

基于网络药理学、分子对接与实验验证探究钩藤治疗热性惊厥的作用机制

崔晓燕¹, 郑晓明¹, 郭树垚², 李天祥², 武 薇², 李姿柔², 熊 辉³, 李 娜^{2,4}, 于永洲^{2,4*}

1. 河北省药品医疗器械检验研究院, 河北 石家庄 050000

2. 承德医学院基础医学院, 河北 承德 067000

3. 河北省中药研究与重点开发实验室, 河北 承德 067000

4. 河北省神经损伤与修复重点实验室, 河北 承德 067000

摘要: 目的 通过网络药理学与分子对接技术探究钩藤 *Uncaria rhynchophylla* 治疗热性惊厥的作用机制, 并进行实验验证。方法 通过 TCMSP 与 BATMAN-TCM 数据库检索钩藤活性成分及相关作用靶点, 用 TCMSP、PubChem 数据库和 SwissADME 平台对活性成分进行筛选; 通过 GeneCards 数据库和 OMIM 数据库提取热性惊厥疾病靶点, 经 Uniprot 数据库进行蛋白-基因 symbol 转换; 药物靶点与疾病靶点取交集绘制 Venn 图, 通过 STRING 数据库绘制蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络, 使用 Cytoscape 3.7.2 软件构建“中药-活性成分-关键靶点-疾病”网络, 采用 DAVID v6.8 在线分析平台对关键靶点进行基因本体 (gene ontology, GO) 功能及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, 利用 Cytoscape 3.7.2 软件将富集分析结果可视化并将分析所得关键化合物及靶点进行分子对接。通过免疫组化、Western blotting 及脑片膜片钳技术对钩藤的作用机制进行验证。**结果** 得到钩藤活性成分 29 个, 活性成分对应靶点 297 个, 活性成分靶点与疾病靶点取交集得到关键靶点 81 个。KEGG 通路富集分析结果显示, 钩藤治疗热性惊厥主要作用于神经元配体-受体相互作用、尼古丁成瘾、环磷酸腺苷信号通路。GO 功能富集分析结果显示, 尼古丁反应、质膜和细胞外配体门控离子通道活性显著性最大。免疫组化及 Western blotting 结果显示, 钩藤显著抑制热性惊厥模型鼠脑组织中 *N*-甲基-*D*-天冬氨酸受体 2A (*N*-methyl-*D*-aspartic acid receptor 2A, NMDAR2A)、*N*-甲基-*D*-天冬氨酸受体 2B (*N*-methyl-*D*-aspartic acid receptor 2B, NMDAR2B) 的表达 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。脑片膜片钳实验结果显示, 钩藤对海马 CA1 区锥体神经元 NMDA 受体诱发兴奋性突触后电流 (NMDA receptor evoked excitatory postsynaptic currents, eEPSC_{NMDA}) 具有抑制作用。**结论** 通过网络药理学及分子对接技术发现了钩藤治疗热性惊厥的活性成分及作用靶点, 通过免疫组化、Western blotting 及膜片钳技术证实了钩藤对 NMDAR 的抑制作用, 为进一步研究钩藤治疗热性惊厥的作用机制、药物研发等提供理论基础。

关键词: 钩藤; 热性惊厥; 网络药理学; 分子对接; 生物碱; 钩藤碱; 异钩藤碱; 毛钩藤碱; *N*-甲基-*D*-天冬氨酸受体

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)15-5154-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.15.015

Mechanism of *Uncaria rhynchophylla* in treatment of febrile seizures based on network pharmacology, molecular docking and experimental verification

CUI Xiaoyan¹, ZHENG Xiaoming¹, GUO Shuyao², LI Tianxiang², WU Wei², LI Zirou², XIONG Hui³, LI Na^{2,4}, YU Yongzhou^{2,4}

1. Hebei Institute for Drug and Medical Device Control, Shijiazhuang 050000, China

2. School of Basic Medicine, Chengde Medical College, Chengde 067000, China

3. Hebei Key Laboratory of Study and Exploitation of Chinese Medicine, Chengde 067000, China

4. Hebei Key Laboratory of Nerve Injury and Repair, Chengde 067000, China

Abstract: Objective To explore the mechanism of *Uncaria rhynchophylla* (UR) in treatment of febrile seizures by network pharmacology, molecular docking technology and experimental verification and experimental verification. **Methods** The active

收稿日期: 2024-04-25

基金项目: 河北省科技厅资助项目 (H2022406026, H2022329001); 承德医学院高层次人才科研启动基金 (202106); 河北省神经损伤与修复重点实验室开放课题 (NJKF202103); 河北省大学生创新创业训练计划项目 (2023074, 2024004, 2024014)

作者简介: 崔晓燕 (1979—), 博士, 正高级工程师, 研究方向为中药药效物质基础与神经药理。E-mail: cuixyhb@163.com

*通信作者: 于永洲 (1977—), 博士, 副主任药师, 研究方向为神经药理。E-mail: 541454096@qq.com

ingredients and related targets of UR were searched from TCMSP and BATMAN-TCM database, and the active ingredients were screened by TCMSP database, PubChem database and SwissADME platform; The disease targets of febrile seizures were extracted from GeneCards and OMIM database, the protein-gene symbol conversion was performed through Uniprot database; The Venn diagram was drawn by the intersection of drug targets and disease targets, protein-protein interaction (PPI) network was drawn by STRING database, “traditional Chinese medicine-active ingredient-key target-disease” network was constructed by Cytoscape 3.7.2 software. Gene ontology (GO) function and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment analysis on key targets were performed by DAVID v6.8 online analysis platform. The enrichment analysis results were visualized by Cytoscape 3.7.2 software. The key compounds and targets obtained from analysis were performed molecular docking. Immunohistochemistry, Western blotting and brain patch clamp techniques were used to verify the mechanism of UR. **Results** A total of 29 active ingredients of UR were obtained, with 297 corresponding targets. The intersection of active ingredient targets and disease targets resulted in 81 key targets. The KEGG pathway enrichment analysis results showed that UR mainly acted on neuronal ligand-receptor interaction, nicotine addiction and cyclic adenosine monophosphate signaling pathway in the treatment of febrile seizures. The GO functional enrichment analysis results showed that nicotine response, plasma membrane and extracellular ligand gated ion channel activity were most significant. Immunohistochemical and Western blotting results showed that UR significantly inhibited the expressions of *N*-methyl-*D*-aspartate receptor 2A (NMDAR2A) and *N*-methyl-*D*-aspartate receptor 2B (NMDAR2B) in brain tissue of neonatal rats with febrile seizures ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). The results of brain patch clamp experiment showed that UR had an inhibitory effect on NMDA receptor induced excitatory postsynaptic currents (eEPSC_{NMDA}) in hippocampal CA1 pyramidal neurons. **Conclusion** The active ingredients and targets of UR in the treatment of febrile convulsions were discovered through network pharmacology and molecular docking technology. The inhibitory effect of UR on NMDAR was confirmed through immunohistochemistry, Western blotting and patch clamp technology. This study provides a theoretical basis for further research on mechanism and drug development of UR in the treatment of febrile seizures.

