

化浊解毒疏肝方对癫痫大鼠学习记忆及PI3K/Akt/GSK-3 β 信号通路的影响

王江红¹, 杨佳丽², 严少博³, 贾志霞², 李刚刚², 秦少坤², 卢晔⁴,
关振伟⁴, 张少丹^{5*}, 裴林^{4*}

(1. 河北大学 中医学院, 河北 保定 071051; 2. 河北中医学院, 石家庄 050051;
3. 华北理工大学 中医学院, 河北 唐山 063210; 4. 河北省中医药科学院, 石家庄 050031;
5. 河北医科大学 第二医院, 石家庄 050073)

【摘要】 目的:观察化浊解毒疏肝方对癫痫大鼠学习记忆及磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)/糖原合成酶激酶-3 β (GSK-3 β)通路相关蛋白表达的影响,探讨其可能的作用机制。**方法:**选取SPF级雄性SD大鼠48只,随机分为正常组、模型组、丙戊酸钠组、化浊解毒疏肝方低、中、高剂量组,每组8只。正常组给予0.9%氯化钠溶液腹腔注射(0.035 g·kg⁻¹),其余5组给予同等剂量戊四氮(PTZ)腹腔注射制备大鼠慢性癫痫模型,共14次。化浊解毒疏肝方低、中、高剂量组分别灌胃化浊解毒疏肝方2.7, 5.4, 10.8 g·kg⁻¹,丙戊酸钠组灌胃丙戊酸钠0.19 g·kg⁻¹,正常组和模型组灌胃同等体积0.9%氯化钠溶液,每天1次,持续28 d。药物干预期间,各造模组大鼠在第7, 14, 21, 28天给予PTZ腹腔注射以维持癫痫模型。应用Morris水迷宫观察大鼠的行为学变化,苏木素-伊红(HE)染色观察大鼠海马神经元病理形态学变化,免疫组化检测磷酸化(p)-Akt, p-GSK-3 β 蛋白的表达,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测PI3K, Akt, p-Akt, GSK-3 β , p-GSK-3 β 蛋白表达情况。**结果:**与正常组比较,模型组大鼠寻找平台时间延长($P<0.01$),穿越平台次数减少($P<0.01$),海马CA1区神经元结构损伤,海马CA1区p-Akt, p-GSK-3 β 蛋白表达降低($P<0.05$),海马组织PI3K, p-Akt, p-GSK-3 β 相对表达量降低($P<0.01$)。与模型组比较,丙戊酸钠组、化浊解毒疏肝方各剂量组大鼠寻找平台时间缩短($P<0.01$);丙戊酸钠组、化浊解毒疏肝方高、中剂量组大鼠穿越平台次数升高($P<0.01$),各治疗组海马CA1区神经元结构明显改善,化浊解毒疏肝方高、中剂量组、丙戊酸钠组海马CA1区p-Akt, p-GSK-3 β 蛋白表达升高($P<0.05$),化浊解毒疏肝方高、中剂量组、丙戊酸钠组PI3K, p-Akt, p-GSK-3 β 相对表达量升高($P<0.01$)。**结论:**化浊解毒疏肝方可改善癫痫大鼠学习记忆能力,可能与激活PI3K/Akt/GSK-3 β 通路相关蛋白有关,从而发挥抗癫痫作用。

【关键词】 化浊解毒疏肝方; 癫痫; 大鼠; 学习记忆; 磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)/糖原合成酶激酶-3 β (GSK-3 β)信号通路

[中图分类号] R2-0; R22; R285.5; R289; R33 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2021)17-0057-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20211603

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210629.1230.003.html>

[网络出版日期] 2021-06-30 9:17

Effect of Huazhuo Jiedu Shugan Prescription on Learning, Memory, and PI3K/Akt/GSK-3 β Signaling Pathway in Epileptic Rats

WANG Jiang-hong¹, YANG Jia-li², YAN Shao-bo³, JIA Zhi-xia², LI Gang-gang², QIN Shao-kun², LU Ye⁴,
GUAN Zhen-wei⁴, ZHANG Shao-dan^{5*}, PEI Lin^{4*}

(1. School of Chinese Medicine, Hebei University, Baoding 071051, China;
2. Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050051, China; 3. Traditional Chinese Medical
College, North China University of Science and Technology, Tangshan 063210, China;

[收稿日期] 20210416(002)

[基金项目] 国家重点研发计划课题(2017YFC1701701);河北省中医药管理局科研计划项目(2020176)

[第一作者] 王江红,在读硕士,主治医师,从事中西医结合治疗脑病研究, E-mail: 1033539623@qq.com

[通信作者] * 张少丹,硕士,主任医师,从事儿科危重症急救工作, E-mail: 13653115066@163.com;

