

基于斑马鱼模型与中医药整合药理学平台研究天麻的抗癫痫作用及潜在机制

裴文强¹, 单毅¹, 张友刚^{1,2}, 贾献慧¹, 汪海洋¹, 王晓静¹, 田青平², 韩利文^{1*}, 姚庆强¹

1. 山东第一医科大学(山东省医学科学院)药学与制药科学学院, 山东 济南 256200

2. 山西医科大学药学院, 山西 太原 030001

摘要: **目的** 利用斑马鱼模型和中医药整合药理学平台(TCMIP), 探究天麻抗癫痫的主要活性成分及潜在的作用机制。**方法** 采用健康发育至 72 h 的 AB 系斑马鱼幼鱼为实验动物, 以氨茶碱诱导形成癫痫模型, 观察天麻对斑马鱼癫痫样行为的改善作用; 利用 TCMIP 筛选天麻抗癫痫的靶点, 构建天麻与癫痫的蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络, 绘制药材-成分-靶点-通路-疾病网络; 利用 Autodock vina 软件对活性成分和靶点进行分子对接。**结果** 天麻对氨茶碱诱导的斑马鱼的癫痫样行为发生频率具有显著改善作用($P < 0.05$)。通过 TCMIP v2.0 整合分析发现, 天麻抗癫痫的核心靶点有 25 个, 天麻素、天麻醚苷、谷甾醇、棕榈酸、西托糖苷可能是天麻抗癫痫的主要活性成分; 这些活性成分可以直接作用于相应关键靶点, 参与调节神经递质的平衡、维持神经元细胞正常电生理活动并影响酮体生成。**结论** 天麻对癫痫样症状具有明显的改善作用, 其抗癫痫的潜在机制可能与调节神经递质的平衡、神经元细胞的电生理稳态和酮体的生成有关, 为天麻的临床应用提供理论依据。

关键词: 天麻; 癫痫; 斑马鱼; 整合药理学; 天麻素; 天麻醚苷; 谷甾醇; 棕榈酸; 西托糖苷

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2021)07-2003-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.07.018

Antiepileptic effect and potential mechanism of *Gastrodiae Rhizoma* based on zebrafish model and integrated pharmacology of traditional Chinese medicine

PEI Wen-qiang¹, SHAN Yi¹, ZHANG You-gang^{1,2}, JIA Xian-hui¹, WANG Hai-yang¹, WANG Xiao-jing¹, TIAN Qing-ping², HAN Li-wen¹, YAO Qing-qiang¹

1. School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Shandong First Medical University & Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 256200, China

2. School of Pharmacy, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China

Abstract: **Objective** To explore the key components and potential mechanism of antiepileptic effect of Tianma (*Gastrodiae Rhizoma*) by using zebrafish model and TCMIP. **Methods** AB zebrafish larva that have grown healthily to 72 h are used as experimental animals. They were treated by aminophylline to establish epileptic models to observe the effect of *Gastrodiae Rhizoma* on the improvement of zebrafish's epileptic like behavior. TCMIP was used to screen the candidate anti-epilepsy targets, the protein-protein interaction network (PPI) of *Gastrodiae Rhizoma* with disease was constructed, and the network map of Chinese medicinal herbs-components-core targets-pathways-diseases was drawn. Autodock Vina software was used to dock small molecules in *Gastrodiae Rhizoma* with proteins. **Results** *Gastrodiae Rhizoma* had a protective effect on aminophylline-induced epileptic model of zebrafish ($P < 0.05$). The integrated analysis based on TCMIP v2.0 found that there were 25 core targets for anti-epilepsy of *Gastrodiae Rhizoma*, and five key pharmacodynamic compounds included gastrodin, gasteroside, sitosterol, palmitic acid and sitoglucoside might be response to the anti-epilepsy effect of *Gastrodiae Rhizoma*. These compounds could directly act on the corresponding core target proteins, participate in the balance of neurotransmitter, maintain normal electrophysiological activities of neuron cells and affect ketone bodies formation. **Conclusion** *Gastrodiae Rhizoma* could significantly improve epileptiform

收稿日期: 2020-12-17

基金项目: 山东省自然科学基金资助项目(ZR2019MH037); 山东省园区产业提升工程项目(2019YQ033); 山东第一医科大学学术提升计划(2019LJ003)

作者简介: 裴文强(1999—), 本科, 研究方向为中药网络药理学分析。Tel: 15098928987 E-mail: VPWQ101@163.com

*通信作者: 韩利文(1980—), 博士, 副研究员, 从事药物筛选及中药质量控制研究。Tel: (0531)59567223 E-mail: hanliwen08@126.com

symptoms on zebrafish model. The potential mechanism of network regulation about anti-epileptic may be related to the balance of neurotransmitters, the electrophysiological homeostasis of neuronal cells and the production of ketone bodies, which provides theoretical basis for clinical application of *Gastrodiae Rhizoma*.

