

基于网络药理学和分子对接探讨癫痫宁片治疗癫痫的潜在作用机制研究

闫文浩¹, 李晨豪¹, 李尚颖², 左莉华¹, 李泽运^{1*}

1. 郑州大学第一附属医院, 河南 郑州 450052

2. 辽宁省药品检验检测院, 辽宁 沈阳 110036

摘要: **目的** 通过网络药理学和分子对接方法, 筛选癫痫宁片治疗癫痫的主要活性成分和分子机制。 **方法** 采用 TCMSP、Herb 数据库筛选癫痫宁片中的主要活性成分及靶点; GeneCard、OMIM、DisGent 筛选癫痫的治疗靶点; 使用 Cytoscape 3.8.2 软件构建“药物活性成分-靶点”网络; 将药物-交集基因上传至相互作用数据库 String 构建蛋白相互作用 (PPI) 网络。将药物-疾病交集基因上传至利用生物信息学开源软件 Bioconductor, 对其进行生物学过程的基因本体论 (GO) 和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析, 并对关键靶点与成分进行分子对接验证。 **结果** 共筛选到癫痫宁片有效成分 70 个, 靶点 308 个, 其中 degree 前 9 位的活性成分分别为毛茛藤碱、山柰酚、狼尾草麦角碱、 β -谷甾醇; 核心靶点共 10 个, 分别为 V-Rel 网状内皮增生病毒癌基因同源物 A (RELA)、转录因子 AP-1 (JUN)、有丝分裂原活化蛋白激酶 1 (MAPK1)、信号传导和转录激活蛋白 3 (STAT3)、肿瘤蛋白 p53 (TP53)、蛋白激酶 B1 (Akt1)、雌激素受体 α (ESR1)、肿瘤坏死因子 (TNF)、有丝分裂原活化蛋白激酶 8 (MAPK8)。共筛选出 5 195 个 GO 条目, 富集到 259 条与药物治疗癫痫相关的通路。分子对接结果显示, 核心靶点与活性成分间结合良好。 **结论** 基于网络药理学和分子对接方法对癫痫宁片治疗癫痫作用机制有了新的认识, 阐明药物活性成分与癫痫的关系, 为临床药物治疗提供了科学依据。

关键词: 癫痫宁; 癫痫; 网络药理学; 毛茛藤碱; 山柰酚; 狼尾草麦角碱; β -谷甾醇

中图分类号: R285.5; R971 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2023)07-1629-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2023.07.011

Mechanism exploring of Dianxianning Tablets in treatment of epilepsy based on network pharmacology and molecular docking technology

YAN Wen-hao¹, LI Chen-hao¹, LI Shang-ying², ZUO Li-hua¹, LI Ze-yun¹

1. The Frist Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China

2. Liaoning Provincial Institute of Drug Inspection and Testing, Shenyang 110036, China

Abstract: Objective To screen the main active ingredients and molecular mechanism of Dianxianning Tablets through network pharmacology and molecular docking methods. **Method** TCMSP and Herb database were used to screen the main active ingredients and targets of Dianxianning Tablets. GeneCard, OMIM, and DisGent were selected as therapeutic targets for epilepsy. Construct the “drug active ingredient-target” network using Cytoscape 3.8.2 software. The drug-intersection gene was uploaded to the interaction database String to construct the PPI network. The drug-disease intersection genes were uploaded to Bioconductor, the bioinformatics software was used to GO and KEGG pathways of biological processes, and the key targets and components were validated by molecular docking. Genetic Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis were performed, and key targets and components were validated by molecular docking. **Results** A total of 70 active ingredients and 308 targets were selected for Dianxianning Tablets, in which the first 9 active ingredients of the degree were hirsutine, kaempferol, penniclavine, and β -sitosterol, respectively. There are 10 core targets, including RELA, JUN, MAPK1, STAT3, TP53, Akt1, ESR1, TNF, MAPK8. A total of 5 195 GO entries were screened, and 259 pathways related to drug treatment of epilepsy were enriched. The results of molecular docking showed that the core target was well bound to the active ingredient. **Conclusion** This study provided a new understanding of Dianxianning Tablets' benefitting effect for treatment of epilepsy based on network pharmacology and molecular docking technology, which jointly elucidated the relationship between the active ingredients of drugs and epilepsy, and provided a

收稿日期: 2023-03-15

作者简介: 闫文浩, 男, 硕士, 主治医师, 研究方向为儿童癫痫中西医结合。E-mail: w.h.y08@163.com

*通信作者: 李泽运, 男, 博士, 研究方向为中药临床评价。E-mail: lizeyun2006@163.com

scientific basis for clinical drug treatment.

Key words: Dianxianning Tablets; epilepsy; network pharmacology; hirsutine; kaempferol; penniclavine; β -sitosterol

癫痫是一种由于大脑神经元异常同步化放电引起的长期、慢性、反复、多病因、多临床表现的神经系统疾病^[1]。其病因复杂,危害巨大,可造成不可逆的脑功能障碍甚至死亡。目前癫痫临床治疗主要包括化学药物治疗、中药治疗、生酮饮食、神经调控、外科手术治疗等,其中化学药物治疗依赖卡马西平、丙戊酸钠等抗癫痫药物,可能导致维生素 D 水平降低、肝肾损伤等风险^[2]。中医药治疗为癫痫控制提供了安全有效的补充手段^[3]。癫痫宁片是由石菖蒲、缬草、蜘蛛香、钩藤、甘松、薄荷脑、牵牛子、千金子组成,具芳香之气,行散之力较强,为宣气通窍之佳品,既能芳香化湿、醒脾健胃,又可化浊祛痰、涤痰开窍之药,具有化痰开窍、化湿和胃、醒神益智、理气活血、散风祛湿等功效^[4]。近年来,癫痫宁片已被广泛应用于原发性、继发性癫痫治疗中,常与化学药物协同发挥作用,扬长避短,增强疗效^[5]。然而,由于成分复杂,其作用机制至今仍不明确,有待进一步研究。

