

加味小柴胡汤调控 AKT/Bcl-xL/Bax/Caspase-3 信号轴抑制癫痫小鼠海马神经元凋亡的机制研究^Δ

卢玲^{1*}, 庄胜², 覃一珏^{1#}, 曲海顺¹, 杨燕唯¹, 许围城¹ (1. 广西壮族自治区人民医院中医科, 南宁 530021; 2. 南宁市第二人民医院关节外科, 南宁 530031)

中图分类号 R965;R284 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2026)13-1728-07
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2026.13.12



摘要 **目的** 探讨加味小柴胡汤抑制急性癫痫模型小鼠海马神经元凋亡的作用机制。**方法** 将36只雄性KM小鼠随机分为正常对照组(生理盐水)、癫痫模型组(生理盐水)、加味小柴胡汤组[7 g/(kg·d)]、卡马西平组[阳性对照, 30 mg/(kg·d)], 每组9只。除正常对照组外, 其余各组小鼠均构建急性癫痫模型。造模成功后, 各组小鼠连续灌胃相应药物/生理盐水2周, 每天1次。给药结束后, 观察小鼠海马CA1区超微结构及海马组织病理形态学变化, 检测海马组织中TUNEL阳性细胞数以及蛋白激酶B(AKT)、胱天蛋白酶3(Caspase-3)、B细胞淋巴瘤-xL(Bcl-xL)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)的表达水平和磷酸化AKT(p-AKT)/AKT比值。**结果** 与正常对照组比较, 癫痫模型组小鼠海马CA1区超微结构及病理损伤严重; 海马组织中TUNEL阳性细胞数显著增加($P<0.05$), p-AKT、Bcl-xL表达均显著下调($P<0.05$), Bax、Caspase-3表达均显著上调($P<0.05$), p-AKT/AKT比值显著降低($P<0.05$)。与癫痫模型组比较, 加味小柴胡汤组小鼠海马组织超微结构、病理损伤及上述各指标均显著改善($P<0.05$)。**结论** 加味小柴胡汤可抑制急性癫痫小鼠海马神经元凋亡; 其机制可能与增强AKT磷酸化激活, 提高p-AKT/AKT比值, 上调Bcl-xL表达, 下调Bax、Caspase-3表达有关。

关键词 加味小柴胡汤; 癫痫; AKT/Bcl-xL/Bax/Caspase-3 信号轴; 神经元凋亡

Study on the mechanism of Jiawei xiaochaihu decoction inhibiting hippocampal neuronal apoptosis in epileptic mice via regulating AKT/Bcl-xL/Bax/Caspase-3 signaling axis

LU Ling¹, ZHUANG Sheng², QIN Yijue¹, QU Haishun¹, YANG Yanwei¹, XU Weicheng¹ (1. Dept. of Traditional Chinese Medicine, People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, China; 2. Dept. of Joint Surgery, The Second People's Hospital of Nanning, Nanning 530031, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To explore the mechanism of Jiawei xiaochaihu decoction against hippocampal neuronal apoptosis in acute epileptic model mice. **METHODS** Thirty-six male KM mice were randomly divided into four groups with 9 mice in each group: normal control group (normal saline), epilepsy model group (normal saline), Jiawei xiaochaihu decoction group [7 g/(kg·d)] and carbamazepine group [positive control, 30 mg/(kg·d)]. Except for the normal control group, the acute epilepsy model was established in the other groups. After successful modeling, mice in each group were given corresponding drugs or normal saline by intragastric administration once a day for 2 consecutive weeks. After drug intervention, the ultrastructure and pathological morphology of hippocampal CA1 region were observed. The number of TUNEL-positive cells in hippocampus was detected, and the expression levels of protein kinase B (AKT), Caspase-3, B-cell lymphoma-extra large (Bcl-xL), Bcl-2-associated X protein (Bax), as well as the ratio of phosphorylated AKT (p-AKT) to AKT were determined. **RESULTS** Compared with the normal control group, severe ultrastructural and pathological damages were observed in the hippocampal CA1 region of epilepsy model group; the number of TUNEL-positive cells was significantly increased ($P<0.05$). The expression levels of p-AKT and Bcl-xL were significantly down-regulated ($P<0.05$), while the Bax and Caspase-3 were significantly up-regulated ($P<0.05$), accompanied by a remarkable decrease of p-AKT/AKT ratio ($P<0.05$). Compared with the epilepsy model group, hippocampal tissue ultrastructure, pathological damage, and the aforementioned indicators were significantly improved in Jiawei xiaochaihu decoction group ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** Jiawei xiaochaihu decoction can inhibit hippocampal neuronal apoptosis in acute epileptic mice, and its mechanism may be related to activating AKT phosphorylation, increasing p-AKT/AKT ratio, up-regulating Bcl-xL expression and down-regulating the expression of Bax and Caspase-3.

KEYWORDS Jiawei xiaochaihu decoction; epilepsy; AKT/Bcl-xL/Bax/Caspase-3 signaling axis; neuronal apoptosis

^Δ基金项目 广西自然科学基金项目(No.2023GXNSFBA026066)

* 第一作者 主治医师, 硕士。研究方向: 中西医结合脑病方向的临床与基础研究。E-mail: luling931101@163.com

通信作者 主任医师, 硕士。研究方向: 中西医结合脑病方向的临床与基础研究。E-mail: 1172184758@qq.com

癫痫是一种由大脑神经元高度同步化异常放电所导致的神经系统疾病, 具有反复发作、自发性等特点, 全球范围内有数千万患者深受其困扰^[1]。尽管目前的抗癫

痫药物对绝大多数癫痫患者有效,但长期使用常伴有认知功能损害、肝肾功能损伤、嗜睡等多种不良反应,严重影响患者的身体健康和生活质量,且无法从根本上阻止癫痫的发生发展及相关的脑神经损伤^[2]。因此,探寻能够多靶点干预癫痫进程、兼具神经保护作用且副作用小的治疗策略具有重要意义。

