

· 基础研究 ·

基于 lncRNA-UCA1/miR-187/MAPK8 通路
探讨加味柴胡疏肝汤治疗癫痫作用机制李瑞暖¹ 谢苗莹¹ 曾 榕¹ 黄柳璘¹ 黄鹏宇¹ 于晓东¹ 李明芬²
周艳英² 梁 霜² 罗玉珍² 刁丽梅²

摘要 **目的** 观察加味柴胡疏肝汤 (MCSF) 对癫痫小鼠行为学的影响及其对长链非编码 RNA 尿路上皮癌相关基因 1 (lncRNA-UCA1)、微小 RNA 187 (miR-187) 和 丝裂原激活蛋白激酶 8 (MAPK8) 的调控作用。**方法** 将 80 只小鼠随机分为正常组、模型组 (盐酸匹罗卡品 180 mg/kg)、MCSF 组 [7 g/(kg·d)]、MCSF[7 g/(kg·d)]+miR-187 模拟剂组 (2 μL)、MCSF[7 g/(kg·d)]+miR-187 抑制剂组 (2 μL)、MCSF[7 g/(kg·d)]+lncRNA-UCA1 模拟剂组 (2 μL)、MCSF[7 g/(kg·d)]+lncRNA-UCA1 抑制剂组 (2 μL)、卡马西平 (CBZ) 组 [30 mg/(kg·d)]。采用匹罗卡品 (180 mg/kg) 诱导建立癫痫小鼠模型, 抑制及过表达 lncRNA-UCA1 (2 μL) 和 miR-187 (2 μL) 后, 给予对应药物: MCSF[7 g/(kg·d)]、卡马西平混悬液 [30 mg/(kg·d)] 或生理盐水 [20 mL/(kg·d)] 灌胃 2 周, 观察小鼠一般情况; 行脑电图和水迷宫行为学实验; 苏木精-伊红 (HE) 染色法观察造模前后海马病理学变化; 逆转录-聚合酶链反应 (RT-qPCR) 检测小鼠海马 lncRNA-UCA1、miR-187 和 MAPK8 mRNA 表达量; 蛋白质免疫印迹法检测小鼠海马 MAPK8 及磷酸化水平变化。**结果** 与正常组比较, 模型组小鼠体重减少, 脑电图可观察到明显连续性痫性放电波, 平台逃避潜伏期明显延长, 穿越平台次数和目标象限停留时间减少 ($P<0.01$, $P<0.05$), 海马组织神经元疏松紊乱, 模型组 miR-187 的表达水平降低, lncRNA-UCA1 和 MAPK8 基因表达水平升高 ($P<0.01$), p-MAPK8 蛋白表达量明显增加 ($P<0.01$); 与模型组比较, 给药组干预 2 周后, 小鼠体重增加, 各组脑电波痫性放电波频率和强度明显减少, MCSF 组、MCSF+miR-187 模拟剂组、MCSF+lncRNA-UCA1 抑制剂组和 CBZ 组平台逃避潜伏期缩短, 穿越平台次数增多 ($P<0.01$, $P<0.05$), 海马组织 miR-187 的表达水平升高, lncRNA-UCA1 和 MAPK8 基因表达水平降低 ($P<0.01$), p-MAPK8 蛋白表达量均明显减少 ($P<0.01$), MCSF+miR-187 抑制剂组 lncRNA-UCA1 基因水平表达量降低 ($P<0.05$); MCSF+lncRNA-UCA1 模拟剂组 miR-187 升高 ($P<0.05$)。**结论** MCSF 可以减少癫痫小鼠痫性波, 改善小鼠癫痫行为, 发挥抗癫痫作用, 其作用机制可能与通过抑制 lncRNA-UCA1 表达从而激活 miR-187, 降低 MAPK8 水平有关。

关键词 加味柴胡疏肝汤; 癫痫; 长链非编码 RNA 尿路上皮癌相关基因 1; 行为学; 内源性竞争 RNA; 中药复方

Mechanism of Modified Chaihu Shugan Formula in the Treatment of Epilepsy Based on lncRNA-UCA1/miR-187/MAPK8 Pathway LI Rui-nuan¹, XIE Miao-ying¹, ZENG Rong¹, HUANG Liu-ying¹, HUANG Peng-yu¹, YU Xiao-dong¹, LI Ming-fen², ZHOU Yan-ying², LIANG Shuang², LUO Yu-zhen², and DIAO Li-mei² ¹ Guangxi Key Laboratory of Molecular Biology of Traditional Chinese Medicine Prevention and Treatment, Graduate School of Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning (530023);

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 81960858); 2022 年广西科技厅科技基地和人才专项 (No. 桂科 AD22035168); 广西研究生教育创新计划项目 (No. YCSW2021225)

作者单位: 1. 广西中医药防治医学分子生物重点实验室, 广西中医药大学研究生院 (南宁 530001); 2. 广西中医药大学第一附属医院脑病一区 (南宁 530023)

通讯作者: 刁丽梅, Tel: 0771-5603925, E-mail: dlm721226@163.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20230804.024

2 Encephalopathy Department 1, The First Affiliated Hospital of Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning (530023)

