

LOC389023在难治性颞叶癫痫中分子海绵机制的预测

温跃桃¹, 姜 维², 吴昆仑¹, 石全红¹

(1. 重庆医科大学附属第一医院神经外科, 重庆 400016; 2. 山东大学齐鲁医院神经内科, 山东 济南 250012)

摘要:【目的】研究可能与 LOC389023 和二肽基肽酶 10(DPP10)作用的 microRNA 在难治性颞叶癫痫患者皮质中的表达变化,预测 LOC389023 在颞叶癫痫中的分子海绵机制。【方法】15 例脑外伤患者切除的皮质为正常组,26 例难治性颞叶癫痫患者行癫痫灶切除的皮质为癫痫组。运用 western blot、免疫组织化学染色检测 DPP10 和电压依赖性钾通道 4.3(Kv4.3)的表达变化,采用免疫荧光染色对 DPP10 和 kv4.3 进行定位,采用免疫共沉淀分析 DPP10 与 Kv4.3 的相关性。运用 miRanda、Pita、TargetScan 和 miRDB 软件分别预测与 LOC389023 以及 DPP10 相互作用的 microRNA。采用 qPCR 技术检测 LOC389023 以及 microRNA 的表达变化。【结果】免疫组织化学染色和 western blot 分析结果显示,DPP10 在癫痫组中高表达($P < 0.05$),Kv4.3 则低表达($P < 0.05$);DPP10 与 Kv4.3 共表达于神经元的细胞膜且两者有相互作用;通过软件预测得到 5 个候选 microRNA(miR-32-5p, miR-140-5p, miR-367-3p, miR-25-3p 和 miR-4325);qPCR 检测结果显示:在癫痫组中,LOC389023 和 miR-140-5p 表达水平均低于对照组($P < 0.05$),miR-25-3p 和 miR-367-3p 表达水平均高于对照组($P < 0.05$),而 miR-32-5p 和 miR-4325 无明显变化($P > 0.05$)。【结论】LOC389023 可能以分子海绵的机制调控 miR-25-3p 和 miR-367-3p,继而调控 DPP10 的表达参与癫痫的形成。

关键词: 难治性颞叶癫痫;分子海绵机制;LOC389023;DPP10;Kv4.3

中图分类号:R742.1

文献标志码:A

文章编号:1672-3554(2017)01-0106-07

Forecasting of Molecular Sponge Mechanism Mediated by LOC389023 in Patients with Intractable Temporal Lobe Epilepsy

WEN Yue-tao¹, JIANG Wei², WU Kun-lun¹, SHI Quan-hong¹

(1. Department of Neurosurgery, The First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China;

2. Department of Neurology, Qilu Hospital of Shandong University, Jinan 250012, China)

Corresponding to: SHI Quan-hong, E-mail: 417149803@qq.com

Abstract: 【Objective】To forecast the sponge mechanism mediated by LOC389023 in patients with intractable temporal lobe epilepsy (TLE), through investigating the expression of microRNA interacted with dipeptidyl peptidase 10 (DPP10) and LOC389023. 【Methods】The expression of DPP10 and Kv4.3 were detected in 15 temporal neocortex from patients with brain trauma (control group) and in 26 temporal neocortex from patients with intractable TLE (epilepsy group) by western blot (WB) and immunohistochemical (IHC) staining. The location of DPP10 and voltage dependent potassium channel 4.3 (Kv4.3) was detected by immunofluorescent (IF) staining. The interaction between DPP10 and Kv4.3 was testified by co-immunoprecipitation (Co-IP). The expression of microRNA obtained by softwares (miRanda, Pita, TargetScan and miRDB) was detected by qPCR. 【Results】IHC and WB showed an increased expression of DPP10 ($P < 0.05$) and a decreased expression of Kv4.3 ($P < 0.05$) in the epilepsy group. IF showed that the DPP10 and the Kv4.3 co-expressed in the membrane and the cytoplasm of neurons. Co-IP showed obvious interaction between the DPP10 and the Kv4.3. Five microRNA (miR-32-5p, miR-140-5p, miR-367-3p, miR-25-3p, miR-4325) were obtained by softwares. No significant differences in the expression of miR-32-5p and miR-4325 were found between epilepsy group and control group by qPCR ($P > 0.05$). But decreased expression of LOC389023 and miR-140-5p and increased expression of miR-25-3p and miR-

收稿日期:2016-09-13

基金项目:重庆市卫生局重点资助项目(2013-1-005)

作者简介:温跃桃,硕士研究生, E-mail: 376311868@qq.com; 石全红,通信作者,主任医师,硕士生导师, E-mail: 417149803@qq.com

367-3p were found in epilepsy group compared to control group ($P < 0.05$). 【Conclusion】 miR-25-3p and miR-367-3p may be regulated by LOC389023 through the sponge mechanism followed by altered expression of DPP10 in intractable temporal lobe epilepsy.

