

·数字中医药·

本文引用:朱 勇,李 亮,吴华英,夏帅帅,李 丰,黄惠勇,杨 萍.基于网络药理学探讨柴胡龙骨牡蛎汤治疗癫痫的作用机制[J].湖南中医药大学学报,2019,39(10):1212-1217.

基于网络药理学探讨柴胡龙骨牡蛎汤 治疗癫痫的作用机制

朱 勇¹,李 亮²,吴华英²,夏帅帅²,李 丰²,黄惠勇²,杨 萍^{1*}

(1.湖南省脑科医院神经外科,湖南中医药大学临床医学院,湖南 长沙 410007;

2.湖南中医药大学中医诊断学湖南省重点实验室,湖南 长沙 410208)

[摘要] **目的** 基于网络药理学、生物信息学等方法研究神经递质参与柴胡龙骨牡蛎汤(CLMD)抗癫痫潜在机制。**方法** 利用中药系统药理学数据库和分析平台(TCMSP)预测、筛选 CLMD 可能的生物活性成分,并预测其靶点。利用药物靶点数据库挖掘癫痫相关靶点,构建 CLMD 药效分子-靶点网络及 CLMD 药效分子-癫痫靶点网络,采用 ClueGo 分析 CLMD 治疗癫痫可能的分子机制,使用锂-匹罗卡品癫痫大鼠模型进行相关机制验证。**结果** 从 TCMSP 中获得 CLMD 中活性成分 42 个及 110 个药效分子靶点基因。利用数据库获得 213 个癫痫靶点。CLMD 生物活性成分-癫痫靶点网络构建分析,最终得到 CLMD 治疗癫痫的 169 个关键基因,包括共同靶点 11 个,分别为:CHRNA2、CYP1A2、CYP3A4 等。通路富集分析显示,这些重要靶点能够富集到在癫痫发生发展中发挥重要作用的通路,如 GABA-A 受体、多巴胺能、谷氨酸能、神经递质受体等信号通路。动物实验验证,CLMD 能提高锂-匹罗卡品癫痫大鼠 GABA 水平,降低 DA 水平,保护海马 CA1 区神经元细胞。**结论** CLMD 治疗癫痫具有多系统、多成分、多靶点的特点,特别是调整神经递质代谢水平。

[关键词] 癫痫;柴胡龙骨牡蛎汤;网络药理学;分子机制;信号通路

[中图分类号]R277.7 **[文献标志码]**A **[文章编号]**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2019.10.009

Study on the Mechanism of Chaihu Longgu Muli Decoction in the Treatment of Epilepsy Based on Network Pharmacology

ZHU Yong¹, LI Liang², WU Huaying², XIA Shuashuai², LI Feng², HUANG Huiyong², YANG Ping^{1*}

(1. Neurosurgery Department of Brain Hospital of Hunan Province, Clinical Medical College of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China; 2. Key Laboratory of Hunan Province for TCM Diagnostics, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

[Abstract] **Objective** To study potential mechanism of Chaihu Longgu Muli Decoction (CLMD) in the treatment of epilepsy based on network pharmacology, bioinformatics and other methods. **Methods** Potential bioactive components of CLMD were screened and predicted through Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP) and their targets were predicted. By using Therapeutic Target Database (TTD), epilepsy-related targets were mined. CLMD pharmacodynamic molecule-target network and CLMD pharmacodynamic molecule-epileptic target network were constructed. Possible molecular mechanism of CLMD in the treatment of epilepsy was analyzed through ClueGo. Lithium-pilocarpine epilepsy rat model was used to verify the mechanism. **Results** A total of 42 bioactive components of CLMD and 110 pharmacodynamic molecular target genes were obtained from TCMSP. A total of 213 epileptic targets were screened out through the database. Through CLMD

[收稿日期]2019-07-02

[基金项目]国家自然科学基金资助项目(81603512,81874429);湖南省卫生计生委科研课题(20180364,20190058);湖南省自然科学基金(2019JJ80027);湖南省中医药科研计划项目(201818)。

