

# 阿司匹林通过抑制 PI3K/Akt/mTOR 通路治疗癫痫大鼠反复自发发作

崔小丽 袁婕 王莉 赵瑞 蒋锋

**【摘要】** 目的 研究阿司匹林治疗癫痫大鼠反复自发发作的分子信号通路。方法 80 只 SD 大鼠, 75 只随机分为 5 组, 分别为(1)对照组(C组); (2)癫痫组(S组): 匹鲁卡品诱导癫痫; (3)癫痫+慢病毒转染组(ST组): 海马注射慢病毒转染 shRNA[沉默磷脂酰肌醇激酶(PI3K)的 p85 亚基]; (4)癫痫+阿司匹林组(SA组): 腹腔注射阿司匹林 20 mg/kg; (5)癫痫+雷帕霉素组(SR组): 腹腔注射雷帕霉素 6 mg/kg。剩余 5 只大鼠分入验证组, 用于慢病毒转染的验证。建模后 2 周, 检测各组大鼠癫痫发作的时间和频率, 以及海马内环氧化酶-2(COX-2)、白介素 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )、PI3K 的 p85 亚基(p85)、蛋白激酶 B(Akt)、核糖体蛋白 S6 激酶(p70S6K)和微管相关蛋白 2(MAP2)的表达水平。利用免疫组化染色, 检测 p70S6K 在各组大鼠海马内的表达量。结果 (1)S 组癫痫发作的时间和发作频率均显著高于 SA、SR 和 ST 组( $P < 0.05$ ), 而 3 个干预组间差异无统计学意义( $P > 0.05$ ); (2)S 组 COX-2、IL-1 $\beta$ 、p85、Akt、p70S6K 和 MAP2 蛋白水平均显著高于 C 组( $P < 0.05$ ); ST 和 SR 组 p85、Akt、p70S6K、MAP2 蛋白水平均显著低于 S 组( $P < 0.05$ ); SA 组 COX-2、IL-1 $\beta$ 、p85、Akt、p70S6K、MAP2 蛋白水平均显著低于 S 组( $P < 0.05$ ); SA 组的 p85、Akt、p70S6K、MAP2 蛋白水平与 SR 组差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。结论 阿司匹林可能通过抑制 PI3K/Akt/mTOR 通路和 MAP2 的表达来治疗癫痫大鼠反复自发发作。

**【关键词】** 癫痫; 阿司匹林; 炎症反应; 短发夹 RNA; 雷帕霉素; 微管相关蛋白 2

doi: 10.3969/j.issn.1009-6574.2017.09.001

**Aspirin inhibits spontaneous seizures in rats with epilepsy by inhibiting the PI3K/Akt/mTOR pathway** CUI Xiao-li, YUAN Jie, WANG Li, et al. Department of Neurology, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an 710068, China

**【Abstract】 Objective** To study the molecular signaling pathway of aspirin in recurrent spontaneous seizures in epileptic rats. **Methods** In 80 SD rats, 75 rats were randomly divided into 5 groups, the control group (C group); the epilepsy group (S group): epilepsy induced by pilocarpine; epilepsy + lentivirus transfection group (ST group): after hippocampal injection of shRNA lentiviral transfection [silence phosphatidylinositol kinase (PI3K) the subunit p85]; the epilepsy + aspirin group (SA group): intraperitoneal injection of aspirin 20 mg/kg; the epilepsy + rapamycin group (SR group): intraperitoneal injection of rapamycin 6 mg/kg. The remaining 5 rats were assigned to test group for validation of the lentivirus transfection. Two weeks after modeling, the frequency and time of seizures in rats, and the level of the hippocampal inner cyclooxygenase-2 (COX-2), interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), p85 subunit of PI3K (p85), protein kinase B (Akt), ribosomal protein S6 kinase (p70S6K) and microtubule associated protein 2 (MAP2) were tested. Immunohistochemical staining was used to detect the expression of p70S6K in the hippocampus of rats in each group. **Results** The time and frequency of seizures in S group were significantly higher than those of SA, SR and ST group ( $P < 0.05$ ), and there was no significant difference among the three intervention groups ( $P > 0.05$ ). The levels of COX-2, IL-1 $\beta$ , p85, Akt, p70S6K and MAP2 protein in S group were significantly higher than those of C group ( $P < 0.05$ ), and the level of p85, Akt, p70S6K, MAP2 in ST and SR group were lower than those in the S group ( $P < 0.05$ ). The level of COX-2, IL-1 $\beta$ , p85, Akt, p70S6K and MAP2 were significantly lower than that of S group ( $P < 0.05$ ), and there was no significant difference of p85, Akt, p70S6K and MAP2 between SA and SR group ( $P > 0.05$ ). **Conclusions** Aspirin may treat recurrent spontaneous seizures in epileptic rats by inhibiting the PI3K/Akt/mTOR pathway and the expression of MAP2.