ABSTRACT Objective To observe the effects of Modified Chaihu Shugan Formula (MCSF) on the behavior of epileptic mice and their regulatory effects on long noncoding RNA-UCA1 (lncRNA-UCA1), microRNA-187 (miR-187) and recombinant mitogen activated protein kinase 8 (MAPK8). **Methods** Totally 80 mice were randomly divided into the normal group, model group (pilocarpine hydrochloride 180 mg/kg), MCSF group ($7\text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), MCSF ($7\text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) + miR-187 mimic group ($2\text{ }\mu\text{L}$), MCSF ($7\text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) + miR-187 inhibitor group ($2\text{ }\mu\text{L}$), MCSF ($7\text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) + lncRNA-UCA1 mimic group ($2\text{ }\mu\text{L}$), MCSF ($7\text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) + lncRNA-UCA1 inhibitor group ($2\text{ }\mu\text{L}$), CBZ group ($7\text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$). The mouse model of epilepsy was induced by pilocarpine (180 mg/kg). After inhibition and overexpression of lncRNA-UCA1 ($2\text{ }\mu\text{L}$) and miR-187 ($2\text{ }\mu\text{L}$), mice were treated with MCSF ($7\text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), carbamazepine suspension ($30\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) or normal saline ($20\text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) by gavage for 2 weeks. The general state of mice was observed. EEG and Morris water maze test were conducted; HE staining was used to observe the pathological changes of hippocampus before and after modeling. The expression levels of lncRNA-UCA1, miR-187 and MAPK8 mRNA in hippocampus of mice were detected by RT-qPCR. Western Blot was used to detect the changes of MAPK8 and phosphorylation levels in hippocampus of mice. **Results** Compared with the normal group, the mice in the model group showed a significant reduction in body weight, a significant continuous epileptic discharge in EEG, a significant prolongation of the platform escape latency, a reduction in the number of crossing the platform and the residence time of the target quadrant ($P < 0.01$, $P < 0.05$), and a reduction in the expression of miR-187 in the model group. The expression levels of lncRNA-UCA1 and MAPK8 genes and the expression of p-MAPK8 protein were significantly increased ($P < 0.01$). Compared with the model group, after two weeks of treatment, the weight of the mice in the drug group increased, the frequency and intensity of epileptic waves in each group decreased significantly, the platform escape latency was shortened, and the number of platform crossings was increased in the MCSF group, MCSF+miR-187 mimic group, MCSF+lncRNA-UCA1 inhibitor group and CBZ group ($P < 0.01$, $P < 0.05$). Compared with the model group, the expression level of miR-187 in the hippocampus was increased, the expression levels of lncRNA-UCA1 and MAPK8 genes were decreased ($P < 0.01$), and the expression level of p-MAPK8 protein was significantly decreased ($P < 0.01$). The expression level of lncRNA-UCA1 gene was decreased in MCSF+miR-187 inhibitor group ($P < 0.05$). The expression of miR-187 was increased in MCSF+lncRNA-UCA1 mimic group ($P < 0.05$). **Conclusions** MCSF can reduce epileptic waves in epileptic mice, improve epileptic behavior in mice, and play an anti-epileptic role. Its mechanism may be related to the activation of miR-187 and the reduction of MAPK8 level by inhibiting the expression of lncRNA-UCA1.

KEYWORDS Modified Chaihu Shugan Formula; epilepsy; lncRNA-UCA1; behavioral science; ceRNA; Chinese herbal compound

癫痫发作未被及时控制会导致脑损伤和记忆缺陷^[1],而加味柴胡疏肝汤具有疏肝解郁、化痰熄风之效,能够缓解癫痫发作,保护大脑海马神经元^[2-4],但该复方起保护作用的分子机制尚不明确。长链非编码 RNA (long noncoding RNA, lncRNA) 和微小 RNA (microRNA, miRNA) 的调控对大脑的发育和认知能力至关重要,不仅参与神经干细胞的增殖分化,还影响神经突触稳定性等^[5]。前期有研究发现 lncRNA 可以作为内源性海绵体来调节 miRNA 的表达和功能^[6]。尽管已有多项研究证明长链非编码 RNA 尿路上皮癌相关基因 1 (long noncoding RNA-UCA1, lncRNA-UCA1) 与 miRNA 之间相互

调控影响下游信号通路以参与癫痫的发生机制^[7, 8],但 lncRNA-UCA1 是否通过调节微小 RNA 187 (microRNA-187, miR-187) / 丝裂原激活蛋白激酶 8 (recombinant mitogen activated protein kinase 8, MAPK8) 通路参与癫痫发作机制及行为学异常的相关研究尚未被揭示。本研究以 lncRNA-UCA1/miR-187/MAPK8 通路为切入点,探究加味柴胡疏肝汤对癫痫小鼠海马组织及行为学的影响及其可能机制,旨在为临床治疗癫痫提供思路。

材料与方法

1 动物 SPF 级健康雄性 KM 小鼠 90 只,

25~30 g, 6~8 周龄, 购自广西中医药大学实验动物中心, 实验动物许可证号: SYXK (桂) 2009-0001。实验小鼠饲养于广西中医药防治医学分子生物重点实验室动物中心, 分笼饲养, 环境温度为 $(20 \pm 2) ^\circ\text{C}$, 相对湿度维持在 45%~65%, 照明 12 h 更替, 自由饮水饮食。本研究经广西中医药大学实验动物伦理委员会批准 (审批时间: 2018-03-05)。

2 药物 加味柴胡疏肝汤由北柴胡 (产地: 山西, 批号: 20220101, 质量层次: 优选) 15 g, 白芍 (产地: 安徽, 批号: 20220201, 质量层次: 精选) 15 g, 枳壳 (麸炒, 产地: 江西, 批号: 220114, 质量层次: 优选) 10 g, 炙甘草 (产地: 内蒙古, 批号: 2202113, 质量层次: 精选) 6 g, 川芎 (产地: 四川, 批号: 20220202, 质量层次: 优选) 10 g, 香附 (产地: 浙江, 批号: 20220201, 质量层次: 精选) 10 g, 陈皮 (醋炒, 产地: 广东, 批号: 22022202, 质量层次: 精选) 9 g, 浙贝母 (产地: 浙江, 批号: 22020201, 质量层次: 优选) 15 g, 生牡蛎 (产地: 广西, 批号: 220100803, 质量层次: 优选) 30 g, 钩藤 (产地: 湖南, 批号: 20220201, 质量层次: 优选) 10 g, 蜈蚣 (产地: 湖北, 批号: 02202088, 质量层次: 精选) 1 条组成, 由广西中医药大学第一附属医药剂科统一采购备用, 所有药材均经广西中医药大学罗耽副教授鉴定为正品, 符合《中国药典》2020 年版一部规范。采用自动煎药机煎煮, 药物浓度浓缩至 500 mg/mL; 盐酸匹罗卡品 (10 g/瓶, 美国 Sigma 公司, 批号: P6503); 硫酸阿托品注射液 (1 mL:0.5 mg, 四川美大康华康药业有限公司, 批号: H51021428); 卡马西平片 (200 mg/片, 北京诺华制药有限公司, 批号: H11022279) 制备成混悬液。mmu-miR-187 抑制剂、mmu-miR-187 模拟剂 (1 OD260/管, 苏州吉玛基因股份有限公司, 批号: B03001); AD-shRNA lncRNA-UCA1、AD lncRNA-UCA1 (200 μL /管, 上海吉凯基因医学科技股份有限公司, 批号: 00124371)。

