

MicroRNA-134/CREB/pCREB 通路在癫痫中的表达及意义

王倩¹, 陈阳美¹, 郭靖¹, 杨小兰², 谢运兰³

(1. 重庆医科大学附属第二医院神经内科, 重庆 400010;
2. 资阳市乐至县人民医院神经内科, 四川 资阳 641500;
3. 重庆医科大学附属第二医院中心实验室, 重庆 400010)

【摘要】 目的 探讨 miR-134、CREB、pCREB 在癫痫大鼠海马及难治性癫痫患者颞叶脑组织中的表达及意义。方法 难治性癫痫患者及非癫痫对照组颞叶组织、氯化锂-匹罗卡品癫痫大鼠及空白对照组海马组织中,应用实时荧光定量 PCR 技术检测 microRNA-134(miR-134)的表达,用 Western blot 方法检测 CREB 及 pCREB 的表达,用免疫组织化学方法检测人脑颞叶皮质及大鼠海马区 CREB、pCREB 的表达。结果 与对照组相比 miR-134 表达在难治性癫痫患者中明显降低($P < 0.05$),在癫痫模型组中点燃后 3、7、14、60 d 明显降低($P < 0.05$),1 d 与 30 d 表达降低较对照组差异无显著性($P > 0.05$);癫痫模型组 CREB 在 3、7、14、60 d 时间点明显升高($P < 0.05$)、pCREB 各时间点表达均高于空白对照组($P < 0.05$)。结论 难治性癫痫患者颞叶皮质及癫痫动物海马中 miR-134 表达下降,CREB、pCREB 表达升高,提示其可能在癫痫发生发展机制中起重要作用。

【关键词】 miR-134; CREB; pCREB; 难治性癫痫; 突触重塑

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2014) 06-0028-06

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2014.06.005

Expression and significance of signaling pathway of miR-134/CREB/pCREB in patients with epilepsy and in epileptic rats

WANG Qian¹, CHEN Yang-mei¹, Guo Jing¹, YANG Xiao-lan², XIE Yun-lan³

(1. Department of Neurology, 3. Central Laboratory, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China.

2. Department of Neurology, the People's Hospital of Lezhi, Ziyang 641500, China)

【Abstract】 Objective To investigate the expression of microRNA-134 (miR-134), CREB and pCREB in the temporal lobe tissue of patients and epileptic rats and to explore their roles in pathogenesis of epilepsy. **Methods** Temporal lobe tissue samples of 14 patients with refractory epilepsy and 10 non-epileptic patients, and hippocampus and brain tissue samples of 42 rats were used in this study. Forty-two healthy adult male Sprague-Dawley rats were randomly divided into 6 epilepsy groups (24 h, 72 h, 7 d, 14 d, 30 d, and 60 d after kindling epilepsy) and a normal control group ($n = 6$ for all groups). The rat model of epilepsy was generated by intraperitoneal injection of 127 mg/kg lithium chloride and 16–20 h later, 35 mg/kg pilocarpine. In the temporal lobe tissue of patients and hippocampal tissue of rats, the expression level of miR-134 was detected by real-time polymerase chain reaction. The expression levels of CREB and pCREB were determined by Western blot, and CREB and pCREB localization was assessed by immunohistochemistry. **Results** Compared with the control rats, the expression of miR-134 was significantly decreased in the temporal lobe tissue of experimental rats

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81171225)。

[作者简介] 王倩,女,在读研究生,E-mail: luofuchen_1987@sina.com

[通讯作者] 陈阳美,教授,从事癫痫及神经电生理研究,E-mail: chenym1996@sina.com

at 72 h, 7 d, 14 d, 60 d after kindling ($P < 0.05$), and no significant change at 24 h and 30 d after kindling ($P > 0.05$). Expression of miR-134 in patients with refractory epilepsy was significantly lower than that of the controls ($P < 0.05$), while up-regulation of CREB expression was at the same time points ($P < 0.05$). Up-regulation of pCREB expression was at all the time points after kindling ($P < 0.05$). CREB and p-CREB expressions were seen in the nuclei of neurons, and significantly higher in patients with refractory epilepsy and epileptic rats. **Conclusions** The expression of miR-134 is significantly decreased and that of CREB and pCREB was significantly increased in the temporal lobe tissue of patients with refractory epilepsy and the hippocampal tissue of epileptic rats. These findings indicate that the signaling pathway of miR-134/CREB/pCREB may play an important role in the pathogenesis of epilepsy.

