

柠檬皮多酚成分分析及其对胰岛素抵抗HepG2细胞糖代谢的影响

王瑞雪, 张筠, 崔艳伟, 付红岩, 房一明, 张彦军, 初众

Analysis of Polyphenols from Lemon Peel and Its Effect on Glucose Metabolism in Insulin-resistant HepG2 Cells

WANG Ruixue, ZHANG Yun, CUI Yanwei, FU Hongyan, FANG Yiming, ZHANG Yanjun, and CHU Zhong

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2022030281>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

异鼠李素调控AKT-FOXO1通路改善胰岛素抵抗HepG2细胞糖代谢作用机制

The Mechanism of Isorhamnetin Regulating AKT-FOXO1 Pathways on Improve the Insulin Resistance Model of HepG2 Cells

食品工业科技. 2020, 41(23): 320-324

紫色马铃薯花色苷改善HepG2细胞胰岛素抵抗模型糖代谢的机制

The mechanism of purple potato anthocyanins improve the insulin resistance model of HepG2 cells*

食品工业科技. 2018, 39(5): 319-324

富硒青钱柳多糖对 α -葡萄糖苷酶及HepG2细胞葡萄糖消耗的影响

Effects of selenium polysaccharide from *Cyclocarya paliurus* (Batal)Ijinskaja on α -glucosidase and glucose consumption in HepG2 cells

食品工业科技. 2018, 39(2): 40-43,50

D-松醇复配 Mn^{2+} 对HepG2细胞胰岛素抵抗的调节及其作用机制

Effects and Mechanism of D-pinitol Compound with Mn^{2+} on Insulin Resistance of HepG2 Cells

食品工业科技. 2019, 40(10): 139-144

壳三糖胍盐酸盐对胰岛素抵抗细胞模型的改善作用

Improving Effect of Chitotriose Guanidine Hydrochloride on Insulin Resistance Cell Model

食品工业科技. 2021, 42(19): 350-356

豌豆肽缓解胰岛素抵抗形成效果探究

Effect of Pea Oligopeptides on Relieving Insulin Resistance

食品工业科技. 2019, 40(12): 145-148



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

王瑞雪, 张筠, 崔艳伟, 等. 柠檬皮多酚成分分析及其对胰岛素抵抗 HepG2 细胞糖代谢的影响 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(23): 310–317. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022030281

WANG Ruixue, ZHANG Yun, CUI Yanwei, et al. Analysis of Polyphenols from Lemon Peel and Its Effect on Glucose Metabolism in Insulin-resistant HepG2 Cells[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(23): 310–317. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022030281

· 分析检测 ·

柠檬皮多酚成分分析及其对胰岛素抵抗 HepG2 细胞糖代谢的影响

王瑞雪^{1,2}, 张 筠^{2,*}, 崔艳伟², 付红岩², 房一明¹, 张彦军¹, 初 众^{1,*}

(1. 中国热带农业科学院香料饮料研究所, 海南万宁 571533;

2. 黑龙江东方学院食品工程学院, 黑龙江哈尔滨 150066)

摘 要: 目的: 探究柠檬皮多酚 (Limon Peel Polyphenols, LPP) 的组成成分, 并研究其对胰岛素抵抗 (Insulin Resistance, IR) 的 HepG2 细胞糖代谢的影响。方法: 采用高效液相色谱串联四级杆飞行时间质谱法 (HPLC-QTOF-MS) 分析 LPP 组成, 利用 HepG2 细胞建立胰岛素抵抗模型, 用 LPP 作用于 IR-HepG2 细胞, 通过测定细胞葡萄糖消耗量初步探究 LPP 对糖代谢的影响, 再通过测定糖原含量和己糖激酶 (Hexokinase, HK)、丙酮酸激酶 (Pyruvate Kinase, PK)、磷酸烯醇式丙酮酸羧基酶 (Phosphoenol Pyruvate Carboxykinase, PEPCK)、葡萄糖六磷酸酶 (Glucose-6-Phosphatase, G6Pase) 的活性, 探究 LPP 调节细胞糖代谢的作用途径。结果: 经过 HPLC-QTOF-MS 分析出 12 种物质, 主要为黄酮及其苷类成分; 在糖代谢研究方面, 与模型组相比浓度为 0.1~2 mg/mL 柠檬皮多酚可显著提高细胞葡萄糖消耗量 ($P<0.05$), 且当浓度为 0.5 mg/mL 时其提高 IR-HepG2 细胞糖原含量和 HK、PK 活性, 降低 PEPCK 和 G6Pase 活性的能力最接近于二甲双胍阳性对照。结论: 柠檬皮多酚可以缓解 IR-HepG2 细胞的胰岛素抵抗状态, 并能通过促进糖原合成、提高糖酵解关键酶活性、降低糖异生酶活力的方式调节糖代谢水平, 为后续的体内研究提供了数据支持, 并为未来开发功能性产品提供了理论依据。