Key words: *Gastrodiae Rhizoma*; epilepsy; zebrafish; integrative pharmacology; gastrodin; gastrodioside; sitosterol; palmitic acid; sitogluside

癫痫是一种由多种原因引起的复杂的神经系统疾病,常伴随运动、感觉、植物神经、意识等障碍,严重危害人类的健康。随着我国人口老龄化,老年人群中癫痫发病率呈上升趋势。难治性神经系统疾病的创新药物研发进展缓慢,现有的抗癫痫药物不良反应较大,因此,寻找新型、高效、低毒的抗癫痫药物仍然是临床迫切需要解决的问题^[1]。

天麻为兰科植物天麻 *Gastrodia elata* Bl. 的干燥块茎,主产于湖北、四川、陕西等地^[2]。《本草纲目》中记载天麻“眼黑头旋,风虚内作,非天麻不能治。天麻乃定风草,故为治风之神药”。研究发现,天麻对神经细胞损伤具有显著的保护作用,具有抗惊厥、防止癫痫大发作、镇静催眠、镇痛等作用^[3-4]。中医临床治疗癫痫的处方中,其核心药味均有天麻^[5]。但天麻抗癫痫的具体物质基础和作用机制仍有待深入挖掘。

目前用于癫痫疾病研究的模型主要为大鼠和小鼠模型,在大规模药物筛选方面具有局限性且成本较高。斑马鱼作为一种新兴的模式动物,基因组与人类同源性达到 87%。研究发现,斑马鱼中可观察到啮齿动物类似的癫痫表型,且斑马鱼产卵量高、实验周期短、成本低,可以实现高通量筛选^[6-8]。中医药整合药理学研究平台(TCMIP)作为一个专业的网络药理学工具,整合了中医药百科全书(ETCM)等优质的数据库资源,通过人工智能、网络可视化等先进的方法形成了其独特的优势,可以为研究天麻抗癫痫的潜在作用机制提供强大的数据支撑和计算辅助^[9]。本研究采用模式动物斑马鱼观察天麻对癫痫发作的保护作用,并利用 TCMIP 平台分析其潜在机制。

1 材料

1.1 动物

AB 型斑马鱼,由山东省科学院药物筛选技术重点实验室提供,饲养于斑马鱼养殖系统,温度设定为 28 ℃,pH 6.8~7.5,14 h 光照/10 h 黑暗,用丰年虫早晚饲喂 2 次。实验所用幼鱼均由健康雌雄鱼以 2:1 比例自然交配而得。

1.2 药品与试剂

天麻(批号 20191103)购自安徽六安,由山东第一医科大学(山东省医学科学院)药学与制药科学学院韩利文副研究员鉴定为兰科植物天麻 *G. elata* Bl. 的干燥块茎;氨茶碱(质量分数为 98%)、丙戊酸钠(质量分数为 98%)购自阿拉丁试剂公司;天麻素(批号 B21243,质量分数≥98%)购自源叶生物;乙腈为色谱纯,其余试剂为分析纯。

1.3 仪器

斑马鱼养殖系统(北京爱生公司);LC-30A 液相色谱系统、Shim-pack GIST C₁₈ 色谱柱(100 mm×3.0 mm, 2 μm)(日本岛津公司);SZX-16 型体视荧光显微镜(日本 Olympus 公司);SPX-300B-G 型博讯光照培养箱(上海基星生物科技有限公司)。

2 方法

2.1 天麻提取物的制备及含量测定

天麻用粉碎机粉碎,过 60 目筛,称取 10 g 天麻粉末,置于 500 mL 圆底烧瓶中,加入 100 mL 80% 乙醇,加热回流提取 2 次,每次 1 h,合并提取液,减压浓缩,真空干燥,得到天麻提取物,于 4 ℃ 保存,临用前用蒸馏水稀释至所需浓度。

按照《中国药典》2020 年版方法进行测定,以乙腈-0.05% 磷酸水溶液梯度洗脱,检测波长 220 nm,以天麻素为对照品,外标一点法计算,天麻提取物中天麻素的质量分数为 1.24%。

2.2 药液的配制

精密称定氨茶碱,溶于蒸馏水,配制成质量浓度为 10 mg/mL 的溶液;精密称定丙戊酸钠,溶于蒸馏水,配制成质量浓度为 100 mg/mL 的溶液。于 4 ℃ 保存备用,临用前用蒸馏水稀释至所需浓度。

2.3 斑马鱼实验

将正常孵化的受精后 72 h (hours post-fertilization, hpf) 斑马鱼幼鱼转移至 6 孔板中,设置模型组、丙戊酸钠(0.25 mg/mL)组和天麻提取物(0.1、1.0、10.0 mg/mL)组,每组 10 条。各给药组加入相应药物预处理 24 h 后,各组再加入氨茶碱(2 mg/mL)造模 4 h,观察斑马鱼幼鱼活动情况,

记录斑马鱼抽搐频率（1 min 内发生抽搐的次数）。

2.4 天麻活性成分和癫痫相关靶点的获取

以“天麻”为关键词，在 TCMIP v2.0 药材数据库功能模块中检索获得天麻的活性成分及靶点；以“癫痫”“癫痫痉挛”“癫痫性发作”“癫痫持续状态”为关键词在疾病相关分子库模块进行检索，获取癫痫相关的靶点。

2.5 天麻与癫痫靶点蛋白质相互作用（protein-protein interaction, PPI）网络的构建及核心靶点的筛选

通过 TCMIP v2.0 的中医药关联网络挖掘功能模块构建天麻与癫痫靶点的 PPI 网络。计算网络拓扑值，以度值、节点紧密度、节点介度的 2 倍中位数卡值，获得核心节点。将筛选到的天麻与癫痫的共同靶点作为核心靶点。度值越高，相应核心节点的重要性越高。

2.6 核心靶点基因本体（gene ontology, GO）功能和京都基因与基因组百科全书（Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG）通路富集分析

将“2.5”项下得到的核心靶点分别导入 DAVID（<https://david.ncifcrf.gov/>）和 Reactome（<https://reactome.org/>）进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析。

