

基于网络药理学和实验验证研究柠檬精油 缓解焦虑症的作用机制

张依萍^{1*}, 徐旭², 吕亿婷¹,
黄金琴¹, 王盛东¹, 奚林芝¹, 王丹丹¹, 刘畅¹

¹浙江万里学院生物与环境学院, 宁波 315100; ²宁波大央科技有限公司, 宁波 315020

摘要: 基于网络药理学方法探讨柠檬精油 (lemon essential oil, LEO) 干预焦虑症的作用机制并进行实验验证。GC-MS 测定 LEO 组成, 从 TCMSp 平台挖掘 LEO 的作用靶点; 利用 OMIM、GeneCards 数据库获得焦虑症靶点; 利用 Venny 获得 LEO-焦虑症的交集靶点, 进行 GO 和 KEGG 富集; 利用 Cytoscape 构建“成分-靶点-通路-疾病”网络, 利用 1-Click Docking 对关键成分与靶点进行分子对接。利用细胞炎症模型进行验证。从构建的网络中得到 LEO 的 19 种活性成分如柠檬烯、 α -松油醇、 β -蒎烯、乙酸橙花酯、4-萜品醇等, 通过作用于 18 个疾病靶点 (占总靶点 78.26%) 如 GABRA2、MAO、DRD1、GRIA2 等, 调控 20 条信号通路如神经活性配体-受体相互作用、羧胺能突触、多巴胺能突触等。柠檬精油对 DPPH、ABTS 自由基有抑制作用, 能降低由脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导 HaCaT 细胞内活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 水平, 降低炎症因子 NO、TNF- α 及 IL-6 水平。LEO 通过多种有效成分多靶点调控多条信号通路降低细胞氧化应激、抑制炎症反应, 从而干预焦虑症。

关键词: 柠檬精油; 焦虑症; 网络药理学; 细胞炎症模型

中图分类号: R966; R285.5

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2024)2-0336-12

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2024.2.016

Mechanism of lemon essential oil in mitigation of anxiety based on network pharmacology and experimental validation

ZHANG Yi-ping¹, XU Xu², LYU Yi-ting¹, HUANG Jin-qin¹,
WANG Sheng-dong¹, XI Lin-zhi¹, WANG Dan-dan¹, LIU Chang¹

¹College of Biological & Environmental Sciences, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100, China;

²Ningbo Dayang Technology Co., Ltd., Ningbo 315020, China

Abstract: The mechanism of lemon essential oil (LEO) intervention in anxiety disorder was investigated using network pharmacology, and its efficacy was validated through experimental verification. The composition of LEO was determined by GC-MS, and the target compounds in LEO were identified from the Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology (TCMSp) platform. The target for anxiety disorder was obtained from the OMIM and GeneCards databases. The intersection target of LEO-anxiety disorder was determined using Venny, and subsequent enrichment analyses were performed for GO and KEGG pathways. The "component-target-pathway-disease" network was constructed using Cytoscape, and the key components were subjected to target docking through 1-Click Docking. The cellular inflammation model was employed for validation. The constructed network identified a total of nineteen active components in LEO, including limonene, α -terpineol, β -pinene, neroli acetate, 4-terpinol, and others. The compound exerts its effects on 18 disease targets, thereby modulating 20 signaling pathways including neuroactive ligand-receptor interaction, serotonergic synapses, and dopaminergic synapses among others. The eighteen disease targets accounted for 78.26% of the total target count, including GABRA2, MAO, DRD1, GRIA2, etc. The LEO demonstrates inhibitory effects on DPPH and ABTS free radicals, suppresses the generation of reactive oxygen species in Lipopo-

lysaccharide-induced HaCaT cells, and reduces the levels of inflammatory factors NO, TNF- α , and IL-6. The various active components of LEO can modulate multiple signaling pathways through interactions with multiple targets, thereby attenuating cellular oxidative stress, suppressing inflammatory responses, and ultimately intervening in anxiety disorders.

Key words: lemon essential oil; anxiety disorders; network pharmacology; cellular inflammation model

焦虑症是一种以暂时性或持续性情绪紧张为主要临床症状,并伴有自主神经紊乱、运动障碍等症状的神经症,也是一种心情不愉快并且伴随身体不适的精神类疾病^[1]。近些年,人们的生活、学习和工作压力不断增加,使得抑郁症和焦虑症患病率大幅度提升。据统计,全世界患有抑郁症的人数占3.01%~5.00%、患有焦虑症的人数占4.00%~6.50%^[2]。目前,治疗抑郁和焦虑的药物主要是艾司西酞普兰、文拉法辛、苯二氮卓类等西药,但其副作用大、依赖性强、用药周期长,给患者身体带来了一定的伤害。

焦虑症治疗除了药物治疗和心理治疗外,芳香疗法被认为是一种有效的辅助治疗手段^[3]。植物精油有一系列的药理特性,包括抗焦虑、抗抑郁、镇静安神、神经保护作用等药理活性,许多动物和人类研究都支持使用香气及其成分来减少焦虑相关症状行为^[4]。佛手、甜橙、香紫苏、柠檬草和薰衣草等植物精油,通过嗅吸或按摩方法对焦虑症状改善有积极的效果且未出现任何不良反应^[5]。薰衣草精油中富含的芳樟醇、玫瑰精油中富含的香叶醇均在舒缓焦虑方面有作用^[6]。研究发现,从柠檬果皮中提取的柠檬精油可以改善情绪、认知、缓解疲劳,可防止考试焦虑期间的认知能力下降^[7];嗅吸柠檬精油(lemon essential oil, LEO)可显著升高人体脑电波的 β 波^[8]。Martial等^[9]采用行为试验研究了柠檬精油蒸汽对小鼠的抗应激作用,发现吸入柠檬精油后的小鼠在高架迷宫和开放场地测试中都有抗焦虑作用。Özer等^[10]研究了大鼠持续暴露于扩散的柠檬精油氛围的行为、激素和神经元反应,发现大鼠在抬高加速迷宫张开臂中花费的时间减少、热伤害阈值提高、福尔马林诱导的疼痛行为降低,下丘脑和中脑导水管周围灰质中的皮质酮浓度降低,表明LEO会导致与焦虑和疼痛有关的神经元回路发生显著变化。但是LEO是多种成分的混合物,具有“多成分、多靶点”的特点,对其抗焦虑症的作用机制尚未得到很好的阐明。

网络药理学是将药物作用网络与生物网络相结合,基于“药物-靶点-通路-疾病”模型,分析药物与

生物体之间的相互作用,系统地探讨药物与疾病之间的关系^[11,12]。本研究基于网络药理学方法,对柠檬精油抗焦虑的关键成分、靶点和信号通路进行预测分析,并结合系列实验(抗氧化活性、细胞炎症和小鼠焦虑模型)对网络药理学筛选出的柠檬精油中的关键成分、作用靶标进行验证,为柠檬精油抗焦虑的临床应用提供理论与实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料与仪器

材料:新鲜柠檬购于宁波果品批发市场,经由浙江万里学院刘利萍教授鉴定确认;乙酸橙花酯(批号PPE8F-RN,东京化成工业株式会社,纯度 $\geq 98\%$)。

试剂:CCK-8试剂盒(批号23131244, Biosharp);活性氧荧光法测试盒(批号UX030F603865, Elabscience);TNF- α ELISA试剂盒(批号GY01X64D0991, Elabscience);IL-6ELISA试剂盒(批号GY012R225072, Elabscience);NO含量检测试剂盒(批号20220718,索莱宝);DPPH(批号GTBXB-QP,上海化成工业发展有限公司);ABTS(批号C14003395,麦克林);DMEM细胞培养液(批号2204025, Viva Cell);胎牛血清(批号2011B, BOVAGEN);小鼠多巴胺受体D1 ELISA试剂盒(批号CV04TR4B0207,武汉伊莱瑞特);小鼠AMPA离子能谷氨酸受体2酶联免疫试剂盒(批号E220ER059,武汉菲越生物);小鼠白细胞介素6高敏ELISA试剂盒(批号70-EK206HS-96,联科生物);苏木精(批号SLBN3249V, SIGMA);伊红(批号62R80915X, SIGMA)。

