

基于GC-MS技术结合网络药理学探究石菖蒲挥发油抗阿尔兹海默症的作用机制

曲迪¹, 薛傲¹, 赵晨宇¹, 徐艳明^{1,2}, 薛慧^{1,2}, 耿放³, 赵继会⁴, 杨波^{1*}, 张宁^{1,2*}
(1. 黑龙江中医药大学药学院, 哈尔滨 150040; 2. 黑龙江中医药大学佳木斯学院, 佳木斯 154007; 3. 哈尔滨师范大学化学化工学院, 哈尔滨 150025; 4. 湖南医药学院药学院, 怀化 418000)

摘要 目的: 通过气相色谱-质谱(GC-MS)技术分析石菖蒲挥发油的化学成分并结合网络药理学研究石菖蒲挥发油抗阿尔兹海默症(AD)的作用机制。方法: 采用GC-MS技术对石菖蒲挥发油成分进行精准鉴定, 运用TCMSP、Swiss Target Prediction数据库对石菖蒲挥发油成分的作用靶点进行预测。利用Genecards、OMIM数据库获得AD疾病靶点。绘制韦恩图并提取交集靶点, 随后对其进行PPI网络构建和拓扑分析、GO富集分析和KEGG通路富集分析, 建立“成分-靶点-疾病-通路”网络图; 并采用分子对接技术进行验证。结果: 经GC-MS分析共得到74个挥发油成分。获得成分疾病交集靶点138个, 经PPI网络拓扑分析发现ALB、ACTB、TNF和IL-6 4个核心靶点。GO结果显示, 石菖蒲挥发油可能通过激素的反应、对外源性物质刺激的反应和激素水平调节等来发挥抗AD的作用。KEGG结果表明, 石菖蒲挥发油可作用于PI3K-Akt、cGMP-PKG、NF- κ B和cAMP等信号通路对AD进行干预。分子对接结果表明, 石菖蒲挥发油中有效成分与核心靶点具有较好的结合活性。结论: 石菖蒲挥发油可通过多靶点和多通路抑制神经炎症和减少氧化应激发挥其抗AD的作用。

关键词: 网络药理学; 石菖蒲挥发油; 阿尔兹海默症; 气相色谱-质谱; 分子对接

中图分类号: R96; R932 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2023)10-1129-011

doi:10.16153/j.1002-7777.2023.10.005

Exploring the Mechanism of the Effect of Volatile Oil of *Acorus Tatarinowii* on Anti-Alzheimer's Disease Based on GC-MS Combined with Network Pharmacology

Qu Di¹, Xue Ao¹, Zhao Chenyu¹, Xu Yanming^{1,2}, Xue Hui^{1,2}, Geng Fang³, Zhao Jihui⁴, Yang Bo^{1*}, Zhang Ning^{1,2*}
(1. College of Pharmacy, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China; 2. College of Kiamusze, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Kiamusze 154007, China; 3. College of Chemistry and Chemical Engineering, Harbin Normal University, Harbin 150025, China; 4. College of Pharmacy, Hunan University of Medicine, Huaihua 418000, China)

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(编号 82174007); 中央支持地方高校改革发展资金人才培养项目: 二至九防治AD作用机理研究; 黑龙江省卫生健康委科研课题(编号 2020-303); 黑龙江中医药大学基金项目(编号 2018RCD19, 2019BJP01); 黑龙江省自然科学基金优秀青年项目(编号 YQ2019H001)

作者简介: 曲迪 Tel: 17745128320; E-mail: Q17745128320@163.com

通信作者: 张宁 Tel: (0454) 6105559; E-mail: zhangning0454@163.com

杨波 Tel: (0451) 87266912; E-mail: 56024955@qq.com

Abstract Objective: To analyze the chemical components of volatile oil of *Acorus tatarinowii* by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and study the mechanism of its effect against Alzheimer's disease (AD) by network pharmacology. **Methods:** GC-MS technique was used to accurately identify volatile oil components of *Acorus tatarinowii*, TCMSP and Swiss Target Prediction databases were used to predict the target of volatile oil components. AD disease targets were obtained using Genecards and OMIM databases, the Venn diagram was drawn and the intersection targets were extracted, then PPI network construction was conducted, topology analysis and GO enrichment analysis and KEGG pathway enrichment analysis, were carried on to establish the "component-target-disease-pathway" network diagram. Molecular docking was used to verify the binding degree of volatile oil components to core targets. **Results:** 74 volatile oil components were obtained by GC-MS analysis. 138 intersection targets of component and diseases were obtained. PPI network topology analysis revealed four core targets: ALB, ACTB, TNF and IL-6. GO results showed that the volatile oil of *Acorus tatarinowii* might play an anti-AD role through the response of hormones, the response to exogenous substance stimulation, and the regulation of hormone levels. KEGG results showed that volatile oil of *Acorus tatarinowii* could interfere with AD by acting on PI3K-Akt, cGMP-PKG, NF- κ B and cAMP signaling pathways. Molecular docking results showed that the active components in the volatile oil of *Acorus tatarinowii* had good binding activity with the core targets. **Conclusion:** The volatile oil of *Acorus tatarinowii* can inhibit neuroinflammation and reduce oxidative stress through multiple targets and pathways to exert its anti-AD effect.

