

# 颞叶癫痫 microRNA 基因甲基化模式分析及机制探究

龙泓羽, 肖文彪, 吴龑昊, 罗朝辉, 肖波

中南大学湘雅医院神经内科, 湖南省长沙市 410008

**摘要:** **目的** 重注释甲基化数据并构建 microRNA (miRNA) 基因甲基化谱, 探究差异甲基化 miRNA 在颞叶癫痫 (TLE) 发生发展及耐药机制中的作用。 **方法** 收集 TLE 患者以及健康对照外周血, 提取 DNA 进行全基因组 DNA 甲基化检测。将甲基化数据重注释至 miRNA 基因, 统计分析筛选病例组与对照组以及临床亚组之间的差异甲基化 miRNA, 运用生物信息学方法对差异甲基化 miRNA 功能分析。 **结果** TLE 和对照组间有 82 个 miRNA 基因甲基化存在差异 ( $FDR < 5\%$ ), 其中甲基化升高的 70 个。临床亚组间也存在差异甲基化 miRNA 基因 ( $P < 0.01$ )。差异甲基化 miRNA 基因参与 MAPK 信号通路、神经营养信号通路等多条生物学通路。 **结论** TLE 患者外周血 miRNA 基因组甲基化存在异常, 以甲基化程度升高为主。差异甲基化 miRNA 基因参与多条生物学通路, 可能在 TLE 发病及耐药机制中起到重要作用。

**关键词:** 颞叶癫痫; DNA 甲基化; microRNA; 表观遗传学

DOI: 10.16636/j.cnki.jinn.2017.04.002

## Genome-wide DNA methylation patterns of miRNAs in temporal lobe epilepsy patients and its underlying mechanism

LONG Hong-Yu, XIAO Wen-Biao, WU Yan-Hao, LUO Zhao-Hui, XIAO Bo. Department of Neurology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China

Corresponding author: XIAO Bo, Email: mdboxiao@163.com

**Abstract: Objective** To explore the role of differentially methylated microRNAs (miRNAs) in the development and progression of temporal lobe epilepsy (TLE) and its drug resistance by reannotating the data of DNA methylation and constructing DNA methylation profiles for miRNAs. **Methods** Peripheral blood samples were collected from TLE patients and healthy controls for DNA extraction. Genome-wide DNA methylation was measured and reannotated to miRNAs. Statistical analysis was performed to identify miRNAs with differentially methylated 5'-C-phosphate-G-3' (CpG) between TLE patients and healthy controls and between different clinical subgroups. Bioinformatics analysis was used to analyze the functions of the aberrantly methylated miRNAs. **Results** In total, 82 miRNA CpG sites were found to be differentially methylated between TLE patients and controls (false discovery rate  $< 5\%$ ), with 70 (85%) of them hypermethylated. There was also a set of differentially methylated miRNAs between different clinical subgroups ( $P < 0.01$ ). Pathway analysis showed that differentially methylated miRNAs were involved in mitogen-activated protein kinase signaling pathway, neurotrophin signaling pathway, and other biological pathways. **Conclusions** MiRNAs display altered methylation profiles in peripheral blood from TLE patients, and most of them are hypermethylated. Aberrantly methylated miRNAs are related to multiple biological signaling pathways, which might be involved in the pathogenesis and drug resistance of TLE.

