

基于生物网络分析研究柑橘属果皮辅助预防2型糖尿病作用

张彦, 闫平, 张华, 张寒, 郑梦迪, 柴希艳

Adjuvant Prevention of Type 2 Diabetes of *Citrus* Peel Based on Bionetwork Analysis

ZHANG Yan, YAN Ping, ZHANG Hua, ZHANG Han, ZHENG Mengdi, and CHAI Xiyan

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023010158>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

基于网络药理学分析咖啡酰奎宁酸类化合物治疗II型糖尿病的作用机制

Mechanism of Caffeoylquinic Acids in the Treatment of Type II Diabetes Based on Network Pharmacology

食品工业科技. 2021, 42(14): 16-24 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021010111>

基于网络药理学探讨桦褐孔菌降血糖功效成分及作用机制

Action Mechanism of *Inonotus obliquus* in the Treatment of Diabetes and the Material Basis of Pharmacodynamics Based on Network Pharmacology

食品工业科技. 2021, 42(22): 18-29 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021040268>

基于网络药理学探讨预知子抗抑郁的作用机制

Mechanism of Anti-depression Mechanism of Akebiae Fructus Based on Network Pharmacology

食品工业科技. 2021, 42(14): 8-15 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020110295>

基于网络药理学与分子对接技术探讨益肝草凉茶解酒保肝的作用机制

Mechanism of Relieving Alcohol and Protecting Liver of Yigancao Herbal Tea Based on Network Pharmacology and Molecular Docking Technology

食品工业科技. 2021, 42(8): 8-18 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020070092>

基于网络药理学分析金钗石斛治疗神经系统疾病的药效物质基础及作用机制

Analysis of the Pharmacodynamic Material Basis and Mechanism of Dendrobium Nobile in the Treatment of Nervous System Diseases Using Integrative Network Pharmacology

食品工业科技. 2021, 42(13): 1-10 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020110140>

咖啡酰奎宁酸类化合物抑菌活性的网络药理学研究

Network Pharmacology Study on the Antibacterial Activity of Caffeoylquinic Acids

食品工业科技. 2021, 42(13): 11-20 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021030017>



关注微信公众号，获得更多资讯信息

张彦, 闫平, 张华, 等. 基于生物网络分析研究柑橘属果皮辅助预防 2 型糖尿病作用 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(5): 319–330. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023010158

ZHANG Yan, YAN Ping, ZHANG Hua, et al. Adjuvant Prevention of Type 2 Diabetes of *Citrus* Peel Based on Bionetwork Analysis[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(5): 319–330. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023010158

· 营养与保健 ·

基于生物网络分析研究柑橘属果皮辅助预防 2 型糖尿病作用

张彦¹, 闫平^{1,*}, 张华¹, 张寒¹, 郑梦迪¹, 柴希艳²

(1. 西安医学院, 陕西西安 710021;

2. 西安雨润百德健康管理有限公司, 陕西西安 710065)

摘要: 目的: 初步阐明柑橘属植物果皮辅助预防 2 型糖尿病的主成分与机制。方法: 体外测定柑橘属植物果皮对 α -糖苷酶的抑制活性, 后通过网络药理学预测其可能的活性成分及其可能的作用机制, 再用分子对接验证。结果: 13 批柑橘属植物果皮均对 α -糖苷酶有一定的抑制作用, 且在线性范围内呈现量效关系。网络药理学和分子对接技术预测, 得到活性成分柚皮素、桔皮素、月桂酸可能通过氧化应激等途径来抑制高血糖, 与炎症中的 PI3K-Akt、Ras、HIF-1 信号通路有关, 和血管相关的 VEGF 信号通路等有关。桔皮素为主成分。结论: 柑橘属植物果皮对 α -糖苷酶有抑制作用, 可能对 2 型糖尿病有一定的辅助预防的作用。

关键词: 柑橘属果皮, 酶抑制, 网络药理学, 降糖作用

中图分类号: TS202.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2024)05-0319-12

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023010158



本文网刊:

Adjuvant Prevention of Type 2 Diabetes of *Citrus* Peel Based on Bionetwork Analysis

ZHANG Yan¹, YAN Ping^{1,*}, ZHANG Hua¹, ZHANG Han¹, ZHENG Mengdi¹, CHAI Xiyang²

(1. Xi'an Medical University, Xi'an 710021, China;

2. Xi'an Yurun Baide Health Management Co., Ltd., Xi'an 710065, China)

Abstract: Objective: To elucidate the main components and mechanism of adjuvant prevention of type 2 diabetes of *Citrus* peel. Methods: The inhibitory activity of *Citrus* peel of α -glycosidase was determined *in vitro*. It were used to predict the material basis and potential mechanism of *Citrus* peel in the treatment of type 2 diabetes by network pharmacology, and verified the results by molecular docking. Results: The α -glucosidase was inhibited by 13 kinds of *Citrus* peel and showed a dose-effect relationship in the linear range. It was predicted that the active ingredients naringin, tangeretin and lauric acid might inhibit hyperglycemia through oxidative stress by network pharmacology and molecular docking. *Citrus* peel treatment of type II diabetes was related to PI3K-Akt, Ras, HIF-1 signaling pathway in inflammation and vascular related VEGF signaling pathway. Tangeretin was the main component. Conclusion: *Citrus* peel had an inhibitory effect on α -glycosidase, which might play a role in the prevention of type 2 diabetes.

Key words: *Citrus* peel; enzyme inhibition; network pharmacology; hypoglycemic effect

芸香科植物橘(*Citrus reticulata* Blanco)及其栽培变种的成熟果皮为陈皮^[1], 最常见的变种为广陈皮

即茶枝柑(*Citrus reticulata* 'Chachi')^[2-3]。酸橙(*Citrus reticulata* Blanco)及其栽培变种的未成熟果实为

收稿日期: 2023-02-09

基金项目: 陕西省自然科学基金研究项目(2021JQ-782); 西安市科技局农业技术研发项目(21NYYF062); 西安医学院青年科研基金(2021QN23); 西安医学院科研能力提升计划项目(2022NLTS082); 西安医学院教育教学改革研究项目(2022JQ-29)。

作者简介: 张彦(1979-), 女, 硕士, 副教授, 研究方向: 药食同源中药药效物质基础与作用机制, E-mail: 110493988@qq.com。

* 通信作者: 闫平(1982-), 女, 硕士, 讲师, 研究方向: 药食同源中药药效物质基础与作用机制, E-mail: 46145132@qq.com。

枳壳^[2-3]。以上品种与甜橙(*Citrus sinensis* Osbeck)的幼果为枳实^[2-3]。近年来出现橘、橙、柑的园艺栽培变种及杂交种^[2-3],例如沃柑、砂糖橘等,其外果皮被广大消费者自行使用,用以理气健脾,燥湿化痰^[1-3],其活性成分中黄酮类、柠檬苦素类和挥发油类与代谢性疾病治疗密切相关^[4-8]。有学者通过体内外实验证实橘皮有降糖的作用^[9-10]。

糖尿病(diabetes mellitus, DM)为常见慢性病。我国是世界上糖尿病患者率上升最快的国家,约有1.1亿患者^[11],其中2型糖尿病(T2DM)占90%以上。目前治疗T2DM除注射胰岛素外,可口服降糖药包括双胍类、 α -糖苷酶抑制剂等^[12],而以上降糖药物存在不良反应,故寻找高效、低毒性的纯天然降糖活性物质来辅助降糖是重要的研究方向。抑制 α -葡萄糖苷酶可影响人体对碳水化合物的消化吸收,从而抑制血糖升高^[4],故评价体外对 α -葡萄糖苷酶抑制作用可快捷方便筛选降糖活性物质。

生物网络分析采用网络药理学,利用计算机技术和大数据从系统层次和生物网络的角度,对“成分-靶点-疾病”进行多层次交互,解析植物提取物中多成分之间的关联规律,阐释其药效物质基础及机制^[13-14]。再用分子对接模拟成分和作用靶点间相互作用、结合模式和亲和力^[15-16]。生物网络分析已广泛应用于活性成分发现与评价领域,但尚未见该方法对柑橘属植物果皮降糖作用的研究。

本研究先用体外 α -葡萄糖苷酶抑制作用评价13批柑橘属植物果皮的降糖效果,然后用生物网络分析中常用的网络药理学与分子对接技术预测其可能辅助预防T2DM的成分与作用机制,以期阐明常见的芸香科柑橘属植物果皮可否作为保健品新资源应用于2型糖尿病的预防中。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

酵母源 α -葡萄糖苷酶(26 U/mg) 上海源叶生物科技有限公司;PNPG(P-Nitrophenyl-d-D-glucopyranoside, 4-硝基苯- α -D-吡喃葡萄糖苷) 上海麦克林科技有限公司;阿卡波糖(BR, 纯度 $\geq 95\%$) 都莱生物技术有限公司;无水乙醇(AR, 纯度 $\geq 99.7\%$)