随着系统生物学的发展,药物成分、靶点、通路的复杂多层次可被现代研究手段所识别展现,为中医药现代药理研究提供了强有力的工具。网络药理学与分子对接相结合的研究方法则逐渐系统化,广泛应用于中药复杂作用机制的探索^[6]。网络药理学通过公共数据库搜集或化学鉴别等手段,明确中药的化学物质基础、与疾病相对应的潜在靶点、可能形成的代谢通路等依次展开复方中药的多成分、多靶点、多通路生物学特征^[7];分子对接技术则对网络药理学研究揭示的核心靶点、核心成分进行亲和力和评估,进而验证网络药理学研究的结果的准确性^[8]。二者相结合产生了重要影响,成为中药复杂作用机制研究的系统策略。

本研究以癫痫宁片为研究对象,基于网络药理学方法,初步探讨癫痫宁片治疗癫痫的作用机制,构建了药物的活性成分、靶点与癫痫相关疾病基因之间的相互作用网络,并进行分子生物学补充验证。本研究契合中医理论系统性、整体性的研究理念,为癫痫宁片治疗癫痫的临床合理应用和进一步科学研究提供了理论依据。

1 方法和方法

1.1 癫痫宁片中药活性成分筛选、靶点预测

通过 TCMSP (<https://tcmssp.com/tcmssp.php>)

数据库对钩藤、石菖蒲、千金子进行活性成分的收集。在 TCMSP 中的“herb name”输入中药名称,以化合物口服生物利用度 (OB) $\geq 30\%$,类药性 (DL) ≥ 0.18 作为筛选条件,并且将无靶点的成分筛选掉。在 TCMSP 数据库中,点击“related targets”获得各活性成分的靶蛋白名。利用 Uniprot 数据库 (<https://www.uniprot.org>) 的 UniprotKB 检索功能将靶蛋白名转换为基因名,筛选条件为“organism: homo sapiens”。

通过 Herb 数据库 (<http://herb.ac.cn/>) 搜集薄荷脑、甘松、牵牛子、缬草、蜘蛛香有效成分,同时运用 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) 获得化合物其 SMILES,导入到结构相似度预测靶点数据库 SwissTargetPrediction (<http://www.swisstargetprediction.ch>) 预测其有效靶点。

1.2 癫痫相关靶点的获取

通过在 GeneCards (<https://www.genecards.org/>)、OMIM (<https://www.omim.org/>)、DisGent (<https://www.disgenet.org/>) 数据库中输入关键词“epilepsy”进行检索,以“relevance score” ≥ 1 作为标准进行疾病相关的基因筛选,剔除重复基因,并经 Uniprot 数据库进行校正。

1.3 药物-疾病靶点预测结果

将获得的药物作用靶点与癫痫靶点相互映射,然后作 Venn 图,从而获得交集基因。然后使用 Cytoscape 3.8.2 软件构建“药物活性成分-靶点”网络,根据化合物与靶点的连接情况筛选出药物作用于癫痫的关键化合物。

1.4 靶蛋白相互作用及核心靶点筛选

为了进一步研究药物治疗癫痫的蛋白之间的相互作用,将药物-交集基因上传至相互作用数据库 String (<https://string-db.org/>) 进行蛋白相互作用 (PPI) 网络构建数据库;物种设置为“homo sapiens”,最低相互作用评分设置为 0.9,其余参数保持默认设置,结果储存为 TSV 格式,将 TSV 文件导入 Cytoscape 3.8.2 中,并对网络进行分析,保存网络分析结果,使用 Cytoscape 中的 Generate style from statistics 工具,用节点大小和颜色反应反映 degree 的大小,节点越大 degree 值越大;边的粗细用于反映 combine score 的大小,边越粗 combine score 越大,挑选核心的靶点做出 PPI 网络图。

1.5 基因本体论 (GO) 富集分析和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路分析

将药物-疾病交集基因上传至利用生物信息学开源软件 Bioconductor (<http://www.bioconductor.org/>) 在 R 语言内安装运行 clusterProfiler、Stringin、DOSE 和 Pathview 程序, 对其进行生物学过程的 GO、KEGG 功能富集分析, 并通过微生信平台进行可视化显示。利用微生信平台 GO 基因功能从生物过程 (BP)、细胞成分 (CC)、分子功能 (MF) 3 个方面注释药物治疗癫痫的作用靶蛋白在基因功能中的作用。为阐明药物治疗癫痫的靶点在信号通路中进行 KEGG 通路富集分析。选取 GO 功能条目和 KEGG 通路条目前几位作为药物治疗癫痫的主要基因功能富集过程和信号通路, 预测癫痫宁片治疗癫痫的潜在作用机制。

1.6 分子对接

将拓扑学参数排名靠前的分子和小分子进行分子对接。蛋白质晶体结构由 alphafold 数据

(<https://alphafold.ebi.ac.uk/>)。对接小分子库由 TCMSP 数据库 (<https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>) 通过搜索中药获取并建立。使用 AutodockTools1.2 对蛋白质晶体结构进行去水、加氢操作, 并进行受体结构准备工作。使用 Open Babel 及 Autodock 程序对小分子库进行拆分等准备工作。对接使用 Autodock 程序进行, 最终结果导入 pymol 进行对接结果的可视化。

2 结果

2.1 癫痫宁片活性成分筛选及靶点预测

通过 TCMSP 和 Herb 数据库检索收集到钩藤 20 个、石菖蒲 6 个、千金子 10 个、薄荷脑 3 个、甘松 5 个、牵牛子 16 个、缬草 20 个、蜘蛛香 6 个有效成分; TCMSP 以 OB $\geq$ 30%、DL $\geq$ 0.18 为条件筛选后, 去除没有靶点的化合物后, 最终共得到钩藤 18 个、石菖蒲 4 个、千金子 8 个、薄荷脑 1 个、甘松 4 个、牵牛子 13 个、缬草 18 个、蜘蛛香 4 个化学成分和 308 个有效靶点, 见表 1。