* 裴林,博士,主任医师,从事中医脑病临床与基础研究, E-mail: 13831190309@163.com

4. Hebei Academy of Chinese Medicine Sciences, Shijiazhuang 050031, China;
5. The Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050073, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effects of Huazhuo Jiedu Shugan Prescription (HZJDSG) on learning, memory, and the expression of phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt)/glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) pathway-related proteins in epileptic rats, and to explore its possible mechanism. **Method:** Forty-eight SPF male SD rats were randomly divided into a normal group, a model group, a sodium valproate (0.19 g·kg⁻¹) group, and low- (2.7 g·kg⁻¹), medium- (5.4 g·kg⁻¹), and high-dose (10.8 g·kg⁻¹) HZJDSG groups, with eight rats in each group. The normal group received 0.9% sodium chloride solution (0.035 g·kg⁻¹) by intraperitoneal injection, and the other five groups received pentetrazol (PTZ) at the same dose to induce a chronic epilepsy model for a total of 14 times. The drug groups received corresponding drugs and the normal group and the model group received 0.9% sodium chloride solution at the same volume once a day for 28 days. During the drug intervention period, epilepsy was maintained in each modeling group by intraperitoneal injection of PTZ on day 7, 14, 21, and 28. The behavioral changes of rats were observed by Morris water maze and the pathomorphological changes of rat hippocampal neurons by hematoxylin-eosin (HE) staining. The protein expression of phosphorylation Akt (p-Akt) and p-GSK-3 β was detected by immunohistochemistry and the protein expression of PI3K, Akt, p-Akt, GSK-3 β , and p-GSK-3 β by Western blot. **Result:** Compared with the normal group, the model group showed prolonged platform finding time ($P < 0.01$), reduced number of platform crossings ($P < 0.01$), structural damage of neurons in the CA1 region of the hippocampus, down-regulated protein expression of p-Akt and p-GSK-3 β in the CA1 region of the hippocampus ($P < 0.05$), and reduced relative expression of PI3K, p-Akt, and p-GSK-3 β in the hippocampus ($P < 0.01$). Compared with the model group, the sodium valproate group and the HZJDSG groups showed shortened platform finding time ($P < 0.01$) and improved neuronal structure in the CA1 region of the hippocampus, while the sodium valproate group and the high- and medium-dose HZJDSG groups exhibited increased number of platform crossings ($P < 0.01$), up-regulated protein expression of p-Akt and p-GSK-3 β in the CA1 region of the hippocampus ($P < 0.05$), and elevated relative expression of PI3K, p-Akt, and p-GSK-3 β ($P < 0.01$). **Conclusion:** HZJDSG can improve the learning and memory of epileptic rats, and its antiepileptic effect may be achieved by the activation of PI3K/Akt/GSK-3 β pathway-related proteins.

[Keywords] Huazhuo Jiedu Shugan prescription; epilepsy; rat; learning and memory; phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt)/glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) signaling pathway

癫痫是多种病因引起的大脑高度同步化异常放电的慢性神经系统疾病,影响全球约 5 000 万~1 亿的癫痫患者^[1],每年致残率约 1 200 万~1 400 万^[2],在我国的癫痫患病人数大约有 800 万~1 000 万,其中活动性癫痫约 500~700 万,每年新增病例约 39 万~41 万^[3],癫痫反复发作可发展为难治性癫痫,影响患者的心理、认知、情感等,给患者个人、家庭及社会带来沉重的负担。

研究表明,磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B (PI3K/Akt)信号通路是一条经典的抗细胞凋亡和促进细胞存活的细胞内信号转导途径^[4],在细胞的凋亡、生存以及在细胞的增殖方面有重要作用,在细胞骨架改变方面也起着相当重要的作用^[5],Akt

是调节细胞过程的各种信号通路细胞的关键激酶,参与调控细胞生长、增殖和存活^[6],可以直接或间接调节细胞凋亡的不同底物来调节细胞的存活^[7],Akt 的磷酸化主要依赖于 PI3K 的活化,脑缺血发生后可通过脑源性神经营养因子与其胞膜上的受体结合,激活 PI3K/Akt 信号途径,PI3K/Akt 活化途径可起到神经保护作用,糖原合成酶激酶-3 β (GSK-3 β)是 PI3K/Akt 通路的重要下游底物之一,是一种丝氨酸-苏氨酸激酶,能磷酸化多种底物,参与多种细胞信号途径及细胞生存^[8],化浊解毒疏肝方是否通过 PI3K/Akt/GSK-3 β 信号通路发挥神经元保护作用目前未见报道。

中医药应用已有上千年的历史,是中华民族

瑰宝,积累了大量的临床经验,具有药效作用时间长,疗效显著,不良反应相对较少及花费较少的特点,以及在中药的研究中表现出多靶点作用、从整体论治的特点而逐步受到临床研究者的重视,到目前为之,尚未发现治疗癫痫的有效的方法,笔者认为癫痫患者的学习记忆能力下降可能与浊伏脑络有关,化浊解毒疏肝方是裴林教授基于浊毒理论并结合基础研究及临床经验的创新方,由黄芩12 g,荷梗9 g,绞股蓝12 g,柴胡12 g,石菖蒲9 g,罗勒6 g等药物组成,具有化浊毒、疏肝郁的作用。本实验应用戊四氮(PTZ)制作大鼠慢性癫痫模型,用中药作为目标治疗药物,探讨其抗癫痫可能的作用机制,为化浊解毒疏肝方进行深入研究及改善癫痫认知功能方面提供新思路 and 理论依据。

1 材料

1.1 动物 选取4周龄SPF级健康SD雄性大鼠48只,体质量100~120 g,购自河北医科大学实验动物中心,动物生产合格证号SCXK(冀)2018-004,饲料垫料生产合格证号SCXK(冀)2018-003。实验动物所处环境光线充足,12 h光亮/黑暗循环交替,温度为22~24℃,湿度为50%~60%,实验大鼠饲养在聚砜鼠笼中,可自由获取食水,在河北省中医药科学院动物房内饲养。本实验经河北省中医药科学院动物实验伦理委员会审查并批准(批准号DWLL-2020003)。

1.2 药物与试剂 化浊解毒疏肝方由黄芩12 g,荷梗9 g,绞股蓝12 g,石菖蒲9 g,柴胡12 g,罗勒6 g组成(安国市伊康药业有限公司,批号分别为191203,200115,191224,190912,191107,200108,经河北省中医药科学院附属医院药学部邵奇药师鉴定符合2015年版《中华人民共和国药典》一部标准,标本凭证保存于河北省中医药科学院附属医院),丙戊酸钠片(湖南省湘中制药有限公司,国药准字H43020874)。PTZ(P6500-100G)(美国Sigma-Aldrich公司,批号#SLBF5034V)。10%水合氯醛(天津市北联精细化学品开发有限公司,批号1040508);PI3K单克隆抗体,Akt多克隆抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,批号分别为60225-1-Ig,10176-2-AP);磷酸化(p)-Akt多克隆抗体,p-GSK-3 β 多克隆抗体(英国Affinity公司,批号分别为AF0016,AF2016);GSK-3 β 多克隆抗体, β -肌动蛋白(β -actin)单克隆抗体,辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G二抗,HRP标记山羊抗小鼠IgG二抗,苏木素-伊红(HE)染液套装,