细胞:HaCaT人永生表皮细胞(批号339817,北纳创联生物技术有限公司)。

动物:25只ICR小鼠(SPF级),雌性,体质量18~22 g,购自上海斯莱克实验动物公司,动物合格证号SCXK(沪)2022-0004。饲养于杭州赫贝科技有限公司,实验动物住所许可编号SYXK(浙)2020-0013,在温度20~25℃、湿度40%~70%,12 h光暗周期,自由进食(江苏协合药业生物工程有限公司提供饲料)饮水。操作符合动物实验3R原则和

动物实验伦理要求(经杭州赫贝科技有限公司动物实验中心审批,审批号为 HB2301006)。

仪器:气相色谱-质谱联用仪(8890-5977B,安捷伦);紫外可见分光光度计(TU-1810,北京普析通用仪器公司);高速离心机(5417R,艾本德);雾化机(405E,鱼跃);病理组织漂烘仪(TEC 2500型,常州市郝思琳仪器设备有限公司);轮转式切片机(RM2235型,LEICA公司);显微镜(BX43型,O-LYMPUS);全波长酶标仪(SpectraMax Plus 384型,美国MD);恒温培养箱(PYX-DHS500BS-II型,上海跃进医疗器械公司)。

1.2 柠檬精油活性成分及对应靶点筛选

采用水蒸气蒸馏法提取柠檬果皮精油,气相色谱质谱联用仪(GC-MS)测定柠檬精油的组成,以血脑屏障(blood brain barrier, BBB) > 0.3 为筛选条件,获得柠檬精油中的主要活性成分。利用中医药系统药理学平台(TCSMP)预测活性成分的作用靶点,并用 Uniprot 数据库对靶点蛋白进行规范化。利用 Cytoscape 构建“柠檬精油-成分-靶点”网络图。

1.3 焦虑症靶点的收集

以“anxiety”和“anxiety disorder”为关键词,检索 OMIM、GeneCards 数据库,从 GeneCards 数据库取 3 次中位数,收集大于中位数的靶点为焦虑症的潜在靶点。合并数据库靶点,删除重复值,得到焦虑症靶点。

1.4 柠檬精油-焦虑症的共同靶点获取及蛋白质互作网络构建

利用 Venny 软件和微生信网站中的可视化工具获取柠檬精油与焦虑症的共同靶点。将二者的共同靶点输入 STRING 数据库构建蛋白互作网络(PPI),其中物种设为“Homo sapiens”,置信度 ≥ 0.15 ,隐藏网络中无联系的节点,利用 Cytoscape 软件可视化。以度值评估靶点的重要性,预测关键靶点。

1.5 靶点功能富集分析与网络构建

利用 David 数据库对共同靶点进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析,GO 选择生物过程(biological process, BP)、细胞组分(cellular component, CC)和分子功能(molecular function, MF)3 个模块。KEGG 分析选择 KEGG Pathway 模块。采用 Cytoscape 软件,以排行前 20 条通路及其涉及的交集靶点,以及这些靶点映射的活性成分构建“柠檬精油-成分-靶点-通路-焦虑症”网络。

1.6 关键化合物及核心靶点的分子对接

在 PubChem 数据库下载关键化合物分子结构的 SDF 格式,通过 Open babel 将 SDF 格式转化为 mol2 格式;通过 RCSB PDB 数据库得到核心靶点的最佳蛋白结构的 PDB 格式。利用 1-Click Docking 对活性成分与关键靶点进行分子对接,并用 Pymol 软件对分子对接结果进行可视化。

1.7 清除自由基活性

在试管中加入 4 mL DPPH 或 ABTS 工作液与 1 mL 样品混匀,暗置反应 30 min,以 95% 乙醇调零,在 518 nm 或 734 nm 处测吸光值(A 值)。以定容样液溶剂代替样液作为空白组,以 VC 作阳性对照组。重复平行 3 次,按公式(1)计算自由基清除率(R_c)。

$$R_c = [(A_1 - A_2) / A_1] \times 100\% \quad (1)$$

式中, A_1 为以样液溶剂代替样液测得的吸光度, A_2 为测定的样品的吸光度。

1.8 细胞活性

细胞活性:收集对数期细胞,调整细胞悬液浓度至 1×10^4 个/孔,过夜,加入 100 μ L 浓度为 0(正常组, Nor)、0.001、0.01、0.1、1、10、100 μ g/mL 的样品液,培养 24 h 后,每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液,继续孵育 4 h,在 450 nm 测定吸光值(A 值)。按公式(2)计算细胞相对生长率(R_c)。

$$R_c = [(A_1 - A_2) / A_1] \times 100\% \quad (2)$$

式中, A_1 为正常生长的细胞的吸光度, A_2 为加入测定的样品的吸光度。

1.9 抗氧化及抗炎活性的测定

抗细胞氧化活性^[13]:将对数生长期细胞按 2×10^5 个/孔接种到 6 孔培养板中。置培养箱中培养 24 h。设置 3 个组:空白对照组(control, Con),只加 2 mL 培养基;模型组(model, Mod),加入 2 mL 含 20 μ g/mL LPS 的培养基;样品组,为 3 个剂量(0.25、0.5、1 μ g/mL)且 LPS 的终浓度为 20 μ g/mL。继续培养 24 h 后,收集上清液,离心去除残留细胞。加入无血清培养基按 1:1 000 稀释 DCFH-DA,37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min。用无血清培养基洗涤细胞三次以去除 DCFH-DA。用荧光酶标仪检测(激发波长 500 nm、发射波长 525 nm)各组荧光值,并与空白对照组对比。

抗炎活性:按上述收集的细胞上清液,根据 ELISA 试剂盒说明书分别测定 NO、TNF- α 及 IL-6 细胞因子水平。

1.10 小鼠水迷宫实验

小鼠分组与给药:小鼠适应性饲养 7 d 后,随机分组,每组 5 只,设立空白对照组(control, Con)、模型组(model, Mod)、奥沙西洋阳性组(Positive, Pos)(用生理盐水配成 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 药液,按照 10 mL/kg 灌胃给药)、精油组(LEO)(用纯净水配成 5% 精油雾化液,每天同一时间段给予小鼠持续吸入雾化精油 30 min,持续 3 周)、乙酸橙花酯单体组(neryl acetate, NA)(浓度 5%,同精油组)。

小鼠焦虑模型建立:对照组小鼠正常饲养不采取任何刺激,其余四组均采用慢性不可预知应激(chronic unpredictable mild stress, CUMS)方法造模刺激^[18]。随机设置 7 种刺激,每天 2 种,每种刺激出现 6 次,分别是:冰水游泳(4 $^{\circ}\text{C}$, 5 min)、热应激(45 $^{\circ}\text{C}$, 5 min)、禁水(24 h)、禁食(24 h)、夹尾(1 min)、斜坡饲养、潮湿垫料(24 h),共计 21 d。