2.7 药材-成分-核心靶点-通路-疾病网络的构建

在中药网络调控机制挖掘结果界面中自定义关联网络可视化功能区，绘制网络图，将“2.5”项下补充的天麻与癫痫的共同靶点添加到网络图中。

2.8 天麻活性成分与抗癫痫相关靶点的分子对接

将天麻活性成分和抗癫痫相关靶点进行分子对接，运用 PubChem（<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>）找到活性成分的 3D 结构，进行能量最低处理。将从 Uniprot（<https://www.uniprot.org/>）中得到的蛋白名称输入 RCSB PDB（<https://www.rcsb.org/>）中，得到关联的蛋白质，进行纯净、加氢、加电荷等处理，运用 Autodock Vina^[10]进行分子对接。

2.9 数据分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，两组数据比较使用 SPSS 18.0 软件进行方差分析（ANOVA）。

3 结果

3.1 天麻对癫痫斑马鱼的保护作用

氨茶碱可刺激内源性肾上腺素和去甲肾上腺素的释放，可引起斑马鱼运动失调、抽搐引起的背部扭曲等癫痫症状，常用于制备斑马鱼癫痫模型^[11]，而加入丙戊酸钠后，斑马鱼癫痫样症状明显减轻^[12]。如图 1 所示，1.0、10.0 mg/mL 天麻提取物能够显著

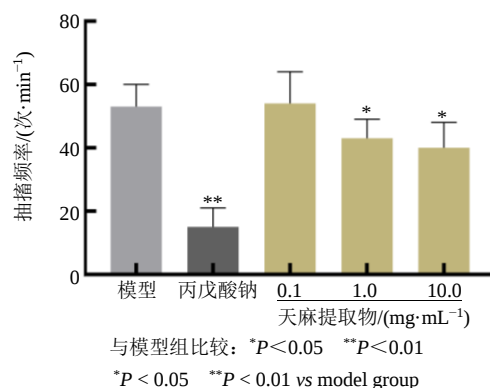


图 1 天麻对癫痫斑马鱼的保护作用 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 1 Protective effect of *Gastrodiae Rhizoma* on epileptic zebrafish ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

抑制斑马鱼幼鱼的癫痫样抽搐 ($P < 0.05$)，呈剂量相关性，表明天麻对斑马鱼的癫痫样发作具有一定的保护作用。

3.2 天麻活性成分及癫痫相关靶点的获取

如表 1 所示，共收集到天麻的 21 个活性成分，分别为天麻素、天麻醚苷、谷甾醇、香草醛、琥珀酸、西托糖苷等，其中 7 个活性成分未检索到候选靶点，故未列出；共有 233 个候选靶点。通过疾病相关分子库共获得癫痫疾病描述的相关靶点共 97 个，其中“癫痫”20 个、“癫痫性发作”1 个、“癫痫痉挛”7 个、“癫痫持续状态”69 个。

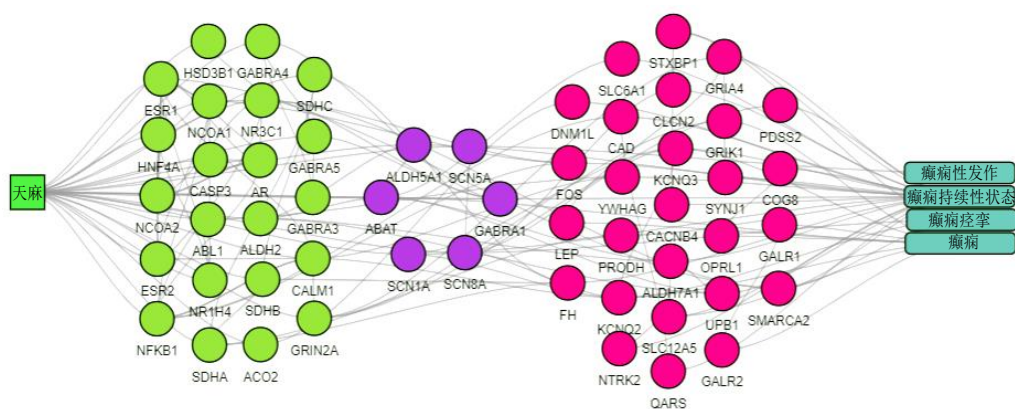
3.3 天麻与癫痫靶点 PPI 网络的构建

如图 2 所示，天麻与癫痫靶点的 PPI 网络有 55 个节点，度值越高，其在网络中的作用越高。度值排名前 10 的节点分别为核受体辅激活因子 1 (nuclear receptor coactivator 1, NCOA1)、雌激素受体 1 (estrogen receptor 1, ESR1)、糖皮质激素受体 (nuclear receptor subfamily 3 group C member 1,

表 1 天麻中的活性成分

Table 1 Active ingredients of *Gastrodiae Rhizoma*

CAS 号	名称	分子式
62499-27-8	天麻素	C ₁₄ H ₁₅ NO ₃
77162-64-2	天麻醚苷	C ₂₀ H ₂₄ O ₈
83-47-6	谷甾醇	C ₂₉ H ₅₀ O
474-58-8	西托糖苷	C ₃₅ H ₆₀ O ₆
121-33-5	香草醛	C ₈ H ₈ O ₃
1957-10-3	棕榈酸	C ₁₆ H ₃₂ O ₂
57-50-1	蔗糖	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁
110-15-6	琥珀酸	C ₄ H ₆ O ₄
123-08-0	对羟基苯甲醛	C ₇ H ₆ O ₂
77-92-9	柠檬酸	C ₆ H ₈ O ₇
76890-93-2	双-(4-羟苄基)-醚	C ₁₄ H ₁₄ O ₃
139-85-5	原儿茶醛	C ₇ H ₆ O ₃
620-92-8	4,4'-亚甲基二苯酚	C ₁₃ H ₁₂ O ₂
62499-28-9	巴利森苷 A	C ₄₅ H ₅₆ O ₂₅