Keywords: network pharmacology; volatile oil of *Acorus tatarinowii*; Alzheimer's disease; GC-MS; molecular docking

阿尔兹海默症 (Alzheimer's Disease, AD) 是一种以记忆和认知功能衰退、人格和行为的改变为特征的神经退行性疾病,但其发病机制尚不明确^[1]。流行病学调查显示,全球AD患者的数量已超过5000万人,且85岁以上的发病率高达50%^[2-3]。目前临床多以西药治疗为主,但其应用效果不明显且副作用较高^[4]。

石菖蒲具有开窍豁痰、醒神益智、化湿开胃等功效^[5]。研究表明,石菖蒲对AD具有改善作用,其挥发油是石菖蒲最主要的药理作用成分^[6-7]。石菖蒲挥发油的主要活性成分 α -细辛醚和 β -细辛醚可通过减少氧化应激和异常蛋白质的积聚发挥神经保护作用^[8-9]。但目前石菖蒲挥发油治疗AD的药效物质基础研究尚不完全,其治疗AD的作用机制也尚不清楚。因此,明确石菖蒲挥发油药效物质基础及其治疗AD的机制具有重要的现实意义。

气相色谱-质谱 (GC-MS) 技术是一种以GC为分离和以MS为检测手段的分析方法,可以分离和鉴定挥发性物质。网络药理学可有效地建立化合物-蛋白质/基因-疾病多层次的联系,与中药治疗的整体观和AD复杂的发病机制相契合^[10-11]。本研

究采用了GC-MS技术对石菖蒲挥发油成分进行了定性分析,并利用网络药理学技术探究石菖蒲挥发油的有效成分和其作用靶点,分析石菖蒲挥发油抗AD的主要作用机制,为临床应用和药物研究等方面提供参考。

1 材料与仪器

石菖蒲购自哈尔滨市北京同仁堂药店,经黑龙江中医药大学张宁教授鉴定符合《中华人民共和国药典》2020年版要求。Agilent 6890N气相色谱仪联用5975B质谱仪(美国安捷伦公司)。

2 方法

2.1 石菖蒲挥发油的GC-MS分析

2.1.1 石菖蒲挥发油的提取

参照《中华人民共和国药典》2020年版(四部)通则中“2204挥发油测定法”中的“甲法”进行提取,称取石菖蒲40 g,粉碎过一号筛,加入400 mL去离子水和2粒沸石,振摇混合后,连接装置回流提取,连续提取5 h。开启下端活塞将水缓缓放出,收集上层挥发油,收率为0.75%^[12]。

2.1.2 GC-MS分析条件

色谱柱为DB-5MS柱,进样量为1 μ L,分流

进样，分流比为20:1；进样器起始温度设定为250℃，载气为氦气，平衡时间为1 min，传输线温度设置为250℃，溶剂延迟时间为4 min，程序升温（最初在50℃下保持5 min，接着以5℃·min⁻¹速率从50℃升至110℃，并保持5 min，然后以3℃·min⁻¹速率从110℃升至180℃，保持5 min，再以5℃·min⁻¹速率从180℃升至210℃，并保持5 min，最后以7℃·min⁻¹速率从210℃升至280℃，并保持5 min）。

离子源：EI源，电子能量为70 eV，调谐方式为自动调谐，质量扫描方式为全扫描。

2.2 石菖蒲挥发油潜在作用靶点的收集

根据GC-MS获得的石菖蒲挥发油的化学成分信息，采用TCMSP数据库（<https://tcmspw.com/tcmsp.php>）进行药物靶点的收集。对于未收录在TCMSP数据库的成分，借助Swiss Target Prediction数据库（<http://www.swisstargetprediction.ch/>）进行补充。利用UniProt数据库（<https://www.uniprot.org/>）规范靶点信息。

2.3 阿尔兹海默症相关靶点的收集

以“Alzheimer's disease”为关键词，通过Genecards数据库（<https://www.genecards.org/>）和OMIM数据库（<https://www.omim.org>）收集AD的疾病靶点，合并和除去重复所得即为阿尔兹海默症的相关靶点。

2.4 PPI网络的构建

将“2.2”项所得的石菖蒲挥发油的潜在作用靶点和“2.3”项所得的AD的相关靶点进行处理并提取交集靶点。所得交集靶点导入String11.5数据库（<https://cn.string-db.org/>），设置“Homo sapiens”，获得PPI关系。将节点信息导入Cytoscape3.7.2软件进行网络构建，并通过2倍的

Degree（度性中心性，以下简称Degree值）中位数提取出Hithubs网络图，并对此网络采用CytoNCA插件进行计算，得出Degree、Betweenness（介数中心性）和Closeness（接近中心性）。通过使用这3个参数的中位数对Hithubs网络进行提取得出主要靶点网络图。选取Degree值靠前的4个为核心靶点。

2.5 GO与KEGG通路富集分析

将“2.4”项中获得的靶点导入到Metascape数据库（<https://metascape.org/gp/index.html>），设置“Homo sapiens”，进行基因本体（GO）、京都基因和基因组百科全书（KEGG）富集分析，*P*值越小则显著性程度越高。将*P*值从小到大排列，GO和KEGG分别选取前10和前20进行可视化。

2.6 成分-靶点-疾病-通路”的网络构建

将石菖蒲挥发油的成分、靶点和通路分析结果构建相互关系。将整理结果导入Cytoscape3.7.2软件中构建石菖蒲挥发油“成分-靶点-疾病-通路”网络模型图。

2.7 分子对接

通过Pubchem数据库（<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>）下载主要活性成分的2D结构，通过Chem 3D软件进行结构常规处理，并转化为3D结构。通过PDB数据库（<https://www.rcsb.org/>）获取核心靶点的蛋白结构，通过Pymol软件进行蛋白质修饰。采用AMDOCK1.5.2进行分子对接，并通过Pymol进行可视化。

3 结果

3.1 石菖蒲挥发油化学成分鉴定

通过GC-MS对提取的石菖蒲挥发油进行分析，其总离子流图（TIC图）见图1。通过质谱数据库检索及文献对比，共分离鉴定出74个石菖蒲挥发油成分，并计算峰面积占比（表1）。