水迷宫测试:21 d 刺激后进行,(1)定位航行:共 5 d,每天同一时间开始,测试四次。将小鼠头朝向池壁轻轻地放在水里,从进入水里到发现平台为逃避潜伏期,时限为 2 min,2 min 后发现平台,小鼠在平台上逗留 15 s;如果 2 min 后小鼠没有发现该平台,那么将小鼠引到该平台上待 30 s。(2)空间探索:第 6 d,撤去隐藏在水面下的平台,选择与平台

相对的象限中点作为入水点,记录小鼠在 2 min 内穿越平台的次数及在平台象限的总时间。

海马 HE 染色(hematoxylin-eosin staining)观测:小鼠麻醉后开颅取海马,海马用体积分数 4% 多聚甲醛固定 24 h,经脱水、透明、石蜡包埋后切片,HE 染色,光镜($\times 400$)观察海马区状态。

纹状体中相关蛋白的 ELISA 测定:小鼠麻醉后开颅取纹状体(液氮冻存),称取样品适量,按照试剂盒说明书的步骤检测小鼠脑纹状体中 DRD1、GRIA2 及 IL6 含量。

1.11 数据处理

结果用平均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。应用单因素方差分析和 Newman-Keuls 法对各组之间的差异进行比较。 $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 柠檬精油化学成分

柠檬精油的成分归属及鉴定信息的总离子流图(见图 1)。由 GC-MS 鉴定出柠檬精油有 30 种成分,相对百分含量 $> 1\%$ 的化合物有 26 种,占总峰面积的 94.94%,含量最高的组分是 β -红没药烯,占比最高的成分为萜烯类化合物。柠檬精油以嗅吸方式给药,符合 BBB 筛选条件的成分有 23 种(见表 1)。

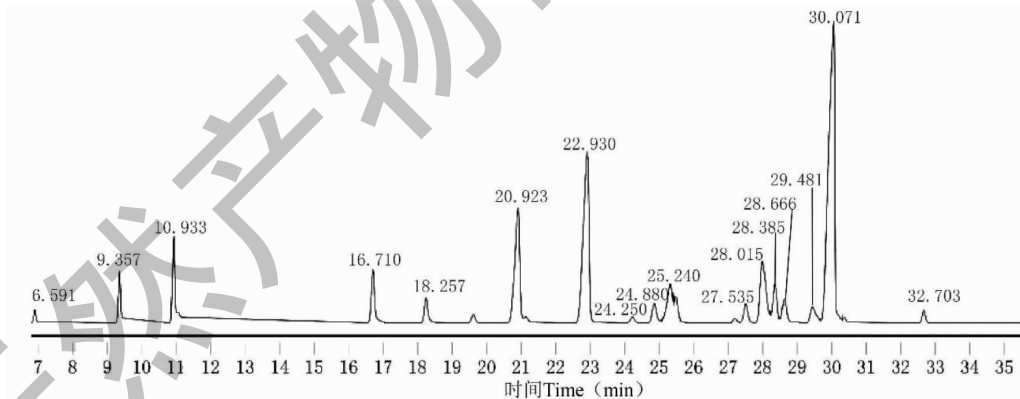


图 1 柠檬精油的总离子流图

Fig. 1 Total ion chromatograms of LEO

表 1 柠檬精油的有效成分

Table 1 Active ingredients of LEO

化合物名称 Compound name	化合物 ID Compound ID	分子式 Molecular formula	血脑屏障 BBB
(+)-柠檬烯 (+)-Limonene	MOL000023	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}$	2.12
β -蒎烯 β -Pinene	MOL000126	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}$	2.12
α -蒎烯 α -Pinene	MOL006867	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}$	2.18

续表 1 (Continued Tab. 1)

化合物名称 Compound name	化合物 ID Compound ID	分子式 Molecular formula	血脑屏障 BBB
二氢香芹醇 (+)-Dihydrocarveol mixture of isomers	MOL008329	C ₁₀ H ₁₈ O	1.3
月桂烯 7-Methyl-3-methyleneocta-1,6-diene	MOL000197	C ₁₀ H ₁₆	1.98
4-萜烯醇 Terpinen-4-ol	MOL004786	C ₁₀ H ₁₈ O	2.19
柠檬醛 Citral	MOL000124	C ₁₀ H ₁₆ O	1.43
芳樟醇 Linalool	MOL001604	C ₁₀ H ₁₈ O	0.74
3-萜烯 3-Carene	MOL008168	C ₁₀ H ₁₆	1.8
薰衣草醇 (-)-Lavandulol	MOL005957	C ₁₀ H ₁₈ O	1.3
α -松油醇 α -Terpineol	MOL000232	C ₁₀ H ₁₈ O	1.4
巴伦西亚橘烯 Valencene	MOL001606	C ₁₅ H ₂₄	2.02
(+)-双环大根香叶烯 Bicyclogermacrene	MOL001184	C ₁₅ H ₂₄	2.13
萜品油烯 Terpinolene	MOL000264	C ₁₀ H ₁₆	2.11
(-)-4-萜品醇 (-)-Terpinen-4-ol	MOL000922	C ₁₀ H ₁₈ O	1.52
4-乙基愈创木酚 Homocresol	MOL000432	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	0.84
甲基丁香酚 Methyleugenol	MOL002334	C ₉ H ₁₂ O ₂	1.42
正癸酸 Decanoic acid	MOL000207	C ₁₁ H ₁₄ O ₂	1.41
香叶醇 Geraniol	MOL001640	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	1.06
乙酸橙花酯 Neryl acetate	MOL000123	C ₁₀ H ₁₈ O	1.14
反式石竹烯 β -Caryophyllene	MOL000597	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	1.4
金合欢烯 α -Farnesene	MOL000036	C ₁₅ H ₂₄	2.07

2.2 “柠檬精油-成分-靶点”网络图

22 种成分均有对应的靶点共计 76 个 (见图 2)。该网络中总节点度值为 249, 平均节点度值为 11.32, 大于平均值的有 11 个, 分别是香叶醇、柠檬

烯、巴伦西亚橘烯、亚油酸、乙酸橙花酯、异松油烯、 β -石竹烯、 β -蒎烯、 α -萜品醇、甲基丁香酚、4-萜品醇。这 11 个成分可能起到重要作用。

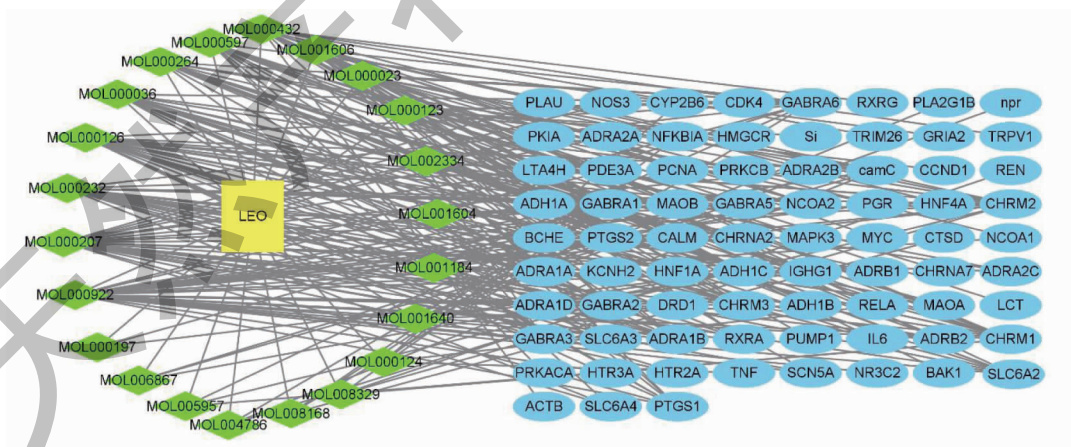


图 2 “柠檬精油-成分-潜在靶点”网络图

Fig. 2 Network diagram "LEO-components-potential targets"