3 主要试剂及仪器 RNA 反转录试剂盒 (TaKaRa 公司, 批号: A4002-1); miRNA 反转录试剂盒 (TaKaRa 公司, 批号: 2110428A); qPCR 试剂盒 (TaKaRa 公司, 批号: AM10789); 引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司设计、合成, 引物序列如下: GAPDH: 上游引物 5'ACCACAGTCCATGCCATCAC3', 下游引物 5'TCCACCACCCTGTTGCTGTA3', 片段长度 432 bp; miR-187: 上游引物 5'TGCAGGGTCCGAGGTATT3', 下游引物 5'GCCGCTCGTGTCTTGTGTTGCAGC3',

片段长度 57 bp; lncRNA-UCA1: 上游引物 5'TCCTTCCAAATGGCCATCCC3', 下游引物 5'ACCAAAGCCTTTTGTCCCCA3', 片段长度 539 bp; MAPK8: 上游引物: 5'ACCACAGTCCATGCCATCAC3', 下游引物: 5'TCCACCACCCTGTTGCTGTA3', 片段长度 432 bp; β -actin (Servicebi 公司, 批号: GB12001); Anti-MAPK8 (武汉三鹰, 24164-1-AP); Anti-p-MAPK8 (santacruz, sc-293136), HRP-山羊抗兔二抗 (Servicebio 公司, 批号: GB23303); Protein Marker (Thermo 公司, 批号: 26616)。Morris 水迷宫实验系统 (江苏赛昂斯生物科技有限公司, 型号: SA201); 荧光定量 PCR 仪 (Roche 公司, 型号: RocheLightCycler 480 II); 多功能成像仪 (GE 公司, 型号: AI600)。

4 动物模型制备及分组 癫痫小鼠模型的制备参考文献 [4], 利用 Excel 2016 中函数公式 RANDBETWEEN (1, 100) 得到随机序列, 制备随机数字表。将 KM 小鼠按照随机数字表法分为正常组 (10 只) 和造模组 (80 只), 通过腹腔注射 17 mg/kg 的硫酸阿托品, 30 min 后腹腔注射 180 mg/kg 的盐酸匹罗卡品制备模型。参照经典 Racine (1972) 的实验动物痫性发作标准 [9], 注射 30 min 后观察小鼠是否出现 4 级以上痫性发作, 对未达 4 级标准的小鼠每隔 15 min 给予首剂 1/3 剂量的匹罗卡品追加注射, 追加 2 次后仍未达到 4 级以上痫性发作则视为造模失败, 不纳入后续行为学观察及指标检测。痫性发作持续 1 h 后给予地西洋终止痫性发作 [10]。脑电图监测记录各组小鼠癫痫发作持续时间和发作强度等, 剔除无自发性反复癫痫发作的动物。造模过程中出现不符合条件或者死亡时 (造模组出现 5 只), 造模成功率为 93.75%, 及时选取备用小鼠进行模型复制。

将造模成功的小鼠按照随机数字表法分为模型组 (盐酸匹罗卡品 180 mg/kg)、MCSF 组 [7 g/(kg·d)]、MCSF[7 g/(kg·d)]+miR-187 模拟剂组 (2 μL)、MCSF[7 g/(kg·d)]+miR-187 抑制剂组 (2 μL)、MCSF[7 g/(kg·d)]+lncRNA-UCA1 模拟剂组 (2 μL)、MCSF[7 g/(kg·d)]+lncRNA-UCA1 抑制剂组 (2 μL)、卡马西平 (CBZ) 组 [7 g/(kg·d)], 每组 10 只。对需要基因干预的小鼠进行麻醉处理, 在脑立体定位仪下分别对海马区进行颅内注射模拟剂或抑制剂 2 μL 。药物剂量结合课题组前期实验并根据《现代医学实验动物学》中的标准方程进行计算 [4, 11]。MCSF 组、MCSF+miR-187 模拟剂组、

MCSF+miR-187 抑制剂组、MCSF+lncRNA-UCA1 模拟剂组、MCSF+lncRNA-UCA1 抑制剂组分别给予加味柴胡疏肝汤 7 g/(kg·d); 模型组给予生理盐水 20 mL/(kg·d); CBZ 组给予卡马西平混悬液 30 mg/(kg·d), 连续灌胃 2 周。

5 检测指标及方法

5.1 观察小鼠一般状况 包括精神状态、活动度、毛色、体重和饮食等情况。

5.2 脑电图检测各组小鼠脑电波变化情况 将各组小鼠麻醉后固定四肢, 使用脑立体定位仪定位, 手持颅钻在小鼠左右颞侧开窗, 大小约 2 mm×2 mm, 滴少量生理盐水以保持湿润, 将电极针插入颞骨表面, 连接同侧耳电极, 待稳定后监测脑电图波变化情况。参照脑电图诊断标准^[3, 4], 通过 NCERP5.01 数据分析软件记录小鼠皮层脑电图, 脑电图设定纸速 3 cm/s, 敏感度 100 μ V/cm。

5.3 各组小鼠认知功能测定 方法参照参考文献[12] 将水迷宫分为四个象限, 在第 3 象限中央低于水平面 1 cm 处放置半径为 5 cm 的圆形透明平台。(1) 平台逃避潜伏期: 指实验动物每次入水后第 1 次成功找到平台所需的时间。每天下午同一时间将小鼠按顺时针方向依次在 4 个象限放入水中, 记录小鼠在 60 s 内寻找平台的时间, 如果小鼠在 60 s 内找到平台, 记录 60 s 内的逃避潜伏期, 如果 60 s 内未找到平台, 将其引上平台并停留 30 s, 逃避潜伏期记录为 60 s。(2) 空间探索实验: 第 7 天撤去圆形平台, 让每组小鼠从第 1 象限进入水迷宫, 记录其在 60 s 内穿越平台次数和目标象限停留时间, 以判断小鼠记忆储存以及提取再现能力。

