

## $\alpha$ -细辛醚对氯化锂-匹罗卡品致痫大鼠 PI3K/Akt/mTOR 通路的调节作用

张春 董海影 牛建国 牛英才 王峰 刘娟

750004 银川, 宁夏医科大学颅脑疾病重点实验室(张春、牛建国、王峰、刘娟); 161006

齐齐哈尔医学院(董海影、牛英才); 750004 银川, 宁夏医科大学总医院神经外科(王峰)

通信作者: 王峰, Email: nxwwang@163.com; 刘娟, Email: ryuken0518@163.com

DOI: 10.3969/j.issn.1009-6574.2018.09.007

**【摘要】目的** 探讨  $\alpha$ -细辛醚对癫痫大鼠学习记忆的影响及分子机制。**方法** SD 大鼠随机分成生理盐水组、癫痫组、 $\alpha$ -细辛醚组, 采用氯化锂-匹罗卡品注射诱导大鼠癫痫造模,  $\alpha$ -细辛醚组造模前用  $\alpha$ -细辛醚干预 28 d。水迷宫检测大鼠空间学习记忆能力, Western blot 方法检测大鼠海马组织 PI3K、Akt、mTOR 蛋白表达, 采用 RT-PCR 技术检测大鼠海马组织 PI3K、Akt、mTOR 的 mRNA 表达。**结果** 水迷宫实验结果显示  $\alpha$ -细辛醚能够改善大鼠的学习记忆能力; Western blot 结果显示, 癫痫组海马组织 PI3K、p-Akt、mTOR 蛋白表达较生理盐水组降低 ( $P < 0.05$ ),  $\alpha$ -细辛醚组海马组织的各蛋白表达较癫痫组增加 ( $P < 0.05$ )。RT-PCR 结果显示, 癫痫组海马组织 PI3K、p-Akt、mTOR mRNA 表达水平与生理盐水组比较显著降低 ( $P < 0.05$ ),  $\alpha$ -细辛醚组海马组织 PI3K、p-Akt 的 mRNA 表达水平与癫痫组比较显著增高 ( $P < 0.05$ )。**结论**  $\alpha$ -细辛醚能够改善氯化锂-匹罗卡品致痫大鼠学习记忆, 其分子机制可能与上调 PI3K/Akt/mTOR 表达有关。

**【关键词】** 癫痫; 海马;  $\alpha$ -细辛醚; PI3K/Akt/mTOR

**基金项目:** 宁夏自然科学基金科研项目(NZ14088); 宁夏自治区“十三五”重大科技项目(2016BZ07); 宁夏医科大学科学研究基金资助项目(XZ2017005); 宁夏高等学校科学研究项目(NGY2017131)

### Regulation effects of alpha-asarone on PI3K/Akt/mTOR pathway in lithium chloride pilocarpine induced epileptic rats

Zhang Chun, Dong Haiying, Niu Jianguo, Niu Yingcai, Wang Feng, Liu Juan  
Key Laboratory of Cerebrocranial Diseases, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China (Zhang C, Niu JG, Wang F, Liu J); Qiqihar Medical University, Qiqihar 161006, China (Dong HY, Niu YC); Department of Neurosurgery, the General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China (Wang F)  
Corresponding authors: Wang Feng, Email: nxwwang@163.com; Liu Juan, Email: ryuken0518@163.com