2.3 “柠檬精油-焦虑症”的交集靶点及蛋白质互作网络图

从 GeneCards 和 OMIM 数据库中筛选焦虑症靶

点,经除重和标准化,获得焦虑症靶点 787 个。将柠檬精油成分靶点和焦虑症疾病靶点作韦恩图,二者有 23 个共同靶点 (见图 3)。

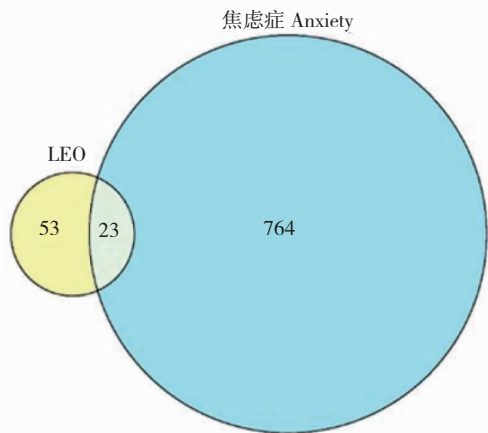


图3 柠檬精油-焦虑症交集靶点的韦恩图

Fig. 3 Venn diagram of LEO-anxiety intersection targets

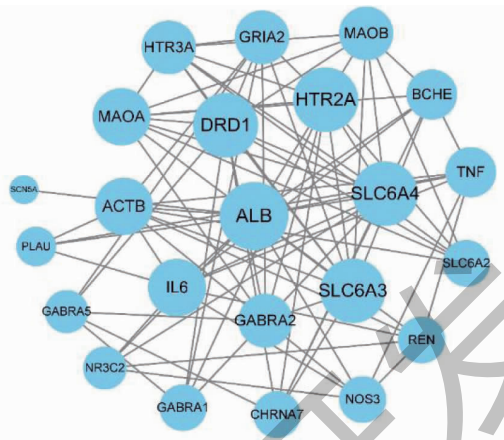


图4 交集靶点的PPI拓扑图

Fig. 4 PPI topology of intersection targets

23个交集靶点的蛋白互作(见图4)。String分析显示平均节点度值为16.2,大于平均值的节点有12个,它们是:白蛋白(ALB)、多巴胺受体D1(DRD1)、5-羟色胺受体2A(HTR2A)、溶质载体家族6成员4(SLC6A4)、溶质载体家族6成员3(SLC6A3)、 γ -氨基丁酸A型受体亚基alpha2(GABRA2)、白细胞介素6(IL6)、肌动蛋白 β (ACTB)、单胺氧化酶A(MAOA)、5-羟色胺受体3A(HTR3A)、AMPA离子能谷氨酸受体2(GRIA2)、单胺氧化酶B(MAOB)。这12个蛋白可能为核心靶点。

2.4 GO富集分析

以 $P < 0.05$ 筛选得到BP 38项、CC 19项、MF 18项。选取 $-\log_{10}(P)$ 值大小排序前12项得到GO条形图(见图5)。

GO富集结果表明:生物过程(BP)中交集靶点主要涉及了给药反应、离子跨膜运输、多巴胺分解代谢过程、单胺运输等过程;细胞组分(CC)中关键靶点主要分布于质体膜、突触后膜、浆膜的整体组成部分、细胞交界处等部位;分子功能(MF)中关键靶点主要与细胞外配体门控离子通道活性、单胺跨膜转运器活性、药物结合、一氧化二氮合成酶结合等有关。

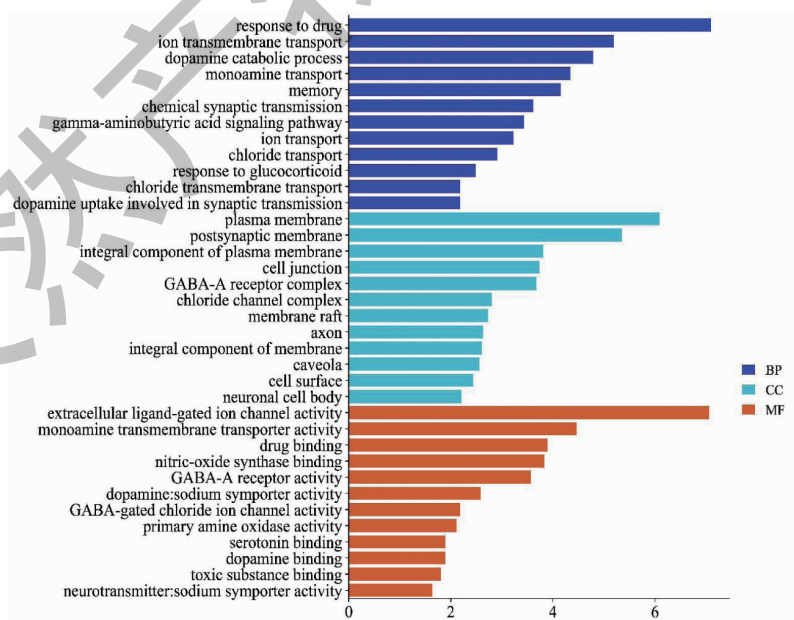


图5 柠檬精油干预焦虑症的核心网络靶点的GO分析条形图

Fig. 5 Bar graph of GO analysis of core network targets for LEO intervention in anxiety disorders

2.5 KEGG 通路富集分析

以 $P < 0.05$ 为标准,共富集获得 31 条 KEGG 通路,其中前 20 条 KEGG 通路(见图 6)。X 轴为通路中关键基因数占比,Y 轴为通路名称;气泡颜色即 $-\log_{10}(P)$ 值,颜色越红, P 值越小,富集程度越好;气

泡大小表示参与通路的基因数的多少。

20 条通路中包括神经活性配体-受体相互作用、羟色胺能突触、尼古丁成瘾、多巴胺能突触、可卡因成瘾、安非他命成瘾等,所含交集靶点的数目相对较多,可能是柠檬精油抗焦虑症的关键通路。

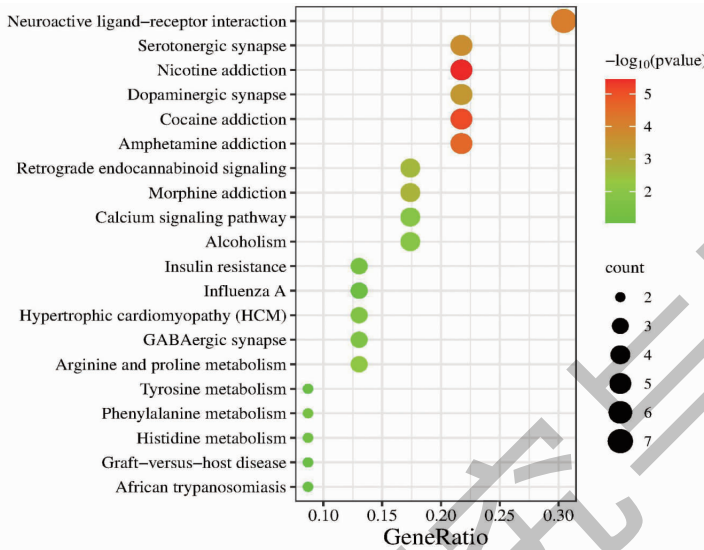


图 6 柠檬精油干预焦虑症核心靶点的 KEGG 通路富集气泡图

Fig. 6 Bubble map of KEGG pathway enrichment for LEO intervention in core targets of anxiety disorders