【Key words】 miR-134; CREB; pCREB; Refractory epilepsy; Synaptic plasticity

癫痫(epilepsy)是一种由不同病因引起的以脑神经元高度同步异常放电所致的短暂性脑功能失常为特征的慢性脑部疾病^[1]。癫痫反复发作可导致神经元的坏死和凋亡、特异性突触重塑、胶质增生及苔藓纤维出芽等,其中特异性突触重塑及苔藓纤维出芽可促进异常兴奋性环路的形成,进而发展成为难治性癫痫^[2-7]。大量癫痫病理生理研究研究表明,异常的轴突、树突的生长发育形成了异常的突触,这可能是导致异常的兴奋性神经环路形成的原因之一,从而促使了癫痫的发生与发展。树突棘位于突触后成分中,其形成和降解的动态变化被认为是突触可塑性的标志^[8,9]。Schratt 等^[10]研究结果显示 microRNA-134(miR-134)可调控树突棘的形态。CREB 是神经元可塑性重要的调节因子,其磷酸化活性形式对树突生长和树突精细结构的调节起重要作用^[11-14]。而 miR-134 通过转录后机制调节 CREB 蛋白的表达,miR-134 过表达可抑制 CREB 的翻译负性调节突触可塑性;反之则增加突触的可塑性^[15]。本研究通过观察难治性癫痫组与非难治性癫痫组颞叶组织、正常对照与癫痫模型大鼠海马组织 miR-134、CREB、pCREB 的表达变化,探讨 miR-134/CREB/pCREB 信号通路在癫痫发生发展过程中的可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

42 只清洁级成年雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠来自重庆医科大学实验动物中心【SCXK(渝)2012-0002】,体重(200 ± 20) g,6 ~ 8 周龄,饲养于环境温度 22 ~ 26℃,湿度 50% ~ 60%,12 h 昼夜循环,自由进食及饮水的标准环境中【SYXK(渝)2010-0002】,所有试验过程遵照重庆医科大学动物伦理委员会的规定。将实验动物按随机数字表法分为对照组及癫痫点燃后 1、3、7、14、30、60 d

组,每组 6 只。

1.2 氯化锂—匹罗卡品癫痫模型

癫痫组大鼠腹腔注射氯化锂 127 mg/kg,16 ~ 20 h 后注射匹罗卡品 35 mg/kg(Sigma 公司),在注射匹罗卡品 30 min 前注射阿托品 1 mg/kg,发作严重程度按照 Racine 分级^[16]方法(0 级:无任何反应; I 级:面部阵挛,包括眨眼、动须、节奏性咀嚼等; II 级: I 级加节律性点头; III 级: II 级加前肢阵挛; IV 级: III 级加后肢站立; V 级: IV 级加摔倒),实验动物连续 3 次达到 IV-V 级发作即被认为达到癫痫持续状态(status epilepticus, SE),SE 点燃后 45 min 腹腔给予地西洋 10 mg/kg 终止发作,未达到标准的大鼠反复给予匹罗卡品 10 mg/kg,每 15 min 一次,直至出现 SE 为止,每只大鼠总量不超过 50 mg/kg。对照组大鼠腹腔注射生理盐水代替匹罗卡品,其余处理同癫痫组。

1.3 人颞叶组织标本

(1)实验中所涉及的 14 例难治性癫痫患者颞叶病灶标本来自第三军医大学新桥医院。进行外科手术的患者其临床表现均达到难治性癫痫的诊断标准:正规使用 3 种及以上 AES 药物,血药浓度处于维持水平,使用 2 年仍不能控制癫痫发作;每月痫性发作 4 次以上;排除其他中枢神经系统疾病。病灶病理改变主要为:神经元缺失、变性、胶质细胞增生,取材部位为颞叶皮质;患者平均年龄:(20.38 ± 10.22)岁。

