

## 腺苷 A2A 受体拮抗剂对 大鼠氯化锂 - 毛果芸香碱所致癫痫模型的影响

李巷<sup>1</sup>, 韩金玲<sup>1</sup>, 康慧聪<sup>2</sup>

1. 广东省深圳市南山区人民医院神经内科, 广东省深圳市 518052

2. 华中科技大学附属同济医院神经内科, 湖北省武汉市 430032

**摘要:**目的 研究腺苷 A2A 受体阻断剂对大鼠氯化锂 - 毛果芸香碱癫痫持续状态 (SE) 模型的影响。方法 选取 50 只 WD 大鼠随机分为对照组、模型组及 A2A 受体阻断剂组。模型组采用氯化锂 - 毛果芸香碱腹腔注射复制癫痫模型, A2A 受体阻断剂组在氯化锂 - 毛果芸香碱注射前 15 min 予腹腔给药 (SCH58261 0.05 mg/kg), 对照组给予同等剂量生理盐水。在成功诱导癫痫发作 40 min 后予地西洋及水合氯醛终止发作, 并于发作终止后 24 h 留取标本。尼氏染色法检测三组中海马神经元损伤情况, Westernblot 法检测 MAPKs (JNK/p-JNK、P38/p-P38 和 ERK/p-ERK) 表达变化。结果 对照组、模型组及 A2A 受体阻断剂组双侧海马 CA3 区正常形态神经元计数分别为  $158.6 \pm 8.4$ 、 $59.8 \pm 7.4$  和  $123.4 \pm 5.0$ , 模型组神经元计数显著低于对照组, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), A2A 受体阻断剂组神经元计数显著高于模型组, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。Westernblot 法检测显示 p-JNK、p-P38 和 p-ERK 在模型组中表达明显增多, 在 A2A 受体阻断剂组中 p-JNK 和 p-P38 表达减少。结论 氯化锂 - 毛果芸香碱模型中, 腺苷 A2A 受体阻断剂可能通过抑制 p-JNK 他 p-P38 的表达对神经元损伤起到保护作用。

**关键词:** 腺苷 A2A 受体阻断剂; 癫痫持续状态; p-JNK; p-P38

DOI: 10.16636/j.cnki.jinn.2017.03.013

## Effect of adenosine A2A receptor antagonist on a rat model of lithium-pilocarpine epilepsy

Li Xiang, Han Jin-Ling, Kang Hui-Cong. Department of Neurology, Nanshan People's Hospital, Shenzhen, Guangdong 518052, China  
Corresponding author: Li Xiang, E-mail: lixiang54120@163.com

**Abstract: Objective** To investigate the effect of adenosine A2A receptor antagonist on a rat model of lithium-pilocarpine status epilepticus (SE). **Methods** A total of 50 WD rats were randomly divided into control group, model group, and A2A receptor antagonist group. The rats in the model group were given intraperitoneal injection of chloride lithium-pilocarpine to establish a rat model of epilepsy, those in the A2A receptor antagonist group were given intraperitoneal administration of SCH58261 at a dose of 0.05 mg/kg before chloride lithium-pilocarpine injection, and those in the control group were given normal saline at the same dose. All rats were given diazepam and chloride aldehyde to terminate seizures at 40 minutes after successful induction of seizures, and samples were collected at 24 hours after termination of seizures. Nissl staining was used to observe hippocampal neuronal damage in the three groups, and Western blot was used to measure the changes in the expression of mitogen-activated protein kinases (JNK/p-JNK, P38/p-P38, and ERK/p-ERK).

**Results** The number of normal neurons in the bilateral hippocampal CA3 region was  $158.6 \pm 8.4$  in the control group,  $59.8 \pm 7.4$  in the model group, and  $123.4 \pm 5.0$  in the A2A receptor antagonist group; the model group had a significantly lower number than the control group ( $P < 0.05$ ), and the A2A receptor antagonist group had a significantly higher number than the model group ( $P < 0.05$ ). Western blot showed that the model group had significant increases in the expression of p-JNK, p-P38, and p-ERK, while the A2A receptor antagonist group had significant reductions in the expression of p-JNK and p-P38. **Conclusions** In the lithium-pilocarpine model, adenosine A2A receptor antagonist has a protective effect against neuronal damage, possibly by inhibiting the expression of p-JNK and p-p38.