2.6 “柠檬精油-成分-靶点-通路-焦虑症”拓扑网络

前 20 条 KEGG 通路中涉及交集靶点有 18 个,占交集靶点总数的 78.26%。将这 20 条 KEGG 通路、18 个交集靶点以及涉及的柠檬精油的 19 个活性成分进行联合分析,得到的网络(见图 7)。

品醇的度值较大,表明是作用于焦虑症的重要活性成分。 γ -氨基丁酸 A 型受体亚基 (GABRA1、GABRA2、GABRA5)、单胺氧化酶 (MAOB、MAOA)、溶质载体家族 6 (SLC6A3、SLC6A2)、多巴胺受体 D1 (DRD1)、AMPA 离子型谷氨酸受体亚基 2 (GRIA2)、白细胞介素 6 (IL-6) 等靶点的度值较大,可能是柠檬精油参与调控焦虑症的重要靶点。

该网络中有 57 个节点,其中,柠檬烯、 α -松油醇、甲基丁香酚、 β -蒎烯、乙酸橙花酯、 β -石竹烯、4-萜

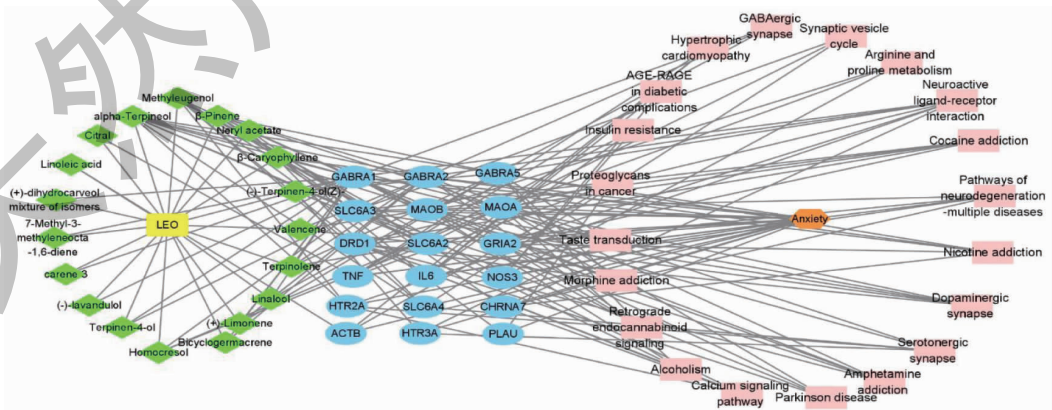


图 7 “柠檬精油-活性成分-靶点-通路-疾病”网络

Fig. 7 "LEO-active ingredient-target-pathway-disease" network

注:黄色长方形表示柠檬精油;绿色菱形表示 19 个活性成分;蓝色椭圆形表示活性成分调控的 18 个靶点;粉色长方形表示 20 条通路;橙色六边形代表焦虑症。Note: Yellow rectangles represent LEO; green diamonds represent the 19 active ingredients; blue ovals represent the 18 targets modulated by the active ingredients; pink rectangles represent the 20 pathways; and orange hexagons represent anxiety disorders.

2.7 分子对接

根据“2.6”项,选取柠檬烯、 β -蒎烯、4-萜品醇、

α -松油烯、乙酸橙花酯与 DRD1、GRIA2、IL-6 蛋白进行分子对接(见表2)。

表2 柠檬精油活性成分与关键靶点的最低结合能

Table 2 Minimum binding energy of active ingredients of LEO with key targets

靶点名称 Target name	结合能 Binding energy(kcal/mol)					
	柠檬烯 (+)-Limonene	β -蒎烯 β -Pinene	4-萜品醇 (-)-Terpinen-4-ol	α -松油烯 α -Terpineol	乙酸橙花酯 Neryl acetate	奥沙西洋 Oxazepam
DRD1	-6.2	-5.5	-6	-6.4	-5.7	-5.2
GRIA2	-5.2	-4.8	-5.3	-5.5	-6	-6.4
IL6	-5.3	-4.1	-5.5	-5.9	-6.4	-7.5

一般认为分子对接结合能 < -5.0 kcal/mol, 表示配体与受体可以较好地自发结合。表2中的五个活性成分和 DRD1 的结合能均高于对照奥沙西洋, 与 GRIA2 和 IL6 的结合能多数都低于 -5 kcal/mol, 但与对照奥沙西洋相比略差。总的来看, 五个成分

都能有效的与 DRD1、GRIA2、IL-6 受体结合。

以乙酸橙花酯为例, 与靶蛋白 DRD1、GRIA2 与 IL-6 之间结合(见图8)。乙酸橙花酯与 DRD1、IL6 的结合模式以盐桥为主、疏水作用为辅; 乙酸橙花酯与 GRIA2 的结合模式以疏水作用为主、氢键为辅。

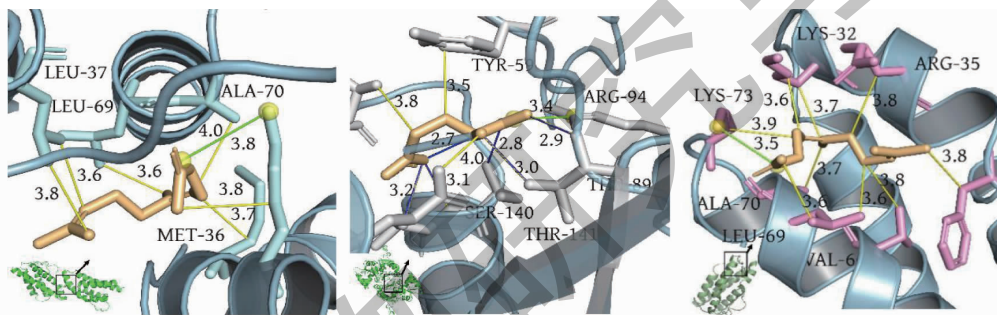


图8 乙酸橙花酯与靶点对接可视化图

Fig. 8 Visualisation of NA docking with the target

注: 从左到右受体分别为 DRD1、GRIA2 与 IL6。橙色代表乙酸橙花酯, 灰色代表靶蛋白; 绿色代表结合的盐桥、蓝色代表结合的氢键, 黄色代表二者结合位点的疏水作用力。Note: From left to right, the receptors are DRD1, GRIA2 and IL6. Orange represents NA, grey represents the target protein; Green represents the bound salt bridge, blue represents the bound hydrogen bond, and yellow represents the hydrophobic force at the binding site of both.

