

[文章编号] 1007-0893(2024)11-0004-04

DOI: 10.16458/j.cnki.1007-0893.2024.11.002

miR-92b-3p 抑制物在阿尔兹海默病 并发癫痫动物模型中的抗癫痫效应

陶 华¹ 吴郑娟¹ 张小璐¹ 刘 杨¹ 周 煦²

(1. 广东医科大学附属第一医院, 广东 湛江 524001; 2. 广东医科大学附属第一医院临床研究实验中心, 广东 湛江 524001)

[摘要] 目的: 评估 miR-92b-3p 抑制物在阿尔兹海默病 (AD) 并发癫痫动物模型中的抗癫痫效应。方法: 通过生物信息学方法和双荧光素酶实验筛选解整合素金属蛋白酶 10 (ADAM10) 的调控分子, 采用实时定量聚合酶链反应和 Western Blot 评估 miR-92b-3p 和 ADAM10 在神经元细胞和 AD 并发癫痫动物模型中的表达水平, 经鼻腔给药方法给予 miR-92b-3p 的抑制物, 评估其在 AD 并发癫痫动物模型中的抗癫痫效应。结果: 通过生物信息学方法, 双荧光素酶实验, Western Blot 条带及其灰度分析, 确认 miR-92b-3p 可转录后调控 ADAM10, 且在神经元细胞中对 ADAM10 调控作用较强。与 AD 动物模型组相比, miR-92b-3p 在 AD 并发癫痫动物模型 (AD+EP) 组中显著上调。与 AD+EP 组相比, 经鼻腔给予 miR-92b-3p 抑制物的治疗组癫痫发生率, Racine 4 级以上发生率均显著减少。Racine 4 级以上发作的潜伏期显著延长。结论: 本研究初步证实 miR-92b-3p 抑制物在 AD 并发癫痫动物模型中具有抗癫痫效应。

[关键词] 阿尔兹海默病; 癫痫; miRNAs; miR-92b-3p; 抑制物

[中图分类号] R 742 **[文献标识码]** A

Antiepileptic Effects of Inhibitors of MiR-92b-3p in Animal Models of Alzheimer's Disease Complicated by Epilepsy

TAO Hua¹, WU Zhengjuan¹, ZHANG Xiaolu¹, LIU Yang¹, ZHOU Xu²

(1. Affiliated Hospital of Guangdong Medical University, Guangdong Zhanjiang 524001; 2. Clinical Research and Experimental Center, Affiliated Hospital of Guangdong Medical University, Guangdong Zhanjiang 524001)

[Abstract] **Objective** To evaluate the antiepileptic effect of miR-92b-3p inhibitor in Alzheimer's disease (AD) animal model with epilepsy. **Methods** Regulatory molecules of a disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10) were screened using bioinformatics methods and dual-luciferase assays. The expression levels of miR-92b-3p and ADAM10 in neuronal cells and animal models of AD with epilepsy were evaluated using real-time quantitative polymerase chain reaction and Western blot. Finally, miR-92b-3p inhibitors were administered via nasal administration to assess their antiepileptic effects in AD induced epilepsy animal models. **Results** By bioinformatics methods, dual-luciferase assay, Western blot bands and grayscale analysis, it was confirmed that miR-92b-3p could post-transcriptionally regulate ADAM10, and had a strong regulatory effect on ADAM10 in neuronal cells. MiR-92b-3p was significantly upregulated in AD complicated epilepsy animal model (AD + EP) group compared with AD animal model group. Compared with AD + EP group, the incidence of epilepsy, the incidence of Racine grade 4 or higher were significantly reduced, and the latency of Racine grade 4 or higher seizures was significantly prolonged in the treatment group given miR-92b-3p inhibitor intranasally. **Conclusion** In this study, we preliminarily confirmed that the inhibitor of miR-92b-3p has an antiepileptic effect in an animal model of AD complicated with epilepsy.