**【Abstract】Objective** To explore the molecular mechanism of alpha-asarone to affect learning and memory skills of lithium chloride pilocarpine induced Epileptic Rats. **Methods** SD rats were randomly divided into 3 groups: normal saline group, epilepsy group, and alpha-asarone group. Lithium chloride pilocarpine injection were applied to induce rat epilepsy models. The rats of the alpha-asarone group were given alpha-asarone 28 days before modeling. Water maze was used to detect the spatial learning and memory ability of the SD rats. Western blot technique was used to detect the expressions of PI3K, Akt and mTOR proteins of hippocampus in lithium chloride pilocarpine induced epileptic rats. RT-PCR technique was used to detect the expressions of PI3K, Akt and mTOR mRNA of hippocampus in lithium chloride pilocarpine induced epileptic rats. **Results** Water maze test result showed that alpha-asarone can improve the spatial learning and memory ability of the SD rats. The expression of PI3K, Akt and mTOR proteins decreased obviously in epilepsy group compared with those in saline group ( $P < 0.05$ ). The expressions of PI3K, Akt and mTOR proteins increased obviously in alpha-asarone group compared with those in epilepsy group ( $P < 0.05$ ). The results of RT-PCR technique showed that the expressions of PI3K, p-Akt and mTOR mRNA decreased obviously in epilepsy group compared with those in saline group ( $P < 0.05$ ), and the expressions of PI3K and p-Akt mRNA increased obviously in alpha-asarone group compared with those in epilepsy group ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** Alpha-asarone can improves learning and memory of lithium chloride pilocarpine induced epileptic rats, and the molecular mechanism maybe related to up-regulation of the expressions of PI3K, Akt and mTOR proteins and mRNA.

**【Key words】** Epilepsy; Hippocampus; Alpha-asarone; PI3K/Akt/mTOR

**Fund programs:** Ningxia Natural Science Foundation Project (NZ14088); Ningxia Thirteenth-Five Major Science and Technology Projects (2016BZ07); Ningxia Medical University Foundation Project (XZ2017005); Ningxia Education Department Research Project (NGY2017131)

癫痫是由外伤、感染、肿瘤等疾病导致脑部神经元异常放电,且伴有情绪、意识、精神、认知等功能异常的神经系统疾病<sup>[1]</sup>。在神经系统疾病中发病率位居第二,仅次于心脑血管疾病<sup>[2-3]</sup>。临床上,药物治疗是癫痫治疗方法之一,但疗效不理想。目前,寻求有效且能通过血脑屏障的药物是治疗癫痫的首要任务之一。

中医药治疗癫痫有着悠久的历史,石菖蒲是治疗癫痫的一种药材,α-细辛脑(asarone)是石菖蒲的主要有效成分,又名α-细辛醚。化学名2,4,5-三甲氧基-1-丙稀基苯,分子式C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>O<sub>3</sub>。临床上,α-细辛醚被用于抗癫痫、止咳平喘、健忘、中风失语、耳鸣、老年性痴呆、降血脂等病症<sup>[4]</sup>。既往研究结果证实石菖蒲及其主要成分α-细辛醚能够使癫痫的发作潜伏期得到延长,缓解病症,逆转因癫痫导致的记忆力下降等症状<sup>[5]</sup>。本研究拟通过检测氯化锂-匹罗卡品致痫大鼠海马组织PI3K、Akt和mTOR表达,探讨α-细辛醚改善癫痫大鼠学习记忆的分子机制。

一、材料与方法

1. 材料: (1) 动物。清洁级SD大鼠, 雄性, 体重180~220 g, 由宁夏医科大学实验动物中心提供[合格证号: SCXK(宁)2500-001]。 (2) 药品及试剂。α-细辛醚(纯度≥98%)(美国Cayman公司)。匹罗卡品(美国Sigma公司), 兔抗PI3K、Akt、p-Akt、p-mTOR单克隆抗体(德国Abcam公司), 生物素标记的羊抗兔IgG抗体、SP试剂、DAB显色剂(北京中杉金桥生物有限公司), 引物由上海生物工程有限公司合成, RT-PCR反应试剂盒(Thermo公司), Trizol(美国Invitrogen公司)。