2.8 体外抗氧化活性

柠檬精油抗 DPPH、ABTS 自由基的效果强于乙酸橙花酯(见图9), 且抗 ABTS 的效果优于抗 DP-

PH, 与同浓度的阳性对照 VC 相近。可见柠檬精油多成分之间有协同性。

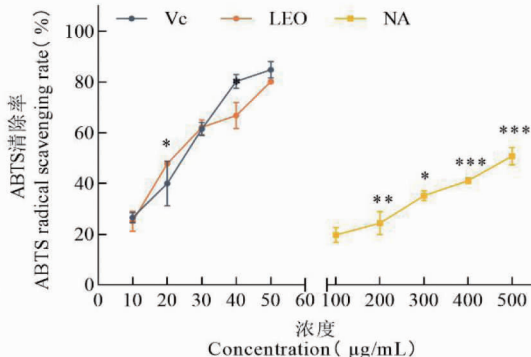
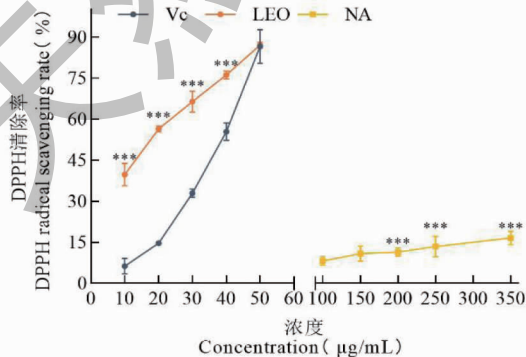


图9 柠檬精油和乙酸橙花酯对 DPPH 和 ABTS 的清除率($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 9 The DPPH and ABTS scavenging rate of LEO and NA($\bar{x} \pm s, n=3$)

注: 与 Vc 相比, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$ 。Note: Compared with Vc, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$.

2.9 浓度对细胞活性的影响

柠檬精油和乙酸橙花酯对 HaCaT 细胞的活性影响(见图 10)。在 0.001 ~ 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度范围内,几乎不影响细胞的存活率,在一定程度上对细胞

生长还有促进作用。当浓度 $\geq 10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时,细胞的活力大大降低。因此,选择精油浓度 $\leq 1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 进行后续实验。

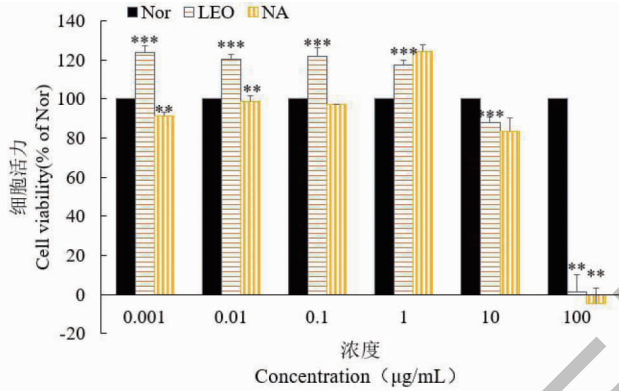


图 10 柠檬精油和乙酸橙花酯浓度对 HaCaT 活力的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 10 Effect of different concentrations of NA and LEO on HaCaT viability($\bar{x} \pm s, n = 3$)

注:与 Nor 相比, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。Note: Compared with Nor, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。

2.10 细胞内抗氧化活性和抗炎症的影响

精油对 LPS 刺激的 HaCaT 细胞中 ROS 的清除率(见图 11a)。通过检测荧光强度发现,与正常组相比,模型组荧光强度明显增强($P < 0.01$),表示细

胞炎症造模成功。与模型组比较,柠檬精油与乙酸橙花酯对 ROS 都有清除作用,呈剂量依赖性。说明柠檬精油及其关键单体乙酸橙花酯通过降低细胞内 ROS 水平缓解氧化应激带给细胞的炎症损伤。

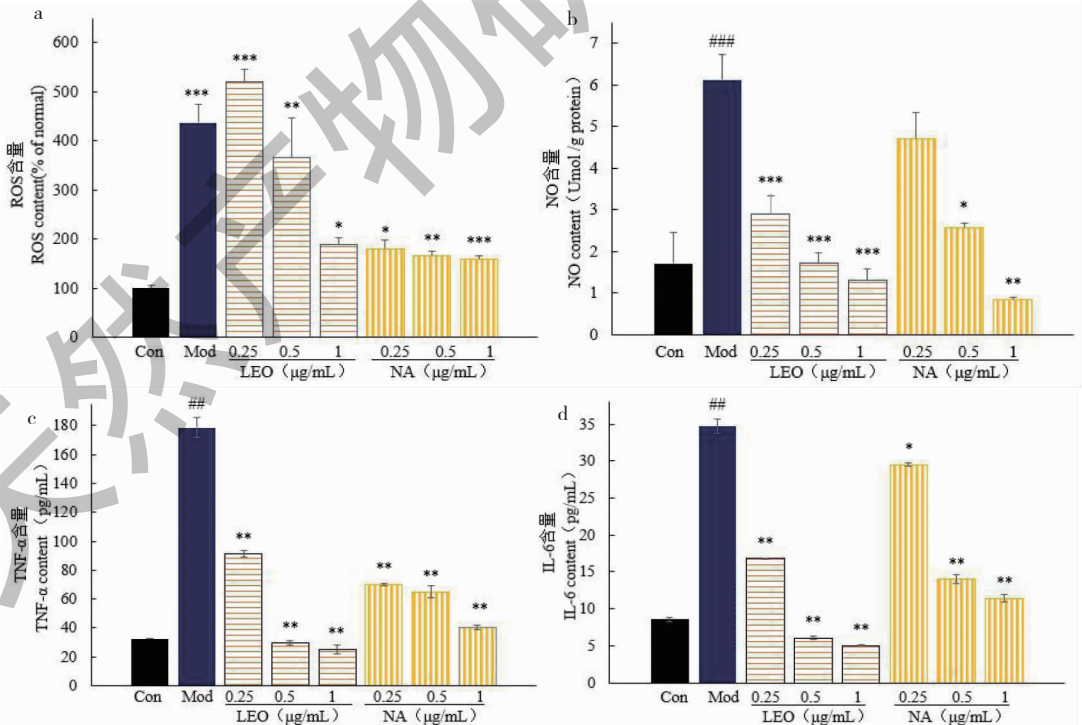


图 11 柠檬和乙酸橙酯对 LPS 刺激的 HaCaT 细胞的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 11 Effect of LEO and NA in LPS-stimulated HaCaT cells($\bar{x} \pm s, n = 3$)

注:与 Con 相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$; 与 Mod 相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。Note: Compared with Con, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$; Compared with Mod, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

通过对炎症因子的检测结果发现(见图 11),模型组的 NO、TNF- α 及 IL-6 水平显著升高 ($P < 0.01$),给予柠檬精油与乙酸橙花酯干预后有不同程度的降低,呈剂量依赖性。上述结果初步证明了柠檬精油及其关键成分乙酸橙花酯对炎症相关因子和趋化因子的调节作用。

2.1 1 嗅吸柠檬精油对小鼠行为学的影响

与空白组比较,模型组小鼠在水中央区域活动

范围、目标象限游泳时间以及穿越次数明显减少 ($P < 0.01$),说明采用 CUMS 刺激造焦虑模型成功(见图 12)。柠檬精油组及乙酸橙花酯组与模型组比较,总体在水中央区域活动距离、目标象限游泳时间以及穿越次数都强于模型组,且柠檬精油组差异有统计学意义 ($P < 0.01$),表明经过嗅吸雾化的柠檬精油后,小鼠的学习记忆能力均较模型组有一定的改善(见表 3)。