Key words: intractable temporal lobe epilepsy; molecular sponge mechanism; LOC389023; DPP10; Kv4.3

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2017, 38(1):106-112]

癫痫是神经系统的第二大常见疾病,我国流行病学资料显示癫痫的患病率为0.09%~0.48%,由于离子通道异常对癫痫的形成至关重要,因此癫痫也常被称为“离子通道病”^[1-2]。电压门控钾离子通道(voltage-gated potassium channel, Kv)在调节神经元兴奋性等生理功能中起重要作用,而Kv4.3参与形成的一种阈下电流 I_{sa} 可以降低神经元的兴奋性,改善神经元的异常放电^[3-5]。二肽基肽酶10(dipeptidyl peptidase 10, DPP10)是Kv4.3的调节蛋白,其受到上游的长链非编码RNA(long noncoding RNA, LncRNA)LOC389023(DPP10-AS1)的调控。近年来研究表明,LncRNA通过分子海绵机制抑制microRNA继而影响靶基因的表达成为许多蛋白的普遍调控机制^[6]。而LOC389023与DPP10之间的分子海绵机制尚未报道,鉴于DPP10与癫痫关系密切,本实验试图运用生物信息学的方法找出能与LOC389023和DPP10相互作用的microRNA,并预测LOC389023在癫痫中可能的分子海绵机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 兔抗DPP10抗体购自于美国Abgent公司,山羊抗DPP10购自于美国Santa Cruz公司,兔抗Kv4.3购自于中国博奥森公司。兔抗IgG购自于美国Abcam公司,小鼠抗NeuN购自于美国Millipore公司,兔抗GFAP购自于中国博士德公司兔抗 β -actin、FITC标记的驴抗小鼠和辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG购自于美国proteintech公司,Dylight633标记的驴抗山羊购自于美国ImmunoReagents公司,Alexa Fluor555标记的驴抗兔、ProteinA+G Agarose、组织裂解液RIPA、蛋白酶抑制剂PMSF、BCA蛋白浓度测定试剂盒以及western blot试剂购自于中国碧云天公司,免疫组织化学染色试剂盒购自于中国中杉金桥公司。LincRNA以及microRNA的引物购自于中国锐博公司,qPCR相关试剂购自于中国takara公司。冰冻

切片机和石蜡切片机均为德国的Leica公司,凝胶成像分析系统(Bio Rad),共聚焦显微镜(Nikon 1R)。

1.1.2 人标本的采集 人体皮质标本取自于2013年1月至2016年1月在重庆医科大学附属第一医院、第三军医大学大坪医院、第三军医大学新桥医院等医院手术的患者。本研究符合重庆医科大学医学研究伦理委员会和赫尔辛基宣言的各项要求,所有患者都签署了知情同意书。癫痫组病人入选标准:①各种诊断包括影像、电生理等明确诊断为癫痫;②排除其他神经系统疾病引起的癫痫发作;③术中进行了神经导航、影像学等进行癫痫灶的定位,确定切除的皮质为癫痫灶;④患者对三种或三种以上抗癫痫药耐药。对照组的入选标准为:①无癫痫发作史,无服用抗癫痫药物史;②明确诊断为急性脑外伤患者;③排除脑外伤以外的其他疾病。

1.2 方法

1.2.1 Western blot 检测DPP10和Kv4.3蛋白表达 从液氮中取出各组皮质组织,按组织质量(mg)、PMSF(μ L)及RIPA(μ L)以1:0.1:10的比例混合,匀浆器充分研磨后静置30 min,4℃12 000 $\times g$ 离心10 min后收集上清,即为总蛋白溶液,按BCA试剂盒说明书步骤检测总蛋白的浓度。将5X SDS上样缓冲液与上清液以1:4体积比混合后,沸水变性5 min。变性后的蛋白上样与SDS-PAGE,经电泳电转后,蛋白转至于PVDF膜上。5%脱脂奶粉室温封闭1 h,分别以兔抗DPP10(1:1 000)、兔抗Kv4.3(1:400)、兔抗 β -actin(1:3 000)4℃过夜。用TBST清洗PVDF膜3次,每次10 min,然后用辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG(1:2 000)室温孵育1 h。用TBST清洗后用化学发光法采集图像。用Quantity One分析光密度,计算DPP10/ β -actin和Kv4.3/ β -actin的值。