[作者简介]朱 勇,男,主治医师,主要从事癫痫中医临床研究。

[通讯作者]* 杨 萍,女,主治医师,E-mail:cuteping12384@126.com。

bioactive component-epileptic target network construction analysis, finally, 169 key genes for CLMD treatment of epilepsy were obtained, including 11 common targets: CHRNA2, CYP1A2, CYP3A4, etc. Pathway enrichment analysis showed that these important targets could be enriched in pathways that played an important role in the development of epilepsy, such as GABA-A receptor, dopaminergic, glutamatergic, neurotransmitter receptor and other signaling pathways. Animal experiments showed that CLMD could increase the level of GABA, decrease the level of DA, and protect neurons in hippocampal CA1 area in rats with epilepsy induced by lithium-pilocarpine. **Conclusion** CLMD has characteristics of multi-system, multi-component, and multi-target in the treatment of epilepsy, and it can especially regulate neurotransmitter metabolic level.

[**Keywords**] epilepsy; Chaihu Longgu Muli Decoction; network pharmacology; molecular mechanism; signaling pathway

癫痫是一种常见的、持续存在的威胁生命的神经系统疾病,全球约 8 000 万人罹患该病,其特征是持久自发性癫痫发作的倾向^[1]。研究发现约 30% 的患者癫痫发作仍未得到控制^[2]。因此,开发具有疗效好、副作用少的抗癫痫药物已成研究重点^[3]。

现代药理学发现中药柴胡龙骨牡蛎汤(CLMD)治疗癫痫具有良好的效果^[4]。我们前期研究发现,CLMD 可通过增加 SOD,降低 MDA,明显改善颞叶癫痫患者症状^[5]。但 CLMD 为复方制剂,各味中药中所含成分庞杂,药效物质基础和分子机制依然不十分明确。故本研究基于网络药理学以及生物信息学方法,拟筛选和预测 CLMD 治疗癫痫的重要活性成分和作用靶点,以及相关的通路,并建立动物模型进行验证,探讨其抗癫痫的作用机制。

1 材料和方法

1.1 CLMD 活性成分筛选

将 CLMD 所有药物成分通过检索中药系统药理学数据库和分析平台^[6](Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform, TCMSP)挖掘 CLMD 所有成分数据,根据成分药理学吸收、分布、代谢、排泄(ADME)参数^[7]行初步筛选,筛选条件为药物口服生物利用度(oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$,药物相似性(drug likeness, DL) ≥ 0.18 ^[8]。

1.2 CLMD 作用靶点预测及生物活性成分-靶点网络构建

预测筛选后的 CLMD 主要生物活性成分的作用靶点,预测使用 TCMSP 提供的靶点预测模型。利用网络绘图软件 Cytoscape 3.4.0^[9]构建 CLMD 主要生物活性成分-靶点之间的作用网络。

1.3 癫痫疾病相关靶点检索

通过 TCMSP、DrugBank^[10]、TTD^[11]、PharmGKB^[12]、GAD^[13]等与疾病靶点相关的数据库,以“Epilepsy”作为关键词对癫痫相关靶点进行检索及挑选,获得癫痫发病过程中已知的靶点。

1.4 CLMD 抗癫痫的蛋白质-蛋白质相互关系网络构建

构建药物直接靶点与其他蛋白之间的蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络,用于发掘药物可能靶点之间的直接、间接调控作用关系。对药物靶点以及疾病靶点通过蛋白-蛋白相互作用关系数据库 String^[14]进行互作分析,筛选条件为互作分数大于 700 的较强互作关系。对获得的两个互作网络抽取交集的靶点网络,构建 CLMD 治疗癫痫的直接和间接靶点调控网络图。

1.5 基因通路富集分析

通过基因富集分析插件 ClueGO^[15]对获得的药物/疾病直接互作的关键靶点进行 KEGG 通路富集分析,研究 CLMD 抗癫痫可能的作用机制(同种类型的信号通路使用同种颜色的节点,信号通路的显著程度通过节点的大小表示)。并对上述靶点进行 GO 通路富集分析,对 $P < 0.05$ 且排名前十的通路构图并对比分析。