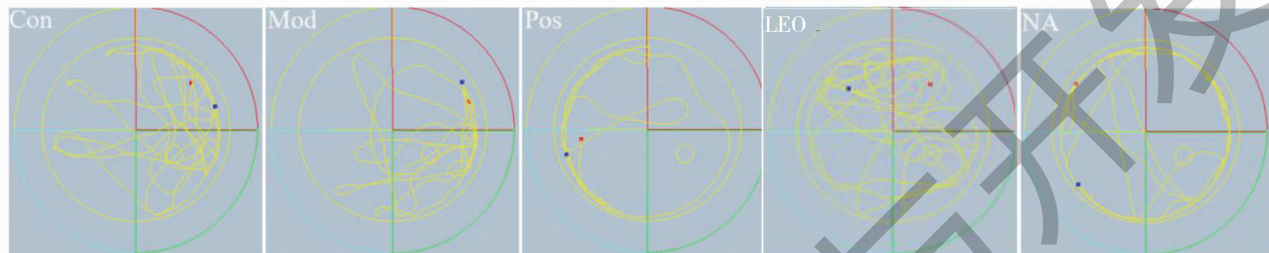


图 12 水迷宫轨迹图

Fig. 12 Morris water maze trajectory diagram

表 3 小鼠水迷宫实验结果 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 3 Results of morris water maze experiments in mice ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别 Group	逃避潜伏期 Latency to platform (s)					目标平台滞留时间 Target platform dwell time (s)	有效进入平台次数 Times of effective area entry (次)
	第一天 Day 1	第二天 Day 2	第三天 Day 3	第四天 Day 4	第五天 Day 5		
Con	88.22 \pm 42.88	59.57 \pm 46.17	61.54 \pm 38.45	34.62 \pm 18.81	48.27 \pm 33.46	30.05 \pm 10.45	3.67 \pm 0.58
Mod	77.69 \pm 43.95	102.27 \pm 29.83 [#]	94.98 \pm 46.11	102.80 \pm 38.37 ^{##}	112.27 \pm 26.85 ^{##}	17.58 \pm 13.68	0.33 \pm 0.58 ^{##}
Pos	89.83 \pm 46.29	85.21 \pm 38.50	90.83 \pm 47.51	84.15 \pm 47.12	71.07 \pm 48.09 [*]	41.02 \pm 14.64	3.00 \pm 0.00 ^{**}
LEO	92.68 \pm 43.23	48.79 \pm 41.01 ^{**}	84.76 \pm 44.87	107.47 \pm 28.88	111.25 \pm 30.44	25.26 \pm 3.51	2.00 \pm 0.00 ^{**}
NA	60.73 \pm 47.04	41.63 \pm 47.10 ^{**}	58.22 \pm 41.55	67.85 \pm 41.43 [*]	107.87 \pm 29.65	33.01 \pm 5.98	1.67 \pm 1.15

注:与 Con 相比,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$;与 Mod 相比,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$,下同。

Note:Compared with Con,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$;Compared with Mod,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$,the same below.

2.12 嗅吸柠檬精油对小鼠血浆中 DRD1、GRIA2 及 IL6 水平的影响

依据“2.6、2.7”网络药理学研究结论,柠檬精

油主要作用靶点是 DRD1、GRIA2、IL-6 蛋白,对血浆中上述蛋白的 ELISA 检测结果(见表 4)。

表 4 嗅吸精油对小鼠血浆中 DRD1、GRIA2、IL6 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 4 Effect of sniffing LEO and NA on plasma levels of DRD1, GRIA2, IL6 in mice ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别 Group	DRD1 (ng/mL)	GRIA2 (ng/mL)	IL-6 (pg/mL)
Con	58.69 \pm 9.97	1.11 \pm 0.25	15.67 \pm 11.92
Mod	32.63 \pm 7.67	2.51 \pm 0.56 [#]	90.72 \pm 14.50 ^{##}
Pos	47.21 \pm 17.25	1.76 \pm 0.43	47.58 \pm 13.05 [*]
LEO	45.47 \pm 6.57	1.84 \pm 0.30	60.70 \pm 11.53 [*]
NA	48.88 \pm 10.46	2.17 \pm 0.67	58.45 \pm 10.11 [*]

焦虑组小鼠血浆中 GRIA2、IL6 含量较空白组

上升,但 DRD1 较空白组有所下降,其中 GRIA2、IL-

6 差异有极显著性 ($P < 0.01$), 造模成功; 各给药组与焦虑组比较, GRIA2、IL6 含量均低于焦虑组, 而 DRD1 含量有所上升, 其中 IL-6 有显著性差异 ($P < 0.05$), 但是均高于空白组, 表示嗅吸精油后对焦虑症状有不同程度的缓解但还没有恢复到正常水平。

2.13 海马组织的 HE 染色

小鼠海马的 HE 染色可知, 相比空白组, 模型组

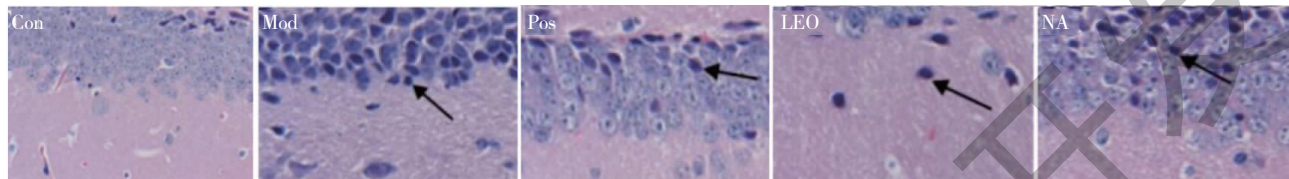


图 13 小鼠海马组织的 HE 染色 (400 ×)

Fig. 13 HE staining of mice hippocampus (400 ×)

注: 黑色箭头表示核固缩。Note: Black arrows indicate nuclear solidification.

3 讨论与结论

本研究通过网络药理学的方法, 挖掘柠檬精油抗焦虑的关键成分、作用靶点及信号通路, 从而探索柠檬精油抗焦虑症的潜在作用机制。通过构建“柠檬精油-活性成分-靶点-通路-焦虑”网络, 识别出柠檬精油抗焦虑的关键成分有 19 个 (如柠檬烯、 α -松油醇、甲基丁香酚、 β -蒎烯、乙酸橙花酯、 β -石竹烯、4-萜品醇等), 关键作用靶点有 18 个 (如 GABRA1、GABRA2、GABRA5、MAO、SLC6A3、SLC6A2、DRD1、GRIA2、IL-6 等), 涉及的主要通路有神经活性配体-受体相互作用、羟色胺能突触、多巴胺能突触、尼古丁成瘾、可卡因成瘾等信号通路。

柠檬精油的挥发性物质以萜类化合物含量较高, 已有研究发现^[14,15] 萜类具有抗焦虑、抑郁以及改善认知障碍的作用。乙酸橙花酯具有抗炎和抗氧化效果, 广泛作用于如神经炎、焦虑症等的治疗^[16]; 通过定量构效关系模型计算对多巴胺受体 D2、血清素转运体和 5-羟色胺受体 1A 的亲合力, 得出乙酸橙花酯可能是有效的抗抑郁药和神经抑制剂^[17]。乙酸橙花酯能调控单胺氧化酶 A, 防止 5-羟色胺在单胺氧化酶 A 作用下生成 5-羟基吲哚乙酸, 使突触间隙的 5-羟色胺浓度减少, 从而起到缓解焦虑的作用^[18]。

DRD1 属于代谢型 G 蛋白偶联受体, 可以通过非受体酪氨酸激酶以 G α q 蛋白依赖抑制 DRD1 的方式减少离子型谷氨酸受体介导的脊髓神经元的激活, 从而缓解慢性疼痛^[19], 也有研究表明可通过电针刺激杏仁基底外侧激活 DRD1 来缓解小鼠焦虑行

小鼠海马区存在大量细胞核固缩, 神经元形态发生改变, 神经元有损伤。而嗅吸 LEO 和 NA 组小鼠的海马中偶见核固缩, 且症状有所缓减。表明 LEO 和 NA 都可以一定程度上保护和修复小鼠海马组织的神经元形态, 对焦虑状态起到一定的改善作用 (见图 13)。