1.2.2 免疫组织化学染色观察DPP10和Kv4.3蛋白表达 新鲜的组织立即用PBS冲洗,经40 g/L多聚甲醛溶液固定12 h后程序脱水,石蜡包埋,用石蜡切片机连续切片,进行免疫组织化学染色。脱蜡水化后进行3% H_2O_2 阻断,0.01 mol/L柠檬酸

抗原修复缓冲液微波修复,山羊血清封闭后滴加兔抗 DPP10(1:1 000)、兔抗 Kv4.3 4 ℃过夜,复温 1 h后,PBS洗涤3次,每次5 min,滴加生物素化山羊抗兔 IgG,SABC 孵育后,DAB显色,常规梯度乙醇脱水干燥,二甲苯透明,中性树胶封片。运用 OLYMPUS PM20 全自动显微镜在 400 倍显微镜下拍照,通过 Image-Pro Plus 6.0 软件进行光密度分析 DPP10、Kv4.3 的平均光密度。

1.2.3 免疫荧光染色对 DPP10 和 Kv4.3 蛋白定位 新鲜的组织立即用 PBS 冲洗,经多聚甲醛溶液固定 12 h后,15%蔗糖脱水,沉底后换 30%蔗糖,沉底后用冰冻切片机制片,-80 ℃保存。进行免疫荧光染色,取出冰冻切片,丙酮固定 30 min,PBS洗3次,每次5 min,0.4% Triton 37 ℃破膜 20 min,PBS洗3次,每次5 min,切片放入柠檬酸抗原修复液中,微波炉中高火 3 min,低火 15 min,用驴血清封闭液 37 ℃封闭 2 h,分别用羊来源 DPP10(1:20),小鼠来源 NeuN(1:100),兔来源 GFAP(1:50)混合物和羊来源 DPP10(1:20),兔来源 Kv4.3(1:10)混合物 4 ℃过夜,37 ℃复温 1 h,PBS清洗后滴加驴抗羊 Dylight633(1:50)、驴抗小鼠 FITC(1:50)、驴抗兔 555(1:50)37 ℃孵育 1 h,PBS清洗后滴加 DAPI(1:20)室温孵育 10 min,PBS清洗后 1:1 甘油封片,用共聚焦显微镜采集图像。

1.2.4 免疫共沉淀检测 DPP10 与 Kv4.3 的相互性 从液氮中取出脑组织,用含有 PMSF 的 RIPA 裂解组织,充分研磨后 4 ℃静置 30 min,4 ℃ 12 000 ×g 离心 10 min 后收集上清,将 ProteinA+G Agarose 与上清液以 1:10 体积比混合,并加入一定量的兔抗 IgG,在 4 ℃缓慢摇动 1 h 去除非特异性结合,4 ℃ 1 000 ×g 离心 5 min 后收集上清。取出一定量的上清,将 5X SDS 上样缓冲液与上清液以 1:4 体积比混合后,沸水变性 5 min 后保存于-80 ℃备用,这部分蛋白即为阳性对照组(input)。余上的上清分为 3 管,每管中加入一定量的兔抗 Kv4.3、兔抗 DPP10 和兔抗 IgG 4 ℃缓慢摇动过夜。每管中加入 40 μL 的 ProteinA+G Agarose 4 ℃缓慢摇动 3 h。4 ℃ 1 000 ×g 离心 5 min 后弃上清,每管中加入 500 μL 冰的 PBS,轻轻上下颠倒后 4 ℃ 1 000 ×g 离心 5 min,弃掉上清,重复上述步骤至少 3 次。每管中加入 50 μL 1X SDS 上样缓冲液后沸水变性 5 min。然后采用 western blot 实验验证相关性。

1.2.5 与 LOC389023 相互作用的 microRNA 预测^[7-9] miRanda 是著名 Memorial Sloan-Kettering 癌症研究中心的研究人员开发的软件,其主要强调 miRNA 与靶基因连接位点的进化保守性,亦偏重于以 miRNA 的 5' 端序列搜索靶基因,并采用 RNAFold 计算热力学稳定性。Pita,由著名的生物信息学家 Segal 实验室开发,基于靶位点的可接性(target-site accessibility)和自由能预测 microRNA 的靶标。本研究采用上软件进行预测。

1.2.6 与 DPP10 相互作用的 microRNA 预测^[9-14] Target Scan 由 microRNA 领域权威 Bartel 实验室开发的软件,是基于靶 miRNA 序列的进化保守等特征预测 miRNA。其预测 microRNA 靶标假阳性率较低。miRanda 也用于与 DPP10 相互作用的 microRNA 的预测。miRDB 是基于 miRBase v21.0 的较新软件。本研究采用以上软件进行预测。