天津市欧博凯化工有限公司;Na₂CO₃ 分析纯,天津大茂化学试剂厂;纯净水 实验室自制;柑橘属植物果皮样品 自制,详见表1,晒干的样品均为室温16~22℃通风自然干燥。

Readman1900/1900plus 型光吸收型全波长酶标仪 上海闪谱生物科技有限公司;KQ5200E 型超声清洗器 昆山市超声仪器有限公司;N-1300D 型旋转蒸发仪、CCA-1112A 型冷却水循环装置、NVP-1000 型隔膜真空泵 东京理化器械株式会社;SQP 型电子分析天平 赛多利斯科学仪器(北京)有限公司;电热恒温水浴锅 北京市永光明医疗仪器厂。

1.2 实验方法

1.2.1 柑橘属植物果皮提取物浸膏的制备及体外 α -葡萄糖苷酶抑制活性测定 13批柑橘属植物果皮50℃干燥60min后粉碎过24目筛,精密称取样品5.0g置于250mL具塞锥形瓶中,加50mL无水乙醇200Hz超声提取30min,过滤,提取2次,合并滤液,减压浓缩,蒸干得样品提取物浸膏。

方法参考文献[17-18]。分别称取以上各样品60mg浸膏,于5mL容量瓶加PBS溶解并定容,得12mg/mL的样品溶液,稀释得4、6、8、10、12mg/mL的待测样品溶液。精密称取1.8mg(26U/mg) α -葡萄糖苷酶冻干粉于5mL容量瓶用PBS溶解并定容,制得9.36U/mL的 α -葡萄糖苷酶溶液。称取PNPG14.5mg于10mL容量瓶,用PBS溶解并定容,制得4.8mmol/L的PNPG溶液。称取5.2295gNa₂CO₃,于50mL容量瓶溶解并定容即得1.0mol/LNa₂CO₃溶液。称取60mg阿卡波糖,于5mL容量瓶溶解并定容,得12mg/mL的阿卡波糖溶液,稀释为4、6、8、10mg/mL阿卡波糖溶液。

在96孔板中,各试剂加样体积见表2,依次加

表1 样品信息及来源

Table 1 Sample information and source

编号	年份	名称	拉丁文	来源	备注
S1	2017	酸橙皮	<i>Citrus aurantium</i> L.	药材市场	商品名:生枳壳
S2	2020	酸橙皮	<i>Citrus aurantium</i> L.	药材市场	商品名:生枳壳
S3	2020	酸橙皮	<i>Citrus aurantium</i> L.	药材市场	商品名:炒枳壳
S4	2019	柚皮	<i>Citrus maxima</i> (Burm.) Merr.	农贸市场	室温通风自然干燥
S5	2021	柚皮	<i>Citrus maxima</i> (Burm.) Merr.	农贸市场	室温通风自然干燥
S6	2021	甜橙皮	<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck	农贸市场	室温通风自然干燥
S7	2018	皇帝柑皮	<i>Tribute</i> × <i>Citru</i>	农贸市场	室温通风自然干燥
S8	2019	砂糖桔皮	<i>Citrus reticulata</i> cv. <i>Citrus tachibana</i> Blanco	农贸市场	室温通风自然干燥
S9	2021	砂糖桔皮	<i>Citrus reticulata</i> cv. <i>Citrus tachibana</i> Blanco	农贸市场	室温通风自然干燥
S10	2022	砂糖桔皮	<i>Citrus reticulata</i> cv. <i>Citrus tachibana</i> Blanco	农贸市场	室温通风自然干燥
S11	2021	桔皮	<i>Citrus reticulata</i> Blanco	农贸市场	室温通风自然干燥
S12	2020	沃柑皮	<i>Citrus reticulata</i> cv. 'Chachiensis'	农贸市场	室温通风自然干燥
S13	2021	沃柑皮	<i>Citrus reticulata</i> cv. 'Chachiensis'	农贸市场	室温通风自然干燥

入 PBS 缓冲液, α -葡萄糖苷酶溶液和样品溶液, 37 °C 恒温孵育 15 min, 加入 PNPG 溶液, 37 °C 恒温 30 min, 加入 Na_2CO_3 溶液中止反应, 在 405 nm 波长下, 用酶标仪测定不同浓度的样品在反应后吸光度。根据公式(1)计算样品对 α -葡萄糖苷酶的抑制率, 其他按表 2 加入, A_5 组为阳性对照, 用样品溶液同浓度的阿卡波糖代替样品, 平行操作三次。

表 2 α -葡萄糖苷酶抑制实验加样表
Table 2 Addition table for α -glucosidase inhibition test

组别	PBS(μL)	酶(μL)	样品(μL)	PNPG(μL)	Na_2CO_3 (μL)
A1	120	15	15	30	60
A2	135	/	15	30	60
A3	135	15	/	30	60
A4	150	/	/	30	60
A5	120	15	阿卡波糖	30	60

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{(A_3 - A_4) - (A_1 - A_2)}{(A_3 - A_4)} \times 100 \quad \text{式 (1)}$$

式中: A_1 、 A_2 、 A_3 、 A_4 分别为样品组、样品空白组、阴性对照组和空白组阳性的吸光度。

1.2.2 柑橘属植物果皮降糖活性成分的预测 从 TCMSP 数据库和查阅中英文文献(截止 2022 年 4 月)获得柑橘属植物果皮的主成分, 使用 Chem-Draw 绘制 2D 结构, 将获取的成分名称导入 Pubchem 网站 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>), 将 Pubchem 网站显示的 2D 结构和绘制的 2D 结构图进行比对, 确认化合物, 从 Pubchem 下载其 2D Save 文件, 导入到 SwissADME 网站 (<http://www.swissadme.ch/>), 计算化合物的分子特性。根据胃肠道吸收和药物相似性规则的标准筛选标准来选择化合物, 即 GI=high 且 drug-likeness 项下有大于等于两个 yes^[19-20], 将符合要求的活性成分编号列表。

生物活性化合物目标预测: 将以上筛选的化合物导入 Swiss TargetPrediction 网站 (<http://www.swisstargetprediction.ch>) 预测药物作用靶点, 下载靶点信息, 以 probability>0 为标准, 将化合物与靶点信息对应, 整理靶点信息^[21]。

靶点交叉获取共有靶点: MalaCards 数据库 (<https://www.malacards.org/>) 和 GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org/>) 搜索 “diabetes mellitus type 2” 获得两个数据库中关于 T2DM 的相关靶基因的信息。将柑橘属植物果皮活性成分作用靶点与 II 型糖尿病靶点导入 Venny2.1.0 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>) 网站, 得到活性成分与疾病的共同靶标。整理活性成分共同靶点, 使用 Cytoscape 3.9.0 软件 (<http://cytoscape.org/>) 绘制 “橘皮活性成分-靶点-T2DM” 网络图, 使其可视化, 并使用其内置的软件工具 Network Analyzer 计算以及靶点的网络拓扑参数筛选出主要有效成分^[22-23]。

1.2.3 柑橘属植物果皮可能降糖机制的预测 T2DM 靶点的 PPI 网络构建: 将交集靶点上传到 STRING

网站 (<https://stringdb.org>), 限定物种为 “Homo sapiens”, 选择置信度 (medium confidence)>0.4, 隐藏网络中游离的靶点 (hide disconnected nodes in the network), 将结果以 TSV 形式导出, 并使用 Cytoscape 3.9.0 软件将导入的 TSV 文件转成可视化 PPI 网络, 并用小插件 “CentiScape 2.2 Menu”, 选中其中的度值 (Degree), 介度 (Betweenness) 和紧密度 (Closeness) 为指标, 分析其结果得到陈皮干预 T2DM 的核心靶点^[19-20]。

GO 和 KEGG 富集分析: 将核心靶点导入 Metascape (<https://metascape.org/>) 网站进行 GO 分析和 KEGG 通路分析, 以 $P<0.05$ 条件进行筛选, 将 GO 富集图和 KEGG 富集图通过微生信 (www.bioinformatics.com.cn) 可视化^[19-20]。

1.2.4 分子对接验证 将 1.2.3 项下预测的关键靶点在 PDB 数据库找到相应的蛋白, 保存为 PDB 格式。在 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 寻找 Degree 值前四的活性成分即 1.2.2 项下预测到的活性成分 2D 结构, 并以 mol2 格式保存, 用 PyMOL 软件转化为 PDB 格式。利用 MOE 软件对蛋白进行去水、加氢、计算电荷、能量最小化等优化, 后与活性小分子成分的 PDB 格式进行对接, 结合能 <-5.0 kJ/mol 结合力良好, 数值越小结合能力越强^[19-20]。

