

· 药理 ·

## 加味柴胡疏肝汤调控 miRNA-204 对癫痫小鼠海马自噬的影响

汪顺贵<sup>1</sup>, 玉倩<sup>1</sup>, 李华霞<sup>1</sup>, 李欢<sup>1</sup>, 卢玲<sup>1</sup>, 廖现秋<sup>1</sup>, 吴琼<sup>1</sup>, 李华琼<sup>1</sup>, 陈爱玲<sup>1</sup>,  
刁丽梅<sup>2\*</sup>, 何乾超<sup>2</sup>, 蔡伦<sup>2</sup>, 梁霜<sup>2</sup>

(1. 广西中医药大学 研究生学院, 南宁 530023; 2. 广西中医药大学 第一附属医院, 南宁 530001)

**[摘要]** 目的: 观察加味柴胡疏肝汤对癫痫小鼠海马微小非编码 RNA 204(miRNA-204) 的表达影响, 探讨其发挥神经保护作用的机制。方法: 将 60 只小鼠随机分为 6 组: 正常组, 模型组(盐酸匹罗卡品  $180 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), 加味柴胡疏肝汤组( $7 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ), 加味柴胡疏肝汤 + miRNA-204 模拟物组( $7 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1} + 2 \mu\text{L}$ ), 加味柴胡疏肝汤 + miRNA-204 抑制物组( $7 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1} + 2 \mu\text{L}$ ), 卡马西平组( $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ), 各灌胃 2 周; 采用匹罗卡品使小鼠致病, 6 组分别灌胃给药、抑制及过表达 miRNA-204 后, 处死小鼠, 取其海马组织, 观察每组的指标情况, 采用实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测小鼠海马 miRNA-204 的表达; 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测自噬相关蛋白微管相关蛋白轻链 3(LC3), 自噬相关标志性蛋白 7(ATG7) 的表达情况, 苏木素-伊红(HE)染色观察每组小鼠海马病理学变化; 透射电镜观察各组小鼠海马组织自噬情况。结果: 与正常组比较, 模型组小鼠 miRNA-204 表达显著降低( $P < 0.01$ ), 海马 C1 区病理改变最明显, ATG7, LC3 II/LC3 I 表达显著升高( $P < 0.01$ ), 自噬小体数量最多; 与模型组比较, 加味柴胡疏肝汤组小鼠海马组织 miRNA-204 表达明显升高( $P < 0.05$ ), 海马 C1 区病理改变减轻, ATG7, LC3 II/LC3 I 表达明显降低( $P < 0.05$ ), 自噬小体数量减少; 加味柴胡疏肝汤 + miRNA-204 模拟物组小鼠海马组织 miRNA-204 表达显著升高( $P < 0.01$ ), 海马 C1 区病理改变最轻, ATG7, LC3 II/LC3 I 表达显著降低( $P < 0.01$ ), 自噬小体数量最少; 与加味柴胡疏肝汤比较, 加味柴胡疏肝汤 + miRNA-204 抑制物组上述指标变化趋势相同, 变化幅度明显减少( $P < 0.05$ )。结论: 加味柴胡疏肝汤可以改善癫痫小鼠海马组织病理改变, 其作用机制可能是通过升高癫痫小鼠海马 miRNA-204 的表达, 抑制神经元过度自噬, 减少细胞凋亡。

**[关键词]** 柴胡疏肝汤; 癫痫; miRNA-204; 自噬

**[中图分类号]** R2-0; R285; R289; R742.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)22-0001-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20192137

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190717.1104.006.html>

**[网络出版时间]** 2019-07-18 09:23

### Effect of Modified Chaihu Shugantang Regulate miRNA-204 on Hippocampus Autophagy in Epileptic Mice

WANG Shun-gui<sup>1</sup>, YU Qian<sup>1</sup>, LI Hua-xia<sup>1</sup>, LI Huan<sup>1</sup>, LU Ling<sup>1</sup>, LIAO Xian-qiu<sup>1</sup>, WU Qiong<sup>1</sup>,  
LI Hua-qiong<sup>1</sup>, CHEN Ai-ling<sup>1</sup>, DIAO Li-mei<sup>2\*</sup>, HE Qian-chao<sup>2</sup>, CAI Lun<sup>2</sup>, LIANG Shuang<sup>2</sup>

(1. Graduate School of Guangxi University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Nanning 530023, China;

2. The First Affiliated Hospital of Guangxi University of TCM, Nanning 530001, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the effect of modified Chaihu Shugantang on the expression of miRNA-204 in hippocampus of epileptic mice, and to explore its mechanism of neuroprotection. **Method:** The sixty mice were randomly divided into 6 groups: normal group, model group (pilocarpine  $180 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), and modified Chaihu Shugantang group ( $7 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ), modified Chaihu Shugantang + miRNA-204 mimic group ( $7 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1} +$

**[收稿日期]** 20190402(002)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81760809); 广西自然科学基金项目(2017GXNSFAA198294); 广西卫生适宜技术研究与开发项目(s2017049)