Key words: *Uncaria rhynchophylla* (Miq.) Miq. ex Havil.; febrile seizures; network pharmacology; molecular docking; alkaloid; rhynchophylline; isorhynchophylline; hirsutine; *N*-methyl-*D*-aspartic acid receptor

热性惊厥是儿科常见急症，是与发热有关的非颅内感染所导致的肢体节律性运动，又称“抽搐”，俗名“抽风”或“惊风”，占小儿人群的 5%~6%，其发生率为 4%~10%，多发生于 0.5~5.0 岁的小儿中^[1]。当小儿机体温度升高时，可引起抽搐，若不及时控制可能会造成脑组织损伤，导致智力低下、癫痫等严重的后遗症，严重影响小儿的生长发育和正常生活^[2]。

中医药治疗惊厥及癫痫已有 2 000 多年历史，热性惊厥属于中医学“急惊风”范畴，治则多以清热平肝、息风止痉为法^[3]。钩藤是息风止痉的良药，其长于清肝热而息肝风，较宜于热性生风之抽搐者，尤其适宜于小儿高热惊风抽搐之证。中医临床上，在热性惊厥的预防及治疗中，以钩藤为主的单方及复方占了大部分，但目前对钩藤治疗热性惊厥的机制尚不明确^[4-5]。故本研究通过网络药理学与分子对接技术，对钩藤治疗热性惊厥进行系统性研究，探究其潜在活性成分及作用机制，并通过免疫组化、Western blotting 及脑片膜片钳技术对其作用机制进行验证，为深入研究钩藤抗热性惊厥的作用机制及临床应用提供实验数据。

1 材料

1.1 动物

SPF 级 SD 大鼠乳鼠 30 只，体质量 28~40 g，SD 大鼠孕鼠购自北京维通利华实验动物有限公司，生产单位许可证号 SCXK（京）2021-0006，动物质量合格证号 No.110011231107691518。动物实验经承德医学院动物伦理委员会批准（批准号 CDMULAC-20211109-026）。

1.2 药材

钩藤（批号 355210902）购自安国京龙康药业有限公司，由河北省药品医疗器械检验研究院中药室段吉平主任药师鉴定为茜草科植物钩藤 *Uncaria rhynchophylla* (Miq.) Miq. ex Havil.。

1.3 药品与试剂

N-甲基-*D*-天冬氨酸受体 2A（*N*-methyl-*D*-aspartic acid receptor 2A，NMDAR2A）抗体（批号 DF7955）、*N*-甲基-*D*-天冬氨酸受体 2B（*N*-methyl-*D*-aspartic acid receptor 2B，NMDAR2B）抗体（批号 AF6426）购自 Affinity 公司，用于免疫组化实验；通用二步法试剂盒（批号 PV-9000）、DAB 显色试剂盒（批号 ZLI-9017）购自北京中杉金桥生物技术

有限公司; PBS 缓冲液(批号 No.P1010)、BCA 蛋白定量试剂盒(批号 PC0020)、RIPA 裂解液(批号 R0010)、脱脂奶粉(批号 3230609001)购自北京索莱宝科技有限公司; 柠檬酸缓冲液(批号 MVS-0066)购自福州迈新试剂公司; Tris-EDTA 缓冲液(批号 R21379)购自 Biosharp 公司; NMDAR2A 抗体(批号 00130155)购自美国 Proteintech 公司; NMDAR2B 抗体(批号 55n9650)购自江苏亲科生物研究中心有限公司; β -actin 抗体(批号 66009)购自武汉三鹰生物技术有限公司; HRP 标记的山羊抗兔二抗(批号 AS014)购自英国 Abcam 公司; HRP 标记的山羊抗小鼠二抗(批号 AS098)购自武汉爱博泰克生物技术有限公司; 蔗糖(批号 WXBD9010V)、 CsCH_3SO_3 (批号 C1426)、 CsCl (批号 289329)、 KCl (批号 WXBC7692V)、 NaCl (批号 WXBD8316V)、葡萄糖酸钾(批号 P1847)、Spermin- C_{14} (批号 BCCH2576)、 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (批号 WXBD5515V)、HEPES(批号 WXBD7369V)、 Na_2ATP (批号 A6419)、 NaOH (批号 72068)、 CaCl_2 (批号 WXBD7367V)、葡萄糖(批号 WXBD7093V)购自美国 Sigma 公司; CsOH (批号 C14558350)购自上海麦克林生化科技有限公司; EGTA(批号 A0427009)、 NaHCO_3 (批号 10230472)、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (批号 A0429554)购自美国赛默飞公司; Na_3GTP (批号 105068)购自北京华迈科生物技术有限公司; QX-314 chloride(批号 A13760)、 α -氨基-3-羟基-5-甲基-4-异恶唑丙酸(α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid, AMPA)受体阻断剂 NBQX(批号 A13109)、 γ -氨基丁酸 A 型受体(γ -aminobutyric acid type A receptor, GABAA)阻断剂 PTX(批号 A14004)购自南京百鑫德诺生物科技有限公司; 钠通道阻断剂河豚毒素(tetrodotoxin, TTX, 批号 201206)购自泰州市康特生物工程有限公司。

1.4 仪器

ASP200S 型高级组织脱水机、1200S 型振动切片仪、EG1150C 型自动组织包埋机、RM2255 型石蜡切片机(德国徕卡公司); Panoramic Midi 型扫描仪(山东斯瑞缔医疗科技有限公司); Tano 6100 型化学发光仪(上海天能公司); ELX808TM 型酶标仪(美国博腾公司); D3024R 型台式高速冷冻离心机、SK-R807-E 型混匀摇床、MX-TB-Pro 型滚轴混匀仪(大龙兴创公司); DYY-5D 型电泳仪电源(北

京六一生物科技有限公司); Multiclamp 700B 型膜片钳放大器、Digidata 1550B 型数模转换器(美国 Molecular Device 公司); BX51W1 型正置红外微分干涉显微镜、Bx53 型正置生物显微镜(日本 Olympus 公司); ISO-Flex 型隔离器(以色列 A.M.P.I. 公司); 30205 型同心钨刺激电极(美国 FHC 公司); P-1000 型拉制仪(美国 Sutter 公司)。

2 方法

2.1 网络药理学分析^[6]

2.1.1 钩藤活性成分和靶点筛选 通过 TCMSP 数据库(<https://tcmsp.w.com/tcmsp.php>)、BATMAN-TCM 数据库(<http://bionet.ncpsb.org.cn/batman-tcm>)、PubChem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)、SwissADME 平台(<http://www.swissadme.ch/index.php>)获得钩藤活性成分并筛选作用靶点。通过 Uniprot 数据库(<https://www.uniprot.org>)对获得的药物靶点来源和基因信息进行校正。

2.1.2 钩藤“活性成分-靶点”网络构建 通过 Uniprot 数据库将钩藤活性成分靶点蛋白名称转换为基因 ID^[7]; 利用 Cytoscape 3.7.2 软件将钩藤、钩藤活性成分、钩藤活性成分对应靶点三者关系可视化, 构建“中药-活性成分-靶点”网络。

2.1.3 药物-疾病靶点预测 通过 GeneCards 数据库(<https://www.genecards.org>)和 OMIM 数据库(<https://omim.org>), 以“febrile seizures”为关键词搜索疾病靶点, 获得疾病靶点数据集。通过 Venny 2.1.0 将钩藤活性成分的相关靶点与热性惊厥疾病的相关靶点取交集。

2.1.4 蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络的构建 通过 STRING 数据库(<https://string-db.org>), 选择“multiple proteins”模式, 蛋白种属设置为“Homo sapiens”, 构建 PPI 网络。

2.1.5 “中药-活性成分-关键靶点-疾病”网络的构建 将钩藤、热性惊厥、钩藤治疗热性惊厥的交集靶点及交集靶点对应的活性成分四者导入 Cytoscape 3.7.2 软件, 将四者关系可视化, 构建“中药-活性成分-关键靶点-疾病”网络, 在 Cytoscape 3.7.2 软件中计算各活性成分的度值。