**【Key words】** Epilepsy; Aspirin; Inflammatory reaction; Short hairpin RNA; Rapamycin; Microtubule associated protein 2

基金项目: 陕西省社会发展科技攻关项目(2015SF209)

作者单位: 710068 陕西省人民医院神经内一科

通讯作者: 蒋锋 Email: docjiangfeng@163.com

近年来,越来越多的研究表明<sup>[1]</sup>,炎症反应参与了癫痫的形成过程,并在其中起到了重要作用。炎症反应可导致神经元的坏死和凋亡,也可诱导新生神经元的异常迁徙和苔藓纤维的芽生,并在脑内形成异常环路。有假说指出异常环路的形成有可能是导致癫痫反复自发性发作的原因。有动物实验研究表明<sup>[2]</sup>,早期应用雷帕霉素可显著减少苔藓纤维的芽生,其发挥药效的机制是抑制哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)。相似的,本实验组前期研究表明<sup>[3]</sup>,癫痫大鼠建模成功后3 h给予阿司匹林也可显著抑制脑内苔藓纤维的芽生,但其发挥药效的具体信号通路尚不清楚,mTOR通路是否也参与其中?本实验拟通过氯化锂-匹鲁卡品(LICL-PILO)诱导建立大鼠癫痫模型,探索阿司匹林治疗癫痫大鼠反复自发性发作的分子信号通路。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物的分组及干预

健康SD大鼠(第四军医大学实验动物中心)80只,体重为200~225 g,饲养于(西京医院动物房),12 h-12 h光-暗环境(8:00-20:00),自由饮水、标准饮食。

随机抽取5只大鼠分入验证组。水合氯醛(10%, 3.5 ml/kg)麻醉,取3  $\mu$ l带有红色免疫荧光蛋白的慢病毒,按照试剂盒说明书提供的操作流程进行慢病毒转染。参照Paxinos和Watson<sup>[4]</sup>的方法进行海马定位,并注射慢病毒转染短发夹RNA(shRNA),用以沉默磷脂酰肌醇激酶(PI3K)的p85亚基。

其余75只大鼠,随机等分为5组:(1)对照组(C组):常规饲养,脑内(3  $\mu$ l)和腹腔内(20 mg/kg)分别注入生理盐水;(2)癫痫组(S组):按照崔小丽等<sup>[3]</sup>的方法,利用匹鲁卡品诱导大鼠癫痫模型(Racine<sup>[5]</sup>评级IV级以上达70 min),并颅内和腹腔注射等量的生理盐水;(3)癫痫+慢病毒转染组(ST组):癫痫建模终止后,行海马注射慢病毒转染shRNA,同时腹腔注射等量的生理盐水;(4)癫痫+阿司匹林组(SA组):癫痫建模终止后3 h,根据前期实验结果,腹腔注射阿司匹林20 mg/kg,同时颅内注射等量的生理盐水;(5)癫痫+雷帕霉素组(SR组):癫痫建模终止后3 h,腹腔注射雷帕霉素6 mg/kg和生理盐水14 mg/kg。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 行为学观察及录像分析

建模4 d后,各组随机选取5只大鼠,进行每天8:00-20:00的连续录像10 d。根据Racine<sup>[5]</sup>标准进行评级,记录IV级和IV级以上癫痫发作的持续时间和频率。

#### 1.2.2 Western blot检测目标蛋白水平

建模成功后14 d,对各组未做行为学观察的10只大鼠,使用水合氯醛(10%, 3.5 ml/kg)进行麻醉,行脱颈处死,在冰上分离出海马组织。每只大鼠取50 mg海马,加入蛋白裂解液(Cell Signaling, USA),制取组织匀浆,并经离心提取其上清液。首先进行上清液中的蛋白定量,