**[第一作者]** 汪顺贵, 在读硕士, 从事癫痫的基础与临床研究, E-mail: 1191298244@qq.com

**[通信作者]** \*刁丽梅, 博士, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 从事癫痫的基础与临床研究, E-mail: dlm721226@163.com

2  $\mu\text{L}$ ), modified Chaihu Shugantang + miRNA-204 inhibitor group ( $7 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1} + 2 \mu\text{L}$ ), carbamazepine group ( $30 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ), each was given intragastric administration for 2 weeks, using pilocarpine to cause epilepsy in mice, respectively, add flavor to Bupleurum after intragastric administration, inhibition and overexpression of miRNA-204, the mice were sacrificed and their hippocampus tissues were harvested. The indicators of each group were observed, Real-time quantitative PCR detecting system (Real-time PCR) was used to detect mouse hippocampal miRNA-204 expression, Western blot analysis of autophagy-related protein microtubule-associated protein light chain 3 (LC3), autophagy-associated marker protein 7 (ATG7) expression, hematoxylin pathological condition of hippocampus in each group was observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. The autophagy of hippocampus in each group was observed by transmission electron microscopy. **Result:** Compared with normal group, the expression of miRNA-204 was significantly decreased in model group ( $P < 0.01$ ), the pathological changes in the hippocampal C1 area were the most obvious, the expression of ATG7, LC3 II/LC3 I was increased ( $P < 0.01$ ), and the autophagy was small. Compared with model group, the expression of miRNA-204 in the hippocampus of the modified Chaihu Shugantang group was increased ( $P < 0.05$ ), the pathological changes in the hippocampal C1 area were alleviated, the expression of ATG7, LC3 II/LC3 I was decreased ( $P < 0.05$ ), and the autophagy was small. The number of body decreased, the expression of miRNA-204 in hippocampus of modified Chaihu Shugantang + miRNA-204 mimic group was significantly increased ( $P < 0.01$ ), the pathological changes in hippocampal C1 area were the lightest, and the expression of ATG7, LC3II/LC3I was decreased ( $P < 0.01$ ), the number of autophagosomes was the least. Compared with modified Chaihu Shugantang group, the above-mentioned indicators of modified Chaihu Shugantang + miRNA-204 inhibitor group had the same change trend and the change range decreased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Modified Chaihu Shugantang can improve the pathological changes of hippocampus in mice with epilepsy and play a neuroprotective role. The mechanism may be to increase the expression of miRNA-204 in hippocampus of mice with epilepsy, inhibit excessive autophagy of neurons and reduce apoptosis.

**[Key words]** Chaihu Shugantang; epilepsy; miRNA-204; autophagy

癫痫是以大脑神经元异常放电为特征的慢性反复发作性短暂性脑功能失调综合征<sup>[1]</sup>,典型症状表现为突然发作,自动停止,反复出现运动、感觉、精神、意识方面障碍。流行病学调查研究显示,全球共有癫痫患者大约 5 000 万人,每年新增癫痫患者约 200 万人,现我国癫痫患病率高达 6%,且这些数据每年都在递增<sup>[2]</sup>。自噬是指吞噬自身细胞质蛋白或细胞器并使其包被进入囊泡,并与溶酶体融合形成自噬溶酶体,降解其所包裹的内容物的过程<sup>[3]</sup>。多项研究表明,癫痫的发作与自噬存在密切的关系<sup>[4]</sup>。微小非编码 RNA (miRNA) 是一种短小的非编码 RNA 片段,通常在转录后水平调控基因表达<sup>[5]</sup>。近年来研究发现,miRNA 参与癫痫的发生可能与其自噬功能有关<sup>[6-7]</sup>,其中 miRNA-204 和自噬参与多种疾病的发生和治疗<sup>[8]</sup>。柴胡疏肝汤出自《景岳全书》,有调气疏肝,解郁散结的功效。加味柴胡疏肝汤为柴胡疏肝汤加减而来,有实验证明,加味柴胡疏肝汤可以通过癫痫小鼠海马区的谷氨酸代谢通路治疗癫痫<sup>[9]</sup>。因此在治疗癫痫疾病过程中,

调节细胞自噬或许可成为更为有效的新的治疗方法。众多研究显示,中医药对癫痫患者临床症状的改善、提高患者预后及生活质量均有一定的疗效,同时联合用药时又可降低化学合成药物的不良反应。结合前人研究,本课题组前期研究观察发现,加味柴胡疏肝汤可以改善癫痫患者和癫痫动物模型的异常脑电图,减少癫痫发作频率<sup>[10-13]</sup>。并运用基因芯片技术研究发现急性癫痫模型小鼠海马组织中的差异基因 miRNA-204 下调。本实验通过研究加味柴胡疏肝汤干预癫痫小鼠后,观察其自噬相关因子,miRNA-204 的变化及其病理的改变,探讨加味柴胡疏肝汤在自噬方面对癫痫小鼠海马神经元的影响。