Tween-20,RIPA裂解液,蛋白酶抑制剂(100 mmol·L⁻¹ PMSF),磷酸化蛋白酶抑制剂,5 $\times$ 蛋白还原型上样缓冲液,SDS-PAGE凝胶制备试剂盒,彩色预染蛋白Marker,PVDF膜0.45 μ m,脱脂奶粉,ECL发光试剂盒,显影定影试剂(武汉谷歌生物科技有限公司,批号分别为GB11099,GB12001,GB23303,GB23301,G1003,WGT8220,G2002,G2008,G2007,G2013,G2003,26617,G6015-0.45,G5002,G2014,G2019);无水乙醇、二甲苯、中性树胶(国药集团化学试剂有限公司,货号分别为100092683,10023418,10004160)。

1.3 仪器 JB-P5型包埋机,JB-L5型冻台(武汉俊杰电子有限公司);RM2016型病理切片机(上海徕卡仪器有限公司);KD-P型组织摊片机(浙江省金华市科迪仪器设备有限公司);Nikon Eclipse E100型正置光学显微镜,NIKON DS-U3型成像系统(日本尼康公司);防脱载玻片,MS-PB型磁力搅拌器,TSY-B型脱色摇床,D1008E型掌上离心机,KZ-II型研磨仪,BV-2型垂直电泳仪,BT-2型转印电泳仪,WGJP0001型柯达胶片(武汉赛维尔生物科技有限公司);Morris水迷宫,SLY-ETS行为分析系统(北京硕林苑科技有限公司);RT-6100型酶标仪(美国Rayto公司);D3024R型台式高速冷冻离心机[大龙兴创实验仪器(北京)有限公司];SPR80型制冰机(美国Sigma公司);alphaEaseFC灰度分析软件(美国Alpha Innotech公司);6300型化学发光仪(上海勤翔科学仪器有限公司)。

2 方法

2.1 造模与分组 将SD雄性大鼠48只随机分为正常组、模型组、丙戊酸钠组、化浊解毒疏肝方低、中、高剂量组,每组8只,根据预实验结果及参考ALESE等^[9]的实验方法制作癫痫模型,模型组及给药组腹腔注射亚惊厥剂量PTZ(0.035 g·kg⁻¹),正常组腹腔注射同等剂量0.9%氯化钠溶液,共14次,执行时间是上午8:00~11:00,造模前称体质量,给药后密切观察每只大鼠的行为学表现30 min,期间如出现强直性抽搐持续超过1 min不能自行缓解的,给以腹腔注射10%水合氯醛溶液3 mL·kg以终止抽搐。

根据Racine分级标准^[10],见表1,造模14次后,进行数据分析,连续出现3次癫痫发作在Ⅳ级及以上的大鼠视为造模成功,造模结束后剔除造模不成功及死亡的癫痫大鼠,其余大鼠纳入实验研究。

2.2 给药方法 造模成功后翌日开始,每天上午

表 1 Racine 分级

Table 1 Racine Grade

分级	行为表现
0 级	无抽搐发作, 行为表现较为正常
I 级	面部可观察到局部肌肉的小阵挛发作, 如眨眼/抖须/湿狗样抖动/咀嚼样表现
II 级	颈部肌肉表现出阵挛, 以点头为主
III 级	一侧前肢抽搐阵挛表现, 不伴站立
IV 级	两侧前肢抽搐阵挛表现, 伴站立
V 级	全身及四肢强直阵挛伴跌倒

8:00~10:00 进行灌胃治疗, 化浊解毒疏肝方临床常用生药量为 60 g, 按人和大鼠间等效剂量的折算系数^[11]进行换算, 化浊解毒疏肝方低、中、高剂量比为 1:2:4, 计算出化浊解毒疏肝方低、中、高剂量组给药剂量分别为 2.7, 5.4, 10.8 g·kg⁻¹, 丙戊酸钠临床成人每日最大剂量为 0.03 g·kg⁻¹, 按照人和大鼠间等效剂量折算系数换算后的大鼠用量为 0.19 g·kg⁻¹, 化浊解毒疏肝方低、中、高剂量组分别给予化浊解毒疏肝方低、中、高剂量治疗, 丙戊酸钠组给予丙戊酸钠治疗, 正常组与模型组给予同等体积的 0.9% 氯化钠溶液灌胃, 每日 1 次, 共持续 28 d。药物干预期间, 各造模组大鼠在第 7, 14, 21, 28 天给予 PTZ 以维持癫痫模型。加适量水浸泡 1 h, 煎煮约 30 min, 滤出药液后再加入适量水煎煮 30 min, 将煎煮好的 2 次的药液合并, 进行浓缩, 将化浊低、中、高剂量分别浓缩为 111 mL 的汤药。煎煮好的各组化浊解毒疏肝方标记好并存于 4 °C 冰箱备用。

2.3 Morris 水迷宫实验 Morris 水迷宫实验是测试大鼠学习记忆的经典实验, 灌胃给药结束翌日进行水迷宫测试, 每组筛选出 6 只大鼠(剔除视力及运动能力差的), 进行为期 5 d 的行为学测试。Morris 水迷宫是一个半径 60 cm, 高 60 cm 的圆形水池, 分为 4 个象限, 在东北(NE)象限放置一个直径约 15 cm, 高 28 cm 的圆形平台, 位于水面下 2 cm, 置放在安静的测试室内进行, 水池上方装有视频图像采集系统, 用来记录大鼠游泳轨迹路线, 电脑软件会自动收集并计算大鼠找到平台的时间及穿越平台次数。操作过程中保持实验室环境安静, 水温控制在 25 °C 左右, 实验前将墨汁加入水中, 以便更好地隐匿平台。定位航行实验历时 4 d, 每天训练 1 次, 每个象限每次大鼠游泳时间设置为 120 s, 如果大鼠成功找到站台, 电脑会自动记录大鼠找到平台的时间。第 5 天进行空间探索实验测试, 撤去平台, 选取西南象限作为大鼠固定入水点, 设置时间为 120 s, 记录在