**Key words:** temporal lobe epilepsy; DNA methylation; microRNA; epigenetics

癫痫是一组由于脑神经元异常过度放电所致的短暂、反复发作的神经系统功能紊乱为特征的慢性病和综合征, 是最常见的神经疾病之一, 全世界约 1% 的人患有癫痫。颞叶癫痫 (temporal lobe epi-

**基金项目:** 国家自然科学基金项目 (81371435; 81671299; 81401078); 国家科技部重大研究专项《基于组学特征谱的癫痫分子分型研究》(2016YFC0904400)

**收稿日期:** 2016-11-16; **修回日期:** 2017-07-26

**作者简介:** 龙泓羽 (1987-), 男, 住院医师, 主要从事癫痫研究。

**通信作者:** 肖波 (1962-), 男, 主任医师, 博士生导师, 主要从事癫痫研究。E-mail: mdboxiao@163.com。

lepsy, TLE) 是成人部分性癫痫的最常见形式<sup>[1]</sup>。虽然过去的研究中, TLE 的神经病理学方面取得了巨大进展, 但其潜在发病和耐药机制仍未阐明<sup>[2]</sup>。microRNA (miRNA) 是内源性小非编码 RNA (约 22 个核苷酸), 主要通过特异性结合 mRNA 转录本 3' UTR 序列, 使 mRNA 翻译抑制或 mRNA 去腺苷化而降解, 从而调节转录后基因表达<sup>[3]</sup>。在癫痫动物模型和癫痫患者一系列研究中发现超过 100 种不同的 miRNA 水平发生变化<sup>[4]</sup>。研究表明 miRNA 失调在癫痫的发生和发展中起重要作用<sup>[5]</sup>。

基因启动区 DNA 甲基化对基因抑制至关重要<sup>[6]</sup>。最近的研究表明 DNA 甲基化不仅调节蛋白质编码基因的表达, 而且影响 miRNA 的表达<sup>[7]</sup>。例如在乳腺癌研究中李永生等<sup>[8]</sup>观察到, 在 miRNAs 基因的启动子中甲基化变化比在蛋白质编码基因中更频繁。此外, 通过比较分析表达和启动子甲基化, Miller-Delaney 等<sup>[9]</sup>确定了 TLE 中一组差异甲基化 miRNAs, 并提出 miRNA 可能对 DNA 甲基化更为敏感。然而, 关于 TLE 中通过 DNA 甲基化调控 miRNA 的机制了解甚少。

本研究使用 450 K 甲基化芯片定量分析 TLE 患者和健康对照外周血 DNA 中 485577 个 CpG 位点的甲基化。通过重新注释 DNA 甲基化芯片获得 miRNA 基因启动子甲基化水平, 随后对差异甲基化 miRNA 进行功能富集分析。本研究可能有助于了解 TLE 中 miRNAs 基因表达调节机制, 及其在癫痫发生以及耐药机制中的作用。

1 对象与方法

1.1 样本

研究方案由中南大学湘雅医院伦理委员会批准, 获得参与研究者的知情同意。从 30 个 TLE 患者和 30 个性别和年龄匹配的健康对照者中收集外周血样品。所有患者符合国际抗癫痫联盟 (ILAE) TLE 的诊断标准, 耐药组纳入标准为应用足量足疗程的两种或两种以上合理的抗癫痫药物治疗, 癫痫发作仍未能完全控制的患者。敏感组纳入标准为合理应用抗癫痫药物治疗, 依据最近 12 个月内癫痫发作的最长间隔, 3 倍最长发作间隔 (≥12 月) 无癫痫发作患者<sup>[10]</sup>。所有患者于 2010 年至 2014 年在湘雅医院神经内科招募, 均接受全面临床检查, 包括病史、查体、脑磁共振 (MRI) 和脑电图 (EEG), 详见表 1。

表 1 受试者临床资料

观察指标	TLE 组 (n = 30)	对照组 (n = 30)
性别		
男	18	18
女	12	12
年龄		
男 ( $\bar{x} \pm s$ )	25.28 ± 11.75	28.17 ± 13.96
女 ( $\bar{x} \pm s$ )	33.33 ± 14.28	35.83 ± 11.19
EEG		
左侧颞叶 [n (%)]	10 (33.33)	NA
右侧颞叶 [n (%)]	11 (36.67)	NA
双侧颞叶 [n (%)]	9 (30.00)	NA
MRI		
正常 [n (%)]	14 (46.67)	NA
海马硬化 [n (%)]	9 (30.00)	NA
其他病变 [n (%)]	7 (23.33)	NA
药物反应		
耐药	10 (33.33)	NA
敏感	20 (66.67)	NA