绿色为中药的靶点；紫色代表疾病与中药的共同靶点；缤纷红色代表疾病靶点

Green is the target of Chinese medicine, purple is the common target of disease and Chinese medicine, and colorful red is the target of disease

图 2 天麻与癫痫靶点的 PPI 网络

Fig. 2 PPI network between *Gastrodiae Rhizoma* and epilepsy targets

NR3C1)、核转录因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF κ B1)、核受体辅激活因子 2 (nuclear receptor coactivator 2, NCOA2)、钙调蛋白 1 (calmodulin 1, CALM1)、雌激素受体 (androgen receptor, AR)、雌激素受体 2 (estrogen receptor 2, ESR2)、N-甲基-D-天冬氨酸受体 2A (N-methyl-D-aspartate receptor 2A subunit, GRIN2A)、电压门控钠通道- α 亚型 (mus musculus voltage-gated sodium channel type 8 α , SCN8A)。此外, 还有 5 个节点为天麻与癫痫的共同靶点, 分别为 γ -氨基丁酸 A 受体 (γ -aminobutyric acid, GABRA1)、4-氨基丁酸转氨酶 (4-aminobutyrate aminotransferase, ABAT)、醛脱氢酶 5 家族 A1 (aldehyde dehydrogenase 5 family, member A1, ALDH5A1)、电压门控钠通道-1 α 亚型 (mus musculus voltage-gated sodium channel type 1 α , SCN1A), 提示这些靶点为天麻抗癫痫的关键靶点。

3.4 核心靶点 GO 和 KEGG 富集分析

将核心靶点导入 DAVID 进行 GO 分析, 得到 $P < 0.05$ 的生物学功能条目共 72 条, 其中生物过程 (biological process, BP)、细胞组分 (cell component, CC) 和分子功能 (molecular function, MF) 各 39、13、19 条, 按照重要性选择前 5 条分别进行可视化分析, 如图 3 所示。将核心靶点导入 Reactome Pathway 进行 KEGG 分析, 共得到 105 条通路, 将前 30 条进行可视化操作, 如图 4 所示, 涉及核受体转录过程 (nuclear receptor transcription pathway)、基因转录途径 (generic transcription pathway)、化学突触传递 (transmission across chemical synapses)、 β 细胞发育的调控 (regulation of β -cell development)、L1 和锚蛋白类的相互作用 (interaction between L1 and ankyrins)、细胞内受体的泛素化修饰 (SUMOylation of intracellular