研究表明,神经元凋亡在癫痫发生发展中起着至关重要的作用^[3]。神经元凋亡是一个受多条信号通路精密调控的主动程序性细胞死亡过程。其中,蛋白激酶B (protein kinase B, AKT)/B 细胞淋巴瘤-xL (B-cell lymphoma-extra large, Bcl-xL)/Bcl-2 相关X 蛋白(Bcl-2-associated X protein, Bax)/胱天蛋白酶3(Caspase-3)信号轴是调控神经元凋亡的核心枢纽:活化的AKT[即磷酸化AKT(phosphorylated AKT, p-AKT)]能够调控Bcl-2 蛋白家族中促凋亡蛋白Bax、抗凋亡蛋白Bcl-xL 的表达,同时抑制Caspase 家族中促凋亡蛋白Caspase-3 的活化,进而协同调控细胞凋亡进程,减轻神经元损伤^[4-5]。研究还发现,Bcl-xL 可对抗Bax 介导的细胞凋亡,Bcl-xL 和Bax 的比值在一定程度上可反映细胞的凋亡趋势^[6]。因此,靶向增强AKT 信号,调控Bcl-xL、Bax 平衡,抑制Caspase-3 的剪切活化,是阻断癫痫神经元凋亡极具潜力的干预策略。

小柴胡汤记载于《伤寒杂病论》,为和解少阳之代表方剂,传统用于治疗少阳病证。现代研究显示,小柴胡汤及其加减方治疗癫痫疗效显著^[7],其作用机制涉及抗炎、抗氧化应激及调节神经递质平衡等多条途径^[8]。本课题组前期通过网络药理学预测发现,小柴胡汤抗癫痫的核心靶点之一为AKT1,而该靶点与细胞凋亡通路密切相关^[9]。然而,癫痫病机复杂,常兼夹“风、痰、瘀”等病理因素。因此,本课题组以小柴胡汤的组方为基础,根据痫病的病机特点,加入钩藤、全蝎、天麻化裁而成的加味小柴胡汤,能够更有针对性地发挥熄风止痉之效。前期体外实验表明,加味小柴胡汤可调控顺铂诱导的BRL 细胞中Bax、Bcl-2、Caspase-3 等凋亡相关蛋白的表达^[10]。本研究拟在前期研究基础上,基于AKT/Bcl-xL/Bax/Caspase-3 信号轴,进一步探讨加味小柴胡汤抑制癫痫小鼠海马神经元凋亡的作用机制,以期为癫痫的临床治疗提供新的理论依据及思路。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用的主要仪器包括:JEM-1400 型透射电镜(日本电子株式会社),Tanon-5200 型全自动化学发光图像分析系统(上海天能科技有限公司),SuPerMax 3100 型全自动酶标仪(上海闪普生物科技有限公司),CX43 型显微镜、BX53 型荧光显微镜(日本Olympus 公司),5424R 型低温高速离心机(德国Eppendorf 公司),KD-TS3S1 型组织脱水机(浙江省金华市科迪仪器设备

有限公司),HistoCore Arcadia 型石蜡包埋机、HistoCore BIOCUT 型切片机(德国Leica 公司),DHP-9054 型热恒温培养箱(山东博科生物产业有限公司)。

1.2 主要药品与试剂

卡马西平片(批号DKM24A02,规格0.1 g)购自江苏恩华药业股份有限公司;地西洋注射液(批号2303091,规格10 mg:2 mL)购自海南制药厂有限公司;盐酸匹罗卡品(批号54-71-7,规格500 mg)购自上海源叶生物科技有限公司;硫酸阿托品(批号2211221,规格1 mL:0.5 mg)购自河南润弘制药股份有限公司;柴胡、黄芩、半夏、生姜、大枣、党参、炙甘草、钩藤、全蝎、天麻饮片均由广西壮族自治区人民医院中药房提供,批号均为20230810。

本研究所用的主要试剂有:DAB 显色试剂盒(江苏康为世纪生物科技股份有限公司,批号CW0125M),TUNEL 检测试剂盒(红色)(上海碧云天生物技术股份有限公司,批号C1090),兔抗Caspase-3 抗体(美国Affinity 公司,批号AF6311),兔抗Bax 抗体(杭州华安生物技术有限公司,批号ER0907),兔抗Bcl-xL 抗体(北京博奥森生物技术有限公司,批号bs-1336R),辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔免疫球蛋白G(IgG)(H+L)二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号ZB-2301),BCA 蛋白定量试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司,批号E-BC-K318-M),小鼠抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(北京全式金生物科技股份有限公司,批号HC301),兔抗AKT、小鼠抗AKT、小鼠抗p-AKT、兔抗Bcl-xL 抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,批号分别为10176-2-AP、60203-2-Ig、66444-1-Ig、10783-1-ap),兔抗Caspase-3、兔抗Bax 抗体(英国Abcam 公司,批号分别为ab184787、ab32503),HRP 标记的山羊抗小鼠IgG(H+L)、山羊抗兔IgG(H+L)二抗(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号分别为GB23303、GB23301)。

1.3 动物

36 只SPF 级雄性KM 小鼠,8 周龄,体重20~22 g,购自斯贝福(北京)生物技术有限公司,生产许可证号为SCXK(京)2024-0001,动物实验均在SPF 级屏障环境实验室中进行,实验方案已获广西壮族自治区人民医院伦理委员会批准(批号:KY-KJT-2023-332 号)。