1.6 动物实验验证

30 只健康雄性 SPF 级 SD 大鼠(许可证编号:SYXK [湘]2016-0005)随机分为对照组,模型组,CLMD 低、中、高剂量组,每组 6 只。除对照组以外均采用氯化锂-匹罗卡品建立癫痫模型^[16]。对照组、模型组给予等量生理盐水灌胃,CLMD 低、中、高剂量给予 CLMD 12.5 g/kg、25 g/kg、50 g/kg, ig, 1 次/d, 连续 28 d。将大鼠麻醉(10%水合氯醛 500 mg/kg, ip)后,左心室抽取动脉血 5 mL 进行 ELISA 检测血浆 γ -氨基丁酸(GABA)、多巴胺(DA)(上海哈灵)水平^[17];灌注后取脑采用 HE 染色检测海马 CA1 区神经元细胞形态^[18]。ELISA 检测数据以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,利用 SPSS 24.0 软件,多组间比较进行单因素方差分析,两两比较用 LSD-T 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CLMD 生物活性成分筛选与 ADME 分析

本研究在 TCMSP 数据库中检索到 CLMD 成分 637 个,根据 DL 和 OB 参数从中挑选,获得 58 个

CLMD 的主要生物活性成分。CLMD 及其活性成分见图 1。利用 TCMSp 提供的药物成分靶点数据挑选出 42 个有对应靶点的活性成分。

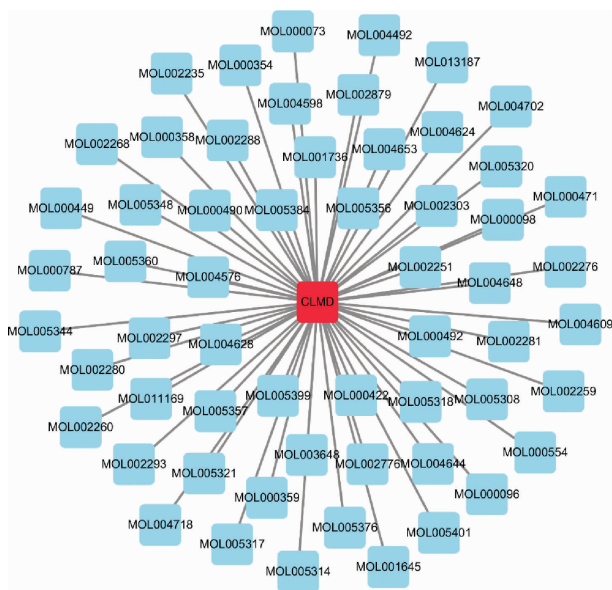
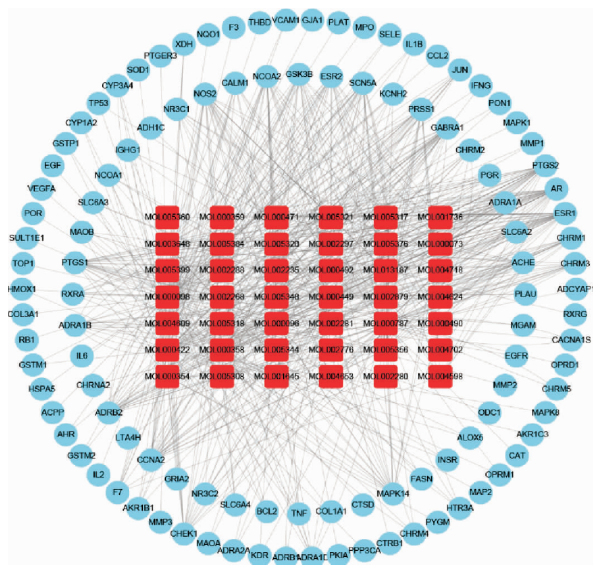


图 1 符合 CLMD 筛选条件的活性成分

2.2 CLMD 作用靶点预测及生物活性成分-靶点网络构建

预测上述得到的 42 个生物活性成分的作用靶点,排除重复靶点后获得 110 个成分作用靶点。利用 Cytoscape 3.4.0 绘制 CLMD 主要生物活性成分-靶点之间的作用网络。共获得 619 对生物活性成分与对应作用靶点,其中基质金属蛋白酶 2(matrix metalloproteinase 2,MMP2),丝裂原活化蛋白激酶 14(mitogen-activated protein kinases14,MAPK14),TP53 等靶点也能与多个成分形成作用关系。见图 2。



