· 基础研究 ·

miR-873-5p 靶向调控 VDAC1 保护大鼠癫痫样神经细胞的作用机制探讨

高永强[1]　董燕[1]　程欣[2]　程明高[1]　许文静[1]　郎永斌[1]　王军[1]
[1]郑州大学第三附属医院儿童康复科,郑州　450052; [2]河南省人民医院,郑州　450003
通信作者:王军,Email:wj3028@163.com

【摘要】 **目的**　研究微 RNA-873-5p(miR-873-5p)靶向调控电压依赖性阴离子通道 1(VDAC1)对大鼠癫痫样神经细胞的影响及作用机制。**方法**　通过无镁培养基诱导构建大鼠癫痫样海马神经细胞模型,将大鼠神经细胞分为对照组、模型组、miR-con 组及 miR-873-5p 组。对照组采用正常培养大鼠神经细胞;模型组采用低镁细胞外液培养大鼠神经细胞;miR-con 组采用低镁细胞外液培养大鼠神经细胞并转染 miR-con;miR-873-5p 组采用低镁细胞外液培养大鼠神经细胞并转染 miR-873-5p。采用荧光定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)检测各组神经细胞 miR-873-5p 及 VDAC1 mRNA 表达;采用 Western blot 技术检测神经细胞中 VDAC1、B 细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)、活化的含半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶 3(Cleaved caspase-3)含量;采用 DCFH-DA 荧光探针检测神经细胞活性氧(ROS)水平;采用硫代巴比妥酸法检测神经细胞丙二醛(MDA)含量;采用酶联免疫吸附实验(ELISA)检测神经细胞谷胱甘肽(GSH)含量;采用流式细胞术检测各组神经细胞凋亡情况;采用双荧光素酶报告基因法验证 miR-873-5p 对 VDAC1 的靶向调控作用。**结果**　与对照组比较,模型组神经细胞中 miR-873-5p 表达显著降低($P<0.05$),VDAC1 表达显著升高($P<0.05$),Bcl-2 表达下调($P<0.05$),Bax 及 Cleaved caspase-3 表达上调($P<0.05$),GSH 及 MDA 含量显著降低($P<0.05$),而 ROS 水平显著升高($P<0.05$),细胞凋亡率显著升高($P<0.05$);与 miR-con 组比较,miR-873-5p 组神经细胞中 Bcl-2 表达明显上调($P<0.05$),Bax 及 Cleaved caspase-3 表达明显下调($P<0.05$),GSH 及 MDA 含量显著升高($P<0.05$),ROS 水平显著降低($P<0.05$),细胞凋亡率明显降低($P<0.05$);双荧光素酶报告基因实验表明 miR-873-5p 能抑制 VDAC1 表达($P<0.05$)。**结论**　miR-873-5p 能通过负向调控靶基因 VDAC1 表达而减少神经细胞凋亡,同时还能抑制神经细胞氧化应激反应,对受损神经细胞具有保护作用。

【关键词】 miR-873-5p;　电压依赖性阴离子通道 1;　癫痫;　神经细胞损伤
基金项目:河南省教育厅科技计划项目(20B320030;14A320004)
DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2021.02.002

miR-873-5p micro-RNA protects neurons damaged by epilepsy by regulating voltage-dependent anion channel protein 1

Gao Yongqiang[1], Dong Yan[1], Cheng Xin[2], Cheng Minggao[1], Xu Wenjing[1], Lang Yongbin[1], Wang Jun[1]
[1]Department of Children's Rehabilitation, Third Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China; [2]Henan Provincial People's Hospital, Zhengzhou 450052, China
Corresponding author: Wang Jun, Email: wj3028@163.com

【**Abstract**】 **Objective**　To explore the regulatory effect of miR-873-5p micro-RNA targeting voltage-dependent anion channel protein 1 (VDAC1) in neurons and its mechanism. **Methods**　Murine nerve cells were randomly divided in vitro into a control group, a model group, a mimetic negative carrier (miR-con) group and an miR-873-5p group. The epileptiform hippocampal nerve cell model was induced in all of the cells except those in the control group using magnesium-free medium. The control group was normally cultured, while the miR-con and miR-873-5p groups were transfected with miR control and miR-873-5p RNA respectively. Real-time fluorescent quantitative polymerase chain reactions were used to detect the expression of miR-873-5p and VDAC1 mRNA. Western blotting was employed to detect VDAC1, B-cell lymphoma/leukemia-2 protein (Bcl-2), Bcl-2 associated X protein (Bax) and cleared caspase-3 in the neurons. The levels of reactive oxygen species (ROS), malondialdehyde (MDA) and glutathione (GSH) were measured using the DCFH-DA fluorescent probe, the thiobarbituric acid method and enzyme-linked immunosorbent assay respectively. Any apoptosis was detected using flow cytometry, while the targeting of miR-873-5p on VDAC1 was verified using the double fluorescence zymase reporter gene

method. **Results** Compared with the control group, a significant decrease in the average expression of miR-873-5p, Bcl-2 and in GSH and MDA levels was observed in the model group, but there was a significant increase in the average level of VDAC1, Bax, cleaved caspase-3 and ROS and in the rate of apoptosis. Compared with the miR-con group, a significant decrease in the average expression of Bax, cleaved caspase-3, ROS and in the apoptosis rate was observed in the miR-873-5p group, but there was a significant increase in the average level of Bcl-2, GSH and MDA. Moreover, it was verified that miR-873-5p reduced the expression of VDAC1. **Conclusion** miR-873-5p protects damaged neurons by inhibiting their apoptosis through negatively regulating the target gene VDAC1 and the oxidative stress response.