2.1.6 基因本体 (gene ontology, GO) 功能及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 通过 Metascape 数据库, 限定物种为 Homo sapiens, 设置

参数后进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析^[8]。利用 R_x64 4.0.2 编程软件及 ggplot2 绘图包绘制可视化 KEGG 通路富集分析图和 GO 富集分析图^[8]。

2.1.7 分子对接 在 TCMSP 及 PubChem 数据库中下载活性成分的 3D 结构,并用 OpenBable 3.1.1 转化为 mol2 格式文件。通过检索 PDB 数据库,下载所需蛋白的 3D 结构。应用 AutoDockTools 1.5.6 和 PyMOL 2.3.4 软件对关键靶点蛋白进行分子对接,将结合能最好的模型使用 PyMOL 2.3.2 软件进行可视化。

2.2 实验验证

2.2.1 钩藤提取物的制备 钩藤粉碎后过 20 目筛,加入 6 倍体积的纯水,浸泡 1 h,回流提取 20 min,滤过,滤液冷冻干燥,置于干燥器避光保存、备用。共提取钩藤药材 198.393 0 g,得到冻干粉 10.019 0 g,提取率为 5.05%,每克钩藤提取物折合钩藤生药量为 19.80 g,采用 UPLC-Q-TOF-MS 检测出钩藤碱、异钩藤碱、毛钩藤碱等 19 种生物碱及马钱苷酸、绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸等其他成分共 41 种,钩藤提取物中生物碱质量分数为 29.15%。

2.2.2 动物分组、给药及造模 将出生后 14 d 的 SD 大鼠乳鼠随机分为对照组、模型组和钩藤低、中、高剂量组(折合成生药量 1、5、10 g/kg),每组 9 只。对照组和模型组 ip 0.9%氯化钠溶液(10 mL/kg),钩藤给药组 ip 钩藤提取物(以 0.9%氯化钠溶液溶解),ip 1 h 后,模型组和钩藤给药组乳鼠置于 45 °C 烘箱中 20 min 诱导热惊厥模型。

2.2.3 免疫组化实验 实验结束 24 h 后,取对照组、模型组、钩藤高剂量组乳鼠脑组织,于 4%多聚甲醛中固定,常规脱水,石蜡包埋,切片(厚度 4 μm),二甲苯脱蜡、梯度乙醇脱水后,滴加 0.01 mol/L (pH 6.0) 柠檬酸缓冲液进行微波修复;滴加内源性过氧化物酶阻断剂,37 °C 孵育 30 min 以消除过氧化物;分别滴加 NMDAR2A 抗体(1:75)、NMDAR2B 抗体(1:200),4 °C 孵育过夜;37 °C 复温 30 min;滴加反应增强液,37 °C 孵育 30 min 以改变细胞通透性;滴加增强酶标山羊抗小鼠/兔 IgG 聚合物,37 °C 孵育 30 min;DAB 显色,苏木素复染 5 min,盐酸酒精分化 5 s,梯度乙醇脱水、二甲苯透明后,中性树脂封片,于显微镜下观察并拍照,用 Image J 软件分析平均吸光度(A)值。

2.2.4 Western blotting 实验 实验结束 24 h 后,取对照组、模型组和钩藤低、中、高剂量组乳鼠海

马组织,加入 RIPA 裂解液提取总蛋白,采用高速离心匀浆仪匀浆,4 °C、12 000 r/min 离心 15 min,取上清液,采用 BCA 法测定蛋白浓度。加入 5×Loading buffer,100 °C 煮沸 10 min 使蛋白变性,于-20 °C 保存备用。蛋白样品经 8%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转至 PVDF 膜,于含 3% 脱脂奶粉的 TBST 溶液中室温封闭 2 h,分别加入 NMDAR2A 抗体(1:1 000)、NMDAR2B 抗体(1:1 000)、β-actin 抗体(1:10 000),于 4 °C 孵育过夜;TBST 洗膜 35 min,加入山羊抗兔 IgG 二抗(1:10 000),室温摇床孵育 2 h,TBST 洗膜 3 次,用 ECL 发光液孵育后,将条带置于自动显影仪进行显影,用 Image J 软件分析条带灰度值。

2.2.5 钩藤对海马 CA1 区锥体神经元 NMDA 受体诱发兴奋性突触后电流(NMDA receptor evoked excitatory postsynaptic currents, eEPSC_{NMDA})的作用 使用全细胞膜片钳进行记录,采样频率和低通滤波分别为 20 kHz 和 3 kHz。电极内液由 115 mmol/L CsCH₃SO₃、20 mmol/L CsCl、10 mmol/L HEPES、5 mmol/L QX-314 chloride、4 mmol/L Na₂ATP、2.5 mmol/L MgCl₂·6H₂O、0.4 mmol/L Na₃GTP、0.6 mmol/L EGTA、0.1 mmol/L Spermin-C₁₄ 组成,用 CsOH 调至 pH 7.2~7.3,渗透压 280~290 mOsm/kg。将麻醉后的 SD 大鼠乳鼠断头取脑,迅速浸于已充氧的冰水混合切片液(210 mmol/L 蔗糖、1.25 mmol/L NaH₂PO₄、25 mmol/L NaHCO₃、10 mmol/L 葡萄糖、2.5 mmol/L KCl、0.5 mmol/L CaCl₂、7 mmol/L MgSO₄,用 NaOH 调至 pH 7.4)中,预冷 1 min。将修整好的目标脑区固定,并以冠状方向切成 300 μm 的脑片,将脑片迅速转移至人工脑脊液(119 mmol/L NaCl、2.5 mmol/L KCl、1 mmol/L NaH₂PO₄、26.2 mmol/L NaHCO₃、11 mmol/L 葡萄糖、2.5 mmol/L CaCl₂、1.3 mmol/L MgCl₂,用 NaOH 调至 pH 7.4,渗透压 280~290 mOsm/kg)中,在 32 °C 的水浴槽中孵育 30 min,取出并于室温放置 1 h,将同心圆钨刺激电极放置距海马 CA1 椎体神经元相对应位置 100 μm 以内的谢弗侧枝上,通过使用 ISO-Flex 隔离器产生胞外刺激,其刺激强度为刺激阈值的 1.5~2.0 倍,刺激时程 0.1 ms。细胞膜电位钳制在+40 mV,记录由 NMDAR 介导的兴奋性突触,灌流液(人工脑脊液)中加入 1 μmol/L TTX(钠通道阻断剂)、100 μmol/L PTX(GABAA 受体阻断剂)和 10 μmol/L NBQX(AMPA 受体阻断剂),灌流液

中加入 2 mg/mL 的钩藤提取物, 分别记录给药前后的 eEPSC_{NMDA} 电流并进行分析。

2.2.6 统计学分析 电生理数据应用 Clampfit v10.7.0.3 软件分析, 实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, GraphPad Prism 8 统计软件进行数据分析, 配对样本的统计采用双因素方差分析 (two-way ANOVA)、配对 *t* 检验和 Wilcoxon 配对符号秩检验; 独立样本的统计采用单因素方差分析 (One-way ANOVA) 和 Kruskal-Wallis 非参数检验。

3 结果

3.1 钩藤活性成分及靶点

通过 TCMSP 数据库得到的活性成分以口服生物利用度 (oral bioavailability, OB)、类药性 (drug likeness, DL) 和血脑屏障 (blood-brain barrier, BBB)