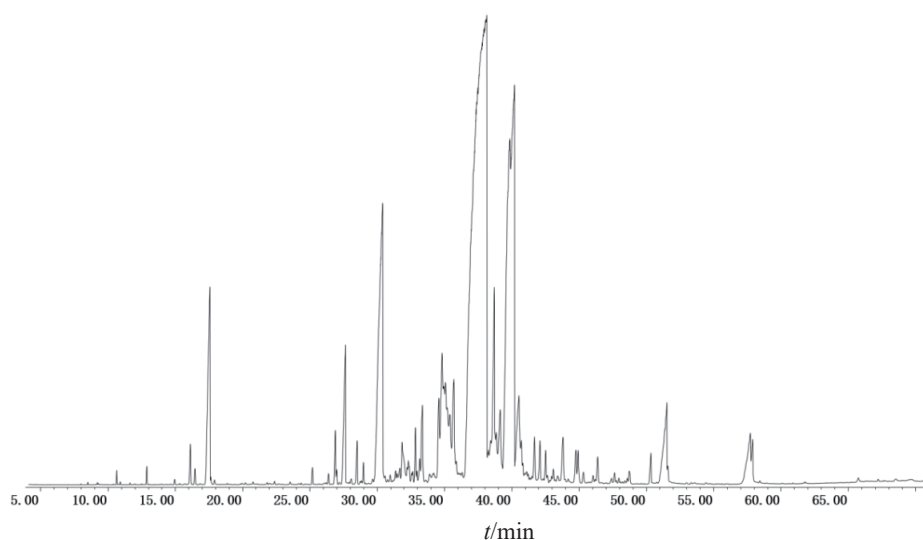


图1 石菖蒲挥发油气质分析的 TIC 图

表1 石菖蒲挥发油中化学成分的鉴定

编号	名称	分子式	分子量	占比	t_R /min	CAS 号
AT1	(-)- α -Pinene	$C_{10}H_{16}$	136.2	0.003	7.995	7785-26-4
AT2	(+)-Camphene	$C_{10}H_{16}$	136.2	0.008	8.503	79-92-5
AT3	Oct-1-en-3-ol	$C_8H_{16}O$	128.2	0.008	9.216	3391-86-4
AT4	β -Pinene	$C_{10}H_{16}$	136.2	0.005	9.308	18172-67-3
AT5	α -Terpinene	$C_{10}H_{16}$	136.2	0.003	10.408	99-86-5
AT6	<i>p</i> -Cymene	$C_{10}H_{14}$	134.2	0.046	10.648	99-87-6
AT7	Limonene	$C_{10}H_{16}$	136.2	0.002	10.789	138-86-3
AT8	Cineole	$C_{10}H_{18}O$	154.2	0.012	10.916	470-82-6
AT9	γ -Terpinene	$C_{10}H_{16}$	136.2	0.007	11.636	99-85-4
AT10	Linalool	$C_{10}H_{18}O$	154.3	0.067	12.878	78-70-6
AT11	Camphor	$C_{10}H_{16}O$	152.2	0.027	14.959	76-22-2
AT12	(-)-Borneol	$C_{10}H_{18}O$	154.2	0.264	16.123	464-45-9
AT13	(-)-Terpinen-4-ol	$C_{10}H_{18}O$	154.2	0.099	16.469	20126-76-5
AT14	2-(4-Methylphenyl)propan-2-ol	$C_{10}H_{14}O$	150.2	0.011	16.836	1197-01-9
AT15	Decanal	$C_{10}H_{20}O$	156.3	0.036	17.577	112-31-2
AT16	2-Isopropyl-5-methylanisole	$C_{11}H_{16}O$	164.2	0.006	17.64	1076-56-8
AT17	Linalyl Acetate	$C_{12}H_{20}O_2$	196.3	0.005	18.868	115-95-7
AT18	Geraniol	$C_{10}H_{18}O$	154.2	0.012	19.848	106-24-1
AT19	<i>cis</i> -Anethol	$C_{10}H_{12}O$	148.2	0.010	19.961	104-46-1

续表 1

编号	名称	分子式	分子量	占比	t_R /min	CAS 号
AT20	Bicyclo[2.2.1]heptan-2-ol,1,7,7-trimethyl-,2-acetate	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	196.3	0.012	21.824	92618-89-8
AT21	Estragole	C ₁₀ H ₁₂ O	148.2	2.762	22.057	140-67-0
AT22	Cyclene	C ₁₀ H ₁₆	136.2	0.022	22.381	508-32-7
AT23	5-Isopropyl-2-methylphenol	C ₁₀ H ₁₄ O	150.2	0.004	22.656	499-75-2
AT24	2-Ethyl-4,5-dimethylphenol	C ₁₀ H ₁₄ O	150.2	0.005	22.706	2219-78-5
AT25	1-Ethenyl-1-methyl-2,4-bis(prop-1-en-2-yl)cyclohexane	C ₁₅ H ₂₄	204.4	0.009	24.357	33880-83-0
AT26	alpha-Longipinene	C ₁₅ H ₂₄	204.4	0.098	25.196	5989-08-2
AT27	alpha-Ylangene	C ₁₅ H ₂₄	204.4	0.014	26.078	14912-44-8
AT28	Longicyclene	C ₁₅ H ₂₄	204.4	0.066	26.389	1137-12-8
AT29	beta-Patchoulene	C ₁₅ H ₂₄	204.4	0.335	26.897	514-51-2
AT30	(-)-beta-Elementene	C ₁₅ H ₂₄	204.4	0.080	26.995	515-13-9
AT31	3,3-Dimethyl-6-methylidene-cyclohexene	C ₉ H ₁₄	122.2	0.016	27.186	20185-16-4
AT32	Methyl Eugenol	C ₁₁ H ₁₄ O ₂	178.2	1.614	27.651	93-15-2
AT33	beta-Maaliene	C ₁₅ H ₂₄	204.4	0.047	28.082	489-29-2
AT34	β-Caryophyllene	C ₁₅ H ₂₄	204.4	0.304	28.512	87-44-5
AT35	beta-Cedrene	C ₁₅ H ₂₄	204.4	0.017	28.745	546-28-1
AT36	(+)-Calarene	C ₁₅ H ₂₄	204.4	0.126	28.985	17334-55-3
AT37	Selina-3,7(11)-diene	C ₁₅ H ₂₄	204.4	0.009	29.14	6813-21-4
AT38	1,4-Dimethyl-7-propan-2-ylidene-2,3,4,5,6,8-hexahydro-1H-azulene	C ₁₅ H ₂₄	204.4	0.008	29.401	88-84-6
AT39	(-)-alpha-Gurjunene	C ₁₅ H ₂₄	204.4	0.101	29.676	489-40-7
AT40	(E)-Methyl isoeugenol	C ₁₁ H ₁₄ O ₂	178.2	8.541	30.41	93-16-3
AT41	gamma-Murolene	C ₁₅ H ₂₄	204.4	0.084	30.975	30021-74-0
AT42	alpha-Curcumene	C ₁₅ H ₂₂	202.3	0.008	31.229	644-30-4
AT43	alpha-Himachalene	C ₁₅ H ₂₄	204.4	0.121	31.37	3853-83-6
AT44	gamma-Gurjunene	C ₁₅ H ₂₄	204.4	0.540	31.687	22567-17-5
AT45	alpha-Amorphene	C ₁₅ H ₂₄	204.4	0.092	32.647	483-75-0
AT46	(+)-Delta-Cadinene	C ₁₅ H ₂₄	204.4	0.369	32.844	483-76-1
AT47	Eremophilene	C ₁₅ H ₂₄	204.4	0.057	33.606	10219-75-7
AT48	Elemicin	C ₁₂ H ₁₆ O ₃	208.3	0.064	33.938	487-11-6
AT49	Caryophyllene Oxide	C ₁₅ H ₂₄ O	220.4	1.444	35.709	1139-30-6