[Keywords] Alzheimer's disease; Epilepsy; MiRNAs; MiR-92b-3p; Inhibitors

根据国外研究, 阿尔兹海默病 (Alzheimer's disease, AD) 患者并发癫痫的风险是正常人的 2~6 倍, 长期随访发现, 其发生率可达 47.7%^[1]。解整合素金属蛋白酶 10 (a disintegrin and metalloprotease 10, ADAM10) 在抑制 AD 认知功能损害中扮演关键角色^[2]。在 ADAM10 基因条件敲除的动物中, 可以见到反复痫性发作后的

[收稿日期] 2024-04-03

[基金项目] 湛江市科技计划项目 (2021A05051)

[作者简介] 陶华, 男, 副主任医师, 主要研究方向是脑血管病与癫痫的临床与分子机制。

病死率增加,提示癫痫损害更重^[3]。因此,ADAM10除了参与认知功能损害,在AD并发癫痫的病理过程中应当发挥重要作用。本研究通过分子生物学筛查,确认miR-92b-3p对ADAM10具有靶向负调控作用,并进一步评估其抑制物在AD并发癫痫动物模型中的抗癫痫效应。

1 材料与方法

1.1 材料

B6C3-Tg小鼠和C57BL/6小鼠、体质量30~35g,购自江苏华创信诺医药科技有限公司,实验动物生产许可证号:SCXK(苏)2020-0009,使用许可证号:SYXK(粤)2022-0286。饲养于广东医科大学附属医院动物实验中心无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级环境中,所有小鼠以标准饲料喂养,自由饮水,实验前进行7d的适应性预饲养。本实验已通过广东医科大学附属医院实验动物伦理委员会审核,遵循动物福利伦理原则[伦理号:AHGDMU-LAC-II(1)-2103-A012]。ADAM10蛋白, β -actin和GAPDH抗体,购自艾博抗(上海)贸易有限公司。pmiR-Report-ADAM10 3'-UTR野生型质粒和突变型质粒,购于广州市锐博生物科技有限公司。人神经元细胞系SK-N-SH细胞和HEK293T细胞,购于赛尔维生物科技有限公司。化学合成的miR-92b-3p, miR-363-3p和miR-195-5p模拟物,化学合成的miR-92b-3p抑制物和miR-363-3p抑制物,购于广州市锐博生物科技有限公司。核糖核酸(ribonucleic acid, RNA)提取试剂盒,第一链互补脱氧核糖核酸(complementary deoxyribonucleic acid, cDNA)合成试剂盒,购于美国Thermo Fisher Scientific公司。Light-Cycler 480序列检测系统,购于美国Roche Applied Science公司。

1.2 生物信息学筛查

通过基因表达综合数据库(gene expression omnibus, GEO),下载基于AD患者41例和尸检对照23例的人海马组织的二代测序数据(GSE48552),获得差异表达微小核糖核酸(microRNAs, miRNAs)。通过TargetsCan等工具同时进行预测对ADAM10具有调控潜力的miRNAs。将前述两个结果取交集,然后分析其在AD患者海马组织中的表达趋势。

1.3 双荧光素酶实验

将处于对数生长期的HEK293T细胞接种于24-well培养板中,通过Rfect试剂等分别转染pmiR-Report-ADAM10 3'-UTR野生型质粒或突变型质粒,以及化学合成的miR-92b-3p, miR-363-3p和miR-195-5p的模拟物;然后通过Dual-Luciferase[®]报告系统,充分裂解细胞并上机检测,使用酶标仪检测萤火虫荧光酶荧光值和海肾荧光酶荧光值;上述实验重复3次。

1.4 离体细胞水平实验

人神经元细胞系SK-N-SH细胞接种于24-well培养板中,通过以riboFECTTM CP Reagent,分别将化学合成miR-92b-3p的模拟物和miR-363-3p的模拟物(终浓度为50 nmol·L⁻¹),以及miR-92b-3p的抑制物和miR-363-3p的抑制物(终浓度为100 nmol·L⁻¹)转染至上述细胞,并设置阴性对照,通过Western Blot检测ADAM10蛋白的表达情况;上述实验重复3次。

1.5 构建AD并发癫痫动物模型

AD动物模型为9月龄的B6C3-Tg小鼠,参考国外研究亚惊厥剂量匹罗卡品诱导癫痫发作方案^[4],通过Racine量表,连续3d达到4级以上,视为AD并发癫痫动物模型构建成功,对于4级以上持续发作60min予以地西泮终止发作(10 mg·kg⁻¹,腹腔内注射),然后获取海马组织样本,用于分析miR-92b-3p及其靶蛋白ADAM10 mRNA的相对表达水平。