注:红色方框为 CLMD 活性成分

图 2 CLMD 活性成分-靶点网络图

2.3 癫痫相关靶点检索

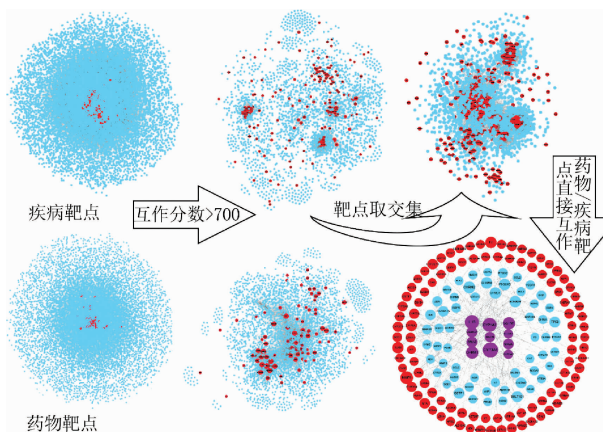
通过检索疾病基因相关数据库,获得与癫痫发生、发展密切相关的靶点基因共 213 个,其中 TCM-SP、PharmGK、TTD、DrugBank、GAD 数据库分别检索到 11、34、23、88、122 个靶点。

2.4 CLMD 治疗癫痫的 PPI 网络构建及关键靶点筛选

利用数据库 String 对癫痫相关的靶点基因进行 PPI 网络构建,213 个靶点基因中有 184 个与 12 536 个靶点之间有相互作用,这些靶点基因与其他靶点之间的相互作用关系多达 115 864 个。从中筛选了互作分数大于 700 的 PPI。最终获得 183 个疾病相关靶点与其他 2 374 个靶点之间的相互作用关系 9 736 个。

对 CLMD 活性成分的作用靶点进行 PPI 网络构建可知,在 110 个药物靶点基因中有 97 个与 12 841 个靶点之间有相互作用,这种作用关系达 135 163 个。筛选互作分数大于 700 之后,获得 3 578 个互作靶点,相互作用关系达 11 623 个。

将癫痫靶点网络和 CLMD 活性成分靶点网络相结合,作用靶点取交集后构建 CLMD 活性成分-癫痫相关基因网络。该网络中有 1601 个节点,相互作用关系 13 919 个。我们从中筛选出 CLMD 活性成分靶点和癫痫靶点基因之间有直接相互作用的网络,得到 169 个靶点(包括 110 个癫痫相关靶点,70 个药物作用靶点,共同靶点 11 个,即 CHRNA2、CYP1A2、CYP3A4、GABRA1、GRIA2、GSTM1、IL1B、MAOA、MAOB、OPRM1、SLC6A4)之间的相互作用关系 410 个。筛选策略图见图 3。



注:红色代表疾病/药物靶点基因;最终筛选结果图中红色节点代表癫痫相关靶点,蓝色代表药物直接作用靶点,紫色代表在癫痫相关靶点以及药物靶点中共有的靶点。节点大小表示与其关联的靶点数量高低。