## 1 材料

**1.1 动物** 雄性昆明种小鼠 70 只,SPF 级,6~8 周龄,体质量 25~30 g,由广西中医药大学实验动物中心提供,动物使用许可证号 SYXK(桂)2009-0001,所有动物实验均符合广西中医药大学动物伦理委员会要求。

**1.2 药物与试剂** 加味柴胡疏肝汤:北柴胡 15 g,

白芍 15 g, 枳壳 10 g, 炙甘草 6 g, 川芎 10 g, 香附 10 g, 陈皮 9 g, 浙贝母 15 g, 生牡蛎 30 g, 钩藤 10 g, 蜈蚣 3 条。所有药材经广西中医药大学罗耽副教授鉴定为正品, 符合 2015 年版《中国药典》规范, 采用自动煎药机煎煮, 浓缩至药物质量浓度  $500 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 盐酸匹罗卡品 (美国 Sigma 公司, 批号 290K1391); 硫酸阿托品注射液 (郑州铃锐制药有限公司, 批号 20170718); 0.9% 氯化钠注射液 (北京双鹤药业有限公司, 批号 C170615051); 卡马西平片 (杭州赛诺菲制药有限公司, 批号 16060970); 小鼠 miRNA-204 模拟物和抑制物 (苏州吉玛基因股份有限公司, 批号分别为 9063, 9081); trizol (美国 Invitrogen 公司, 批号 15596-026); miRNA 第一条链 cDNA 合成试剂盒, miRNA 荧光定量检测试剂盒, 总 miRNA 分离试剂盒 (天根生物科技有限公司, 批号分别为 KR201, FP401, DP501); 自噬相关标志蛋白 7 (ATG7) 抗体 (武汉博士德生物工程有限公司, 货号 BM5322); 自噬相关蛋白微管相关蛋白轻链 3 (LC3) II/LC3 I 抗体 (英国 Abcam 公司, 货号 ab192890); 山羊抗兔二抗 (北京博奥森公司, 货号 ZB2301);  $\beta$ -肌动蛋白抗体 ( $\beta$ -actin, 北京中杉金桥生物技术有限公司, 货号 TA-09); 苏木素-伊红 (HE) 染色液 (苏州泽科生物技术有限公司, 批号 ZKP-E151004-1)。

**1.3 仪器** ABI7500 型实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 仪 (美国 Applied Biosystems 公司); 22331 型蛋白浓度定量仪, BioPhotometer 型生物分光光度计, 5417R 型低温高速离心机 (德国 Eppendorf 公司); MM1000 型凝胶成像分析仪 (美国 Carestream 公司); DYCZ-24DN 型电泳仪 (北京六一公司); Tanon1600 型分析仪器 (上海 Tanon 公司); WSE-4040 型桌面数显脑立体定位仪 (深圳市瑞沃德生命科技公司); AE6675L 型半干转膜仪系统 (美国 Atento SA 公司); Tecnai G2 型电镜 (美国 FEI 公司); EM UC7 型超薄切片机 (德国 Leica 公司)。

## 2 方法

**2.1 造模与分组** 所有小鼠自由饮水, 适应性饲养 1 周后, 按随机数字表的法将小鼠随机分为 6 组: 正常组、模型组、加味柴胡疏肝汤组、加味柴胡疏肝汤 + miRNA-204 模拟物组、加味柴胡疏肝汤 + miRNA-204 抑制物组、卡马西平组, 每组各 10 只。除正常组外, 其余组致癫痫步骤: 先腹腔注射硫酸阿托品  $17 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 30 min 后腹腔注射盐酸匹罗卡品  $180 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 给药完毕后, 按照经典的 Racine (1972) 实验动物癫痫性发作标准对动物行为学进

行观察<sup>[14]</sup>。注射 30 min 后, 对未出现 4 级以上发作的动物每隔 15 min 给予首剂 1/3 剂量的匹罗卡品追加注射, 追加注射 2 次以后未出现 4 级以上发作的小鼠, 根据 Racine 标准, 视为造模失败, 不纳入下一步行为学观察。持续痫性发作达到 1 h 后给予地西洋腹腔注射, 以终止痫性发作。实验小鼠给药用量及方法参照《现代医学实验动物学》中的标准方程进行计算<sup>[15]</sup>。作如下处理: 正常组, 生理盐水  $20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$  灌胃, 灌胃 2 周; 模型组, 予上述致病方法, 再给予生理盐水  $20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$  灌胃, 灌胃 2 周; 加味柴胡疏肝汤组, 给予加味柴胡疏肝汤  $7 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  灌胃 2 周<sup>[10]</sup>; 加味柴胡疏肝汤 + miRNA-204 模拟物组, 灌胃加味柴胡疏肝汤 2 周后, 在麻醉下通过脑立体定位仪, 颅内海马区注射 miRNA-204 模拟物  $2 \mu\text{L}$ ; 加味柴胡疏肝汤 + miRNA-204 抑制物组, 灌胃加味柴胡疏肝汤 2 周后, 在麻醉下通过脑立体定位仪, 颅内海马区注射 miRNA-204 抑制物  $2 \mu\text{L}$ ; 卡马西平组, 给予卡马西平混悬液  $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 2 周后再次使用盐酸匹罗卡品  $180 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  致痫, 正常组采用生理盐水代替匹罗卡品。

