

网络出版时间:2023-11-30 11:29:06 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.r.20231129.1027.014

circ RNA_0017178 对戊四氮致癫痫小鼠模型的影响

毛 戡^{1*}, 温萍萍^{2*}, 孙洪英¹, 张舒雅^{3,4}, 孟晨曦⁴, 张 佳¹

摘要 目的 探究环状 RNA (circ RNA) 在癫痫发病中的可能作用机制。方法 利用 circRNA 基因芯片检测癫痫患者与健康对照者外周静脉血中 circRNA 表达谱筛选出差异表达的 circRNA。利用 circPrimer、circMir、TargetScan 对 circ_0017178 与癫痫进行生物信息学分析并构建相关腺病毒载体。将 30 只雄性成年 C57BL/6 小鼠随机分为对照组、空载体组、circ_0017178 过表达组 (10 只/组), 分别向 3 组小鼠海马内注射生理盐水、空质粒腺病毒载体、circ_0017178 过表达腺病毒载体, 构建戊四唑癫痫模型后观察各组小鼠的动物行为学变化, 用 Tunel 染色法分析各组小鼠海马组织细胞凋亡情况。结果 基因芯片结果表明, 与对照组比较, 癫痫组中 circ_0069272、circ_0033065、circ_0017178、circ_0073442、circ_0033063、circ_0049415 上调, circ_0083773、circ_0088262、circ_0016396 下调。其中 circ_0017178 可能与癫痫密切相关, 通过生信分析 circ_0017178 可能结合 20 个 miRNA 调控 39 个癫痫基因, 并具备潜在 m6A、IRES、ORF1 结合位点。在动物实验中, 相比空载体组及对照组, circ_0017178 过表达组癫痫的潜伏期缩短 ($P < 0.05$)、发作时间延长 ($P < 0.05$)、发作次数增加 ($P < 0.05$); 空载体组及对照组间无统计学意义 ($P > 0.05$)。相比空载体组及对照组, circ_0017178 过表达组癫痫小鼠海马组织细胞凋亡程度明显增加 ($P < 0.05$), 空载体组及对照组间无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 Circ_0017178 在癫痫患者外周血单个核细胞表达谱中升高, Circ_0017178 可能充当 miRNA 的“分子海绵”在癫痫中发挥作用, 并具备 m6A 甲基化和翻译蛋白质的潜能。Circ_0017178 可能通过促进戊四唑癫痫小鼠的细胞凋亡增加癫痫的易感性和严重程度。

关键词 环状 RNA_0017178; 癫痫; 差异性表达; 生物信息学

分析; 细胞凋亡

中图分类号 R 742.1

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)12-2081-08
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.12.014

癫痫是一种常见的神经系统疾病, 特征是神经元过度同步放电出现短暂的中枢神经系统功能障碍, 还伴有一定程度的心理障碍、行为障碍以及认知障碍^[1]。目前全世界有超过 7 000 万的癫痫患者, 其中约三分之一为难治性癫痫^[2]。癫痫的反复发作、高病死率加重了癫痫患者的经济负担^[3]。神经元高度同步异常放电是癫痫发作的根本原因, 但具体的发病机制尚未明确。因此, 研究癫痫的发病机制, 寻找诊断和治疗癫痫的新方法尤为重要。环状 RNA (circular RNA, circRNA) 是一种闭环结构的非编码 RNA, 因其半衰期较长、表达稳定、不易降解等性质被广泛研究^[4], 其在脑组织中表达丰富, 在神经元功能中起着重要作用。据报道^[5], circRNA 与多发性硬化症、帕金森病、阿尔茨海默病等神经系统疾病有关, 然而, 由于癫痫发病的具体机制尚不明确, 且目前关于 circRNA 与癫痫的研究相对其他疾病开展的较少, 病变通路、作用靶点尚未明确。该研究旨在对癫痫患者及对照组进行基因芯片测序结果分析, 并对 circ_0017178 在癫痫中的作用机制进行生物信息学预测, 探究 circ_0017178 对戊四唑癫痫小鼠的行为学变化及海马细胞凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 主要材料 RNeasy Kit (美国安捷伦科技有限公司, 货号: DXT-74404)、TRIZOL (德国 themro, 货号: 15596026)、反转录试剂盒 (南京诺唯赞有限公司, 货号: R211-01/02)、Ficoll 淋巴细胞分离液 (北京索莱宝科技有限公司, 货号: P8610)、戊四唑 (美国 Sigma, 货号: P6500)、Tunel 细胞凋亡检测试剂盒 (上海翊圣生物科技有限公司, 货号: 40308ES60)、PBS 洗液 (上海源培生物科技有限公司, 货号: B390KJ)、人 circRNA 基因芯片 (美国安捷伦科技有限公司, 芯片 ID085202)、SureScan Dx 微阵列芯片扫描仪 (美

2023-09-24 接收

基金项目: 内蒙古自治区自然科学基金 (编号: 2020MS08073); 内蒙古自治区卫生计生科研计划项目 (编号: 201702130)

作者单位: ¹ 内蒙古科技大学包头医学院第一附属医院神经内科, 包头 014010

² 包头市职工健康休养中心, 包头 014040

³ 内蒙古科技大学包头医学院第三附属医院神经内科, 包头 014030

⁴ 内蒙古科技大学包头医学院研究生学院, 包头 014040

作者简介: 毛 戡, 男, 硕士研究生;