关键词: 柠檬皮多酚, 成分分析, 降糖活性, HepG2 细胞, 胰岛素抵抗

中图分类号: TQ283

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2022)23-0310-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022030281



本文网刊:

Analysis of Polyphenols from Lemon Peel and Its Effect on Glucose Metabolism in Insulin-resistant HepG2 Cells

WANG Ruixue^{1,2}, ZHANG Yun^{2,*}, CUI Yanwei², FU Hongyan², FANG Yiming¹,
ZHANG Yanjun¹, CHU Zhong^{1,*}

(1. Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Spice and Beverage Research Institute, Wanning 571533, China;

2. College of Food Engineering, East University of Heilongjiang College, Harbin 150066, China)

Abstract: Objective: To explore the composition of limon peel polyphenols (LPP) and its influence on glucose metabolism in insulin resistance (IR) HepG2 cells. Methods: The composition of LPP was analyzed by HPLC-QTOF-MS. HepG2 cells were used to establish insulin resistance model, IR-HepG2 cells were treated with LPP, and the effect of LPP on glucose metabolism was preliminarily investigated by measuring glucose consumption. By determining glycogen content and hexokinase (HK), pyruvate kinase (PK), phosphoenol pyruvate carboxykinase (PEPCK) and glucose-6-phosphatase (G6Pase) activities to explore the pathway of LPP regulating glucose metabolism in cells. Results: Twelve compounds were

收稿日期: 2022-03-23

基金项目: 农业农村部香辛饮料作物遗传资源利用重点实验室、海南省香料饮料作物工程技术研究中心开放课题资助 (2019xys003); 黑龙江东方学院科研创新团队建设项目 (HDFKYTD202104)。

作者简介: 王瑞雪 (1998-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品功能性, E-mail: 1186615232@qq.com。

* 通信作者: 张筠 (1976-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品功能性, E-mail: forever19@sina.com。

初众 (1981-), 男, 硕士, 研究员, 研究方向: 食品工程, E-mail: cz809@163.com。

identified by HPLC-QTOF-MS, mainly flavonoids and their glycosides. In the study of glucose metabolism, compared with the model group, the concentration of 0.1~2 mg/mL lemon peel polyphenols significantly increased glucose consumption ($P<0.05$), and the ability to increase the glycogen content and HK and PK activities and decrease the PEPCK and G6Pase activity of IR-HepG2 cells was closest to metformin-positive control when the concentration of lemon peel polyphenols was 0.5 mg/mL. Conclusion: Lemon peel polyphenols can reduce IR-HepG2 cell state of insulin resistance, and can promote glycogen synthesis, improve the glycolytic key enzyme activity, reduce sugar dysplasia regulate sugar metabolism enzyme activity way, it provides data support for the subsequent research in the body, and provides the theoretical basis for the future development of functional products.

Key words: lemon peel polyphenols; component analysis; hypoglycemic activity; HepG2 cells; insulin resistance

糖尿病(Diabetes Mellitus, DM)是目前临床上面临的主要治疗难题之一,其本质是由于胰岛 β 细胞损伤或胰岛素抵抗,导致血液中葡萄糖含量较高,通过服用降糖类药物虽能够达到良好的降血糖效果,但通常伴有一些毒副作用,因此寻找天然无毒副作用的降糖成分成为研究的热点^[1]。植物多酚是一大类以羟基苯酚为特征的异质化合物,主要的多酚亚类包括黄酮类、芪类、酚酸类和木质素类,具有抗氧化、抑菌消炎、抗病毒抗肿瘤和降血糖降血脂等功效^[2-7]。