【Key words】 miR-873-5p micro-RNA; Voltage-dependent anion channel protein 1; Epilepsy; Nerve cell injury

Funding: Henan Province Education Commission Science and Technology Plan Project (20B320030 and 14A320004)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2021.02.002

癫痫(epilepsy)是一种常见的中枢神经系统慢性疾病,目前全球范围内癫痫患者约有 5000 万,其中我国约有 900 万[1]。当前临床针对癫痫的治疗手段主要是抗癫痫药物,但药物治疗会有不良反应且患者依从性较差,临床治疗疗效不佳[2];同时癫痫由于长期反复发作特点,严重影响患者日常工作及生活,因此如何提高癫痫治疗效果具有重要意义。微小 RNA(microRNA,miRNA)是一类广泛存在于真核生物体内且长度为18~25 nt 的高度保守非编码小 RNA,可结合形成 RNA 诱导沉默复合体(RNA-induced silencing complex,RISC),进而切割、降解靶基因 mRNA 或抑制其翻译,在生命活动中具有广泛调控作用[3-4]。已有报道发现 miRNA 与癫痫发生、发展密切相关[5],因此探讨miRNA与癫痫的关系、找寻 miRNA 作用的潜在靶点对癫痫诊断及治疗十分重要。miR-873-5p 最初是通过微阵列技术在人类子宫肌层中发现,且催产素可上调 miR-873-5p 表达[6]。Shi 等[7]研究发现人参皂苷 Rg1 和苦参根可促进阿尔茨海默病患者 miR-873-5p 表达从而抑制神经细胞凋亡;但关于 miR-873-5p 与癫痫发生、发展的关系则鲜见报道。

电压依赖性阴离子通道 1(voltage-dependent anion channel 1,VDAC1)位于线粒体外膜,是线粒体与外界发生关系的第一道门,线粒体依赖性凋亡相关因子首先与 VDAC 接触,因此它也是调节细胞凋亡的关键蛋白,VDAC1 作为其最丰富的亚型,在癫痫大鼠海马中表达显著增加[8]。

本研究经在线靶基因预测软件发现 miR-873-5p 与 VDAC1 间可能存在靶向结合位点,通过体外构建大鼠癫痫样神经细胞模型,进一步分析 miR-873-5p 及 VDAC1 对癫痫模型大鼠神经细胞凋亡及氧化应激的影响,以期为癫痫的发病机制及治疗研究提供参考资料。

材料与方法

一、材料与试剂

大鼠神经细胞购自上海康朗生物科技有限公司;胎牛血清、RPMI 1640 培养基、胰蛋白酶均购自美国 Sigma 公司;Trizol 试剂、反转录试剂盒、荧光定量试剂盒购自日本 TaKaRa 公司;引物购自上海生工有限公司;牛血清白蛋白(bovine serum albumin,BCA)试剂盒、细胞裂解液、Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒购自碧云天生物技术研究所;LipofectamineTM 2000 转染试剂购自美国 Invitrogen 公司;电压依赖性阴离子通道 1、B 细胞淋巴瘤/白血病-2(B cell lymphoma/lewkmia-2,Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2 associated X protein,Bax)、活化的含半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶 3(cleaved cysteinyl aspartate specific proteinase 3,Cleaved caspase-3)、β-肌动蛋白(β-actin)抗体购自美国 Santa Cruz 公司,辣根过氧化物酶标记二抗购自北京中杉金桥有限公司;活性氧(reactive oxygen species,ROS)检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所;谷胱甘肽(glutathione, GSH)、丙二醛(malondialdehyde,MDA)、酶联免疫吸附测定(enzyme linked immunosorbent assay,ELISA)试剂盒均购自上海江莱生物科技有限公司;双荧光素酶报告基因检测试剂盒购自美国 Promega 公司。

二、大鼠神经细胞癫痫模型构建及分组

将大鼠神经细胞在正常维持液内培养 14 d 后弃掉原维持液,并用低镁细胞外液清洗,后用低镁细胞外液培养(每孔 2 ml),于培养箱内培养 3 h 后用正常细胞外液清洗 2 遍,然后在正常维持液(每孔加入 2 ml)中继续培养至第 14 天,终止培养用于后续实验,构建大鼠神经细胞癫痫模型[9]。

将大鼠神经细胞分为对照组、模型组、miR-con 组及 miR-873-5p 组。对照组正常培养大鼠神经细胞;模

型组采用低镁细胞外液培养大鼠神经细胞;miR-con 组采用低镁细胞外液培养大鼠神经细胞并转染 miR-con;miR-873-5p 组采用低镁细胞外液培养大鼠神经细胞并转染 miR-873-5p。