孙洪英, 女, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: sunhongying2004@sina.com

* 对本文具有同等贡献

国安捷伦科技有限公司,型号:G5791A),Agilent Bioanalyzer 2100(美国安捷伦科技有限公司,型号:2100),qubit3.0 定量仪(美国 Thermo,型号:Qubit 3.0 Nanodrop 2000),PCR 扩增仪(美国 ABI,型号:7500),脑立体定位仪(上海玉研仪器有限公司,型号:SA-103-3),荧光倒置显微镜(日本 Olympus,型号:IX73)。

1.2 基因芯片分析

1.2.1 病例资料 收集 2018 年 11 月—2019 年 3 月就诊于包头医学院第一附属医院癫痫门诊和病房以及包头市中心医院癫痫门诊的癫痫患者。纳入标准:符合 2017 年国际抗癫痫联盟癫痫发作和癫痫新分类标准^[6]。排除标准:①神经学检查或头颅磁共振发现颅内肿瘤、血管损伤或畸形以及癫痫发作相关的脑软化灶;②由头颅外伤、产伤或感染引发的癫痫;③患有精神系统疾病、其它神经系统遗传性或发作性疾病或存在明显的智力障碍;④3 代家属内发现存在明确的癫痫病史。按照病例组年龄、性别匹配包头医学院第一附属医院体检健康人群作为健康对照组。该研究已通过包头医学院第一附属医院的伦理委员会批准,所有研究对象在抽血前均签署知情同意书。

1.2.2 基因芯片测序 EDTA 管收集受试者外周静脉血 4 ml,依据 Ficoll 密度梯度离心法使用淋巴细胞分离液分离外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC),按照 TRIzol 试剂盒说明书提供的标准操作流程提取样品的总 RNA,并利用 NanoDrop ND-2000 定量检测纯度及浓度,使用 qubit3.0 荧光定量仪测定库浓度,应用 Agilent Bioanalyzer 2100 对 RNA 片段的大小进行精确测定和浓度定量,使用 Agilent Bioanalyzer 2100 系统软件检测总 RNA 的完整性,选取高质量的 RNA 样品用于后续芯片分析。应用人 circRNA 芯片鉴定差异性表达的 circRNA。按照反转录试剂盒说明进行标记和扩增。随后使用荧光染料 Cyanine-3-CTP(Cy3)进行标记,利用 Agilent Scanner 扫描得到原始图像。采用 Feature Extraction 软件(version12.0.3.1, Agilent Technologies)处理原始图像、提取原始数据;利用 Genespring 软件(version14.8, Agilent Technologies)进行数据的标准化和后续处理;使用火山图可视化两组之间的差异 circRNA,并进行分层聚类以显示样品之间可区分的 circRNA 表达模式。本部分由北京阅微基因技术有限公司完成。

1.3 生物信息学分析 使用 circPrimer 生信软

件^[7](www.bio-inf.cn/circPrimer)分析 circ_0017178 的组成及可能结合的腺苷酸 N6 位(N6-methyladenosine, m6A)的甲基化修饰位点、核糖体进入位点(internal ribosome entry site, IRES)和开放阅读框架(open reading frame, ORF)结合位点;使用 circMir 生物信息学软件(www.bio-inf.cn/circmir)自带的 miRANDA 工具和 RNAhybrid 工具分别预测 circ_0017178 可能结合的 miRNA,结果取交集得到的 miRNA 为 circ_0017178 可能结合的 miRNA;使用 TargetScan(http://www.targetscan.org/vert_80/)生物信息学网站,将 circMir 所得的 miRNA 与癫痫基因可能结合的位点进行预测,预测结果以 CWCS(cumulative weighted context ++ score)评分分数进行评估,以 CWCS 分数 < -0.1 为最低的要求标准,使用 Cytoscape 构建 circ_0017178 相关 miRNA 及相关癫痫基因生物信息网络图。

1.4 动物学实验

1.4.1 实验动物及分组 30 只 C57BL/6 雄性成年小鼠(下文简称小鼠),周龄为 12~13 周,中位年龄 12.5 周,平均体质量为 30~35 g,饲养环境温度(22±2)℃,湿度 50%~60%,光照暗室循环 12 h,自由食水,并且在进行实验前 1 周适应所生活的环境。本实验所涉及到关于动物的使用和护理都符合动物实验相关规定,并获得了动物伦理委员会的批准(伦理学批号:包医伦审动物 2021 第 031 号)。将小鼠随机分为 3 组:对照组、空载体腺病毒组(下文简称空载体组)、circ_0017178 过表达腺病毒组(下文简称过表达组),每组 10 只。

1.4.2 构建腺病毒载体并进行 qRT-PCR 检测

Circ_0017178 过表达的质粒由由华大基因公司构建,腺病毒载体由汉恒生物公司根据腺病毒操作手册说明书进行构建。9 只小鼠用来检测腺病毒载体的表达,随机分为对照组、空载体组、过表达组 3 组/组,分别向各组小鼠海马内注射生理盐水、空载体病毒载体、过表达腺病毒载体。1 周后使用实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(qRT-PCR)检测小鼠海马组织 circ_0017178 表达;参照 TRIzol 试剂说明书操作提取海马组织总 RNA,按照逆转录试剂盒说明书反转录,按照上面的反应体系进行 cDNA 的合成逆转录反应体系,PCR 仪中进行扩增,根据循环数阈值(cycle threshold, CT)值的结果,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 mRNA 的相对表达水平,引物序列见表 1。