2. 方法: (1) 动物分组及给药。SD大鼠40只随机分成生理盐水组12只、癫痫组12只、α-细辛醚组12只。生理盐水组注射生理盐水, 另外两组大鼠腹腔注射氯化锂-匹罗卡品制备癫痫模型, 氯化锂剂量为127 mg/kg, 匹罗卡品剂量为40 mg/kg。按Racine评分标准, 大鼠身体立起伴有双侧前肢抽搐, 连续3次以上为癫痫模型成功。α-细辛醚组大鼠于匹罗卡品注射前连续28 d给予α-细辛醚, 剂量为100 mg/kg, 生理盐水组与癫痫组给予等量的生理盐水。给药方式均为灌胃<sup>[6]</sup>。 (2) Morris水迷宫。共8 d, 分为定位航行与空间搜索两个实验步骤。定位航行6 d, 药物干预后2~3 h记录SD大鼠平均逃避潜伏期, 观察不

同组大鼠空间学习能力。在第7、8天进行空间搜索实验, 记录SD大鼠在60 s内穿越平台象限的次数, 评价大鼠空间记忆能力。 (3) 标本采集。水迷宫实验结束后, 10%水合氯醛麻醉, 大鼠断头, 冰上迅速取出海马组织。 (4) RT-PCR。应用Trizol试剂一步法提取海马组织总RNA, 按照试剂盒进行逆转录和荧光定量PCR。PCR反应条件: 94℃, 3 min; 94℃, 30 s; 58℃, 30 s; 72℃, 45 s; 40个循环。引物序列见表1。 (5) Western Blot。应用蛋白提取试剂盒提取冰冻海马组织总蛋白, BCA法测定蛋白浓度, 蛋白变性, -20℃保存备用。各组样品采取总蛋白40 μg, 8%SDS-PAGE凝胶电泳分离蛋白质。电泳后将蛋白转印至硝酸纤维素膜上, 5%脱脂奶粉封闭后, 分别加入1:500稀释的兔抗大鼠PI3K单克隆抗体, 1:1000稀释的兔抗大鼠Akt单克隆抗体, 1:1000稀释的兔抗大鼠p-Akt单克隆抗体, 1:500稀释的兔抗大鼠p-mTOR单克隆抗体, β-Tubulin作为内参照, 4℃培育过夜。PBST洗涤3次, 加入1:5000稀释的荧光标记二抗, 37℃反应1 h, PBST洗涤3次, 采用Odyssey双色红外线荧光成像系统扫描图像, 并进行半定量比较分析, 以目的基因条带与内参基因β-Tubulin的比值来表示蛋白的表达水平。

表1 RT-PCR实验的引物序列

基因	引物	序列(5'→3')
GAPDH	上游引物	GAGTCAACGGATTTCGCTG
	下游引物	GACAAGATTCCCGTTCTCAG
PI3K	上游引物	GGACCCGATGCGGTTAGAG
	下游引物	ATCAAGTGGATGCCCCACAG
Akt	上游引物	GGACAAGGACGGGCACATTA
	下游引物	CGACCCGACATCATCTCGTA
mTOR	上游引物	CGCGAACCTCAGGGCAA
	下游引物	ATTCGGCTCTTTAGGCCAC

3. 统计学方法: 采用SPSS 17.0统计软件包进行分析, 计量资料以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用LSD-t, 以P < 0.05为差异有统计学意义。

二、结果

1. 3组大鼠Morris水迷宫定位航行实验结果比较: 见表2。3组大鼠逃避潜伏期和穿越平台次数比较差异有统计学意义(F=375.084, 31.748, P < 0.05), 癫痫组的逃避潜伏期明显高于生理盐水组, 穿越平