为指标进行筛选。通过 BATMAN-TCM 数据库得到的活性成分利用 PubChem、SwissADME 平台进行分析再进行筛选。将筛选所得结果相结合得到钩藤活性成分 29 个, 包括钩藤碱、异钩藤碱、缝籽嗉甲醚和 β -谷甾醇等。

3.2 “中药-活性成分-靶点”网络

通过 TCMSP 和 BATMAN-TCM 数据库检索及筛选得到钩藤活性成分靶点 297 个。利用 Cytoscape 3.7.2 软件构建“中药-活性成分-靶点”网络, 见图 1。网络中共有 327 个节点、746 条边。粉红色圆形代表钩藤, 橙色圆形代表有效成分, 黄色圆形代表关联靶点。网络图中 corynanthine 是子节点最多的有效成分, 有 155 个子节点, 表明其在钩藤成分中联系的靶点最多。

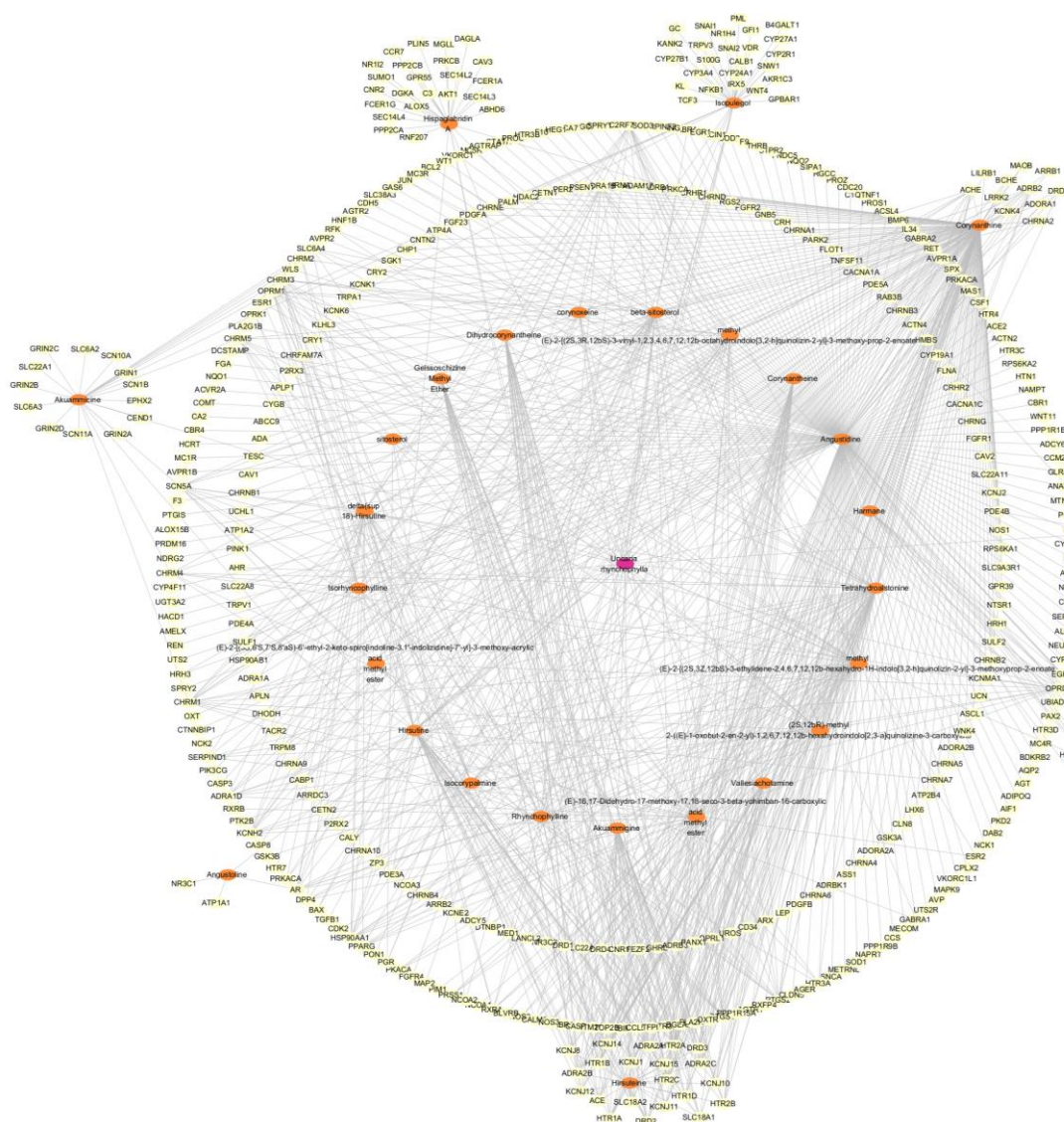


图 1 “中药-活性成分-靶点”网络

Fig. 1 “Chinese medicine-active ingredient-target” network

3.3 疾病靶点及交集靶点

将检索 GeneCards 和 OMIM 数据库后得到的疾病靶点进行筛选后, 最终得到疾病靶点 3 739 个。活性成分靶点与疾病靶点取交集得到关键靶点 81 个, 见图 2。

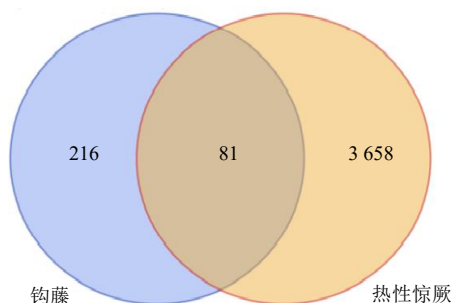


图 2 活性成分与疾病的交集靶点

Fig. 2 Intersection targets of active ingredients and diseases

3.4 PPI 网络

将交集靶点导入 STRING 数据库分析 PPI 关系, 构建可视化 PPI 网络, 见图 3。圆形代表基因表达的靶蛋白, 颜色越深, 面积越大, 度值越大。边代表蛋白质之间的相互作用, 线段由细到粗, PPI 综合得分由低到高。PPI 网络中蛋白激酶 B1 (protein kinase B1, AKT1) 和 GRIN2B (NMDAR2B)、GRIN2A (NMDAR2A) 和雌激素受体 1 (estrogen receptor 1, ESR1)、蛋白磷酸酶 2 催化亚基 α 亚型 (phosphatase 2 catalytic subunit α PPP2CA) 和内皮型一氧化氮合酶 (endothelial nitric oxide synthase 3, NOS3)、瘦素 (leptin, LEP) 和过氧化物酶体增生激活受体 γ (peroxisome proliferative activated receptor γ ,

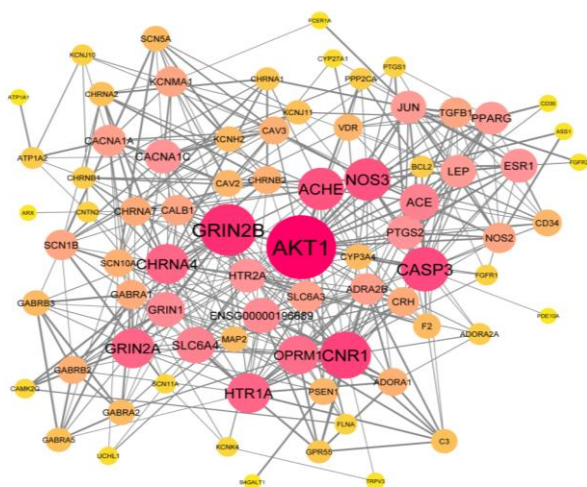


图 3 PPI 网络

Fig. 3 PPI network

PPARG) 的综合得分较高, 说明各组蛋白间的相互作用能力较强。通过 Cytoscape 3.7.2 软件拓扑分析得到核心蛋白度值, 见表 1。度值即节点在网络中的中心性, 根据节点中心性可用于衡量节点在网络中影响能力大小, 用以判断节点靶蛋白的重要性, 度值越高, 认为节点中心性越大, 该节点在网络中越重要^[9]。可以看出 AKT1、GRIN2B (NMDAR2B) 和大麻素受体 1 (cannabinoid receptor 1, CNR1) 的蛋白度值较高, 说明它们与其他蛋白有较强的相互作用。