1.4.3 颅内立体注射转染腺病毒载体 腹腔注射 0.4% 戊巴比妥钠麻醉 1.4.1 和 1.4.2 项的小鼠,使

表1 qRT-PCR 扩增引物序列表

引物名称	序列(5'→3')
GAPDH	F: TGA CTTCAACAGCGACACCCA R: CACCCTGTGTGCTAGCCAAA
circ_0017178	F: TCCTGGTAGATTGTGGAGCT R: GGCATAGGACAGAGGAGTGG

用前囟进行颅骨标志法定位:前囟和后囟处于水平,之间的间距大约0~0.1 mm,以前囟出为“0点”,前囟向嘴侧的方向为“+”,向尾侧的方向为“-”。使用脑立体定位仪固定小鼠头部,剪去头部毛发后消毒,沿矢状缝切开3 cm的创口,缓慢分离皮下的相关组织,暴露小鼠的前囟、人字缝及矢状缝。将金属定位针置于矢状缝上方,定位针前囟确定标准中线后在前囟后方2 mm,矢状缝旁开2.5 mm处定位,即为海马平面所在位置。钻孔针颅骨钻孔后于下降2 mm处对双侧海马各注射1 μ l的腺病毒液体,对照组注射等量的生理盐水。缝合皮下组织和头皮,对齐组织,用酒精对创口消毒。染毒后恢复1周,将1.4.2小鼠进行qRT-PCR检测circ_0017178的表达验证腺病毒构建情况,将1.4.1项小鼠用来构建戊四唑癫痫模型及检测海马组织细胞凋亡的情况。

1.4.4 构建戊四氮癫痫小鼠模型 用0.9%生理盐水溶液将戊四氮配成100 mg/ml,每天上午9时到12时按照35 mg/kg对1.4.1项小鼠经腹腔给予戊四唑(pentylenetetrazole, PTZ)注射,持续21 d,每次注射完PTZ后0.5 h内记录小鼠行为变化,按照癫痫发作程度的Racine评分^[8]评估,具体的动物行为学观察内容包括:①潜伏期:首次达到Racine 4级及以上的天数;②发作频率:每次注射PTZ后癫痫小鼠的发作次数;③发作时间:每次注射PTZ后癫痫小鼠的发作时间。

1.4.5 Tunel染色法检测海马组织细胞凋亡情况

腹腔注射50 mg/kg苯巴比妥钠麻醉1.4.1项分组小鼠,安乐死后提取海马组织制备切片。按照Tunel细胞凋亡检验试剂盒说明书对海马组织切片进行Tunel染色,使用荧光显微镜对样本的海马组织CA1区细胞凋亡情况进行检测分析计数。

1.5 统计学处理 芯片数据利用差异倍数及 t 检验的 P 值进行差异circRNA的筛选:上调或者下调差异倍数 ≥ 2.0 且 P 值 < 0.05 为有生物学重复性,上调或者下调差异倍数 < 2 无生物学重复性;动物实验正态分布计量资料以平均值 $\pm$ 标准差表示,不符合正态分布或方差不齐数据采用 $M(P_{25}, P_{75})$ 来表示;采用Levene检验方差齐性,方差齐则使用独立样本 t 检验进行两组间比较;数据不符合正态分布或方差不齐时使用秩和检验进行两组间比较;计数资料使用卡方检验进行两组之间的比较。分别使用SPSS 25.0、GraphPad Prism 8.0软件进行统计分析和做统计图, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 病例临床一般资料 本研究纳入癫痫组(EP)和正常对照组(NC)受试者各3例,3组受试者按照病例组的年龄、性别匹配选出,一般临床资料见表2。

2.2 基因芯片分析结果

2.2.1 总RNA质量 经qubit3.0定量仪检测两组总RNA的纯度和浓度,按照质量检测标准,A260/A280比值1.8~2.1则符合circRNA芯片实验要求;Agilent2100生物分析RIN ≥ 7 则样品RNA完整性良好。该研究癫痫组和对照组所有样本RNA质量符合后续circRNA芯片实验的要求,见表3。

2.2.2 circRNA表达谱分析结果 circRNA在癫痫组和对照组中表达倍数变化及统计学显著程度以火

表2 病例临床一般资料

ID	性别	年龄	起病时间(岁)	发作形式	头颅核磁	抗癫痫药物	用药时间(年)	发作频率(次/年)
EP1	男	27	25	局灶起源伴意识受损	阴性	卡马西平	2	1~2
EP2	男	26	25	局灶起源伴意识受损	阴性	卡马西平	1	1~2
EP3	女	22	19	局灶起源伴意识受损	阴性	卡马西平	3	1~2
NC1	男	25			阴性			
NC2	男	22			阴性			
NC3	女	21			阴性			