120 s 内各组大鼠穿过平台的次数。

2.4 HE 染色观察大鼠海马组织病理变化 腹腔注射 10% 水合氯醛麻醉, 数秒后待其充分麻醉后将其置于解剖台上, 逐层打开胸腹腔, 用止血钳固定, 使心脏充分暴露, 在右心耳处剪开一个小口使血液顺利流出, 将预冷的 0.9% 氯化钠溶液的输血器针头自左心室插入心脏, 快速灌注约 230 mL, 随后缓慢灌注 4 °C 预冷的 4% 多聚甲醛固定液约 240 mL, 待大鼠出现四肢僵直、肝脏发白时提示灌注成功, 剥取全脑, 标记后置于 4% 多聚甲醛中固定 24~48 h, 切取视交叉至乳头体之间的部分, 将目的部位组织修平整, 石蜡包埋, 切片(厚 4 μm), HE 染色(脱蜡, 苏木素染色, 脱水, 透明, 封片), 光镜下观察。

2.5 免疫组化检测 p-Akt, p-GSK-3β 蛋白表达 将石蜡切片脱蜡至水, 抗原修复, 将其放入 3% 过氧化氢中, 需要避光孵育 25 min(室温), 再放入磷酸盐缓冲液(PBS)中清洗 3 次, 每次 5 min, 滴加 3% BSA, 室温封闭 30 min, 滴加一抗(p-Akt, p-GSK-3β 稀释比例均为 1:100), 将切片平放于湿盒内, 4 °C 孵育过夜, 第 2 天取出恢复室温, 然后将载玻片放入 PBS 中清洗 3 次, 每次 5 min, 随后滴加二抗(HRP 标记的山羊抗兔 IgG, 稀释比例为 1:200), 室温孵育 50 min, DAB 显色, 脱水封片, 显微镜镜检, 图像采集分析。

2.6 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测海马组织 PI3K, Akt, p-Akt, GSK-3β, p-GSK-3β 蛋白表达

从 -80 °C 冰箱取出海马组织, 称取每只大鼠海马质量, 用高温消毒的眼科剪把组织剪成细小的碎片, 加入适量裂解液直至海马组织完全裂解, 将裂解后的样品置于低温高速离心机中, 12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 收集上清, 即为总蛋白溶液, 然后转至离心管, 分装冻存, 放置在 -80 °C 冰箱, 根据蛋白浓度测定结果, 按照 4:1 的比例加入 5×还原型蛋白上样缓冲液, 吹打混匀, 沸水浴变性 15 min, 将样品缓慢加入至胶孔, Marker 所在的上样孔中加入等体积的预染 Marker, 接通电源, 浓缩胶电压 75 V (15 mA), 当出现蛋白 Marker 进入分离胶以后将电压改为 120 V (20 mA), 电泳至溴酚蓝距离最底部大约 1 cm 即可关闭电泳仪, 终止电泳。将凝胶上分离到的蛋白条带通过转移电泳方式转印至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉进行封闭, 加入配置好的一抗(稀释比例为 PI3K, Akt, p-Akt, GSK-3β, p-GSK-3β 1:1 000; β-actin 1:2 000), 4 °C 孵育摇床过夜, 第 2 天将 HRP 标记的山羊抗小鼠或山羊抗兔二抗(1:3 000)放置摇床上进行孵育, ECL 化学发光, 以 Image J 图像分

析软件分析各组目的蛋白与内参蛋白的光密度比值。

2.7 统计学方法 采用SPSS 19.0统计软件进行统计学分析,连续变量数据资料符合正态分布且方差齐均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析(One-way ANOVA)及最小显著性差异法(LSD)进行两两比较,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 Morris水迷宫结果 与正常组比较,模型组大鼠寻找平台时间显著延长($P < 0.01$),穿越平台次数显著减少($P < 0.01$)。与模型组比较,丙戊酸钠组、化浊解毒疏肝方高、中、低剂量组大鼠寻找平台时间显著缩短($P < 0.01$),丙戊酸钠组、化浊解毒疏肝方高、中剂量组大鼠穿越平台次数显著增多($P < 0.01$)。化浊解毒疏肝方高剂量组与丙戊酸钠组大鼠寻找平台时间及穿越平台次数差异无统计学意义,见表2。各组大鼠Morris水迷宫运动轨迹图见图1。

表2 化浊解毒疏肝方对癫痫大鼠寻找平台时间及穿越平台次数的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