1.2 DNA 提取及甲基化芯片

根据操作说明使用试剂盒分离全血 DNA。NanoDrop 分光光度计测定 DNA 的含量, 并计算 OD260/OD280 比值。对于全基因组甲基化分析, 使用 illumina 人甲基化 450 K 芯片 (illumina, Inc. 美国) 在 485577 个 CpG 位点测量 DNA 甲基化水平。DNA 样品根据 illumina 推荐的方案进行亚硫酸氢钠转化并与芯片杂交。

1.3 miRNA 甲基化重注释

从 miRBase 下载人类 miRNA 的注释信息文件。miRNA 启动子被定义为每个 pri-miRNA 的转录起始位点 (TSS) 上游 10 kb。根据探针位置及 miRNA 基因转录起始终止位点信息, 用 bedtools 软件将全基因组甲基化探针匹配到 miRNA 基因启动子区域, 构建 miRNA 甲基化谱。与蛋白质编码基因一样, 最靠近 miRNA 启动子的 DNA 甲基化与转录沉默紧密相关<sup>[11]</sup>, 本研究只使用最靠近 TSS 的探针来决定 miRNA 启动子的 DNA 甲基化状态。见图 1。

1.4 MiRNA 靶基因预测及功能分析

MiRNA 靶基因数据来源于 miRGator, miRGator 整合了 9 个 (3 个实验验证, 6 个预测算法) miRNA 靶基因预测数据库<sup>[12]</sup>。在预测数据库 4/9 个中都为阳性的被认为是 miRNA 靶基因。使用 DAVID 对差异甲基化 miRNA 的靶基因进行基因本体论 (GO) 和京都基因和基因组百科全书 (KEGG) 通路注释<sup>[13]</sup>。将校正的 P (Benjamini) < 0.05 认为是 GO 和 KEGG 通路显著性的阈值。

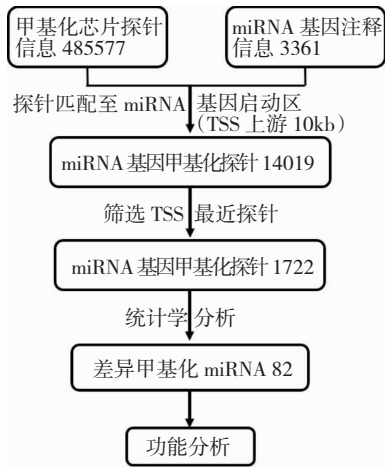


图1 miRNA 基因 DNA 甲基化重注释结果图

1.5 差异甲基化的统计学分析

我们使用 student-t 检验来比较 TLE 患者与健康对照以获得未调整的 *P* 值,并使用错误发现率 (false discovery rate, FDR) 多重检验来校正,FDR 小于 5% 的甲基化位点认为是显著的。而对比临床亚组的 student-t 检验以确定未校正的 *P* 值,*P* < 0.01 的 miRNA 甲基化位点认为是显著的。所有统计学计算用 R 软件完成。

2 结果

2.1 miRNA 甲基化重注释及差异甲基化 miRNA 筛选

基于 TLE 全基因组甲基化数据及 miRNA 注释信息,采用计算策略将探针数据重新匹配到 miRNA 相关的启动子区域 (TSS 上游 10 kb)。总共有 14019 个探针序列对应于 1722 个 miRNA 启动子区,本研究保留最接近 TSS 的单个探针以表示 miRNA 启动子的 DNA 甲基化状态 (即 1722 个)。为了进一步研究差异甲基化 miRNA 可能的生物学意义,我们对 miRNA 启动子的近端探针子集进行统计学分析。在 TLE 和健康对照之间,miRNA 启动子中分析的 CpG 位点中 4.8% (82/1722) (FDR < 5%) 存在显著差异,其中 70 (85%) 位点高甲基化和 12 (15%) 位点低甲基化。在 82 个差异甲基化 miRNA 中有 37 个新发现的 miRNA (尚未正式命名);有 45 个已知的 miRNA,其中包括 MIR23B、MIR27B 和 LET7A 等。