**Key words:** adenosine A2A, receptor antagonist; status epilepticus; p-JNK; p-P38

**基金项目:** 国家自然科学基金青年基金项目 (81201006); 深圳市南山区技术研发和创意设计项目分项基金 (南科研卫 2012002; 南科研卫 2014015)

**收稿日期:** 2017-02-23; **修回日期:** 2017-04-25

**作者简介:** 李巷 (1983-), 女, 博士研究生, 主治医师, 主要从事神经病学方面的研究。E-mail: lixiang54120@163.com。

癫痫发病的危险因素有多种。其发病机制比较复杂,有研究表明,炎性损伤参与了癫痫持续状态的发生<sup>[1]</sup>。以往有研究表明,腺苷 A1 受体可通过激活后抑制谷氨酸的表达发挥抗癫痫作用<sup>[2,3]</sup>。但当癫痫频繁发作,腺苷浓度降低,A1 受体结合能力减弱,致使腺苷的抗癫痫作用减弱。现已有研究表明,腺苷 A2A 受体的结合能力高于 A1 受体,且作用与 A1 的作用相反,可通过阻断 A2A 受体发挥脑保护作用<sup>[4,5]</sup>。但阻断 A2A 受体是否能够在癫痫持续状态(SE)模型中也发挥脑保护作用鲜有报道。本研究成功复制氯化锂-毛果芸香碱 SE 模型,旨在探讨腺苷 A2A 受体阻断剂 SCH58261 对 SE 的作用及具体机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物及分组

SPF 级雄性 Wistar 大鼠,体重 200 ~ 300 g,温度 18 ~ 25℃,自由饮食水,适应性喂养 1 周后进行实验。大鼠随机分为对照组、模型组及 A2A 受体阻断剂组。

### 1.2 药品与试剂

兔抗 JNK 多克隆抗体、兔抗 p-JNK 多克隆抗体、兔抗 p-p38 单克隆抗体、小鼠抗 p38 单克隆抗体、小鼠抗 p-Erk1/2 单克隆抗体和兔抗 Erk1/2 单克隆抗体均购自美国 Cell Signal 公司;SCH58261 购自英国 Tocris Cookson 公司;其他化学试剂为国产分析纯。

### 1.3 SE 模型建立

除对照组外,其余大鼠均给予腹腔注射氯化锂 3 mmol/kg,18 ~ 24 h 后腹腔注射毛果芸香碱 50 mg/kg · 40 ~ 60 min 模型点燃后,参照改良后 Racine 分级法进行癫痫强度的评价,若达到 5 级发作视为点燃成功,发作持续 15 min 后给予阿托品,40 min 后给予地西洋及 6% 水合氯醛交替腹腔注射直至发作控制<sup>[10]</sup>。A2A 受体阻断剂组在氯化锂-毛果芸香碱注射前 15 min 予腹腔给药(SCH58261 0.05 mg/kg),对照组给予同等剂量生理盐水。所有实验动物在点燃成功持续发作后 40 min 予地西洋及水合氯醛终止发作,对照组在同时间点给予上述药物。并于发作终止后 24 h 留取标本。

### 1.4 海马神经元 Nissl 染色

三组实验动物在 24 h 后采用取 -70℃ 冰箱中预冷异戊烷灌注取脑,-20℃ 冰箱保存备用。采用 Nissl 染色液进行染色、脱水、透明及封片等后期处理。采用 BI-2000 型图像分析系统进行神经元

的观察,在光学显微镜(×400)视野下观察各组海马组织 Nissl 染色阳性神经元的损伤情况,随机选择 3 个视野进行阳性神经元的计数,取平均值。

### 1.5 Western blot 检测

冰上剥离海马,提取总蛋白,测定蛋白浓度后,SDS-PAGE 凝胶电泳,转膜,封闭后,加一抗、二抗孵育,DAB 显色,扫描胶片,使用美国 Gene Genius 公司凝胶成像分析系统分析 JNK、p-JNK、P38、p-P38、ERK 和 p-ERK 光密度值,计算 p-JNK/JNK、p-P38/P38 和 p-ERK/ERK 比值。