三、qRT-PCR 检测 miR-873-5p 及 VDAC1 mRNA 表达水平

收集适量对照组、模型组、miR-con 组及 miR-873-5p 组大鼠神经细胞,充分研磨后加入 Trizol 裂解细胞,参照 RNA 抽提试剂盒说明书进行操作。经检测 RNA 纯度及浓度合格后,按照荧光定量试剂盒说明书检测 miR-873-5p 和 VDAC1 mRNA 表达水平。miR-873-5p 上游引物序列:5′-CTGCACTCCCCCACCTG-3′,下游引物序列:5′-GTGCAGGGTCCGAGGT -3′;U6 上游引物序列:5′-CTCGCTTCGGCAGCACA-3′,下游引物序列:5′-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3′;VDAC1 上游引物序列:5′-GACTGCTGTCAATCTCGCCT-3′,下游引物序列:5′-GGAGTTGTTCACTTTGGCCG-3′;内参 β-actin 上游引物序列:5′-CTCCATCCTGGCCTCGCTGT-3′,下游引物序列:5′-GCTGTCACCTTCACCGTTCC-3′。相对表达量采用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$法计算。

四、Western blot 法检测 VDAC1、Bcl-2、Bax、Cleaved caspase-3 蛋白表达

收集适量对照组、模型组、miR-con 组及 miR-873-5p 组大鼠神经细胞,加入蛋白裂解液裂解细胞后离心提取总蛋白,参照 BCA 法试剂盒说明书对蛋白进行定量操作。蛋白样品经聚丙烯酰胺凝胶(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis,SDS-PAGE)电泳后转至聚偏二氟乙烯膜(polyvinylidene fluoride,PVDF)膜上,封闭液封闭 2 h,一抗 4 ℃孵育过夜,经三羟甲基氨基甲烷盐缓冲液(tris-buffered saline with tween-20,TBST)洗膜后二抗(辣根过氧化物酶标记)室温孵育 1 h,经 TBST 洗膜后加入显影混合液显影。以 β-actin 为内参,应用凝胶成像系统分析 VDAC1、Bcl-2、Bax、Cleaved caspase-3 蛋白条带灰度值。

五、大鼠神经细胞活性氧水平检测

将对照组、模型组、miR-con 组及 miR-873-5p 组神经细胞于室温条件下避光孵育 24 h,然后分别加入 DCFH-DA 探针标记进行检测,操作过程参照 ROS 检测试剂盒说明书,以平均荧光强度(mean fluorescence intensity,MFI)表示 ROS 生成水平。

六、ELISA 法检测 GSH 及 MDA 含量

收集对照组、模型组、miR-con 组及 miR-873-5p 组适量细胞,加入胰蛋白酶消化细胞,经 3000 r/min(4 ℃)离心 10 min 后,吸取上清液 1 ml 用于检测,采用 ELISA 法检测 GSH 及 MDA 含量,进而根据曲线方程计算样本中 GSH 及 MDA 浓度值。

七、流式细胞术检测细胞凋亡

收集对照组、模型组、miR-con 组及 miR-873-5p 组适量细胞,加入胰蛋白酶进行消化,经磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution,PBS)冲洗 2 次后,调整细胞密度至 2×10^6 个/ml,经 1000 r/min(4 ℃)离心 10 min后收集细胞备用。向收集的细胞中加入 1 ml 预冷的 PBS 冲洗细胞 2 次,再加入 200 μl Binding Buffer 重悬细胞,然后依次加入 5 μl FITC 标记的 Annexin V(Annexin V-FITC)与碘化丙啶,充分混匀,室温下避光孵育 15 min,再加入 300 μl Binding Buffer,利用流式细胞仪检测各组神经细胞凋亡情况。

八、双荧光素酶报告基因实验

构建 VDAC1 野生型和 VDAC1 突变型基因表达载体 VDAC1-WT 和 VDAC1-MUT,然后分别与 miR-con 和 miR-873-5p 共转染大鼠癫痫样神经细胞后继续培养 48 h。收集适量处于对数生长期的各组细胞,参照双荧光素酶报告基因检测试剂盒说明书进行操作,检测萤火虫荧光酶荧光值及海肾荧光酶荧光值。

九、统计学分析

采用 SPSS 22.0 版统计学软件包进行数据分析,所得计量资料符合正态分布以($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两组间比较采用 t 检验,$P<0.05$表示差异具有统计学意义。