(2)10 例非癫痫对照组标本来源于第三军医大学新桥医院神经外科,患者为颅脑损伤,颅内高压,需外科开颅减压者。纳入标准为:诊断脑外伤明确,其他非癫痫颅脑疾病引起的颅内高压,需手术治疗,术后病理检查脑组织结构正常;无癫痫病史和家族史;取材部位为颞叶皮质。患者平均年龄:(36.80 ± 13.01)岁。

1.4 试剂

齐鲁卡品 (Sigma 公司, 美国), RNA 提取、SYBR Premix Ex Taq™ II、RNAiso Plus、PrimeScript RT reagent Ki 试剂盒 (TaKaRa 公司, 中国大连), U6 及 miR-134 特异性反转录及 PCR 引物 (南京金斯瑞, 中国南京), 全蛋白提取试剂盒 (凯基公司, 中国南京), BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (增强型) (碧云天公司, 中国上海), CREB、pCREB 多克隆一抗 (Cell Signaling Technology, 美国), NPY (武汉三鹰公司, 武汉)。

1.5 组织处理

(1) 将术中获得的人脑颞叶皮质标本分成两部分: 一份保存于液氮中作为 RT-PCR 及 Western blot 的实验材料; 一份放入 4% 多聚甲醛中保存 24h 后石蜡包埋组织, 并将组织切成 5 μ m 厚度, 作为免疫组化实验材料。

(2) 造模成功后每组 3 只大鼠腹腔注射 3.5% 水合氯醛 1mL/kg 后断头取脑, 分离出两侧海马, 立即浸入液氮中分别用于 RT-PCR 及 Western blot 检测。其余大鼠用 4% 多聚甲醛灌注固定后分离大脑, 用石蜡包埋后冠状位切片, 厚 5 μ m, 用于免疫组织化学分析。

1.6 实时荧光定量 PCR 检测

取液氮保存的人颞叶皮质标本及大鼠海马组织提取总 mRNA。采用 RNAiso plus 试剂 (TaKaRa 公司), 按操作说明书提取。提取的总 RNA 样本在加入 RNase-free 水完全溶解 RNA 沉淀后 -80 $^{\circ}$ C 中保存。RNA 的浓度和纯度用 260 / 280 nm 下检测, 260 / 280 nm 在 1.9 ~ 2.20 之间。反转录实验采用 TaKaRa 的反转录试剂盒, 步骤为 ① 37 $^{\circ}$ C 60 min; ② 85 $^{\circ}$ C 5 s。反应在 96 孔 PCR 板中进行, 每个反应做 3 个复孔。PCR 反应体系为 20 μ L, RT 1 μ L, 上下游引物各 0.5 μ L, SYBR Green 荧光染料 (TaKaRa 公司) 10 μ L, 去离子水 8 μ L。反应条件为 ① 95 $^{\circ}$ C, 30 s; ② 95 $^{\circ}$ C, 5 s, 60 $^{\circ}$ C, 20 s, 40 个循环。miR-134 和 β -actin 的标准曲线保证扩增的效率在 90% ~ 110% 之间。扩增和溶解曲线及数据用 Bio-Rad CFX Manager 软件分析。实时定量 PCR 双向引物序列: miR-134: 5'-GGGCTGTGACTGCTTGAC-3' (南京金斯瑞, 中国), U6: F: 5'-GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT-3'; R: 5'-CGCTTCACGAATTTGCGTGCAT-3'。结果用平均 2 $^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行分析。