1.3 数据处理

体外酶活性测定数据用 $\bar{X} \pm S$ 表示, 用 OriginPro 2021 处理。网络药理学及分子对接部分运用 TCMSP 数据库 (<http://tcmspw.com/tcmsp.php>)、Metascape (<https://metascape.org/>)、SwissADME 数据库 (<http://www.swissadme.ch/>)、SwissTargetPrediction 网站 (<http://www.swisstargetprediction.ch/>)、Pubchem 网站 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)、MalaCards (<https://www.malacards.org/>)、MOE 软件、GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org/>)、STRING 网站 (<https://stringdb.org>)、Venny 2.1.0 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>)、ChemDraw (19.0 版本)、PDB 数据库、微生信 (www.bioinformatics.com.cn)、CentiScape 2.2 Menu、PyMOL 软件 (2.3.5 版本)、Cytoscape 3.9.0 软件 (<http://cytoscape.org/>)、Network Analyzer 软件处理^[19-20]。

2 结果与分析

2.1 柑橘属植物果皮体外 α -葡萄糖苷酶抑制活性测定

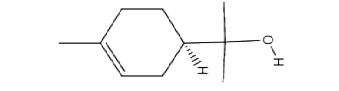
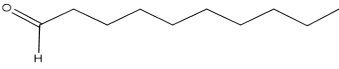
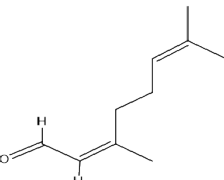
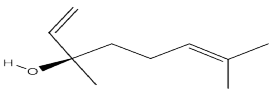
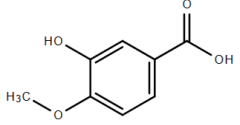
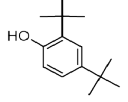
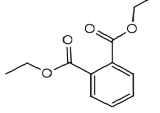
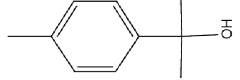
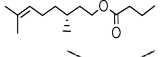
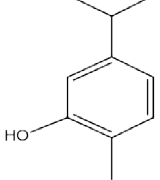
由表 3 可知 13 批柑橘属植物包括杂交种的果皮体外对 α -葡萄糖苷酶均有抑制作用。S1~S13 的半数抑制浓度 IC_{50} 值分别为 8.4、9.1、8.3、15.6、7.8、8.7、9.0、2.6、2.7、3.0、10.0、7.4、5.5 mg/mL, IC_{50} 值越小说明抑制活性越好, 其中 S8、S9、S10 即园艺栽培品种砂糖橘果皮各浓度抑制 α -葡萄糖苷酶活性最好。故砂糖橘、沃柑、皇帝柑等常见的园艺栽培种、杂交种与该属药用品种陈皮、枳实、枳壳等同

表 3 不同浓度样品对 α -葡萄糖苷酶抑制率(%)
Table 3 Inhibition rate of α -glucosidase by samples with different concentrations (%)

组别	浓度				
	4.0 mg/mL	6.0 mg/mL	8.0 mg/mL	10.0 mg/mL	12.0 mg/mL
S1	26.71±1.31	38.74±0.98	47.07±0.41	58.90±1.55	67.68±1.24
S2	28.54±1.27	38.07±1.12	46.24±0.73	54.74±1.73	60.50±1.36
S3	29.36±0.65	40.93±1.67	49.13±0.68	58.04±0.95	64.86±1.61
S4	5.37±0.33	13.45±0.26	20.92±0.15	28.60±0.72	36.24±0.85
S5	27.04±0.79	39.43±0.31	52.05±0.89	63.56±1.68	74.80±1.33
S6	26.74±0.53	33.02±0.46	45.45±0.05	57.29±1.23	69.20±1.29
S7	27.62±0.27	35.03±0.77	43.66±0.66	54.27±1.31	65.46±1.39
S8	54.73±1.16	62.36±1.41	69.14±1.48	76.79±1.26	83.06±1.09
S9	55.13±1.54	61.68±1.28	69.91±1.59	77.16±1.84	84.74±1.33
S10	52.92±1.27	60.49±1.33	67.97±1.27	74.98±1.91	81.19±0.31
S11	23.82±0.28	33.51±0.58	42.45±0.97	50.32±1.93	57.33±0.09
S12	32.23±0.37	43.40±0.76	54.81±1.11	63.91±0.81	71.29±0.06
S13	43.20±0.84	52.62±0.94	60.82±1.37	67.60±0.69	74.11±0.31

表 4 柑橘属植物果皮活性化合物信息

Table 4 Information on active compounds of *Citrus* peel

序号	MOL编号	名称	结构式	分子式
1	000118	(L)- α -松油醇		C ₁₀ H ₁₈ O
2	000121	癸醛		C ₁₀ H ₂₀ O
3	000127	柠檬醛 (3,7-二甲基-2,6-辛二烯醛)		C ₁₀ H ₁₆ O
4	000198	芳樟醇 (沉香醇; 里那醇; 3,7-二甲基-1,6-辛二烯-3-醇)		C ₁₀ H ₁₈ O
5	002050	异兰香酸(3-羟基-4-甲氧基苯甲酸)		C ₈ H ₈ O ₄
6	002092	Antioxidant No.33		C ₁₄ H ₂₂ O
7	002095	邻苯二甲酸二乙酯		C ₁₂ H ₁₄ O ₄
8	002138	2-(4-甲基苯基)丙-2-醇 (对甲基苯异丙醇)		C ₁₀ H ₁₄ O
9	002456	[(3R)-3,7-Dimethyloct-6-enyl] butanoate		C ₁₄ H ₂₆ O ₂
10	000259	香芹酚 (5-异丙基-2-甲基苯酚)		C ₁₀ H ₁₄ O

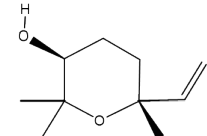
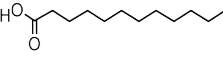
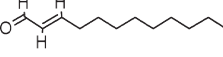
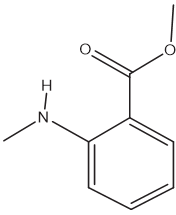
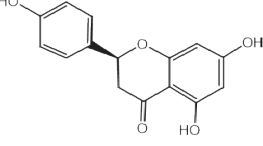
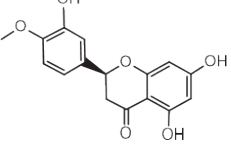
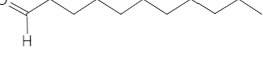
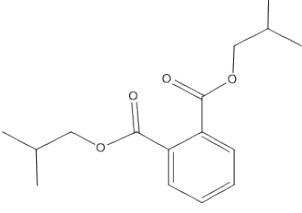
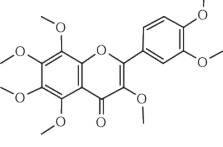
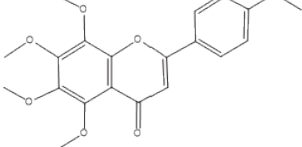
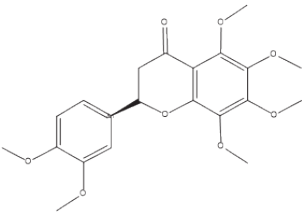
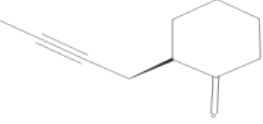
样有抑制 α -葡萄糖苷酶的作用, 并呈浓度依赖关系, 其中沙糖桔皮、沃柑等近年来涌现的园艺栽培品种果皮对酶抑制效果较好。

2.2 柑橘属植物果皮降糖活性成分的预测

2.2.1 活性成分 从 TCMSP 数据库和查阅文献共获得柑橘属植物果皮中黄酮类、萜类、柠檬苦素类、挥发油类和生物碱类等 65 种主要化合物成分, 经 SwissADME 网站筛选出 40 种生物活性化合物。均符合药物相似性和口服胃肠道吸收^[21], 结果见表 4。

2.2.2 柑橘属植物果皮干预 T2DM 重要的目标化合物预测 从 Swiss Target Prediction 网站中获得柑橘属植物果皮生物活性化合物的潜在目标。删除重复后确定了 480 个橘皮活性成分靶点。从 MalaCards 数据库和 GeneCards 数据库通过搜索术语“diabetes mellitus type 2”共获得 577 个关于 T2DM 的相关靶基因的信息。分别将收集的 480 个活性成