2 方法

2.1 加味小柴胡汤的制备

取柴胡12 g、黄芩10 g、半夏12 g、生姜10 g、大枣10 g、党参15 g、炙甘草6 g、钩藤15 g、全蝎10 g、天麻15 g,加入10 倍量蒸馏水浸泡30 min,采用自动煎药机以武火煮沸后改文火煎煮40 min,用200 目滤网过滤,收集滤液;药渣加入8 倍量蒸馏水再次煎煮30 min,过滤后合并2 次滤液。将合并滤液以60 ℃减压浓缩至生药质量浓度为500 mg/mL 的药液,即得。

2.2 分组、造模与给药

将36只KM小鼠适应性喂养1周后,采用随机数字表法分为正常对照组(生理盐水)、癫痫模型组(生理盐水)、加味小柴胡汤组[7 g/(kg·d)]^[11]和卡马西平组[阳性对照,30 mg/(kg·d)]^[11],每组9只。正常对照组小鼠在整个实验过程中同步给予生理盐水;其余各组小鼠均先腹腔注射硫酸阿托品(17 mg/kg),30 min后再腹腔注射盐酸匹罗卡品(180 mg/kg),制备小鼠急性癫痫模型^[11]。注射盐酸匹罗卡品30 min后,按照文献[12]方法评估小鼠癫痫发作级别(分为0~V级),对未出现Ⅳ级及以上癫痫发作的小鼠,每隔15 min给予首剂1/3剂量的盐酸匹罗卡品追加注射;追加注射2次后仍未出现Ⅳ级及以上癫痫发作的小鼠,视为造模失败,不纳入后续研究。小鼠持续癫痫发作达到1 h后,腹腔注射地西洋(4 mg/kg),终止癫痫发作。以上操作均在视频监控系统下进行。本研究27只小鼠全部造模成功。造模成功24 h后,各组小鼠灌胃相应药物/生理盐水,每天1次,连续2周。

2.3 小鼠一般情况观察

实验过程中,观察各组小鼠的一般情况,记录小鼠的进食量、精神状态和体型等特征。

2.4 样本取材与处理

末次灌胃结束24 h后,麻醉小鼠,断头处死后迅速取全脑。每组随机取3只小鼠全脑,于冰上分离右侧海马组织,置于2.5%戊二醛固定液中,4℃冰箱保存;其左侧海马组织用4%多聚甲醛固定。取剩余小鼠全脑,分离双侧海马组织,液氮速冻后转移至-80℃冰箱中保存,备用。

2.5 海马CA1区超微结构观察

取“2.4”项下小鼠右侧海马组织(每组取3只小鼠样本),用磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗后,经乙醇梯度脱水,然后采用100%丙酮置换乙醇10 min;将组织置于Spurr812纯环氧树脂中渗透36 h,再在纯丙酮与包埋液中室温渗透过夜;烘箱干燥固化,切片(厚70 nm),以3%醋酸铀-枸橼酸铅双染色后,采用透射电镜观察各组小鼠海马CA1区超微结构变化。

2.6 海马组织病理形态学观察

采用苏木精-伊红(HE)染色法观察。取“2.4”项下经4%多聚甲醛固定的小鼠左侧海马组织(每组取3只小鼠样本),经修块、脱水、石蜡包埋后,常规制备石蜡切片(厚4 μm)。切片进行常规HE染色后,采用显微镜观察小鼠海马CA1区神经元的形态、数量与分布。

2.7 海马神经元凋亡情况检测

采用TUNEL染色法检测。将“2.6”项下石蜡切片移入湿盒中,滴加Proteinase K工作液,37℃反应30 min;以PBS充分洗涤后,滴加TUNEL检测液,42℃避光孵育1 h;再次用PBS洗涤,滴加DAPI,避光孵育5 min,进行染核;经PBS冲洗、封片后,采用荧光显微镜观察各组小鼠海马神经元凋亡情况。TUNEL阳性细胞呈现红色

荧光,DAPI染色细胞核呈现蓝色荧光。每张切片于400×高倍视野下随机选取3个不重叠的视野,通过荧光显微镜采集图像,直接计数每个视野内的TUNEL阳性细胞数,取平均值。

2.8 海马组织中AKT/Caspase-3/Bax/Bcl-xL信号轴相关蛋白表达检测

2.8.1 免疫组织化学染色法

取“2.6”项下石蜡切片,进行烤、脱蜡、水化处理;胃蛋白酶抗原修复后,灭活内源性过氧化物酶活性,通透组织、封闭非特异性位点;加入AKT、Bcl-xL、Caspase-3(稀释比例均为1:100)以及Bax(稀释比例为1:200)一抗,4℃孵育过夜;PBS充分淋洗,滴加HRP标记的山羊抗兔IgG(H+L)二抗(稀释比例为1:100),37℃孵育30 min;DAB显色3~5 min,PBS冲洗1 min,苏木精复染3 min、分化、返蓝,流水冲洗;进行脱水、透明、封片处理后,采用显微镜观察各组小鼠海马组织中上述蛋白表达情况。以DAB显色形成的棕黄色颗粒为阳性信号,采用IPWin 32图像分析系统进行半定量分析。每张切片在400×高倍视野下随机选取3个不重叠的视野,测定每个视野内阳性产物的积分光密度及对应图片总面积,以平均光密度(平均光密度=积分光密度/图片总面积)反映目的蛋白的表达水平。