表 1 PPI 网络中度值排名前 10 位的靶蛋白

Table 1 Top 10 target proteins in degree ranking of PPI network

靶点	度值
AKT1	32
GRIN2B	27
CNR1	25
CASP3	24
ACHE	23
NOS3	23
HTR1A	21
CHRNA4	21
GRIN2A	21
OPRM1	20

3.5 “中药-活性成分-关键靶点-疾病”网络

利用 Cytoscape 3.7.2 软件构建“中药-活性成分-关键靶点-疾病”网络, 见图 4。网络中共有 91 个节点、301 条边。橙色菱形代表钩藤, 粉色圆形代表活性成分, 蓝色菱形代表热性惊厥, 绿色圆形代表关键靶点。其中, 度值最高的是 β -谷甾醇, 度值为 18; 其次是 corynanthine, 度值为 15。说明钩藤在治疗热性惊厥时主要依赖于活性成分的多靶点作用能力。

3.6 KEGG 通路富集分析

利用 DAVID v6.8 数据库进行 KEGG 信号通路富集分析, 得到 41 条相关通路, 对所得信号通路进行富集分析, 按 $P < 0.05$ 排列并筛选出 20 个结果。利用 R_x64 4.0.2 软件中的 ggplot2 绘图包对筛选出的结果根据 P 值、基因数目及富集系数绘制气泡图, 见图 5。通路所涉及基因数目越多, 气泡越大; 统计显著性越大, 填充颜色从蓝到红颜色渐深。图中可见神经活性配体-受体相互作用 (neuroactive ligand-receptor interaction) 通路所涉及基因数目最多、显著性最大 ($P = 1.108 \times 10^{-16}$)。

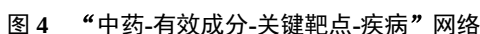


Figure 2 is a dot plot showing the top 20 enriched GO terms for the 1000 most differentially expressed genes. The x-axis represents the 'rich factor' (log2 fold change) ranging from 0 to 30. The y-axis lists the GO terms. The size of the dots indicates the number of genes (基因数) and the color indicates the q-value (q 值).

Legend for Gene Count (基因数):

- 5
- 10
- 15
- 20
- 25

Legend for q-value (q 值):

- 0.0020 (Blue)
- 0.0015 (Purple)
- 0.0010 (Pink)
- 0.0005 (Red)

Top 20 Enriched GO Terms (approximate rich factor values):

GO Term	Rich Factor (approx.)	Gene Count (approx.)	q-value (approx.)
neuroactive ligand-receptor interaction	30	25	0.0005
nicotine addiction	15	20	0.0005
cAMP signaling pathway	14	20	0.0005
serotonergic synapse	12	15	0.0005
calcium signaling pathway	12	15	0.0005
proteoglycans in cancer	11	10	0.0010
morphine addiction	11	10	0.0005
cholinergic synapse	11	10	0.0005
retrograde endocannabinoid signaling	11	10	0.0005
adrenergic signaling in cardiomyocytes	11	10	0.0005
tuberculosis	9	5	0.0020
dopaminergic synapse	9	5	0.0005
cGMP-PKG signaling pathway	10	5	0.0010
Chagas disease (American trypanosomiasis)	7	5	0.0010
amphetamine addiction	7	5	0.0005
GABAergic synapse	7	5	0.0005
insulin secretion	6	5	0.0020
cocaine addiction	5	5	0.0020
amyotrophic lateral sclerosis (ALS)	5	5	0.0020
endocrine and other factor-regulated calcium reabsorption	5	5	0.0020

图5 钩藤治疗热性惊厥潜在靶点的 KEGG 通路富集分析

3.7 GO 功能富集分析

利用 DAVID v6.8 数据库对关键靶点进行 GO 功能富集分析，得到 247 个生物过程（biological process, BP）结果，48 个细胞成分（cellular component, CC）结果，54 个分子功能（molecular function, MF）结果。对 BP、CC 和 MF 结果按 $P < 0.05$ 分别排列并筛选出前 10 个结果。利用 Rx64

4.0.2 软件中的 **ggplot2** 绘图包分别对 BP、CC、MF 条目显著性 *P* 值前 10 的结果绘制分析图，见图 6。BP 中尼古丁反应、CC 中质膜和 MF 中细胞外配体门控离子通道活性显著性最大。

3.8 分子对接

将筛选出的度值排名靠前的化合物及靶点蛋白进行分子对接,结果显示,各活性成分与蛋白对接

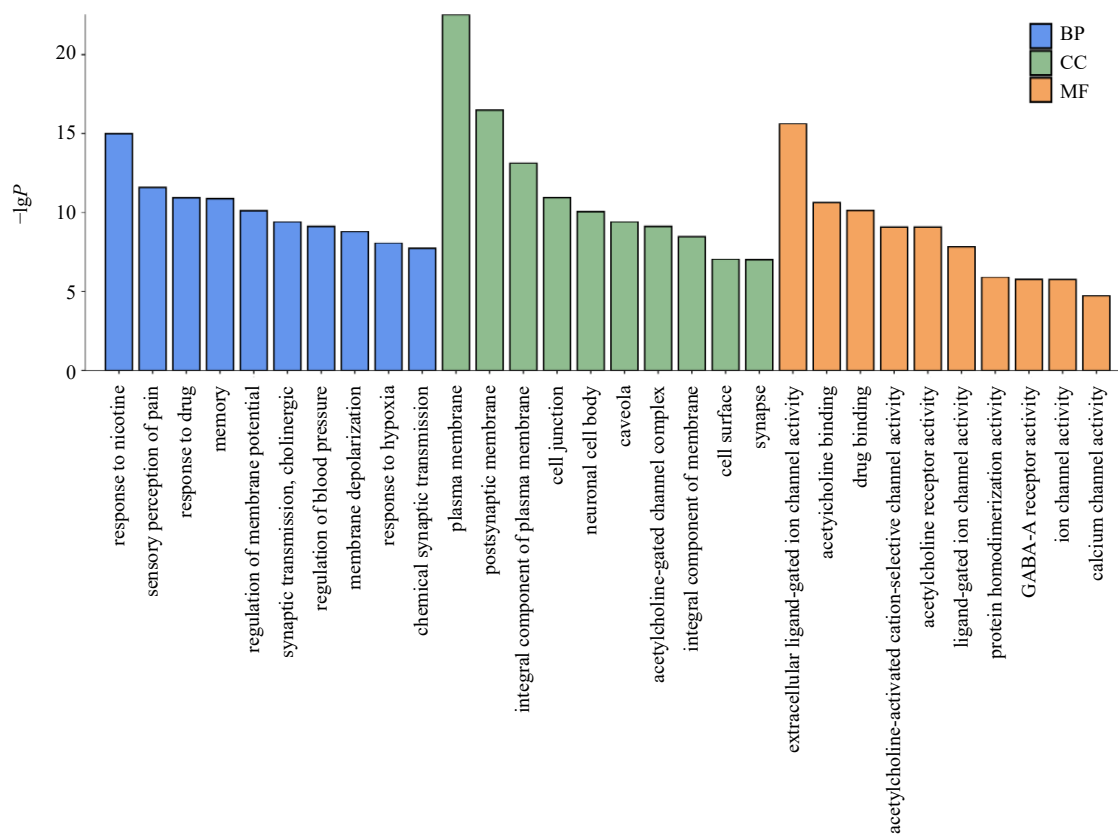


图 6 钩藤治疗热性惊厥潜在靶点的 GO 功能富集分析

Fig. 6 GO function enrichment analysis of potential targets of *U. rhynchophylla* in treatment of febrile seizures