1.2.7 qPCR 法检测 LOC389023 和 microRNA 表达水平 根据 Prime Script[®] RT 试剂盒说明书提取总 RNA,按 HiS cript[®] II 逆转录试剂盒分别得到总 cDNA(用于 LOC389023 的检测),microRNA 的 cDNA(用于 microRNA 的检测),U6 的 cDNA(用于看家基因 U6 的检测)。采用 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] 试剂盒进行荧光定量 PCR(qPCR),定量 PCR 采用 20 μL 体系(cDNA:2 μL,SYBR[®] Green Master Mix:10 μL,引物 1:0.4 μL,引物 2:0.4 μL,dd H₂O₂:7.2 μL)。定量 PCR 条件:95 ℃ 5 min,95 ℃ 10 s,60 ℃ 34 s,进行 35 个循环。每个孔重复 3 次,取平均 Ct 值。LOC389023 以 GAPDH 作为内参,而 microRNA 以 U6 作为内参。表达量以 2^{-ΔΔCt} 计算。

1.3 统计学处理

采用 SPSS19.0 软件进行分析,计量资料以采用均数±标准差表示,若无特殊说明,实验结果采用独立样本 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 两组病人资料的比较

对照组和癫痫组在年龄,性别以及皮质切除的部位方面,均无统计学意义($P > 0.05$,表 1)。

2.2 DPP10 与 Kv4.3 的表达

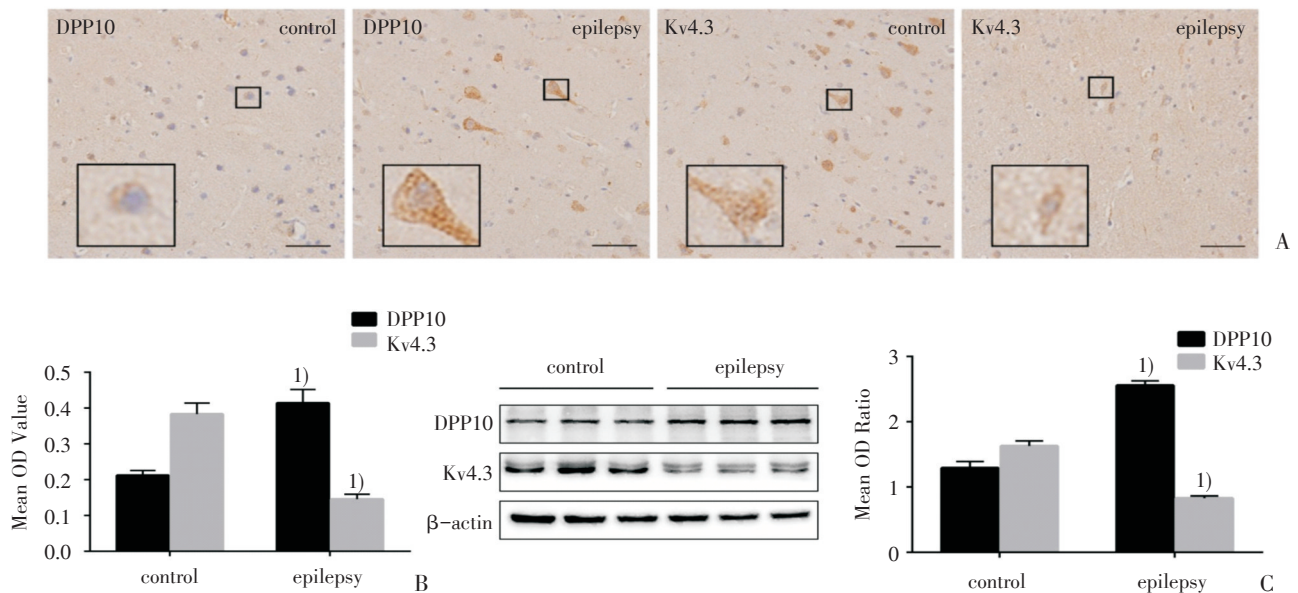
通过免疫组织化学染色分析,DPP10 在对照组中的光密度(OD)值为 0.212 ± 0.014,在癫痫组

表1 对照组和癫痫组病人年龄、性别和切除部位的比较
Table 1 The comparison of age, gender and resection tissue between control group and epilepsy group

	Group		P value
	control (n=15)	epilepsy (n=26)	
Age	34.24±3.65	29.87±1.24	> 0.05 ¹⁾
Gender			> 0.05 ²⁾
Male	20	8(0.40)	12(0.60)
Female	21	7(0.33)	14(0.67)
Resection tissue			> 0.05 ²⁾
Left	25	9(0.36)	16(0.64)
Right	16	6(0.375)	10(0.625)