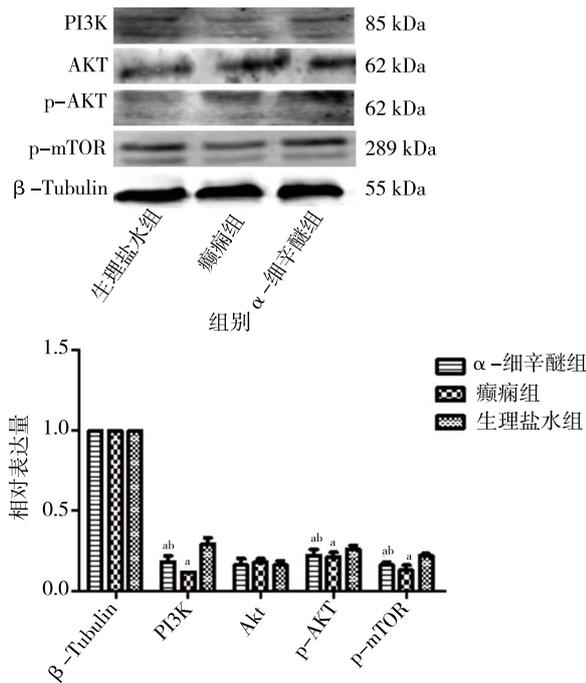
台次数明显低于生理盐水组,经  $\alpha$ -细辛醚干预,逃避潜伏期缩短、穿越平台次数提高( $P < 0.05$ )。

表2 3组大鼠Morris水迷宫定位航行实验结果比较( $n=12, \bar{x} \pm s$ )

组别	逃避潜伏期(s)	穿越平台次数(次)
生理盐水组	12.72 ± 3.43 <sup>a</sup>	4.38 ± 1.18 <sup>a</sup>
癫痫组	54.37 ± 5.39	1.22 ± 0.31
$\alpha$ -细辛醚组	16.68 ± 3.15 <sup>a</sup>	4.40 ± 1.53 <sup>a</sup>

注:与癫痫组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$

2. 3组大鼠海马蛋白表达水平比较:见图1。 $\alpha$ -细辛醚组、癫痫组大鼠海马组织中PI3K、p-Akt、p-mTOR蛋白表达水平均低于生理盐水组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$ )。经干预, $\alpha$ -细辛醚组大鼠海马组织中PI3K、p-Akt、p-mTOR蛋白表达水平均高于癫痫组,差异均计学意义(均 $P < 0.05$ )。



注:与生理盐水组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ,与癫痫组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$

图1  $\alpha$ -细辛醚对癫痫大鼠海马组织PI3K、Akt、mTOR蛋白表达的影响( $n=5$ )

3. 3组大鼠海马各因子mRNA水平比较:见表3。与生理盐水组比较, $\alpha$ -细辛醚组与癫痫组大鼠海马组织中PI3K、Akt、mTOR mRNA相对表达量均降低,差异均有统计学意义( $F_{PI3K}=188.483, F_{Akt}=151.358, F_{mTOR}=80.491$ ,均 $P < 0.05$ ),癫痫组降低最显著。其中, $\alpha$ -细辛醚组与癫痫组比较,癫痫组PI3K、Akt

mRNA相对表达量低于 $\alpha$ -细辛醚组( $t_{PI3K}=7.858, t_{Akt}=6.087$ ,均 $P < 0.05$ ),差异有统计学意义;癫痫组mTOR mRNA相对表达量低于 $\alpha$ -细辛醚组( $t_{mTOR}=0.418, P > 0.05$ ),但差异无统计学意义。

表3 3组大鼠海马组织PI3K、Akt、mTOR mRNA表达水平比较( $n=5$ )

组别	PI3K	Akt	mTOR
生理盐水组	1.254 ± 0.079	1.101 ± 0.074	1.024 ± 0.067
癫痫组	0.577 ± 0.056 <sup>a</sup>	0.531 ± 0.062 <sup>a</sup>	0.602 ± 0.049 <sup>a</sup>
$\alpha$ -细辛醚组	0.786 ± 0.063 <sup>ab</sup>	0.731 ± 0.058 <sup>ab</sup>	0.653 ± 0.079 <sup>a</sup>

注:与生理盐水组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与癫痫组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$