的结合自由能均为负值（表 2），说明受体分子与配体分子的结合活性较好，数值越小，二者之间的亲和力越大。结合能力最强的是 GRIN2A 和 corynanthine，其结合能为 -6.78 kcal/mol （ $1 \text{ kcal/mol} = 4.182 \text{ kJ/mol}$ ）。利用 PyMOL 软件选取活性成分与蛋白结合能低的对其进行可视化处理，分析表明 corynanthine 和 GRIN2A 共形成 3 个氢键，corynanthine 与 GRIN2A 在 PHE-240、THR-242、

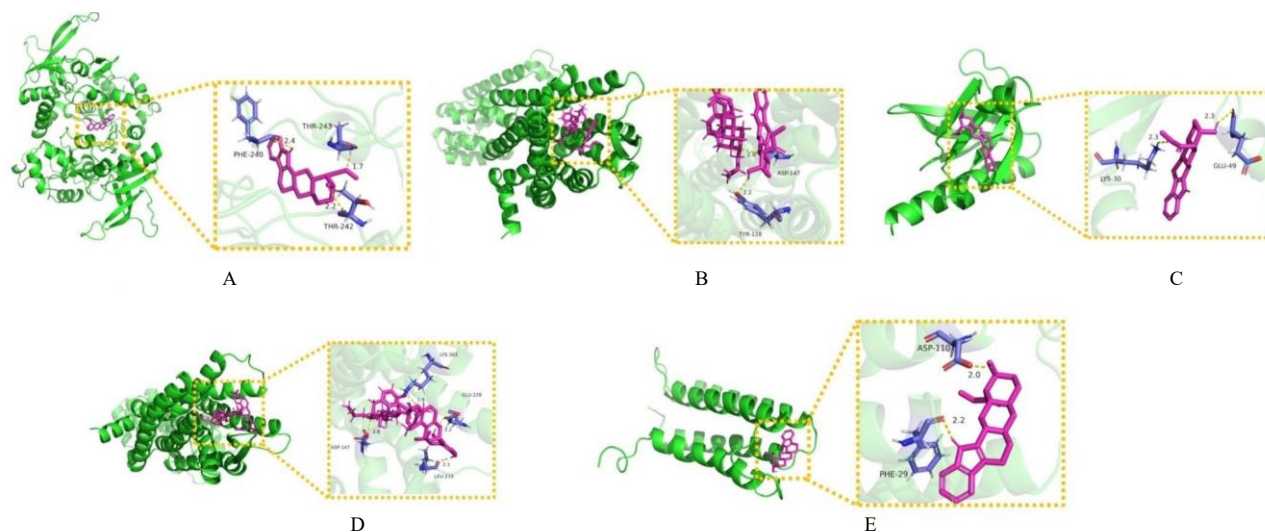
THR243 处形成氢键， β -谷甾醇与 OPRM1 在 AEP-147、TYR-128 处形成氢键， β -谷甾醇与 AKT1 在 LYS-30、GLU-49 处形成氢键， β -谷甾醇与 CHRNA4 在 PHE-29、ASP-110 处形成氢键，hispaglabridin A 与 OPRM1 在 ASP-147、GLU-229、LEU-219、LYS-303 处形成氢键，corynanthine 与 CHRNA4 在 LYS-38 处形成氢键。核心靶点蛋白结合较稳定分子对接 3D 模型见图 7。

表 2 分子对接结合能

Table 2 Molecular docking binding energy

核心靶点	PDB ID	结合能/($\text{kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$)				
		hispaglabridin A	geissoschizine methyl ether	corynanthine	β -谷甾醇	akuammicine
HTR1A	7OVE	-4.02	-3.21	-5.43	-5.72	-4.38
GRIN2A	6ODL	-5.66	-5.60	-6.78	-6.03	-5.86
OPRM1	4DKL	-6.27	-4.78	-6.08	-6.50	-4.22
AKT1	1UNQ	-3.55	-2.82	-4.98	-6.38	-4.63
CASP3	3DEK	-3.53	-3.52	-4.21	-4.54	-4.20
CHRNA4	211Y	-5.84	-4.73	-6.10	-6.29	-5.28
GRIN2B	5EWJ	-3.71	-4.40	-4.91	-4.24	-4.57
CNR1	5TGC	-0.94	-2.76	-2.36	-5.72	-4.32
ACHE	5HQ3	-3.63	-4.17	-4.92	-4.18	-4.27

$1 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1} = 4.182 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$



A-corynanthine 与 GRIN2A; B-β-谷甾醇与 OPRM1; C-β-谷甾醇与 AKT1; D-β-谷甾醇与 CHRNA4; E-hispaglabridin A 与 OPRM1。
A-corynanthine with GRIN2A; B-β-sitosterol with OPRM1; C-β-sitosterol with AKT1; D-β-sitosterol with CHRNA4; E-hispaglabridin A with OPRM1.

图 7 分子对接 3D 模型

Fig. 7 3D Model of molecular docking

3.9 钩藤提取物对热性惊厥模型乳鼠脑组织 NMDAR2A、NMDAR2B 蛋白表达的影响

免疫组化结果见图 8, NMDAR2A、NMDAR2B 阳性表达在胞质呈棕黄色。与对照组比较, 模型组

乳鼠脑组织 NMDAR2A、NMDAR2B 阳性表达显著升高 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 钩藤高剂量组乳鼠脑组织 NMDAR2A、NMDAR2B 阳性表达显著降低 ($P < 0.001$)。