表 1 活性成分信息

Table 1 Active ingredient information

编号	化合物名称	来源	编号	化合物名称	来源
GS1	(2R)-5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl) chroman-4-one	甘松	QNZ6	8-isopentenyl-kaempferol	牵牛子
GS2	acacetin	甘松	QNZ7	phaseollidin	牵牛子
GS3	sitosterol	甘松	QNZ8	gibberellin	牵牛子
GS4	cryptotanshinone	甘松	QNZ9	penniclavine	牵牛子
GT1	geissoschizinc acid	钩藤	QNZ1	chanoclavine	牵牛子
GT2	SMR000232338	钩藤	QNZ11	lysergol	牵牛子
GT3	(E)-16,17-didehydro-17-methoxy-17	钩藤	QNZ12	agroclavin	牵牛子
GT4	Rhynchophylline A	钩藤	QNZ13	elymoclavine	牵牛子
GT5	methyl (E)-2-[(2S,3Z,12bS)-3-ethylidene-2,4,6,7,12	钩藤	SCP1	8-isopentenyl-kaempferol	石菖蒲
GT6	rhynchophylline	钩藤	SCP2	(1R,3aS,4R,6aS)-1,4-bis(3,4-dimethoxyphenyl)-1,3,3a,4,6,6a-hexahydrofuro[4,3-c]furan	石菖蒲
GT7	SMR000232333	钩藤	SCP3	cycloartenol	石菖蒲
GT8	isorhynchophylline	钩藤	SCP4	kaempferol	石菖蒲
GT9	geissoschizinc acid	钩藤	XC1	γ -terpinene	缬草
GT10	SMR000232338	钩藤	XC2	alpha-pyrufuran	缬草
GT11	(E)-16,17-didehydro-17-methoxy-17	钩藤	XC3	valerenolic acid	缬草
GT12	rhynchophylline A	钩藤	XC4	valerenic acid	缬草
GT13	corynoxine	钩藤	XC5	caffeic acid dimethyl ether	缬草
GT14	corynantheine	钩藤	XC6	terpinyl acetate	缬草
GT15	(1'R,3S,4a'S,5a'R)-1'-methyl-2-oxo-1',4a',5',5a',7',8',10',10a'-octahydrospiro[indoline-3,6'-pyrano[3,4-f]indolizine]-4'-carboxylic acid	钩藤	XC7	selinene	缬草
GT16	(2S,12bR)-methyl 2-((E)-1-oxobut-2-en-2-yl)-1,2,6,7,12,12b-hexahydroindolo[2,3-a]quinolizine-3-carboxylate	钩藤	XC8	perillyl acetate	缬草
GT17	coryncine	钩藤	XC9	pentanacid	缬草
GT18	quercetin	钩藤	XC10	n-valerophenone-O-carboxylic acid	缬草
QJZ1	euphorbetin	千金子	XC11	heteratisine	缬草
QJZ2	euphol	千金子	XC12	cineole	缬草
QJZ3	beta-sitosterol	千金子	XC13	N-(p-hydroxyphenethyl) actinidine	缬草
QJZ4	sitosterol	千金子	XC14	maali alcohol	缬草
QJZ5	stigmasterol	千金子	XC15	valeranone	缬草
			XC16	isovaleroxy-hydroxy dihydrovaltrate	缬草

续表 1

编号	化合物名称	来源	编号	化合物名称	来源
QJZ6	eseramine	千金子	XC17	isovalericacid	缬草
QJZ7	DL-laudanine	千金子	XC18	γ -selinene	缬草
QJZ8	beta-sitosterol	千金子	ZZX1	acaciin	蜘蛛香
QNZ1	gibberellin A44	牵牛子	ZZX2	linarin isovalerate	蜘蛛香
QNZ2	rhein	牵牛子	ZZX3	B-patchoulene	蜘蛛香
QNZ3	beta-sitosterol	牵牛子	ZZX4	(+)-maali oxide	蜘蛛香
QNZ4	sitosterol	牵牛子	BHN1	menthol	薄荷脑
QNZ5	anhydroicaritin	牵牛子			

2.2 癫痫相关靶点

通过在 GeneCards (<https://www.genecards.org/>) 数据库中输入关键词“epilepsy”进行检索,以“relevance score” ≥ 1 作为标准进行筛选,共获得了 2 317 条癫痫相关的靶点,从 OMIM 数据库中共获得 325 条关于癫痫相关靶点信息,在 DisGent 数据库得到 1 216 个靶点;合并 3 个数据库的数据,剔除重复基因共得到 2 837 个疾病靶点。

2.3 药物活性成分-靶点预测结果

共获得癫痫宁片治疗癫痫的潜在作用靶点 160 个(图 1)。将上述所得的活性成分和有效交集靶点数据导入到 Cytoscape 3.8 进行网络构建,获得药物活性成分-靶点网络,见图 2。该网络共包含 582 个节点,1 831 条边。图中倒三角代表癫痫宁片所含中药,六边形节点代表中药成分,菱形节点代表靶点蛋白,其中黑线代表节点间的连接数量。对药物活性成分-靶点网络进行分析,其中 degree 前 9 位的活性成分分别为毛钩藤碱(hirsutine)、山柰酚(kaempferol)、狼尾草麦角碱(penniclavine)、薄荷醇(menthol)、蒙花苷异戊酸酯(linarin isovalerate)、刺槐苷(acaciin)、广藿香烯(patchoulene)、 β -谷甾醇(β -sitosterol)、豆甾醇(stigmasterol),推测可能是复方的重要成分,见表 2。采用 CytoHubba 插件的 degree 算法再次验证得到关键化合物,分别为毛钩藤碱、山柰酚、狼尾草麦角碱、 β -谷甾醇。

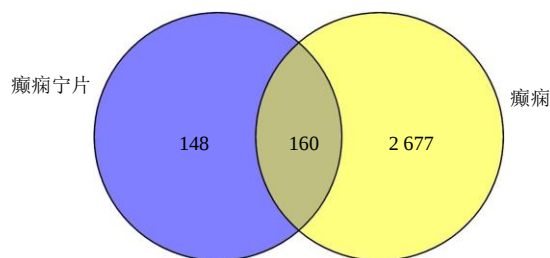


图 1 癫痫宁片化学成分靶点与癫痫疾病靶点 Venn 图

Fig. 1 Venn diagram of chemical component targets of Dianxianning Tablets and epileptic disease targets