为导致的神经损伤^[20]。由 GRIA2 编码的亚基在神经元中高度表达, 敲除 GRIA2 后, 小鼠在高架迷宫中表现出焦虑感降低^[21]。IL-6 是一种与中枢神经系统神经炎症相关的细胞因子, 在小胶质细胞中激活纹状体脑区可上调包括 IL-6 在内的炎性分子表达, 并且诱导小鼠产生负性情感以及快感缺失^[22]。

分子对接验证了柠檬精油的核心化合物乙酸橙花酯、柠檬烯、 β -蒎烯、4-萜品醇、 α -松油烯与核心靶标 DRD1、GRIA2、IL-6 蛋白之间的相互结合能均低于 5 Kcal/mol, 具有较好的结合活性, 表明柠檬精油具有抗焦虑症的良好分子基础。表明柠檬精油抗焦虑的作用机制是通过多成分、多靶点、多通路的相互调节作用实现的。根据网络预测结果, 在细胞中对柠檬精油进行抗焦虑体外验证。

一旦机体的抗氧化机制遭到破坏, 可产生氧化应激, 导致炎性细胞因子的产生, 促进炎症发生^[23]。DA 能神经元因氧化性损伤会导致焦虑的发生。通过对 DPPH、ABTS 自由基清除检测, 柠檬精油的清除效果优于单体乙酸橙花酯。同时柠檬精油能够降低 LPS 诱导的 HaCaT 细胞内 ROS 水平且呈剂量依赖性, 能有效降低 NO、TNF- α 和 IL-6 炎症因子, 从而缓解氧化应激引起的细胞炎症损伤。柠檬精油也可改善小鼠焦虑时的认知能力, 对组织损伤有所缓减, 并降低血清中相关蛋白含量。

综上所述, 本研究通过网络药理学方法, 筛选出了柠檬精油干预焦虑症的主要化学成分、作用靶点和信号通路, 并通过实验进行验证, 得出柠檬精油中的柠檬烯、乙酸橙花酯等成分通过对 DRD1、GRIA2、

IL6 等靶点调控多条信号通路,降低细胞氧化应激、抑制神经炎症反应,从而干预焦虑症。

研究结果表明柠檬精油成分中化合物的可调控不同靶点,而同一靶点可干预不同的生物学过程及信号通路,体现了柠檬精油多通路、多靶点联合作用的特点。但限于网络药理学方法论的局限性以及中药组分在提取时发生化学反应的复杂性,本研究主要是以生物信息学与生化指标的结果为基础,后续将在此基础进一步完善从基因组或蛋白组学方面进行验证,进而明晰柠檬精油的主要调控靶点与作用机制。

参考文献

- 1 Rehm J,Shield KD. Global burden of disease and the impact of mental and addictive disorders[J]. *Curr Psychiatry Rep*, 2019, 21:10.
- 2 Helen H, Vikram P, Christian K, et al. Time for united action on depression: a lancet-world psychiatric association commission[J]. *The Lancet*, 2022, 399: 957-1022.
- 3 Zhou Q, Yang N, Yang K, et al. Pharmacological treatments for generalised anxiety disorder[J]. *The Lancet*, 2019, 394: 1229.
- 4 Li H, Li Y, Ren G, et al. Research status and prospect of herbal volatile oil in prevention and treatment of emotional diseases[J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2019, 50: 4031-4040.
- 5 Rahman MM, Wills RBH, Bowyer MC, et al. Efficacy of orange essential oil and citral after exposure to UV-C irradiation to inhibit *Penicillium digitatum* in navel oranges[J]. *Horticulturae*, 2020, 6: 102.
- 6 Bavarsad NH, Bagheri S, Kouros-Arabi M, et al. Aromatherapy for the brain: Lavender's healing effect on epilepsy, depression, anxiety, migraine, and Alzheimer's disease: a review article[J]. *Heliyon*, 2023, 9: e18492.
- 7 Özer Z, Teke N, Turan GB, et al. Effectiveness of lemon essential oil in reducing test anxiety in nursing students[J]. *Explore(NY)*, 2022, 18: 526-532.
- 8 Zhang N, Wang ST, Yao L. Inhalation of *Cananga odorata* essential oil relieves anxiety behaviors in autism-like rats via regulation of serotonin and dopamine metabolism[J]. *J Integr Med*, 2023, 21: 205-214.
- 9 Martial C, Poirrier AL, Pottier L, et al. From nose to brain: The effect of lemon inhalation observed by whole brain voxel to voxel functional connectivity[J]. *Cortex*, 2023, 165: 119-128.
- 10 Özer Z, Teke N, Turan GB, et al. Effectiveness of lemon essential oil in reducing test anxiety in nursing students[J]. *Explore(NY)*, 2022, 18: 526-532.
- 11 Xie J, Gao S, Li L, et al. Research progress and application strategy on network pharmacology in Chinese materia medica[J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2019, 50: 2257-2265.
- 12 Ren Y, Deng Y, Ma H, et al. Research progress and challenges of network pharmacology in field of traditional Chinese medicine[J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2020, 51: 4789-4797.
- 13 Mengsa H, Kun X, Pei L, et al. Five Rutaceae family ethanol extracts alleviate H₂O₂ and LPS-induced inflammation via NF- κ B and JAK-STAT3 pathway in HaCaT cells[J]. *Chin J Nat Med*, 2022, 20: 937-947.
- 14 Zhang Y, Long Y, Yu S, et al. Natural volatile oils derived from herbal medicines: a promising therapy way for treating depressive disorder[J]. *Pharmacol Res*, 2021, 164: 105376.
- 15 Wang S, Zhang N, Yao L. Effects of bergamot essential oil on anxiety and cognitive ability in offspring autistic rats[J]. *Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发)*, 2020, 32: 1124-1133.
- 16 Agatonovic-Kustrin S, Kustrin E, Gegechkori V, et al. Anxiolytic terpenoids and aromatherapy for anxiety and depression[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2020, 1260: 283-296.
- 17 Speranta A, Miruna SS, Ana MU, et al. The study of natural compounds as antidepressants by bioinformatics methods[J]. *Biol Life Sci Forum*, 2021, 7: 10-16.
- 18 Jin X, Xu X, Ding QL, et al. To explore the potential molecular mechanism of complex rose-bergamot essential oil on anti-anxiety with facial spots based on network pharmacology[J]. *J Cosmet Dermatol*, 2022, 21: 6363-6376.
- 19 Dai WL, Bao YN, Fan JF, et al. Blockade of spinal dopamine D₁/D₂ receptor suppresses activation of NMDA receptor through G α q and Src kinase to attenuate chronic bone cancer pain[J]. *J Adv Res*, 2021, 28: 139-148.
- 20 Wu MW, Chen YQ, Shen Z, et al. Electroacupuncture alleviates anxiety-like behaviors induced by chronic neuropathic pain via regulating different dopamine receptors of the basolateral amygdala[J]. *Mol Neurobiol*, 2022, 59: 5299-5311.
- 21 Weckmann K, Deery MJ, Howard JA, et al. Ketamine's effects on the glutamatergic and GABAergic systems: a proteomics and metabolomics study in mice[J]. *Mol Neuropsychiatry*, 2019, 5: 42-51.
- 22 Klawonn AM, Fritz M, Castany S, et al. Microglial activation elicits a negative affective state through prostaglandin-mediated modulation of striatal neurons[J]. *Immunity*, 2021, 54: 225-234.
- 23 Latif S, Jahangeer M, Maknoon RD, et al. Dopamine in Parkinson's disease[J]. *Clin Chim Acta*, 2021, 522: 114-126.