

基于GC-MS与网络药理学的青皮挥发油防治阿尔茨海默症的活性成分及作用机制研究^Δ

王腾华^{1*}, 罗颖懿², 王馥辰³, 任之尧⁴, 唐建新¹, 李咏梅¹, 方翼^{1#}, 吴波^{5#}(1.广州医科大学附属第五医院药理学部, 广州 510700; 2.中山大学孙逸仙纪念医院药理学部, 广州 510120; 3.深圳中学高中部, 广东深圳 518001; 4.广州中医药大学中药学院, 广州 510006; 5.广州医科大学药学院, 广州 511436)

中图分类号 R284.2; R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)17-2093-08

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.17.09

摘要 目的: 预测青皮挥发油防治阿尔茨海默病(AD)的主要活性成分和潜在作用靶点。方法: 采用气质联用技术(GC-MS)分析青皮挥发油化学成分, 并借助NIST 11.L数据库和人工数据解析进行成分的结构鉴定。借助中药系统药理学分析平台(TC-MSP)、PharmMapper数据库等预测青皮挥发油活性成分及其对应靶点, 借助GeneCards数据库、人类孟德尔遗传数据库等挖掘AD相关靶点; 利用Venny 2.1.0软件映射以获取青皮挥发油防治AD的直接靶点; 借助STRING数据库和Cytoscape 7.2.1软件挖掘核心节点, 利用Venny 2.1.0软件映射并去重后获取青皮挥发油防治AD的间接靶点; 借助DAVID 6.7数据库对上述直接和间接靶点(即作用靶点)进行基因本体(GO)功能富集和KEGG通路富集分析; 采用Cytoscape 7.2.1软件, 以节点度值、介数中心度、紧密中心度为指标, 对青皮挥发油“活性成分-作用靶点”网络进行拓扑学分析, 挖掘关键成分和关键靶点。结果与结论: GC-MS法共分离并鉴定出青皮挥发油化学成分40个, 均为活性成分, 包括右旋柠檬烯、 γ -蒎品烯等。共挖掘出活性成分对应靶点151个、AD相关靶点1 291个, 其中直接靶点48个、间接靶点41个。上述89个作用靶点主要富集于细胞分数、轴突、胞浆等细胞组分, 细胞内信号级联、对有机物的反应等生物过程, 蛋白激酶活性、胺受体活性等分子功能, 以及癌症通路、钙信号通路、神经营养信号通路等信号通路($P < 0.05$)。共挖掘出 α -蒎品烯、 β -elemen、百里酚、(-)-4-蒎品醇等关键成分10个, 雄激素受体(AR)、前列腺素G/H合酶2(PGSG2)、丝裂原活化蛋白激酶14、毒蕈碱乙酰胆碱受体M1等关键靶点21个, 表明青皮挥发油防治AD呈多成分、多靶点、多通路的作用特点。

关键词 青皮; 挥发油; 气质联用技术; 网络药理学; 阿尔茨海默病; 机制

Study on Active Components and Mechanism of Volatile Oil of *Citri reticulatae* Preventing and Treating Alzheimer's Disease Based on GC-MS and Network Pharmacology

WANG Tenghua¹, LUO Yingyi², WANG Yuchen³, REN Zhiyao⁴, TANG Jianxin¹, LI Yongmei¹, FANG Yi¹, WU Bo⁵
(1. Dept. of Pharmacy, the Fifth Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510700,

- dendritic cell maturation and anti-cancer immunity[J]. *Oncoimmunology*, 2017. DOI: 10.1080/2162402X.2017.1325981.
- [16] TAN W, YU K Q, LIU YY, et al. Anti-fatigue activity of polysaccharides extract from *Radix Rehmanniae Preparata*[J]. *Int J Biol Macromol*, 2012, 50(1): 59-62.
- [17] 付昊, 龙虎, 蔡自建, 等. 熟地黄多糖的体内抗氧化活性研究[J]. *食品研究与开发*, 2019, 40(4): 57-61.
- [18] HARMAN D. About "origin and evolution of the free radical theory of aging: a brief personal history, 1954-2009"[J]. *Biogerontology*, 2009, 10(6): 773-781.
- [19] SEVAG MG, LACKMAN DB, SMOLENS J. The isolation of the components of streptococcal nucleoproteins in serologically active form[J]. *J Biol Chem*, 1938, 124(1): 425-436.
- [20] 徐叔云, 卞如濂. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 1464-1466.
- [21] 刘涛, 王灿晖, 杨进, 等. 改良三甲散抗脑衰老作用的实验研究[J]. *中国老年学杂志*, 2001, 21(4): 308-309.
- [22] 沙爱龙, 吴瑛, 盛海燕, 等. 昆仑雪菊黄酮对衰老模型小鼠脑及脏器指数的影响[J]. *动物医学进展*, 2013, 34(7): 66-68.
- [23] 王茨, 迟伟群, 姜晓峰. 自身抗体及炎症因子与动脉粥样硬化相关性的研究进展[J]. *中国实验诊断学*, 2020, 24(6): 1052-1056.
- (收稿日期: 2020-04-24 修回日期: 2020-07-21)
(编辑: 林 静)