1.7 Western blot 检测

人颞叶皮质组织、海马组织提取全蛋白, 根据全

蛋白提取试剂盒说明提取, BCA 法检测蛋白浓度。聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白: 转膜采用全湿法, 按照 3 张滤纸、PVDF 膜、完成电泳的胶、3 张滤纸的顺序依次排放, 250 mA 电流电转 1 h; 5% 脱脂奶粉 37 $^{\circ}$ C 封闭 1 h; 分别加入 PBS 稀释过的 marker 蛋白 (β -actin, 1:1000)、兔多克隆 CREB 一抗 (1:100) 及兔多克隆 pCREB 一抗 (1:50), 4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜; TBST 摇洗 10 min \times 4 次; 加入 TBST 稀释的 HRP 标记的山羊抗兔二抗 (1:4000), 与膜 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h; 再次 TBST 摇洗 10 min \times 4 次; ECL 显色。应用 Quantity One 图像分析软件, 计算 PVDF 膜上条带的光密度值。用目的条带的光密度值比相应内参 β -actin 条带的光密度值得到该蛋白在组织中的表达量。

1.8 免疫组织化学检测

将组织切片在二甲苯中脱蜡, 梯度酒精中脱水。自来水冲洗 5 min, PBS 磷酸盐缓冲液中浸泡 3 min 后于 3% H₂O₂ 37 $^{\circ}$ C 反应 10 min, 以灭活内源性过氧化物酶, PBS 缓冲液冲洗 3 min \times 3 次, 用枸橼酸抗原修复, 煮沸 3 min, 92 ~ 98 $^{\circ}$ C 15 min, 室温自然冷却后 PBS 缓冲液冲洗 5 min \times 3 次, 滴加正常山羊封闭血清, 37 $^{\circ}$ C 30 min; 甩去多余血清加入稀释后的兔多克隆 CREB 一抗 (1:400), 兔多克隆 pCREB 一抗 (1:100), 阴性对照组用 PBS 代替一抗, 4 $^{\circ}$ C 冰箱中过夜, 第二日 37 $^{\circ}$ C 孵育 60 min 复温, PBS 缓冲液冲洗 5 min \times 3 次, 滴加生物素标记羊抗兔二抗工作液 (中杉金桥), 37 $^{\circ}$ C 30 min, PBS 冲洗 5 min \times 3 次, 辣根酶标记链酶卵白素工作液 (中杉金桥) 37 $^{\circ}$ C 30 min, PBS 冲洗 5 min \times 3 次, DAB 显色, 经苏木素复染, 酒精梯度脱水, 二甲苯透明, 中性树脂封片。采用奥林巴斯 BX51 自动图片采集系统采集图片。

1.9 统计学分析

使用 SPSS 17 软件对数据进行统计学分析, 对计量资料数据进行正态性检验, 采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组均数比较采用 *t* 检验, 多组均数采用单因素方差分析中的 LDS 检验, $P < 0.05$ 差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 实时荧光定量 PCR 测定 miR-134

在大鼠癫痫点燃后 72h (0.026 \pm 0.014)、7 d (0.021 \pm 0.007)、14 d (0.008 \pm 0.005)、60 d (0.015 \pm 0.004) miR-134 的表达水平相对于正常对照组 (0.034 \pm 0.017) 表达明显降低 ($P < 0.05$), 14 d 达

到最低,而在 1 d (0.031 ± 0.018)、30d (0.030 ± 0.012) 时间点无明显差异 ($P > 0.05$);在难治性癫痫患者颞叶皮质中 miR-134 的表达 (0.062 ± 0.039) 较对照组 (0.137 ± 0.086) 明显降低 ($P < 0.05$), 差异具有统计学意义。见图 1。