5.4 各组小鼠相关标本采集 一部分取大脑组织, 固定于 4% 多聚甲醛固定液中, 用于 HE 染色观察神经元细胞形态, 另一部分取海马组织用于检测 lncRNA-UCA1、miR-187 和 MAPK8 等指标的测定。

5.5 造模后小鼠海马组织病理损伤 将小鼠大脑组织于适量 4% 多聚甲醛中固定 72 h, 用流水洗去多聚甲醛后, 脱水过夜, 石蜡包埋, 切片厚度为 5 μ m。在漂片机中展开后附着在载玻片上, 按照 HE 染色试剂盒中的要求进行 HE 染色, 中性树胶封固后在显微镜下观察、拍照并分析。

5.6 RT-qPCR 检测各组小鼠海马组织 lncRNA-UCA1、miR-187 和 MAPK8 mRNA 水平约取 100 mg 海马组织液氮研磨, 按 Trizol 法提取总 RNA 后, 检测总 RNA 的浓度和纯度。按照普通 RNA 反转录试

剂盒和 miRNA 反转录试剂盒说明书配备去除基因组 DNA 反应混合液和配制 RT 反应液, 利用内参引物 GAPDH, 检测基因引物 lncRNA-UCA1、miR-187 和 MAPK8, 结合逆转录酶, 反转录制备 cDNA 进行荧光定量 PCR, 首先是预变性: 95 $^{\circ}$ C/10 min; 第二步是循环反应 40 cycles: 95 $^{\circ}$ C/15 s; 60 $^{\circ}$ C/45 s (收集荧光); 72 $^{\circ}$ C/45 s; 第三步溶解曲线: 95 $^{\circ}$ C/15 s; 60 $^{\circ}$ C/1 min; 95 $^{\circ}$ C/15 s。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行相对定量分析。

5.7 Western Blot 检测各组小鼠海马 MAPK8 及磷酸化水平表达 取小鼠海马进行组织蛋白提取后, 采用 BCA 法测定蛋白浓度, 变性后根据目的蛋白分子量大小配制不同浓度的胶, 电泳转膜, 封闭液封闭、加入一抗, β -actin (1:1 500), MAPK8、p-MAPK8 (1:1 000), 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 洗膜, 孵育二抗 1 h, 加 ECL 发光液曝光显影, 扫描图像后分析结果。以 β -actin 为内参进行统计分析。

6 统计学方法 采用 SPSS 26.0 软件进行数据分析, 符合正态分布的计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 符合正态分布以及方差齐性的, 两组间采用独立样本 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析。方差不齐两组间比较采用 t' 检验, 多组间校正方差后进行方差分析。若各组资料不符合正态分布, 采用非参数检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 小鼠一般状况 正常小鼠形体肥胖, 精神状态佳, 皮毛致密有光泽, 进食量、饮水量正常。造模后形体瘦小, 体重下降, 竖毛蓬乱少泽, 动作迟缓, 精神差, 饮食饮水量减少, 时有节律性点头动作, 伴嘴角流涎, 两周后饮食饮水量增加, 体重未见明显升高。给药组治疗两周后, 小鼠精神状态好转, 体重较模型组增加。但均未达正常组水平。各治疗组间在体重方面尚无明显差异。

2 各组小鼠脑电图变化情况 (图 1) 与正常组比较, 模型组小鼠脑电图可观察到明显连续性的高频、高振幅、多尖峰痫性放电波。与模型组比较, 其余各组脑电波痫性放电波频率和强度明显减少, 其中 CBZ 组最少, 其次是 MCSF+miR-187 模拟剂组、MCSF+lncRNA-UCA1 抑制剂组和 MCSF 组; MCSF+miR-187 抑制剂组和 MCSF+lncRNA-UCA1 模拟剂组痫性波减少不明显, 较单纯使用 MCSF 组增加。

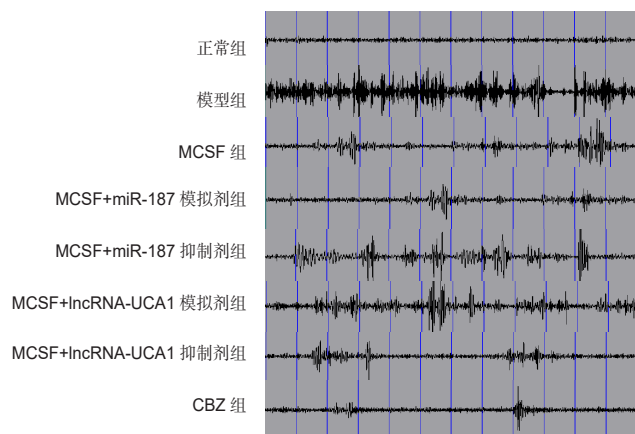
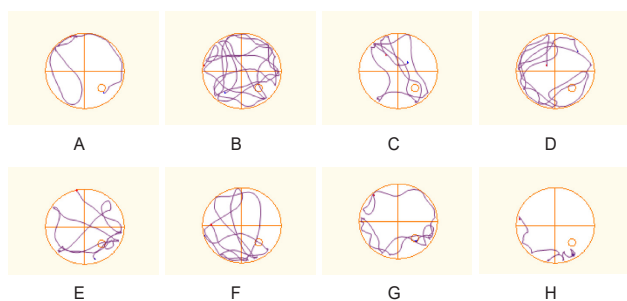


图 1 各组小鼠脑电图变化情况

3 各组小鼠认知功能比较 (表 1, 图 2) 与正常组比较, 模型组平台逃避潜伏期明显延长, 穿越平台次数和目标象限停留时间减少 ($P<0.01$, $P<0.05$); 与模型组比较, MCSF 组、MCSF+miR-187 模拟剂组、MCSF+IncRNA-UCA1 抑制剂组和 CBZ 组平台逃避潜伏期缩短, 穿越平台次数增多 ($P<0.01$, $P<0.05$), MCSF+miR-187 抑制剂组和 MCSF+IncRNA-UCA1 模拟剂组潜伏期略缩短、穿越平台次数略增多, 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。



注: A 为正常组; B 为模型组; C 为 MCSF 组; D 为 MCSF+miR-187 模拟剂组; E 为 MCSF+miR-187 抑制剂组; F 为 MCSF+IncRNA-UCA1 模拟剂组; G 为 MCSF+IncRNA-UCA1 抑制剂组; H 为 CBZ 组