1) Student's *t* test; 2) Fisher's exact test

中的OD值为 0.414 ± 0.038 ,经统计学检验, $P < 0.05$,差异有统计学意义,DPP10在癫痫中高表达;而Kv4.3在对照组中的OD值为 0.383 ± 0.031 ,在癫痫组中的OD值为 0.146 ± 0.014 ,经统计学检验, $P < 0.05$,差异有统计学意义,Kv4.3在癫痫中低表达(图1A,B)。通过western blot分析,DPP10在对照组中的OD值为 1.290 ± 0.101 ,在癫痫组中的OD值为 2.557 ± 0.070 ,经统计学检验, $P < 0.05$,差异有统计学意义,DPP10在癫痫中高表达;而Kv4.3在对照组中的OD值为 1.628 ± 0.079 ,在癫痫组中的OD值为 0.830 ± 0.033 ,经统计学检验, $P < 0.05$,差异有统计学意义,Kv4.3在癫痫中低表达(图1C)。



Immunohistochemistry (A, B) and Western blot (C) results indicate an increase in expression of DPP10 in the epilepsy group, but a decrease in expression of Kv4.3 in the epilepsy group. 1) $P < 0.05$ vs control group. Error bar: Mean±SD, $n = 6$ /group. Scale bar: 50 μ m.

图1 DPP10与Kv4.3的在颞叶癫痫病人中的表达改变

Fig.1 Altered expression of DPP10 and Kv4.3 in the patients with TLE

2.3 免疫荧光染色和免疫共沉淀检测 DPP10 和 Kv4.3 的定位与相关性

DPP10(紫色)与神经元标记物 NeuN(绿色)的细胞质和细胞膜共定位,而不与星型胶质细胞 GFAP(红色)重合(图2A-E)。Kv4.3(红色)与 DPP10(紫色)共表达(图2F-I)。免疫共沉淀展示 DPP10与Kv4.3有相互作用(图2J)。

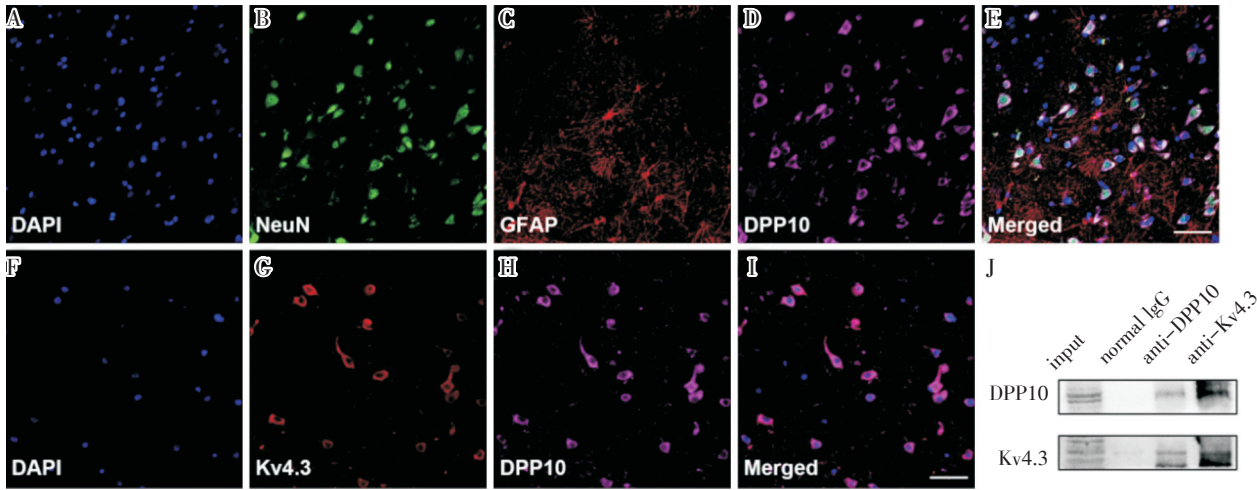
2.4 microRNA 的预测

通过运用 miRanda、Pita 数据库以 LOC389023 预测 microRNA,取交集得到 709 个 microRNA(图

3A),通过运用 TargetScan、miRDB 与 miRanda 数据库以 DPP10 预测 microRNA,取交集得到 27 个 microRNA(图3B),最终的到 5 个候选 microRNA,分别是 miR-32-5p、miR-140-5p、miR-367-3p、miR-25-3p、miR-4325。