## 2.2 指标检测

**2.2.1 Real-time PCR 检测各组小鼠海马 miRNA-204 的表达** 取 30 mg 海马组织, trizol 抽提 RNA 后, 检测 RNA 浓度和纯度, RNA 纯度 A260/A280 应在 1.8 ~ 2.2。通过随机引物和逆转录酶 (天根生物技术有限公司) 将 RNA 逆转录成 cDNA, 引物序列见表 1。PCR 反应条件为  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  反应 60 min, 合成的 cDNA 反应液放置于  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  保存。PCR 扩增反应体系: miRNA-204/ $\beta$ -actin Forward Primer  $2 \mu\text{L}$ , miRNA-204/ $\beta$ -actin Reverse Primer  $2 \mu\text{L}$ ,  $2 \times \text{SYBR Green Mix } 9 \mu\text{L}$ , cDNA  $2 \mu\text{L}$ , RNase-Free ddH<sub>2</sub>O  $5 \mu\text{L}$ ; PCR 反应条件:  $94 \text{ }^\circ\text{C}$  2 min,  $94 \text{ }^\circ\text{C}$  20 s,  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  34 s, 40 个循环。采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法进行数据的相对定量分析。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences of PCR

引物	序列 (5'-3')	长度
miRNA-204	CTGCCGTTCCCTTTGTGCAT	22 nt
	TATGTTGTCTCTCTCTGTCTC	
$\beta$ -actin	AAGCCAACCGGAGAA	183 bp
	ATGGGGGAGGGCATAAC	

**2.2.2 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测各组自**

噬相关蛋白的表达 取组织 30 ~ 100 mg 进行液氮研磨,加入 RIPA 蛋白裂解液 500 ~ 1 000  $\mu\text{L}$  中,充分混匀,裂解 2 ~ 3 h,12 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 20 min,将上清转移到新的离心管中,分装待用,用考马斯亮蓝试剂盒测定样本蛋白浓度,变性后根据目的蛋白分子量大小配制不同浓度的胶电泳转膜,孵育一抗,ATG7 抗体(1:300),LC3 II/LC3 I 抗体(1:1 000), $\beta$ -actin(1:500),4  $^{\circ}\text{C}$  过夜,洗膜后,二抗孵育 1 h 加 ECL 发光液曝光,扫描图像后分析结果。以两者比值表达其相对含量并计算 LC3II/LC3I 值。

**2.2.3 HE 染色观察海马组织病理学变化** 将由 4% 多聚甲醛固定的海马组织经过脱水、透明、浸蜡包埋后进行 5  $\mu\text{m}$  厚度切片,后进行 HE 染色,应用光学显微镜观察小鼠海马 CA1 区神经元的形态、数目及其分布。

**2.2.4 透射电镜观察海马神经元自噬情况** 取材、固定、脱水、浸透、包埋后,切成厚 0.5 ~ 1  $\mu\text{m}$  的半薄切片,使用甲苯胺蓝染色定位,后进行超薄切片,行电子染色,漂洗自然干燥后用透射电镜(加速电压 200 kV)观察。

**2.2.5 统计学分析** 采用 SPSS 17.0 软件统计分析,所有数据用  $\bar{x} \pm s$  表示。符合正态分布时,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 检验;非正态分布组间比较采用秩和检验, $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对癫痫小鼠海马 miRNA-204 表达的影响** 与正常组比较,模型组 miRNA-204 表达显著下调( $P < 0.01$ );与模型组比较,加味柴胡疏肝汤组和加味柴胡疏肝汤 + miRNA-204 抑制物组,miRNA-204 表达明显上调( $P < 0.05$ );而卡马西平组和加味柴胡疏肝汤 + miRNA-204 模拟物组,miRNA-204 表达上调更加显著( $P < 0.01$ )。见表 2。

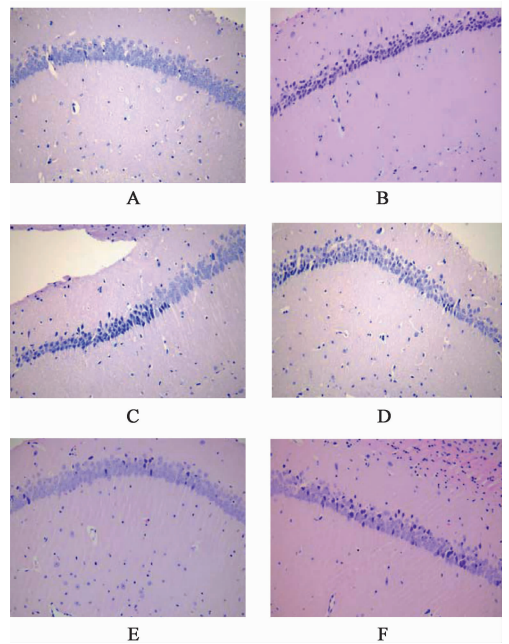
**3.2 对癫痫小鼠海马病理形态学的影响** HE 染色结果显示,正常组小鼠海马 CA1 区细胞形态正常,以锥体细胞为主,基本无神经元细胞出现,各层细胞结构整齐;模型组小鼠海马结构的 CA1 区神经元呈层状排列,结构紊乱,大量细胞形态改变,胞体收缩呈不规则形,胞核固缩深染,结构不清;与模型组比较,加味柴胡疏肝汤组组织结构及细胞形态有所改善,CA1 正常锥体细胞数量增多,约 40% ~ 50% 胞体收缩呈不规则形,胞核固缩深染,加味柴胡疏肝汤 + miRNA-204 模拟物组组织结构比较清晰,CA1 正常锥体细胞数量增多,约 20% ~ 25% 胞体收