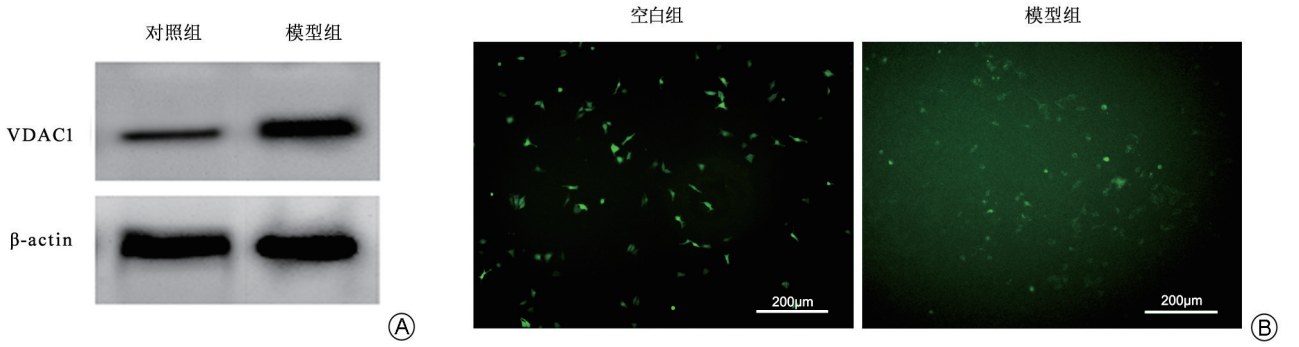
结　　果

一、大鼠癫痫样神经细胞中 miR-873-5p 及 VDAC1 表达分析

经 qRT-PCR 检测发现,与对照组比较,模型组大鼠神经细胞中 miR-873-5p 表达水平明显降低,而 VDAC1 mRNA 表达水平显著升高,组间差异均具有统计学意义($P<0.05$);经 Western blot 检测发现,与对照组比较,模型组 VDAC1 蛋白表达水平明显升高,差异具有统计学意义($P<0.05$),具体情况见图 1A、表 1。与对照组比较,模型组大鼠神经细胞中氧化应激指标 GSH 及 MDA 含量均显著降低,而 ROS 水平显著升高,组间差异均具有统计学意义($P<0.05$),具体情况见图 1B、表 1。

二、大鼠癫痫样神经细胞凋亡情况分析

通过流式细胞仪检测大鼠癫痫样神经细胞凋亡情况发现,与对照组比较,模型组大鼠神经细胞凋亡率明显升高,差异具有统计学意义($P<0.05$),具体情况见图 2A、表 2。进一步检测发现,与对照组比较,模型组大鼠神经细胞中 Bcl-2 蛋白表达水平明显降低($P<0.05$),而 Bax 蛋白和 Cleaved caspase-3 蛋白表达水平均明显升高($P<0.05$),具体情况见图 2B、表 2。



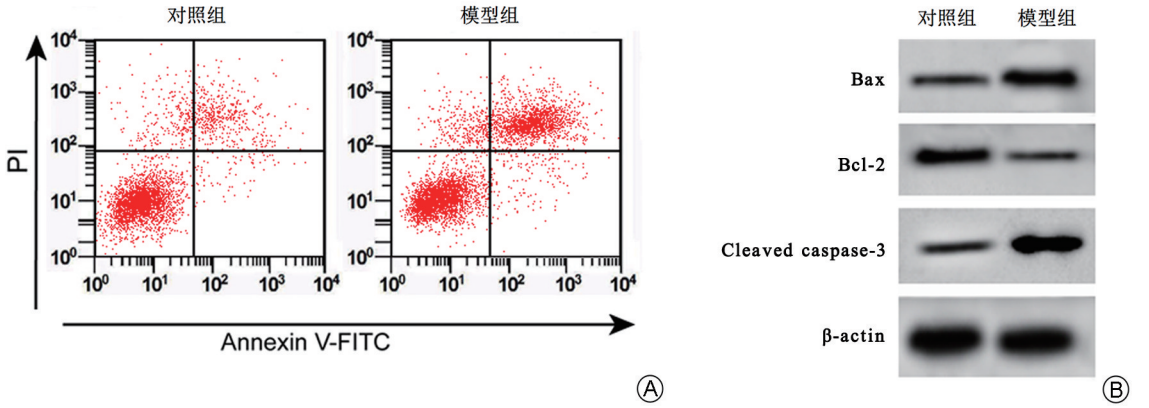
注：A 为 Western blot 检测大鼠神经细胞中 VDAC1 表达；B 为 DCFH-DA 探针标记检测大鼠神经细胞活性氧含量情况

图 1　模型组及对照组神经细胞中 VDAC1 蛋白表达及活性氧含量比较

表 1　模型组及对照组神经细胞中 miR-873-5p、VDAC1 mRNA 及蛋白表达、氧化应激情况分析($\bar{x}\pm s$)

组别	miR-873-5p 表达	VDAC1 mRNA 表达	VDAC1 蛋白表达	ROS(MFI)	GSH 含量(%)	MDA 含量(%)
对照组	1.03±0.17	1.03±0.21	0.31±0.05	354.43±48.56	100.00±8.46	100.00±8.08
模型组	0.28±0.08[a]	2.68±0.26[a]	0.58±0.08[a]	1267.64±93.38[a]	67.39±10.21[a]	53.83±6.53[a]

注：与对照组比较，[a]$P<0.05$



注：A 为流式细胞仪检测大鼠神经细胞凋亡；B 为 Western blot 检测大鼠神经细胞 Bcl-2、Bax 及 Cleaved caspase-3 蛋白表达

图 2　模型组和对照组神经细胞凋亡及 Bcl-2、Bax、Cleaved caspase-3 蛋白表达比较

表 2　对照组及模型组大鼠神经细胞凋亡、Bcl-2、Bax 及 Cleaved caspase-3 表达比较($\bar{x}\pm s$)

组别	Bax	Bcl-2	Cleaved caspase-3	细胞凋亡率(%)
对照组	0.34±0.05	0.76±0.08	0.32±0.04	5.89±0.87
模型组	0.88±0.09[a]	0.27±0.03[a]	0.83±0.07[a]	21.64±1.86[a]