2.2 差异甲基化 miRNA 功能分析

45 个已知的差异甲基化 miRNA 中共有 2222 个靶基因,经 DAVID 数据库分析后按照某些共同属性富集在 MAPK 信号通路、神经营养信号通路、

GnRH 信号通路等不同的“信号通路”,以及神经元投射发育、神经元分化、轴突导向、突触、神经元投射、转录调节活性等“生物学过程”、“细胞成分”和“分子功能”子集。见表 2。

表2 TLE 中差异甲基化 miRNAs 靶基因功能富集的 KEGG 通路和 GO 注释

	名称	Benjamini (校正 <i>P</i> 值)
GOTERM_BP	GO:0045449 ~ 转录调节	1.40E-13
	GO:0010628 ~ 基因表达正性调节	2.71E-08
	GO:0031175 ~ 神经元投射发育	1.03E-05
	GO:0048812 ~ 神经元投射形态形成	2.83E-05
	GO:0030182 ~ 神经元分化	5.67E-05
	GO:0048666 ~ 神经元发育	9.17E-05
	GO:0030334 ~ 细胞迁移调节	1.25E-04
	GO:0007409 ~ 轴突形成	3.46E-04
	GO:0001568 ~ 血管发育	0.0021
	GO:0007411 ~ 轴突导向	0.0044
GOTERM_MF	GO:0030528 ~ 转录调节活性	3.33E-10
	GO:0003700 ~ 转录因子活性	4.21E-10
	GO:0003677 ~ DNA 结合	2.78E-07
	GO:0043565 ~ 序列特异性 DNA 结合	6.75E-06
	GO:0016563 ~ 转录激活活性	1.07E-04
	GO:0004672 ~ 蛋白激酶活性	7.55E-04
	GO:0016564 ~ 转录抑制活性	9.78E-04
	GO:0004674 ~ 蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶活性	0.0031
	GO:0003682 ~ 染色质结合	0.0034
	GO:0031981 ~ 细胞核腔	5.03E-07
GOTERM_CC	GO:0005654 ~ 细胞核浆	3.12E-06
	GO:0044451 ~ 核质部分	4.95E-06
	GO:0005794 ~ 高尔基体	9.88E-05
	GO:0043233 ~ 细胞器腔	9.77E-05
	GO:0031974 ~ 膜封闭腔	9.38E-05
	GO:0070013 ~ 细胞内细胞器腔	1.04E-04
	GO:0045202 ~ 突触	1.15E-04
	GO:0043005 ~ 神经元投射	4.47E-04
	GO:0005667 ~ 转录因子复合物	4.67E-04
	KEGG 通路 hsa04010; MAPK 信号通路	3.89E-04
KEGG 通路	hsa05200; 恶性肿瘤信号通路	5.46E-04
	hsa04722; 神经营养信号通路	0.0083
	hsa05215; 前列腺癌	0.0437
	hsa05210; 结直肠癌	0.0407
	hsa04912; GnRH 信号通路	0.0450

2.3 临床亚组分析

对 TLE 患者临床资料分析进行多层次分组:根据药物治疗情况可分为药物敏感组和耐药组,根据磁共振结果分为海马硬化和 MRI 阴性组。组间进行两样本 *t* 检验,找出差异甲基化 miRNA 基因 (*P* < 0.01)。药物治疗组差异甲基化 miRNA 基因有 23 个,包括 MIR30A、MIR128 和 MIR219 等;磁共