续表 1

编号	名称	分子式	分子量	占比	t_R /min	CAS 号
AT50	alpha-Guaiene	C ₁₅ H ₂₄	204.4	0.101	36.174	3691-12-1
AT51	β-Asarone	C ₁₂ H ₁₆ O ₃	208.3	32.032	37.395	5273-86-9
AT52	alpha-Cadinol	C ₁₅ H ₂₆ O	222.4	1.241	39.145	481-34-5
AT53	Zierone	C ₁₅ H ₂₂ O	218.3	0.401	42.094	6754-66-1
AT54	4-Chloro-N-methylbenzenesulfonamide	C ₇ H ₈ ClNO ₂ S	205.7	0.253	42.517	6333-79-5
AT55	Guaiazulene	C ₁₅ H ₁₈	198.3	0.019	43.568	489-84-9
AT56	Costunolide	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	232.3	0.005	46.898	553-21-9
AT57	Palmitic Acid	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256.4	1.628	51.498	57-10-3
AT58	Linoleic Acid	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	280.4	0.015	53.312	60609-53-2
AT59	(Z)-14-Methyl-8-Hexadecen-1-Al	C ₁₇ H ₃₂ O	252.4	0.015	53.58	506-12-7
AT60	Margaric Acid	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	270.5	0.008	54.405	56599-58-7
AT61	8,11-Octadecadienoic acid, methyl ester	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	294.5	0.004	55.569	629-94-7
AT62	Heneicosane	C ₂₁ H ₄₄	296.6	0.003	55.915	112-80-1
AT63	Oleic Acid	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	282.5	0.425	57.876	57-11-4
AT64	Stearic Acid	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	284.5	0.019	58.406	630-06-8
AT65	Hexatriacontane	C ₃₆ H ₇₄	507.0	0.002	65.2	25246-27-9
AT66	Alloaromadendrene	C ₁₅ H ₂₄	204.4	0.936	28.837	4460-86-0
AT67	2,4,5-Trimethoxybenzaldehyde	C ₁₀ H ₁₂ O ₄	196.2	0.137	40.817	2883-98-9
AT68	α-Asarone	C ₁₂ H ₁₆ O ₃	208.3	26.752	37.451	1002-84-2
AT69	Pentadecanoic Acid	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	242.4	0.061	47.399	107919-92-6
AT70	5-Methyl-2-pyridin-4-yl-indole	C ₁₄ H ₁₂ N ₂	208.3	0.005	70.901	62016-79-9
AT71	Heptacosane,1-chloro	C ₂₇ H ₅₅ Cl	415.2	0.005	61.771	119-90-4
AT72	3,3'-Dimethoxybiphenyl-4,4'-diamine	C ₁₄ H ₁₆ N ₂ O ₂	244.3	0.004	55.174	14435-88-2
AT73	2,6-di(4-Methylphenyl)pyridine	C ₁₉ H ₁₇ N	259.3	0.001	61.707	489-39-4
AT74	(+)-Aromadendrene	C ₁₅ H ₂₄	204.4	0.080	31.483	489-39-4

3.2 石菖蒲挥发油抗AD的潜在作用靶点的获取

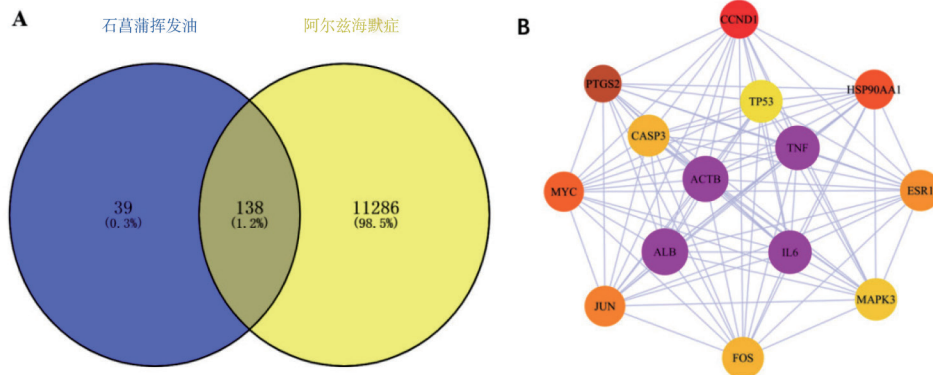
将石菖蒲的化学成分信息进行靶点预测,共得到678个靶点(去重后剩余177个)。将OMIM数据库和Genecards数据库所得的AD的相关靶点进行合并和去重后剩余11424个靶点。其中石菖蒲挥发油抗AD的潜在作用靶点为138个,占两者之和的1.2%(图2A)。

3.3 石菖蒲挥发油抗AD的潜在作用靶点的蛋白-蛋白相互作用

将获得的石菖蒲挥发油抗AD的潜在作用靶点导入String11.5平台构建PPI网络图,对其进行分析发现该网络图共有138个节点(其中TRIM26未参与相互作用,因此剔除),1314条边,平均Degree为19.2,平均局部聚类系数为0.556。将下载的PPI信