图 3 CLMD 治疗癫痫关键节点目标筛选策略图

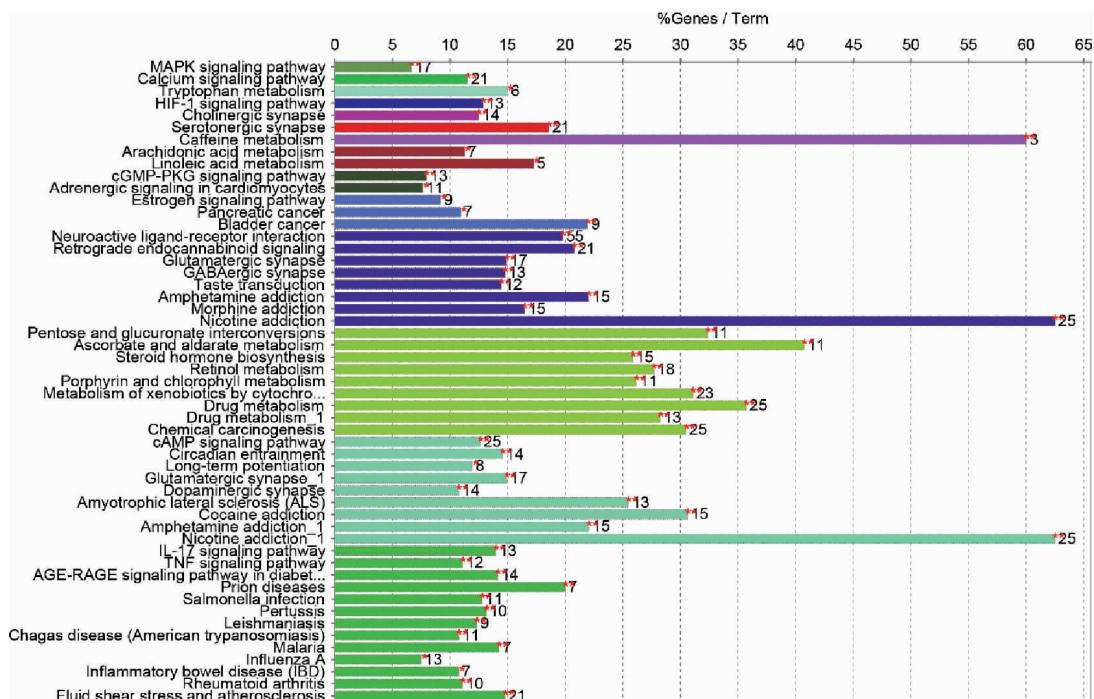
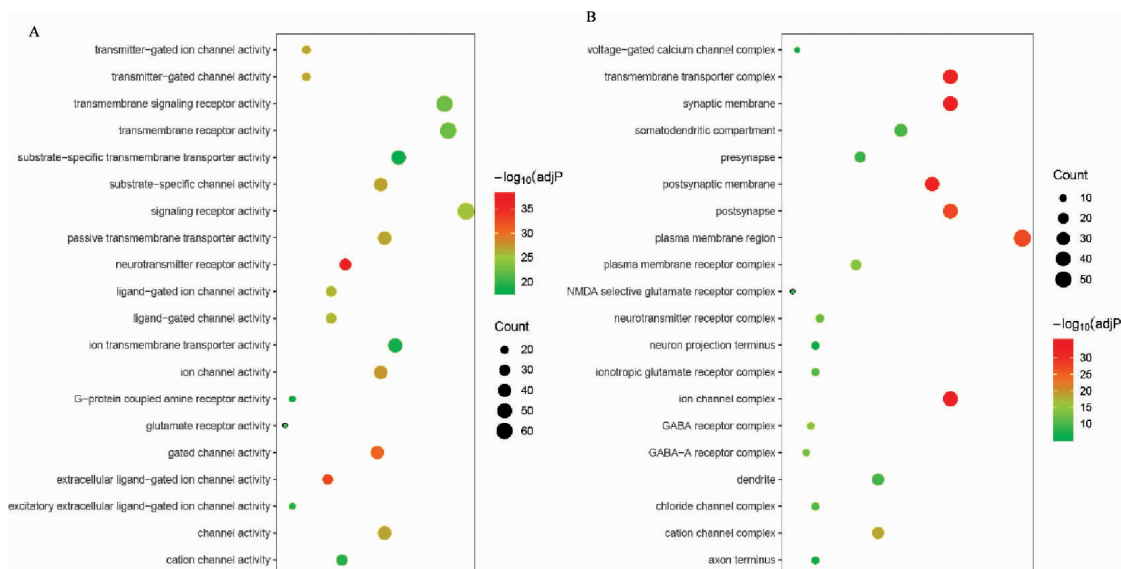