讨论 癫痫是世界范围的常见神经系统慢性疾病,药物治疗是其常用的治疗方法,因此寻找有效的药物是癫痫研究的重点之一。以往研究发现<sup>[7]</sup>中草药石菖蒲中提取的有效活性成分 $\alpha$ -细辛醚对多种类型的癫痫动物模型均具有一定的抗癫痫作用,但在 $\alpha$ -细辛醚抗癫痫作用机理方面较少研究报道。

PI3K信号通路是细胞内信号通路之一,Akt位于PI3K的下游,与细胞增殖和凋亡等过程相关联。一些学者<sup>[8-9]</sup>研究发现匹鲁卡品致痫大鼠海马神经元大量凋亡,p-Akt表达水平下降,Akt可能参与了匹罗卡品诱导的癫痫大鼠海马神经元的凋亡,并且Akt活化后将信号传递给多种下游底物,其中,哺乳动物雷帕霉素蛋白(mTOR)为Akt下游底物之一。mTOR在PI3K途径中既是下游效应器又是上游调节器。mTOR的信号至少由两种不同的复合体形式完成,即对雷帕霉素敏感的mTOR复合体1(mTORC1)与对雷帕霉素不敏感的复合体2(mTORC2)完成,发挥其独特的作用。活化mTORC1磷酸化的底物主要包括S6K(Thr-389)、eIF4E(Ser-209)和4EBP1。mTORC2磷酸化Akt的作用位点在Ser-473<sup>[10-11]</sup>。

本实验以氯化锂-匹罗卡品致癫痫大鼠为研究对象,用天然药物石菖蒲的单体成分 $\alpha$ -细辛醚预防性给药28 d,结果显示, $\alpha$ -细辛醚能够改善大鼠的学习记忆能力,同时,RT-PCR和Western blot技术分别分析了 $\alpha$ -细辛醚组、癫痫组与生理盐水组的SD大鼠海马组织中PI3K/Akt/mTOR信号通路的部分核酸和蛋白表达的影响,结果显示 $\alpha$ -细辛醚组海马组织PI3K、p-Akt和p-mTOR mRNA和蛋白表达水平与癫痫组比较显著增高。

本实验发现, $\alpha$ -细辛醚对实验性癫痫大鼠的学习记忆能力有显著的改善作用,对癫痫大鼠海马神经元PI3K/Akt/mTOR信号通路有作用,为 $\alpha$ -细辛醚作为抗癫痫的辅助药物提供更多的实验依据。

**利益冲突** 文章所有作者共同认可文章无相关利益冲突

**作者贡献声明** 试验设计为张春、牛建国、牛英才, 研究实施、资料收集为张春、董海影, 论文撰写为张春, 论文修订为王峰, 刘娟审校

**参 考 文 献**

[1] Devinsky O, Vezzani A, O'Brien TJ, et al. Epilepsy[J]. Nat Rev Dis Primers, 2018, 4: 18024. DOI: 10.1038/nrdp.2018.24.

[2] Mathon B, Bédos-Ulvin L, Baulac M, et al. Evolution of ideas and techniques, and future prospects in epilepsy surgery[J]. Rev Neurol (Paris), 2015, 171(2): 141-156. DOI: 10.1016/j.neurol.2014.09.010.

[3] Lüders H, Amina S, Bailey C, et al. Proposal: different types of alteration and loss of consciousness in epilepsy[J]. Epilepsia, 2014, 55(8): 1140-1144. DOI: 10.1111/epi.12595.

[4] Min WW, Yuskaitis CJ, Yan Q, et al. Elevated glycogen synthase kinase-3 activity in Fragile X mice: key metabolic regulator with evidence for treatment potential[J]. Neuropharmacology, 2009, 56(2): 463-472. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2008.09.017.

[5] Liu HJ, Lai X, Xu Y, et al.  $\alpha$ -Asarone Attenuates Cognitive Deficit in a Pilocarpine-Induced Status Epilepticus Rat Model via a Decrease in the Nuclear Factor- $\kappa$ B Activation and Reduction in Microglia Neuroinflammation[J]. Front Neurol, 2017, 8: 661.