息导入Cytoscape3.7.2，并通过拓扑分析提取出了14个石菖蒲挥发油抗AD的主要靶点（图2B）。其中白蛋白（ALB）、肌动蛋白（ACTB）、肿瘤坏死

因子（TNF）和白细胞介素-6（IL-6）度值最大，视为核心靶点。

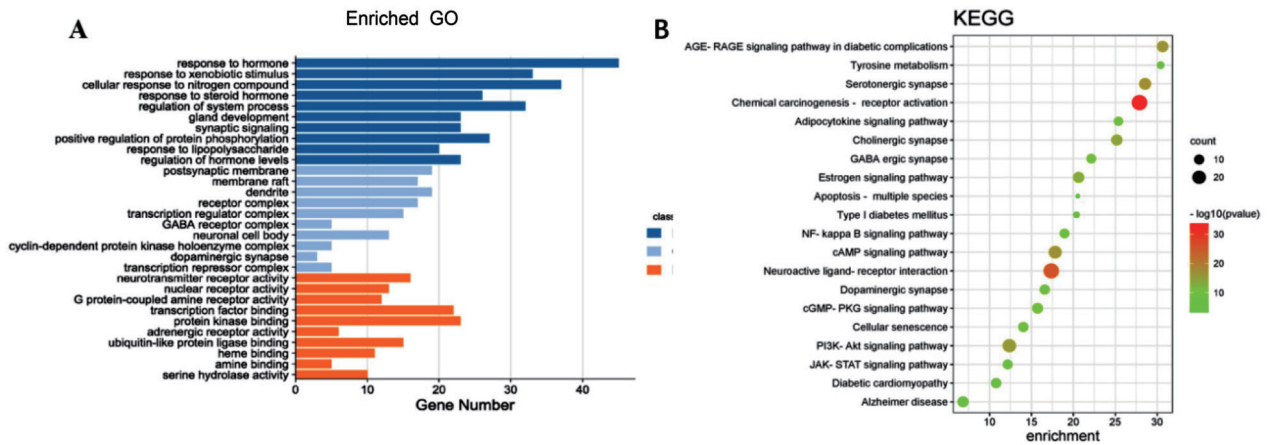


A. 石菖蒲挥发油 - 阿尔兹海默症靶点 Venn 图；B. 石菖蒲挥发油抗 AD 的主要靶点网络图。
图 2 石菖蒲挥发油抗 AD 潜在作用靶点及 PPI 网络图

3.4 GO功能分析和KEGG通路富集分析

通过利用Metascape数据库对石菖蒲挥发油抗AD作用的潜在靶点进行富集分析，并选取GO富集结果的前10条和KEGG富集结果的前20条，借助微生信在线作图平台将结果可视化。如图3A所示，石菖蒲挥发油参与的生物学过程主要为对激素的反应、对外源性物质刺激的反应、细胞对氮化合物的反应和蛋白质磷酸化正向调控等；细胞组成相关条目主要包括突触后膜、GABA受体复合物、神经

元胞体和多巴胺能神经突触等。分子功能相关条目主要为神经递质受体的活动、核受体的活动、G蛋白偶联胺受体活性以及丝氨酸水解酶活性等。根据KEGG结果显示（图3B），石菖蒲挥发油抗AD的作用机制主要与神经活性配体-受体相互作用、阿尔兹海默症信号通路、PI3K-Akt信号通路、cGMP-PKG信号通路、NF-κB信号通路、JAK-STAT信号通路和cAMP信号通路等信号通路相关。



A. GO 功能富集分析条形图；B. KEGG 通路富集分析气泡图。

图 3 GO 功能分析和 KEGG 通路富集分析

3.5 “成分-靶点-疾病-通路”的网络分析

采用Cytoscape3.7.2软件构建石菖蒲挥发油抗AD的“成分-靶点-疾病-通路”的网络图(图4)。该网络图共有222个节点及939条边,其中排名靠前的10个化学成分分别为AT56,度值为27;AT5,度值为22;AT32,度值为21;AT40,度值为19;AT48,度值为19;AT51,度值为19;AT30,度值为19;AT21,度值为16;AT24,度值为16;AT63,度值为16。排名前10的化学成分中,仅有AT21、AT32、AT40和AT51的峰面积占比大于1,因此视为石菖蒲挥发油的主要活性成分。核络模型中胆碱能受体毒

蕈碱1(CHRM1)、前列腺素内过氧化物合酶2(PTGS2)、胆碱能受体毒蕈碱2(CHRM2)、胆碱能受体毒蕈碱3(CHRM3)、 γ -氨基丁酸受体亚基 α -1(GABRA1)、前列腺素内过氧化物合酶1(PTGS1)、钠依赖性去甲肾上腺素转运蛋白(SLC6A2)、 γ -氨基丁酸受体亚基 α -2(GABRA2)等靶点度值均大于20,较为重要。从图4可以看出,石菖蒲中的化学成分可与多个靶点相互结合且不同通路可通过相同的几个靶点相互影响。非常直观地表明石菖蒲挥发油是通过多成分、多靶点、多通路来发挥抗AD的作用。