续表 4

序号	MOL编号	名称	结构式	分子式
11	002944	(E)-Linalolpyranoxide		C ₁₀ H ₁₈ O ₂
12	000305	月桂酸 (十二酸; 正十二酸; 十二烷酸)		C ₁₂ H ₂₄ O ₂
13	003450	2-十二烯醛醇		C ₁₂ H ₂₂ O
14	003508	1-癸醇 (癸烷-1-醇; 正癸醇; 癸醇; 壬基甲醇)		C ₁₀ H ₂₂ O
15	003949	2-(甲氨基)苯甲酸甲酯 (N-甲基邻氨基苯甲酸甲酯; 邻甲氨基苯甲酸甲酯)		C ₉ H ₁₁ NO ₂
16	004328	柚皮素 (4',5,7-三羟基黄酮)		C ₁₅ H ₁₂ O ₅
17	005100	橙皮苷		C ₁₆ H ₁₄ O ₆
18	005577	十一醛		C ₁₁ H ₂₂ O
19	000057	邻苯二甲酸二异丁酯		C ₁₆ H ₂₂ O ₄
20	005811	Hepta-3		C ₂₂ H ₂₄ O ₉
21	005814	桔皮素 (5,6,7,8,4'-五甲氧基黄酮)		C ₂₀ H ₂₀ O ₇
22	005815	柠檬酸		C ₂₁ H ₂₄ O ₈
23	005817	2-(2-丁炔基)-环己酮		C ₁₀ H ₁₄ O

续表 4

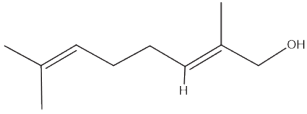
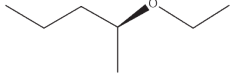
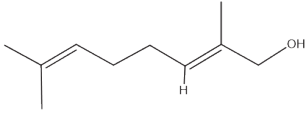
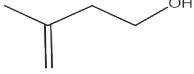
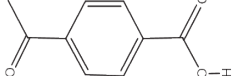
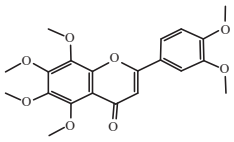
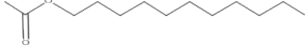
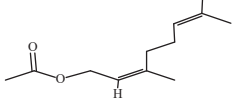
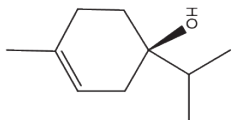
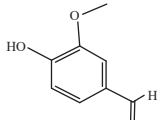
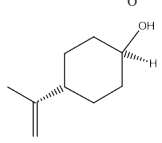
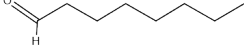
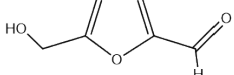
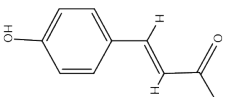
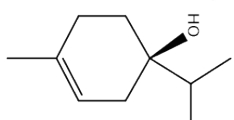
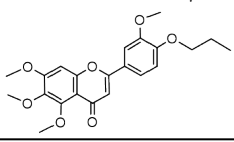
序号	MOL编号	名称	结构式	分子式
24	005820	22410-74-8		$C_{10}H_{18}O$
25	005821	(2S)-2-Ethoxypentane		$C_7H_{16}O$
26	005822	香叶醇((E)-3,7-二甲基-2,6-辛二烯-1-醇)		$C_{10}H_{18}O$
27	005823	3-甲基-3-丁烯-1-醇		$C_5H_{10}O$
28	005824	4-乙酰基苯甲酸(对乙酰基苯甲酸)		$C_9H_8O_3$
29	005825	6-庚烯-1-醇		$C_7H_{14}O$
30	005828	川陈皮素		$C_{21}H_{22}O_8$
31	005829	醋酸十一酯(乙酸十一酯)		$C_{13}H_{26}O_2$
32	000597	乙酸橙花酯(橙花乙酸酯; (Z)-3,7-二甲基-2,6-辛二烯-1-醇乙酸酯)		$C_{12}H_{20}O_2$
33	000608	(s)-Terpinen-4-ol		$C_{10}H_{18}O$
34	000635	香兰素 (香草醛; 3-甲氧基-4-羟基苯甲醛)		$C_8H_8O_3$
35	000696	β -松油醇		$C_9H_{16}O$
36	000710	正辛醛(辛醛; 羊脂醛)		$C_8H_{16}O$
37	000748	5-羟甲基糠醛		$C_6H_6O_3$
38	000771	4-羟基肉桂酸 (对羟基肉桂酸; 对羟基苯基丙烯酸; 对香豆酸)		$C_9H_8O_3$
39	000922	(R)-p-Menth-1-en-4-ol		$C_{10}H_{18}O$
40	001803	Sinensetin		$C_{22}H_{24}O_7$

表 5 柑橘属植物果皮活性成分和 T2DM 的共同靶点
Table 5 Common targets of *Citrus* peel active components and T2DM

编号	靶点	编号	靶点	编号	靶点
1	AR	34	CXCL8	67	IGF1R
2	AKR1B1	35	RBP4	68	FABP2
3	TLR4	36	ALB	69	NOS3
4	EP300	37	SMARCA4	70	KDR
5	ALDH2	38	HMGR	71	TTR
6	FASN	39	ADRA2A	72	PTGS2
7	HNFA4	40	SERPINE1	73	PARP1
8	CDK4	41	GSR	74	SHBG
9	BCL2	42	F2	75	MMP2
10	MMP3	43	SCN9A	76	MMP9
11	VEGFA	44	OPRM1	77	HMOX1
12	MMP8	45	MPO	78	SIRT2
13	ALOX5	46	NR3C1	79	SCD
14	MTNR1B	47	FABP1	80	HSD11B1
15	MMP1	48	PPARG	81	FABP5
16	FABP3	49	NPC1L1	82	BCHE
17	FABP4	50	SREBF2	83	PTPN1
18	ACP1	51	CYP19A1	84	AKT1
19	PTPN2	52	NR1H3	85	PDE5A
20	ACHE	53	SLC5A2	86	MAPK10
21	CYP1A2	54	CYP1A1	87	GCGR
22	GPBAR1	55	IKBKB	88	CNR1
23	NR1H4	56	PIK3R1	89	MIF
24	VDR	57	PRKAB1	90	ARG1
25	AOC3	58	LIPE	91	PRKCD
26	NOS1	59	MC4R	92	ELANE
27	RET	60	PLA2G2A	93	F3
28	MEN1	61	INSR	94	GSK3B
29	ERBB2	62	IGFBP3	95	TERT
30	FGFR1	63	CYP2C9	96	NOS2
31	PPARA	64	CYP3A4	97	AVPR2
32	PPARG	65	DRD2	98	CYP2C19
33	ESR1	66	CYP17A1		

分靶点和收集的 577 个 T2DM 疾病靶点上传到 Venny 2.1^[19-22], 获取交集靶点共 98 个见表 5, 可视化结果见图 1。将活性成分与交集靶蛋白导入到 Cytoscape 3.9.0 软件构建“柑橘属植物果皮成分-靶点-T2DM 网络图”, 见图 2。拓扑参数由高到低分别为 α -松油醇、柚皮素、桔皮素、月桂酸, 以上可能是橘皮辅助干预 T2DM 重要的核心成分^[19-22]。

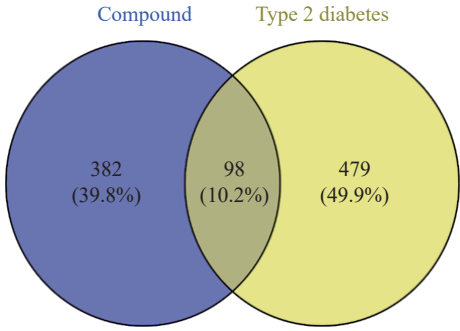


图 1 柑橘属植物果皮活性成分和 T2DM 的共同靶点韦恩图
Fig.1 Venn diagram of the common target of *Citrus* peel active components and T2DM

2.2.3 柑橘属植物果皮降糖作用靶点的预测 柑橘属植物果皮与 T2DM 共有靶点的 PPI 网络, 见图 3。将 TSV 格式导出结果可视化, 见图 4。以度值 (Degree unDir) 介度 (Betweenness unDir) 和精密度 (Closeness unDir) 这三个标准^[19-22]来筛选橘皮干预 T2DM 的核心靶点, 筛选出 17 个核心靶点, 见表 6。其中 AKT1、ALB、PPARG、VEGFA 靠前。

GO 和 KEGG 富集分析: 将以上筛选出来的核心靶点导入 metascape 网站进行 GO 分析, 包括三部分: 生物过程 (Biological process, BP)、细胞组分 (Cellular components, CC) 和分子功能 (Molecular function, MF)^[19-20]。以 P Value Cutoff<0.05 筛选^[20-22],