China; 2. Dept. of Pharmacy, Sun Yat-sen Memorial Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China; 3. Senior School Section, Shenzhen Middle School, Guangdong Shenzhen 518001, China; 4. College of Chinese Medicine, Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510006, China; 5. School of Pharmaceutical Sciences, Guangzhou Medical University, Guangzhou 511436, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To predict the active components and potential target of volatile oil of *Citri reticulatae* preventing and treating Alzheimer's disease (AD). METHODS: The volatile oil of *C. reticulatae* was determined by GC-MS, and identified according to NIST 11.L database and manual data analysis. The active components and targets of volatile oil of *C. reticulatae* were predicted through TCMSP and PharmMapper database. The related targets of AD were obtained by using GeneCards and OMIM databases. Venny 2.1.0 software mapping was used to obtain the direct targets of volatile oil of *C. reticulatae* against AD. Core nodes were mined with STRING database and Cytoscape 7.2.1 software, and the indirect targets of volatile oil of *C. reticulatae* against AD were obtained by mapping and duplication coith Venny 2.1.0 software. With the help of DAVID 6.7 database, the above direct and indirect targets (i.e. action targets) were used for gene ontology (GO) function enrichment analysis and KEGG pathway enrichment analysis. Using Cytoscape 7.2.1 software, topology analysis was conducted for the network of "active components-acting targets" of volatile oil of *C. reticulatae*, with node degree value, betweenness centrality and closeness centrality as indexes, then key components and key targets were mined. RESULTS & CONCLUSIONS: A total of 40 chemical components in volatile oil were identified by GC-MS, all of them were active components, including *D*-limonene, γ -terpinene, etc. A total of 151 active components-corresponding targets and 1 291 AD-related targets were mined, including 48 direct targets and 41 indirect targets. The above 89 targets were mainly concentrated in cell fraction, axon, cytosol and other cell components; intracellular signaling cascade, response to organic substance and other biological processes; protein kinase activity and amine receptor activity and other molecular functions; as well as cancer pathway, calcium signaling pathway and neurotrophin signaling pathway ($P < 0.05$). A total of 10 key components including α -terpinene, β -elemen, thymol and (-)-4-terpineol, as well as 21 key targets such as androgen receptor, prostaglandin G/H synthase 2, mitogen activated protein kinase 14, muscarinic acetylcholine receptor M1 were excavated, indicating the effect of volatile oil of *C. reticulatae* against AD had the characteristics of multi-component, multi-target and multi-channel.

KEYWORDS *Citri reticulatae*; Volatile oil; GC-MS; Network pharmacology; Alzheimer's disease; Mechanism

青皮为芸香科植物橘(*Citrus reticulata* Blanco)及其栽培变种的干燥幼果或未成熟果实的果皮。其中,5~6月收集自落的幼果晒干者,习称“个青皮”;7~8月采收未成熟的果实,在果皮上纵剖成四瓣至基部,除尽瓜瓣后晒干者,习称“四花青皮”^[1]。除橘类未成熟果实的果皮外,其同属植物甜橙[*C. sinensis* (Linn.) Osbeck]、枸橼(*C. medica* L.)以及茶枝柑(*C. reticulata* Blanco cv. Chachiensis)等柑类未成熟果实的果皮在有的地区亦作青皮使用^[2]。青皮味辛、苦,性微温,沉降下行,偏于疏肝胆气分,有破气行痰、消积化滞之功效^[3],对心脑血管、消化系统、呼吸系统^[4]及平滑肌^[5]均具有广泛的药理作用,主要用于治疗肝气郁滞、疝气、胸胁胃脘疼痛、食积、乳房胀痛、腕闷暖气、久疔癍块等症^[6-7]。青皮挥发油为其主要药效成分之一,具有理气、调气和抗菌等活性^[8-10]。其中,*D*-柠檬烯是青皮发挥理气作用的主要有效成分,同时还兼具祛痰、抗肿瘤^[11-14]和广谱抗菌^[15]等作用;对伞花烃、芳樟醇、 α -萜品醇以及柠檬醛等是青皮发挥调气作用的主要成分^[4],且 α -萜品醇还具有显著的抗菌作用^[16]。

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种中枢神经退行性疾病,也是老年痴呆中较常见的类型之一。现有治疗药物的效果欠佳^[17],其中常用的乙酰胆碱

酯酶抑制剂等化学药物作用靶点单一,且长期服用会引发副作用和成瘾性^[18]。因此,多靶点抗AD研究已成为相关药物研发的热门方向^[19]。中药具有丰富的药理活性,可通过多通路、多靶点发挥治疗作用^[4]。中药挥发油是中药材中一种具有挥发性的油状液体,易透过血脑屏障并迅速入脑,具有药理活性丰富、起效靶点多、不良反应较少且症状轻微等特点;同时,其独特的芳香气味的容易让患者接受并在治疗过程中产生愉悦感^[18]。可见,中药挥发油在防治AD领域中可能具有较大潜力。已有研究显示,罗勒挥发油可抗抑郁^[20],石菖蒲挥发油可抗焦虑^[21],辛夷、温郁金挥发油可改善实验动物的学习记忆能力^[22-23],当归挥发油可提高记忆力、防治AD^[24]等。有关青皮挥发油防治AD方面的研究主要集中于相关复方中,如:存注丹可缓解老年人健忘^[25],加味癫狂梦醒汤联合盐酸多奈哌齐可更有效地改善AD痰瘀互结证患者的中医证候^[26]。考虑到中药挥发油用于防治情志病具有一定的潜力,加之青皮也用于治疗AD的中药复方中,故本研究拟探索青皮挥发油防治AD的潜在靶点与途径,为进一步阐明复方中单味药的作用机制奠定基础。

中药具有多成分、多途径、多靶点的作用特点,其疗效通常取决于其中有效成分群的综合作用。网络药理学是一种药物设计的新方法,涉及生物信息学、多向药

理学、计算机科学等多学科的技术和知识,可多方位地阐释药物治疗疾病的潜在靶点及作用机制,体现了药物作用的整体性和系统性,与中药作用特点相一致^[27-30]。为此,本研究通过气质联用技术(GC-MS)对青皮挥发油中的活性成分进行定性分析,并借助网络药理学研究思路对所鉴定出的化学成分进行信息挖掘,筛选出青皮挥发油防治AD的关键活性成分、关键作用靶点以及潜在信号通路,旨在为青皮挥发油用于防治AD的深入研究提供参考。

1 材料

1.1 仪器

7890A/5975C型GC-MS仪,配电子轰击(EI)离子源以及5975C-GC/MSD数据处理系统(美国Agilent公司);TC-15型恒温电热套(海宁市新华医疗器械厂);Milli-Q型超纯水系统(美国Millipore公司)。

1.2 药材与试剂

青皮幼果采自江西省吉安市新干县山湖镇青皮种植基地,经广东省中医药科学院黄志海教授鉴定为芸香科植物橘(*C. reticulata* Blanco)的幼果。将其果皮上纵剖成四瓣至基部,除尽瓜瓣,将所得果皮部分自然晒干后,即得四花青皮药材。无水硫酸钠、甲苯、石油醚(60~90℃)等试剂均为分析纯,水为超纯水。

2 方法

2.1 挥发油提取

参照2015年版《中国药典》(四部)通则中“2204挥发油测定法”项下“甲法”操作:称取四花青皮药材50g,加10倍量(mL/g)水,浸泡2h,回流提取9h,得黄色透明液体,经无水硫酸钠干燥后,即得青皮挥发油。平行操作3次。每克药材可得挥发油(1.367±0.058)mL。