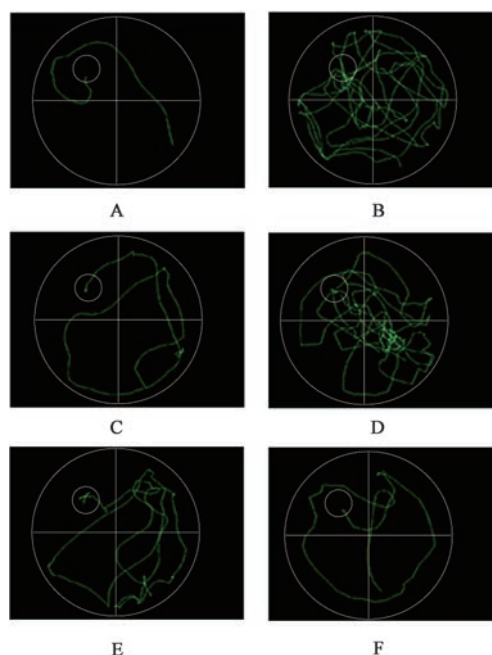
Table 2 Effect of Huazhuo Jiedu Shugan prescription on time to find platform and number of platform crossings in rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	寻找平台时间/s	穿越平台数/次
正常		13.89±2.82	8.50±1.05
模型		37.14±4.30 ²⁾	3.50±1.05 ²⁾
丙戊酸钠	0.19	18.50±3.42 ⁴⁾	7.17±1.17 ⁴⁾
化浊解毒疏肝方	2.7	30.61±5.45 ⁴⁾	4.00±0.89
	5.4	28.83±3.83 ⁴⁾	6.17±1.17 ⁴⁾
	10.8	17.96±4.03 ⁴⁾	7.67±1.03 ⁴⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ (表3同)。

3.2 对癫痫大鼠海马组织CA1区病理形态学的影响 正常组大鼠海马CA1区锥体细胞数目较多,形态饱满,呈圆形及椭圆形,胞核大而圆,核仁较清晰,细胞排列规整,结构完整。模型组大鼠海马CA1区锥体细胞数目减少,形态不规则,细胞排列不整齐,形状呈梭形,可见明显细胞胞体固缩深染。丙戊酸钠组、化浊解毒疏肝方低、中、高剂量组大鼠海马CA1区的锥体细胞数目相对较多,排列较为规整,结构相对完整,以化浊解毒疏肝方高剂量组和丙戊酸钠组最为明显。见图2。

3.3 对癫痫大鼠海马CA1区p-Akt,p-GSK-3 β 蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组大鼠海马CA1区p-Akt,p-GSK-3 β 表达明显降低($P < 0.05$);与模型组比较,丙戊酸钠组、化浊解毒疏肝方中剂量组及



A. 正常组;B. 模型组;C. 丙戊酸钠组;D. 化浊解毒疏肝方低剂量组;E. 化浊解毒疏肝方中剂量组;F. 化浊解毒疏肝方高剂量组(图2~5同)

图1 Morris水迷宫大鼠运动轨迹

Fig. 1 Morris Water Maze rat motion profile

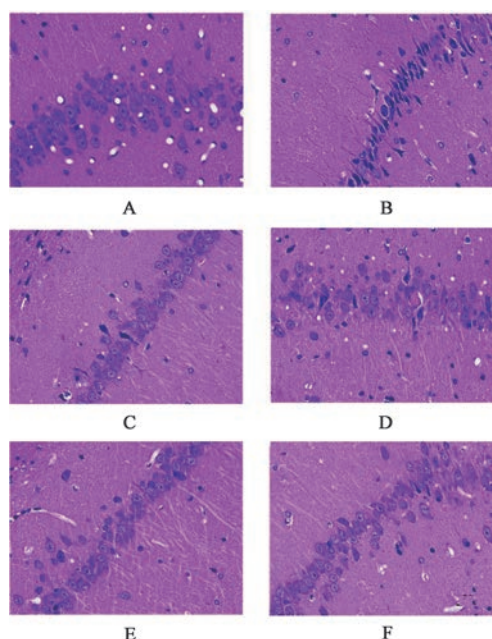


图2 化浊解毒疏肝方对癫痫大鼠海马组织CA1区病理形态学的影响(HE,×400)

Fig. 2 Effect of Huazhuo Jiedu Shugan prescription on pathomorphology of CA1 region of hippocampus in rats (HE,×400)

化浊解毒疏肝方高剂量组p-Akt,p-GSK-3 β 表达明显升高($P < 0.05$)。化浊解毒疏肝方高剂量组予丙戊酸钠组比较差异无统计学意义。见图3,4。

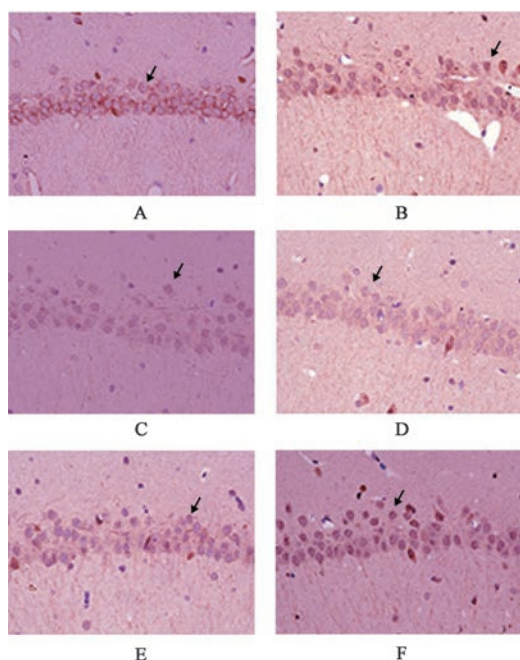


图 3 化浊解毒疏肝方对癫痫大鼠海马 CA1 区 p-Akt 蛋白表达的影响(免疫组化, ×400)

Fig. 3 Effect of Huazhuo Jiedu Shugan prescription on expression of p-Akt protein in CA1 region of hippocampus in rats (IHC, ×400)