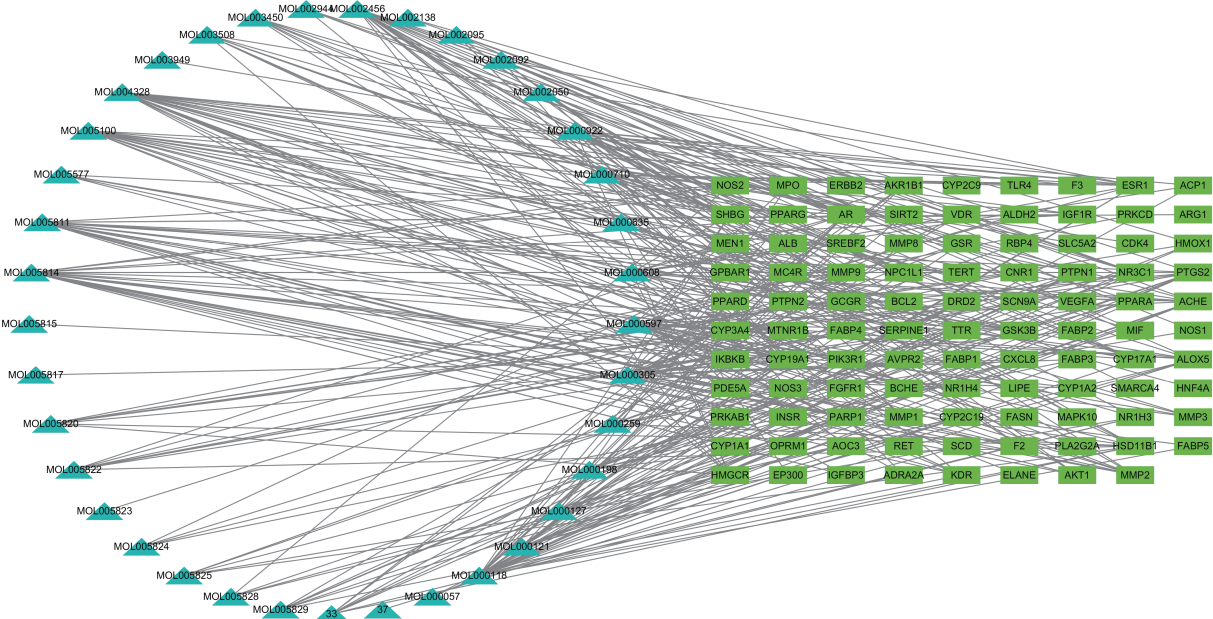


图 2 柑橘属植物果皮活性成分-靶点-T2DM 网络图
Fig.2 Network diagram *Citrus* peel active components-target-T2DM
注: 绿色为橘皮活性成分, 蓝色为靶点。

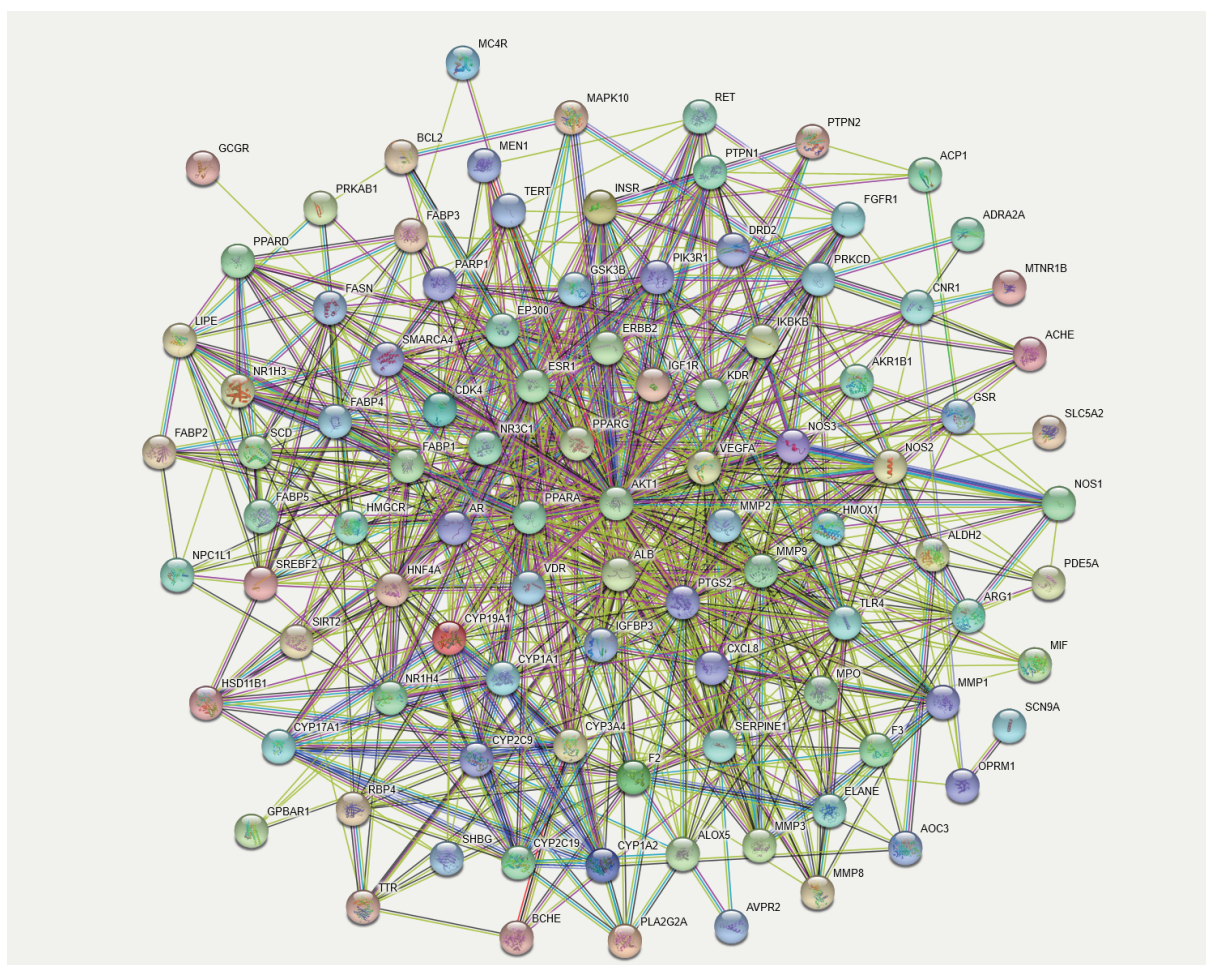


图3 柑橘属植物果皮治疗 T2DM 共有靶点的 PPI 网络

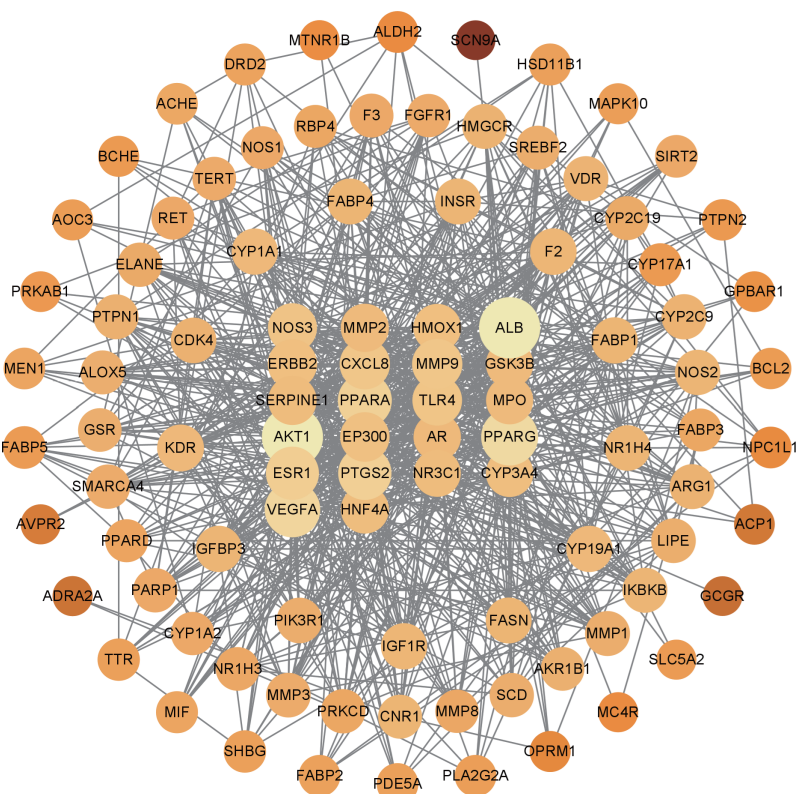
Fig.3 PPI network of common targets of *Citrus* peel in the treatment of T2DM

图4 柑橘属植物果皮治疗 T2DM 共有靶点的 PPI 网络可视化

Fig.4 PPI network visualization of common targets of *Citrus* peel in the treatment of T2DM