图 4 关键靶点基因 KEGG 通路富集结果



注: A.分子功能;B.细胞组分

图 5 关键靶点基因 GO 通路富集结果

2.5 CLMD 治疗癫痫的机制分析

利用 ClueGO 对上一步筛选得到的 169 个关键靶点基因做 KEGG 以及 GO 通路富集分析,KEGG 通路富集结果显示,CLMD 治疗癫痫的关键靶点主要与尼古丁成瘾、神经递质、炎症、药物代谢、神经活性配体-受体相互作用等 53 条相关信号通路(图 4)。GO 分子功能通路富集分析显示这些重要靶点主要分布在一些神经递质、离子通道相关的通路,而细胞组分通路富集结果显示它们主要分布在与膜、突触、通道复合物等相关的通路中(图 5)。

2.6 各组大鼠血浆 GABA、DA 测定

与对照组相比,模型组血浆中 GABA 显著降低、DA 显著升高($P<0.01$);与模型组相比,CLMD 低、中、高剂量组 GABA 升高,CLMD 高剂量组 DA 降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与 CLMD 高剂量组相比,CLMD 低、中剂量组 GABA 水平显著升高,DA 降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。见表 1。

2.7 各组大鼠海马 CA1 区神经元细胞结构情况比较

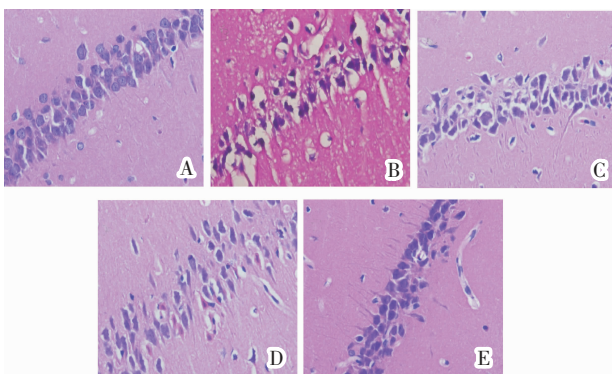
对照组海马 CA1 区神经元排列整齐,细胞形态

表1 各组大鼠血浆 GABA、DA 水平变化 ($\bar{x} \pm s, n=6, \text{pg/mL}$)

组别	GABA	DA
对照组	1.852±0.121	27.831±2.040
模型组	1.078±0.066**	57.318±3.310**
CLMD 低剂量组	1.300±0.087 ^{###}	52.630±2.890 ^{###}
CLMD 中剂量组	1.510±0.129 ^{###}	49.825±5.610 [#]
CLMD 高剂量组	1.677±0.134 ^{##}	37.756±2.750 ^{##}

注:与对照组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组相比,+ $P<0.05$,
 $++P<0.01$;与 CLMD 高剂量组相比,# $P<0.05$,## $P<0.01$

结构完整;模型组海马 CA1 区神经元排列疏松,出现细胞肿胀,伴有不同程度的细胞固缩;CLMD 各剂量组海马 CA1 区神经元细胞形态明显改善,尤其是 CLMD 高剂量组(图 6)。



注:A.对照组;B.模型组;C.CLMD 低剂量组;D.CLMD 中剂量组;
 E.CLMD 高剂量组

图6 各组大鼠海马 CA1 区的 HE 染色($\times 400$)

3 讨论

癫痫属中医学“痫病”范畴,病因主要责之于痰,明·楼英《医学纲目·癫痫》云“癫痫者,痰邪逆上也”,痰邪贯穿疾病始终,故有“无痰不作痫”之说。治疗上当以涤痰开窍,镇惊安神为主。柴胡加龙骨牡蛎汤(CLMD)出自汉·张仲景《伤寒论》第 107 条,是柴胡证中和解法的代表方剂之一,具有和解痰瘀,泄热安神之功。本方柴胡、黄芩主入肝胆清其胸胁之热,半夏、生姜、茯苓降逆化痰浊,桂枝、人参、大枣升中土归化万物,龙骨、牡蛎、铅丹镇惊安神,大黄下其瘀热。故清·徐灵胎《伤寒论类方》言:“本方能下肝胆之惊痰,以之治癫痫必效。”