然后使用聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)进行蛋白电泳。半干后,转移至聚偏氟乙烯(PVDF)膜上。使用5%脱脂牛奶,在室温下封闭2 h。然后,再加入各种一抗,环氧合酶-2(COX-2, 1:1 000, Sigma)、白细胞介素1(IL-1 $\beta$ , 1:500, Novus)、p85亚基(p85, 1:1 000, 艾博抗)、蛋白激酶(Akt, 1:1 000, CST)、核糖体蛋白S6激酶(p70S6K, 1:250, 艾博抗)、微管相关蛋白2(MAP2, 1:1 000, Sigma),在4 $^{\circ}$ C条件下孵育过夜。再加入二抗,山羊抗兔IgG(1:5 000, Sigma)、山羊抗小鼠IgG(1:3 000, Sigma),然后室温孵育1 h。对各种蛋白经过显色、成像。然后,使用Image J进行扫描,测定各条带的灰度值,最终标定各种不同蛋白的表达水平。

#### 1.2.3 海马切片制作及免疫组化染色

建模14 d后,将剩余的30只大鼠(行为学观察25只+验证组5只)进行麻醉,迅速开胸,将针头固定于主动脉,并剪破右心耳。首先使用生理盐水150 ml灌注冲去血液,然后分两次,各200 ml多聚甲醛(4%, 4 $^{\circ}$ C, PH=7.4)对组织进行初步固定;取出脑组织,在多聚甲醛中进行固定,冰冻状态下制作30  $\mu$ m的海马组织切片。每只大鼠各随机抽取5张切片行p70S6K免疫组化染色。(1)p70S6K免疫组化染色:按超敏即用型二步法检测试剂盒的使用说明书,对切片先进行脱蜡、水化,接着利用微波对抗原进行碱性热修复,然后灭活内源性氧化酶,再加入稀释后的浓缩型抗体p70S6K(1:100),孵育12 h后再加入辣根酶标记的抗鼠IgG,最后DAB和苏木素染色,树胶封片。(2)切片的图像处理和分析:使用荧光显微镜分别观察慢病毒转染切片和免疫组化切片。其中,每张免疫组化切片随机选取3个完整的高倍镜视野,使用Image J软件计算其光密度值,并取其平均值记为该张切片的平均光密度值。

### 1.3 统计学方法

运用SPSS 19.0统计学软件进行统计分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,癫痫发作次数及频率组间比较采用U检验,其余数据则采用单因素方差分析,组间的两两比较,使用SNK-q检验,检验水准设置为 $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 验证组慢病毒转染效果

见图1(见本期封三)。慢病毒转染验证组大鼠2 d后,麻醉处死,制作脑切片并行免疫荧光染色。在荧光显微镜下观察红色荧光蛋白的表达,结果显示,整个海马区均有红色荧光分布,占总细胞数量的80%~95%,提示慢病毒转染高效且成功。

### 2.2 不同组癫痫发作时间和频率

见图2。S组大鼠发作时间和发作频率均显著高于其他3组( $P < 0.05$ );而其他3组间比较,差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。

### 2.3 各组蛋白的表达水平比较

见表1。S组COX-2、IL-1 $\beta$ 、p85、Akt、p70S6K、MAP2蛋白水平均显著

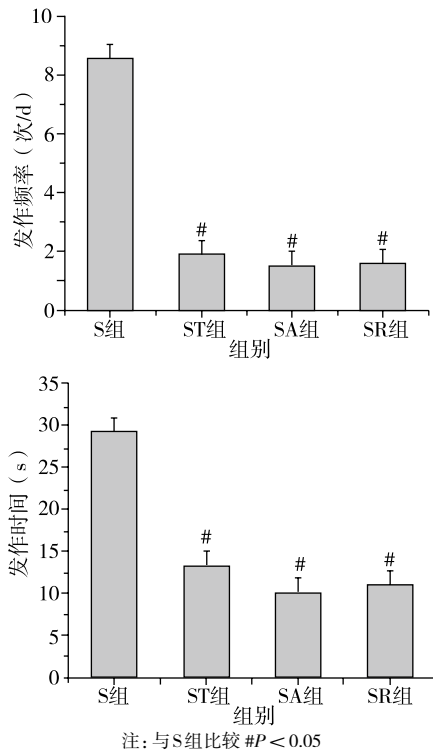


图2 不同组大鼠癫痫发作的时间及频率比较

高于C组 ( $P < 0.05$ ); 其中ST组因慢病毒转染抑制了PI3K-p85; SR组因抑制了mTOR通路, 均使得两组p85、Akt、p70S6K、MAP2蛋白水平均显著低于S组 ( $P < 0.05$ ); 而SA组因阿司匹林对于COX-2的抑制作用, 进而导致IL-1 $\beta$ 、p85、Akt、p70S6K、MAP2蛋白水平均显著低于S组 ( $P < 0.05$ )。但SA组的p85、