振组差异甲基化 miRNA 基因有 3 个,包括 MIR219 和 MIR5581 等。见表 3。

表 3 TLE 临床亚组中差异甲基化 miRNAs

临床分组	基因名称	基因 ID 号	P 值
药物耐药 VS 药物敏感	MIR1295A	ENSG00000221390	0.0016
	MIR514A1	ENSG00000207868	0.0095
	MIR514A2	ENSG00000207866	0.0095
	MIR1289-2	ENSG00000221287	0.0035
	MIR302D	ENSG00000199145	0.0022
	MIR203	ENSG00000207568	0.0009
	AC105052.1	ENSG00000238997	0.0026
	AL160269.1	ENSG00000265367	0.0089
	AL356479.1	ENSG00000216037	0.0015
	AC044860.1	ENSG00000221266	0.0009
	AL392111.1	ENSG00000263626	0.0053
	AC097470.1	ENSG00000265720	0.0083
	MIR30A	ENSG00000207827	0.0004
	AP002490.1	ENSG00000212089	0.0011
	MIR4641	ENSG00000266494	0.0018
	MIR128-2	ENSG00000207625	0.0003
	MIR219-1	ENSG00000199036	0.0087
	AL139821.1	ENSG00000266069	0.0025
	AC092846.2	ENSG00000265001	0.0100
	MIR4660	ENSG00000263407	0.0030
	AC027319.1	ENSG00000221535	0.0005
	MIR3177	ENSG00000265820	0.0052
	MIR4745	ENSG00000265767	0.0013
MRI 阴性 VS 海马硬化	MIR5581	ENSG00000263675	0.0020
	MIR219-1	ENSG00000199036	0.0059
	AL121761.1	ENSG00000239120	0.0083

3 讨论

本研究是 TLE 患者外周血 miRNA 基因的首次全基因组甲基化分析。研究结果显示,在 TLE 和健康对照组以及不同的临床亚组中存在 miRNA 基因甲基化改变。85% (70/82) miRNA 基因高甲基化是 TLE 患者和健康对照之间的主要改变,这与 TLE 患者和 TLE 啮齿动物模型的海马中基因高甲基化为主要效应的发现相吻合<sup>[9, 14]</sup>。此外,有研究表明在 TLE 患者中两种 DNA 甲基转移酶(DNMT1 和 DNMT3a)表达上调<sup>[15]</sup>。

通过 DAVID 数据库分析,差异甲基化 miRNA 基因参与 MAPK 信号通路、神经营养信号通路等多条生物学通路。神经营养信号通路在神经发育和其他高阶活动如学习和记忆起重要作用<sup>[16]</sup>。Wang 等<sup>[17]</sup>在癫痫患者循环 miRNA 表达谱分析中也报道了神经营养信号通路与癫痫相关。另一种失调的通路 MAPK 信号通路控制基本细胞过程如生长、增殖、分化、迁移和凋亡<sup>[18]</sup>。在神经系统中,p38

MAPK 信号传导具有控制细胞死亡和存活的多种功能,并且可以调控神经元功能,例如突触可塑性<sup>[19]</sup>。此外 p38 MAPK 信号通路通过调节 P-糖蛋白表达参与难治性癫痫耐药机制的形成<sup>[20]</sup>。