2.2 GC-MS分析

2.2.1 GC条件 色谱柱:HP-5MS 5 Phenyl-Methyl Siloxane石英毛细管柱(30 m×250 μm,0.25 μm);升温程序(初始温度50.00℃,以0.40℃/min升至55.92℃,以0.20℃/min升至58.00℃,再以15.00℃/min升至88.00℃并保持2.00min;以1.30℃/min升至131.70℃,以0.80℃/min升至137.00℃,再以1.50℃/min升至148.00℃并保持2.00min;以15.00℃/min升至248.00℃,以20.00℃/min升至280.00℃。总运行时间:87.04min);进样口温度:250℃;气化室温度:250℃;载气(氦气)流速:1.0 mL/min;进样量:1.0 μL;进样方式:分流进样,分流比:10:1。

2.2.2 MS条件 离子源:EI离子源;离子源温度:230℃;四极杆温度:150℃;电子轰击能量:70 eV;溶剂延迟:3 min;扫描范围:*m/z* 50~500。

2.2.3 青皮挥发油成分分析 取“2.1”项下青皮挥发油,用适量石油醚溶解后,按“2.2.1”“2.2.2”项下GC-MS条件进样分析,记录色谱图和质谱数据。所得质谱数据通

过NIST 11.L质谱数据库检索、匹配后,经人工解析并确定各化学成分的结构。

2.3 网络药理学分析

2.3.1 青皮挥发油活性成分的筛选 将“2.2.3”项下已鉴定出的青皮挥发油成分输入至中药系统药理学分析平台(TCMSP, <http://lsp.nwu.cn/tcmsp.php>),以口服利用度(OB)≥30%、类药性(DL)≥0.18作为筛选条件^[31]对青皮挥发油活性成分进行筛选。

2.3.2 青皮挥发油对应靶点的收集 将“2.3.1”项所得青皮挥发油活性成分录入TCMSP和PharmMapper数据库(<http://www.lilab-ecust.cn/pharmmapper/>),限定物种为“人类(Homo sapiens)”。将检索所得各靶点以反向对接结合值(即Fit值)降序排列,选择前20位作为每个成分对应的主要靶点^[32]。将上述主要靶点录入UniProt数据库(<http://www.uniprot.org>),限定物种为“人类(Homo sapiens)”,检索相应的UniProt ID,并获取对应的基因简称(Gene symbol),去重后即得青皮挥发油活性成分的对应靶点。

2.3.3 AD相关靶点的收集 以“Alzheimer's disease”为关键词,在GeneCards数据库(<https://www.genecards.org/>)、人类孟德尔遗传数据库(OMIM, <https://omim.org/>)中检索AD相关靶点。其中,GeneCards数据库中以相关分数(Relevance score)>10为标准^[33]进行筛选。将两个数据库的检索结果去重后,即得AD相关靶点。

2.3.4 青皮挥发油防治AD直接靶点的收集 利用Venny 2.1.0软件映射“2.3.2”“2.3.3”项下所得青皮挥发油活性成分对应靶点和AD相关靶点,即得青皮挥发油防治AD的直接靶点。

2.3.5 青皮挥发油防治AD作用靶点的确定 为明确青皮挥发油成分靶点与疾病AD靶点之间的相互作用关系,将“2.3.2”“2.3.3”项下所得青皮挥发油活性成分对应靶点和AD相关靶点导入STRING数据库(<https://string-db.org/>),限定物种为“人类(Homo sapiens)”,设置较高置信度(High confidence)≥0.700^[34],除去未相互连接的节点(Node)后,得“靶点互作”网络并保存为“tsv”格式文件;将上述文件导入Cytoscape 7.2.1软件,运用软件中的“CentiScaPe 2.2”插件计算节点度值(Degree),选取度值大于平均度值2倍的靶点作为核心节点(Hub node)^[35]。利用Venny 2.1.0软件将该核心靶点与“2.3.2”“2.3.3”项下所得青皮挥发油活性成分对应靶点和AD相关靶点进行映射,选择与活性成分对应靶点的交集靶点,在排除与“2.3.4”项下直接靶点重复的靶点之后,即得青皮挥发油防治AD的间接靶点。将直接靶点与间接靶点合并,即得青皮挥发油防治AD作用靶点。

2.3.6 基因本体(GO)功能和KEGG通路富集分析 将“2.3.5”项下所得青皮挥发油防治AD作用靶点录入DAVID 6.7数据库(<https://david-d.ncicrf.gov/summary>。

jsp), 限定物种为“人类(Homo sapiens)”, 进行GO功能富集和KEGG通路富集分析, 以 $P < 0.05$ 为显著富集, 且 P 值越小则显著性程度越高^[36]。将 P 值由小到大排序, 取前10位利用GraphGad PrinSm 7软件绘制GO功能富集柱状图(即二级分类柱状图, 包括细胞组分、分子功能、生物过程); 将 P 值由小到大排序, 利用OmicShare在线工具(<http://www.omicshare.com/>)绘制KEGG通路富集气泡图。

2.3.7 关键成分和关键靶点的筛选 将“2.3.5”项下所得青皮挥发油防治AD作用靶点及相应活性成分通过Cytoscape 3.7.1软件构建青皮挥发油的“活性成分-作用靶点”网络, 并运用软件中“CentiScaPe 2.2”插件进行拓扑学分析, 计算节点度值、介数中心度(Betweenness centrality)和紧密中心度(Closeness centrality), 并选择上述参数均大于其对应均值的成分和靶点作为青皮挥发油抗AD的关键成分和关键靶点^[35], 再通过Cytoscape 3.7.1软件构建“关键成分-关键靶点”网络, 进行可视化展示。

3 结果

3.1 青皮挥发油GC-MS分析结果

青皮挥发油GC-MS总离子流图见图1。经NIST 11.L质谱数据库检索、匹配和人工解析后, 共鉴定出40个成分(匹配度均大于80%), 大多为萜烯类、不饱和醇类、酯类、长链烷烃类以及苯类化合物, 如右旋柠檬烯、 γ -萜品烯、芳樟醇、 β -月桂烯等, 详见表1。