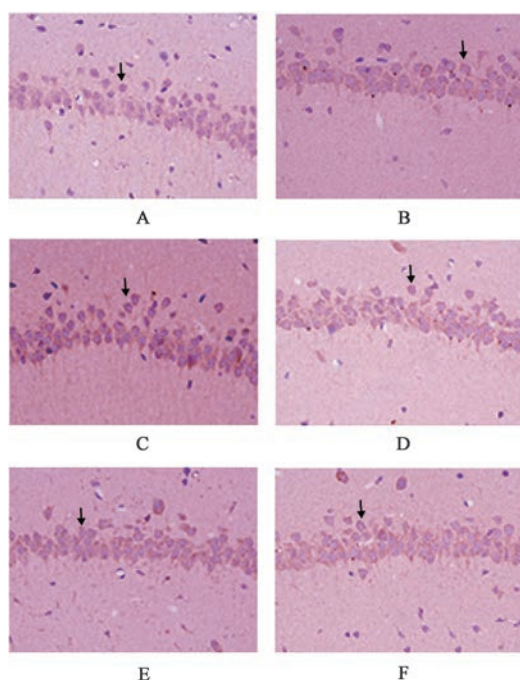


图 4 化浊解毒疏肝方对癫痫大鼠海马 CA1 区 p-GSK-3β 蛋白表达的影响(免疫组化, ×400)

Fig. 4 Effect of Huazhuo Jiedu Shugan prescription on expression of p-GSK-3β protein in CA1 region of hippocampus in rats (IHC, ×400)

3.4 对癫痫大鼠海马组织 PI3K, p-Akt/Akt, p-GSK-3β/GSK-3β 的影响 与正常组比较,模型组海马组织 PI3K, p-Akt, p-GSK-3β 相对表达量显著

降低($P<0.01$);与模型组比较,化浊解毒疏肝方高剂量组、化浊解毒疏肝方中剂量组及丙戊酸钠组 PI3K, p-Akt, p-GSK-3β 相对表达量显著升高($P<0.01$)。化浊解毒疏肝方高剂量组与丙戊酸钠组比较差异无统计学意义。见图 5,表 3。

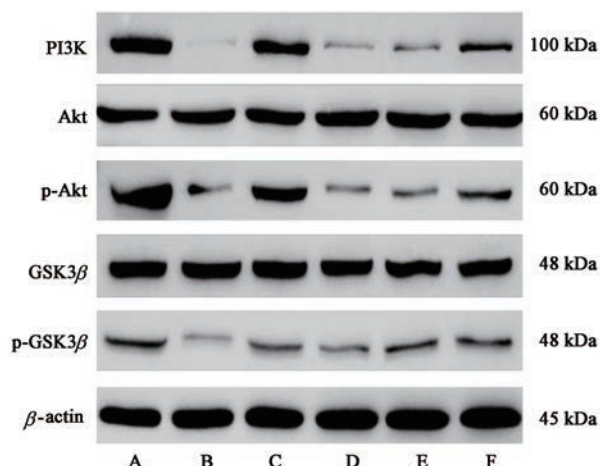


图 5 各组大鼠 PI3K, Akt, p-Akt, GSK-3β, p-GSK-3β 蛋白表达电泳

Fig. 5 Electrophoresis of PI3K, Akt, p-Akt, GSK-3β, p-GSK-3β protein in rats of each group

4 讨论

癫痫是一种致残率高的慢性疾病,反复发作可引起认知功能的损害,海马 CA1 区是认知功能的关键区域,参与学习记忆过程,易受到缺血性损伤的影响^[12-13]。本研究 HE 染色结果显示,与正常组比较,模型组大鼠海马 CA1 区受损较为严重,细胞数目减少,形态呈梭形,细胞排列不规则,提示癫痫模型制作成功,对大鼠海马神经元产生一定的损伤。与模型组比较,丙戊酸钠组及化浊解毒疏肝方高、中、低剂量组大鼠海马 CA1 区细胞形态较为完整,排列较为整齐,层次较清晰,提示化浊解毒疏肝方可改善癫痫大鼠海马 CA1 区损伤。

PTZ 是一种常用的点燃实验动物模型,是 γ-氨基丁酸(GABA)受体拮抗剂,易通过血脑屏障,为癫痫组织病理学和细胞病理学的公认模型^[14-15]。丙戊酸钠是常用的抗癫痫一线药物,是许多癫痫发作的首选药物^[16],故本研究采用丙戊酸钠作为阳性对照药物,验证了化浊解毒疏肝方的抗惊厥作用。

Morris 水迷宫测试是 1981 年由英国心理学家 Morris 报道,用于多种神经系统疾病的模型评估、行为表现及药物干预研究,主要用于评估啮齿类动物的空间学习记忆能力的经典实验^[17]。本研究结果显示,模型组大鼠寻找平台时间延长,穿越平台次

表 3 化浊解毒疏肝方对癫痫大鼠海马组织 PI3K, p-Akt/Akt, p-GSK-3 β /GSK-3 β 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Effect of Huazhuo Jiedu Shugan prescription on PI3K, p-Akt/Akt and p-GSK-3 β /GSK-3 β in hippocampus of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	PI3K/ β -actin	p-Akt/Akt	p-GSK-3 β /GSK-3 β
正常		0.75 $\pm$ 0.12	0.96 $\pm$ 0.22	0.80 $\pm$ 0.05
模型		0.23 $\pm$ 0.02 ²⁾	0.30 $\pm$ 0.06 ²⁾	0.30 $\pm$ 0.08 ²⁾
丙戊酸钠	0.19	0.62 $\pm$ 0.42 ⁴⁾	0.95 $\pm$ 0.29 ⁴⁾	0.65 $\pm$ 0.09 ⁴⁾
化浊解毒疏肝方	2.7	0.28 $\pm$ 0.08	0.48 $\pm$ 0.14	0.49 $\pm$ 0.10 ³⁾
	5.4	0.44 $\pm$ 0.03 ⁴⁾	0.59 $\pm$ 0.13	0.56 $\pm$ 0.09 ⁴⁾
	10.8	0.61 $\pm$ 0.04 ⁴⁾	0.86 $\pm$ 0.24 ⁴⁾	0.68 $\pm$ 0.12 ⁴⁾