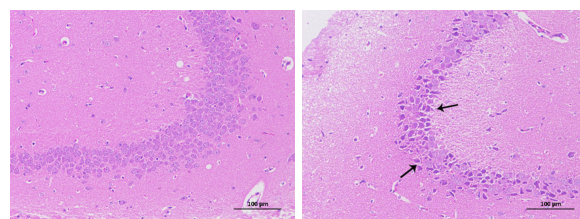
图 2 第 7 天空间探索实验轨迹图

表 1 各组小鼠空间学习记忆能力比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	训练逃避潜伏期 (s)		穿越平台次数 (次)	目标象限停留时间 (s)
		第 5 天	第 6 天		
正常	10	28.67 ± 6.85	25.17 ± 7.60	13.33 ± 4.84	19.65 ± 16.98
模型	10	50.87 ± 13.59*	51.17 ± 12.40**	2.17 ± 2.14**	6.92 ± 4.44*
MCSF	10	33.68 ± 17.62 [△]	32.57 ± 14.92 ^{△△}	8.00 ± 3.35 [△]	11.35 ± 8.72
MCSF+miR-187 模拟剂	10	31.80 ± 15.73 [△]	30.33 ± 14.92 ^{△△}	8.17 ± 4.36 [△]	14.93 ± 13.62
MCSF+miR-187 抑制剂	10	43.85 ± 14.47	39.52 ± 14.48	5.33 ± 2.42	9.02 ± 10.23
MCSF+IncRNA-UCA1 模拟剂	10	39.00 ± 12.94	35.88 ± 13.12 [△]	4.17 ± 3.19	9.07 ± 6.39
MCSF+IncRNA-UCA1 抑制剂	10	31.21 ± 5.95 ^{△△}	30.08 ± 5.95 ^{△△}	7.17 ± 6.21 [△]	12.08 ± 14.05
CBZ	10	29.50 ± 3.16 ^{△△}	26.88 ± 2.82 ^{△△}	9.50 ± 2.17 ^{△△}	17.68 ± 11.86

注: 与正常组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与模型组比较, [△] $P<0.05$, ^{△△} $P<0.01$

4 小鼠海马神经元细胞 HE 染色结果比较 (图 3) 造模前正常小鼠皮层与海马体神经元数量丰富、排列紧密, 神经元形态结构正常、胞核胞质分界清晰、核仁明显; 造模后海马组织可见神经元疏松紊乱, CA3、DG 区少量神经元固缩深染, 细胞核固缩, 排列不整齐。



正常组

模型组

注: 箭头表示阳性结果

图 3 造模后小鼠海马神经组织变化 (HE, ×200)

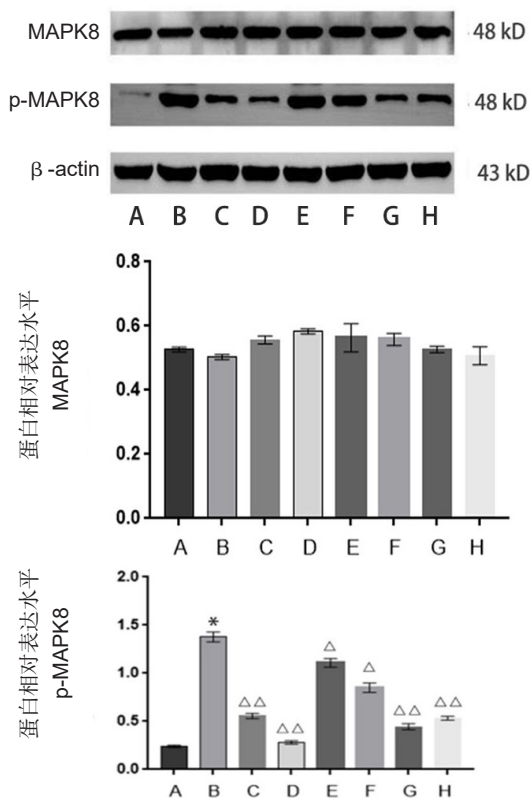
5 各组海马组织 IncRNA-UCA1、miR-187 和 MAPK8 mRNA 表达比较 (表 2) 与正常组比较, 模型组 miR-187 的表达水平降低, IncRNA-UCA1 和 MAPK8 基因表达水平升高 ($P<0.01$)。与模型组比较, MCSF 组、MCSF+miR-187 模拟剂组、MCSF+IncRNA-UCA1 抑制剂组和 CBZ 组 miR-187 的表达水平升高, IncRNA-UCA1 和 MAPK8 基因表达水平降低 ($P<0.01$); MCSF+miR-187 抑制剂组 IncRNA-UCA1 基因水平表达量降低 ($P<0.05$), miR-187 和 MAPK8 差异无统计学意义 ($P>0.05$); MCSF+IncRNA-UCA1 模拟剂组 miR-187 升高 ($P<0.05$), IncRNA-UCA1 和 MAPK8 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

6 各组海马组织 MAPK8 及其磷酸化水平比较 (图 4) 各组间海马组织中 MAPK8 蛋白表达量差异无统计学意义 ($P>0.05$); 模型组 p-MAPK8 蛋白表达量较正常组明显增加 ($P<0.01$); 各药物组小鼠海马组织中 p-MAPK8 蛋白表达量较模型组均明显减少 ($P<0.01$, $P<0.05$)。

表 2 各组小鼠海马组织 lncRNA-UCA1、miR-187 和 MAPK8 基因表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	lncRNA-UCA1	miR-187	MAPK8
正常	3	0.04 ± 0.01	1.84 ± 0.17	0.22 ± 0.01
模型	3	1.00 ± 0.14*	1.00 ± 0.07*	1.00 ± 0.14*
MCSF	3	0.58 ± 0.08 ^{△△}	1.45 ± 0.10 ^{△△}	0.63 ± 0.07 ^{△△}
MCSF+miR-187 模拟剂	3	0.37 ± 0.06 ^{△△}	1.70 ± 0.07 ^{△△}	0.46 ± 0.04 ^{△△}
MCSF+miR-187 抑制剂	3	0.79 ± 0.11 [△]	1.13 ± 0.03	0.92 ± 0.06
MCSF+lncRNA-UCA1 模拟剂	3	0.95 ± 0.12	1.25 ± 0.01 [△]	0.95 ± 0.07
MCSF+lncRNA-UCA1 抑制剂	3	0.48 ± 0.02 ^{△△}	1.66 ± 0.17 ^{△△}	0.40 ± 0.05 ^{△△}
CBZ	3	0.10 ± 0.02 ^{△△}	1.47 ± 0.32 ^{△△}	0.51 ± 0.06 ^{△△}