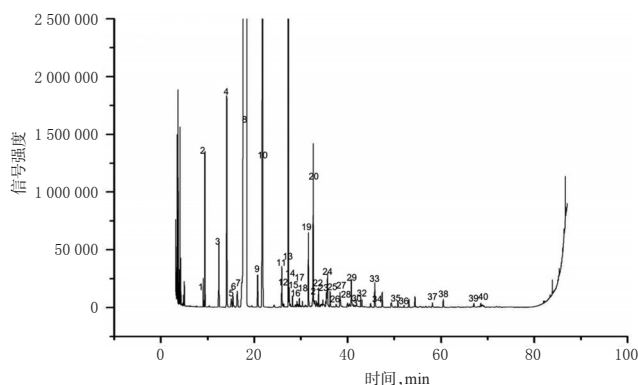


图1 青皮挥发油GC-MS总离子流图

Fig 1 Total ion chromatogram of volatile oil from *C. reticulatae*

3.2 青皮挥发油防治AD作用靶点的筛选结果

表1中, 所有化学成分的OB值均大于30%; 除(-)-4-萜品醇的DL值为0.11外, 其余化学成分的DL值均大于0.18。考虑到(-)-4-萜品醇对情志病具有一定的治疗作用^[37-38], 故本研究将包含其在内的40个化学成分作为活性成分全部导入TCMSP和PharmMapper数据库, 并分别收集到273、760个靶点; 经UniProt数据库校正、去重后得到青皮挥发油活性成分对应靶点151个。以“Alzheimer’s disease”为关键词, 在GeneCards和OMIM数据库中共收集到AD相关靶点1 291个。经

表1 青皮挥发油成分分析结果

Tab 1 Component analysis results of volatile oil from *C. reticulatae*

峰号	名称	分子式	匹配度, %	分子量	保留时间, min
1	3-thujene	C ₁₀ H ₁₆	94	136.13	9.054
2	蒎烯	C ₁₀ H ₁₆	97	136.13	9.400
3	β -蒎烯	C ₁₀ H ₁₆	94	136.13	12.398
4	β -月桂烯	C ₁₀ H ₁₆	91	136.13	14.088
5	α -水芹烯	C ₁₀ H ₁₆	91	136.13	15.045
6	正辛醛	C ₈ H ₁₆ O	96	128.12	15.393
7	α -萜品烯	C ₁₀ H ₁₆	97	136.13	16.339
8	右旋柠檬烯	C ₁₀ H ₁₆	99	136.13	18.308
9	β -罗勒烯	C ₁₀ H ₁₆	97	136.13	20.701
10	γ -萜品烯	C ₁₀ H ₁₆	95	136.13	21.751
11	异松油烯	C ₁₀ H ₁₆	98	136.13	25.888
12	2,4-二甲基苯乙烯	C ₁₀ H ₁₂	97	132.09	26.104
13	芳樟醇	C ₁₀ H ₁₈ O	97	154.14	27.264
14	脱氧芳樟醇	C ₁₀ H ₁₆ O	83	152.12	27.459
15	(R)-氧化柠檬烯	C ₁₀ H ₁₆ O	90	152.12	28.177
16	Cis-2,8-menthadien-1-ol	C ₁₀ H ₁₈ O	98	152.12	29.108
17	β -松油醇	C ₁₀ H ₁₈ O	98	154.14	29.650
18	香茅醛	C ₁₀ H ₁₈ O	96	154.14	30.291
19	(-)-4-萜品醇	C ₁₀ H ₁₈ O	97	154.14	31.579
20	α -松油醇	C ₁₀ H ₁₈ O	87	154.14	32.608
21	癸醛	C ₁₀ H ₂₀ O	91	156.15	33.757
22	Cis-carveol	C ₁₀ H ₁₈ O	98	152.12	34.690
23	橙花醇	C ₁₀ H ₁₈ O	96	154.14	35.455
24	香茅醇	C ₁₀ H ₂₀ O	98	156.15	35.676
25	右旋香芹酮	C ₁₀ H ₁₄ O	95	150.10	36.232
26	香叶醇	C ₁₀ H ₁₈ O	94	154.14	37.506
27	4-(1-甲基烯基)-1-环己烯-1-甲醛	C ₁₀ H ₁₆ O	97	150.10	38.337
28	(+)-p-薄荷-1-烯-9-醇	C ₁₀ H ₁₈ O	98	154.14	40.334
29	百里酚	C ₁₀ H ₁₄ O	95	150.10	40.780
30	4-ethenyl-4-methyl-1-(propan-2-yl)-3-(prop-1-en-2-yl)cyclohexene	C ₁₅ H ₂₄	97	204.19	43.060
31	3,7-dimethyl-2,6-octadiene	C ₁₀ H ₁₈	95	138.14	44.913
32	乙酸橙花酯	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	91	196.15	45.812
33	β -elemen	C ₁₅ H ₂₄	99	204.19	47.404
34	γ -elemene	C ₁₅ H ₂₄	98	204.19	50.744
35	金合欢烯	C ₁₅ H ₂₄	97	204.19	53.114
36	Germacrene D	C ₁₅ H ₂₄	96	204.19	54.405
37	δ -cadinene	C ₁₅ H ₂₄	95	204.19	58.157
38	γ -gurjunene	C ₁₅ H ₂₄	95	204.19	60.476
39	α -gurjunene	C ₁₅ H ₂₄	93	204.19	67.043
40	β -桉叶醇	C ₁₅ H ₂₆ O	97	222.20	68.522

Venny 2.1.0软件映射后, 共得到青皮挥发油防治AD直接靶点48个。

利用STRING数据库和Cytospace 3.7.1软件共筛选出大于平均度值(21.866)2倍的核心节点401个(“靶点互作”网络图略); 经Venny 2.1.0软件映射后, 共得到间接靶点41个。将直接靶点和间接靶点合并, 即得青皮挥发油防治AD作用靶点89个, 详见图2。

3.3 GO功能富集和KEGG通路富集结果

GO功能富集结果显示, 89个作用靶点主要涉及GO功能过程564个($P < 0.05$)。其中, 生物过程富集440个, 以有机物的反应(Response to organic substance)、对内生刺激的反应(Response to endogenous stimulus)、细