2.2 Western blot 检测结果

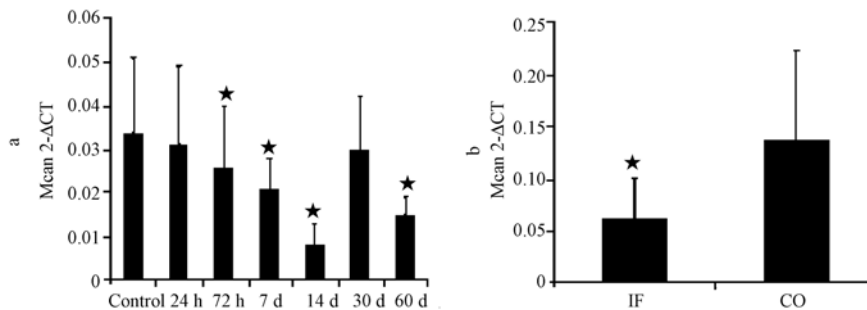
2.2.1 CREB 在人颞叶皮质及癫痫大鼠脑组织中的表达

CREB 在人颞叶皮质及大鼠海马中均有表达,在癫痫大鼠点燃成功后 1 d (0.214 ± 0.088) 及 30 d (0.273 ± 0.117) 表达较对照组 (0.225 ± 0.04) 无明显变化 ($P > 0.05$), 在 3 d (0.423 ± 0.123)、7 d (0.416 ± 0.079)、14 d (0.44 ± 0.054)、60 d (0.382 ± 0.052) 较对照组明显增加 ($P < 0.05$);人颞叶皮

质中难治性癫痫组 CREB 表达 (0.335 ± 0.177) 较非难治性癫痫对照组表达 (0.180 ± 0.068) 增加 ($P < 0.05$), 差异具有显著性。见图 2。

2.2.2 pCREB 在人颞叶皮质及癫痫大鼠脑组织中的表达

pCREB 在人颞叶皮质及大鼠海马中均有表达,在癫痫大鼠点燃成功后 1 d (0.386 ± 0.055)、3 d (0.425 ± 0.082)、7 d (0.379 ± 0.074)、14 d (0.517 ± 0.126)、30 d (0.492 ± 0.037)、60 d (0.441 ± 0.075) 表达较对照组 (0.174 ± 0.045) 均明显增加 ($P < 0.05$);人颞叶皮质中难治性癫痫组 pCREB 表达 (0.43 ± 0.18) 较非难治性癫痫对照组表达 (0.27 ± 0.115) 增加 ($P < 0.05$), 差异有显著性。见图 3。

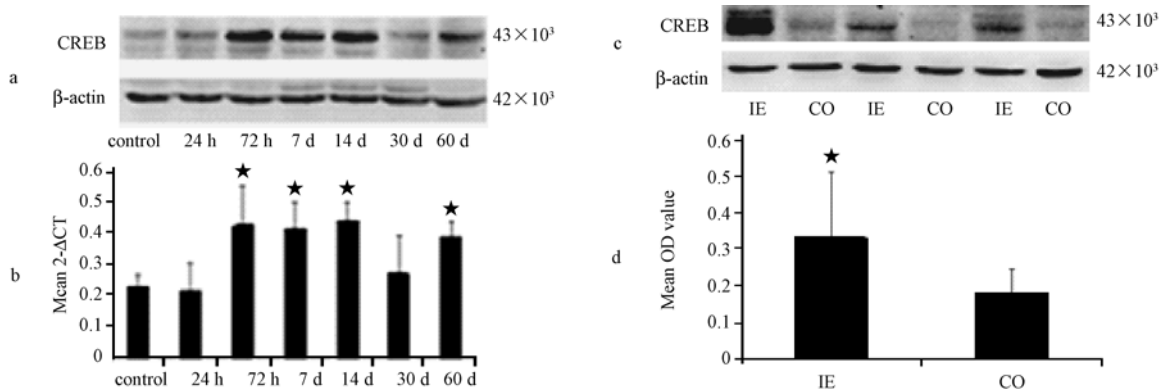


注:癫痫模型组(a),临床标本(b)比较, * $P < 0.05$ 。

图 1 荧光定量 PCR 测定 miR-134 表达水平

Note. * $P < 0.05$ vs. a; Rat model; * $P < 0.05$ vs. b; Clinical samples.

Fig. 1 Expression of miR-134 in brain tissues detected by quantitative fluorescence PCR