数减少,表明癫痫大鼠学习记忆能力受损。而经过药物治疗后各组大鼠寻找平台时间缩短,大鼠穿越平台次数增多,表明化浊解毒疏肝方可以改善癫痫大鼠学习记忆能力。化浊解毒疏肝方高剂量组与丙戊酸钠组大鼠寻找平台时间及穿越平台次数无统计学差异,表明化浊解毒疏肝方高剂量组与丙戊酸钠组疗效相当。

PI3K/Akt 信号转导通路是抗细胞损伤,促进细胞存活的经典通路,在调节认知功能,改善学习记忆中起重要作用,该通路的激活在缺血缺氧性神经元损伤中起着尤为重要作用^[18]。PI3K/Akt 通路是 BDNF/TrkB 通路的重要下游级联信号中的一部分,癫痫发作引起的缺血缺氧可激活 BDNF 与 TrkB 结合后可引起 PI3K 的变化,PI3K 是一种二聚物体复合物,由催化亚基(p110)和调节亚基(p85)构成,PI3K 可以将代谢物磷脂酰肌醇二磷酸(PIP2)脂质催化域转化为 PIP3,PIP3 可充当第二信使,PIP3 的 3 位磷酸基团可同时招募磷酸肌醇依赖性激酶 1(PDK1)和 Akt 蛋白到质膜上,PDK1 使 Thr308 上的 Akt 磷酸化,导致 Akt 部分活化^[19-20],Akt 在羧基端疏水基中的 Ser473 位点则可以进一步被哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)复合体-2(mTORC2)磷酸化,也可被 PI3K 相关激酶(PIKK)家族成员 DNA-PK 磷酸化,从而激发 Akt 的完全活化^[21-22],活化的 Akt 可引起下游底物 GSK-3 β 的变化。

GSK-3 是 Akt 的重要下游底物之一^[23-24],在脑组织发生缺血缺氧损伤时,GSK-3 β 起促进神经细胞凋亡的作用^[25],此时 Akt 磷酸化被激活,通过抑制糖原合成酶激酶 3 的活性而起到神经系统保护作用。是一种丝氨酸/苏氨酸激酶,由 GSK-3 α 和 GSK-3 β 的 2 个亚型组成,参与多种细胞功能的调节^[26],对其神经元存活^[27]及细胞凋亡^[28]有调节作用,活化的 Akt 可在高度保守的 N 末端调节位点磷酸化 GSK-3 亚型(Ser9),该残基的磷酸化导致 GSK-3 β

失活,从而抗细胞凋亡,促神经细胞存活及发挥神经保护作用。免疫组化及 Western blot 检测结果显示,模型组大鼠海马 PI3K, p-Akt, p-GSK-3 β 表达均减少,可能与癫痫反复发作出现脑部缺血缺氧激活了 PI3K/Akt 信号通路,引起 Akt 的磷酸化水平升高,进而促进神经元存活,阻止神经元的损伤,是机体对脑部缺血缺氧的一种保护性反应。经药物治疗后的各组 PI3K, p-Akt, p-GSK-3 β 表达均增多,反复癫痫发作可能激活了 Akt,活化形式的 Akt 可以磷酸化 GSK-3 β Ser9 位点使 GSK-3 β 受到抑制而失活,从而阻止神经元损伤,发挥神经保护作用。

裴林老师认为浊毒既是一种对人体脏腑经络、气血阴阳等均能造成严重损害的致病因素,也是指多种原因导致脏腑功能紊乱、气血运行失常,机体内产生的代谢产物不能及时正常排出而蕴积体内化生的病理产物^[29]。痰邪、瘀血日久,化为浊邪,内伏于脑络,导致疾病缠绵难愈,脑脉失其所养则出现言语混乱、呆傻等表现;舌质红,苔黄腻,脉弦滑数是为浊毒内蕴于脏腑的表现^[30-32]。化浊解毒疏肝方是裴林老师基于浊毒理论结合患者的临床表现及基础实验研究总结的治疗癫痫的基础方,在临床上根据患者的具体临床表现进行药物的加减,在改善癫痫患者记忆方面及情志方面给均有较好的疗效。方中黄芩用于清除体内湿邪浊邪等;荷梗理气宽胸,使气顺痰消,湿邪排除体外;绞股蓝清热解暑,可化内浊毒使浊毒去清窍通而病自止;石菖蒲开窍豁痰,醒神益智,柴胡疏肝升阳,治疗肝气不疏,肝主疏泄功能正常则浊毒去;罗勒化湿活血解毒,疏泄全身气机,气行则湿浊毒行,促使其排除体外,全方共司疏肝郁,化浊毒之功用。