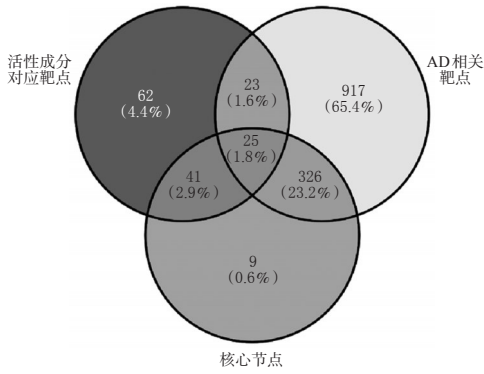


图2 青皮挥发油防治AD作用靶点

Fig 2 Targets of the volatile oil from *C. reticulatae* against Alzheimer's disease

胞内信号级联(Intracellular signaling cascade)等为主;细胞组分富集43个,以细胞分数(Cell fraction)、轴突(Axon)、胞浆(Cytosol)、不溶性组分(Insoluble fraction)等为主;分子功能富集81个,以胺受体活性(Amine receptor activity)、蛋白激酶活性(Protein kinase activity)、胺结合(Amine binding)、肾上腺素受体活性(Adrenoceptor activity)等为主,详见图3。

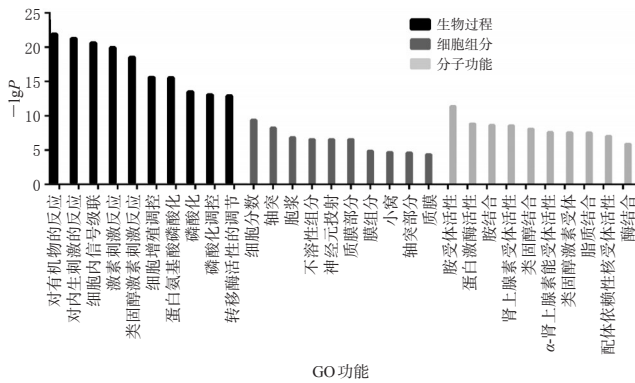


图3 青皮挥发油防治AD作用靶点的GO功能富集柱状图

Fig 3 GO functional enrichment histogram of the targets of volatile oil from *C. reticulatae* against Alzheimer's disease

KEGG通路富集结果显示,89个作用靶点主要富集于19条通路上($P < 0.05$),以癌症通路(Pathways in cancer)、局灶性粘连(Focal adhesion)、结直肠癌(Colorectal cancer)、钙信号通路(Calcium signaling pathway)、神经营养因子信号通路(Neurotrophin signaling pathway)等为主,详见图4。

3.4 青皮挥发油防治AD关键成分及关键靶点的筛选结果

“活性成分-作用靶点”网络(图略)中,介数中心度、紧密中心度和节点度值均大于其对应平均值(上述参数的平均值分别为456.2017、0.003130、14.900)的关键成分有10个,分别为 α -萜品烯、 β -elemen、百里酚、(-)-4-

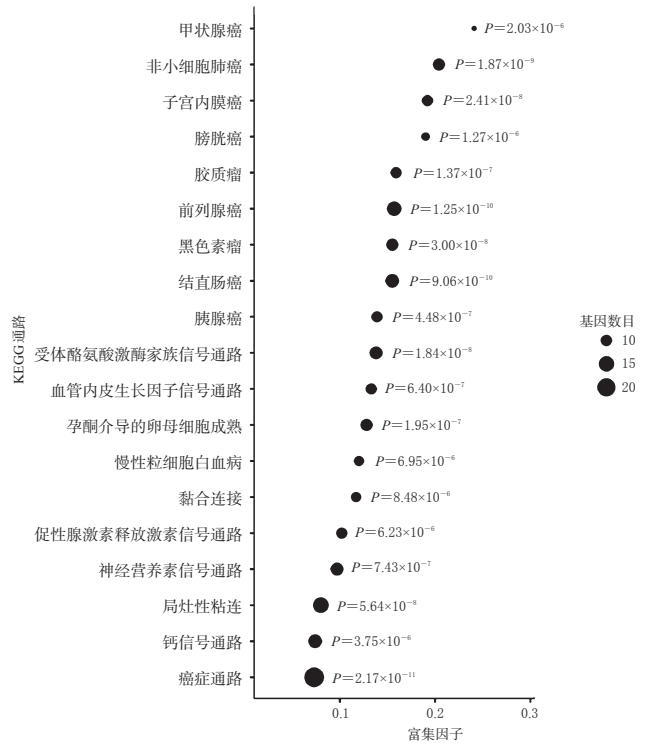


图4 青皮挥发油防治AD作用靶点的KEGG通路富集气泡图

Fig 4 KEGG pathway enrichment bubble diagram of the targets of volatile oil from *C. reticulatae* against Alzheimer's disease

萜品醇、右旋柠檬烯、乙酸橙花酯、香叶醇、Cis-2,8-menthadien-1-ol、 β -松油醇、Cis-carveol,节点度值分别为31.000、27.000、26.000、25.000、21.000、19.000、19.000、17.000、17.000、17.000。其中, α -萜品烯、 β -elemen、百里酚、(-)-4-萜品醇的节点度远高于其他成分。

介数中心度、紧密中心度和节点度值均大于其对应平均值(上述参数的平均值分别为134.5618、0.002679、6.700)的关键靶点有21个,分别为血清白蛋白(ALB)、载脂蛋白A-II(APOA2)、胱天蛋白酶7(CASP7)、碳酸酐酶2(CA2)、维生素D结合蛋白(GC)、类驱动蛋白KIF11(KIF11)、骨形态发生蛋白2(BMP2)、 β -分泌酶1(BACE1)、钠依赖性多巴胺转运体(SLC6A3)、雄激素受体(AR)、前列腺素G/H合酶2(PTGS2)、丝裂原活化蛋白激酶14(MAPK14)、凝血酶原(F2)、毒蕈碱乙酰胆碱受体M1(CHRM1)、 γ -氨基丁酸受体 α -2亚单位(GABRA2)、CHRM2、二肽基肽酶4(DPP4)、丝裂原活化蛋白激酶10(MAPK10)、孕酮受体(PGR)、MAPK8、CHRM3,节点度值分别为34.000、27.000、24.000、22.000、21.000、21.000、20.000、17.000、16.000、16.000、16.000、15.000、14.000、14.000、13.000、13.000、12.000、12.000、10.000、10.000、9.000。其中,AR、PTGS2、MAPK14、CHRM1、CHRM2、MAPK10、PGR、MAPK8、CHRM3富集于“3.3”项下所得的19条KEGG通路上。