注:癫痫模型(a;b)临床样本(c;d)比较, * $P < 0.05$ 。

图 2 Western blot 方法分析 CREB 的表达水平

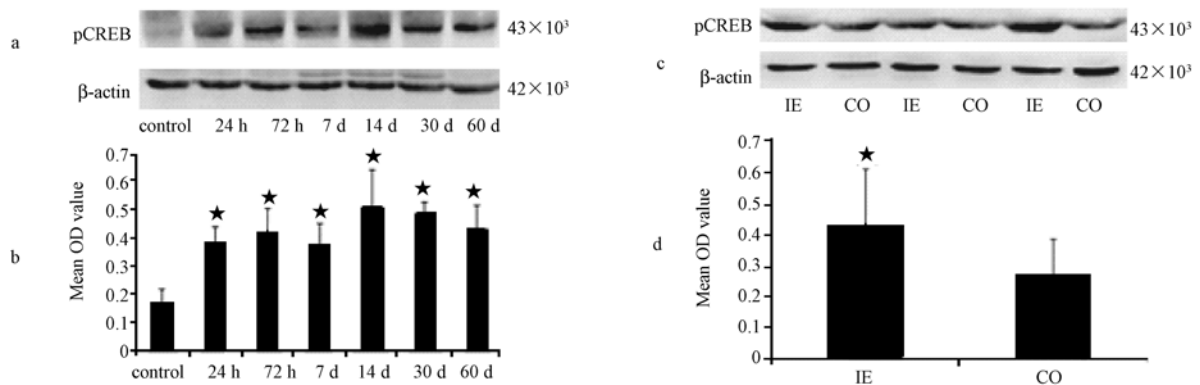
Note: * $P < 0.05$ vs. a;b; Rat model; * $P < 0.05$ vs. c;d; Clinical samples.

Fig. 2 Expression of CREB in brain tissues analyzed by western blotting

2.3 免疫组化结果

2.3.1 CREB 在癫痫大鼠脑组织中的表达

癫痫大鼠脑组织的海马区 CREB 阳性表达主要见于齿状回、CA1 及 CA3 区神经元胞核。癫痫模型



注:癫痫模型(a;b)临床样本(c;d)比较, * $P < 0.05$ 。

图3 Western blot 方法分析 pCREB 的表达水平

Note: * $P < 0.05$ vs. a;b; rat model; * $P < 0.05$ vs. c;d; clinical samples.

Fig. 3 Expression of pCREB in brain tissues determined by western blotting

组 72h 时间点 CREB 表达明显多于正常对照组见图 4(彩插 3)。人颞叶皮质中 CREB 阳性表达主要存在于神经元细胞核中,且癫痫组明显多于对照组见图 5(彩插 3)。

2.3.2 pCREB 在癫痫大鼠脑组织中的表达

癫痫大鼠脑组织的海马区 pCREB 阳性细胞主要见于齿状回、CA1 及 CA3 区神经元胞核。癫痫模型组 72h 时间点 CREB 表达明显强于正常对照组见图 6(彩插 2)。人颞叶皮质中 pCREB 阳性表达主要存在于神经元细胞核中,且癫痫组明显多于对照组见图 7(彩插 2)。

3 讨论

颞叶癫痫是一种常见的慢性神经系统疾病,其特征为复发性癫痫^[1-3]。大量病理研究分析表明,苔藓纤维出芽(mossy fiber sprouting, MFS)和特异性突触重组是造成难治性癫痫的主要病理基础,其中 MFS 是突触重组的主要形式,广泛存在于难治性癫痫患者标本和癫痫动物模型中^[17,18]。氯化锂-匹罗卡品大鼠是理想的颞叶癫痫模型,急性期表现为癫痫持续状态,随后有大约两周的潜伏期是异常兴奋性环路形成的关键时期并伴随动物一生,慢性期主要表现为自发性反复发作^[28],这与人类难治性癫痫的发生发展机制较为相似。众多研究显示^[19,20], microRNA(miR) 是一类长 20bp 左右具有高度保守性的,内源性非编码小 RNA,其作为广泛存在与哺乳动物中枢神经系统中的基因表达调控因子,在神经系统发育、神经细胞分化、树突生长和突触重组中起重要作用。它主要通过核酸特异性序列的互补结合,在蛋白质翻译水平降解靶 mRNA 或抑制其表