表3 癫痫组和对照组的总RNA质检结果

样本	浓度(g/L)	A260/A280值	RIN值	结果
癫痫组	0.878	2.05	9.6	合格
对照组	1.225	2.04	9.5	合格

表4 癫痫组与对照组相比显著上调的6条差异 circRNA

探针型号	circRNA 名称	差异倍数	P 值	来源基因	染色体
CUST_66946_PI438085371	hsa_circ_0069272	518.52	0.01	NCAPG	chr4
CUST_70948_PI438085371	hsa_circ_0073442	276.53	0.04	RHOBTB3	chr5
CUST_32316_PI438085371	hsa_circ_0033065	217.44	0.03	IFI27	Chr14
CUST_32314_PI438085371	hsa_circ_0033063	111.59	0.04	IFI27	Chr14
CUST_17018_PI438085371	hsa_circ_0017178	100.49	0.03	CHRM3	Chr1
CUST_47914_PI438085371	hsa_circ_0049415	97.57	0.04	DOCK6	Chr19

表5 癫痫组与对照组相比显著下调的3条差异 circRNA

探针型号	circRNA 名称	Log2 差异倍数	P 值	来源基因	染色体
CUST_80798_PI438085371	hsa_circ_0083773	-7.07	0.03	SCARA3	Chr8
CUST_85121_PI438085371	hsa_circ_0088262	-6.68	0.03	ASTN2	Chr9
CUST_16263_PI438085371	hsa_circ_0016393	-6.42	0.04	SCARA3	Chr1

山图呈现(图1A),根据 circRNA 表达水平的不同,经过图像采集和数据分析后筛选得差异 circRNA (图1B)。与健康对照组对比,癫痫组差异性表达的 circRNA 共 21 988 条,上调的 circRNA 11 488 条,下调的共 10 500 条;上调的 circRNA 中有 6 条(circ_0069272、circ_0073442、circ_0033065、circ_0033063、circ_0017178、circ_0049415)有生物学重复性(表4);下调的 circRNA 中有 3 条(circ_0083773、circ_0088262、circ_0016393)有生物学重复性(表5);9 条有生物学重复性的环状 RNA 中, circ_0017178 的来源基因 CHRM3 与癫痫易感性有关。因此,接下来对 circ_0017178 进行生物信息学分析,并在动物实验中对 circ_0017178 与癫痫的关系展开研究。

2.3 生物信息学分析结果

2.3.1 CircPrimer 生物信息学软件分析结果 如图2所示, circ_0017178 是 CHRM3 基因的表达产物,由 CHRM3 的外显子 exon8 聚合形成的外显子型环状 RNA,含有 127 个碱基序列。使用“DEACH”功能发现 circ_0017178 可能结合的 m6A 甲基化位点一共有 3 个(表6),使用“高度匹配”功能发现 circ_0017178 可能结合的 m6A 甲基化位点为 1 个,位置位于 27 号位点,同时, circ_0017178 具备 1 个 ORF1 和 IRES 的潜在结合位点。

表6 ORF 与 m6A 结合位点信息

位置	片段	序列
27	TGACA	CTGGTCTCTTGGGCAGCCTGACATCTGGTCCACTCCTCTGT
68	TGACC	CCTATGCCGGGATCATCATGACCGTAGAGATTATGTCACGT
109	TAACT	TTTTCATCCTTGTTACATAACTCAGTTCCTGCTAGATTGT

2.3.2 CircMir 生物信息学软件分析结果 circMir 生物信息学软件分析 circ_0017178 可能结合的

miRNA 显示 circ_0017178 可能结合 51 个 miRNA, RNAhybird 工具分析显示 circ_0017178 可能结合 299 个 miRNA,取交集共有 26 个 miRNA。分别为: miR-363-5p、miR-3681-5p、miR-4298、miR-433-3p、miR-4433b-3p、miR-4436b-3p、miR-4475、miR-4651、miR-4740-3p、miR-4776-5p、miR-4786-5p、miR-4800-5p、miR-584-3p、miR-656-5p、miR-665、miR-6735-5p、

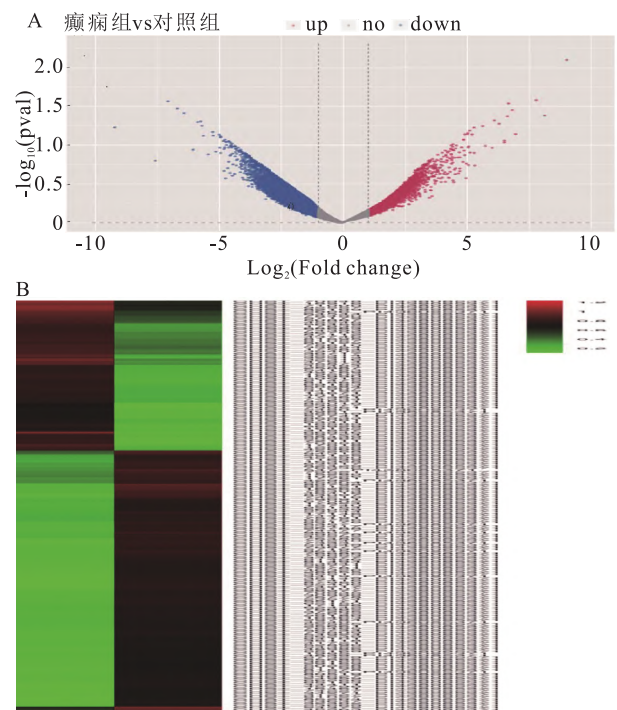


图1 癫痫组和对照组环状 RNA 差异倍数火山图和 RNA 聚类图

图1A 中横坐标代表 circRNA 在两组中表达倍数变化,纵坐标代表 circRNA 表达量变化的统计学显著程度,散点代表各个 circRNA,灰色圆点表示无显著性差异,红色圆点表示上调,蓝色圆点表示下调;图1B 中左半部分为癫痫组,右半部分为对照组,红色代表相对高表达,绿色代表相对低表达