本研究通过初步筛选获得了 62 个 CLMD 的主要生物活性成分,并在此基础上利用最终得到的 42 个生物活性成分,继而挖掘出 110 个靶点基因以及相互作用关系 619 个。生物活性成分-靶点网络分析显示,CLMD 能作用于网络中的多个靶点,

MMP2、MAPK14、TP53 等靶点也能与多个成分形成作用关系。然后通过 CLMD 生物活性成分-癫痫靶点网络构建分析,得到 CLMD 治疗癫痫的 169 个关键基因(共同靶点 11 个,即 CHRNA2、CYP1A2、CYP3A4、GABRA1、GRIA2、GSTM1、IL1B、MAOA、MAOB、O-PRM1、SLC6A4)。因此,CLMD 有效成分之间不仅存在紧密的协同关系,而且其作用的靶点也在癫痫疾病进程中发挥着重要作用。

通路富集结果显示,CLMD 主要通过影响尼古丁成瘾、神经递质、炎症、药物代谢、神经活性配体-受体相互作用等相关通路而发挥治疗癫痫作用。GO 分析发现 γ -氨基丁酸(GABA)-A 受体活性、电压门控钙通道、多巴胺能、谷氨酸能等。(1)GABA 是一种抑制性的神经递质,GABA-A 受体与癫痫关系最密切,多项实验证实兴奋 GABA-A 受体能抑制癫痫发作,抑制 GABA-A 受体则会诱发癫痫^[20]。(2)电压门控钙通道广泛分布于中枢神经系统中,其中 L 型钙通道可能与癫痫的发生有密切的关系,其阻断剂维拉帕米通过提高内质网上钙联结蛋白的转运和组装能力来大幅增强 GABA-A 受体的 α 亚基的表达^[21]。(3)多巴胺是中枢神经系统的单胺类神经递质之一,其中 D1 类受体可增强兴奋性氨基酸神经毒性,降低抑制性神经递质浓度。同时,可能通过增加 Ca^{2+} ,从而动作电位后出现持续性去极化状态,加强癫痫活动^[22]。(4)谷氨酸是中枢神经系统主要的兴奋性氨基酸神经递质,其中 NMDA 受体可直接与离子通道相耦联,与兴奋性氨基酸结合后,引起 Ca^{2+} 和 Na^{+} 内流,诱发脑内的异常电活动^[22]。目前研究证实,癫痫患者的重要病理学改变为海马硬化,主要表现为海马区神经元的丢失和胶质增生并伴有齿状回颗粒细胞轴突的出芽、神经发生以及炎症反应^[23]。本研究动物实验发现锂-匹罗卡品癫痫大鼠海马 CA1 区神经元细胞固缩,而 CLMD 可改善海马 CA1 区神经元细胞形态、增加 GABA、降低 DA,从而保护海马区神经元细胞。

综上,基于网络药理学、生物信息学分析及实验验证揭示出 CLMD 可能通过神经递质与离子通道发挥抗癫痫机制,为后续研究及实验提供重要的理论依据,也为药物作用机制研究和药物研发提供了新思路和新方法。

参考文献

- [1] HWANG G, DABBS K, CONANT L, et al. Cognitive slowing and its underlying neurobiology in temporal lobe epilepsy [J].