1.6 实时定量聚合酶链反应

根据miR-92b-3p和ADAM10的序列信息设计特异性引物。在无核糖核酸酶的条件下,使用RNA提取试剂盒提取AD并发癫痫动物模型海马组织总RNA。使用第一链cDNA合成试剂盒进行逆转录。cDNA产物进一步通过Light-Cycler 480序列检测系统进行扩增。最后,使用2^{- $\Delta\Delta$ CT}方法计算miR-92b-3p及其靶蛋白ADAM10 mRNA的相对表达水平。

1.7 Western Blot实验

将组织样本在冰上用匀浆器进行匀浆,然后离心获取上清液并测定蛋白浓度。将配置好的蛋白转移到聚偏氟乙烯膜上,恒流转移并封闭未结合位点。膜与多克隆抗ADAM10抗体,以及作为内参使用的单克隆抗GAPDH抗体孵育后,再与稀释至1:100的二抗在37℃下反应1h。最后,通过化学发光获取免疫反应条带,并定量分析ADAM10蛋白的表达水平。

1.8 评估miR-92b-3p的抑制物在AD并发癫痫动物模型中的抗癫痫效应

设置4组:AD并发癫痫动物模型(AD+EP)组,通过匹罗卡品诱导癫痫急性发作;与AD+EP组相比,治疗组在给予匹罗卡品30min前,额外经鼻腔给药给予miR-92b-3p的抑制物(100 nmol·mL⁻¹, 10 nmol·kg⁻¹);取同龄B6C3-Tg小鼠为AD组;取B6C3-Tg小鼠背景来源的同龄C57BL/6小鼠为正常对照组。在各组给与亚惊厥剂量匹罗卡品(100 mg·kg⁻¹,腹腔内注射)后,连续观察60min,记录发作水平, Racine 4级以上发作潜伏期和发生率。

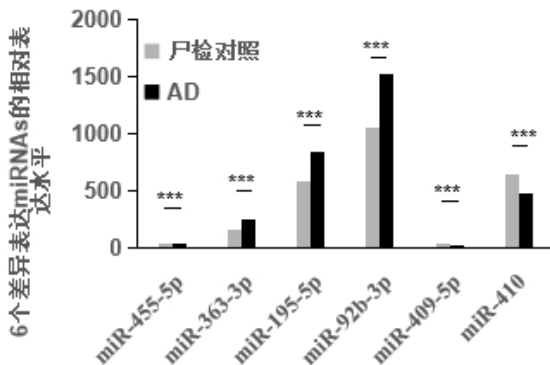
1.9 统计学方法

计数资料通过 χ^2 检验或Fisher确切概率法比较组间差异。计量资料通过独立样本t检验比较组间差异;采用SPSS 22.0软件,双侧P<0.05视为有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-363-3p, miR-195-5p 和 miR-92b-3p 是 ADAM10 的潜在调控分子

通过生物信息学方法, 获得对 ADMA10 具有调控潜力的 miRNAs 6 个, 其中 4 个 miRNAs 在 AD 患者海马组织中表达丰度较高, 且在两组间表达差异明显 (见图 1)。按照 miRNAs 对靶基因的负调控原则, 选择在 AD 患者海马组织中表达丰度高, 且表达上调的 miR-363-3p, miR-195-5p 和 miR-92b-3p 作为 ADAM10 的潜在调控分子。

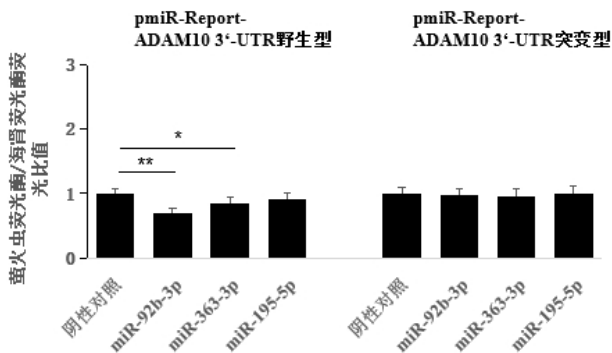


注: AD—阿尔兹海默病。
与尸检对照比较, ***表示 $P < 0.001$ 。

图 1 对 ADMA10 具有调控潜力的 miRNAs 在 AD 患者和尸检对照海马中的表达水平

2.2 miR-92b-3p 和 miR-363-3p 可转录后调控 ADAM10

通过双荧光素酶实验, 发现 miR-92b-3p 和 miR-363-3p 模拟物可使 pmiR-Report-ADAM10 3'-UTR 野生型质粒的表达受到显著抑制 ($P < 0.01$; $P < 0.05$), 荧光比值分别下降至 0.7 倍和 0.85 倍, 但是对插入 ADAM10 3'-UTR 突变型质粒荧光比值差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (见图 2)。结果提示, miR-92b-3p 和 miR-363-3p 可转录后调控 ADAM10。