2.8.2 Western blot法

取“2.4”项下-80℃冻存的小鼠双侧海马组织(每组取3只小鼠样本),加入RIPA裂解液提取组织中总蛋白,采用BCA法测定总蛋白浓度并对蛋白进行变性处理。取变性后蛋白,上样进行SDS-PAGE电泳(电泳时间1.5 h),然后在300 mA恒流下转至PVDF膜,用脱脂奶粉封闭;加入GAPDH(稀释比例为1:2 000)、AKT(稀释比例为1:10 000)、p-AKT(稀释比例为1:5 000)以及Caspase-3、Bax、Bcl-xL(稀释比例均为1:1 000)抗体,4℃孵育过夜;洗膜后,加入相应二抗(稀释比例为1:2 000),室温孵育2 h;用发光液浸湿PVDF膜,置于超灵敏度化学发光成像系统中进行显影成像。采用ImageJ软件测定各条带积分光密度,以目的蛋白与内参蛋白(GAPDH)的条带积分光密度比值表示目的蛋白的相对表达量,并计算p-AKT/AKT比值。

2.9 统计学方法

采用GraphPad Prism 9.0软件进行统计分析。计量资料符合正态分布以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用Tukey检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

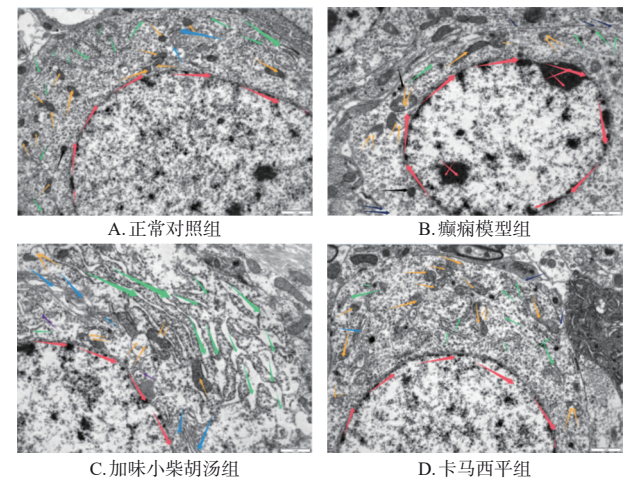
3 结果

3.1 一般情况观察结果

整个实验过程中,正常对照组小鼠形体正常,精神状态佳,进食正常。造模成功后,各造模小鼠均出现形体瘦小、精神状态差、进食量减少等症状;灌胃给药2周后,加味小柴胡汤组和卡马西平组小鼠精神状态好转,进食量增加。

3.2 海马CA1区超微结构观察结果

正常对照组小鼠海马CA1区细胞核呈卵圆形或椭圆形,形态规则;线粒体结构完整,膜结构连续,嵴结构清晰、无溶解,基质电子密度正常。癫痫模型组可见细胞膜局部出现不延续的断裂或穿孔现象;线粒体中度水肿变性,外膜部分断裂,嵴结构多数溶解。加味小柴胡汤组细胞核呈卵圆形或椭圆形,形态规则;线粒体局部水肿,形成低电子密度区;细胞膜表面延续完整,未见断裂或溶解现象。卡马西平组细胞核呈卵圆形或椭圆形,形态规则;线粒体膜结构完整,嵴结构清晰、仅见轻微溶解,基质电子密度未见异常。结果见图1。



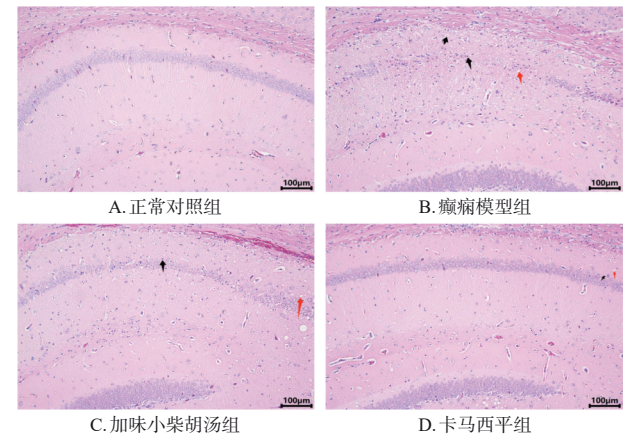
注:橙黄色箭头所指为线粒体;红色箭头所指为细胞核;蓝色箭头所指为细胞膜;绿色箭头所指为内质网。

图1 各组小鼠海马CA1区超微结构观察的透射电镜图(标尺:1 μm)

3.3 海马组织病理形态学观察结果

正常对照组小鼠海马组织结构完整,神经元排列整齐有序,无明显病理炎症变化。癫痫模型组神经元排列紊乱,大量细胞核固缩、消失,组织间质内有大量空泡。加味小柴胡汤组神经元排列疏松,神经元核固缩和空泡数量较癫痫模型组减少。卡马西平组神经元排列紧密,

神经元核固缩和空泡数量较癫痫模型组明显减少。结果见图2。



注:黑色箭头所指为神经元细胞核;红色箭头所指为组织间质内的空泡。

图2 各组小鼠海马组织病理形态学观察的显微图(HE染色)

3.4 海马神经元凋亡检测结果

与正常对照组[(2±1)个($\bar{x} \pm s, n=3$,下同)]比较,癫痫模型组小鼠海马组织中TUNEL阳性细胞数[(30±6)个]显著增加($P<0.05$);与癫痫模型组比较,加味小柴胡汤组和卡马西平组小鼠海马组织中TUNEL阳性细胞数[分别为(8±2)、(9±2)个]均显著减少($P<0.05$)。结果见图3。