综上所述,化浊解毒疏肝方可激活 PI3K/Akt/GSK-3 β 信号通路相关蛋白的表达,改善癫痫大鼠海马神经元损伤引起的学习记忆能力减退,从而对癫痫大鼠神经元起到保护作用。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] PAUDEL Y N, LISGARAS C P, LIM K S, et al. Epilepsy and comorbidities: towards unraveling the common underlying mechanisms [J]. *Neurosci Res Notes*, 2018, 1(3): 1-4.
- [2] SINGH G, SANDER J W. The global burden of epilepsy report: implications for low- and middle-income countries [J]. *Epilepsy Behav*, 2020, doi: 10.1016/j.yebeh.2020.106949.
- [3] WANG W Z, WU J Z, WANG D S, et al. The prevalence and treatment gap in epilepsy in China: an ILAE/IBE/WHO study [J]. *Neurology*, 2003, 60(9): 1544-1545.
- [4] XU F, NA L, LI Y, et al. Roles of the PI3K/Akt/mTOR signalling pathways in neurodegenerative diseases and tumours [J]. *Cell Biosci*, 2020, 10: 54.
- [5] WANG C, WEI Z, JIANG G, et al. Neuroprotective mechanisms of miR-124 activating PI3K/Akt signaling pathway in ischemic stroke [J]. *Exp Ther Med*, 2017, 13(6): 3315-3318.
- [6] PIAO Y, GUO H, QU Z, et al. CD146 promotes migration and proliferation in pulmonary large cell neuroendocrine carcinoma cell lines [J]. *Oncol Lett*, 2019, 17(2): 2075-2080.
- [7] CHEN G, SHEN H, ZANG L, et al. Protective effect of luteolin on skin ischemia-reperfusion injury through an Akt-dependent mechanism [J]. *Int J Mol Med*, 2018, 42(6): 3073-3082.
- [8] BADIMON L, CASANI L, CAMINO-LOPEZ S, et al. GSK-3beta inhibition and canonical Wnt signaling in mice hearts after myocardial ischemic damage [J]. *PLoS One*, 2019, 14(6): e0218098.
- [9] ALESE O O, NGROUPAYE G T, RAKGANTSHO C, et al. Glutamatergic pathway in depressive-like behavior associated with pentylenetetrazole rat model of epilepsy with history of prolonged febrile seizures [J]. *Life Sci*, 2020, 253: 117692.
- [10] RACINE R J. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure [J]. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 1972, 32(3): 281-294.
- [11] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学 [M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 202-204.
- [12] CHANDRASEKARAN K, CHOI J, ARVAS M I, et al. Nicotinamide mononucleotide administration prevents experimental diabetes-induced cognitive impairment and loss of hippocampal neurons [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(11): 3756.
- [13] ALSHAMMARI T K, ALSHAMMARI M A, NENOV M N, et al. Genetic deletion of fibroblast growth factor 14 recapitulates phenotypic alterations underlying cognitive impairment associated with schizophrenia [J]. *Transl Psychiatry*, 2016, 6: e806.
- [14] SHIMADA T, YAMAGATA K. Pentylenetetrazole-induced kindling mouse model [J]. *J Vis Exp*, 2018(136): e56573.
- [15] KLIQUEVA I A, VAN LUIJTELAAR E L, CHEPURNOVA N E, et al. PTZ-induced seizures in rats: effects of age and strain [J]. *Physiol Behav*, 2001, 72(3): 421-426.
- [16] MARSON A G, AL-KHARUSI A M, ALWAIDH M, et al. The SANAD study of effectiveness of valproate, lamotrigine, or topiramate for generalised and unclassifiable epilepsy: an unblinded randomised controlled trial [J]. *Lancet*, 2007, 369(9566): 1016-1026.
- [17] MORRIS R G M. Spatial localization does not require the presence of local cues [J]. *Learn Motiv*, 1981, 12(2): 239-260.
- [18] ROMORINI L, GARATE X, NEIMAN G, et al. Akt/GSK-3beta signaling pathway is critically involved in human pluripotent stem cell survival [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 35660.
- [19] BRAZIL D P, HEMMINGS B A. Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow [J]. *Trends Biochem Sci*, 2001, 26(11): 657-664.
- [20] MAJEWSKA E, SZELIGA M. Akt/GSK-3beta signaling in glioblastoma [J]. *Neurochem Res*, 2017, 42(3): 918-924.
- [21] FRUMAN D A, CHIU H, HOPKINS B D, et al. The PI3K pathway in human disease [J]. *Cell*, 2017, 170(4): 605-635.
- [22] HEMMINGS B A, RESTUCCIA D F. PI3K-PKB/Akt pathway [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2012, 4(9): a011189.
- [23] SI H, ZHANG Y, SONG Y, et al. Overexpression of adrenomedullin protects mesenchymal stem cells against hypoxia and serum deprivation-induced apoptosis via the Akt/GSK-3beta and Bcl2 signaling pathways [J]. *Int J Mol Med*, 2018, 41(6): 3342-3352.
- [24] KOHNO K, KOYA-MIYATA S, HARASHIMA A, et al. Inflammatory M1-like macrophages polarized by NK-4 undergo enhanced phenotypic switching to an anti-inflammatory M2-like phenotype upon co-culture with apoptotic cells [J]. *J Inflamm (Lond)*, 2021, 18(1): 2.

- [25] BAGHI M, ROSTAMIAN D M, YADEGARI E, et al. Modified level of miR-376a is associated with Parkinson's disease[J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(4): 2622-2634.
- [26] LIM H, LEE D, CHOI W K, et al. Galectin-3 secreted by human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells reduces aberrant tau phosphorylation in an alzheimer disease model[J]. Stem Cells Int, 2020, doi: 10.1155/2020/8878412.
- [27] TAHERI P, KESHAVARZI S, EBADI M, et al. Neuroprotective effects of forced exercise and bupropion on chronic methamphetamine-induced cognitive impairment via modulation of cAMP response element-binding protein/brain-derived neurotrophic factor signaling pathway, oxidative stress, and inflammatory biomarkers in rats[J]. Adv Biomed Res, 2018, 7:151.
- [28] HONG F, ZHANG Y, CHENG W, et al. beta-arrestin-2 up-regulates toll-like receptor 2 signaling and inhibits apoptosis in human endometrial cancer heterotransplants in nude mice[J]. BMC Cancer, 2019, 19(1):1035.
- [29] 裴林, 李佃贵, 曹东义, 等. 浊毒浅识[J]. 河北中医, 2010, 32(1):24-25.
- [30] 田军彪, 万溪, 高晶晶, 等. 化浊解毒活血通络方对大鼠脑缺血再灌注损伤后 Bcl-2 和 Bax 基因表达的影响[J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(6):2727-2730.
- [31] 梁俊杰, 魏明清, 倪敬年, 等. 田金洲教授升降浊法治疗帕金森病非运动症状的临床经验[J]. 世界中医药, 2020, 15(16):2474-2477.
- [32] 华荣, 武曼丽, 丘宇慧, 等. 浅谈益气升降浊法论治清阳不升之脑髓病[J]. 世界中医药, 2020, 15(20): 3058-3061.
- [责任编辑 周冰冰]