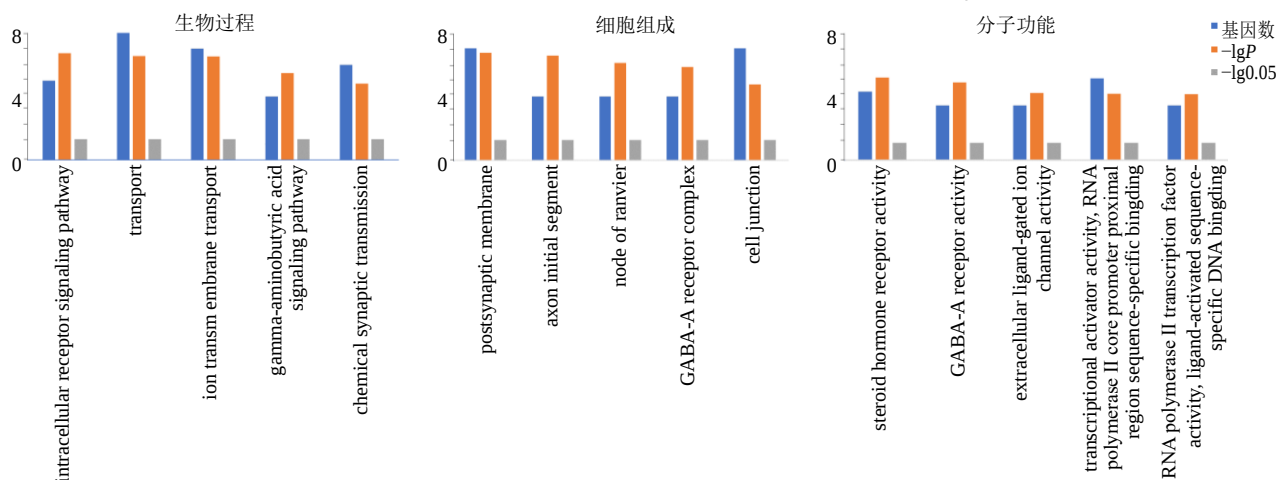


图 3 天麻抗癫痫核心靶点的 GO 分析

Fig. 3 GO analysis of core targets of anti-epilepsy in *Gastrodiae Rhizoma*

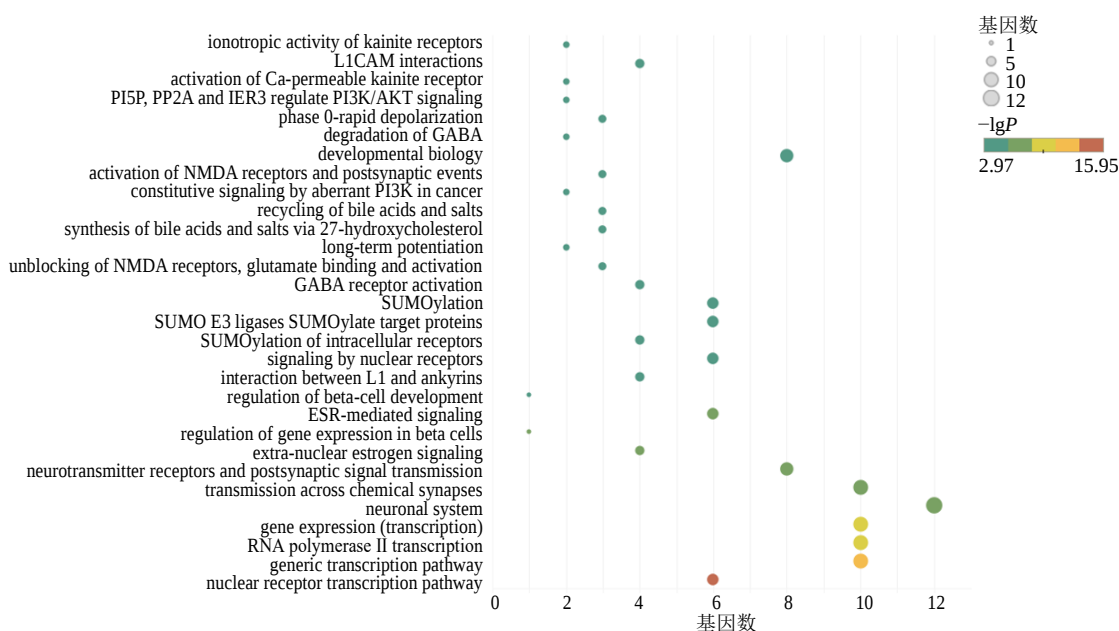


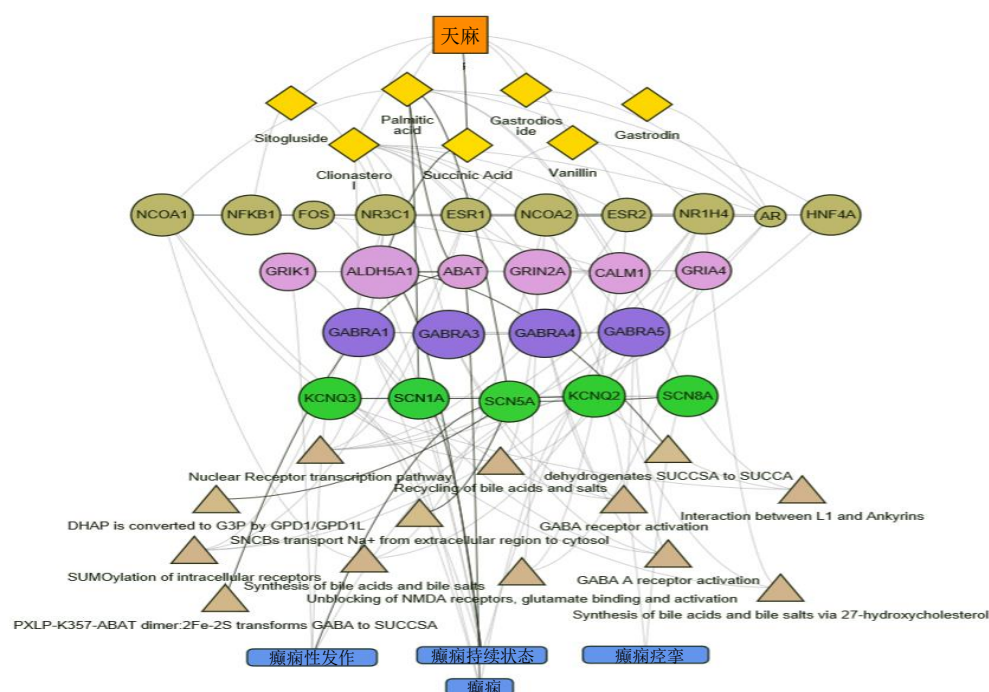
图 4 天麻抗癫痫核心靶点的 KEGG 分析

Fig. 4 KEGG analysis of core targets of anti-epilepsy in *Gastrodiae Rhizoma*

receptors)、 γ -氨基丁酸受体的激活 (GABA receptor activation)、门冬氨酸受体的释放及谷氨酸的结合与活化 (unblocking of NMDA receptors, glutamate binding and activation)、27-羟基胆固醇合成胆汁酸和胆盐 (synthesis of bile acids and bile salts via 27-hydroxycholesterol) 等通路。

3.5 药材-成分-核心靶点-通路-疾病网络的构建

如图 5 所示, 天麻的 7 种成分 (天麻醚苷、天麻、谷甾醇、香草醛、棕榈酸、西托糖苷、琥珀酸) 主要通过作用于 NCOA1、NR3C1、ESR1、GABRA1 等靶点以及胆汁酸、胆汁酸盐的合成和循环、 γ -氨基丁酸受体的激活、门冬氨酸受体的释放、细胞内



“□”为药材, “◇”为活性成分, “○”为核心靶点, “△”为通路, “□”为疾病
“□” are drugs, “◇” are active components, “○” are targets, “△” are pathways, “□” are diseases

图 5 天麻抗癫痫的药材-成分-核心靶点-通路网络

Fig. 5 Network of Chinese medicinal herbs-components-core targets-pathways of anti-epilepsy of *Gastrodiae Rhizoma*

受体的泛素化修饰、核受体传导、琥珀酸半醛脱氢等通路,从而发挥抗癫痫作用。

3.6 分子对接结果

在 PubChem 中寻找“药材-成分-核心靶点-通路”网络中活性成分对应的小分子,与核心靶点进行分子对接,小分子与靶点蛋白的结合能越低,越可能发挥更大的作用。如表 2 所示,谷甾醇与电压门控钾离子通道 KCNQ2 及 NCOA1、棕榈酸与 CALM1、西托糖苷与 KCNQ2 及 NCOA2、天麻醚苷与 KCNQ2、CALM1、NCOA2、NCOA1、GRIN2A,天麻素与