3.5 海马组织中AKT/Bcl-xL/Bax/Caspase-3信号轴相关蛋白表达检测结果

3.5.1 免疫组织化学染色结果

与正常对照组比较,癫痫模型组小鼠海马组织中AKT、Bcl-xL蛋白表达水平均显著降低($P<0.05$),Bax、Caspase-3蛋白表达水平均显著升高($P<0.05$);与癫痫模型组比较,各给药组小鼠海马组织中AKT、Bcl-xL蛋白表达水平均显著升高($P<0.05$),Bax、Caspase-3蛋白表达水平均显著降低($P<0.05$)。结果见图4、表1。

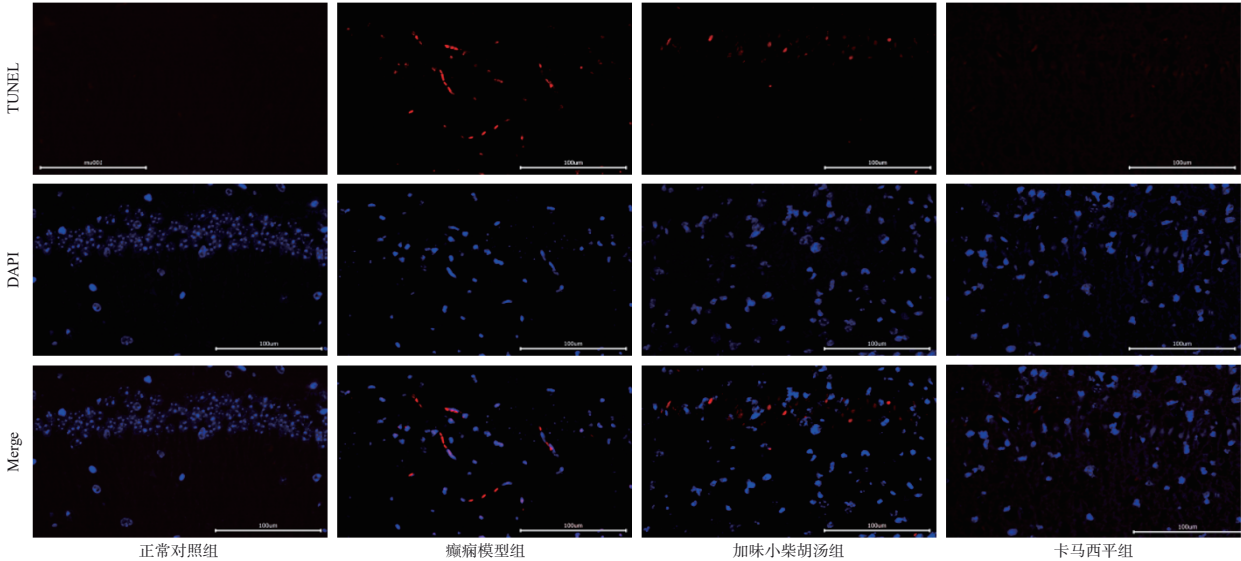


图3 各组小鼠海马神经元凋亡观察的荧光显微图(标尺:100 μm)

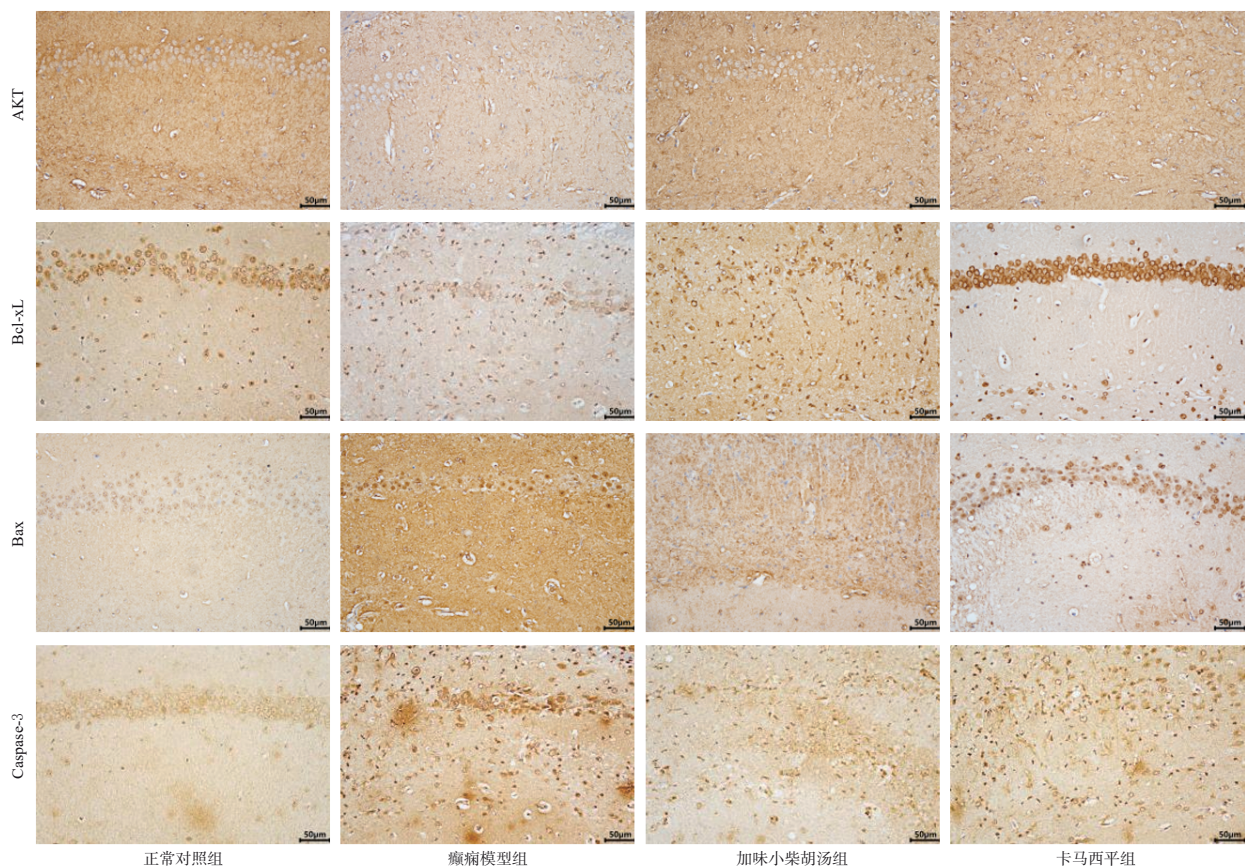


图4 各组小鼠海马组织中AKT、Caspase-3、Bax、Bcl-xL蛋白表达的免疫组织化学染色图(标尺:50 μm)