2.4 核心靶点及网络相互作用

将药物成分靶点与癫痫相关的 160 个共有靶点导入 String (<https://string-db.org/>) 数据库中进行蛋白相互作用预测,物种设置为 homo sapiens,为确保研究的可信度,置信度设置为 0.9,其余参数默认设置;将网络文件保存为 TSV 格式,将 TSV 文件导入 Cytoscape 3.8.2 软件绘制 PPI 网络,见图 3。该网络共有 82 个结点和 252 条边。计算靶点相应属性信息,并以自由度(degree)、中介中心度(BC)、接近中心度(CC)、邻里连通性(NC)分别大于其相应中位数为筛选条件,进一步筛选核心靶点,最终得到癫痫宁片治疗癫痫的核心靶点共 10 个,分别为 V-Rel 网状内皮增生病毒癌基因同源物 A (RELA)、转录因子 AP-1 (JUN)、有丝分裂原活化蛋白激酶 1 (MAPK1)、信号传导和转录激活蛋白 3 (STAT3)、肿瘤蛋白 p53 (TP53)、蛋白激酶 B1 (Akt1)、雌激素受体 α (ESR1)、肿瘤坏死因子 (TNF)、有丝分裂原活化蛋白激酶 8 (MAPK8)。

2.5 生物功能富集分析

2.5.1 GO 富集分析 取交集基因,利用 R 软件进行 GO 基因功能富集分析,共筛选出 GO 条目 5 195 条,其中 BP 相关的有 4 314 条,CC 相关的 334 条,MF 相关的 547 条;以 $P < 0.05$ 作为标准筛选药物治疗疾病的显著富集的生物功能主要条目 30 条,见图 4。BP 主要涉及对药物的反应、活性氧代谢过程、对氧化应激的反应、细胞对化学应激的反应、对脂多糖的反应、对金属离子的响应、对细菌来源分子的反应、细胞对氧化应激的反应;CC 涉及膜筏、膜微区、膜区、质膜筏、小窝、突触前膜的组成部分、突触前膜的内在成分、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶复合物、细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶全酶复合物、突触后膜、囊泡腔等;MF 涉及碳酸盐脱水酶活性、药物结合、水解酶活性、核受体活性、配体激活的转录因子活性、碳氧裂解酶活性、神经递质受体活性等。

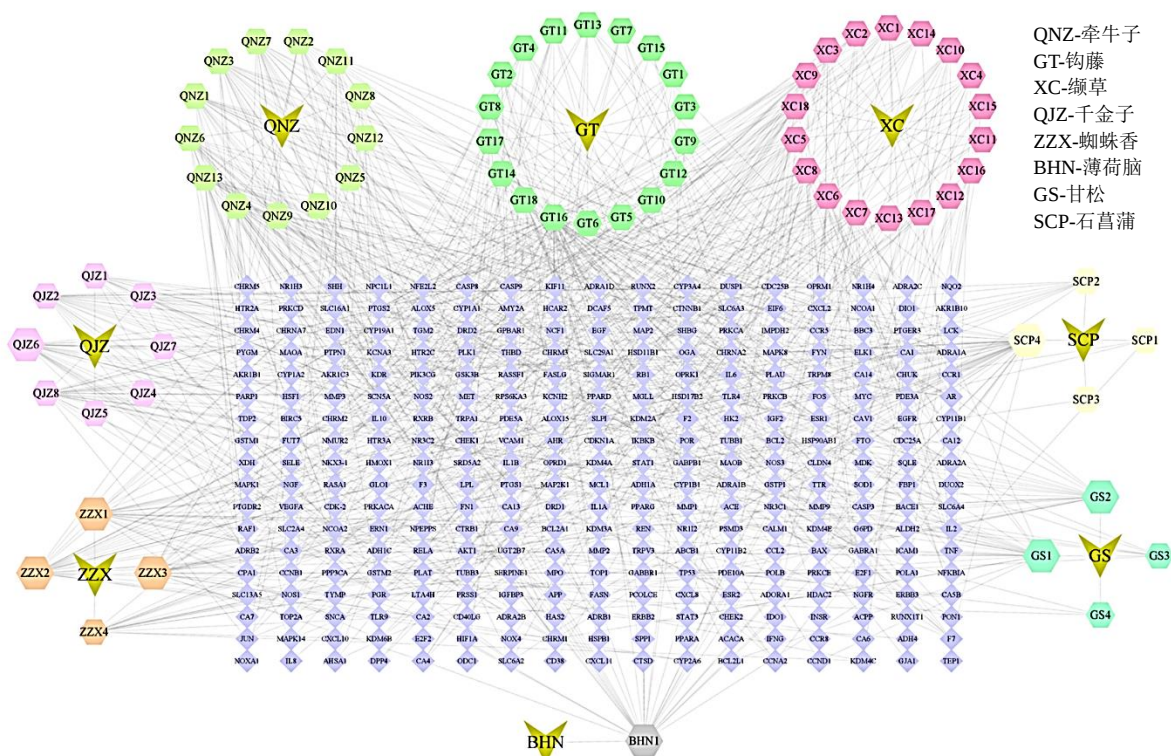


图 2 癫痫宁片药物活性成分-靶点网络图

Fig. 2 Dianxianning Tablets active ingredients - target network diagram

表 2 核心化学成分拓扑学参数

Table 2 Topology parameter of key chemical components

活性成分	自由度
毛钩藤碱	60
薄荷醇	32
广藿香烯	29
山柰酚	52
蒙花苷异戊酸酯	30
豆甾醇	28
狼尾草麦角碱	52
刺槐苷	29
β -谷甾醇	28