注：与对照组比较，[a]$P<0.05$

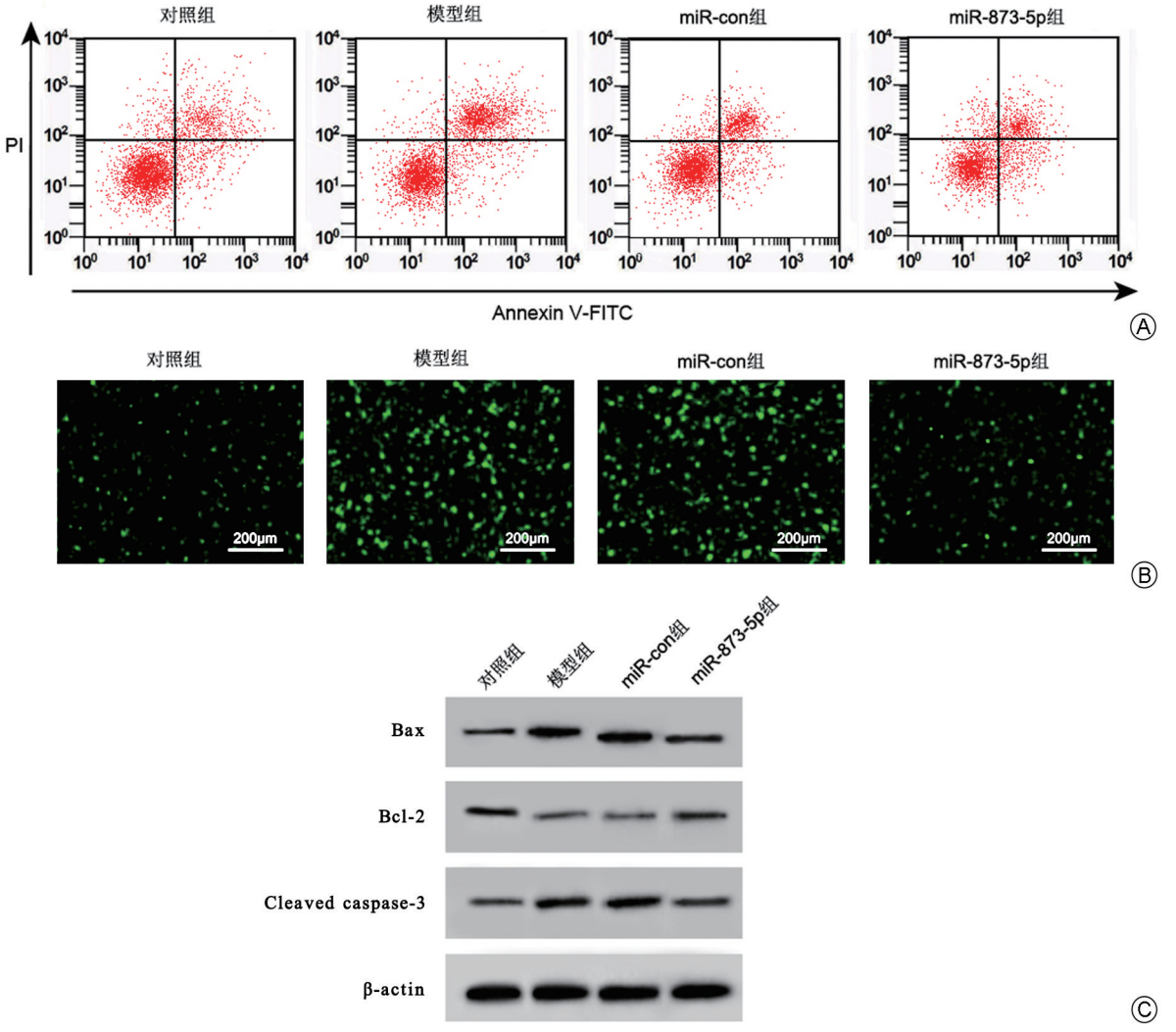
三、过表达 miR-873-5p 对大鼠癫痫样神经细胞凋亡及氧化应激的影响

与 miR-con 组比较，miR-873-5p 组神经细胞凋亡率明显降低，差异具有统计学意义($P<0.05$)；进一步检测还发现，miR-873-5p 组神经细胞中 Bcl-2 蛋白表达明显高于 miR-con 组，而 Bax 蛋白及 Cleaved caspase-3 蛋白表达均明显低于 miR-con 组，组间差异均具有统计学意义($P<0.05$)。通过检测大鼠神经细胞氧化应激指标发现，与 miR-con 组比较，miR-873-5p 组大鼠神经细胞中 GSH 及 MDA 含量均显著升高，ROS 水平则明显降低，组间差异均具有统计学意义($P<0.05$)，具体情况见图 3、表 3。

四、miR-873-5p 靶向调控 VDAC1 的表达

通过 TargetScan 数据库分析提示 miR-873-5p 与 VDAC1 间存在结合位点(见图 4A)。双荧光素酶报告基因检测实验结果显示，转染野生型 VDAC1 基因表达载体 VDAC1-WT 后，与 miR-con 组比较，miR-873-5p 组细胞荧光活性明显降低，组间差异具有统计学意义($P<0.05$)；而转染突变型 VDAC1 基因表达载体 VDAC1-MUT 后，与 miR-con 组比较，miR-873-5p 组细胞荧光活性无显著性差异，具体情况见表 4，上述结果表明 miR-873-5p 可靶向调控 VDAC1 表达。进一步利用 Western blot 检测 miR-873-5p 对 VDAC1 的调控作用，结果显示与 miR-con 组(0.82±0.08)比较，miR-873-