表1 各组小鼠海马组织中AKT、Caspase-3、Bax、Bcl-xL蛋白阳性表达水平比较($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	AKT	Caspase-3	Bax	Bcl-xL
正常对照组	9.874 ± 0.581	2.373 ± 1.212	1.564 ± 1.259	12.610 ± 2.544
癫痫模型组	1.567 ± 0.576 ^a	20.380 ± 15.150 ^a	23.160 ± 12.160 ^a	3.506 ± 0.482 ^a
加味小柴胡汤组	4.659 ± 0.772 ^b	7.720 ± 3.286 ^b	13.830 ± 3.861 ^b	8.898 ± 4.304 ^b
卡马西平组	6.263 ± 1.525 ^b	9.508 ± 2.988 ^b	11.000 ± 3.069 ^b	11.880 ± 3.580 ^b

a: 与正常对照组比较, $P < 0.05$; b: 与癫痫模型组比较, $P < 0.05$ 。

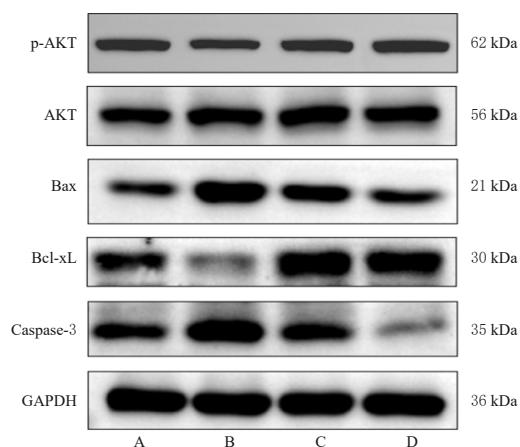
3.5.2 Western blot实验结果

与正常对照组比较,癫痫模型组小鼠海马组织中p-AKT、Bcl-xL蛋白相对表达量和p-AKT/AKT比值均显著降低($P < 0.05$),Bax、Caspase-3蛋白相对表达量均显著升高($P < 0.05$)。与癫痫模型组比较,各给药组小鼠海马组织中上述指标(除卡马西平组Bcl-xL外)均显著改善($P < 0.05$)。结果见表2、图5。

表2 各组小鼠海马组织中AKT/Caspase-3/Bax/Bcl-xL信号轴相关蛋白的表达情况比较($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	AKT/ GAPDH	p-AKT/ GAPDH	p-AKT/AKT	Bax/ GAPDH	Bcl-xL/ GAPDH	Caspase-3/ GAPDH
正常对照组	0.499 ± 0.049	0.722 ± 0.098	1.443 ± 0.067	0.439 ± 0.029	0.655 ± 0.102	0.439 ± 0.056
癫痫模型组	0.570 ± 0.049	0.450 ± 0.069 ^a	0.787 ± 0.063 ^a	0.790 ± 0.081 ^a	0.372 ± 0.016 ^a	0.726 ± 0.038 ^a
加味小柴胡汤组	0.574 ± 0.045	0.727 ± 0.106 ^b	1.263 ± 0.090 ^b	0.625 ± 0.043 ^b	0.761 ± 0.119 ^b	0.544 ± 0.047 ^b
卡马西平组	0.523 ± 0.044	0.706 ± 0.104 ^b	1.345 ± 0.098 ^b	0.479 ± 0.045 ^b	0.634 ± 0.127	0.335 ± 0.053 ^b

a: 与正常对照组比较, $P < 0.05$; b: 与癫痫模型组比较, $P < 0.05$ 。



A: 正常对照组; B: 癫痫模型组; C: 加味小柴胡汤组; D: 卡马西平组。

图5 各组小鼠海马组织中AKT/Caspase-3/Bax/Bcl-xL信号轴相关蛋白表达的电泳图

4 讨论

在中医学理论中,癫痫属于“痫病”范畴。《黄帝内经》有云“诸风掉眩,皆属于肝”,阐明了痫病与“肝”密切相关^[13]。癫痫“肝风”“积痰”“气乱”以及“郁火”等病理因素的产生均与肝失疏泄密切相关。因此,“从肝论治”为癫痫的治疗提供了一个新的视角。加味小柴胡汤基于“从肝论治”治疗癫痫的理论基础化裁而来,由柴胡、黄芩、半夏、生姜、大枣、党参、炙甘草、钩藤、全蝎、天麻