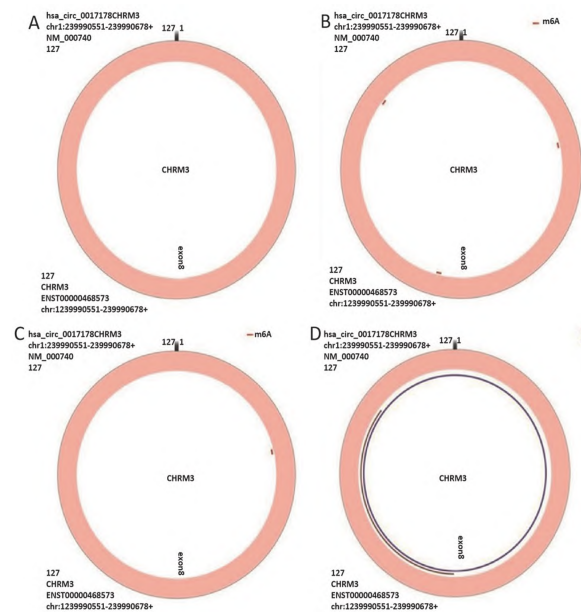


图2 CircPrimer 对 circ_0017178 的生物信息学分析图

A: 环状 RNA 结构特点; B、C: m6A 甲基化结合位点; D: ORF1 和 IRES 结合位点

miR-6736-3p、miR-6782-5p、miR-6847-5p、miR-6879-5p、miR-8071、miR-877-5p、miR-4632-5p、miR-6738-5p、miR-184、miR-4726-5p。见图 3。

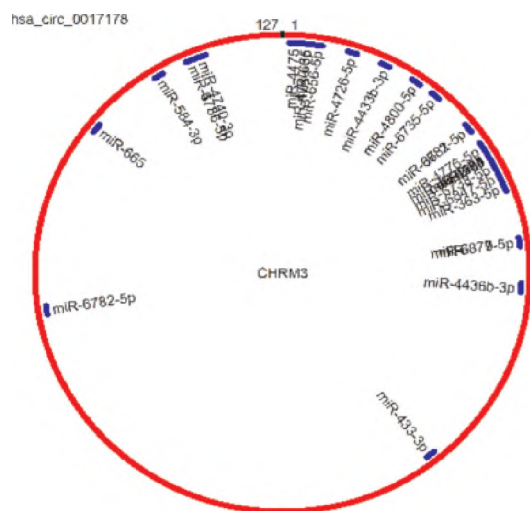


图3 CircMir 对 circ_0017178 的生物信息学分析结果图

2.3.3 TargetScan 生物信息学网站预测 将 26 个 miRNA 与癫痫相关基因运用 TargetScan, 将取得的结果以 CWCS < -0.1 分为条件, 6 个 miRNA (miR-4632-5p、miR-6738-5p、miR-184、miR-4726-5p、miR-877-5p、miR-433-3p) 没有找到符合条件的癫痫基因, 另外 20 个 miRNA 可以交互匹配到 39 个癫痫

基因, 共 96 条路线参与构成生物信息学网络。见图 4。

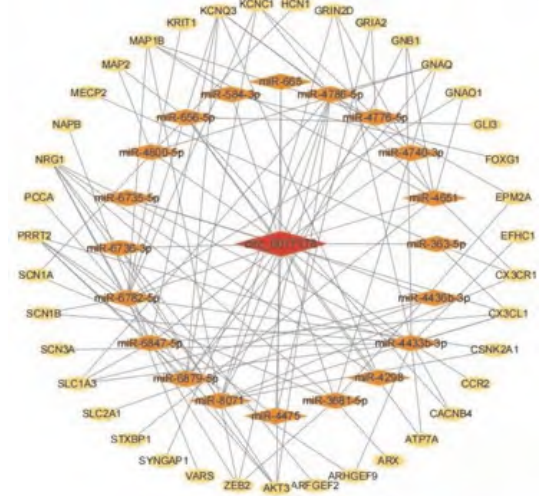


图4 生物信息学预测得到的 circ_0017178 调控癫痫基因网络图

2.4 Circ_0017178 对癫痫小鼠的影响

2.4.1 qRT-PCR 法检测 circ_0017178 过表达腺病毒载体水平 1.4.2 小鼠在对照组和空载体组中, 未检测出 circ_0017178 的表达; 在 circ_0017178 过表达组海马组织中, 内参平均 CT 值为 16.43, circ_0017178 的平均 CT 值为 24.54, 表明 circ_0017178 腺病毒载体构建成功。