5p 组细胞中 VDAC1 蛋白表达(0.24±0.05)明显降低,组间差异具有统计学意义(t=18.444,P<0.05);与anti-miR-con 组(0.77±0.07)比较,miR-873-5p 敲除组细胞中 VDAC1 蛋白表达(1.22±0.13)明显升高,组间差异具有统计学意义(t=9.143,P<0.05),具体情况见图 4B。

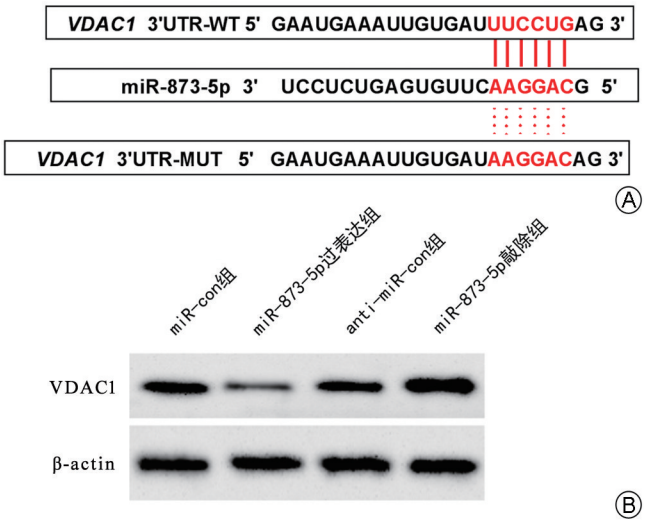


注:A 为流式细胞仪检测大鼠神经细胞凋亡情况;B 为 Western blot 检测大鼠神经细胞 Bcl-2、Bax 及 Cleaved caspase-3 表达

图 3　过表达 miR-873-5p 对大鼠神经细胞凋亡的影响

表 3　过表达 miR-873-5p 对大鼠神经细胞凋亡因子及氧化应激的影响

组别	miR-873-5p	Bax	Bcl-2	Cleaved caspase-3	细胞凋亡率(%)	ROS(MFI)	GSH(%)	MDA(%)
对照组	1.04±0.08	0.23±0.04	0.41±0.04	0.35±0.04	5.28±0.84	278.58±48.28	107.28±10.36	98.32±10.75
模型组	0.19±0.04	0.72±0.07	0.15±0.03	0.63±0.06	22.27±2.27	958.49±208.96	59.36±12.48	52.43±9.58
miR-con 组	0.15±0.03	0.71±0.09	0.13±0.03	0.62±0.07	20.28±2.15	978.98±217.38	64.55±14.89	56.53±9.75
miR-873-5p 组	2.46±0.47	0.39±0.06	0.32±0.05	0.44±0.06	15.28±1.59	677.32±74.69	89.37±11.48	87.39±10.58
F	183.050	116.621	111.610	49.927	159.461	38.925	29.128	44.624
P	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000



注：A 为 miR-873-5p 与 VDAC1 互补的核苷酸序列；B 为 Western blot 检测大鼠癫痫样神经细胞中 VDAC1 蛋白表达

图 4　miR-873-5p 对 VDAC1 蛋白表达的靶向调控作用分析

表 4　双荧光素酶报告基因检测实验结果分析($\bar{x}\pm s$)

组别	VDAC1-WT	VDAC1-MUT
miR-con 组	1.00±0.12	0.97±0.09
miR-873-5p 过表达组	0.53±0.06[a]	1.05±0.12

注：与 miR-con 组比较，[a]$P<0.05$

讨　论

癫痫是由于大脑神经细胞异常放电导致神经系统紊乱，是一种慢性反复发作性疾病（患者通常伴有抽搐及意识改变）[10]。miR-873-5p 表达异常可造成癫痫患者学习困难[11]；如 Liu 等[12]采用 Morris 水迷宫法将颞叶癫痫大鼠分为记忆障碍组与记忆正常组，通过检测大鼠海马体中失调的 miRNA，发现与记忆正常组比较，记忆障碍组大鼠 miR-873-5p 表达均明显下调。本研究通过体外构建大鼠癫痫样神经细胞模型，分析正常对照细胞、模型对照细胞 miR-873-5p 及 VDAC1 表达，发现模型对照细胞 miR-873-5p 表达水平显著降低，而 VDAC1 mRNA 及蛋白表达水平均显著升高。

神经细胞损伤是癫痫发生、发展的主要原因，减轻神经细胞损伤对改善癫痫病情具有重要意义[13]。癫痫导致的神经细胞损伤大多为细胞凋亡[14]；细胞凋亡过程通常由 Bcl-2、Bax、caspase 家族等凋亡相关基因调控，相关研究表明 Bcl-2 可抑制细胞凋亡，而 Bax、caspase 可促进细胞凋亡[15-16]。本研究结果显示，过表达 miR-873-5p 后，癫痫大鼠神经细胞中 Bcl-2 表达水平明显升高，而 Bax 及 Cleaved caspase-3 表达水平均显著降低，表明过表达 miR-873-5p 可通过调控细胞凋亡基因表达进而抑制神经细胞凋亡；进一步检测氧化应激指标发现，过表达 miR-873-5p 后，癫痫大鼠神经细胞中 GSH 及 MDA 含量均显著升高，而 ROS 水平显著降低，表明过表达 miR-873-5p 可通过抑制神经细胞氧化应激反应进而减轻神经细胞损伤程度。