表 2 柴胡疏肝汤对癫痫小鼠海马 miRNA-204 表达的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )  
Table 2 Effect of modified Chaihu Shugantang on miRNA-204 expression levels in hippocampus of mice with epilepsy ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量	miRNA-204
正常	-	1.01 $\pm$ 0.07
模型	180 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	0.17 $\pm$ 0.03 <sup>1)</sup>
加味柴胡疏肝汤	7 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	0.31 $\pm$ 0.03 <sup>2)</sup>
加味柴胡疏肝汤 + miRNA-204 模拟物	7 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ + 2 $\mu\text{L}$	0.58 $\pm$ 0.09 <sup>3)</sup>
加味柴胡疏肝汤 + miRNA-204 抑制剂	7 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ + 2 $\mu\text{L}$	0.29 $\pm$ 0.03 <sup>2)</sup>
卡马西平	30 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	0.66 $\pm$ 0.08 <sup>3)</sup>

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

缩呈不规则形,胞核固缩深染,加味柴胡疏肝汤 + miRNA-204 抑制物组组织结构及细胞形态略有改善,CA1 约 60% ~ 70% 胞体收缩呈不规则形,胞核固缩深染,结构紊乱,卡马西平组海马 CA1 区细胞形态正常,以锥体细胞为主,伴有少量深染神经元细胞出现,各层细胞结构整齐。见图 1。



A. 正常组;B. 模型组;C. 加味柴胡疏肝汤组;D. 加味柴胡疏肝汤 + miRNA-204 模拟物组;E. 加味柴胡疏肝汤 + miRNA-204 抑制物组;F. 卡马西平组(图 2 ~ 3 同)

图 1 加味柴胡疏肝汤对小鼠海马组织病理学影响(HE,  $\times 200$ )  
Fig. 1 Effect of modified Chaihu Shugantang on hippocampus histopathology of mice(HE,  $\times 200$ )

**3.3 对癫痫小鼠海马自噬相关 ATG7, LC3 II/LC3 I 蛋白表达的影响** 与正常组比较,模型组小鼠海

马组织自噬相关标志性蛋白 ATG7, LC3 II/LC3 I 的表达水平显著上调 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 加味柴胡疏肝汤组和加味柴胡疏肝汤 + miRNA-204 抑制物组小鼠海马组织自噬相关蛋白 ATG7, LC3 II/LC3 I 表达水平明显下调 ( $P < 0.05$ ); 而卡马西平组和加味柴胡疏肝汤 + miRNA-204 模拟物组小鼠海马组织自噬相关蛋白 ATG7, LC3 II/LC3 I 下调水平更加显著 ( $P < 0.01$ )。见图 2, 表 3。

**3.4 对癫痫小鼠海马自噬的影响** 通过电子显微镜观察每组癫痫小鼠海马组织的自噬情况发现,

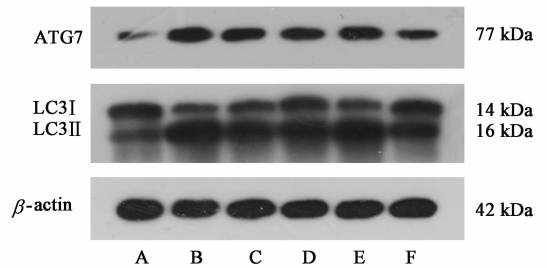


图 2 小鼠海马自噬相关 ATG7, LC3 II/LC3 I 蛋白表达电泳  
Fig. 2 Electrophoresis of hippocampus autophagy related LC3 II/LC3 I and ATG7 proteins in mice

表 3 加味柴胡疏肝汤对小鼠海马自噬相关蛋白 ATG7, LC3 II/LC3 I 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 3 Effect of modified Chaihu Shugantang on ATG7 and LC3 II/LC3 I expression of autophagy related proteins in hippocampus of mice ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量	ATG7/ $\beta$ -actin	LC3 II/LC3 I
正常	-	0.24 $\pm$ 0.03	0.11 $\pm$ 0.05
模型	180 mg $\cdot$ kg <sup>-1</sup>	1.03 $\pm$ 0.16 <sup>1)</sup>	0.73 $\pm$ 0.08 <sup>1)</sup>
加味柴胡疏肝汤	7 g $\cdot$ kg <sup>-1</sup>	0.77 $\pm$ 0.09 <sup>2)</sup>	0.59 $\pm$ 0.09 <sup>2)</sup>
加味柴胡疏肝汤 + miRNA-204 模拟物	7 g $\cdot$ kg <sup>-1</sup> + 2 $\mu$ L	0.53 $\pm$ 0.09 <sup>3)</sup>	0.35 $\pm$ 0.04 <sup>3)</sup>
加味柴胡疏肝汤 + miRNA-204 抑制剂	7 g $\cdot$ kg <sup>-1</sup> + 2 $\mu$ L	0.82 $\pm$ 0.09 <sup>2)</sup>	0.62 $\pm$ 0.05 <sup>2)</sup>
卡马西平	30 mg $\cdot$ kg <sup>-1</sup>	0.48 $\pm$ 0.12 <sup>3)</sup>	0.28 $\pm$ 0.04 <sup>3)</sup>