注：与正常组比较，* $P < 0.01$ ；与模型组比较，[△] $P < 0.05$ ，^{△△} $P < 0.01$



注：A 为正常组；B 为模型组；C 为 MCSF 组；D 为 MCSF+miR-187 模拟剂组；E 为 MCSF+miR-187 抑制剂组；F 为 MCSF+lncRNA-UCA1 模拟剂组；G 为 MCSF+lncRNA-UCA1 抑制剂组；H 为 CBZ 组；与正常组比较，* $P < 0.01$ ；与模型组比较，[△] $P < 0.05$ ，^{△△} $P < 0.01$

图 4 各组小鼠海马组织 MAPK8、p-MAPK8 蛋白相对表达比较

讨 论

miRNAs 参与建立大脑基因表达谱，并且在癫痫中起着关键作用^[13]，参与炎症通路、突触重组和神经元兴奋性等生物过程^[14]。与其他表观遗传过程相比，miRNA 和 lncRNA 可以通过使用反义寡核苷酸进行选择性靶向基因表达^[15]。例如通过对戊四唑诱导的癫痫大鼠的海马区靶向注射 miR-187 模拟剂，可以调节侧支发芽因子同源物 1 (polyclonal antibody to sprouty homolog 1, SPRY1) 的表达

以缓解癫痫大鼠神经元凋亡，减少癫痫发作^[16]。使用腺相关病毒载体递送系统沉默癫痫小鼠海马组织 lncRNA-UCA1 的表达，可以降低癫痫发作等级^[17]。以上研究提示非编码 RNA 的新基因疗法可能会成为预防癫痫发展的新的治疗手段。

研究发现，各种非编码 RNA 在疾病中形成一个相互作用的竞争性内源 RNA 网络，该网络的原理是基于包含“miRNA 反应元件”的 lncRNA 和相应的 miRNA 结合并调节其活性^[18]。lncRNAs 可以通过竞争性结合 miRNAs，以类似海绵效应的方式降低细胞内特定 miRNAs 的含量、功能与活性，从而在转录后水平调节 miRNAs 靶基因 mRNA 表达^[19, 20]。例如 miR-495 是 lncRNA-UCA1 的靶点之一，lncRNA-UCA1 可与 miR-495 竞争性结合，抑制靶基因 Nrf2 的表达水平，参与癫痫的发生过程^[21]。在癫痫大鼠海马组织中，lncRNA-UCA1 的过表达增加了肌细胞增强因子 2 (myocyte enhancer factor 2C, MEF2C) 的表达，其敲低降低了 MEF2C 的表达，而 MiR-203 升高可以抑制 MEF2C 的水平，促进核因子 κ B (nuclear factor kappa-B, NF- κ B)、磷酸化的 NF- κ B 抑制蛋白 (inhibitor of NF- κ B, I κ B) / I κ B 激酶和炎症效应物的活化，该结果可以被 MEF2C 敲低逆转，提示 lncRNA-UCA1 在癫痫中可竞争性结合 miR-203，共同调控 MEF2C、NF- κ B 在体内表达水平^[8]。lncRNA-UCA1 与 SFRP1 在癫痫中的表达呈正相关，两者与 miR-375 的表达相反，上调 lncRNA-UCA1 的表达可以减弱 miR-375 对 SFRP1 表达的抑制作用，表明 lncRNA-UCA1~SFRP1 在癫痫海马细胞中形成了正反馈闭合环路^[2]。以上研究均表明 lncRNA-UCA1 可以作为“竞争者”以增强或削弱 miRNA 对其靶基因的功能。通过生物信息学预测 lncRNA-UCA1 序列中存在与 miR-187 互补结合的结合位

点,而 MAPK8 是 miR-187 的靶基因之一^[20, 22-24]。本研究中模型组海马组织 lncRNA-UCA1 和 MAPK8 磷酸化水平表达上调,miR-187 下调。中药干预组可能通过下调 lncRNA-UCA1 的表达,逆转增加 miR-187 表达量,抑制 MAPK8 磷酸化,从而控制癫痫发作。结果表明在癫痫中加味柴胡疏肝汤对 lncRNA-UCA1/miR-187/MAPK8 通路具有一定的调节作用。

中医学认为气机升降出入异常与癫痫发生有着密切关系^[26]。肝气失于疏泄条达,则容易产生风、痰、郁等病理变化,由此提出“从肝论治”的治则。柴胡疏肝汤最早记载于《景岳全书》卷五十六,全方由柴胡、陈皮、川芎、香附、芍药、枳壳、甘草组成,具有疏肝理气、活血止痛之效^[16],加味柴胡疏肝汤在此方基础上加以浙贝母、生牡蛎、钩藤和蜈蚣,诸药相合,祛除“风、痰、郁”等致病因素,以疏肝行气解郁为本,化痰熄风为标,从而达到标本兼治。既往研究显示加味柴胡疏肝汤在癫痫中可能通过调控 miR-204 的表达,抑制 AKT/mTOR/P70S6K 通路或抑制泛素 E1 样连接酶、微管相关蛋白 1 轻链 3- II 的表达,影响癫痫小鼠海马组织神经元细胞的自噬和凋亡,发挥保护大脑神经元的保护作用^[2-4];本团队前期临床证明加味柴胡疏肝汤可以降低癫痫的发作频率,具有良好的临床疗效^[25]。本次实验观察到在对癫痫小鼠进行中药干预后,其体重、脑电图和认知功能方面具有显著效果,其中 MCSF+miR-187 模拟剂组、MCSF+lncRNA-UCA1 抑制剂组疗效最好。结果说明单纯使用加味柴胡疏肝汤或结合 miR-187 模拟剂和 lncRNA-UCA1 抑制剂均可以改善癫痫小鼠的脑电图异常和提高认知功能。