Akt、p70S6K、MAP2蛋白水平与SR组比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

2.4 不同组p70S6K免疫组化染色结果 见图3, 4。S组平均光密度值显著高于其他各组 ( $P < 0.05$ ); C组、S组和ST组平均光密度值显著高于SA组和SR组 ( $P < 0.05$ ); 而SA组和SR组之间差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

### 3 讨论

PI3K/Akt/mTOR信号转导通路不仅仅存在于人类的中枢神经系统内, 而是广泛存在于各种组织器官内, 对于细胞生长、分化和增殖, 该通路均有重要调控作用<sup>[6]</sup>。各类营养、生长因子、胰岛素等分子是该通路上游激活因子; 其作用靶点则主要有两个, 分别是p70S6K和4EBP1。两者通过磷酸化水平的变化, 可起到调节下游蛋白质翻译<sup>[7]</sup>的作用。研究表明, p70S6K与癫痫的发生、发展有着重要联系。p70S6K具有促进细胞生长、mRNA合成和rRNA翻译的功能; 在神经系统中则介导了谷氨酸和亮氨酸对于突出信号的调节过程<sup>[8]</sup>; 同时在人类癫痫和癫痫的动物模型中均发现了p70S6K免疫荧光染色的MD的增高, 表明其表达水平增高, 提示mTOR信号通路的激活。

雷帕霉素是哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)的特异性抑制剂<sup>[9]</sup>。对于mTOR信号通过的激活有显著的抑制作用。大量研究表明, 雷帕霉素通过对该通路的抑制, 可有效抑制神经元的丢失、星形胶质细胞的增生及苔藓纤维的芽生, 并有效改善癫痫症状<sup>[10]</sup>。本实验所得结果也表明, 大鼠癫痫模型中

表1 各组蛋白的表达水平比较(mg/ml,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	只数	COX-2	IL-1 $\beta$	p85	Akt	p70S6K	MAP2
C组	10	0.97 $\pm$ 0.03 <sup>**</sup>	1.00 $\pm$ 0.02 <sup>#</sup>	1.29 $\pm$ 0.02 <sup>#</sup>	1.44 $\pm$ 0.35 <sup>#</sup>	0.80 $\pm$ 0.09 <sup>**</sup>	0.62 $\pm$ 0.05 <sup>**</sup>
S组	10	1.80 $\pm$ 0.10 <sup>*</sup>	1.36 $\pm$ 0.06 <sup>*</sup>	1.43 $\pm$ 0.11 <sup>*</sup>	1.92 $\pm$ 0.18 <sup>*</sup>	1.02 $\pm$ 0.06 <sup>*</sup>	0.85 $\pm$ 0.07 <sup>*</sup>
ST组	10	1.78 $\pm$ 0.08 <sup>*</sup>	1.34 $\pm$ 0.08 <sup>*</sup>	0.90 $\pm$ 0.02 <sup>**</sup>	1.38 $\pm$ 0.16 <sup>#</sup>	0.85 $\pm$ 0.08 <sup>**</sup>	0.58 $\pm$ 0.05 <sup>**</sup>
SA组	10	0.50 $\pm$ 0.07 <sup>#</sup>	1.13 $\pm$ 0.07 <sup>#</sup>	1.20 $\pm$ 0.15 <sup>#</sup>	1.45 $\pm$ 0.26 <sup>#</sup>	0.59 $\pm$ 0.11 <sup>#</sup>	0.35 $\pm$ 0.06 <sup>#</sup>
SR组	10	1.50 $\pm$ 0.06 <sup>*</sup>	1.33 $\pm$ 0.05 <sup>*</sup>	1.26 $\pm$ 0.09 <sup>#</sup>	1.58 $\pm$ 0.37 <sup>#</sup>	0.57 $\pm$ 0.05 <sup>#</sup>	0.33 $\pm$ 0.04 <sup>#</sup>