### 1.6 统计学分析

数据分析采用 SPSS 15.0 软件,计量数据以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )来表示。各组间差异分析采用单因素方差分析。 $P < 0.05$  代表差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 Nissl 染色结果

尼氏染色的结果显示,对照组染色最为清晰,可见 Nissl 小体大而数量多,呈蓝紫色;模型组染色最模糊,Nissl 小体的数量减少,甚至消失;A2A 受体阻断剂组介于二者中间。光镜下进行神经元计数,结果显示,对照组、模型组及 A2A 受体阻断剂组双侧海马 CA3 区正常形态神经元计数分别为  $158.6 \pm 8.4$ 、 $59.8 \pm 7.4$  和  $123.4 \pm 5.0$ ,模型组神经元计数显著低于对照组,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ),A2A 受体阻断剂组神经元计数显著高于模型组,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。说明阻断剂明显改善海马区神经损伤情况,药物对癫痫持续状态下海马神经元损伤有抑制作用。见图 1、图 2。

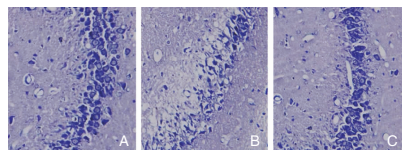


图 1 尼氏染色双侧海马 CA3 区神经元结果  
注:A:对照组;B:模型组;C:A2A 受体阻断剂组。

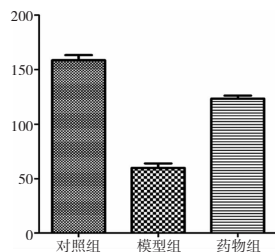


图 2 神经元细胞染色正常计数柱形图

## 2.2 Western blot 检测结果

Western blot 分析显示,三组中 JNK、P38 和 ERK 表达差异无统计学意义。对照组中 p-JNK、p-P38 和 p-ERK 表达量较少,模型组中 p-JNK、p-P38 和 p-ERK 表达量明显增多,A2A 受体阻断剂组中 p-JNK 和 p-P38 表达量较模型组少,p-ERK 表达量与模型组无明显差异。

相对光密度值分析示,p-JNK46/JNK46 在对照组、模型组、A2A 受体阻断剂组中分别为  $0.15 \pm 0.02$ 、 $0.53 \pm 0.06$  和  $0.24 \pm 0.03$ ,组间差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ );p-JNK54/JNK54 在三组中分别为  $0.15 \pm 0.02$ 、 $0.53 \pm 0.06$  和  $0.24 \pm 0.02$ ,组间差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。p-P38/P38 在对照组、模型组和 A2A 受体阻断剂组中分别为  $0.41 \pm 0.03$ 、 $1.20 \pm 0.06$  和  $0.71 \pm 0.04$ ,组间差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。p-ERK42/ERK42 在对照组、模型组和 A2A 受体阻断剂组中分别为  $0.11 \pm 0.03$ 、 $1.04 \pm 0.09$  和  $1.05 \pm 0.05$ ;p-ERK44/ERK44 在对照组、模型组和 A2A 受体阻断剂组中分别为  $0.12 \pm 0.03$ 、 $1.03 \pm 0.05$  和  $1.04 \pm 0.05$ ;模型组和 A2A 受体阻断剂组明显高于对照组 ( $P < 0.05$ ),但两组之间表达无差异。见图 3 ~ 图 8。