组成,具有疏通三焦、疏肝理气、熄风化痰的功效,能够调节内环境,调达气机,使抽搐缓解,临床上常辨证加减用于治疗癫痫^[7]。

细胞凋亡是一种由基因调控的程序性细胞死亡,参与该调控过程的关键分子包括 AKT、Bcl-2 家族和 Caspase 家族蛋白等^[14]。抗凋亡蛋白 Bcl-xL 和促凋亡蛋白 Bax 是 Bcl-2 家族蛋白中关键的线粒体凋亡调节因子。其中,Bax 位于细胞质或松散附着于线粒体,在多种凋亡因素刺激下,Bax 会发生构象变化而激活,并转位至线粒体外膜,其 N 端发生插入、C 端形成跨膜螺旋,最终发生寡聚组装形成孔道;Bax 寡聚体可引发线粒体外膜通透性改变,并促进 Caspase 依赖性或非依赖性细胞凋亡^[15]。Bcl-xL 位于线粒体外膜,可通过结合 Bax,阻止 Bax 发生构象改变和寡聚化,抑制 Bax 诱导的外膜通透性改变,进而抑制细胞凋亡;此外,Bcl-xL 还能调节线粒体膜电位及代谢,维持线粒体稳定性^[16]。Caspase-3 是 Caspase 家族成员之一,被称为凋亡的“执行者”。Bax 孔道的形成,促使通透性转换孔开放,导致细胞色素 C (cytochrome C, Cyt C)、凋亡诱导因子等凋亡因子从膜间隙释放至细胞质^[17]。其中,Cyt C 的释放是激活下游 Caspase 级联反应的关键。在腺嘌呤核苷三磷酸/脱氧腺苷三磷酸存在下,Cyt C 与凋亡蛋白酶激活因子 1 结合,募集并激活 Caspase-9 前体,形成凋亡小体;活化的 Caspase-9 切割并激活下游的“执行者”Caspase-3,激活后的 Caspase-3 系统地切割细胞蛋白,进而导致细胞凋亡^[5]。

AKT 蛋白表达水平的改变与细胞凋亡调控密切相关。AKT 可直接磷酸化 Bcl-2 家族相关细胞凋亡因子,或间接改变凋亡相关基因表达,从而抑制细胞凋亡的起始过程,阻滞细胞凋亡通路的激活,减少细胞凋亡^[18]。Bad 作为 Bcl-2 家族的成员,能够通过与 Bcl-xL 结合形成复合底物,调控细胞凋亡;位于上游的 AKT 被磷酸化激活成 p-AKT 后,通过磷酸化下游底物(如 Bad),使 Bad 从与 Bcl-xL 结合而成的异源二聚体中分离出来,产生更多游离的 Bcl-xL,促进细胞生存,从而发挥抗凋亡的作用^[19]。p-AKT 进一步调控中游 Bcl-2 家族蛋白:一方面解除对 Bcl-xL 的抑制、促进游离 Bcl-xL 的生成;另一方面抑制 Bax 的表达与活化^[19]。Bcl-xL 通过与 Bax 结合,维持线粒体稳定性——当 Bax 被抑制后,线粒体通透性转换孔开放受阻,Cyt C 释放减少,最终抑制下游“执行者”Caspase-3 的激活,阻断凋亡级联反应^[5,15-17]。这一系列事件构成了从 AKT 磷酸化激活到 Bcl-xL/Bax 平衡调控再到 Caspase-3 执行凋亡的完整信号传导链条。在癫痫发作的病理条件下,上述 AKT 介导的抗凋亡信号通路常受到显著抑制。本研究结果显示,与正常对照组比较,

癫痫模型组小鼠海马 CA1 区超微结构改变明显、海马组织病理损伤严重;TUNEL 阳性细胞数明显增加;AKT、Bcl-xL 的表达下调,Bax、Caspase-3 的表达上调。这些变化与既往癫痫研究中观察到的分子事件高度一致:在癫痫持续状态模型中,海马神经元 AKT 磷酸化水平在癫痫发作后数小时内迅速下降,并伴随 Bax 从胞质转位至线粒体、Bcl-xL 表达下调,以及 Caspase-3 的剪切活化^[20]。可见,癫痫发作可抑制 AKT 活性、打破 Bcl-xL/Bax 平衡、激活 Caspase-3 依赖的凋亡级联反应,最终导致海马神经元丢失。基于此,干预 AKT/Bcl-xL/Bax/Caspase-3 信号轴的任何节点均可能减轻癫痫海马神经元凋亡,而同时作用于多个节点有望产生协同抗凋亡效应。

现代药理学研究表明,加味小柴胡汤中主要组成药物柴胡、天麻、黄芩、党参等的特征性活性成分均具有神经保护作用,并可调节 AKT/Bcl-xL/Bax/Caspase-3 信号轴的不同节点。如柴胡多糖能够通过调节 Caspase-3 和 Bax 的表达来改善癫痫大鼠海马神经元凋亡^[21];天麻素具有调节神经自噬、减少氧化应激、抗炎、减少神经元凋亡等神经保护作用^[22];黄芩苷可通过调节 Caspase-3、Bax 和 Bcl-xL 的表达来调控细胞凋亡,发挥神经保护作用^[23];党参炔苷具有抗炎和神经保护作用,党参多糖能够调节 AKT 的表达^[24]。这提示该方可通过多成分、多靶点的作用特征,发挥神经保护和抗癫痫作用。本研究结果显示,与癫痫模型组比较,加味小柴胡汤组小鼠海马组织超微结构及病理损伤均明显改善、TUNEL 阳性细胞数明显减少;AKT、Bcl-xL 表达水平及 p-AKT/AKT 比值均显著升高,Bax、Caspase-3 表达水平显著降低。以上结果提示,该方在增强 AKT 磷酸化激活的同时,有效调控了下游 Bcl-xL、Bax 及 Caspase-3 的表达。加味小柴胡汤抗癫痫的作用可能源于其对 AKT/Bcl-xL/Bax/Caspase-3 信号轴相关蛋白表达的调控,尤其是通过增强 AKT 磷酸化激活,进而抑制海马神经元凋亡。

综上所述,加味小柴胡汤可抑制急性癫痫小鼠海马神经元凋亡;其机制可能与增强 AKT 磷酸化激活,提高 p-AKT/AKT 比值,上调 Bcl-xL 表达,下调 Bax、Caspase-3 表达有关。然而,其具体调控机制有待进一步研究。

参考文献

- [1] Klein P, Kaminski R M, Koepp M, et al. New epilepsy therapies in development[J]. Nat Rev Drug Discov, 2024, 23(9):682-708.
- [2] 平鑫,秦少坤,刘书宁,等. 难治性癫痫中西医诊治现状分析与临床对策[J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(2): 691-694.
- [3] Sokolova T V, Zabrodskaia Y M, Litovchenko A V, et al.