我们的研究显示在 MAPK 信号通路中大多数基因是异常甲基化 miRNA 的靶基因。在这些基因中,钙通道基因和肌细胞增强子结合因子 2c (MEF2C) 涉及癫痫或癫痫表型。在癫痫患者和癫痫动物模型中已经鉴定了几种钙通道基因的功能获得性突变,说明了钙通道在癫痫病理生理学中的作用<sup>[21]</sup>。例如,CACNA1A,电压依赖性钙通道家族的成员,其点突变导致脑钙通道 CaV2.1 的损害,可能在癫痫的发病机制中发挥重要作用<sup>[22]</sup>。钙通道基因可以是几种异常甲基化 miRNA 的靶标,例如 let-7a、miR-27b、miR-23b 和 miR-190b。丙戊酸(VPA)和加巴喷丁是常用的抗癫痫药物,其抗癫痫性质已部分归因于抑制离子通道包括电压依赖性钙通道。异常甲基化 miRNA (miR-27b 和 let-7a 等)可能靶向电压依赖性钙通道,进而改变钙通道阻断剂的抗癫痫作用。MEF2C,异常甲基化 miR-23b 的可能靶标,是早期神经发生、神经元分化和迁移所必需的,MEF2C 的点突变或缺失可导致严重的精神发育迟滞和癫痫发作<sup>[23]</sup>。

同时,我们分析发现在药物治疗组和磁共振组差异甲基化 miRNA 基因中都存在 MIR219。MIR219 在恒河猴和大鼠呈现脑特异性表达并随年龄梯度逐渐升高的表达模式,提示 MIR219 参与调控神经系统发育过程的重要环节<sup>[24]</sup>。MIR219 靶基因预测及功能分析提示其参与突触可塑性相关的生物过程,包括钙离子转运、神经递质转运、谷氨酸分泌、长时程增强和长时程抑制等<sup>[25]</sup>。癫痫动物模型研究显示 MIR219 通过靶向 CaMKII $\gamma$  负调节 NMDA 受体的功能,从而抑制癫痫形成<sup>[26]</sup>。而颞叶癫痫患者无颗粒细胞层病理改变组与颗粒细胞层分散组比较也存在 MIR219 差异性表达<sup>[27]</sup>。肿瘤研究中发现甲基化可调控 MIR219 表达,进而调节 ERK1/2 相关的信号转导通路参与胃癌的发生发展<sup>[28]</sup>。因此我们推测差异甲基化 MIR219 可能参与 TLE 病理学进展及耐药机制形成。

DNA 甲基化是动态稳定的过程,并与环境因素密切相关。DNA 甲基化通过调控 miRNA,从而影响信号转导通路中基因表达调控,导致通路功能失调进而影响疾病的发生发展。DNA 甲基化与 miR-