DOI: 10.3389/fneur.2017.00661.

[6] Yang F, Liu ZR, Chen J, et al. Roles of astrocytes and microglia in seizure-induced aberrant neurogenesis in the hippocampus of adult rats[J]. J Neurosci Res, 2010, 88(3): 519-529. DOI: 10.1002/jnr.22224.

[7] Chen QX, Miao JK, Li C, et al. Anticonvulsant activity of acute and chronic treatment with a-asarone from Acorus gramineus in seizure models[J]. Biol Pharm Bull, 2013, 36(1): 23-30.

[8] Zhang R, Yang G, Wang Q, et al. Acylated ghrelin protects hippocampal neurons in pilocarpine-induced seizures of immature rats by inhibiting cell apoptosis[J]. Mol Biol Rep, 2013, 40(1): 51-58. DOI: 10.1007/s11033-012-1993-1.

[9] Tokuda S, Mahaffey CL, Monks B, et al. A novel Akt3 mutation associated with enhanced kinase activity and seizure susceptibility in mice[J]. Hum Mol Genet, 2011, 20(5): 988-999. DOI: 10.1093/hmg/ddq544.

[10] Fan QW, Weiss WA. Inhibition of PI3K-Akt-mTOR signaling in glioblastoma by mTORC1/2 inhibitors[J]. Methods Mol Biol, 2012, 821: 349-359. DOI: 10.1007/978-1-61779-430-8\_22.

[11] Gulati N, Karsy M, Albert L, et al. Involvement of mTORC1 and mTORC2 in regulation of glioblastoma multiforme growth and motility[J]. Int J Oncol, 2009, 35(4): 731-740.

(收稿日期: 2018-05-09)

(本文编辑: 赵静姝)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

**本刊文稿中缩略语的书写要求**

在本刊发表的学术论文中, 已被公知公认的缩略语在摘要和正文中可以不加注释直接使用(表1); 不常用的和尚未被公知公认的缩略语以及原词过长、在文中多次出现者, 若为中文可于文中第1次出现时写明全称, 在圆括号内写出缩略语, 如: 流行性脑脊髓膜炎(流脑); 若为外文可于文中第1次出现时写出中文全称, 在圆括号内写出外文全称及其缩略语, 如: 阿尔茨海默病(Alzheimer disease, AD)。若该缩略语已经公知, 也可不注出其英文全称。不超过4个汉字的名词不宜使用缩略语, 以免影响论文的可读性。西文缩略语不得拆开转行。

**表1** 《神经疾病与精神卫生》杂志常用缩略语

缩略语	中文全称	缩略语	中文全称	缩略语	中文全称
CNS	中枢神经系统	CSF	脑脊液	GABA	$\gamma$ -氨基丁酸
IL	白细胞介素	AD	老年痴呆症(阿尔茨海默病)	PD	帕金森病
MRI	磁共振成像	CT	电子计算机体层扫描	DSA	数字减影血管造影
PCR	聚合酶链式反应	EEG	脑电图	MR	磁共振
HE	苏木素-伊红	BDNF	脑源性神经营养因子	PET	单光子发射计算机断层扫描
SOD	超氧化物歧化酶	ELISA	酶联免疫吸附剂测定	CRP	C反应蛋白
MMSE	简易精神状态检查	NIHSS	美国国立卫生研究院卒中评分	TIA	短暂性脑缺血发作
TNF	肿瘤坏死因子	WHO	世界卫生组织	HAMD	汉密尔顿抑郁量表
HAMA	汉密尔顿焦虑量表	PANSS	阳性与阴性症状量表	rTMS	重复经颅磁刺激
5-HT	5-羟色胺	SSRIs	选择性5-羟色胺再摄取抑制剂	MoCA	蒙特利尔认知评估量表
PTSD	创伤后应激障碍	ICD-10	国际疾病分类第十版	DSM	美国精神障碍诊断与统计手册
CCMD-3	中国精神障碍分类与诊断标准第3版				