正常组小鼠细胞形态完整, 细胞器结构正常, 未发现自噬小体; 模型组小鼠海马区神经元核膜凹凸, 核内异染色质为主, 染色质出现小而不规则的凝块、边集, 细胞器减少、结构破坏, 细胞浆内形成大小不等的空腔和空泡, 细胞膜破裂, 细胞内容物泄漏等, 出现大量典型的双层囊泡类似洋葱皮样结构的自噬小体; 余用药组自噬小体数量较模型组减少, 由多到少依次为加味柴胡疏肝汤组 + miRNA-204 抑制物组、加味柴胡疏肝汤组、加味柴胡疏肝汤组 + miRNA-204 抑制物组、卡马西平组。见图 3。

#### 4 讨论

现代抗癫痫西药具有不良反应多、副作用大、依赖性强的缺点, 中医药是我国特色及传统医学的一部分, 具有多效、多因、多靶点的优势, 能改善慢性病变的临床症状和防治靶器官受损的作用, 因此寻找有效的中药防治癫痫逐渐成为热点<sup>[16]</sup>。痫病的病机与肝的疏泄功能异常关系密切, 其风、痰、瘀产生均为肝气失于疏泄、条达的病理变化, 因而“从肝论治”是治疗痫病的关键所在<sup>[11]</sup>。加味柴胡疏肝汤具有疏肝解郁, 化痰熄风的功效, 方中柴胡功善疏肝解郁, 用以为君; 香附理气疏肝, 川芎、白芍活血行气, 二药相合, 助柴胡以解肝经之郁滞, 并增行气活血之

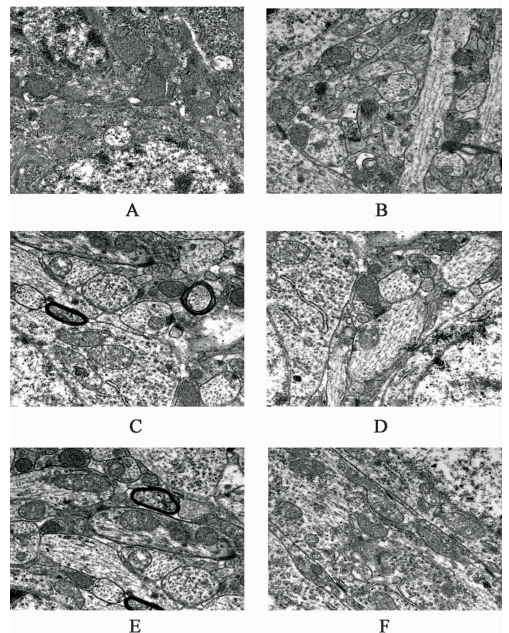


图 3 加味柴胡疏肝汤对小鼠海马自噬的影响 (电镜扫描,  $\times 5000$ )  
Fig. 3 Effect of modified Chaihu Shugantang on autophagy in hippocampus of mice (TEM,  $\times 5000$ )

效, 共为臣药; 枳壳、陈皮行滞理气, 甘草、白芍缓急止痛, 养血柔肝, 均为佐药; 甘草调和诸药, 为使药; 在此基础上加用浙贝母清热化痰, 散结解毒, 再加工

牡蛎平肝熄风和钩藤熄风止痉。诸药合用共奏疏肝理气,化痰熄风之效。经临床证实该方是对癫痫具有确切治疗作用的中药复方制剂。现代药理研究表明柴胡皂苷具有抗惊厥和镇静作用,能够缓解癫痫患者的抽搐、全身强直、凝视等症状<sup>[17-18]</sup>。有研究表明,浙贝母能够下调难治性癫痫大鼠模型的耐药蛋白,减少患者的癫痫发作频率<sup>[19]</sup>。当癫痫持续状态,大脑神经元细胞持续异常放电,代谢废物不断积累,超过细胞生理性自噬时,导致细胞死亡。而细胞微环境过多的病理性代谢产物积聚与中医“风”“痰”“郁”密切相关。癫痫持续状态或长期慢性癫痫,病理性代谢产物的过多沉积,会引起超过生理范围的细胞自噬,认为是中医“风”“痰”“郁”在细胞微观层面上的体现。具有疏肝解郁、化痰熄风功效的加味柴胡疏肝汤可能正是通过减少“风”“痰”“郁”,从而抑制异常激活的细胞自噬,减少细胞程序性死亡,保护神经元,达到抗癫痫的作用。