达,从而起到沉默基因、调控表达的作用。越来越多研究表明^[7-9],树突棘作为突触后成分,是突触后兴奋性传导的重要部位,突触重塑与脑中一些特殊表达的 miR 密切相关。

miR-134 是脑内一种特殊的小 RNA,广泛分布于海马神经元上,参与调控神经元的微观结构,负性调节树突棘的大小并通过调节树突功能而参与癫痫的病理发生过程。miR-134 过表达可减小树突棘的体积^[21-23]。对临床标本检测中,miR-134 在难治性癫痫组表达明显低于非癫痫组;在动物实验中,miR-134 在癫痫大鼠模型成功点燃后 72h 开始下降,直到 60d 仍保持低水平,人及动物标本中这种在癫痫慢性期长期保持低水平的状态可能与癫痫慢性期重塑后的突触稳定性增加,及稳定的异常神经网络形成有关。CREB 存在于脑内所有细胞细胞核中,是转录因子蛋白家族的成员,参与了许多细胞内信号通路的信号传递,有研究表明 CREB 可促进记忆涉及新的突触联系生长或形成^[24]。当细胞膜受到刺激时可引起胞内 CREB 的转录发生变化,而 CREB 则通过改变靶基因的表达,调节神经元所有类型蛋白的表达,进而影响单个神经功能最终影响整个神经回路。在发育成熟神经元中,转录因子 CREB 在树突生长^[25]和活性调节树突的精细结构方面起重要作用^[26],其调节基因转录的关键步骤包括二聚体形成,结合到 DNA 反应原件以及磷酸化。CREB 蛋白的生物学活性受磷酸化的调控,磷酸化作用可以增强 CREB 的转录活性。miR-134 通过转录后机制调节 CREB 蛋白的表达,在正常状态下,miR-134 对 CREB 蛋白的表达起抑制作用,miR-134 表达增加,对 CREB 的抑制加强^[27];反之,miR-134 表达降低

对 CREB 蛋白的翻译抑制作用解除导致 CREB 表达升高,并增加其磷酸化的功能活性形式(pCREB)含量,具有功能活性的 pCREB 可促进下游 miR-132 表达上调进而激活相关信号通路,导致细胞骨架肌动蛋白聚合,增加树突棘的密度及体积最终调节突触的可塑性,促使苔藓纤维出芽形成异常神经网络,导致癫痫长期反复发作及耐药。在癫痫临床标本及动物模型中 CREB 与 pCREB 表达较对照组均明显且保持上升,CREB 磷酸化生物活性增强表明 CREB/pCREB 可能参与了癫痫的病理发生发展过程。miR-134、CREB、pCREB 在癫痫发生发展过程中的表达结果提示,miR-134/CREB/pCREB 通路可能参与了癫痫慢性期突触可塑性变化的调节。

我们通过检测难治性颞叶癫痫患者及癫痫大鼠模型各时间点 miR-134、CREB、pCREB 的表达情况,在一定程度上推测 miR-134/CREB/pCREB 通路参与了人及大鼠癫痫的病理发生发展机制,为进一步探讨该通路下游信号通路对癫痫的影响提供了理论及实验基础。然而,在不同种属脑组织内,CREB 表达以及功能激活所受到的诸多调控因素可能有所不同,故以 miR-134/CREB/pCREB 为基础探讨癫痫的病理发生发展机制还需更全面的深入研究。