在癫痫自发性反复发作的潜伏期和发作间期,神经元和神经网络会经历各种功能和结构的变化,包括神经元凋亡、反应性胶质细胞增殖、轴突和树突可塑性变化以及炎症反应等^[26-28]。现代药理学研究证实“加味柴胡疏肝汤”类汤剂及其组成药物可通过影响癫痫相关生物学过程,有效治病^[29]。研究发现君药柴胡的有效成分芳香油可以改善海人藻酸诱导的癫痫大鼠行为学变化、神经炎症和神经递质异常。通过调节癫痫大鼠海马组织中 γ -氨基丁酸受体、N-甲基-D-天冬氨酸受体、1 型跨膜糖蛋白和微管相关蛋白 2 的表达,可以改善癫痫症状,该结果表明柴胡可以通过 Notch/NMDAR/GABA 通路的作用来缓解癫痫样行为^[30]。此外,柴胡有效成分中的多酚和黄酮类化合物具有较强抗癫痫作用^[31]。臣药川芎的生物活性成

分四甲基吡嗪可以通过抑制钙通道的作用以抑制兴奋性突触传递过程,延缓电点燃癫痫小鼠模型的癫痫发作进程并缩短了放电后持续时间^[32]。香附的提取物具有显著的镇痛和抗惊厥活性作用,不仅可以增加 γ -氨基丁酸水平,还可以发挥抗氧化活性的潜在作用,预防戊四唑引起的癫痫发作^[33]。芍药苷作为一种从芍药中提取的萜类苷类化合物,具备恢复线粒体功能,抑制神经炎症、氧化应激及细胞凋亡的作用,可以预防癫痫发作^[34]。加味药物之一的钩藤在中医实践中常用来治疗惊风、癫痫、子痫等脑部疾病,其主要活性成分是生物碱、萜类化合物和黄酮类化合物,这些活性成分可以通过抗氧化、抗炎、调节神经递质等多种机制,保护神经元不受损伤^[35]。以上研究表明,加味柴胡疏肝汤以其多成分、多途径、多靶点的模式在癫痫的治疗中发挥了非常重要的作用,具有明显的特点和优势。与化学药物相比,运用加味柴胡疏肝汤治疗癫痫具有疗效独特、不良反应小等特点。

综上所述,本研究提示加味柴胡疏肝汤可以通过调节 lncRNA-UCA1/miR-187/MAPK8 信号通路,减少癫痫小鼠痫性波,改善行为学变化,达到治疗癫痫的目的。由于不同的表观遗传过程可以协同或拮抗地发挥作用,表现出可变性和相互依赖性。故本研究以长链非编码 RNA 参与分子信号通路的功能机制为切入点,为探讨加味柴胡疏肝汤防治癫痫的分子作用机制提供了新的参考靶点。通过对 lncRNA/miRNA 在癫痫中相关分子机制的深入探索,有助于开发有效且新颖的临床治疗策略。本研究不足之处在于未能阐释加味柴胡疏肝汤具体以何种方式增加癫痫小鼠海马组织表达 lncRNA-UCA1,仍需进一步研究。

利益冲突: 本文无相关利益冲突。

参 考 文 献

- [1] Oyegbile TO, Dow C, Jones J, et al. The nature and course of neuropsychological morbidity in chronic temporal lobe epilepsy[J]. *Neurology*, 2004, 62 (10): 1736-1742.
- [2] 汪顺贵, 玉倩, 李华霞, 等. 加味柴胡疏肝汤调控 miR-204 影响癫痫小鼠海马神经元凋亡与 ATG7、LC3 II 的表达[J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2020, 22 (7): 2154-2159.
- [3] 汪顺贵, 玉倩, 李华霞, 等. 加味柴胡疏肝汤调控 miR-204 对急性癫痫小鼠海马 AKT/mTOR/P70S6K