表 6 T2DM 的 PPI 网络核心靶点拓扑学分析结果

Table 6 Topological analysis results of PPI network core targets of T2DM

编号	靶点	度值	介度	精密度	编号	靶点	度值	介度	精密度
1	ALB	67	1335.1156	0.0078125	10	CXCL8	34	199.1637067	0.006134969
2	AKT1	67	1262.660625	0.0078125	11	F2	22	127.6764313	0.005586592
3	PTGS2	43	296.8887643	0.006578947	12	HNF4A	27	128.4767872	0.005813953
4	INSR	20	117.5407933	0.005555556	13	NOS2	18	127.9912985	0.005555556
5	PPARG	54	939.0000537	0.007092199	14	CYP3A4	25	291.3906018	0.005847953
6	VEGFA	50	372.4423703	0.006896552	15	TLR4	32	177.3151086	0.006097561
7	PPARA	45	566.219661	0.006622517	16	ESR1	42	357.6428551	0.006451613
8	NR3C1	24	292.4289529	0.005780347	17	CYP1A1	21	117.8376291	0.005649718
9	EP300	31	152.7547866	0.00591716					

共富集到 284 个 BP, 6 个 CC, 38 个 MF。根据 P 值筛选出来的前 10 条 BP、6 条 CC 和前 10 条 MF, 用微生信进行可视化处理, 结果见图 5。

由图 5 可知, 柑橘属植物果皮辅助参与预防 T2DM 靶点的生物过程可能与氧化应激(response to decreased oxygen levels)、脂质代谢调控 (positive

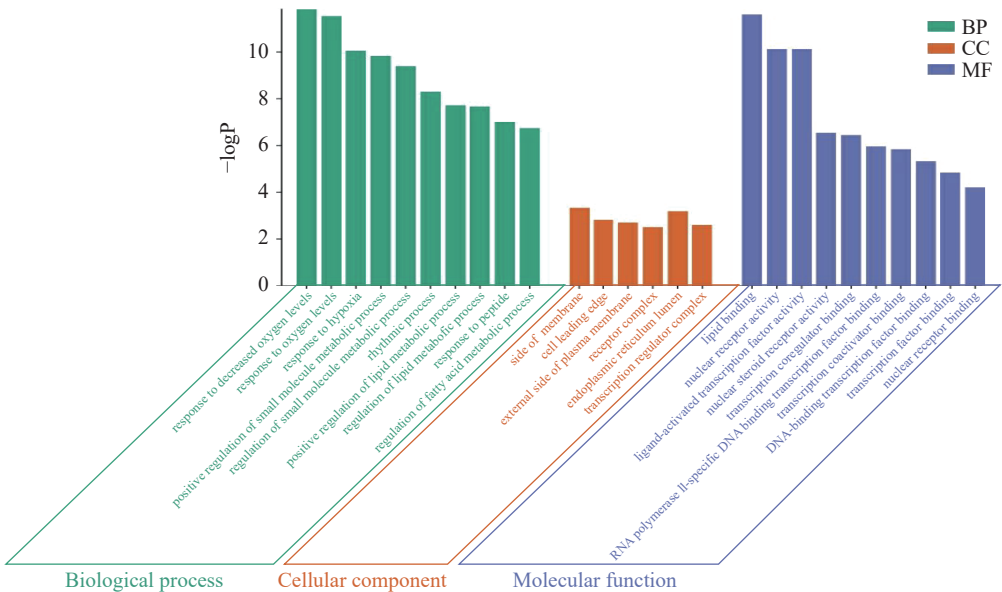


图 5 GO 功能富集分析组图

Fig.5 Go functional enrichment analysis group diagram

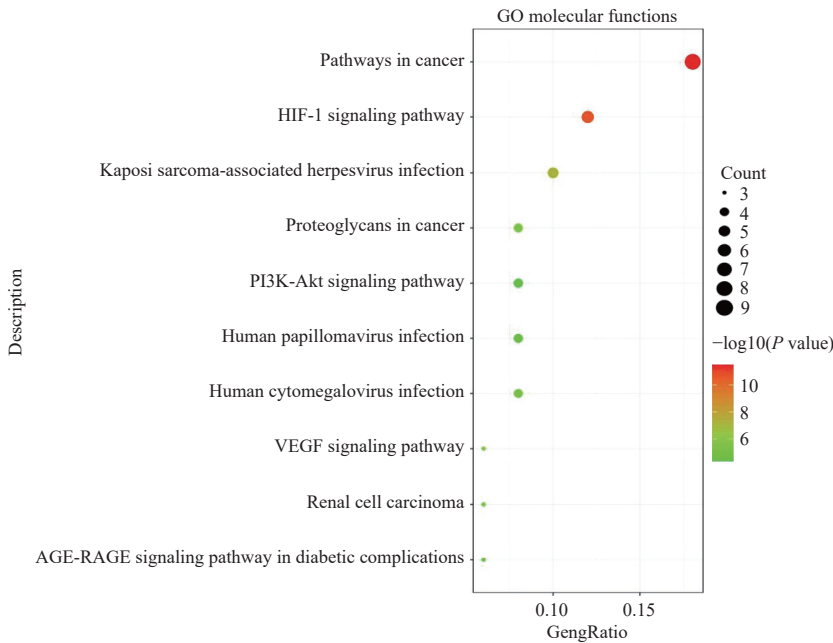


图 6 KEGG 通路富集分析

Fig.6 KEGG path analysis

表 7 有效成分与 T2DM 靶点对接打分

Table 7 Docking score of active ingredient and T2DM target

靶点	PDB ID	α -松油醇	柚皮素	桔皮素	月桂酸
AKT1	2UZS	-4.1511	-5.3559	-5.4150	-5.1724
ALB	6RQ7	/	-5.8827	-7.5564	-5.0959
PPARG	2VST	/	-5.9649	-6.4267	-6.1526
VEGFA	1CZ8	/	-4.4706	-6.6152	-6.1376

regulation of lipid metabolic process) 有关。可能与细胞膜(side of membrane)与内质网(endoplasmic reticulum lumen)功能有关。可能与脂质结合受体(lipid binding)、转录因子(transcription factor binding)、类固醇受体(nuclear steroid receptor activity)、RNA、DNA、结合转录辅酶(ligand-activated transcription factor activity)等分子功能有关^[19-22]。

KEGG 通路富集分析经过 $P < 0.05$ 的筛选结果显示,柑橘属植物果皮辅助参与 T2DM 过程共有 51 条通路, P 值筛选出靠前 10 条通路,见图 6。

图 6 可知,柑橘属植物果皮辅助参与预防 T2DM 的通路分别为癌症中的通路(pathways in cancer)、HIF-1 信号通路(HIF-1 signaling pathways)、

卡波西肉瘤相关疱疹病毒感染(Kaposi sarcoma-associated herpesvirus infection)、癌症中的蛋白聚糖(proteoglycans in cancer)、PI3K-Akt 信号通路(PI3K-Akt signaling pathways)、人乳头瘤病毒感染(human papillomavirus infection)、人巨细胞病毒感染(human cytomegalovirus infection)、VEGF 信号通路(VEGF signaling pathways)、肾细胞癌(renal cell carcinoma)、AGE-RAGE 信号通路(AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications)在糖尿病并发症中的作用^[19-22]。

2.3 分子对接验证

将 2.2.2 项下根据 Degree 值分别筛选出来主要活性成分 α -松油醇、柚皮素、桔皮素、月桂酸与 2.2.3 项下得到的 T2DM 相关核心靶蛋白 AKT、VEGFA、PPARG 和 ALB 做分子对接,打分结果见表 7。结合能 < -5.0 kJ/mol 可认为结合能力良好,数值越小结合能力他越强。以此为筛选依据^[19-22],桔皮素与关键靶点生物亲和力最强,活性最好。桔皮素与关键蛋白对接 2D 与 3D 模型,见图 7~图 8。