- Cortex,2019,117:41–52.
- [2] GUR-OZMEN S, MULA M, AGRAWAL N, et al. The effect of depression and side effects of antiepileptic drugs on injuries in patients with epilepsy[J]. *European Journal of Neurology*, 2017, 24(9):1135–1139.
- [3] ADAMS J, ALIPIO-JOCSON V, INOYAMA K, et al. Methylphenidate, cognition, and epilepsy: A 1-month open-label trial[J]. *Epilepsia*,2017,58(12):2124–2132.
- [4] 卢化平.柴胡加龙骨牡蛎汤治疗癫痫 50 例[J].*四川中医*,1998,16(7):36.
- [5] 肖慧琼,杨 萍,彭红莉.柴胡加龙骨牡蛎汤对颞叶癫痫患者 SOD、MDA 的影响[J].*中国医师杂志*,2018,20(3):357–359,363.
- [6] LI Y, ZHANG J, ZHANG L, et al. Systems pharmacology to decipher the combinational anti-migraine effects of Tianshu formula[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2015, 174:45–56.
- [7] LIU H, WANG J, ZHOU W, et al. Systems approaches and polypharmacology for drug discovery from herbal medicines: An example using licorice[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2013,146(3):773–793.
- [8] LI J, ZHAO P, LI Y, et al. Systems pharmacology – based dissection of mechanisms of Chinese medicinal formula Bufeì Yishen as an effective treatment for chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5:15290.
- [9] SHANNON P, MARKIEL A, OZIER O, et al. Cytoscape: A software environment for integrated models of biomolecular interaction networks[J]. *Genome Research*, 2003, 13(11):2498–2504.
- [10] WISHART D S, KNOX C, GUO A C, et al. DrugBank: a knowledgebase for drugs, drug actions and drug targets[J]. *Nucleic Acids Research*, 2008, 36(DI): D901–906.
- [11] LIU X, ZHU F, MA X, et al.The Therapeutic Target Database: an Internet resource for the primary targets of approved, clinical trial and experimental drugs[J]. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 2011,15(8):903–912.
- [12] MA Q, LU A Y. Pharmacogenetics, Pharmacogenomics, and Individualized Medicine[J]. *Pharmacol Reviews*, 2011, 63(2):437–459.
- [13] BECKER K G, BARNES K C, BRIGHT T J, et al. The Genetic Association Database[J]. *Nature Genetics*, 2004,36(5):431–432.
- [14] SZKLARCZYK D, FRANCESCHINI A, WYDER S, et al. STRING v10: protein–protein interaction networks, integrated over the tree of life[J]. *Nucleic Acids Research*,2015,43(DI):D447–452.
- [15] BINDEA G, MLECNIK B, HACKL H, et al. ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks[J]. *Bioinformatics*, 2009, 25(8): 1091–1093.
- [16] BRANDT C, BANKSTAHL M, TÖLLNER K, et al. The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy: Marked intrastrain differences in female Sprague–Dawley rats and the effect of estrous cycle[J]. *Epilepsy Behavior*,2016,61:141–152.
- [17] HOLTMAN L, VAN VLIET EA, ARONICA E, et al. Blood plasma inflammation markers during epileptogenesis in post –status epilepticus rat model for temporal lobe epilepsy[J]. *Epilepsia*, 2013, 54(4):589–595.
- [18] XIE H, ZHAO Y, ZHOU Y, et al. MiR–9 Regulates the Expression of BACE1 in Dementia Induced by Chronic Brain Hypoperfusion in Rats[J]. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2017,42(3):1213–1226.
- [19] BHAT M A, GURU S A, MIR R, et al. Association of GABAA Receptor Gene with Epilepsy Syndromes[J]. *Journal of Molecular Neuroscience*,2018,65(2):141–153.
- [20] HAN D Y, GUAN B J, WANG Y J, et al. L-type Calcium Channel Blockers Enhance Trafficking and Function of Epilepsy-associated $\alpha 1$ (D219N) Subunits of GABA (A) Receptors[J]. *ACS Chemical Biology*, 2015, 10(9):2135–2148.
- [21] LOUCKS C M, PARK K, WALKER D S, et al. EFHC1, implicated in juvenile myoclonic epilepsy, functions at the cilium and synapse to modulate dopamine signaling[J]. *Elife*, 2019, 8: e37271.
- [22] MARWICK K F M, HANSEN K B, SKEHEL P A, et al. Functional assessment of triheteromeric NMDA receptors containing a human variant associated with epilepsy[J]. *Journal of Physiology*, 2019, 597(6):1691–1704.
- [23] MENG X F, TAN L, TAN M S, et al. Inhibition of the NLRP3 inflammasome provides neuroprotection in rats following amygdala kindling–induced status epilepticus[J]. *Journal of Neuroinflammation*, 2014, 11(1): 212.

(本文编辑 苏 维)