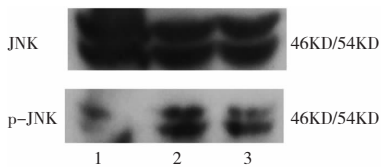


图 3 p-JNK/JNK Western blot 结果

注:1:对照组;2:模型组;3:A2A 受体阻断剂组

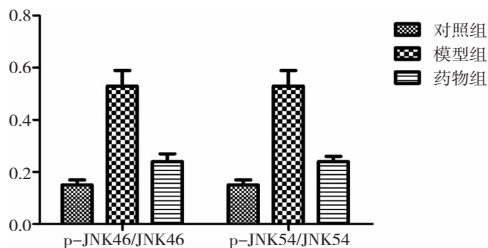


图 4 p-JNK/JNK 相对光密度分析柱状图

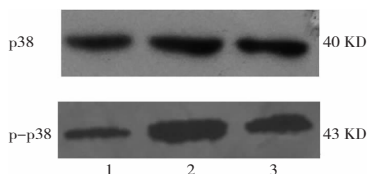


图 5 p-P38/P38 Western blot 结果

注:1:对照组;2:模型组;3:A2A 受体阻断剂组

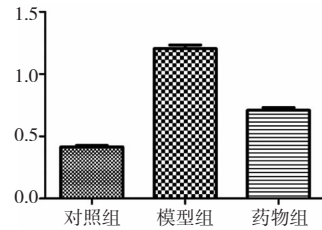


图 6 p-P38/P38 相对光密度分析柱状图

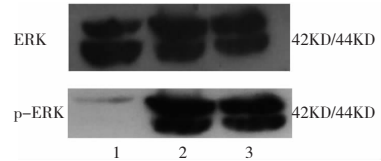


图 7 p-ERK/ERK Western blot 结果

注:1:对照组;2:模型组;3:A2A 受体阻断剂组

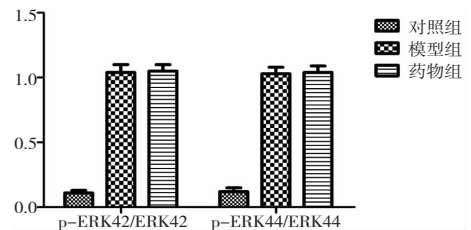


图 8 p-ERK/ERK 相对光密度分析柱状图

## 3 讨论

腺苷在信号转导中作为 G 蛋白偶联受体发挥作用,与 Gs 偶联,有抑制腺苷酸环化酶 (AC),降低 cAMP 水平的作用,参与神经元兴奋等重要生命活动<sup>[6]</sup>。在神经退行性疾病中,腺苷 A2A 受体的拮抗剂表现出减轻损害的作用<sup>[7]</sup>。腺苷 A2A 受体的亲和力较强,此受体被阻断或是受到损伤时,能够减轻脑部的损伤情况,改善神经功能<sup>[8,9]</sup>。腺苷 A2A 受体主要分布在基底节区,近年来研究发现 A2A 受体在与癫痫相关的新皮质和边缘系统也有分布。在病理条件下,A2A 受体表达会有变化。研究证实,在帕金森病患者体内,A2A 受体的表达上调,而且分布也有变化<sup>[10]</sup>。反复发作的癫痫模型中,A2A 受体的表达也明显上调,说明 A2A 受体在相关疾病(如癫痫和帕金森病)中有更大的研究价值。

本课题组前期研究已经显示,在氯化锂-毛果芸香碱 SE 模型中,A1 受体表达及结合力降低,而 A2A 表达及结合力增加,两方面导致癫痫发作不易控制,脑神经元损伤严重<sup>[11]</sup>。本实验即在此基

础上,推测 A2A 受体水平升高会加重癫痫持续状态,造成脑部损伤,如果阻断 A2A 受体可能抑制癫痫发作以及对海马神经元损伤起保护作用。前期研究证实,在杏仁核点燃癫痫模型中, SCH58261 发挥作用的有效浓度在 0.005 mg/kg 到 0.5 mg/kg 之间(腹腔注射),本实验参照以往实验<sup>[12]</sup>,选取有效浓度 0.05 mg/kg 进行干预。本实验选用点燃后的大鼠,并且 A2A 受体的结合能力增强,密度也增加,以增加 A2A 受体阻断剂与受体结合概率,充分表达抑制性。