癫痫作为一种常见的神经系统疾病,其发病机制十分复杂。多项研究表明,癫痫的发作与自噬存在密切的关系<sup>[4]</sup>。生理状态下自噬是细胞清除自身受损或衰老细胞器的过程,具有积极作用<sup>[20]</sup>。但在缺血、缺氧等病理条件下,过度自噬或者不足自噬均可以导致疾病的发生<sup>[21]</sup>。最新研究发现 ATG7 的失活可以造成自噬缺陷,从而导致癫痫的发生<sup>[22]</sup>。另有研究表明,癫痫的发生与自噬导致的细胞凋亡现象有一定关系<sup>[23]</sup>。当自噬被过度激活时,可促进细胞程序性死亡(I 型凋亡型细胞死亡,II 型自噬性细胞死亡,III 型坏死性细胞死亡)<sup>[24]</sup>,使神经元产生病理性改变,从而导致癫痫的发生。研究证明,ATG7 以及 LC3 II 与 LC3 I 的比值是自噬发生的标志性蛋白<sup>[25-27]</sup>。有研究证明 miRNA-204 可通过对 LC3 负调控,调节自噬活性从而影响相关疾病<sup>[28-29]</sup>。研究发现 miRNA-204 在缺氧缺血条件下调节 LC3 II 抑制自噬发生,减少 miRNA-204 会增加 LC3 II 的表达水平<sup>[30]</sup>。miRNA-204 还可以通过保护海马神经元,抑制癫痫样放电<sup>[31]</sup>。也有研究证明,miRNA-204 在癫痫患者海马中的表达是降低的<sup>[32]</sup>。

本研究采用匹罗卡品致痫小鼠模型,HE 染色发现致痫小鼠海马相对于正常小鼠海马神经元产生了明显的病理性改变,同时在透射电镜下观察发现致痫小鼠海马区神经元发生明显的病理性改变以及大量的自噬小体,本实验采用 Western blot 检测方法发现致痫小鼠海马的自噬标志性蛋白 ATG7, LC3 II/LC3 I 较正常组明显升高,以上实验说明癫

痫组小鼠海马自噬被过度激活,促进了细胞凋亡,从而导致其海马区神经元发生病理性改变。本课题组前期通过基因芯片技术发现癫痫小鼠海马 miRNA-204 表达明显降低,本研究采用 Real-time PCR 技术也验证了这一结果,并且发现使用加味柴胡疏肝汤后癫痫小鼠 miRNA-204 的表达相对于模型组小鼠明显上升,但未达到正常水平,这说明加味柴胡疏肝汤可能会升高 miRNA-204 的表达水平。此外笔者通过对 miRNA-204 进行过表达/抑制后发现,抑制 miRNA-204 表达后,使用加味柴胡疏肝汤的癫痫小鼠较单纯使用加味柴胡疏肝汤的小鼠,海马病理变化较明显,ATG7, LC3 II/LC3 I 升高,自噬小体增多,但是这些指标未达到模型组癫痫小鼠指标水平;而使 miRNA-204 过表达后,再加用柴胡疏肝汤后发现较单纯使用加味柴胡疏肝汤,海马病理变化较轻,ATG7, LC3 II/LC3 I 降低,自噬小体减少。以上结果说明,加味柴胡疏肝汤可能上调 miRNA-204 的表达,减少细胞过度自噬,发挥神经保护作用,从而治疗癫痫。

综上,本研究通过加味柴胡疏肝汤对 miRNA-204 通路的影响,推测加味柴胡疏肝汤可能使 miRNA-204 高表达,从而抑制癫痫小鼠海马神经元过度自噬,减少细胞程序性死亡,发挥神经保护作用,达到治疗癫痫的目的。并值得进一步去进行体内或体外实验,对其更深层次的作用机制进行深入研究。

#### [参考文献]

- [1] DIAO L M, YU H C, ZHENG J O, et al. Abnormalities of the uncinate fasciculus correlate with executive dysfunction in patients with left temporal lobe epilepsy [J]. Magn Reson Imaging, 2015, 33(5):544-550.
- [2] Singh A, Trevick S. The epidemiology of global epilepsy [J]. Neurol Clin, 2016, 34(4):837-847.
- [3] Darcy M S. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy [J]. Cell Biol Intl, 2019, 43(6):582-592.
- [4] Kunz W S. The role of mitochondria in epileptogenesis [J]. Curr Opin Neurol, 2002, 15(2):179-184.
- [5] Alsharafi W A, LUO Z, LONG X, et al. MicroRNA in glutamate receptor-dependent neurological diseases [J]. Clin Sci, 2017, 131(14):1591-1604.
- [6] WEN X, HAN X R, WANG Y J, et al. MicroRNA-421 suppresses the apoptosis and autophagy of hippocampal neurons in epilepsy mice model by inhibition of the TLR/MYD88 pathway [J]. J Cell Physiol, 2018, 233