2.5.2 KEGG 通路富集分析 利用 R 软件进行通路富集分析, 富集到 259 条与药物治疗癫痫相关的通路, 根据 $P < 0.05$ 筛选出药物治疗癫痫相关的通路, 见图 5, 分别是晚期糖基化终末化产物 (AGE) - 晚期糖基化终末产物受体 (RAGE) 信号通路、乙型肝炎信号通路、人巨细胞病毒感染信号通路、白细胞介素-17 (IL-17) 信号通路、TNF 信号通路、低氧诱导因子-1 (HIF-1) 信号通路。

2.6 分子对接

分子对接结合能 < -1 kcal/mol ($1 \text{ cal} = 4.4 \text{ J}$) 表示具有结合活性, 结合能 < -5 kcal/mol 表示结合

活性较好。因此, 由 AutodockTools 1.5.6 软件分子对接结果可知, 拓扑学参数靠前的中药化合物小分子毛钩藤碱、山柰酚、狼尾草麦角碱、 β -谷甾醇与 PPI 核心蛋白拓扑学参数前 8 位的大分子受体均具有良好的结合活性。其中毛钩藤碱、山柰酚、狼尾草麦角碱、 β -谷甾醇的结合能较低, 结合活性较好, 见图 6。

3 讨论

癫痫宁片由石菖蒲、钩藤、牵牛子、千金子、甘松、薄荷脑、缬草、蜘蛛香组成, 具豁痰开窍、息风安神之功, 用于风痰上扰癫痫病控制, 疗效确切, 应用广泛。其作用机制至今尚不明确。本研究以网络药理学、分子对接等手段相结合, 探讨其药效成分、潜在靶点、通路机制, 对临床合理应用及后续研究具有重要参考价值。

网络药理学研究发现毛钩藤碱、山柰酚、狼尾草麦角碱、 β -谷甾醇为癫痫宁片中的重要化学成分。其中毛钩藤碱、狼尾草麦角碱为生物碱成分, 研究报道生物碱类成分对阿尔茨海默病、帕金森病、惊厥、癫痫等中枢神经系统病症具有治疗及神经保护作用^[9]。文献报道钩藤提取物对癫痫模型具有神经保护及改善作用^[10]。毛钩藤碱为钩藤中主要生物碱

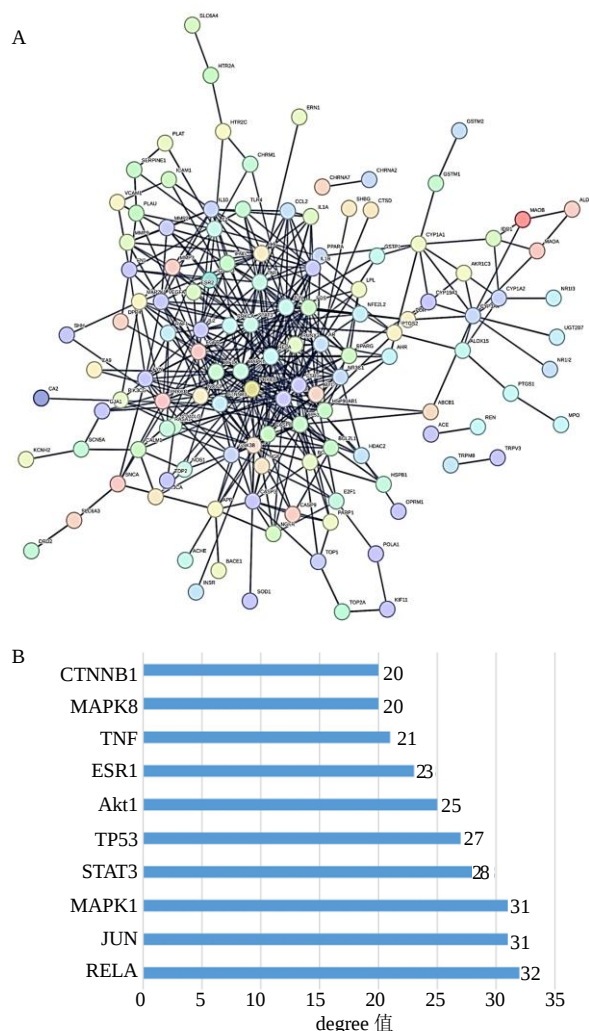


图 3 核心靶点 PPI 网络图 (A) 及核心靶点 degree 值 (B)
Fig. 3 Interaction network (A) and degrees of key targets (B)

成分,可能是治疗癫痫药物的重要实体,其具体机制有待进一步的研究^[11]。狼尾草麦角碱为牵牛子中化学成分^[12],文献报道牵牛子对癫痫具有一定改善作用^[13]。低剂量牵牛子提取物对东莨菪碱所致小鼠记忆获得性障碍有比较明显的改善作用^[14],本研究推测狼尾草麦角碱可能为牵牛子抗癫痫的化学物质基础之一。黄酮类化合物具有抗氧化、神经保护等生物学作用,多种单体展现出对癫痫具有改善作用^[15-16]。本研究中山柰酚为广泛存在的黄酮成分,文献报道其通过核因子- κ B (NF- κ B) 和 STAT3 信号通路发挥缺血性脑卒中的保护作用^[17-18]。此外,文献报道其具有抗抑郁^[19]、抗氧化^[20]、记忆改善^[21]等作用。考虑到癫痫的发作和氧化还原反应密切相关^[22],研究者推测癫痫宁片中山柰酚等黄酮类物质可能通过调节氧化应激、神经保护等发挥其治疗癫