2.4.2 Circ_0017178 对癫痫小鼠生物行为学变化的影响 1.4.1 小鼠构建 PTZ 癫痫模型过程中, 对照组小鼠死亡 1 只, 9 只小鼠成功构建 PTZ 癫痫模型; 空载体组 C57BL/6 小鼠死亡 2 只, 8 只小鼠成功构建 PTZ 癫痫模型; 过表达 circ_0017178 组 C57BL/6 小鼠死亡 2 只, 8 只小鼠成功构建 PTZ 癫痫模型。三组小鼠的潜伏期、发作时间、发作次数均符合计量资料正态分布, 且方差齐 ($P > 0.05$)。与对照组及空载体组相比, circ_0017178 过表达组癫痫的潜伏期明显缩短 ($t = 12.78, 13.39$, 均 $P < 0.05$)、发作时间明显延长 ($t = 12.86, 10.88$, 均 $P < 0.05$)、发作次数明显增加 ($t = 8.92, 6.79$, 均 $P < 0.05$); 空载体组及对照组间无差异。结果见图 5。

2.4.3 Circ_0017178 对癫痫小鼠海马组织细胞凋亡的影响 在 1.4.1 中对照组、空载体组、过表达组三组癫痫小鼠海马 CA1 区中可见红色荧光信号 (红光代表细胞凋亡), 相比于对照组和空载体组, 过表达组海马组织 CA1 区荧光信号更强。见图 6A。采取图像分析计数, 卡方检验结果显示空载体组和对照组之间细胞凋亡率差异无统计学意义 ($\chi^2 = 0.66$,

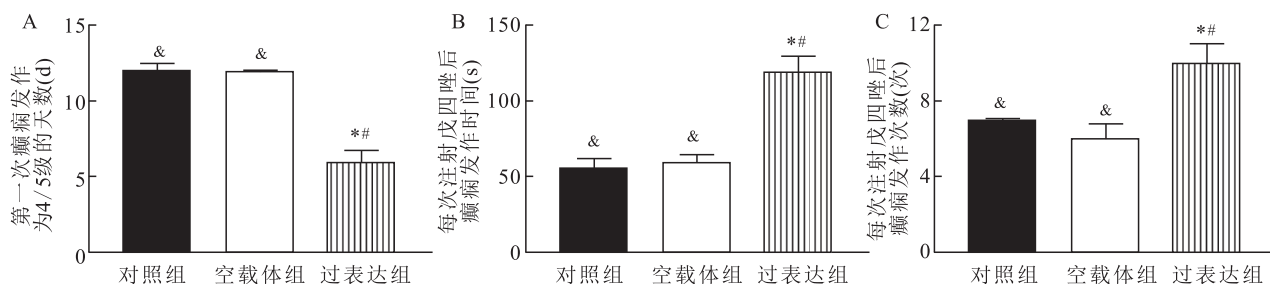


图5 各组癫痫小鼠动物行为学结果统计分析图

A: 各组小鼠癫痫发作的潜伏期; B: 各组小鼠癫痫发作的时间; C: 各组小鼠癫痫发作的频率; 与对照组比较: * $P < 0.05$; 与空载体组比较: # $P < 0.05$; 与过表达组比较: & $P < 0.05$