2.5 qPCR 结果

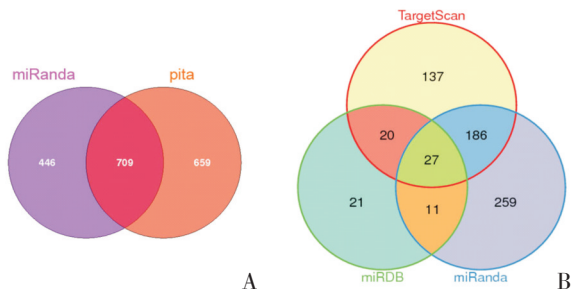
以对照组为 1,癫痫组为 $2^{-\Delta\Delta CT}$,做直方图如图 4。LOC389023 和 miR-140-5p 的 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 各为 0.55 ± 0.28 、 0.53 ± 0.19 ,经统计学检验, $P < 0.05$,LOC389023 和 miR-140-5p 在癫痫中低表达。miR-



Three-label Immunofluorescence showed that DPP10 was exclusively occurred in the neurons (A-E). Double-label Immunofluorescence showed that DPP10 was co-expressed with Kv4.3 (F-I). Co-immunoprecipitation showed the obvious interaction between DPP10 and Kv4.3. Scale bar: 50 μ m.

图2 免疫荧光染色和免疫共沉淀检测 DPP10 和 Kv4.3 的定位与相关性

Fig.2 The location and interaction of DPP10 and Kv4.3 detected by immunofluorescent staining and co-immunoprecipitation



A: The venn diagram of microRNA interacted with LOC389023;
B: The venn diagram of microRNA interacted with DPP10

图3 与 LOC389023 和 DPP10 相互作用的 microRNA 的文氏图

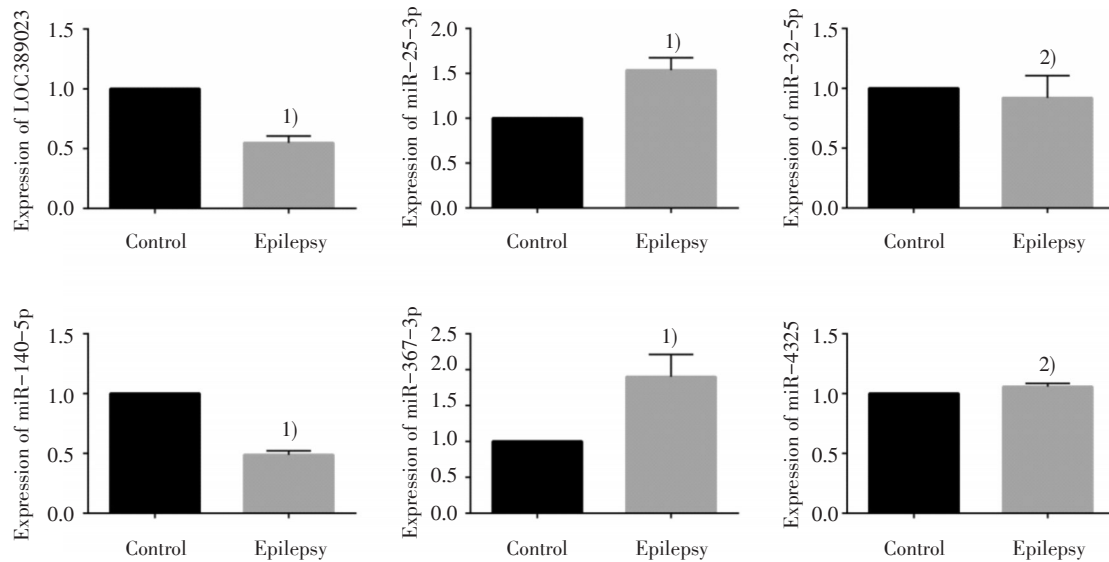
Fig.3 The venn diagram of microRNA interacted with LOC389023 and DPP10

25-3p 和 miR-367-3p 的 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 各为 1.42 ± 0.35 , 1.91 ± 0.64 , 经统计学检验, $P < 0.05$; miR-25-3p 和 miR-367-3p 在癫痫中高表达。而 miR-32-5p 和 miR-4325 的 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 各为 0.86 ± 0.33 , 0.98 ± 0.10 , 经统计学检验, $P > 0.05$, 差异无统计学意义。