VDAC1 是一种多功能蛋白，在哺乳动物线粒体膜上广泛分布，是线粒体通透性转换孔道（mitochondria permeability transition pore，mPTP）的重要组成部分，主要调节 mPTP 的开放与关闭[17]。VDAC1 蛋白主要控制代谢物、核苷酸及离子转运，与细胞氧化应激及线粒体介导的细胞凋亡密切相关[18]。Nagakannan 等[19]研究发现抑制 VDAC1 表达对谷氨酸诱导的海马 HT22 细胞氧化损伤及线粒体裂解具有一定保护作用；Mo 等[20]发现富含氢的生理盐水能通过刺激上调 Bcl-2 表达、下调 VDAC1 活性，抑制神经细胞凋亡，降低高糖对神经细胞的损伤作用；Shoshan-Barmatz 等[21]发现阿尔茨海默病模型细胞中 VDAC1 高表达，从而导致细胞死亡。本研究结果显示大鼠癫痫样神经细胞中 VDAC1 蛋白表达水平显著升高；荧光素酶实验验证 miR-873-5p 与 VDAC1 存在靶向调控关系，miR-875-5p 负调控 VDAC1 表达。线粒体是活性氧 ROS 的主要来源，Dehart 等[22]已证实 VDAC1 参与活性氧从线粒体向胞质释放过程，本研究发现大鼠癫痫样神经细胞在沉默 VDAC1 后，其 ROS 水平显著降低，也进一步证实沉默 VDAC1 可抑制神经细胞氧化应激反应进而减轻神经细胞损伤程度。

综上所述，本研究结果表明，过表达 miR-873-5p 可通过调控 VDAC1 表达进而减少神经细胞凋亡，还可抑制神经细胞氧化应激反应，对受损神经细胞具有保护作用。

参　考　文　献

[1] Puvenna V, Engeler M, Banjara M, et al. Is phosphorylated tau unique to chronic traumatic encephalopathy? Phosphorylated tau in epileptic brain and chronic traumatic encephalopathy[J]. Brain Res, 2016, 1630: 225-240. DOI: 10.1016/j.brainres.2015.11.007.

[2] Englot DJ, Birk H, Chang EF. Seizure outcomes in nonresective epilepsy surgery: an update[J]. Neurosurg Rev, 2017, 40(2): 181-194. DOI: 10.1007/s10143-016-0725-8.

[3] Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, et al. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs[J]. Science, 2001, 294(5543): 853-858. DOI: 10.1126/science.1064921.

[4] Reis RS. The entangled history of animal and plant microRNAs[J]. Funct Integr Genomics, 2017, 17(2-3): 127-134. DOI: 10.1007/s10142-016-0513-0.

[5] Aksoy-Aksel A, Zampa F, Schratt G. MicroRNAs and synaptic plasticity-a mutual relationship[J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2014, 369(1652): 20130515. DOI: 10.1098/rstb.2013.0515.

[6] Cook JR, MacIntyre DA, Samara E, et al. Exogenous oxytocin modulates human myometrial microRNAs[J]. Am J Obstet Gynecol, 2015, 213(1): 65-65. DOI: 10.1016/j.ajog. 2015.03.015.

[7] Shi R, Zhang S, Cheng G, et al. Ginsenoside Rg1 and acori graminei rhizoma attenuates neuron cell apoptosis by promoting the expression of miR-873-5p in Alzheimer's disease[J]. Neurochem Res, 2018, 43(8): 1529-1538. DOI: 10.1007/s11064-018-2567-y.

[8] Jiang W, Du B, Chi Z, et al. Preliminary explorations of the role of mitochondrial proteins in refractory epilepsy: some findings from comparative proteomics[J]. J Neurosci Res, 2007, 85(14): 3160-3170. DOI: 10.1002/jnr.21384.

[9] Khan AA, Shekh-Ahmad T, Khalil A, et al. Cannabidiol exerts antiepileptic effects by restoring hippocampal interneuron functions in a temporal lobe epilepsy model[J]. Br J Pharmacol, 2018, 175(11): 2097-2115. DOI: 10.1111/bph.14202.

[10] 曾琦,张月华,杨小玲,等.良性家族性新生儿癫痫致病基因研究[J].中华实用儿科临床杂志,2018,33(8):602-606. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-428X.2018.08.011.

[11] Koufaris C, Papagregoriou G, Kousoulidou L, et al. Haploinsufficiency of the miR-873/miR-876 microRNA cluster is associated with craniofacial abnormalities[J]. Gene, 2015, 561(1): 95-100. DOI: 10.1016/j.gene.2015.02.018.

[12] Liu X, Wu Y, Huang Q, et al. Grouping pentylenetetrazol-induced epileptic rats according to memory impairment and microRNA expression profiles in the hippocampus[J]. PLoS One, 2015, 10(5): e0126123. DOI: 10.1371/journal.pone.0126123.

[13] Becker AJ. Review: animal models of acquired epilepsy: insights into mechanisms of human epileptogenesis[J]. Neuropathol Appl Neurobiol, 2018, 44(1): 112-129. DOI: 10.1111/nan.12451.