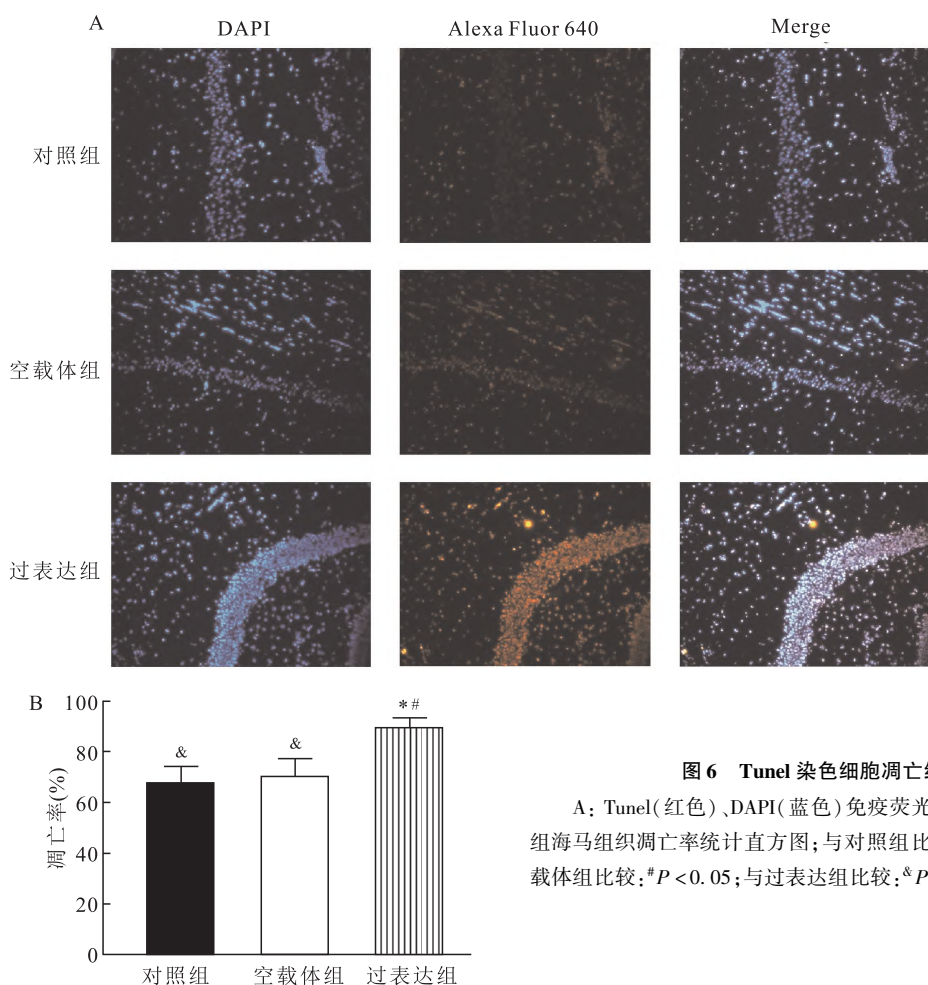


图6 TUNEL 染色细胞凋亡结果

A: TUNEL(红色)、DAPI(蓝色)免疫荧光共染图 $\times 100$; B: 各组海马组织凋亡率统计直方图; 与对照组比较: * $P < 0.05$; 与空载体组比较: # $P < 0.05$; 与过表达组比较: & $P < 0.05$

$P > 0.05$), 过表达组的细胞凋亡率明显高于对照组和空载体组 ($\chi^2 = 49.38, 41.11$, 均 $P < 0.05$)。见图 6B。表明, 相比于空载体组和对照组, Circ_0017178 过表达组海马组织 CA1 区细胞凋亡更严重。

3 讨论

CircRNA 在疾病中的功能是结合 miRNA 以“分子海绵”发挥作用, 此外, 还具备吸附蛋白、调控其

它基因转录、干扰其它基因剪接、翻译多肽、作为生物学标记物等多种功能^[9], 目前 circRNA 在癫痫中的研究很少。本研究结果表明 circ_0017178 与癫痫密切相关。

circRNA 发挥功能与其来源的位置密不可分, circRNA 根据其来源分为外显子 circRNA、内显子 circRNA 以及外显子-内显子混合的 circRNA。外显子 circRNA 在细胞质中稳定表达, 可以与 miRNA

或 RNA 结合蛋白相互作用,甚至包绕具备翻译起始密码子的区域,可能在基因表达和翻译中发挥调节作用^[10]。相比之下,内显子 circRNA 更多位于细胞核中,受其他因素干扰较小,表达稳定^[11]。外显子-内含子 circRNA 同时具有外显子和内含子 circRNA 特征。本研究通过 circPrimer 生物信息学软件分析发现 circ_0017178 为外显子型 circRNA,其可能具备“分子海绵”的功能结合 miRNA 调节癫痫基因的表达在癫痫中发挥作用。本研究结果显示 circ_0017178 可能结合的 miRNA 共有 26 个,运用 TargetScan 匹配发现其中 20 个 miRNA 匹配到 39 个癫痫基因,共 96 条 ceRNA 通路。

本研究显示 circ_0017178 在结构上不仅具备 m6A 甲基化的位点,还具备与 ORF1、IRES 结合的位点。研究^[12]表明 m6A 修饰会影响 circRNA 的发生、翻译、降解和细胞定位,在 circRNA 的代谢过程中起到生理或病理生理调节作用。m6A 可能促进 circRNA 的翻译能力^[13]。IRES、ORF 和 m6A 修饰三个基本元素赋予 circRNA 编码蛋白质的独特能力,从而具备翻译的潜力^[12]。因此 circ_0017178 的具备的 m6A 结合位点可能通过表观遗传学在癫痫中发挥作用,circ_0017178 甚至还具备翻译的潜能。

研究表明^[14] circRNA 可能通过影响神经元凋亡过程从而对癫痫产生影响。细胞凋亡是一种细胞程序性的死亡,受到严格的程序性生物控制。细胞凋亡有利于维持多细胞生物组织和器官的完整性和平衡性,使机体更容易适应体内不断变化的环境,对生物具有特殊的意义^[15]。本研究癫痫小鼠体内实验发现 circ_0017178 过表达后可以更加快速地诱发癫痫发作,以及加重癫痫的严重程度,同时利用 Tunel 染色观察到过表达 circ_0017178 后加剧了癫痫小鼠海马组织的凋亡程度,这表明 circ_0017178 可能通过促进细胞凋亡参与癫痫的发生和发展。

本研究亦存在不足,如仅运用 PTZ 癫痫模型进行了实验,仅运用 Tunel 染色验证细胞凋亡,因此在后期实验中将设计实验构建其他癫痫模型进行重复实验,同时用检测 Capase-3、死亡受体等方式多维度对细胞凋亡进行研究;生物信息学方面,将进一步探究 circRNA-miRNA-mRNA 的相互关系。随着生物学技术的发展和 circ RNA 研究的不断深入,未来将更深刻的了解 circRNA 与癫痫的关系,为癫痫防治