Relationship between neuroglial apoptosis and neuroinflammation in the epileptic focus of the brain and in the blood of patients with drug-resistant epilepsy[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(20):12561.

- [4] 汪倩, 杨梅, 赵琦, 等. 中药干预PI3K/AKT信号通路防治非酒精性脂肪性肝病研究现状[J]. *辽宁中医杂志*, 2025, 52(9):209-213.
- [5] Henshall D C, Simon R P. Epilepsy and apoptosis pathways[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2005, 25(12):1557-1572.
- [6] 丁黎敏, 黄小民, 张微, 等. 原花青素通过对Caspase-3和Bcl-xl/Bax蛋白的调节抑制人脐静脉内皮细胞凋亡[J]. *中华中医药学刊*, 2013, 31(3):582-584.
- [7] 尤海玲, 陈源, 郭志英. 小柴胡汤合桃核承气汤加味治疗海绵状血管瘤合并瘤内小灶出血及蛛网膜下腔出血并癫痫一例[J]. *环球中医药*, 2022, 15(8):1437-1439.
- [8] 苏丽娟, 王娟, 刘旭恩, 等. 小柴胡汤抗抑郁作用及其对脑内神经递质、神经营养因子和雌性激素的影响研究[J]. *中华中医药学刊*, 2020, 38(9):38-40.
- [9] 卢玲, 李欢, 廖现秋, 等. 小柴胡汤治疗癫痫的网络药理学研究[J]. *中国医院药学杂志*, 2020, 40(22):2296-2302.
- [10] 刘应柯, 李合国, 宫瑾瑾. 加味小柴胡汤对顺铂诱导的BRL细胞相关凋亡蛋白表达的影响[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2009, 15(9):665-667.
- [11] 汪顺贵, 玉倩, 李华霞, 等. 加味柴胡疏肝汤调控miR-204对急性癫痫小鼠海马AKT/mTOR/P70S6K通路和脑电图的影响[J]. *时珍国医国药*, 2020, 31(2):273-276.
- [12] Racine R J. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure[J]. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 1972, 32(3):281-294.
- [13] 玉倩, 汪顺贵, 李华霞, 等. 从肝论治癫痫治疗进展[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2020, 22(2):118-121.
- [14] Zhang S L, Liu N, Ma M X, et al. Methionine enkephalin (MENK) suppresses lung cancer by regulating the Bcl-2/Bax/caspase-3 signaling pathway and enhancing natural killer cell-driven tumor immunity[J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 98:107837.
- [15] D'Orsi B, Kilbride S M, Chen G, et al. Bax regulates neuronal Ca^{2+} homeostasis[J]. *J Neurosci*, 2015, 35(4):1706-1722.
- [16] Chen Y B, Aon M A, Hsu Y T, et al. Bcl-xL regulates mitochondrial energetics by stabilizing the inner membrane potential[J]. *J Cell Biol*, 2011, 195(2):263-276.
- [17] 赖颖蓉, 赵倩琳, 姜丽红. 基于Bcl-2/Bax/Caspase-3信号通路探究参红通络方对心肌缺血再灌注损伤大鼠细胞凋亡的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2024, 30(11):104-110.
- [18] Zhang F, Ru N, Shang Z H, et al. Daidzein ameliorates spinal cord ischemia/reperfusion injury-induced neurological function deficits in Sprague-Dawley rats through PI3K/Akt signaling pathway[J]. *Exp Ther Med*, 2017, 14(5):4878-4886.
- [19] 张家伟, 许莉莉, 吕佩源. PI3K/AKT信号通路及缺血性脑损伤引起的细胞凋亡研究进展[J]. *临床与病理杂志*, 2022, 42(11):2826-2831.
- [20] Henshall D C, Araki T, Schindler C K, et al. Activation of Bcl-2-associated death protein and counter-response of Akt within cell populations during seizure-induced neuronal death[J]. *J Neurosci*, 2002, 22(19):8458-8465.
- [21] Li X M, Liu Y, Wang S Y, et al. The polysaccharides from the aerial parts of *Bupleurum chinense* DC attenuate epilepsy-like behavior through oxidative stress signaling pathways[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022:7907814.
- [22] Zuo H, Duan Z, Wang Z, et al. Gastrodin improves microglia-mediated inflammatory response after hypoxic-ischemic brain damage in neonatal rats via PI3K/AKT pathway[J]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 2024, 44(9):1712-1719.
- [23] 樊琼, 邓小渝, 傅继凡, 等. 黄芩苷通过PI3K/AKT/mTOR信号通路对人胶质瘤细胞凋亡与自噬的影响[J]. *中西医结合研究*, 2025, 17(4):236-241.
- [24] 田艳, 朱飞, 宋采滢, 等. 党参多糖通过PI3K/AKT信号通路抑制瘢痕疙瘩成纤维细胞增殖和诱导细胞周期阻滞的实验研究[J]. *重庆医科大学学报*, 2024, 49(9):1142-1146.

(收稿日期:2026-02-01 修回日期:2026-06-17)

(本文责编:林 静)