注: ADAM10—整合素金属蛋白酶 10。
*表示 $P < 0.05$; **表示 $P < 0.01$ 。

图 2 双荧光素酶实验筛查可转录后调控 ADAM10 的 miRNAs

2.3 miR-92b-3p 在神经元细胞中对 ADAM10 调控作用较强

通过 Western Blot, 可见 miR-92b-3p 和 miR-363-3p 的模拟物可使 ADAM10 的表达减少至 0.3 倍和 0.7 倍 ($P < 0.01$; $P < 0.05$) (见插页 1 图 3A), miR-92b-3p 和 miR-363-3p 的抑制物可使 ADAM10 表达增加至 2.1 倍和 1.5 倍 ($P < 0.01$; $P < 0.05$) (见插页 1 图 3B)。结果提示, miR-92b-3p 在神经元细胞中对 ADAM10 调控作用较强。

2.4 miR-92b-3p 在 AD 并发癫痫动物模型中表达上调

基于 AD 动物模型为 9 月龄的 B6C3-Tg 小鼠, 与 AD 动物模型 (AD 组) 相比, miR-92b-3p 在 AD 并发癫痫动物模型 (AD+EP 组) 增加至 2.0 倍 ($P < 0.01$) (见插页 1 图 4A), 而 ADAM10 蛋白则下降至 0.8 倍 ($P < 0.01$) (见插页 1 图 4B)。结果提示, miR-92b-3p 在 AD 并发癫痫这一特殊疾病状态很可能处于异常上调状态。

2.5 miR-92b-3p 的抑制物在 AD 并发癫痫动物模型中的抗癫痫效应

癫痫发作率在 AD+EP 组和治疗组中, 分别为 100% 和 66.7%, 降幅达到 33.3% ($P < 0.05$) (见插页 2 图 5A)。Racine 4 级以上发作率分别为 100% 和 20%, 降幅达到 80% ($P < 0.01$) (见插页 2 图 5B), Racine 4 级以上发作的潜伏期分别为 3.7 min 和 8 min, 增幅达到 2.1 倍 ($P < 0.01$) (见插页 2 图 5C)。结果提示, miR-92b-3p 的抑制物在 AD 并发癫痫动物模型中具有抗癫痫效应。

3 讨论

ADAM10 是一个主要的 α 分泌酶, 其与 β 分泌酶均以淀粉样前体蛋白 (amyloid precursor protein, APP) 为代谢底物, 以竞争性的方式, 分别促进非淀粉样代谢通路和淀粉样代谢通路^[5], 故而 ADAM10 的功能下调, 很可能导致非淀粉样代谢通路活性降低, 间接促进淀粉样代谢通路和 β 淀粉样蛋白沉积, 并在 AD 癫痫发作的病理过程中发挥作用。与此同时, ADAM10 功能下调在早期发生时可以导致皮质发育不良, 而后者是难治性癫痫最主要的病因之一和早发性癫痫的重要来源^[6], 故而 ADAM10 可能是一个潜在的多效性调控分子, 在 AD 并发癫痫人群中发挥关键作用。

事实上, 已有多项研究通过 AD 转基因动物模型确认 ADAM10 功能下调与癫痫表型相关。相比中度过表达 ADAM10/APP 和正常表达 ADAM10 的 APP 转基因动物, ADAM10 (E384A) 功能抑制 Adam10dn/APP 转基因动物遭受较强的痫性发作症状, 伴随较长的恢复时间, 以及海马区域明显的神经退化^[7]。在 ADAM10 基因条件敲除的动物中, 与正常对照相比, 可以见到反复痫性发作后的病死率增加, 提示癫痫损害更重^[3]。

因此,本研究以 ADAM10 为调控靶点,通过生物信息学方法,双荧光素酶实验,Western Blot 条带及其灰度分析,确认 miR-92b-3p 可转录后调控 ADAM10,且在神经元细胞中对 ADAM10 调控作用较强。近年来,有报道提示经鼻腔给药是一种可绕开血脑屏障,通过嗅球和三叉神经鞘间隙进入颅内,是治疗脑部疾病的无创且可行的策略^[8]。非蛋白编码的 miRNAs 是一类具有精确调控下游信号的小分子,可通过经鼻腔给药的方式治疗颅内疾病^[9]。基于此,本研究进一步经鼻腔给予 miR-92b-3p 抑制物,竞争性抑制 miR-92b-3p 的生物学效应,初步证实其在 AD 并发癫痫动物模型中具有抗癫痫效应。