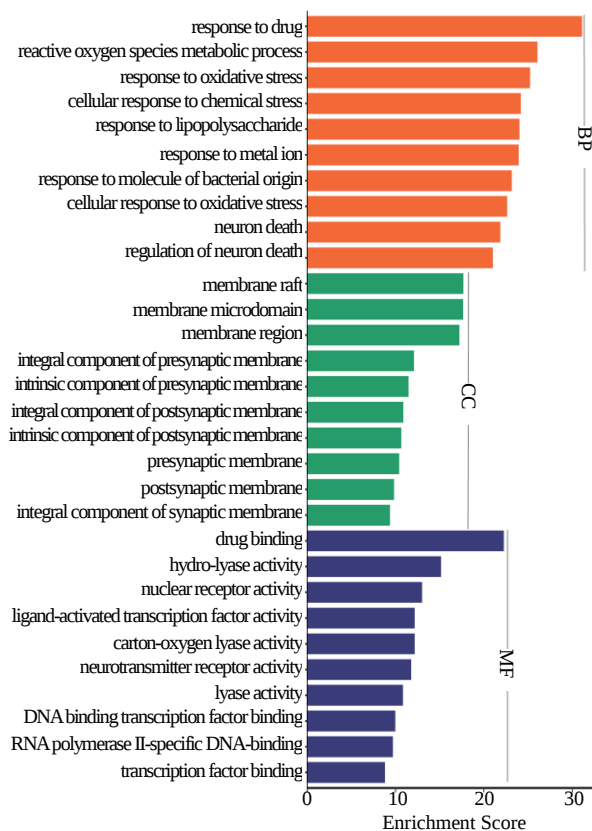


图 4 GO 富集分析

Fig. 4 GO enrichment analysis

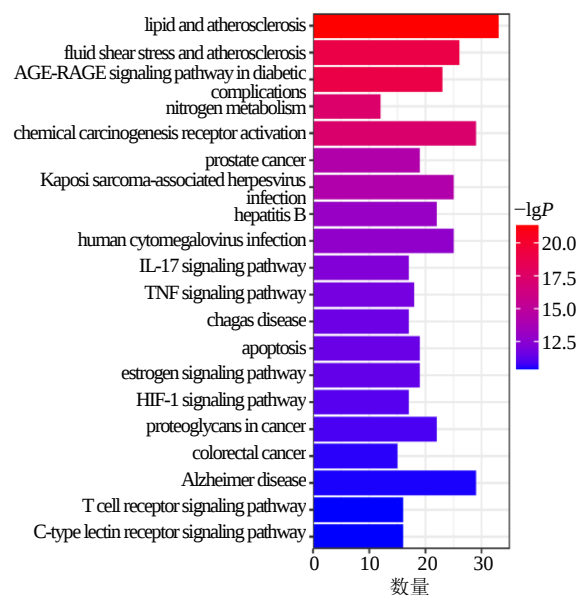


图 5 KEGG 通路分析

Fig. 5 KEGG channel analysis

痫的作用。炎症反应亦在癫痫的发生发展中扮演着重要的角色^[23]。 β -谷甾醇为草药中广泛存在的甾体结构,其具有抗炎、抗氧化等多重生物学功能^[24-25]。

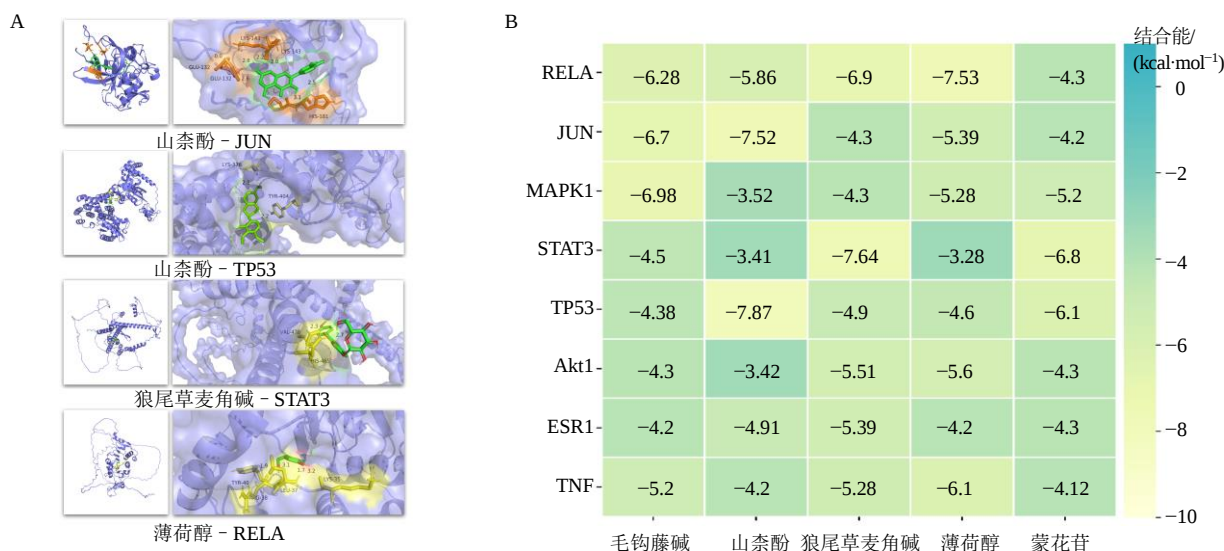


图 6 核心化合物与核心靶点结合示意图 (A) 与分子对接结合热能热图 (B)

Fig. 6 Molecular docking diagram of key compounds to targets (A) and heatmap of binding energy (B)

文献报道 β -谷甾醇等成分在复方中药中可能发挥抗癫痫的治疗作用^[26]。本研究推测 β -谷甾醇可能为癫痫宁片重要潜在药效物质基础之一。

活性成分-靶点网络及 PPI 网络综合分析的结果显示, RelA、JUN、MAPK1、STAT3、TP53 等靶点可能是癫痫宁片治疗癫痫的核心作用靶点。RELA 是 NF- κ B 家族重要成员,其翻译后修饰可精准调控 NF- κ B 的转录活性,进而通过调节炎症、神经及免疫应答等介导疾病进展^[27]。JUN 为应激活化蛋白激酶 (JNK) 通路下游转录因子,具有神经元凋亡调控作用,且参与细胞的增殖、存活、神经元细胞再生等系列生命过程^[28]。JNK 为哺乳类细胞中 MAPK 信号通路的另一亚类,研究报道其为神经退行性疾病的潜在靶点^[29]。JNK/c-JUN 通路在神经元凋亡过程中发挥重要作用,阻断该通路可能是癫痫治疗的重要靶点^[30]。MAPK1 为 MAPK 家族的成员,可参与细胞运动、凋亡、分化及生长增殖等多种生理过程,与神经系统疾病密切相关^[29]。STAT3 为 STAT 家族成员,调控多种细胞因子和生长因子,参与炎症、癫痫等过程^[31]。Xu 等^[32]发现 STAT3 在脑损伤后星形胶质细胞增生、分化方面有重要作用,为 STAT3 参与癫痫模型星形胶质细胞增生提供了可靠的证据。TP53 是一种抑癌基因,有研究报道 TP53 与海马神经元损伤有关,其上调促进斑马鱼神经丘毛细胞存活,保护海马神经元损伤^[33-34]。基于以上研究,癫痫宁片核心靶点相互作用所涉及的 RELA、JUN、MAPK1、STAT3、TP53 等靶点可能