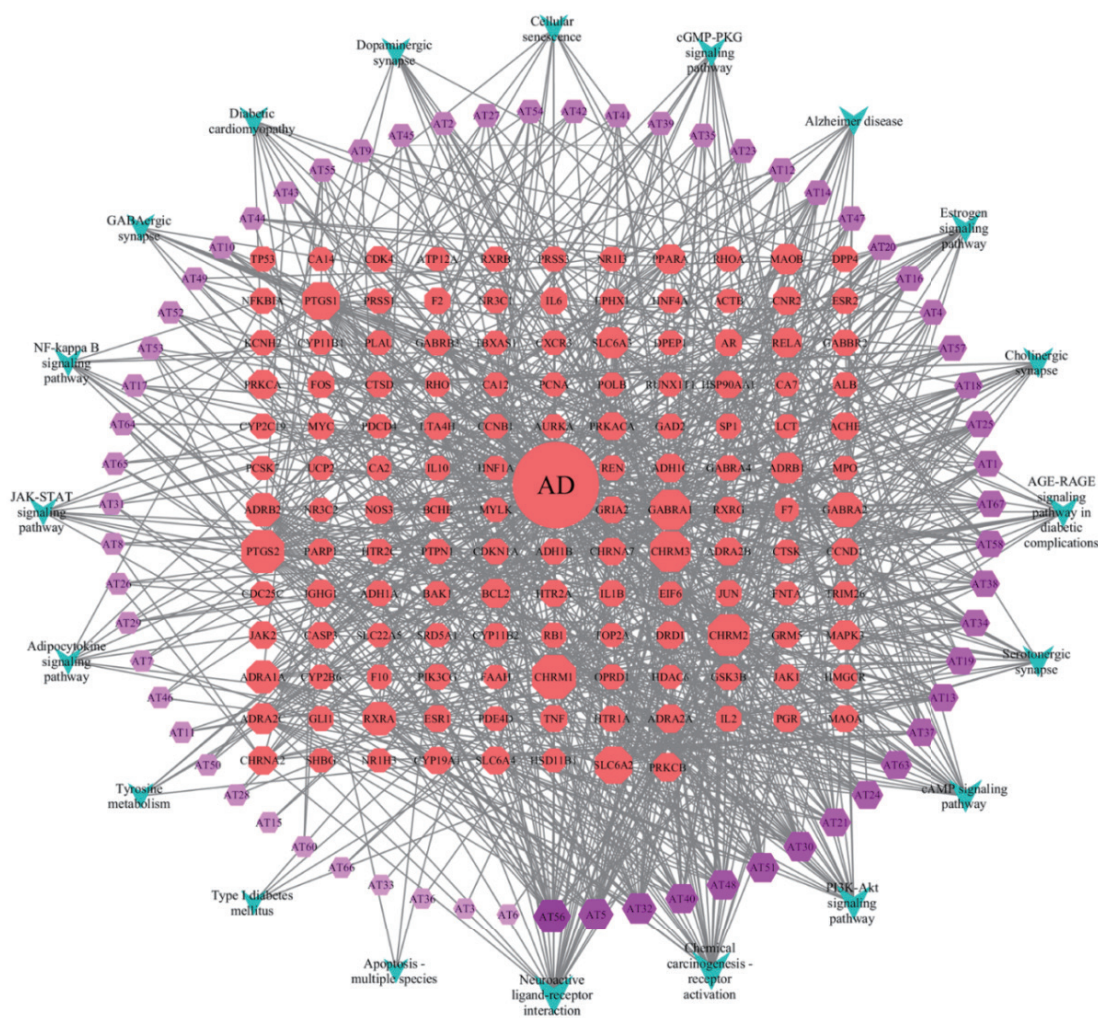


图4 石菖蒲挥发油抗AD的“成分-靶点-疾病-通路”网络图

3.6 分子对接结果

选取石菖蒲挥发油主要活性成分与核心靶点进行分子对接验证,结果见表2和图5。配体与受体蛋白的结合能 $< -5.0 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ 则表明配体与受体

蛋白具有较强的亲和力。在所有对接结果中,仅有AT32和AT21与IL-6的结合能 $> -5.0 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$,但相差不大,总体来说对接结果相对稳定。

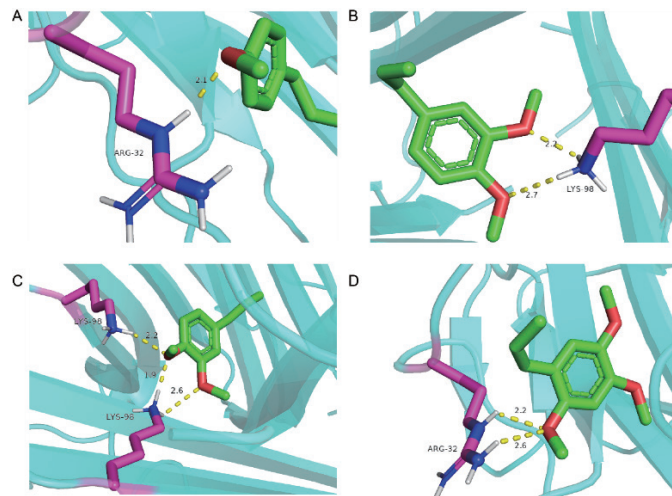


图5 AT21 (A)、AT32 (B)、AT40 (C) 和AT51 (D) 与TNF分子对接

表2 石菖蒲挥发油分子对接的结合能

化学成分	结合能 / (kcal · mol ⁻¹)			
	AT21	AT32	AT40	AT51
ALB	-7.3	-7	-7.5	-6.8
TNF	-5.4	-6.6	-6.1	-7.2
ATCB	-5.4	-5.8	-6	-5.9
IL-6	-4.8	-4.9	-5	-5.1

4 讨论

传统的网络药理学通过数据库对草药的化学成分进行检索，存在成分信息不全等问题，同时基于网络虚拟预测的检索方式并不能体现某一类特性成分，采用GC-MS技术对石菖蒲挥发油成分进行定性分析，可最大程度保障石菖蒲挥发油成分的直观性和准确性。此外，网络药理学的方法与中医的整体观念大致相同，故本研究采用GC-MS技术鉴定石菖蒲挥发油的成分并结合网络药理学手段来探究石菖蒲挥发油在抗AD中的作用。

通过GC-MS分析，结果显示本次研究共鉴定出挥发油成分74个，其中β-细辛醚、α-细辛醚、异丁香甲酚甲基醚以及草蒿脑等含量较高，其中β-细辛醚峰面积占比高达32.03%。邵佳等^[13]曾通过GC-MS技术鉴定出石菖蒲挥发油56个，主要包括α-细辛醚、β-细辛醚、γ-细辛醚和反式甲基异丁香酚等，与本研究检测到的成分大致相同。