- 通路和脑电图的影响[J]. 时珍国医国药, 2020, 31 (2): 273-276.
- [4] 汪顺贵, 玉倩, 李华霞, 等. 加味柴胡疏肝汤调控 miRNA-204 对癫痫小鼠海马自噬的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25 (22): 1-7.
- [5] 赵培源, 陈少昀, 刘喜红. lncRNA 与 miRNA 相互作用对中枢神经系统发育的影响[J]. 实用医学杂志, 2022, 38 (18): 2373-2376.
- [6] Zhao Z, Sun W, Guo Z, et al. Mechanisms of lncRNA/microRNA interactions in angiogenesis[J]. Life Sci, 2020, 254: 116900.
- [7] Yu Q, Zhao MW, Yang P. LncRNA UCA1 suppresses the inflammation via modulating miR-203-mediated regulation of MEF2C/NF- κ B signaling pathway in epilepsy[J]. Neurochem Res, 2020, 45 (4): 783-795.
- [8] Diao L, Yu H, Li H, et al. LncRNA UCA1 alleviates aberrant hippocampal neurogenesis through regulating miR-375/SFRP1-mediated WNT/ β -catenin pathway in kainic acid-induced epilepsy[J]. Acta Biochim Pol, 2021, 68 (2): 159-167.
- [9] Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation II Motor seizure[J]. Electroencephalogr Clin Neurophysiol, 1972, 32 (3): 281-294.
- [10] Lu J, Zhou N, Yang P, et al. MicroRNA-27a-3p downregulation inhibits inflammatory response and hippocampal neuronal cell apoptosis by upregulating mitogen-activated protein kinase 4 (MAP2K4) expression in epilepsy: *in vivo* and *in vitro* studies[J]. Med Sci Monit, 2019, 25: 8499-8508.
- [11] 施新猷主编. 现代医学实验动物学[M]. 北京: 人民军医出版社, 2000: 332-335.
- [12] 徐颖, 张宗奇, 赵妍, 等. 桂枝加葛根汤对脂多糖诱导神经炎症小鼠学习记忆障碍的改善作用[J]. 中国中西医结合杂志, 2014, 34 (2): 179-184.
- [13] Venø MT, Reschke CR, Morris G, et al. A systems approach delivers a functional microRNA catalog and expanded targets for seizure suppression in temporal lobe epilepsy[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2020, 117 (27): 15977-15988.
- [14] Chen X, Ba Y, Ma L, et al. Characterization of microRNAs in serum: A novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases[J]. Cell Res, 2008, 18 (10): 997-1006.
- [15] Khorkova O, Wahlestedt C. Oligonucleotide therapies for disorders of the nervous system[J]. Nat Biotechnol, 2017, 35 (3): 249-263.
- [16] Diao L, Yu H, Wang S, et al. MicroRNA-187 inhibits pentylentetrazol-induced neuronal apoptosis and alleviates development of epilepsy in epileptic rats by regulating SPRY1 expression[J]. Trop J Pharm Res, 2021, 18 (9): 1823-1829.
- [17] 杨诚, 罗涛, 彭夏培, 等. lncRNA-UCA1 通过调节 TGF β 1 对海人酸诱导小鼠癫痫的保护作用[J]. 中国老年学杂志, 2021, 41 (8): 1708-1711.
- [18] Lee WJ, Moon J, Jeon D, et al. Possible epigenetic regulatory effect of dysregulated circular RNAs in epilepsy[J]. PLoS One, 2018, 13 (12): e0209829.
- [19] Cesana M, Cacchiarelli D, Legnini I, et al. A long noncoding RNA controls muscle differentiation by functioning as a competing endogenous RNA[J]. Cell, 2011, 147 (2): 358-369.
- [20] Kallen AN, Zhou XB, Xu J, et al. The imprinted H19 lncRNA antagonizes let-7 microRNAs[J]. Mol Cell, 2013, 52 (1): 101-112.
- [21] Geng JF, Liu X, Zhao HB, et al. LncRNA UCA1 inhibits epilepsy and seizure-induced brain injury by regulating miR-495/Nrf2-ARE signal pathway[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2018, 99: 133-139.
- [22] Wei S, Sun P, Guo Y, et al. Gene expression in the hippocampus in a rat model of premenstrual dysphoric disorder after treatment with baixiangdan capsules[J]. Frontiers Psychol, 2018, 9: 2065.
- [23] 吴琼, 汪顺贵, 郭雪峰, 等. 基于基因芯片技术研究氯化锂-匹罗卡品致痫小鼠海马组织 miR-187 的表达及 GO 和 KEGG 分析[J]. 中风与神经疾病杂志, 2018, 35 (6): 517-521.
- [24] Cesana M, Cacchiarelli D, Legnini I, et al. A long noncoding RNA controls muscle differentiation by functioning as a competing endogenous RNA[J]. Cell, 2011, 147 (2): 358-369.
- [25] 何乾超, 苏晗, 黄德庆, 等. 柴胡疏肝汤加味对难治性癫痫的影响及疗效相关因素研究[J]. 辽宁中医杂志, 2016, 43 (12): 2581-2583.

- [26] Li X, Yang C, Shi Y, et al. Abnormal neuronal damage and inflammation in the hippocampus of kainic acid-induced epilepsy mice[J]. Cell Biochem Funct, 2021, 39 (6): 791-801.
- [27] Pitkänen A, Sutula TP. Is epilepsy a progressive disorder? Prospects for new therapeutic approaches in temporal-lobe epilepsy[J]. Lancet Neurol, 2002, 1 (3): 173-181.
- [28] Wang Z, Zhou L, An D, et al. TRPV4-induced inflammatory response is involved in neuronal death in pilocarpine model of temporal lobe epilepsy in mice[J]. Cell Death Dis, 2019, 10 (6): 386.
- [29] 卢玲, 刁丽梅, 李欢, 等. 柴胡疏肝汤治疗癫痫的研究现状[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2021, 19 (19): 3351-3354.
- [30] Li X, Liu Y, Wang S, et al. The aerial parts of Bupleurum chinense DC. Aromatic oil attenuate kainic acid-induced epilepsy-like behavior and its potential mechanisms[J]. Biomed Res Int, 2022, 2022: 1234612.
- [31] Li X, Liu Y, Wang S, et al. Identification and potential mechanism of different components from the aerial part of Bupleurum chinense DC. for epileptic treatment[J]. Nat Prod Res, 2022, 36 (23): 6137-6142.
- [32] Jin Y, Cai S, Jiang Y, et al. Tetramethylpyrazine reduces epileptogenesis progression in electrical kindling models by modulating hippocampal excitatory neurotransmission[J]. ACS Chem Neurosci, 2019, 10 (12): 4854-4863.
- [33] Herrera-Calderon O, Santiváñez-Acosta R, Pari-Olarte B, et al. Anticonvulsant effect of ethanolic extract of *Cyperus articulatus* L. leaves on pentylenetetrazol induced seizure in mice[J]. J Tradit Complement Med, 2017, 8 (1): 95-99.
- [34] Hong H, Lu X, Wu C, et al. A review for the pharmacological effects of paeoniflorin in the nervous system[J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 898955.
- [35] Yang W, Ip SP, Liu L, et al. Uncaria rhynchophylla and its major constituents on central nervous system: A review on their pharmacological actions[J]. Curr Vasc Pharmacol, 2020, 18 (4): 346-357.
- (收稿: 2023-02-10 在线: 2023-09-12)
责任编辑: 赵芳芳

《中国中西医结合杂志》再次荣获“百种中国杰出学术期刊”

2023 年 9 月 20 日, 中国科技论文 2022 年统计结果在京发布。中国科学技术信息研究所每年出版《中国科技期刊引证报告》发布中国科技论文与引文数据库收录的中国科技论文核心期刊的 20 余项文献计量指标, 从 1999 年开始以此为基础, 研制了中国科技期刊综合评价指标体系, 对期刊进行综合评定。根据 2022 年引证报告,《中国中西医结合杂志》继续被收录为“中国科技核心期刊”, 并再次荣获“百种中国杰出学术期刊”及“第 6 届中国精品学术期刊”。

2002 年开始, 中国科学技术信息研究所每年评选一次百种中国杰出学术期刊。此次是《中国中西医结合杂志》自 2002 年首次评选以来第 19 次入选, 充分彰显我刊的学术影响力。

感谢长期以来广大作者、读者以及专家对中国中西医结合杂志社的大力支持, 在此表示由衷的感谢。杂志社愿与广大科研工作者一起努力, 共同促进中西医结合事业发展。

(本刊讯)