- (9):7022-7034.
- [ 7 ] GAN J, QU Y, LI J, et al. An evaluation of the links between microRNA, autophagy, and epilepsy [J]. *Rev Neuro Sci*, 2015, 26(2):225-237.
- [ 8 ] YU S Y, DONG B, FANG Z F, et al. Knockdown of lncRNA AK139328 alleviates myocardial ischaemia/reperfusion injury in diabetic mice via modulating miRNA-204-3p and inhibiting autophagy [J]. *J Cell Mol Med*, 2018, 22(10):4886-4898.
- [ 9 ] 于云红, 谢炜, 赵云燕. 同病异治对戊四氮点燃大鼠海马区谷氨酸代谢通路的影响 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2013, 33(1):95-99.
- [ 10 ] 谢炜, 史国军, 李长征, 等. 柴胡疏肝汤对匹罗卡品致难治性癫痫大鼠痫性发作的影响 [J]. *时珍国医国药*, 2011, 22(4):913-915.
- [ 11 ] 何乾超, 苏晗, 黄德庆, 等. 柴胡疏肝汤加味对难治性癫痫的影响及疗效相关因素研究 [J]. *辽宁中医杂志*, 2016, 43(12):2581-2583.
- [ 12 ] 何乾超, 刘泰, 黄德庆, 等. 柴胡疏肝汤加浙贝母对难治性癫痫的生活质量及脑电图的影响 [J]. *辽宁中医杂志*, 2016, 43(2):350-352.
- [ 13 ] 耿玉娜. 柴胡疏肝汤治疗癫痫临床观察 [J]. *亚太传统医药*, 2015, 11(19):135-136.
- [ 14 ] Racine R J. Modification of seizure activity by electrical stimulation II Motor seizure [J]. *Electroen Clin Neuro*, 1972, 32(3):281-294.
- [ 15 ] 施新猷. 现代医学实验动物学 [M]. 北京:人民军医出版社, 2000:488-469.
- [ 16 ] 杜萌, 宁梅琳, 曾常茜. 中医药与癫痫的研究进展 [J]. *现代中西医结合杂志*, 2018, 27(23):2611-2616.
- [ 17 ] SUN P, LI Y, WEI S, et al. Pharmacological effects and chemical constituents of bupleurum [J]. *Mini Rev Med Chem*, 2019, 19(1):34-55.
- [ 18 ] LI X Q, SONG Y N, WANG S J, et al. Saikosaponins: a review of pharmacological effects [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2018, 20(5):399-411.
- [ 19 ] 李泽慧, 安超, 胡凯文, 等. 浙贝母总生物碱对人肺腺癌 A549/顺铂细胞耐药性的逆转作用 (英文) [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2013, 27(3):315-320.
- [ 20 ] Lampert M A, Gustafsson Å B. Balancing autophagy for a healthy heart [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2018, 1:21-26.
- [ 21 ] WANG L, SONG L F, CHEN X Y, et al. MiR-181b inhibits P38/JNK signaling pathway to attenuate autophagy and apoptosis in juvenile rats with kainic acid-induced epilepsy via targeting TLR4 [J]. *Cns Neurosci Ther*, 2019, 25(1):112-122.
- [ 22 ] McMahan J, HUANG X, YANG J, et al. Impaired autophagy in neurons after disinhibition of mammalian target of rapamycin and its contribution to epileptogenesis [J]. *J Neurosci*, 2012, 32(45):15704-15714.
- [ 23 ] Dingledine R, Varvel N H. When and how do seizures kill neurons, and is cell death relevant to epileptogenesis? [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2014, 813:109-122.
- [ 24 ] 曹丽丽. 自噬在癫痫大鼠海马损伤中的作用及机制研究 [D]. 济南:山东大学, 2009.
- [ 25 ] Nitta A, Hori K, Tanida I, et al. Blocking LC3 lipidation and ATG12 conjugation reactions by ATG7 mutant protein containing C572S [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 508(2):521-526.
- [ 26 ] Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC3 and autophagy [J]. *Method Mol Biol*, 2008, 445:77-88.
- [ 27 ] LI Q, HAN Y, DU J, et al. Alterations of apoptosis and autophagy in developing brain of rats with epilepsy: changes in LC3, P62, Beclin-1 and Bcl-2 levels [J]. *Neurosci Res*, 2018, 130:47-55.
- [ 28 ] 徐琰琪. MicroRNA204-5p 通过调节 LC3 II 参与早期糖尿病性视网膜病变的研究 [D]. 南昌:南昌大学, 2018.
- [ 29 ] XIAO J, ZHU X, HE B, et al. MiRNA-204 regulates cardiomyocyte autophagy induced by ischemia-reperfusion through LC3-II [J]. *J Biomed Sci*, 2011, 18(1):35.
- [ 30 ] Mikhaylova O, Stratton Y, Hall D, et al. VHL-regulated MiRNA-204 suppresses tumor growth through inhibition of LC3B-mediated autophagy in renal clear cell carcinoma [J]. *Cancer Cell*, 2012, 21(4):532-546.
- [ 31 ] XIANG L, REN Y, LI X, et al. MicroRNA-204 suppresses epileptiform discharges through regulating TrkB-ERK1/2-CREB signaling in cultured hippocampal neurons [J]. *Brain Res*, 2016, 1639:99-107.
- [ 32 ] Kaalund S S, Ven M T, Bak M, et al. Aberrant expression of miR-218 and miRNA-204 in human mesial temporal lobe epilepsy and hippocampal sclerosis-convergence on axonal guidance [J]. *Epilepsia*, 2014, 55(12):2017-2027.

[责任编辑 孙丛丛]