由PPI结果可知，石菖蒲挥发油抗AD的核心靶点为ALB、ACTB、TNF和IL-6。IL-6和TNF为炎

症调节因子，均与神经炎症相关^[14]。ALB被认为是一种具有清除自由基活性的强效抗氧化剂，可经ERK/Nrf2/HO-1信号通路减轻大鼠ICH后氧化应激相关的神经元死亡^[15]。同时，ALB可以与环氧化物酶系统结合，抑制花生四烯酸脂质氧化酶的活性，从而减轻神经炎症^[16-17]。ACTB可与tau蛋白结合，从而抑制其与微管的结合，使tau蛋白逐渐聚集在神经元上，影响基本细胞功能，最终导致神经元死亡^[18-19]。这表明石菖蒲挥发油可能通过这些靶点抑制神经炎症和抗氧化应激来发挥抗AD的作用。

KEGG结果中，PI3K-Akt信号通路可参与细胞的增殖、分化和凋亡等多个生物过程。PI3K-Akt可以通过糖原合酶激酶3β (GSK-3β) 和半胱天冬酶-9 (Caspase-9) 等不同底物调节神经毒性并介导神经元的存活^[20-21]。激活PI3K-Akt信号通路，可上调抗炎因子IL-4和IL-10的表达，下调促炎因子TNF和IL-6的表达，缓解神经炎症所致的认知障碍^[22-23]。Zhou等^[24]也经试验证明PI3K-Akt信号通路可以抑制脑缺血大鼠神经元凋亡，改善血脑

屏障损伤和神经炎症,从而保护神经元。环磷酸腺苷(cAMP)和环磷酸鸟苷(cGMP)是突触效能的长时程增强(LTP)和形成巩固记忆所需的第二信使,过量的 β -淀粉样蛋白(A β)沉积会抑制cAMP和cGMP通路进而损害LTP信号转导,损害学习认知能力^[25]。环鸟苷单磷酸依赖性蛋白激酶(PKG)和cGMP调控因子磷酸二酯酶是神经炎症过程中的关键参与者,cGMP-PKG通路在防止细胞凋亡和促进神经细胞存活方面发挥着重要作用^[26]。有研究发现,依赖于cGMP-PKG通路可促进Akt表达和GSK-3 β 失活,减少tau蛋白的过度磷酸化^[27]。激活NF- κ B信号通路,一方面可增加促炎症基因RAGE的表达,产生神经炎症反应;另一方面,星形胶质细胞释放的血管内皮生长因子(VEGF)可激活蛋白激酶C(PKC)和RHO相关激酶(ROCK),进一步促进炎症^[28]。NF- κ B信号通路可增加促炎因子IL-6和TNF- α 的表达,同时IL-6可激活JAK-STAT信号通路,影响炎症基因的调控^[29]。KEGG的结果进一步证实了石菖蒲挥发油对炎症的抑制作用。同时,石菖蒲挥发油可能通过这些作用减轻AD的病理特征。

“成分-靶点-疾病-通路”网络的分析结果表明,石菖蒲挥发油抗AD的主要活性成分为 β -细辛醚、甲基丁香酚、甲基异丁香酚以及草蒿脑。其中 β -细辛醚的研究比较广泛,其可穿过血脑屏障,具有抑制A β 单体的聚集和分解其寡聚体的作用;而在体内的研究则证明了 β -细辛醚可减轻由A β 引起的氧化应激和炎症反应、恢复胞内 β -catenin的正常水平,进而保护神经元^[30-32]。甲基丁香酚及甲基异丁香酚在结构上与丁香酚相似,可通过PI3K-Akt信号通路发挥抗炎和抗细胞凋亡的作用^[33]。草蒿脑属于肉桂醛的苯丙素类化合物,药理学研究显示具有抗炎和抗氧化应激的作用^[34]。

以上结果显示,石菖蒲挥发油可通过多成分、多靶点和多通路抑制神经炎症和减少氧化应激来保护神经细胞,进而达到抗AD作用。其发挥作用的方式可能与PI3K-Akt信号通路、cGMP-PKG信号通路、NF- κ B信号通路和cAMP信号通路等通路相关。分子对接结果显示,石菖蒲挥发油的主要活性成分和其治疗AD的核心靶点结合相对稳定,具有潜在研究价值。

本研究通过GC-MS技术对石菖蒲挥发油进行

定性分析,并结合网络药理学与分子对接的方法对石菖蒲挥发油抗AD的作用机制进行预测,初步探讨了石菖蒲挥发油抗AD的作用机制。由于本研究仅通过网络药理学手段对石菖蒲挥发油抗AD的作用机制进行了预测,其结果仍具有局限性,后续可进行相关动物试验加以印证,来进一步探索石菖蒲挥发油抗AD的作用机制。

参考文献:

- [1] Liu P P, Xie Y, Meng X Y, et al. History and Progress of Hypotheses and Clinical Trials for Alzheimer's Disease[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2019, 4: 29.
- [2] 2022 Alzheimer's Disease Facts and Figures[J]. *Alzheimers Dement*, 2022, 18(4): 700-789.
- [3] Soria L J, Gonzalez H M, Leger G C. Alzheimer's Disease[J]. *Handb Clin Neurol*, 2019, 167: 231-255.
- [4] Tiwari S, Atluri V, Kaushik A, et al. Alzheimer's Disease: Pathogenesis, Diagnostics, and Therapeutics[J]. *Int J Nanomedicine*, 2019, 14: 5541-5554.
- [5] 梅婷婷, 闫璐, 陈晶. 石菖蒲化学成分及其药理作用概述[J]. *中医药信息*, 2022, 39(4): 77-80, 89.
- [6] 杨悦, 谢文婷, 魏涛华, 等. 中药石菖蒲防治阿尔兹海默症研究进展[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2021, 23(9): 68-172.
- [7] 郝野陆, 牛文民. 石菖蒲挥发油用于中枢神经系统疾病防治研究进展[J]. *陕西中医药大学学报*, 2022, 45(2): 141-145.
- [8] Lam K, Wu Q Y, Hu W H, et al. Asarones from *Acori Tatarinowii* Rhizoma Stimulate Expression and Secretion of Neurotrophic Factors in Cultured Astrocytes[J]. *Neurosci Lett*, 2019, 707: 134308.
- [9] Balakrishnan R, Cho D Y, Kim I S, et al. Molecular Mechanisms and Therapeutic Potential of Alpha-and Beta-Asarone in the Treatment of Neurological Disorders[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2022, 11(2): 281.
- [10] Zhang R, Zhu X, Bai H, et al. Network Pharmacology Databases for Traditional Chinese Medicine: Review and Assessment[J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 123.
- [11] 付新, 邓琦川, 张佳宁, 等. 基于网络药理学探讨牛黄治疗阿尔茨海默病的作用机制[J]. *中医药信息*, 2022, 39(8): 23-34.
- [12] 中华人民共和国药典: 四部[S]. 2020: 233.