CALM1、NCOA2、GRIN2A 均具有低于原配体的结合能。天麻素、天麻醚苷与 SCN5A 和 ALDH5A1 具有较低且相近的结合能,提示这些活性分子可能通过作用于相关靶点,从而发挥抗癫痫作用。结合能较低的活性分子和靶点蛋白对接结果如图 6 所示,活性分子都能很好地嵌入到靶点蛋白的活性口袋中。

4 讨论

大脑神经元的异常放电是癫痫的典型病因,与神经元突触的兴奋性和抑制性递质的平衡相关。生理状态下,神经元突触兴奋与抑制性递质平衡,神

表 2 分子对接结果

Table 2 Molecular docking results

靶点蛋白	结合能/(kJ·mol ⁻¹)							
	谷甾醇	香草醛	棕榈酸	西托糖苷	天麻醚苷	天麻素	琥珀酸	原配体
KCNQ2	-40.546	-24.244	-25.498	-41.382	-35.948	-29.260	-19.646	-32.186
GABRA5	-34.694	-24.244	-22.154	-36.366	-31.350	-27.170	-17.974	-38.875
GRIK1	-30.096	-27.170	-24.662	-28.006	-31.768	-26.752	-24.662	-32.604
NR1H4	-40.546	-26.334	-25.498	-36.366	-37.202	-33.440	-19.646	-45.980
CALM1	-16.302	-22.990	-25.916	40.546	-32.604	-27.170	-16.720	-25.498
GABRA1	-33.440	-22.990	-24.244	-24.662	-29.678	-30.096	-17.556	-34.276
ESR2	-27.170	-23.408	-25.916	-28.842	-30.096	-30.514	-19.228	-45.144
NCOA2	-43.054	-25.916	-26.334	-31.768	-42.636	-34.276	-21.318	-26.752
NCOA1	-31.350	-26.334	-28.424	-33.022	-38.456	-28.424	-19.228	-35.530
NR3C1	-38.456	-23.408	-24.244	-18.392	-37.620	-30.514	-17.974	-51.414
GRIN2A	-28.842	-25.916	-27.588	-25.916	-41.800	-35.530	-18.810	-33.858
AR	2.090	-24.662	-26.752	33.022	-26.334	-31.768	-18.810	-38.874
SCN5A	-22.572	-22.154	-20.064	-24.244	-25.498	-24.244	-17.974	—
ALDH5A1	-35.112	-22.990	-23.826	10.032	-37.202	-34.276	-19.228	—

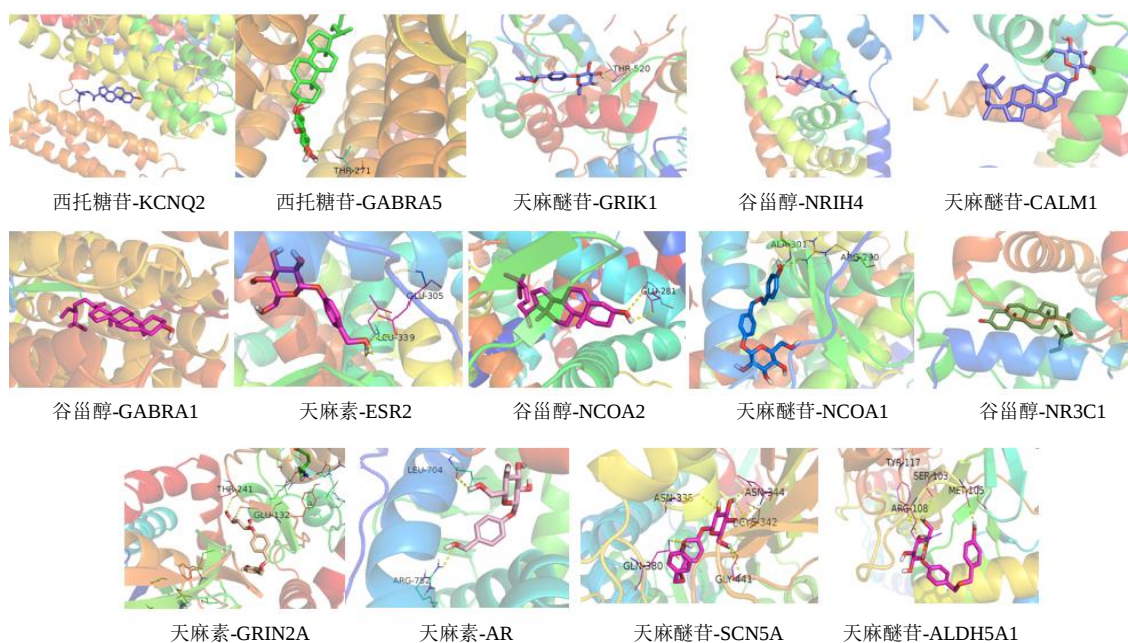


图 6 天麻主要活性成分与靶点的分子对接

Fig. 6 Molecular docking between main active components of *Gastrodiae Rhizoma* and targets