是癫痫宁片治疗癫痫的潜在核心靶点。

GO 富集分析 BP 涉及活性氧代谢过程、对氧化应激的反应、对脂多糖的反应、对金属离子的响应等; CC 涉及丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶复合物、细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶全酶复合物等; MF 涉及核受体活性、配体激活的转录因子活性、碳氧裂解酶活性、神经递质受体活性等; 以上内容均报道与癫痫等神经系统疾病相关联^[35-36]。KEGG 分析主要涉及 AGE-RAGE 信号通路、乙型肝炎信号通路、人巨细胞病毒感染信号通路、IL-17 信号通路、TNF 信号通路、HIF-1 信号通路等; 以上通路癫痫发病机制既往研究吻合^[37],可能为癫痫宁片治疗癫痫疾病的潜在通路。AGE-RAGE 通路 NF- κ B 激活有关,可影响下游信号转导通路,从而产生促炎性细胞因子和炎症,进而与癫痫发生发展有关^[38]。IL-17 在药物难治性颞叶外侧型癫痫病灶中高表达和分布,为癫痫发生发展中可能的作用信号通路^[39]。TNF 信号通路与自身免疫密切相关,调节神经炎症和炎性细胞因子对大脑的影响,在癫痫发生中起重要作用^[40]。血清低氧诱导因子-1 α (HIF-1 α) 表达与卒中后继发性癫痫的关联密切,血清 HIF-1 α 可能预测卒中继发癫痫的风险^[38]。基于以上报道,癫痫宁片网络药理学研究所揭示的信号通路可能为本制剂在癫痫治疗作用中的潜在作用机制。

研究进一步通过分子对接技术手段对核心靶点与核心配体的分子亲和力进行补充验证。分子对接结果表明毛钩藤碱、山柰酚、狼尾草麦角碱、 β -

谷甾醇配体等与核心靶蛋白 JUN、RELA、MAPK3、TP53、STAT3 等具有很强的结合活性,提示癫痫宁片可能是通过以上成分调节核心靶点进而发挥其治疗癫痫的药理作用。

