterol accumulation in glomerular endothelial cells through the LXRs/LncRNAOR13C9/ABCA1 regulatory network [J]. *Front Physiol*, 2020, 11: 552483. DOI: 10.3389/fphys.2020.552483.
- [9] KILIKEVICIUS A, MEISTER G, COREY D R. Reexamining assumptions about miRNA-guided gene silencing [J]. *Nucleic Acids Res*, 2022, 50 (2): 617-634. DOI: 10.1093/nar/gkab1256.
- [10] 刘磊, 董海, 何仲春, 等. mir-133b对新生大鼠脑神经元细胞焦亡的影响和机制研究 [J]. *医学分子生物学杂志*, 2020, 17 (3): 200-206. DOI: 10.3870/j.issn.1672-8009.2020.03.005.
- [11] 朱琳. 脑神经胶质瘤替莫唑胺耐药circRNA-miRNA-mRNA调控网络的构建 [J]. *安徽医药*, 2021, 25 (7): 1414-1418. DOI: 10.3969/j.issn.1009-6469.2021.07.035.
- [12] SABIRZHANOV B, MATYAS J, COLL-MIRO M, et al. Inhibition of microRNA-711 limits angiotensin-II and Akt changes, tissue damage, and motor dysfunction after contusive spinal cord injury in mice [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10 (11): 839. DOI: 10.1038/s41419-019-2079-y.
- [13] 刘华, 徐祖才, 陈阳美. 丙戊酸钠对大鼠海马神经元癫痫样放电后P-CREB1表达的影响 [J]. *重庆医科大学学报*, 2009, 34 (8): 1024-1027. DOI: 10.3969/j.issn.1671-8348.2008.18.064.
- [14] URBANSKA M, KAZMIERSKA-GREBOWSKA P, KOWALCZYK T, et al. GSK3 β activity alleviates epileptogenesis and limits GluA1 phosphorylation [J]. *EBioMedicine*, 2019, 39: 377-387. DOI: 10.1016/j.ebiom.2018.11.040.
- [15] CHANG Y C, HUANG A M, KUO Y M, et al. Febrile seizures impair memory and cAMP response-element binding protein activation [J]. *Ann Neurol*, 2003, 54 (6): 706-718. DOI: 10.1002/ana.10789.
- [16] TALOS D M, JACOBS L M, GOURMAUD S, et al. Mechanistic target of rapamycin complex 1 and 2 in human temporal lobe epilepsy [J]. *Ann Neurol*, 2018, 83 (2): 311-327. DOI: 10.1002/ana.25149.
- [17] HA JI SUN, CHOI H R, KIM I S, et al. Hypoxia-induced S100A8 expression activates microglial inflammation and promotes neuronal apoptosis [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22 (3): 1205. DOI: 10.3390/ijms22031205.
- [18] SARACHANA T, ZHOU R L, CHEN G, et al. Investigation of post-transcriptional gene regulatory networks associated with autism spectrum disorders by microRNA expression profiling of lymphoblastoid cell lines [J]. *Genome Med*, 2010, 2 (4): 23. DOI: 10.1186/gm144.
- [19] FANG Y, DAVIES P F. Site-specific microRNA-92a regulation of Krüppel-like factors 4 and 2 in atherosusceptible endothelium [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012, 32 (4): 979-987. DOI: 10.1161/atvbaha.111.244053.

(收稿日期: 2022-09-19; 修回日期: 2023-02-13)

(本文编辑: 崔丽红)