本研究结果显示,与对照组相比,氯化锂-毛果芸香碱 SE 模型中双侧海马 CA3 区神经元缺失明显,细胞数量明显少于 A2A 受体阻断剂组和对照组,说明 A2A 受体阻断剂组的腺苷 A2A 受体阻断剂 SCH58261 可以减少神经元损伤,证实腺苷 A2A 受体阻断剂 SCH58261 可以减轻 SE 模型中海马神经元损伤。丝裂原活化蛋白激酶系统(MAPKs)是体内重要的信号转导系统,参与了细胞的生长、分化、死亡等多种过程,实验中,我们也检测了 JNK、p38、ERK 及其磷酸化蛋白的表达情况<sup>[13,14]</sup>。Western blot 检测 SE 模型中双侧海马 p-JNK、p-P38 和 p-ERK 表达明显增多,药物组中 p-JNK 和 p-P38 的表达较模型组在一定程度上减少,说明药物能够抑制 p-JNK 及 p-P38 表达,进一步抑制了相应的下游信号通路,参与 SE 模型中神经元保护作用。

本研究发现 A2A 受体阻断剂有改善癫痫持续状态,减轻神经损伤,但 A2A 受体阻断剂的有效浓度尚需要进一步研究,有研究表示这类阻断剂有一定的不良反应,A2A 受体发挥作用可能存在其他的通路,例如之前已有研究表明,癫痫的发作与谷氨酸的释放有关,与其相关的信号通路和蛋白质表达值得进一步的探讨。

综上所述, SCH58261 (0.05 mg/kg, 腹腔注射)对大鼠氯化锂-毛果芸香碱 SE 模型有一定的脑保护作用。其作用机制可能是通过抑制 p-JNK 及 p-P38 信号通路实现。

#### 参 考 文 献

[1] 杨博文,陈欣,孙皓,等. 癫痫发病危险因素的 meta 分析[J]. 中国循证医学杂志, 2014, 14(1): 94-100.

- [2] 谢井伟,王新军,梁博,等. CPEB-4 蛋白在癫痫致痫灶中的表达及临床意义[J]. 实用医学杂志, 2013, 29(9): 1445-1448.
- [3] 张笋,王维平,冯连元. 腺苷与腺苷激酶在癫痫中的作用[J]. 国际神经病学神经外科学杂志, 2008, 35(3): 267-271.
- [4] Avsar E, Empson RM. Adenosine acting via A1 receptors, controls the transition to status epilepticus-like behaviour in an in vitro model of epilepsy[J]. Neuropharmacology, 2004, 47(3): 427-437.
- [5] El Yaboubi M, Ledent C, Parmentier M, et al. Adenosine A2A receptor deficient mice are partially resistant to limbic seizures[J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2009, 380(3): 223-232.
- [6] 黄瑛,马颖钰,张璞,等. 蛋氨酸对化疗药物引起内耳损伤的保护作用[J]. 河北医科大学学报, 2012, 33(8): 904-907.
- [7] 王任焯,狄枫,徐英,等. 腺苷及其受体在神经系统中的生物学作用[J]. 国外医学药学分册, 2006, 33(4): 279-282.
- [8] Yu L, Haverty PM, Mariani J, et al. Genetic and pharmacological inactivation of adenosine A2A receptor reveals an Egr-2-mediated transcriptional regulatory network in the mouse striatum[J]. Physiol Genomics, 2005, 23(1): 89-102.
- [9] 王皓香,范文辉. 腺苷受体 A1 与 A2A 相互作用对缺血性脑损伤的影响[D]. 第三军医大学, 2012.
- [10] 张丹,张建军,刘耕陶. 治疗帕金森病新药:腺苷 A<sub>2A</sub>受体拮抗剂[J]. 中国药理学通报, 2006, 22(8): 897-900.
- [11] 康慧聪,刘晓艳,胡琦,等. 氯化锂-毛果芸香碱点燃癫痫(癇)大鼠模型中腺苷激酶表达的动态改变[J]. 中国临床神经科学, 2009, 17(3): 225-230.
- [12] Xiang LI, KANG H, LIU X, et al. Effect of Adenosine A2A Receptor Antagonist ZM241385 on Amygdala-kindled Seizures and Progression of Amygdala Kindling[J]. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2012, 32(2): 257-264.
- [13] Johnson GL, Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases[J]. Science, 2002, 298(5600): 1911-1912.
- [14] Harrison JC, Zyla TR, Bardes ES, et al. Stress-specific activation mechanisms for the "cell integrity" MAPK pathway[J]. J Biol Chem, 2004, 279(4): 2616-2622.