综上所述,本研究基于网络药理学方法对癫痫宁片治疗癫痫作用机制进行挖掘并分析,结果表明,癫痫宁的活性成分毛茛藤碱、山柰酚、狼尾草麦角碱、 β -谷甾醇等可通过 RELA、JUN、MAPK1、STAT3、TP53 等靶蛋白介导 AGE-RAGE 信号通路、乙型肝炎信号通路、人巨细胞病毒感染信号通路、IL-17 信号通路、TNF 信号通路、HIF-1 信号通路发挥抗癫痫作用。本研究阐明了癫痫宁片干预调控治疗癫痫的分子机制,既体现了中药多成分、多靶点、多通路的疗效方式,也验证了中医学的整体医学观,为后期的临床及研究提供了理论支持。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 陆钦池. 癫痫持续状态药物治疗进展 [J]. 中国现代神经疾病杂志, 2023, 23(2): 104-109.
- [2] 张今潞. 癫痫患者药物相关问题分析及药物治疗管理实施效果评价 [D]. 石河子: 石河子大学, 2022.
- [3] 苏发智, 孙延平, 白晨曦, 等. 中医药辨证治疗癫痫的研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(11): 200-211.
- [4] 木崇仙. 癫痫宁片治疗癫痫疗效观察 [D]. 昆明: 昆明医学院, 2009.
- [5] 王书豹, 彭俊举, 范永会. 癫痫宁片联合丙戊酸钠治疗颅脑外伤术后癫痫的临床研究 [J]. 现代药物与临床, 2020, 35(6): 1141-1145.
- [6] 牛明, 张斯琴, 张博, 等. 《网络药理学评价方法指南》解读 [J]. 中草药, 2021, 52(14): 4119-4129.
- [7] 陈健, 陈启龙. 网络药理学在中医药研究中的现状及思考 [J]. 上海中医药大学学报, 2021, 35(5): 1-6.
- [8] 章新友, 张亚明, 刘梦玲, 等. 虚拟筛选技术在中药研究中的应用 [J]. 中国新药杂志, 2022, 31(17): 1676-1683.
- [9] 邢志恒, 何忠梅, 祝洪艳, 等. 生物碱类化合物对中枢神经系统影响的研究进展 [J]. 上海中医药杂志, 2018, 52(6): 95-98.
- [10] 严瑶瑶, 马瑶, 周童, 等. 钩藤对脑损伤早期癫痫易感性的影响 [J]. 时珍国医国药, 2019, 30(7): 1575-1578.
- [11] 黄晏, 周文霞, 张永祥, 等. 钩藤碱及其同分异构体对神经系统作用的研究进展 [J]. 药学报, 2018, 53(7): 1017-1022.
- [12] 张丹宇, 季宇彬, 许旭东等. 牵牛子的化学成分和药理作用研究进展 [J]. 科学技术创新, 2018(30): 13-14.
- [13] 梁桂美, 麦绮红, 陆晓晖. 牵牛子散联合托吡酯对难治性癫痫疗效及认知功能的影响 [J]. 中国药业, 2015, 24(12): 89-91.
- [14] 敖冬梅, 骆静, 吴和珍, 等. 牵牛子提取物对 CN 的激活及对东莨菪碱致记忆获得性障碍小鼠的影响 [J]. 北京师范大学学报: 自然科学版, 2003(6): 803-806.
- [15] 祁建宏, 董芳旭. 黄酮类化合物药理作用研究进展 [J]. 北京联合大学学报, 2020, 34(3): 89-92.
- [16] 张雪意, 郭珍立, 陈延, 等. 中药单体治疗癫痫研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2020, 22(2): 129-132.
- [17] 余录, 陈维, 和丽芬, 等. NF- κ B 和 STAT3 信号通路在山柰酚糖苷治疗缺血性脑损伤中的作用 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2012, 26(3): 422-423.
- [18] 张雅雯, 邵东燕, 师俊玲, 等. 山柰酚生物功能研究进展 [J]. 生命科学, 2017, 29(4): 400-405.
- [19] 梁玉雕, 谭友果, 张莎, 等. 山柰酚对慢性应激抑郁模型老年大鼠抑郁样行为的影响及机制研究 [J]. 中国临床药理学杂志, 2020, 36(24): 4028-4030.
- [20] 张丽阳, 孙军, 陈迪. 山柰酚抑制脑缺血/再灌注大鼠的脑损伤、炎症、氧化应激和凋亡 [J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2022, 31(4): 381-386.
- [21] 张君, 程笑, 杨欢, 等. 山柰酚对慢性脑缺血大鼠学习记忆能力的影响及机制探讨 [J]. 中国药理学通报, 2017, 33(1): 39-44.
- [22] 樊玉香, 郭电渠, 王满利. 合并焦虑抑郁癫痫患者的血清氧化应激水平及其与癫痫发作的相关性 [J]. 国际精神病学杂志, 2022, 49(3): 477-479.
- [23] Tan T H, Perucca P, O'Brien T J, 等. 炎症、癫痫发作和癫痫发生: 对人类疾病的探索 [J]. 癫痫杂志, 2022, 8(4): 348-365.
- [24] 陈元堃, 曾奥, 罗振辉, 等. β -谷甾醇药理作用研究进展 [J]. 广东药科大学学报, 2021, 37(1): 148-153.
- [25] 陈跃平, 谢婷, 张昊, 等. β -谷甾醇的生理功能及其在动物生产中的应用研究进展 [J]. 动物营养学报, 2022, 34(5): 2721-2731.
- [26] 孙凯滨, 孙蓉. 基于网络药理学研究模式的柴胡桂枝汤治疗胃溃疡与癫痫的异病同治分析 [J]. 中草药, 2019, 50(21): 5178-5186.
- [27] 耿云峰, 杜鸿斌, 刘琳琳, 等. NF- κ B 家族成员 RelA 的翻译后修饰及其生理病理作用的研究进展 [J]. 生命科学, 2020, 32(5): 431-438.
- [28] Busquets O, Parcerisas A, Verdaguer E, et al. c-Jun N-terminal kinases in Alzheimer's disease: A possible target for the modulation of the earliest alterations [J]. J Alzheimers Dis, 2021, 82(s1): S127-S139.
- [29] Zhao Y, Kuca K, Wu W, et al. Hypothesis: JNK signaling is a therapeutic target of neurodegenerative diseases [J]. Alzheimers Dement, 2022, 18(1): 152-158.

- [30] 张吴琼. JNK 信号通路在癫痫后海马神经元 Parthanatos 死亡中的作用及相关机制的探讨 [D]. 长春: 吉林大学, 2020.
- [31] 严尔福, 徐莲, 刘文娟, 等. 新型抗癌药物分子靶标 STAT3 的研究进展 [J]. 现代生物医学进展, 2014, 14(7): 1388-1391.
- [32] Xu Z, Xue T, Zhang Z, *et al.* Role of signal transducer and activator of transcription-3 in up-regulation of GFAP after epilepsy [J]. *Neurochem Res*, 2011, 36(12): 2208-2215.
- [33] 逯琴, 张文敏, 赵敏. Circ_HECTD1 调节 miR-135a-5p/TP53INP1 轴对 OGD/R 诱导的海马神经元损伤的影响 [J]. 中风与神经疾病杂志, 2022, 39(6): 503-509.
- [34] 秦彦筠, 范纯新, 王建. 1-苯基 2-硫脲通过 Tp53 调控自噬活性来保护斑马鱼神经丘毛细胞 [J/OL]. 中国海洋大学学报: 自然科学版: 1-7 [2023-07-05]. <https://doi.org/10.16441/j.cnki.hdxh.20220399>.
- [35] 焦玉壮. 基于 RNA-seq 探讨 lncRNA 在癫痫患者外周血中差异表达及意义 [D]. 济南: 山东第一医科大学, 2019.
- [36] 吴琼, 汪顺贵, 郭雪峰, 等. 基于基因芯片技术研究氯化锂-匹罗卡品致痫小鼠海马组织 miRNA-187 的表达及 GO 和 KEGG 分析 [J]. 中风与神经疾病杂志, 2018, 35(6): 517-521.
- [37] 梁沛余, 马晓雨, 常秀君, 等. 基于生物信息学分析癫痫相关基因在低级别胶质瘤患者预后中的作用 [J]. 中国高原医学与生物学杂志, 2020, 41(4): 244-251.
- [38] 宋军, 马艳红, 崔颖. 血清 HIF-1 α 、GFAP 表达与脑卒中后继发性癫痫的相关性 [J]. 脑与神经疾病杂志, 2022, 30(3): 164-167.
- [39] 孙飞吉, 范仕兵, 谭云, 等. IL-17 在药物难治性颞叶外侧型癫痫中的表达 [J]. 现代免疫学, 2017, 37(3): 224-228.
- [40] 叶霖, 黄虹蜜, 吴莹, 等. 抗 NMDA 受体脑炎相关癫痫小鼠脑组织小胶质细胞及 IL-1 β 、TNF- α 表达的变化 [J]. 癫痫与神经电生理学杂志, 2022, 31(3): 129-134.

[责任编辑 高源]