神经元膜保持稳定状态,当兴奋性递质过多或抑制性递质过少时,膜的稳定性发生变化,产生异常放电。GABA 和谷氨酸分别为最常见的抑制性和兴奋性神经递质^[13]。GABRA 基因变异会导致早发性癫痫和智力障碍^[14]; GABRA 基因变异能够加速电流变化、降低门控、减慢神经元的激活并产生更小的电流振幅,从而改变突触受体介导的抑制性突触后膜电流的时间进程,促进超兴奋性,产生癫痫或加剧癫痫^[15],表明神经元抑制性递质受损会导致癫痫。谷氨酸受体在突触可塑性、兴奋性神经递质传递和神经发育中发挥重要作用,当谷氨酸门控通道 Ca^{2+} 通透性发生改变时, mRNA 前体编辑的程度可能影响癫痫发作^[16]。本研究结果显示,在 PPI 和“药材-成分-核心靶点-通路”网络图中, GABRA1、GABRA3、GABRA4、GABRA5、CALM1、GRIK1、GR1A4、ALDH5A1、ABAT 均与抑制性神经递质和兴奋性神经递质的调节有关。GR1A4 会通过天冬氨酸的释放^[17-18]、谷氨酸的结合与活化,从而编码谷氨酸受体亚基的表达,增加癫痫发病率^[19]。Cash 等^[20]通过对 ALDH5A1^{-/-}小鼠进行研究,证实 GR1A4 是一个编码线粒体 NAD^+ 依赖的琥珀酸半醛脱氢酶的基因,可催化 GABA 分流途径;当 GR1A4 缺乏时,编码 GABAA 受体的模板数量减少, GABA 保持未成熟状态,发挥兴奋性作用^[21]。ABAT 是 GABA 分解的关键酶,当 ABAT 表达受到抑制时, GABA 水平升高,对癫痫具有一定的保护作用^[22]。本研究发现,天麻素和谷甾醇可能通过直接作用于 GABRA、GRIA、ABAT、ALDH5A 等靶点,参与 GABA 和谷氨酸的代谢调节,从而发挥抗癫痫作用。此外,天麻素也可能通过作用于 CALM1 参与神经元的修复,从而发挥抗癫痫作用^[23]。

天麻素可能通过作用于 SCN 和 KCN 相关受体保证离子转运的正常进行,维持膜的稳定性,从而发挥抗癫痫作用。癫痫异常电生理活动的基础是离子的转运,调控相关离子的转运对癫痫的发生发展有一定的影响。钠离子通道可启动电神经元动作电位,编码钠离子通道 α 亚基的 5 种基因突变可导致癫痫^[24],钠离子通道阻滞剂可以用来治疗局灶性癫痫^[25]。钾离子通道调节大脑中神经元和非神经元的电活动,是癫痫发作易感性的重要决定因素^[17],KCNQ2 可以调节参与中枢神经元 M 电流的过程^[26],KCNQ2 基因突变会导致良性家族性新生儿惊厥^[27]。本研究发现,天麻素可能通过间接作用于 SCN8A,

抑制神经细胞自发性和重复性放电,维持神经元正常的生理活动^[28-29]。

天麻素、天麻醚苷、谷甾醇、西托糖苷可能通过作用于 NCOA1 和 NCOA2 参与胆汁酸和胆汁酸盐的合成及循环,从而参加体内酮的代谢过程,发挥抗癫痫作用。生酮、高脂、低糖饮食对癫痫具有治疗作用^[30-31]。对比正常小鼠和基因工程小鼠的大脑切片发现,酮体可降低黑质网状部 GABA 能神经元的自发放电;酮体可以通过调节囊泡性谷氨酸转运体来抑制突触前谷氨酸的释放,从而抑制神经元兴奋性和癫痫发作^[32]。在脂肪酸水平增加并超过最大三羧酸循环功能的情况下,如在禁食或生酮治疗期间,乙酰辅酶 A 转向酮生成^[33]。胆汁酸在动物体内可以乳化脂肪,扩大与脂肪酶的接触面积,促进脂肪水解生成脂肪酸等代谢产物,从而间接提高酮体的生成^[34]。

综上所述,本研究通过斑马鱼模型快速评价了天麻的抗癫痫作用,利用 TCMIP 平台探究了天麻抗癫痫的潜在作用机制,发现天麻中的天麻素、天麻醚苷、谷甾醇、棕榈酸、西托糖苷可能通过作用于 NCOA1、NR3C1、ESR1、GABRA1 等 25 个核心靶点,调节神经递质的抑制与兴奋的平衡、维持神经元细胞的正常电生理活动并参与酮体生成,从而发挥抗癫痫作用,体现了中药治疗疾病整体性、多靶点、网络调节的特点,并为癫痫的防治提供了理论依据。

志谢: 山东省科学院药物筛选技术重点实验室提供斑马鱼支持。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Thijs R D, Surges R, O'Brien T J, et al. Epilepsy in adults [J]. *Lancet*, 2019, 393(10172): 689-701.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 44.
- [3] 田春梅. 天麻的药理学研究进展 [J]. *哈尔滨医药*, 2010, 30(4): 71-72.
- [4] 胡鹏程, 王进, 李墨香, 等. 天麻改善小鼠睡眠作用及其机制研究 [J]. *中草药*, 2019, 50(13): 3140-3146.
- [5] 袁丹. 汪受传治疗小儿癫痫用药规律分析 [J]. *中医杂志*, 2015, 56(14): 1205-1207.
- [6] Baraban S C, Taylor M R, Castro P A, et al. Pentylentetrazole induced changes in zebrafish behavior, neural activity and c-fos expression [J]. *Neuroscience*, 2005, 131(3): 759-768.
- [7] Gerhard G S, Cheng K C. A call to fins! Zebrafish as a gerontological model [J]. *Aging Cell*, 2002, 1(2):