柠檬(*Citrus limon* (L.) Burm. f.)为芸香科柑橘属常绿小乔木,源产于东南亚,截至 2020 年全球柠檬产量约为 2135 万吨^[8]。目前柠檬主要用于鲜食或制作成果汁、果酱等产品,产生经济效益的主要是柠檬果肉,柠檬皮通常作为废料被掩埋处理,由于柠檬果皮中含有丰富的营养成分和水分,掩埋后会滋生大量细菌污染周边水源及土壤,破坏环境的同时其营养成分也未得到充分利用,造成了经济损失和资源浪费^[9-10]。目前对于柠檬皮的研究主要停留在对芳香油和果胶的提取上,对其功能性研究不够深入,因此本文探究柠檬皮多酚的成分及其调节糖代谢的功能,为今后开发相关产品提高柠檬整体经济效益提供了理论依据,同时也为柠檬加工废物处理提供了新的方案。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

香水柠檬 海南省万宁市兴隆热带植物园 4 月采摘;大孔树脂 AB-8 天津市光复科技发展有限公司;甲酸、甲醇、乙腈 色谱纯,德国默克公司;人肝癌细胞(HepG2)、DMEM 高糖培养基、PBS、0.25% 胰蛋白酶-EDTA、青霉素-链霉素(P/S) 苏州美仑生物科技有限公司;胎牛血清(FBS) 哈尔滨市立峰生物工程有限公司;二甲基亚砜(DMSO)、MTT、盐酸二甲双胍 北京博奥拓达科技有限公司;重组人胰岛素(40 IU/mL) 上海碧云天生物技术有限公司;BCA 蛋白定量/浓度测定试剂盒 大连美仑生物科技有限公司;葡萄糖测定试剂盒 上海荣盛生物药业有限公司;糖原试剂盒、丙酮酸激酶(PK)试剂盒、己糖激酶(HK)试剂盒 南京建成生物工程研究所;G6Pase Elisa 试剂盒、PEPCK Elisa 试剂盒 北京诚林生物科技有限公司。

1290 HPLC-G7117B DAD-G6546A QTOF 美国 Agilent 公司;SW-CJ-2FD 净化工作台 上海博迅医疗生物仪器股份有限公司;HERAcell 150i 二氧化碳培养箱 美国 Thermo 公司;Ts2-FL 倒置显微镜 日本 Nikon 公司;UV-1200 紫外-可见分光光度计 上海美谱达仪器有限公司;RT-6000 酶标仪 深圳雷社生命科学股份有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 柠檬皮多酚的提取和成分分析

1.2.1.1 样品处理及提取 依据黄修晴^[11]的方法提取和测定柠檬皮多酚,柠檬去皮,冷冻干燥后粉碎过 60 目筛,用 70% 乙醇按料液比 1:60,50 ℃ 超声提取 45 min,5000 r/min 离心 10 min,重复提取 3 次,合并提取液,50 ℃ 旋转蒸发至无醇味,将提取物冷冻干燥后配制成 500 mL 浓度为 3 mg/mL 的上样液,选用 AB-8 大孔树脂湿法灌柱,以 2 mL/min 的流速吸附,用 160 mL 蒸馏水洗去可溶性糖和杂质,使用 70% 乙醇溶液以 1 mL/min 的流速进行洗脱,洗脱液 50 ℃ 旋转蒸发至无醇味,冷冻干燥,得纯度为 81.67% 的 LPP 冻干粉,于 -20 ℃ 密封冷冻保存,取少量柠檬皮多酚溶于甲醇,浓度为 1 mg/mL,过 0.22 μm 尼龙滤膜用于后续仪器分析。

1.2.1.2 液相条件 色谱柱 Agilent EC-C₁₈(2.7 μm , 2.1 mm $\times$ 150 mm),柱温:45 ℃,流速:0.4 mL/min,进样量:1 μL ,DAD 检测波长:254 nm、280 nm,波长范围:190~400 nm,流动相 A:0.1% 甲酸水溶液,流动相 B:0.1% 甲酸乙腈溶液,以 5% 流动相 A 和 95% 流动相 B 洗脱 60 min。

1.2.1.3 质谱条件 选择 Agilent Dual AJS ESI 源,进行正离子模式扫描,干燥气温度及流速:300 ℃、5 L/min,雾化器电压:45 psi,鞘气温度及流速:350 ℃、11 L/min,Vcap 电压:3500 V,毛细管出口电压:135 V,MS 扫描范围:100~1700 m/z,MS 扫描速率:4 s。