青皮挥发油防治AD的“关键成分-关键靶点”网络见图5。

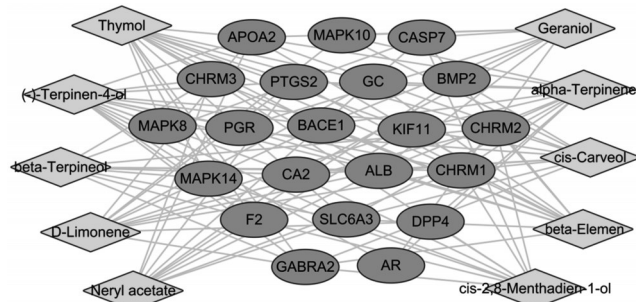


图5 青皮挥发油防治AD的“关键成分-关键靶点”网络
Fig 5 Network of “major components-key targets” of volatile oil from *C. reticulatae* against Alzheimer’s disease

4 讨论

本研究结合GC-MS技术与网络药理学方法,初步探讨了青皮挥发油防治AD的潜在活性成分以及分子作用机制。通过GC-MS分析,共鉴定出匹配度较高的活性成分40个;通过TCMSP、PharmMapper数据库和软件映射后,共得到青皮挥发油防治AD作用靶点89个。

GO富集结果显示,89个作用靶点主要分布于564个GO功能过程。笔者结合AD的发病机制分析发现,蛋白激酶可通过抑制Tau蛋白的过度磷酸化而保护神经元^[39];突触的胞外信号可引起胞内信号级联,并参与调节基因功能^[40],均与AD发生有关。本研究GO富集结果显示,89个作用靶点主要富集于蛋白激酶活性、细胞内信号级联等生物过程及分子功能,与上述研究基本一致,提示青皮挥发油可能通过上述途径防治AD。有研究指出,钙离子浓度过高,可激活蛋白激酶,从而引起Tau蛋白的过度磷酸化;钙离子浓度过低,则会导致依赖钙的相关酶活性降低,造成 β 淀粉样蛋白(A β)沉积^[41];钙离子失调还会引起活性氧等下游物质含量升高,诱发体内氧化应激,最终导致神经元凋亡^[42-43]。神经营养素是神经营养物质,也是与神经细胞存活相关的生长因子,其家族成员之一的脑源性神经营养因子主要分布于大脑中枢神经系统,与学习以及记忆能力密切相关^[44-45]。此外,徐倩等^[27]通过生物信息学分析发现,AD的差异表达基因主要富集于癌症通路,还涉及结肠癌、非小细胞肺癌等通路。本研究KEGG富集结果显示,89个作用靶点主要富集于钙信号通路、神经营养素信号通路以及癌症通路等信号通路上,提示青皮挥发油可能通过上述通路发挥对AD的防治作用。此外,局灶性粘连、结肠癌等癌症通路也可作为青皮挥发油防治AD的潜在靶点,但具体机制有待后续深入研究。

通过对“活性成分-作用靶点”网络进行拓扑学分析,共筛选出关键成分10个。在筛选出的10个关键成

分中,右旋柠檬烯是青皮挥发油测定结果中峰面积最大的活性成分,且匹配度达99%; γ -蒎烯作为青皮挥发油测定结果中峰面积第二大的成分,有研究指出其与百里酚联用后可增强乙酰胆碱水平及烟碱型乙酰胆碱的反应性^[46]。 α -蒎烯为“活性成分-作用靶点”网络中节点度值最高的成分,具有很好的抗氧化活性,并可有效抑制脂氧合酶和乙酰胆碱酯酶的活性^[47]。有研究指出,百里酚对A β 致海马突触损伤的高脂模型大鼠具有一定的保护和治疗作用^[48-49]。(一)-4-蒎烯醇可通过抑制丁酰胆碱酯酶的活性来发挥对AD的治疗作用^[37];且有研究显示,富含(一)-4-蒎烯醇的朝鲜冷杉挥发油可有效提高莼蓉碱诱导的健忘模型大鼠的记忆力^[38]。由此可见,青皮挥发油在防治AD方面具有较好的物质基础。

通过对“活性成分-作用靶点”网络进行拓扑学分析,共筛选出关键靶点21个。目前,AD的发病机理虽未完全明确,但现代医学普遍认为,AD的发生与A β 沉积、Tau蛋白过度磷酸化、炎症反应、胆碱能、物质能量代谢等因素有关^[50-51]。在筛选出的21个关键靶点中,ALB的节点度值最高,亦远高于其余节点。有研究发现,ALB可有效抑制A β 的聚集,从而缓解AD症状^[52]。本研究还发现,AR、PTGS2、MAPK14、CHRM1、CHRM2、MAPK10、PGR、MAPK8、CHRM3等9个作用靶点富集于19条KEGG通路上。CHR广泛存在于大脑中,其中CHRM1可缓解A β 所致的兴奋性神经毒性,并缓解AD模型小鼠的认知障碍^[53-54];CHRM2与智力、人格特征以及抑郁等有关^[55],均是AD治疗的潜在靶点。MAPK14与炎症反应的发生密切相关,且其表达量在AD模型大鼠体内明显升高^[56],亦可能成为治疗AD的作用靶点之一。PTGS2已被初步证实为杜仲植物雌激素类成分治疗AD^[57]以及酸枣仁汤治疗失眠^[58]的主要靶点之一。孕酮是一种重要的内源性神经载体,不仅对生殖系统具有重要意义,而且还可通过提高神经元存活率、抑制炎症反应、改善脑缺血和脑损伤等途径调节神经系统功能^[59-60],但关于孕酮及其受体发挥神经保护作用的机制尚不完全清楚,有待后续研究予以证实。

综上所述,本研究借助GC-MS技术和网络药理学方法,初步筛选了青皮挥发油防治AD的活性成分及潜在作用靶点,为中药挥发油防治AD等情志类疾病的研究以及后续实验评价指标的筛选等提供了思路与理论依据。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:197.
- [2] 靳贝贝,裴香萍,梁惠珍.青皮药材的HPLC指纹图谱建立及聚类分析和主成分分析[J].中国药房,2018,29(24):3336-3339.