3 讨论

DPP10 是 DPP IV 功能或结构类似蛋白 (DPP IV activity and/or structure homologue, DASH) 中的一

员, 与 DPP IV 共有 30% 的序列, DPP10 不具有 DPP IV 的肽酶活性, 但其具有不同于 DPP IV 的重要生理作用^[15]。在神经系统中, DPP10 调节 Kv4.3 形成 Isa 电流, 继而影响神经元的兴奋性, 而神经元兴奋性的异常是癫痫形成的基础。研究发现 DPP10 一方面可以促进 Kv4.3 的表达, 继而产生更多的 Isa 电流, Isa 通过调节动作电位的反向传播而降低神经元的兴奋性; 另一方面, DPP10 通过调节 Kv4.3 从钝化状态进入激活状态, 使 Isa 的产生减小, 从而神经元兴奋性增强^[16]。我们发现在难治性颞叶癫痫患者的皮质中, DPP10 表达是升高的, 而 Kv4.3 的表达是降低的, 这就说明在癫痫形成过程中, 高表达的 DPP10 和低表达的 Kv4.3 降低了 Isa 电流的形成, 继而使神经元异常兴奋, 即使升高的 DPP10 可以促进 Kv4.3 的表达, 但总体来说, Kv4.3 的表达降低。在人体标本中, 我们通过免疫荧光实验发现 DPP10 和 Kv4.3 共表达于神经元, 且免疫共沉淀发现 DPP10 与 Kv4.3 有相互作用, 这与之之前在动物上的研究是吻合的。因此, 我们推测高表达的 DPP10 和低表达的 Kv4.3 通过降低 Isa 使神经元异常放电, 继而引起癫痫的发生。LncRNA 是大于 200 个核苷酸的具有高保守性的非编码 RNA, 一直被认为是转录产生的“垃圾基因”, 随着生物技术的发展, 许多 LncRNA 在人体、大鼠等中



No significant differences in the expression of miR-32-5p and miR-4325 were found between epilepsy group and control group. But a decreased expression of LOC389023 and miR-140-5p and an increased expression of miR-25-3p and miR-367-3p were found in epilepsy group compared to control group. 1) $P < 0.05$ vs control group; 2) $P > 0.05$ vs control group. Error bar: Mean+SD. $n=10$ /group.

图4 LOC389023和microRNA的qPCR结果

Fig.4 The qPCR results of LOC389023 and microRNA

被发现,且其功能也逐一呈现根据其位置的不同分为正义、反义、双向、基因内和基因间5种,目前研究发现,LncRNA与许多疾病相关,特别是在肿瘤转移和增殖中发挥重要作用^[17-20]。LncRNA可以从表观遗传学、转录水平及转录后水平三个层面通过多种途径参与靶基因的表达调控,继而参与人类多种疾病的发生发展。在转录水平,LncRNA除了直接与信使RNA结合参与靶基因表达以外,还可以作为一直竞争性内源RNA(compet-ing endogenous RNA, ceRNA)与其他RNA转录本竞争相同的microRNA,从而实现对RNA转录本的调控,此机制被形象地称为分子海绵^[21-22]。LOC389023作为DPP10蛋白的上游调控RNA,是参与DPP10转录基因的组蛋白3在第4位赖氨酸的三甲基化重要一员,其是造成DPP10在神经系统不同于其他系统的重要原因,LOC389023还可以通过募集PRC2复合物以及与染色质和锌指蛋白密切结合来调控DPP10的表达^[23-24],实际上,LOC389023对DPP10的调控极为复杂,其调控机制有待进一步的研究。有研究发现,DPP10表达的增高很可能是由microRNA引起的^[25-26]。因此我们推测LOC389023可能以ceRNA的形式竞争抑制参与DPP10表达的microRNA,继而调控DPP10的表达。因此我们运用数据库,寻找到了

5个可能即与DPP10结合又与LOC389023结合的microRNA。经过分析他们在难治性颞叶癫痫病人中表达发现,LOC389023与miR-25-3p和miR-367-3p的表达模式相反,这符合竞争性抑制的结果,而LOC389023与DPP10的表达模式相反,这与之前的研究是一致的。因此我们推测LOC389023作为ceRNA竞争性抑制miR-25-3p和miR-367-3p的表达,继而调控DPP10表达。

综上所述,在难治性颞叶癫痫形成过程中,我们预测低表达的LOC389023对miR-25-3p和miR-367-3p抑制作用减少,使miR-25-3p和miR-367-3p促进DPP10的表达,继而通过抑制Isa电流使神经元兴奋性升高,神经元异常放电致使癫痫形成。

参考文献

- [1] 洪震. 癫痫流行病学研究[J]. 中国现代神经疾病杂志, 2014, 14(11): 919-923.
- [2] 邱文娟, 胡小伟, 张正春. 癫痫发病机制及治疗的研究进展[J/CD]. 中华临床医师杂志(电子版), 2014, 8(10): 1920-1924.
- [3] Köhling R, Wolfart J. Potassium channels in epilepsy [J]. Cold Spring Harb Perspect Med, 2016, 6(5): a022871
- [4] Singh NA, Charlier C, Stauffer D, et al. A novel potassium