[14] Wu Q, Zhang M, Liu X, et al. CB2R orchestrates neuronal autophagy through regulation of the mTOR signaling pathway in the hippocampus of developing rats with status epilepticus[J]. Int J Mol Med, 2020, 45(2): 475-484. DOI: 10.3892/ijmm.2019.4439.

[15] 李杨,王聚信,赵姗姗,等.褪黑素抑制新生大鼠脑缺血缺氧损伤后海马内 Bcl-2/Bax 的下调和 caspase-3 的活化[J].中国组织化学与细胞化学杂志,2016,25(3):216-222. DOI: 10.16705/j.cnki.1004-1850.2016.03.003.

[16] Rottenberg H, Hoek JB. The path from mitochondrial ROS to aging runs through the mitochondrial permeability transition pore[J]. Aging Cell, 2017, 16(5): 943-955. DOI: 10.1111/acel.12650.

[17] Shoshan-Barmatz V, Krelin Y, Shteinfer-Kuzmine A. VDAC1 functions in Ca^{2+} homeostasis and cell life and death in health and disease[J]. Cell Calcium, 2018, 69: 81-100. DOI: 10.1016/j.ceca.2017.06.007.

[18] Maurya SR, Mahalakshmi R. Mitochondrial VDAC2 and cell homeostasis: highlighting hidden structural features and unique functionalities[J]. Biol Rev Camb Philos Soc, 2017, 92(4): 1843-1858. DOI: 10.1111/brv.12311.

[19] Nagakannan P, Islam MI, Karimi-Abdolrezaee S, et al. Inhibition of VDAC1 protects against glutamate-induced oxytosis and mitochondrial fragmentation in hippocampal HT22 cells[J]. Cell Mol Neurobiol, 2019, 39(1): 73-85. DOI: 10.1007/s10571-018-0634-1.

[20] Mo XY, Li XM, She CS, et al. Hydrogen-rich saline protects rat from oxygen glucose deprivation and reperusion-induced apoptosis through VDAC1 via Bcl-2[J]. Brain Res, 2019, 1706: 110-115. DOI: 10.1016/j.brainres.2018.09.037.

[21] Shoshan-Barmatz V, Nahon-Crystal E, Shteinfer-Kuzmine A, et al. VDAC1, mitochondrial dysfunction, and Alzheimer's disease[J]. Pharmacol Res, 2018, 131: 87-101. DOI: 10.1016/j.phrs.2018.03.010.

[22] Dehart DN, Fang D, Heslop K, et al. Opening of voltage dependent anion channels promotes reactive oxygen species generation, mitochondrial dysfunction and cell death in cancer cells[J]. Biochem Pharmacol, 2018, 148: 155-162. DOI: 10.1016/j.bcp. 2017.12.022.

(修回日期:2020-09-29)
(本文编辑:易　浩)

·读者·作者·编者·

本刊对来稿中统计学处理的有关要求

1. 统计研究设计:应交代统计研究设计的名称和主要做法。如调查设计(分为前瞻性、回顾性或横断面调查研究);实验设计(应交代具体的设计类型,如自身配对设计、成组设计、交叉设计、析因设计、正交设计等);临床试验设计(应交代属于第几期临床试验,采用了何种盲法措施等)。主要做法应围绕 4 个基本原则(随机、对照、重复、均衡)概要说明,尤其要交代如何控制重要非试验因素的干扰和影响。

2.资料的表达与描述:用($\bar{x}\pm s$)表达近似服从正态分布的定量资料,用 $M(Q_R)$ 表达呈偏态分布的定量资料;用统计表时,要合理安排纵横标目,并将数据的含义表达清楚;用统计图时,所用统计图的类型应与资料性质相匹配,并使数轴上刻度值的标法符合数学原则;用相对数时,分母不宜小于 20,要注意区分百分率与百分比。

3. 统计分析方法的选择:对于定量资料,应根据所采用的设计类型、资料所具备的条件和分析目的,选用合适的统计分析方法,不应盲目套用 t 检验和单因素方差分析;对于定性资料,应根据所采用的设计类型、定性变量的性质和频数所具备的条件以及分析目的,选用合适的统计分析方法,不应盲目套用 χ^2 检验。对于回归分析,应结合专业知识和散布图,选用合适的回归类型,不应盲目套用简单直线回归分析,对具有重复实验数据的回归分析资料,不应简单化处理;对于多因素、多指标资料,要在一元分析的基础上,尽可能运用多元统计分析方法,以便对因素之间的交互作用和多指标之间的内在联系进行全面、合理的解释和评价。

4. 统计结果的解释和表达:当 $P<0.05$(或 $P<0.01$)时,应说明对比组之间的差异有统计学意义,而不应说对比组之间具有显著性(或非常显著性)的差别;应写明所用统计分析方法的具体名称(如:成组设计资料的 t 检验、两因素析因设计资料的方差分析、多个均数之间两两比较的 q 检验等),统计量的具体值(如 $t=3.45$, $\chi^2=4.68$, $F=6.79$ 等),应尽可能给出具体的 P 值(如 $P=0.0238$);当涉及到总体参数(如总体均数、总体率等)时,在给出显著性检验结果的同时,再给出 95%可信区间。