- [3] 冯永辉,冯娟.浅谈陈皮常见药对的配伍应用[J].陕西中医,2011,32(7):906-907.
- [4] 陈红,刘传玉,李承晏.青皮的化学及药理作用研究进展[J].中草药,2001,32(11):1051-1052.
- [5] 刘恒,马永明,瞿颂义,等.青皮对大鼠离体子宫平滑肌运动的影响[J].中草药,2000,31(3):203-205.
- [6] 陈青,钟宏波.黔产青皮挥发油化学成分及抑菌活性研究[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(9):118-121.
- [7] 高顺平,邬国栋,刘全礼.青皮的研究进展[J].包头医学院学报,2014,30(1):139-141.
- [8] 徐小娜,蒋军辉,王永生,等. GC-MS 和 HELP 法分析药对陈皮-青皮与其单味药挥发油成分[J].分析测试学报,2012,31(10):1277-1281.
- [9] TIRADO CB, STASHENKO EE, COMBARIZA MY, et al. Comparative study of Colombian citrus oils by high-resolution gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry[J]. *J Chromatogr A*, 1995, 697(1): 501-513.
- [10] FLAMINI G, TEBANO M, CIONI PL. Volatiles emission patterns of different plant organs and pollen of Citrus limon[J]. *Anal Chim Acta*, 2007, 589(1): 120-124.
- [11] WANG Y, YI L, LIANG Y, et al. Comparative analysis of essential oil components in Pericarpium Citri Reticulatae Viride and Pericarpium Citri Reticulatae by GC-MS combined with chemometric resolution method[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2008, 46(1): 66-74.
- [12] KANG SA, PARK HJ, KIM M, et al. Citri Reticulatae Viride Pericarpium extract induced apoptosis in SNU-C₄ human colon cancer cells[J]. *J Ethnopharmacol*, 2005, 97(2): 231-235.
- [13] ASAMOTO M, TORIYAMA-BABA H, OHNISHI T, et al. Transgenic rats carrying human c-Ha-ras proto-oncogene are highly susceptible to N-nitrosomethylbenzylamine induction of esophageal tumorigenesis[J]. *Jpn J Cancer Res*, 2002, 93(7): 744-751.
- [14] BEZERRA DP, COSTA EV, NOGUEIRA PCL. *Essential oil constituents: biodiversity and their applicability for cancer therapy*[M]. Berlin: Springer-Verlag, 2013: 285-300.
- [15] DAO TP, TRAN TH, NGUYEN PTN, et al. Chemical composition and evaluation of antibacterial activities of essential oil from lemon (*Citrus aurantifolia* L.) leaves growing Tien Giang Province, Vietnam [J]. *Asian J Chem*, 2019, 31(10): 2284-2286.
- [16] COSENTINO S, TUBEROSO CIG, PISANO B, et al. In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian Thymus essential oils[J]. *Lett Appl Micro Biol*, 1999, 29(2): 130-135.
- [17] 黄龙舰,赵春阳,冯新红,等.抗阿尔茨海默病药物非临床药效学评价体系的探索[J].药学学报,2020,55(5): 789-805.
- [18] 李慧婷,李远辉,任桂林,等.中药挥发油防治情志疾病的研究现状及前景展望[J].中草药,2019,50(17):4031-4040.
- [19] 李艳萍,李海燕,纪晓婉,等.金钗石斛叶中总黄酮的提取分离及体外抗阿尔茨海默病活性研究[J].中国药房,2018,29(3):330-333.
- [20] 郑家欢.药用植物挥发油的提取及抗抑郁活性研究[D].广州:广东药科大学,2017.
- [21] 冯波,靖慧军,郭敏娟,等.石菖蒲挥发油和水煎液的抗焦虑作用[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(9):207-210.
- [22] 贺利敏.自闭症小鼠神经行为学观察及辛夷挥发油对其学习记忆行为影响研究[D].合肥:安徽医科大学,2016.
- [23] 齐越,刘冉,贾冬,等.温郁金挥发油对Aβ₂₅₋₃₅致阿尔兹海默病小鼠模型行为学的影响[J].实验动物科学,2017,34(5):23-27.
- [24] 王虎平,吴红彦,李海龙,等.当归有效组分防治阿尔茨海默病模型大鼠组方配伍优化的实验研究[J].甘肃中医药大学学报,2019,36(3):12-19.
- [25] 刘根.运用数据挖掘方法对益智抗老年性痴呆类方剂核心药物组合的筛选研究[D].太原:山西中医学院,2016.
- [26] 顾彦琳.加味癫狂梦醒汤治疗阿尔茨海默病痰瘀互结证临床疗效的观察[D].长沙:湖南中医药大学,2019.
- [27] 徐倩,苏溪淇,谭毅,等.阿尔茨海默病相关差异表达基因及其生物信息学分析[J].中国药房,2019,30(24): 3423-3427.
- [28] 赵杰,许波,刘金豹,等.基于网络药理学探讨牛膝治疗骨质疏松的潜在有效成分及作用机制[J].中国药房,2019,30(22):3090-3095.
- [29] 刘丹凯,王凯,魏赓权,等.昆明山海棠-鸡血藤药对治疗类风湿关节炎作用机制的网络药理学研究[J].中国药房,2019,30(19):2639-2644.
- [30] 刘树森,孙文斌,李文兰,等.基于网络药理学的黄连-吴茱萸药对抗癌及治疗心脑血管疾病机制研究[J].中草药,2020,51(1):109-117.
- [31] 孙晓丽,杨若聪,刘俊杰,等.基于网络药理学研究龙生蛭胶囊抗脑卒中的作用机制[J].中华中医药杂志,2019,34(5):2165-2168.
- [32] ZHUANG Y, QIN K, YANG B, et al. Prediction of the targets of the main components in blood after oral administration of Xanthii Fructus: a network pharmacology study[J]. *RSC Advances*, 2018, 8(16): 8870-8877.
- [33] 逯克娜,林寒梅,黄巍,等.基于网络药理学的化痰通脉饮“半夏-当归”药对抗多囊卵巢综合征作用机制的研究[J].时珍国医国药,2019,30(3):539-543.
- [34] ZHU J, YI X, ZHANG Y, et al. Systems pharmacology-based approach to comparatively study the independent and synergistic mechanisms of danhong injection and naoxintong capsule in ischemic stroke treatment[J]. *Evid-Based Complement Altern*, 2019. DOI: 10.1155/2019/1056708.