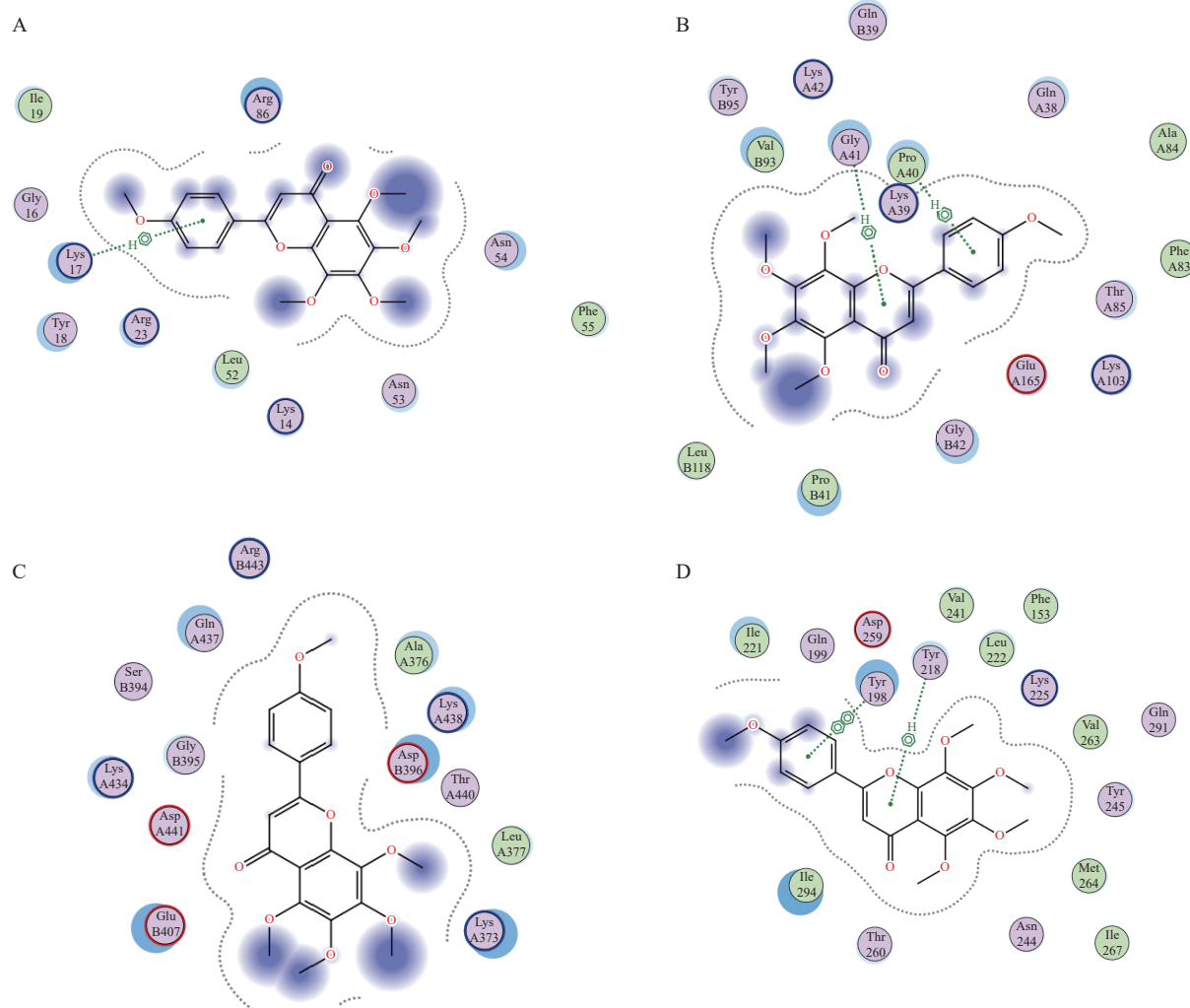


图 7 桔皮素与 T2DM 分子对接 2D 模型

Fig.7 2D model of tangeretin-T2DM molecular docking

注: A-AKT; B-VEGFA; C-PPARG; D-ALB; 图 8 同。

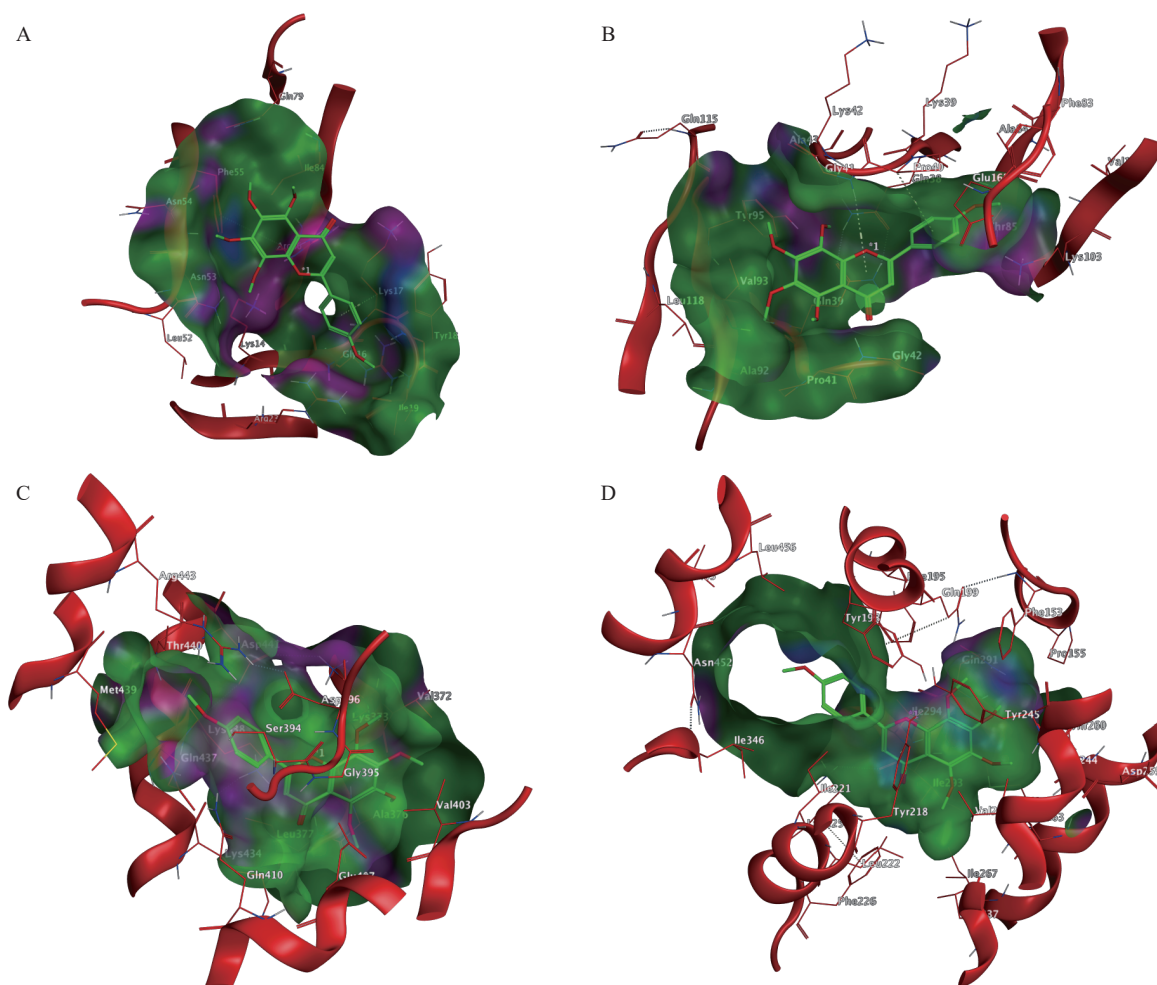


图 8 桔皮素-T2DM 分子对接 3D 模型

Fig.8 3D model of tangeretin-T2DM molecular docking

3 讨论与结论

本研究发现芸香科柑橘属其果皮均可作为食品添加剂应用于糖尿病的辅助预防中,在保健领域有一定的研究价值,有较强的应用前景。如果将芸香科柑橘属植物及砂糖橘、沃柑等园艺栽培种和杂交种的果皮利用起来,可“变废为宝”,实现副产品的综合利用与开发。通过生物网络分析,本研究初步揭示柚皮素、桔皮素、月桂酸可能为柑橘属植物果皮中辅助预防 2 型糖尿病的活性成分。再结合分子对接初步揭示柑橘属植物果皮对 2 型糖尿病辅助预防的可能作用靶点,有一定的创新性。

生物网络分析初步预测柑橘属植物果皮预防 2 型糖尿病的机制可能通过氧化应激等途径,与炎症中的 PI3K-Akt、Ras、HIF-1 信号通路及血管相关的 VEGF 信号通路等有关^[24]。具体作用如下:第一,调控 PI3K-Akt 信号通路,与胰岛素调节有关^[24-25]。胰岛素受体底物磷酸化,激活 PI3K,刺激磷脂酰肌醇,再进一步激活调节葡萄糖转化和糖原合成的作用的 AKT^[24-25]。第二,调控 RAS/MAPK 信号通路,参与细胞增殖、分化、凋亡、免疫应答,与炎症及血管新生的关系密切。第三,调控糖尿病视网膜病变相关的血管内皮生长因子 VEGF 信号通路。桔皮素与以上

通路中蛋白激酶 B-1(AKT1)、白蛋白(ALB)、过氧化物酶体增殖物激活受体(PPARG)、血管内皮生长因子 A(VEGFA)结合作用良好,以上蛋白可能为柑橘属果皮降糖机制的主要作用靶点^[26]。桔皮素可进入该活性蛋白中心,与蛋白受体形成氢键。分子对接可视化图可以看出其形成氢键的个数较多且作用力较强。但因时间有限以上猜想尚未通过体内及细胞水平的验证,后续将进一步完善。