- 104-111.
- [8] Jin M, He Q X, Zhang S S, *et al.* Gastrodin suppresses pentylenetetrazole-induced seizures progression by modulating oxidative stress in zebrafish [J]. *Neurochem Res*, 2018, 43(4): 904-917.
 - [9] Xu H Y, Zhang Y Q, Liu Z M, *et al.* ETCM: An encyclopaedia of traditional Chinese medicine [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(D1): D976-D982.
 - [10] Valdés-Tresanco M S, Valdés-Tresanco M E, Valiente P A, *et al.* AMDock: A versatile graphical tool for assisting molecular docking with autodock vina and autodock4 [J]. *Biol Direct*, 2020, 15(1): 1-12.
 - [11] 胡雅琼, 余磊, 李银保, 等. 氨茶碱诱导斑马鱼幼鱼产生运动失调 [J]. 基因组学与应用生物学, 2017, 36(8): 3421-3424.
 - [12] 郑仰民, 张靖溥, 唐胜, 等. 斑马鱼幼体癫痫模型的建立及应用 [J]. 药学报, 2016, 51(4): 580-587.
 - [13] Zorumski C F, Paul S M, Izumi Y, *et al.* Neurosteroids, stress and depression: Potential therapeutic opportunities [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2013, 37(1): 109-122.
 - [14] Guazzi M, Striano P. GABA strikes down again in epilepsy [J]. *Ann Transl Med*, 2019, 7(3): 57.
 - [15] Hernandez C C, Klassen T L, Jackson L G, *et al.* Deleterious rare variants reveal risk for loss of GABAA receptor function in patients with genetic epilepsy and in the general population [J]. *PLoS One*, 2016, 11(9): e0162883.
 - [16] Sander T, Hildmann T, Kretz R, *et al.* Allelic association of juvenile absence epilepsy with a GluR5 kainate receptor gene (GRIK1) polymorphism [J]. *Am J Med Genet*, 1997, 74(4): 416-421.
 - [17] Chu H W, Sun P, Yin J H, *et al.* Integrated network analysis reveals potentially novel molecular mechanisms and therapeutic targets of refractory epilepsies [J]. *PLoS One*, 2017, 12(4): e0174964.
 - [18] Gao K, Tankovic A, Zhang Y, *et al.* A *de novo* loss-of-function GRIN2A mutation associated with childhood focal epilepsy and acquired epileptic aphasia [J]. *PLoS One*, 2017, 12(2): e0170818.
 - [19] Pfisterer U, Petukhov V, Demharter S, *et al.* Identification of epilepsy-associated neuronal subtypes and gene expression underlying epileptogenesis [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 5038.
 - [20] Cash C D, Maitre M, Mandel P. Purification from human brain and some properties of two NADPH-linked aldehyde reductases which reduce succinic semialdehyde to 4-hydroxybutyrate [J]. *J Neurochem*, 1979, 33(6): 1169-1175.
 - [21] Vogel K R, Ainslie G R, Walters D C, *et al.* Succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency, a disorder of GABA metabolism: An update on pharmacological and enzyme-replacement therapeutic strategies [J]. *J Inherit Metab Dis*, 2018, 41(4): 699-708.
 - [22] Besse A, Wu P, Bruni F, *et al.* The GABA transaminase, ABAT, is essential for mitochondrial nucleoside metabolism [J]. *Cell Metab*, 2015, 21(3): 417-427.
 - [23] Miyamoto E. Molecular mechanism of neuronal plasticity: Induction and maintenance of long-term potentiation in the hippocampus [J]. *J Pharmacol Sci*, 2006, 100(5): 433-442.
 - [24] Smith M. MRNA transcription, translation, and defects in developmental cognitive and behavioral disorders [J]. *Front Mol Biosci*, 2020, 7: 577710.
 - [25] Krauss G L, Klein P, Brandt C, *et al.* Safety and efficacy of adjunctive cenobamate (YKP3089) in patients with uncontrolled focal seizures: A multicentre, double-blind, randomised, placebo-controlled, dose-response trial [J]. *Lancet Neurol*, 2020, 19(1): 38-48.
 - [26] Wang H S, Pan Z, Shi W, *et al.* KCNQ2 and KCNQ3 potassium channel subunits: Molecular correlates of the M-channel [J]. *Science*, 1998, 282(5395): 1890-1893.
 - [27] Cooper E C, Harrington E, Jan Y N, *et al.* M channel KCNQ2 subunits are localized to key sites for control of neuronal network oscillations and synchronization in mouse brain [J]. *J Neurosci*, 2001, 21(24): 9529-9540.
 - [28] Menezes L F S, Sabiá Júnior E F, Tibery D V, *et al.* Epilepsy-related voltage-gated sodium channelopathies: A review [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 1276.
 - [29] Rubinstein M, Westenbroek R E, Yu F H, *et al.* Genetic background modulates impaired excitability of inhibitory neurons in a mouse model of Dravet syndrome [J]. *Neurobiol Dis*, 2015, 73: 106-117.
 - [30] Kobow K, Auvin S, Jensen F, *et al.* Finding a better drug for epilepsy: Antiepileptogenesis targets [J]. *Epilepsia*, 2012, 53(11): 1868-1876.
 - [31] Mak S C, Chi C S, Wan C J. Clinical experience of ketogenic diet on children with refractory epilepsy [J]. *Acta Paediatr Taiwan*, 1999, 40(2): 97-100.
 - [32] Kawamura M, Ruskin D N, Masino S A. Metabolic autocrine regulation of neurons involves cooperation among pannexin hemichannels, adenosine receptors, and KATP channels [J]. *J Neurosci*, 2010, 30(11): 3886-3895.
 - [33] 时乐, 龙建纲, 刘健康. 酮体代谢与阿尔茨海默病 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2015, 42(4): 323-328.
 - [34] Hu M M, He W R, Gao P, *et al.* Virus-induced accumulation of intracellular bile acids activates the TGR5- β -arrestin-SRC axis to enable innate antiviral immunity [J]. *Cell Res*, 2019, 29(3): 193-205.

[责任编辑 李亚楠]