提供新的方法,为治疗策略及新药研发开辟新的切入点。

参考文献

- [1] Fisher R S, Acevedo C, Arzimanoglou A, et al. ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy [J]. Epilepsia, 2014, 55(4): 475-82.
- [2] Kalilani L, Sun X, Pelgrims B, et al. The epidemiology of drug-resistant epilepsy: a systematic review and meta-analysis [J]. Epilepsia, 2018, 59(12): 2179-93.
- [3] 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): 512-21.
- [4] Auferio S, Reckman Y J, Pinto Y M, et al. Circular RNAs open a new chapter in cardiovascular biology [J]. Nat Rev Cardiol, 2019, 16(8): 503-14.
- [5] 武世萍, 俞 坤, 王满侠. 环状 RNA 的生物学功能及其与中枢神经系统疾病关系的研究进展 [J]. 中国生物制品学杂志, 2022, 35(3): 356-62.
- [6] Fisher R S, Cross J H, French J A, et al. Operational classification of seizure types by the international league against epilepsy: position paper of the ILAE commission for classification and terminology [J]. Epilepsia, 2017, 58(4): 522-30.
- [7] Zhong S, Wang J, Zhang Q, et al. CircPrimer: a software for annotating circRNAs and determining the specificity of circRNA primers [J]. BMC Bioinform, 2018, 19(1): 292.
- [8] Racine R, Okujava V, Chipashvili S. Modification of seizure activity by electrical stimulation. 3. mechanisms [J]. Electroencephalogr Clin Neurophysiol, 1972, 32(3): 295-9.
- [9] Li X, Yang L, Chen L L. The biogenesis, functions, and challenges of circular RNAs [J]. Mol Cell, 2018, 71(3): 428-42.
- [10] Li J, Lin H, Sun Z, et al. High-throughput data of circular RNA profiles in human temporal cortex tissue reveals novel insights into temporal lobe epilepsy [J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 45(2): 677-91.
- [11] Li Z, Huang C, Bao C, et al. Corrigendum: exon-intron circular RNAs regulate transcription in the nucleus [J]. Nat Struct Mol Biol, 2017, 24(2): 194.
- [12] Lan Q, Liu P Y, Haase J, et al. The critical role of RNA M6A methylation in cancer [J]. Cancer Res, 2019, 79(7): 1285-92.
- [13] Yang Y, Fan X, Mao M, et al. Extensive translation of circular RNAs driven by N6-methyladenosine [J]. Cell Res, 2017, 27(5): 626-41.
- [14] Lin Q, Chen J, Zheng X, et al. Circular RNA Circ_ANKMY2 regulates temporal lobe epilepsy progression via the miR-106b-5p/FOXPI Axis [J]. Neurochem Res. 2020, (12): 3034-44.
- [15] 高 振, 翁 柠. 细胞程序化死亡在癫痫发生过程中的机制研究 [J]. 癫痫杂志, 2021, 7(2): 152-8.

Effect of circ RNA_0017178 on a mouse model of epilepsy induced by pentatetrazide

Mao Jian¹, Wen Pingping², Sun Hongying¹, Zhang Shuya^{3,4}, Meng Chenxi⁴, Zhang Jia¹

(¹Dept of Neurology, The First Affiliated Hospital of Baotou Medical College, Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou 014010; ²Baotou Staff Health Rest Center, Baotou 014040;

³Dept of Neurology, The Third Affiliated Hospital of Baotou Medical College, Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou 014030; ⁴Graduate School, Baotou Medical College, Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou 014040)

Abstract Objective To investigate the possible mechanism of circ RNA in the pathogenesis of epilepsy. **Methods**

In this study, circRNA expression profiles in peripheral venous blood of epileptic patients and healthy controls were studied by using circRNA gene chip technology, and differentially expressed circRNAs were screened. Bioinformatics databases such as circPrimer, circMir and TargetScan were used to analyze its possible role in epilepsy and adenovirus vector was constructed. Thirty male adult C57BL/6 mice were randomly divided into control group, empty vector group and circ_0017178 overexpressed group (10 mice/group). Normal saline, empty plasmid adenovirus vector and circ_0017178 overexpressed adenovirus vector were injected into the hippocampus of the three groups respectively. The change of animal behavior of mice in each group was observed after the establishment of pentetrazole epilepsy model, and the apoptosis of hippocampal tissue cells of mice in each group was analyzed by TUNEL staining. **Results** The results of gene microarray showed that circ_0069272, circ_0033065, circ_0017178, circ_0073442, circ_0033063 and circ_0049415 in epilepsy group were up-regulated significantly compared with the control group. And circ_0083773, circ_0088262, circ_0016396 decreased significantly. Circ_0017178 might be the most associated with epilepsy. Through bioanalysis, circ_0017178 might regulate 39 epilepsy genes by combining 20 miRNA and possess potential m6A, IRES and ORF1 binding sites. In the experiment of pentetrazole epileptic mice, compared with the empty carrier group and the control group, the latency period of epilepsy in the circ_0017178 overexpression group was shortened ($P < 0.05$), the seizure time was prolonged ($P < 0.05$), and the seizure frequency increased ($P < 0.05$). There was no statistical significance between the empty carrier group and the control group ($P > 0.05$). In animal experiments, compared with the empty vector group and the control group, the apoptosis degree of hippocampal tissue of epileptic mice in the circ_0017178 overexpression group significantly increased ($P < 0.05$), but there was no statistical significance between the empty vector group and the control group ($P > 0.05$). **Conclusion** Circ_0017178 significantly increases in the expression profile of peripheral blood mononuclear cells in patients with epilepsy, which may act as a "molecular sponge" of miRNA in epilepsy and has the potential of m6A methylation and protein translation. Circ_0017178 may increase the susceptibility and severity of epilepsy by promoting apoptosis in pentetrazole epileptic mice.

Key words circ_0017178; epilepsy; differential expression; bioinformatics analysis; apoptosis