(彩插 4,5 见彩插 2,彩插 6,7 见彩插 3)。

参 考 文 献

- [1] Schmidt D, Löscher W. Drug resistance in epilepsy: putative neurobiological and clinical mechanisms [J]. *Epilepsia*, 2005, 46: 858 - 77.
- [2] Benzgon J, Mohapel P, Ekdahl CT, et al. Neuronal apoptosis after brief and prolonged seizures [J]. *Prog Brain Res*, 2002, 135:111 - 9.
- [3] Sperk G, Drexel M, Pirker S. Neuronal plasticity in animal models and the epileptic human hippocampus [J]. *Epilepsia*, 2009, 50 Suppl 12: 29 - 31.
- [4] DeFelipe J. Chandelier cells and epilepsy [J]. *Brain*. 1999; 122:1807 - 1822.
- [5] McNamara JO, Huang YZ, Leonard AS. Molecular signaling mechanisms underlying epileptogenesis [J]. *Sci STKE*. 2006, 2006;re12.
- [6] Wetherington J, Serrano G, Dingleline R. Astrocytes in the epileptic brain [J]. *Neuron*, 2008, 58:168 - 178.
- [7] Vezzani A, French J, Bartfai T, et al. The role of inflammation in epilepsy [J]. *Nat Rev Neurol*, 2011, 7:31 - 40.
- [8] Bonhoeffer T, Yuste R. Spine motility. Phenomenology, mechanisms, and function [J]. *Neuron*, 2002, 35:1019 - 1027.
- [9] Hering H, Sheng M. Dendritic spines: structure, dynamics and regulation [J]. *Nature Rev Neurosci*. 2001, 2: 880 - 888.
- [10] Schrott GM, Tuebing F, Nigh EA, et al. A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development [J]. *Nature*, 2006, 439: 283 - 289.
- [11] Frank DA, Greenberg ME. CREB: A mediator of long-term memory from mollusks to mammals [J]. *Cell*, 1994, 79(1): 5 - 8.
- [12] Flavell SW, Greenberg ME. Signaling mechanisms linking neuronal activity to gene expression and plasticity of the nervous system [J]. *Ann Rev Neurosci*, 2008, 31(1): 563 - 590.
- [13] Redmond L, Kashani AH, Ghosh A. Calcium regulation of dendritic growth via CaM kinase IV and CREB-mediated transcription [J]. *Neuron*, 2002, 34(6): 999 - 1010.
- [14] Wayman GA, Impey S, Marks D, et al. Activity-dependent dendritic arborization mediated by CaM-kinase I activation and enhanced CREB-dependent transcription of wnt-2 [J]. *Neuron*, 2006, 50(6): 897 - 910.
- [15] Gao J, Wang WY, Mao YW, et al. A novel pathway regulates memory and plasticity via SIRT1 and miR-134 [J]. *Nature*, 2010, 466(7310):1105 - 1109.
- [16] Racine R. Modification of seizure activity by electrical stimulation II motor seizure [J]. *Electroencephalogr Clinl Neurophysiol*, 1972, 32(3): 281 - 294.
- [17] Oyegbile TO, Dow C, Jones J, et al. The nature and course of neuropsychological morbidity in chronic temporal lobe epilepsy [J]. *Neurology*, 2004, 62: 1736 - 1742.
- [18] 肖占琴,陶树新,陈阳美. microRNA 在神经系统疾病发病机制中的作用 [J]. *中华神经医学杂志*, 2011, 10(2): 204 - 206.
- [19] 王学峰,肖波,孙红斌,等. 难治性癫痫 [M]. 上海:上海科技出版社, 2003: 1 - 3.
- [20] André V, Dubé C, François J, et al. Pathogenesis and pharmacology of epilepsy in the lithium-pilocarpine model [J]. *Epilepsia*, 2007, 48(Suppl 5): 41 - 47.
- [21] Campbell DS, Holt CE. Chemotropic responses of retinal growth cones mediated by rapid local protein synthesis and degradation [J]. *Neuron*, 2001, 32(6): 1013 - 1026.
- [22] Kang H, Schuman EM. A requirement for local protein synthesis in neurotrophin-induced hippocampal synaptic plasticity [J]. *Science*, 1996, 273(5280): 1402 - 1406.
- [23] Zhang X, Poo MM. Localized synaptic potentiation by BDNF requires local protein synthesis in the developing axon [J]. *Neuron*, 2002, 36(4):675 - 688.
- [24] Katz LC, Shatz CJ. Synaptic activity and the construction of cortical circuits[J]. *Science*, 1996, 274(5290):1133 - 1138.
- [25] Shaywitz AJ, Greenberg ME. CREB: A stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals [J]. *Ann Rev Biochem*, 1999, 68(1): 821 - 861.
- [26] Vo N, Klein ME, Varlamova O, et al. A cAMP-response element binding protein-induced microRNA regulates neuronal morphogenesis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(45): 16426 - 16431.
- [27] Mayr B, Montminy M. Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001, 2(8): 599 - 609.

[收稿日期] 2014-09-19