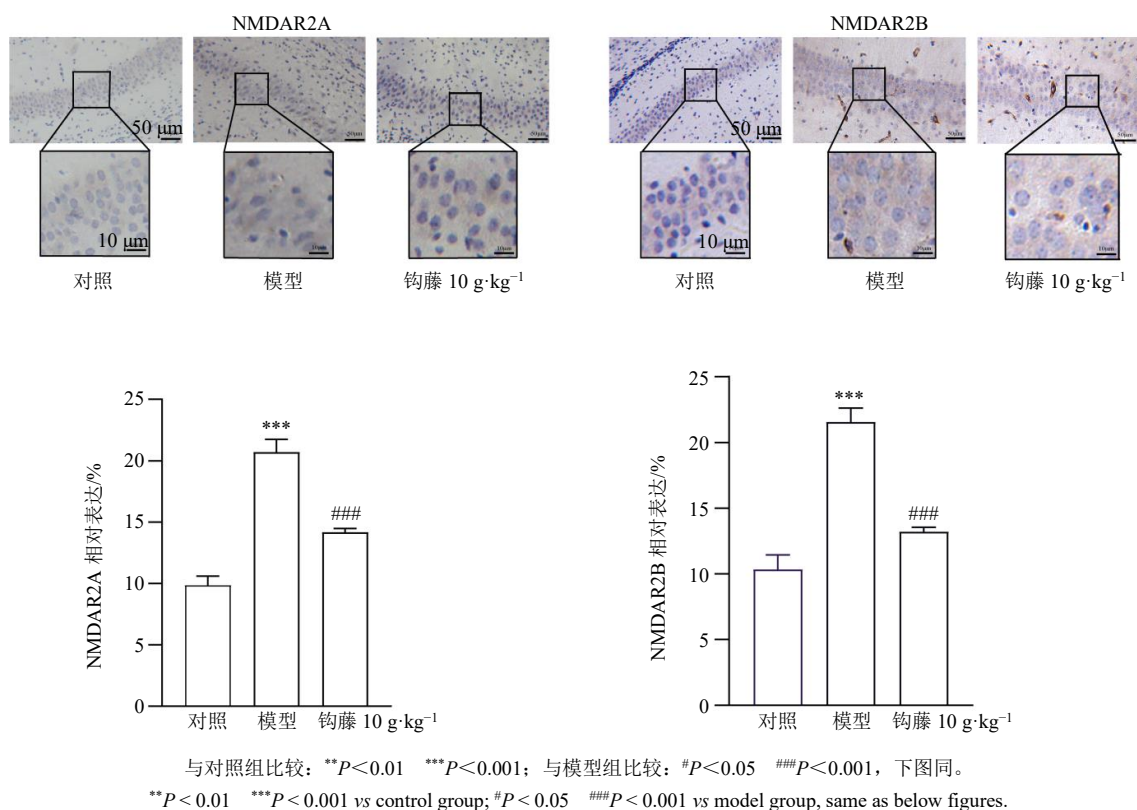


图 8 钩藤提取物对热性惊厥模型乳鼠脑组织 NMDAR2A、NMDAR2B 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 8 Effect of *U. rhynchophylla* extract on NMDAR2A, NMDAR2B protein expressions in brain tissues of neonatal rats with febrile seizures ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Western blotting 结果见图 9, 与对照组比较, 模型组乳鼠海马组织 NMDAR2A、NMDAR2B 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$ 、 0.001); 与模型组比较, 钩藤各剂量组 NMDAR2A、NMDAR2B 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 且呈剂量相关性。表明钩藤能够降低由于高热惊厥导致的 NMDAR2A、NMDAR2B 蛋白表达的升高, 对高热惊厥有一定的治疗效果, 且呈剂量相关性。

3.10 钩藤提取物对海马 CA1 区锥体神经元 eEPSC_{NMDA} 的作用

通过膜片钳技术, 记录给药前后 SD 大鼠乳鼠急性脑片海马区 CA1 锥体细胞神经元的 eEPSC_{NMDA} 电流, 如图 10 所示, 给予钩藤提取物后, eEPSC_{NMDA} 电流的幅值从 (172.40 ± 16.73) pA 降低到 (152.60 ± 15.74) pA ($P < 0.01$)。说明钩藤提取物能够通过抑制 NMDA 受体电流而产生降低神经元兴奋性的作用。

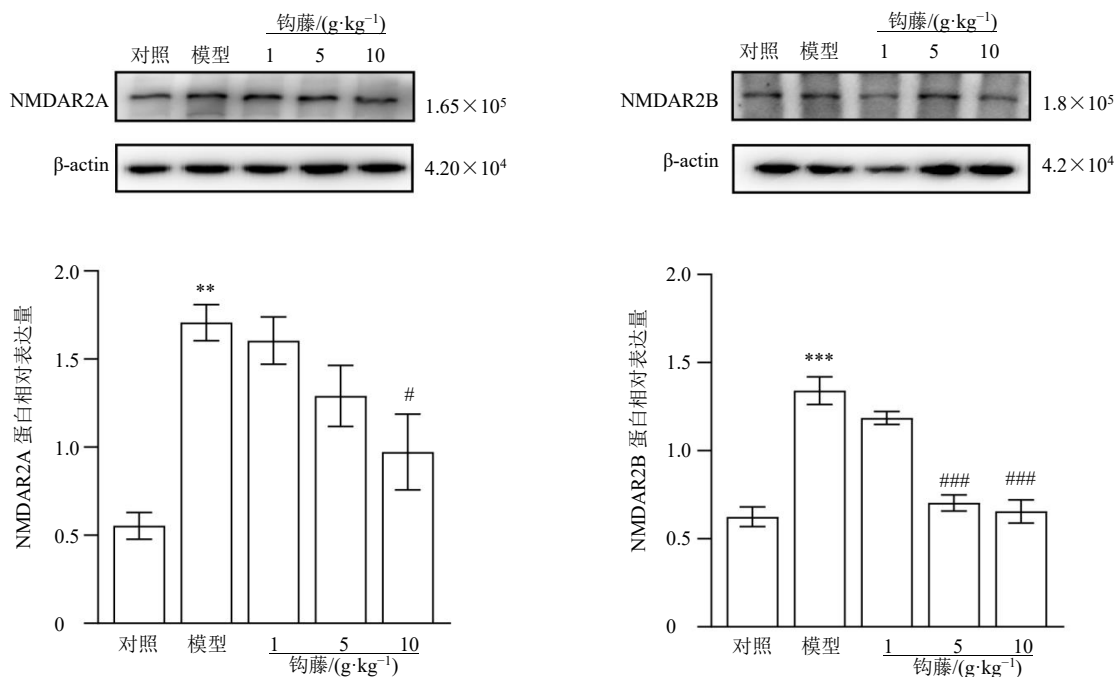


图 9 钩藤提取物对热性惊厥模型乳鼠海马组织 NMDAR2A、NMDAR2B 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 9 Effect of *U. rhynchophylla* extract on NMDAR2A, NMDAR2B protein expressions in hippocampus of neonatal rats with febrile seizures ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

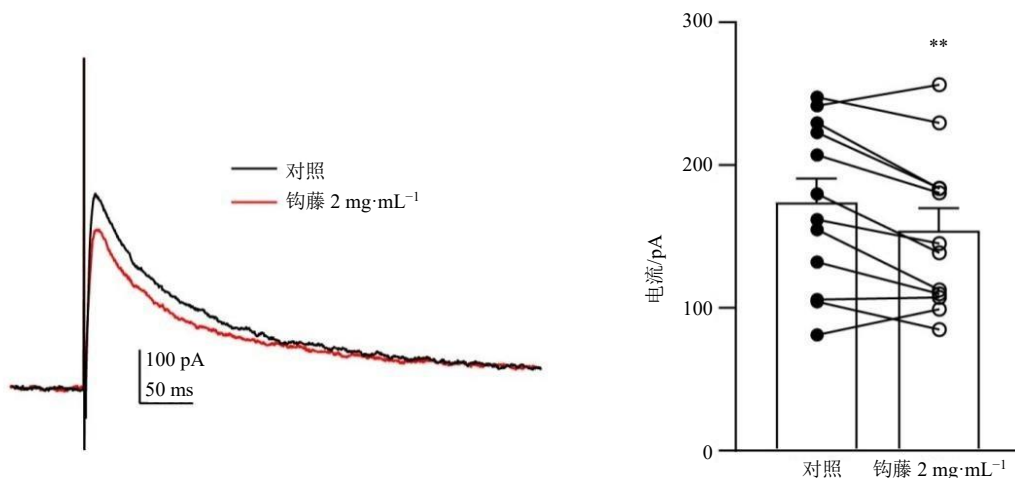


图 10 钩藤提取物对海马 CA1 区锥体神经元 eEPSC_{NMDA} 电流的作用 ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

Fig. 10 Effect of *U. rhynchophylla* extract on eEPSC_{NMDA} currents amplitude in hippocampal CA1 pyramidal neurons ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