NA 机制研究不仅能够加深对 TLE 疾病机制的理解,而且有助于进一步找到 TLE 临床表型相关的生物标记物,对 TLE 的诊断和治疗提供新的靶点和导向。

### 参 考 文 献

- [1] Tellez-Zenteno JF, Hernandez-Ronquillo L. A review of the epidemiology of temporal lobe epilepsy [J]. *Epilepsy Res Treat*, 2012, 2012: 630853.
- [2] Blumcke I, Coras R, Miyata H, et al. Defining clinico-neuropathological subtypes of mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis [J]. *Brain Pathol*, 2012, 22 (3): 402-411.
- [3] Djuranovic S, Nahvi A, Green R. miRNA-mediated gene silencing by translational repression followed by mRNA deadenylation and decay [J]. *Science*, 2012, 336 (6078): 237-240.
- [4] Alsharafi WA, Xiao B, Abuhamed M M, et al. miRNAs: biological and clinical determinants in epilepsy [J]. *Front Mol Neurosci*, 2015, 8: 59.
- [5] Jimenez-Mateos EM, Henshall DC. Epilepsy and microRNA [J]. *Neuroscience*, 2013, 238: 218-229.
- [6] Jones PA. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond [J]. *Nat Rev Genet*, 2012, 13 (7): 484-492.
- [7] Sato F, Tsuchiya S, Meltzer SJ, et al. MicroRNAs and epigenetics [J]. *FEBS J*, 2011, 278 (10): 1598-1609.
- [8] Li Y, Zhang Y, Li S, et al. Genome-wide DNA methylome analysis reveals epigenetically dysregulated non-coding RNAs in human breast cancer [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 8790.
- [9] Miller-Delaney SF, Bryan K, Das S, et al. Differential DNA methylation profiles of coding and non-coding genes define hippocampal sclerosis in human temporal lobe epilepsy [J]. *Brain*, 2015, 138 (Pt 3): 616-631.
- [10] Kwan P, Arzimanoglou A, Berg AT, et al. Definition of drug resistant epilepsy: consensus proposal by the ad hoc Task Force of the ILAE Commission on Therapeutic Strategies [J]. *Epilepsia*, 2010, 51 (6): 1069-1077.
- [11] Morita S, Takahashi RU, Yamashita R, et al. Genome-wide analysis of DNA methylation and expression of microRNAs in breast cancer cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2012, 13 (7): 8259-8272.
- [12] Cho S, Jang I, Jun Y, et al. MiRgator v3.0: a microRNA portal for deep sequencing, expression profiling and mRNA targeting [J]. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41 (Database issue): D252-D257.
- [13] Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources [J]. *Nat Protoc*, 2009, 4 (1): 44-57.
- [14] Kobow K, Kaspi A, Harikrishnan KN, et al. Deep sequencing reveals increased DNA methylation in chronic rat epilepsy [J]. *Acta Neuropathol*, 2013, 126 (5): 741-756.
- [15] Zhu Q, Wang L, Zhang Y, et al. Increased expression of DNA methyltransferase 1 and 3a in human temporal lobe epilepsy [J]. *J Mol Neurosci*, 2012, 46 (2): 420-426.
- [16] Reichardt LF. Neurotrophin-regulated signalling pathways [J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2006, 361 (1473): 1545-1564.
- [17] Wang J, Yu JT, Tan L, et al. Genome-wide circulating microRNA expression profiling indicates biomarkers for epilepsy [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 9522.
- [18] Dhillon AS, Hagan S, Rath O, et al. MAP kinase signalling pathways in cancer [J]. *Oncogene*, 2007, 26 (22): 3279-3290.
- [19] Correa SA, Eales KL. The Role of p38 MAPK and Its Substrates in Neuronal Plasticity and Neurodegenerative Disease [J]. *J Signal Transduct*, 2012, 2012: 649079.
- [20] Shao Y, Wang C, Hong Z, et al. Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase signaling reduces multidrug transporter activity and anti-epileptic drug resistance in refractory epileptic rats [J]. *J Neurochem*, 2016, 136 (5): 1096-1105.
- [21] Gambardella A, Labate A. The role of calcium channel mutations in human epilepsy [J]. *Prog Brain Res*, 2014, 213: 87-96.
- [22] Imbrici P, Jaffe SL, Eunson LH, et al. Dysfunction of the brain calcium channel CaV2.1 in absence epilepsy and episodic ataxia [J]. *Brain*, 2004, 127 (Pt 12): 2682-2692.
- [23] Nowakowska BA, Obersztyn E, Szymanska K, et al. Severe mental retardation, seizures, and hypotonia due to deletions of MEF2C [J]. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 2010, 153B (5): 1042-1051.
- [24] 张满仓. miR-219 时空表达特征及功能研究 [D]. 华东师范大学, 2008.
- [25] 熊璐. miR-219 调控 NMDAR 信号通路在微波辐射致突触可塑性损伤中的作用研究 [D]. 中国人民解放军军事医学科学院, 2014.
- [26] Zheng H, Tang R, Yao Y, et al. MiR-219 Protects Against Seizure in the Kainic Acid Model of Epilepsy [J]. *Mol Neurobiol*, 2016, 53 (1): 1-7.
- [27] Zucchini S, Marucci G, Paradiso B, et al. Identification of miRNAs differentially expressed in human epilepsy with or without granule cell pathology [J]. *PLoS One*, 2014, 9 (8): e105521.
- [28] 雷荟仔. miR-219-2-3p 在胃癌中的作用及其 DNA 甲基化调控 [D]. 重庆医科大学, 2013.