- channel gene, KCNQ2, is mutated in an inherited epilepsy of newborns[J]. *Nat Genet*, 1998, 18(1):25-29.
- [5] Aronica E, Boer K, Doorn KJ, et al. Expression and localization of voltage dependent potassium channel Kv4.2 in epilepsy associated focal lesions[J]. *Neurobiol Dis*, 2009, 36(1):81-95.
- [6] Ebert MS, Neilson JR, Sharp PA. MicroRNA sponges: competitive inhibitors of small RNAs in mammalian cells[J]. *Nat Methods*, 2007, 4(9):721-726.
- [7] Kertesz M, Iovino N, Unnerstall U, et al. The role of site accessibility in microRNA target recognition [J]. *Nat Genet*, 2007, 39(10):1278-1284.
- [8] Jalali S, Bhartiya D, Lalwani MK, et al. Systematic transcriptome wide analysis of lncRNA-miRNA interactions [J]. *PLoS One*, 2013, 8(2):e53823.
- [9] Friedman RC, Farh KK, Burge CB, et al. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs [J]. *Genome Res*, 2009, 19(1):92-105.
- [10] Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets [J]. *Cell*, 2005, 120(1):15-20.
- [11] Grimson A, Farh KK, Johnston WK, et al. MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing[J]. *Mol Cell*, 2007, 27(1):91-105.
- [12] Garcia DM, Baek D, Shin C, et al. Weak seed-pairing stability and high target-site abundance decrease the proficiency of lscy-6 and other microRNAs [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2011, 18(10):1139-1146.
- [13] John B, Enright AJ, Aravin A, et al. Human MicroRNA targets[J]. *PLoS Biol*, 2004, 2(11):e363.
- [14] Chi SW, Zang JB, Mele A, et al. Argonaute HITS-CLIP decodes microRNA-mRNA interaction maps [J]. *Nature*, 2009, 460(7254):479-486.
- [15] Wagner L, Klemann C, Stephan M, et al. Unravelling the immunological roles of dipeptidyl peptidase 4 (DPP4) activity and/or structure homologue (DASH) proteins[J]. *Clin Exp Immunol*, 2016, 184(3):265-283.
- [16] Dhamija S, Diederichs S. From junk to master regulators of invasion: lncRNA functions in migration, EMT and metastasis[J]. *Int J Cancer*, 2016, 139(2):269-280.
- [17] Matouk IJ, Halle D, Raveh E, et al. The role of the oncofetal H19 lncRNA in tumor metastasis: orchestrating the EMT-MET decision [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(4):3748-3765.
- [18] Sun M, Nie FQ, Wang ZX, et al. Involvement of lncRNA dysregulation in gastric cancer [J]. *Histol Histopathol*, 2016, 31(1):33-39.
- [19] Liu Y, Sharma S, Watabe K. Roles of lncRNA in breast cancer[J]. *Front Biosci (Schol Ed)*, 2015, 7:94-108.
- [20] Loewen G, Jayawickramarajah J, Zhuo Y, et al. Functions of lncRNA HOTAIR in lung cancer[J]. *J Hematol Oncol*, 2014, 7:90.
- [21] Salmena L, Poliseno L, Tay Y, et al. A ceRNA hypothesis: the Rosetta Stone of a hidden RNA language [J]. *Cell*, 2011, 146(3):353-358.
- [22] 涂超峰, 武明花, 李桂源. lncRNA 与 miRNA 相互调控作用及其与肿瘤的关系[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2013, 29(11):1029-1034.
- [23] Shulha HP, Crisci JL, Reshetov D, et al. Human-specific histone methylation signatures at transcription start sites in prefrontal neurons [J]. *PLoS Biol*, 2012, 10(11):e1001427.
- [24] Kanhere A, Viiri K, Araújo CC, et al. Short RNAs are transcribed from repressed polycomb target genes and interact with polycomb repressive complex-2 [J]. *Mol Cell*, 2010, 38(5):675-688.
- [25] Tushir JS, Akbarian S. Chromatin-bound RNA and the neurobiology of psychiatric disease [J]. *Neuroscience*, 2014, 264:131-141.
- [26] Zhou R, Yuan P, Wang Y, et al. Evidence for selective microRNAs and their effectors as common long-term targets for the actions of mood stabilizers[J]. *Neuropsychopharmacology*, 2009, 34(6):1395-1405.

(编辑 刘清海)