4 讨论

《医学衷中参西录》云：“小儿疾之最危者，无越惊风之证，吉凶反掌，变生瞬息。”热性惊厥为小儿机体发育不全，中枢神经系统功能不足，引起高热，继而发展为惊厥^[10]。西医利用苯巴比妥联合地西洋治疗，临床效果较好，可有效改善患儿病^[11]。中医则使用钩藤、羚羊角等药物治疗热性惊厥，在西医对症治疗的基础上，可以进一步及时有效地控制症状，还能够有效减少惊厥复发次数^[4-5]。钩藤为茜草科植物钩藤 *U. rhynchophylla* (Miq.) Miq. ex Havil. 及同属多种植物的干燥带钩茎枝，始载于《名医别录》，应用历史悠久，主要含有生物碱类、三萜类、酚类、甾醇类、黄酮类等成分，主要作用于心血管和中枢神经系统，具有治疗高血压、阿尔茨海默病、热性惊厥、帕金森、肺纤维化等疾病的作用^[12]。《中国药典》2020 年版一部载：“钩藤具有息风止痉、清热平肝之功效。用于肝风内动、惊痫抽搐、高热惊厥、感冒夹惊、小儿惊啼、妊娠子痫和头疼眩晕”。因而，抗惊厥和癫痫是钩藤的重要药理作用。本研究对钩藤的抗热性惊厥作用及机制进行系统性的研究，为临床应用提供数据支撑。

本研究采用网络药理学方法，通过 TCMSP 和 BATMAN-TCM 数据库检索及筛选得到钩藤活性成分 29 个，作用靶点 297 个，钩藤发挥治疗热性惊厥药效的成分可能为钩藤碱、异钩藤碱、毛钩藤碱等。通过 PPI 网络分析，结果提示钩藤的活性成分主要作用于 AKT1、GRIN2B (NMDAR2B)、GRIN2A (NMDAR2A) 和 CNR1 等靶点发挥抗热性惊厥的作用，分子对接结果显示这些核心靶点与关键活性成分有较好的结合力。AKT1 由多巴胺 D2 信号传导启动编码丝氨酸/苏氨酸激酶，通过纹状体多巴胺受体信号级联影响大脑区域包括细胞凋亡、细胞存活和新陈代谢的广泛的细胞过程^[9]。CNR1 通过跨突触机制调节纹状体多巴胺的释放，进而抑制海马和杏仁核中的 GABA 能神经元和谷氨酸能神经元，从而影响神经系统的兴奋性^[13]。

NMDA 受体属于离子型谷氨酸受体，NMDAR2A、NMDAR2B 同属于 NMDA 受体亚基，广泛分布于大脑中，尤其在大脑皮质、海马中含量最为丰富。NMDA 受体在神经信号传递中扮演着重要的角色，参与脑中兴奋性突触的传递，在维持突触可塑性中发挥关键作用，其表达的数量、分布和种类的改变可诱发多种神经疾病。现代药理学研究

发现，在癫痫、帕金森、脑卒中等脑部疾病发生的状态下 NMDAR2B 水平的升高会进一步加重疾病症状。NMDAR2B 增加导致脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) DNA 甲基化水平降低，进而控制中枢神经系统有丝分裂后神经元的基因转录，从而影响大脑海马区域的神经活动，导致癫痫的发生^[14]。

由于与 AKT1 能够紧密对接的化学成分 β -谷甾醇并非钩藤所含有的特异性成分，为此，选择了能够与钩藤生物碱对接的核心靶点 NMDAR2A 与 NMDAR2B 进行验证，以探讨钩藤的可能作用机制。免疫组化及 Western blotting 结果表明，热性惊厥乳鼠海马组织中 NMDAR2A 及 NMDAR2B 表达显著高于对照组，表明 NMDA 受体参与了热性惊厥的过程，受体表达过多，导致受体活动增强，兴奋性神经元活动增强，破坏大脑皮层的兴奋-抑制平衡，最终导致热性惊厥的发生。给予钩藤提取物后，SD 大鼠乳鼠海马组织中 NMDAR2A 及 NMDAR2B 表达降低，从而对 NMDA 受体产生抑制作用，降低神经元兴奋性。在膜片钳电生理实验中，再次验证了这一结论，钩藤能够直接抑制 eEPSC_{NMDA} 电流，表明钩藤能够抑制 NMDA 受体所介导的兴奋性突触的传递。

综上，本研究通过网络药理学探索了钩藤治疗热性惊厥的作用机制，并通过免疫组化、Western blotting 及膜片钳技术进行了初步验证，结果表明，钩藤可能通过抑制 NMDAR2A 及 NMDAR2B 的表达，对 NMDA 受体产生抑制作用，从而抑制了兴奋性突触的传递，对热性惊厥起到治疗作用，为进一步深入研究钩藤治疗热性惊厥的药效物质基础和作用机制提供参考依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 李莉群, 倪世宏, 许莉萍, 等. 小儿高热惊厥临床资料分析 [J]. 实用医药杂志, 2008, 25(4): 410-411.
- [2] 熊芬, 袁红连. 小儿高热惊厥发病的相关危险因素分析 [J]. 中国医学创新, 2022, 19(20): 93-96.
- [3] 吴夏玲, 吉训超. 从“心主惊肝主风”理论探究小儿急惊风发病时辰规律 [J]. 中国中医急症, 2018, 27(3): 478-479.
- [4] 王小丽, 朱小东, 郁星峰. 钩藤水煎液口服预防热性惊厥效果观察 [J]. 交通医学, 2016, 30(5): 479.
- [5] 蒋廷廷. 羚羊钩藤汤结合西医治疗小儿热性惊厥发作临床研究 [J]. 光明中医, 2023, 38(15): 3017-3020.

- [6] 廖韵诺, 赵凯丽, 郭宏伟. 中药网络药理学的研究应用与挑战 [J]. 中草药, 2024, 55(12): 4204-4213.
- [7] Hadley W. *ggplot2: Elegant graphics for data analysis* [M]. New York: Springer-Verlag, 2016: 168-172.
- [8] Zhou J G, Xiong W, Wang Y, *et al.* Protein function prediction based on PPI networks: Network reconstruction vs edge enrichment [J]. *Front Genet*, 2021, 12: 758131.
- [9] Scheid M P, Woodgett J R. PKB/AKT: Functional insights from genetic models [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2: 760-768.
- [10] 席颖, 胡淑萍. 小儿高热惊厥中医治疗研究进展 [J]. 实用中医药杂志, 2022, 38(8): 1471-1472.
- [11] 乐艳珍, 胡金霞, 高海元. 苯巴比妥联合地西洋治疗小儿高热惊厥的临床效果 [J]. 临床合理用药杂志, 2022, 15(10): 112-115.
- [12] 张晓娟, 左冬冬, 于孙婉琪. 钩藤化学成分和药理作用研究进展 [J]. 中医药信息, 2024, 41(2): 81-86.
- [13] Chakrabarti B, Kent L, Suckling J, *et al.* Variations in the human cannabinoid receptor (*CNR1*) gene modulate striatal responses to happy faces [J]. *Eur J Neurosci*, 2006, 23(7): 1944-1948.
- [14] Parrish R R, Albertson A J, Buckingham S C, *et al.* Status epilepticus triggers early and late alterations in brain-derived neurotrophic factor and NMDA glutamate receptor Grin2b DNA methylation levels in the hippocampus [J]. *Neuroscience*, 2013, 248: 602-619.

[责任编辑 李亚楠]