注: 与S组比较 #P < 0.05; 与SA组比较 \*P < 0.05

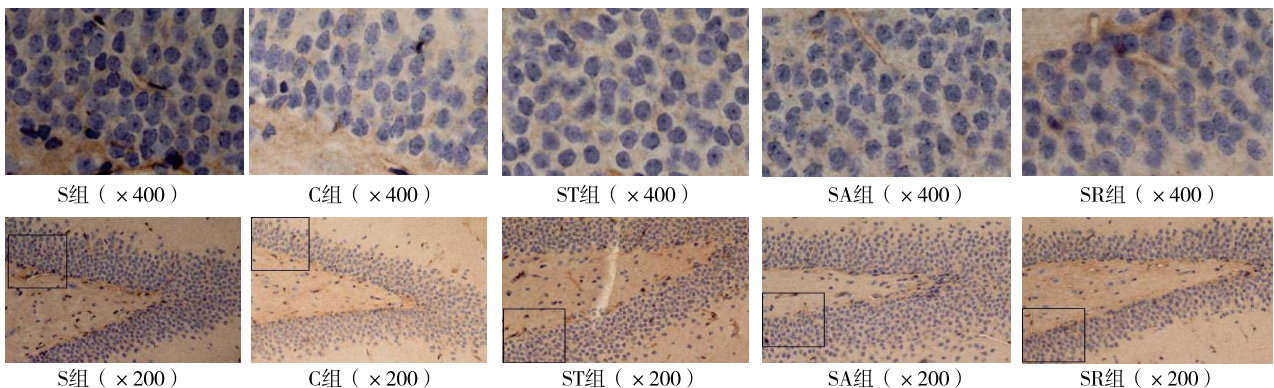


图3 各组p70S6K免疫组化染色

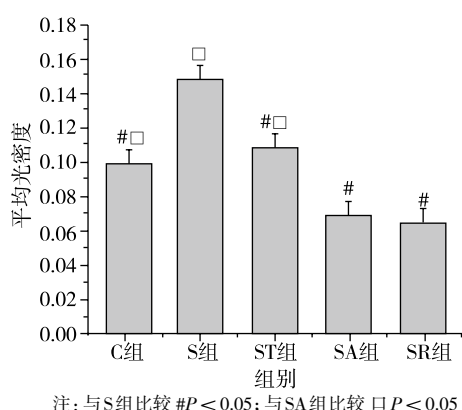


图4 各组p70S6K免疫组化染色平均光密度值比较

COX-2、IL-1 $\beta$ 、p85、Akt和p70S6K蛋白水平均显著升高,提示mTOR通路被激活;通过转染可有效沉默PI3K的p85亚基的慢病毒shRNA,即可抑制该通路,从而导致p85、Akt和p70S6K蛋白水平的显著降低;而雷帕霉素也可抑制该通路的激活,引起p70S6K水平的降低。而阿司匹林首先降低COX-2和IL-1 $\beta$ 水平,从而有效抑制了大鼠海马内的炎症反应。进而引起p85、Akt和p70S6K蛋白水平的降低,起到抑制通路激活的作用。因此,不难发现阿司匹林也具有抑制mTOR通路激活的能力,其药效也可能是借此通路来发挥。

近年来,随着癫痫研究<sup>[11]</sup>的深入,学者们发现苔藓纤维芽生,其侧突发生分叉和反折<sup>[12]</sup>并与颗粒细胞形成非对称性<sup>[13]</sup>(兴奋性)的突触联系。这种异常的兴奋性回路的形成,可能是导致癫痫反复发作,并难以治愈的重要病理机制<sup>[14]</sup>。