综上所述,芸香科柑橘属植物果皮在预防 2 型糖尿病方面有应用前景,可进一步深入研究。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2020: 199-200. [National Pharmacopoeia Committee. Pharmacopoeia of the People's Republic of China; A [M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2020: 199-200.]
- [2] 刘雪峰, 杨梅, 向莘苇, 等. 柑橘果皮重要成分及其应用研究进展[J/OL]. 食品与发酵工业; 1-10 [2023-12-15]. <https://doi.org/10.13995/j.cnki.11-1802/ts.033939>. [LIU X F, YANG M, XIANG P W, et al. Research progress on important components of citrus peel and their application[J/OL]. Food and Fermentation Industries; 1-10 [2023-07-12]. <https://doi.org/10.13995/j.cnki.11-1802/ts.033939>.]
- [3] 王艺涵, 赵佳琛, 金艳, 等. 经典名方中柑橘属果皮用药材的本草考证[J]. 中国现代中药, 2020, 22(8): 1185-1200. [WANG Y

- H, ZHAO J S, JIN Y, et al. Herbal textual research on classical prescription of medicinal material pericarps of *Cirtus* spp.[J]. Modern Chinese Medicine, 2020, 22(8): 1185–1200.]
- [4] MUHAMMAD T, MUHAMMAD H, ABDUL R, et al. UH-PLC, ATR-FTIR profiling and determination of 15 LOX, α -glucosidase, ages inhibition and antibacterial properties of *Citrus* peel extracts[J]. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 2021, 55(2): 176–186.
- [5] SHITAL Y, CHANDRA S. S. Novel and green processes for citrus peel extract: A natural solvent to source of carbon[J]. *Polymer Bulletin*, 2018(75): 5133–5142.
- [6] 吴梦玫, 马舒婷, 钟楚楚, 等. 5种柑橘属药材中黄酮差异比较[J]. 中成药, 2022, 44(10): 3225–3228. [WU M M, MA S T, ZHONG C C, et al. Flavonoids variations in five medicinal materials of genus *Citrus*[J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2022, 44(10): 3225–3228.]
- [7] 姚旭, 郇萍, 顾青. 4种甜橙皮黄酮类化合物体外抗氧化活性及降糖降脂功能研究[J]. 中国食品学报, 2022, 22(1): 49–57. [YAO X, LI P, GU Q. Studies on antioxidant activity, hypoglycemic and lipid-lowering capacity of flavonoids in sweet orange peels *in vitro*[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2022, 22(1): 49–57.]
- [8] AYOKUNLE O A, GANIYU O, TOSIN A O, et al. From folk medicine to functional food: A review on the bioactive components and pharmacological properties of citrus peels[J]. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*, 2018(18): 9–20.
- [9] NESRIN M F, AMANI H E, AZZA R A, et al. Comparative study of the hypocholesterolemic, antidiabetic effects of four agro-waste *Citrus* peels cultivars and their HPLC standardization[J]. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 2017(27): 488–494.
- [10] RAMYA S, NARAYANAN V, PONNERULAN B, et al. Potential of peel extracts of *Punica granatum* and *Citrus aurantifolia* on alloxaninduced diabetic rats[J]. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 2020(9): 24.
- [11] 中国老年2型糖尿病防治临床指南(2022年版)[J]. 中国糖尿病杂志, 2022, 30(1): 2–51. [Clinical guidelines for the prevention and treatment of type 2 diabetes in the elderly in China (2022 edition) [J]. *Chinese Journal of Diabetes*, 2022, 30(1): 2–51.]
- [12] ARAKI E, TANAKA A, INAGAKI N, et al. Diagnosis, prevention, and treatment of cardiovascular diseases in people with type 2 diabetes and prediabetes: a consensus statement jointly from the Japanese Circulation Society and the Japan Diabetes Society [J]. *Diabetology International*, 2021, 12(1): 1–51.
- [13] 姚旭. 生物分子网络分析及其在疾病药物预测中的应用研究[D]. 杭州: 杭州师范大学, 2021. [YAO X. Biomolecule network analysis and its application in disease-drug prediction[D]. Hangzhou: Hangzhou Normal University, 2021.]
- [14] CHEN W L, HONG J N, ZHANG X N, et al. Network biological modeling: A novel approach to interpret the traditional Chinese medicine theory of exterior-interior correlation between the lung and large intestine[J]. *Digital Chinese Medicine*, 2020, 3(4): 249–259.
- [15] 世界中医药学会联合会. 网络药理学评价方法指南[J]. 世界中医药, 2021, 16(4): 527–532. [World Federation of Chinese Medicine Societies. Guidelines for network pharmacological evaluation methods[J]. *World of Chinese Medicine*, 2021, 16(4): 527–532.]
- [16] 牛明, 张斯琴, 张博, 等. 《网络药理学评价方法指南》解读[J]. 中草药, 2021, 52(14): 4119–4129. [NIU M, ZHANG S Q, ZHANG B, et al. Interpretation of network pharmacology evaluation method guidance[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2021, 52(14): 4119–4129.]
- [17] 余雨婷, 张彦, 张迎, 等. 基于分子对接探究紫苏粗提物对代谢综合征相关酶的抑制作用[J]. 食品与机械, 2022, 38(4): 183–188. [YU Y T, ZHANG Y, ZHANG Y, et al. Explore the inhibitory effect of *Perilla* crude extract on metabolic syndrome-related enzymes based on molecular docking[J]. *Food & Machinery*, 2022, 38(4): 183–188.]
- [18] 余雨婷, 张彦, 张迎, 等. 紫苏体外对代谢综合征相关四种酶抑制作用的研究[J]. 中国食品添加剂, 2022, 33(4): 63–71. [YU Y T, ZHANG Y, ZHANG Y, et al. Study on enzyme inhibition of *Perilla in vitro* on metabolic syndrome[J]. *Chinese food additives*, 2022, 33(4): 63–71.]
- [19] 张宇欣, 刘巍巍, 杨娟, 等. 基于网络药理学和分子对接探讨常见酚酸提高机体免疫力的作用机制[J]. 食品工业科技, 2023, 44(2): 29–40. [ZHANG Y X, LIU W W, YANG J, et al. Molecular mechanism of common phenolic acids on enhancing immunity based on network pharmacology and molecular docking[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2023, 44(2): 29–40.]
- [20] 邢菊玲, 刘芬, 冯萌, 等. 基于网络药理学及分子对接的黄芪散治疗2型糖尿病机制探讨[J]. 广州中医药大学学报, 2022, 39(4): 920–931. [XING J L, LIU F, FENG M, et al. Mechanism of Huangqi San in the treatment of type 2 diabetes mellitus based on network pharmacology and molecular docking[J]. *Journal of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine*, 2022, 39(4): 920–931.]
- [21] 陈超, 缪艳燕, 李慧君, 等. 基于 UPLC-MS/MS 成分分析结合网络药理学预测新会陈皮黄酮类成分质量标志物[J]. 环球中医药, 2022, 15(3): 417–426. [CHEN C, MIU Y Y, LI H J, et al. Prediction of quality markers of flavonoid components of Xinhui Chenpi based on UPLC-MS/MS compositional analysis combined with network pharmacology[J]. *Global Traditional Chinese Medicine*, 2022, 15(3): 417–426.]
- [22] SINGH J, SOOD S, MUTHURAMAN A. *In-vitro* evaluation of bioactive compounds, anti-oxidant, lipid peroxidation and lipoxigenase inhibitory potential of *Citrus karna* L. peel extract[J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2014, 51(1): 67–74.
- [23] ZHAO J Y, LI L, JIAO F P, et al. Human plasma protein binding of water soluble flavonoids extracted from *Citrus* peels[J]. *Journal of Central South University*. 2014 (21): 2645–2651.
- [24] 王安楠, 范书源, 侯铁军, 等. 基于网络药理学和分子对接方法探究白及治疗糖尿病足作用机制[J]. 辽宁中医药大学学报, 2022, 24(5): 161–169. [WANG A Y, FAN S H Y, HOU T J, et al. Exploration on mechanisms of Baiji(*Bletillae rhizoma*) on diabetic foot based on network pharmacology and molecular docking[J]. *Journal of Liaoning University of TCM*, 2022, 24(5): 161–169.]
- [25] 于乃馨, 李国琼, 李标, 等. 基于网络药理学和分子对接探讨黄芪甲苷治疗糖尿病视网膜病变的作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(13): 209–216. [YU N X, LI G Q, LI B, et al. Mechanism of astragaloside IV in treating diabetic retinopathy based on network pharmacology and molecular docking[J]. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*, 2022, 28(13): 209–216.]
- [26] SHAKIR A, RAM P, MOHAMMED N, et al. Dried peel fraction of *Citrus sinensis* partially reverses pathological changes in rat model of liver cirrhosis[J]. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism*, 2011, 4(1): 57–67.