- [13] 邵佳, 邹俊波, 史亚军, 等. GC-MS分析水蒸气蒸馏法提取石菖蒲挥发油过程中油水分配规律[J]. 中草药, 2020, 51 (1): 59-66.
- [14] Hampel H, Caraci F, Cuello A C, et al. A Path Toward Precision Medicine for Neuroinflammatory Mechanisms in Alzheimer's Disease[J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 456.
- [15] Deng S, Liu S, Jin P, et al. Albumin Reduces Oxidative Stress and Neuronal Apoptosis via the ERK/Nrf2/HO-1 Pathway after Intracerebral Hemorrhage in Rats[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021 (9-10): 1-14.
- [16] 卓芬, 肖华, 黄娟娟, 等. 血清白蛋白及中性粒细胞/淋巴细胞比值预测创伤性脑出血患者预后的价值[J]. 中国急救医学, 2019, 39 (5): 408-411.
- [17] 华晓芳, 沈艳芳. 口服支链氨基酸对心力衰竭合并低蛋白血症患者血清白蛋白水平和心功能的影响[J]. 临床与病理杂志, 2019, 39 (9): 1966-1970.
- [18] Ward S M, Himmelstein D S, Lancia J K, et al. Tau Oligomers and Tau Toxicity in Neurodegenerative Disease[J]. *Biochem Soc Trans*, 2012, 40 (4): 667-671.
- [19] He H J, Wang X S, Pan R, et al. The Proline-Rich Domain of Tau Plays a Role in Interactions with Actin[J]. *BMC Cell Biol*, 2009, 10: 81.
- [20] Long H Z, Cheng Y, Zhou Z W, et al. PI3K/AKT Signal Pathway: A Target of Natural Products in the Prevention and Treatment of Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 648636.
- [21] Huang J, Xu Z, Chen H, et al. Shen Qi Wan Ameliorates Learning and Memory Impairment Induced by STZ in AD Rats through PI3K/AKT Pathway[J]. *Brain Sci*, 2022, 12 (6): 758.
- [22] Xu X, Zhang A, Zhu Y, et al. MFG-E8 Reverses Microglial-induced Neurotoxic Astrocyte (A1) Via NF- κ B and PI3K-Akt Pathways[J]. *J Cell Physiol*, 2018, 234 (1): 904-914.
- [23] Kumar M, Bansal N. Implications of Phosphoinositide 3-Kinase-Akt (PI3K-Akt) Pathway in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease[J]. *Mol Neurobiol*, 2022, 59 (1): 354-385.
- [24] Zhou Z, Dun L, Wei B, et al. Musk Ketone Induces Neural Stem Cell Proliferation and Differentiation in Cerebral Ischemia via Activation of the PI3K/Akt Signaling Pathway[J]. *Neuroscience*, 2020, 435: 1-9.
- [25] Ricciarelli R, Fedele E. cAMP, cGMP and Amyloid Beta: Three Ideal Partners for Memory Formation[J]. *Trends Neurosci*, 2018, 41 (5): 255-266.
- [26] Zhang Y, Qian L, Liu Y, et al. CircRNA-ceRNA Network Revealing the Potential Regulatory Roles of CircRNA in Alzheimer's Disease Involved the cGMP-PKG Signal Pathway[J]. *Front Mol Neurosci*, 2021, 14: 665788.
- [27] Wang L, Xiaokaiti Y, Wang G, et al. Inhibition of PDE2 Reverses Beta Amyloid Induced Memory Impairment through Regulation of PKA/PKG-Dependent Neuro-Inflammatory and Apoptotic Pathways[J]. *Sci Rep*, 2017, 7 (1): 12044.
- [28] Van Dyken P, Lacoste B. Impact of Metabolic Syndrome on Neuroinflammation and the Blood-Brain Barrier[J]. *Front Neurosci*, 2018, 12: 930.
- [29] O'Shea J J, Schwartz D M, Villarino A V, et al. The JAK-STAT Pathway: Impact on Human Disease and Therapeutic Intervention[J]. *Annu Rev Med*, 2015, 66: 311-328.
- [30] 牛康. β -细辛醚对AD模型大鼠认知损伤的影响及可能机理研究[D]. 合肥工业大学, 2020.
- [31] Meng M, Zhang L, Ai D, et al. Beta-asarone Ameliorates Beta-amyloid-induced Neurotoxicity in PC12 Cells by Activating PI3K/Akt/Nrf2 Signaling Pathway[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 659955.
- [32] Yang Y X, Chen Y T, Zhou X J, et al. Beta-asarone, a Major Component of *Acorus Tatarinowii* Schott, Attenuates Focal Cerebral Ischemia Induced by Middle Cerebral Artery Occlusion in Rats[J]. *BMC Complement Altern Med*, 2013, 13: 236.
- [33] Wang M, Zhang J, Zhang J, et al. Methyl Eugenol Attenuates Liver Ischemia Reperfusion Injury Via Activating PI3K/Akt Signaling[J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 99: 108023.
- [34] Alves J E, de Oliveira F R, de Lima S C, et al. Estragole Prevents Gastric Ulcers Via Cytoprotective, Antioxidant and Immunoregulatory Mechanisms in Animal Models[J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 130: 110578.

(收稿日期 2023年3月22日 编辑 王雅雯)