MAP2是一种特异性与微管相互作用的微管相关蛋白(II型),主要表达于神经元的胞体、树突及突触后致密区,其与微管连接,以磷酸化依赖性的方式调节突触的可塑性、细胞骨架的动力学及稳定性<sup>[15]</sup>。如果阻断海马神经元中MAP2的表达,将导致神经元突起的数目和生长的减少或停止。而在非神经细胞中过表达MAP2,则会导致该细胞胞浆内出现类树突状的伸长。这些均提示MAP2可能参与了细胞突起生长和神经元极性的形成。Kato等<sup>[16]</sup>在大鼠癫痫模型的海马颗粒层中发现了MAP2免疫活性的增强,且其表达的时间和空间分布于苔藓纤维的芽生相一致。另一方面,张继伟<sup>[17]</sup>的研究表明,mTOR通路可以通过CD44促进MAP2的表达及神经元细胞突的生长,进而促进神经元的再生。综合以上研究结果表明,mTOR通路可能通过调控MAP2的表达来参与调节苔藓纤维的芽生。本实验组前期研究表明,阿司匹林也可显著抑制癫痫大鼠脑内苔藓纤维的芽生<sup>[3]</sup>。再结合本实验结果,MAP2的表达水平可能和mTOR通路的激活存在着相关性和一致性。因此,

阿司匹林可能是通过抑制mTOR通路来抑制苔藓纤维的芽生和异常环路的形成,最终降低癫痫的反复发作。

#### 参 考 文 献

- [1] Borsini A, Zunszain PA, Thuret S, et al. The role of inflammatory cytokines as key modulators of neurogenesis[J]. Trends Neurosci, 2015, 38(3): 145-157.
- [2] Buckmaster PS, Ingram EA, Wen X. Inhibition of the mammalian target of rapamycin signaling pathway suppresses dentate granule cell axon sprouting in a rodent model of temporal lobe epilepsy[J]. J Neurosci, 2009, 29(25): 8 259.
- [3] 崔小丽,杨丰,王莹,等.阿司匹林对癫痫大鼠海马苔藓纤维芽生的影响[J].现代生物医学进展,2011,11(2):220-222.
- [4] Paxinos G, Watson C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates [M]. Elsevier Academic Press, 1986.
- [5] Racine RJ, Okujava V, Chipashvili S. Modification of seizure activity by electrical stimulation: III. Mechanisms[J]. Electroencephalogr Clin Neurophysiol, 1972, 32(3): 295-299.
- [6] Bockaert J, Marin P. mTOR in Brain Physiology and Pathologies [J]. Physiol Rev, 2015, 95(4): 1 157-1 187.
- [7] Robitaille AM, Hall MN. Quantitative phosphoproteomics reveal mTORC1 activates de novo pyrimidine synthesis [J]. Science, 2013, 339(6 125): 1 320-1 323.
- [8] Lenz G, Avruch J. Glutamatergic regulation of the p70S6 kinase in primary mouse neurons [J]. J Biol Chem, 2005, 280(46): 38 121-38 124.
- [9] Huang K, Fingar DC. Growing knowledge of the mTOR signaling network [J]. Semin Cell Dev Biol, 2014, 36: 79.
- [10] Raffo E, Coppola A, Ono T, et al. A pulse rapamycin therapy for infantile spasms and associated cognitive decline [J]. Neurobiol Dis, 2011, 43(2): 322-329.
- [11] Wuarin JP, Dudek FE. Electrographic seizures and new recurrent excitatory circuits in the dentate gyrus of hippocampal slices from kainate-treated epileptic rats [J]. J Neurosci, 1996, 16(14): 4 438-4 448.
- [12] Covolan L, Mello LE. Temporal profile of neuronal injury following pilocarpine or kainic acid-induced status epilepticus [J]. Epilepsy Res, 2000, 39(2): 133-152.
- [13] Cavazos JE, Zhang P, Qazi R, et al. Ultrastructural features of sprouted mossy fiber synapses in kindled and kainic acid-treated rats [J]. J Comp Neurol, 2003, 458(3): 272-292.
- [14] Chang BS, Lowenstein DH. Epilepsy [J]. N Engl J Med, 2003, 349(13): 1 257-1 266.
- [15] Pereno GL, Beltramino CA. Timed changes of synaptic zinc, synaptophysin and MAP2 in medial extended amygdala of epileptic animals are suggestive of reactive neuroplasticity [J]. Brain Res, 2010, 1 328(3): 130-138.
- [16] Kato K, Masa T, Tawara Y, et al. Dendritic aberrations in the hippocampal granular layer and the amygdalohippocampal area following kindled-seizures [J]. Brain Res, 2001, 901(1): 281-295.
- [17] 张继伟. mTOR通路通过CD44促进神经元再生的内在机制的研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2015.

(收稿日期: 2017-07-02)