- [35] 伊晓娇.基于系统生物学方法的丹红注射液抗阿霉素心肌毒性作用机制研究[D].杭州:浙江大学,2019.
- [36] 甘东浩,陈德强,冯蓬,等.基于网络药理学探讨骨碎补抗骨质疏松的物质基础及作用机制[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(13):186-191.
- [37] BONESI M, MENICHINI F, TUNDIS R, et al. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity of Pinus species essential oils and their constituents[J]. *J Enzym Inhib Med Chem*, 2010, 25(5):622-628.
- [38] KIM K, BU Y, JEONG S, et al. Memory-enhancing effect of a supercritical carbon dioxide fluid extract of the needles of *Abies koreana* on scopolamine-induced amnesia in mice[J]. *Biosci Biotech Biochem*, 2006, 70(8):1821-1826.
- [39] MOHANDAS E, RAJMOHAN V, RAGHUNATH B. Neurobiology of Alzheimer's disease[J]. *Indian J Psychiatry*, 2009, 51(1):55-61.
- [40] ARPITA K, ASHISH K, BRYAN M, et al. A serine protease KLK8 emerges as a regulator of regulators in memory: microtubule protein dependent neuronal morphology and PKA-CREB signaling[J]. *Sci Rep*, 2018. DOI: 10.1038/s41598-018-27640-6.
- [41] 汪亚楠,李思齐,岳一强,等.基于网络药理学的苓桂术甘汤治疗阿尔茨海默病的潜在作用机制研究[J].中草药,2019,50(23):5812-5122.
- [42] WATER BVD, ZOETEWEL JP, BONT HJD, et al. Role of mitochondrial Ca^{2+} in the oxidative stress-induced dissipation of the mitochondrial membrane potential: studies in isolated proximal tubular cells using the nephrotoxin 1, 2-dichlorovinyl-L-cysteine[J]. *J Biol Chem*, 1994, 269(20):14546-14552.
- [43] 胡倩,刘育斌,毛思宇,等.基于网络药理学对白术治疗阿尔茨海默症的机制探讨[J].中南药学,2020,18(3):427-434.
- [44] 刘邵阳,白辰,徐竞男,等.基于网络药理学方法探索达原饮治疗发热作用机制[J].中国中医药信息杂志,2020,27(5):84-89.
- [45] 郁俊昌,唐牟尼,韩海英,等.阿尔茨海默病、血管性痴呆及轻度认知障碍患者血浆脑源性神经营养因子浓度变化[J].实用医学杂志,2013,29(9):1429-1431.
- [46] SAMMI SR, TRIVEDI S, RATH SK, et al. 1-methyl-4-propan-2-ylbenzene from *Thymus vulgaris* attenuates cholinergic dysfunction[J]. *Mol Neurobiol*, 2016, 54(7):5468-5481.
- [47] CUTILLAS AB, CARRASCO A, MARTINEZ-GUTIERREZ R, et al. *Thymus mastichina* L. essential oils from Murcia (Spain): composition and antioxidant, antienzymatic and antimicrobial bioactivities[J]. *PLoS One*, 2018. DOI: 10.1371/journal.pone.0190790.
- [48] ASADBEGI M, YAGHMAEI P, SALEHI I, et al. Investigation of thymol effect on learning and memory impairment induced by intrahippocampal injection of amyloid beta peptide in high fat diet-fed rats[J]. *Metab Brain Dis*, 2017, 32(3):827-839.
- [49] ASADBEGI M, KOMAKI A, SALEHI I, et al. Effects of thymol on amyloid- β -induced impairments in hippocampal synaptic plasticity in rats fed a high-fat diet[J]. *Brain Res Bull*, 2018. DOI: 10.1016/j.brainresbull.2018.01.008.
- [50] 王涛.阿尔茨海默症Ch4脑区相关的遗传变异位点的识别与分析[D].哈尔滨:哈尔滨工业大学,2019.
- [51] 罗俊.石菖蒲-益智仁精油提取工艺及精油吸嗅给药对AD的作用研究[D].南昌:江西中医药大学,2019.
- [52] XIE B, LI X, DONG XY, et al. Insight into the inhibition effect of acidulated serum albumin on amyloid β -protein fibrillogenesis and cytotoxicity[J]. *Langmuir*, 2014, 30(32):9789-9796.
- [53] GU Z, ZHONG P, YAN Z. Activation of muscarinic receptors inhibits beta-amyloid peptide-induced signaling in cortical slices[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(19):17546-17556.
- [54] 毕丹蕾,文朗,熊伟,等.阿尔茨海默病的可能药物靶点和临床治疗研究进展[J].中国药理学与毒理学杂志,2015,29(4):507-536.
- [55] CHEE LY, CUMMING A. Polymorphisms in the cholinergic receptors muscarinic (CHRM2 and CHRM3) genes and Alzheimer's disease[J]. *Avicenna J Med Biotechnol*, 2018, 10(3):196-199.
- [56] QILING JI, XU MEI WANG, CAI J. MiR-22-3p regulates amyloid β deposit in mice model of Alzheimer's disease by targeting mitogen-activated protein kinase 14[J]. *Curr Neurovasc Res*, 2019, 16(5):473-480.
- [57] 王晶,刘斌,薛慧,等.基于整合药理学平台的杜仲植物雌激素类成分治疗AD的作用机制研究[J].现代中药研究与实践,2019,33(1):30-34.
- [58] 邝梓君,汤顺莉,黄雁,等.酸枣仁汤治疗失眠的有效成分预测与靶点通路分析[J].中华中医药杂志,2018,33(8):3585-3590.
- [59] 秦亚彬.孕酮对A β 所致神经元损伤的保护作用及其机制研究[D].石家庄:河北医科大学,2015.
- [60] 孙爽.孕酮对AD细胞模型及动物模型神经再生的影响及机制研究[D].石家庄:河北医科大学,2018.

(收稿日期:2020-02-07 修回日期:2020-07-07)

(编辑:张元媛)