尽管如此,本研究以 ADAM10 为靶点筛选出转录后调控分子 miR-92b-3p,并证实其抑制物具有抗癫痫效应,但是不排除 miR-92b-3p 的其他靶基因共同参与 AD 并发癫痫的调控过程。总体上,本研究既有助于提前应对 AD 并发癫痫等人口老龄化相关医学问题,也有助于从新的角度理解癫痫病理机制,拓展抗癫痫治疗策略。

[参考文献]

- [1] ZAREA A, CHARBONNIER C, ROVELET-LECRUX A, et al. Seizures in dominantly inherited Alzheimer disease [J]. *Neurology*, 2016, 87 (9): 912-919
- [2] POSTINA R, SCHROEDER A, DEWACHTER I, et al. A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model

- [J]. *Clin Invest*, 2004, 113 (10): 1456-1464.
- [3] PROX J, BERNREUTHER C, ALTMPEPPEN H, et al. Postnatal disruption of the disintegrin/metalloproteinase ADAM10 in brain causes epileptic seizures, learning deficits, altered spine morphology, and defective synaptic functions [J]. *Neurosci*, 2013, 33 (32): 12915-12928, 12928a.
- [4] MÜLLER CJ, GRÖTICKE I, HOFFMANN K, et al. Differences in sensitivity to the convulsant pilocarpine in substrains and sublines of C57BL/6 mice [J]. *Genes Brain Behav*, 2009, 8 (5): 481-492.
- [5] O'BRIEN RJ, WONG PC. Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease [J]. *Annu Rev Neurosci*, 2011, 34: 185-204.
- [6] BOZZI Y, CASAROSA S, CALEO M. Epilepsy as a neurodevelopmental disorder [J]. *Front Psychiatry*, 2012, 3: 19.
- [7] SCHROEDER A, FAHRENHOLZ F, SCHMITT U. Effect of a dominant-negative form of ADAM10 in a mouse model of Alzheimer's disease [J]. *Alzheimers Dis*, 2009, 16 (2): 309-314.
- [8] HANSON L R, FREY W H. Intranasal delivery bypasses the blood-brain barrier to target therapeutic agents to the central nervous system and treat neurodegenerative disease [J]. *BMC Neurosci*, 2008, 9 (Suppl 3): S5.
- [9] LEE S T, JEON D, CHU K, et al. Inhibition of miR-203 Reduces Spontaneous Recurrent Seizures in Mice [J]. *Mol Neurobiol*, 2017, 54 (5): 3300-3308.

[文章编号] 1007-0893(2024)11-0007-05

DOI: 10.16458/j.cnki.1007-0893.2024.11.003

医院内智慧化静脉血栓栓塞症防控系统的构建与实现

桂敏 韩云* 黄俊锋 张梦春 杨金星 喻婉莹

(深圳大学第一附属医院 深圳市第二人民医院, 广东 深圳 518035)

[摘要] 静脉血栓栓塞症(VTE)的发生,不仅威胁医疗质量与安全,也给医院管理带来重大挑战。但VTE具有可防可控的特性。随着医院信息化的深入发展,深圳市第二人民医院引入智慧化VTE防控系统,利用人工智能对住院患者进行全程管理,为医护人员提供决策支持。医疗管理部门通过实时监测和分析,形成标准化、规范化的VTE防治管理体系,有效提升防治效率,为医疗安全及质量提供了有力保障。在VTE系统逐步深化的运行过程中,医院的各项能力和标准均持续得到提高。

[关键词] 静脉血栓栓塞症; 智慧化; 信息化; 风险评估; 智能监控

[中图分类号] R 725 **[文献标识码]** B

[收稿日期] 2024-04-25

[基金项目] 广东省高水平临床重点专科(深圳市配套建设经费)资助项目(SZGSP007); 深圳市第二人民医院新技术项目(23.1.5-21)

[作者简介] 桂敏,女,护师,主要研究方向是骨科护理。

[*通信作者] 韩云(E-mail: 13502800301@139.com; Tel: 13502800301)