1.2.2 细胞培养及 IR-HepG2 细胞模型建立

1.2.2.1 细胞培养 HepG2 细胞培养基以 89% DMEM 培养基+10% FBS+1% P/S 配制,37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养,2~3 d 按 1:3 传代^[12]。

1.2.2.2 细胞模型建立 取对数生长期细胞,以每孔

2×10^4 个细胞接种于 98 孔板,待贴壁后,用 10^{-6} mol/L 的胰岛素作用于 HepG2 细胞 24 h,建立胰岛素抵抗模型^[13-14]。

1.2.3 LPP 对 IR-HepG2 细胞葡萄糖消耗量及存活率的影响 参考王梦丽^[15]的方法,设空白组(不含细胞)、空白对照组(正常 HepG2 细胞)、模型组(IR-HepG2 细胞)、阳性对照组(0.05 mg/mL 二甲双胍)以及 LPP 样品组(LPP 浓度分别为 0.1、0.5、1、1.5、2、2.5 mg/mL 的完全培养基),分别培养 24、48、72 h,采用 MTT 法^[16]测定 LPP 干预后 IR-HepG2 细胞存活率,用葡萄糖检测试剂盒测定培养液中葡萄糖的含量,根据公式(1)、(2)计算不同浓度的柠檬皮多酚对 IR-HepG2 细胞存活率和葡萄糖消耗量的影响。

$$\text{细胞存活率(\%)} = \frac{\text{对照组吸光度} - \text{空白组吸光度}}{\text{样品组吸光度} - \text{空白组吸光度}} \times 100 \quad \text{式(1)}$$

$$\Delta M(\text{mmol/L}) = m - n \quad \text{式(2)}$$

式中: ΔM 表示葡萄糖消耗量(mmol/L); m 表示空白组葡萄糖含量(mmol/L); n 表示样品组葡萄糖含量(mmol/L)。

1.2.4 LPP 对 IR-HepG2 细胞糖代谢途径的影响 细胞在 T25 瓶中培养,设立空白组、空白对照组、模型组、阳性对照组(同 1.2.3)和 LPP 组(LPP 浓度分别为 0.1、0.5、1 mg/mL 的完全培养基),经过建模和给药处理后,弃上清, PBS 清洗 2 次,加入 1 mL 胰酶消化,培养基终止消化后收集细胞。1000 r/min 离心 5 min 弃上清,用 PBS 清洗。再离心,弃上清,用 1 mL PBS 重悬,冰水浴条件下 200 W 超声破碎细胞 5 s 一次,重复 30 次,之后 -4°C 冷冻离心取上清, -20°C 保存备用。采用试剂盒测定 LPP 对 IR-HepG2 细胞糖代谢中糖原含量、HK、PK、PEPCK 和 G6Pase 活性的影响。蒽酮法测定糖原含量;比色法检测 HK、PK 活性;酶联免疫吸附试验(ELISA)检测 PEPCK、G6Pase 活性,具体操作按照试剂盒说明书进行,其含量以蛋白量作为计量单位(参照 BCA 试剂盒说明书的方法进行测定),评价 LPP 对

IR-HepG2 细胞糖代谢的影响。

1.3 数据处理

液质数据用 Agilent Mass Hunter Workstation 的 Qualitative Analysis 10.0 软件进行分析;细胞试验每组重复 5 次,采用 Excel 2010、Origin 2019b、SPSS17.0 进行绘图及数据分析,采用 Duncans'法进行组间差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 柠檬皮多酚 HPLC-QTOF-MS 结果分析

根据质谱扫描结果对液相色谱的 11 个峰进行定性分析,依据样品先经过 DAD 检测器再进入质谱检测器的原理,与液相色谱图的保留时间相比总离子流色谱图的保留时间会相对延后,图 1 和图 2 为正离子扫描模式下的总离子流色谱图与液相色谱图出峰情况,依据液相色谱出峰位置找到相应总离子流色谱图(Total Ion Chromatogram, TIC)出峰位置提取色谱图(Extracted Ion Chromatogram, EIC),获得化合物的分子离子峰(如 $[M+H]^+$ 、 $[M+Na]^+$ 和 $[M+K]^+$)信息,根据分子离子峰响应、峰形以及软件自动生成分子式的偏差得到该峰的分子式和母离子,再依据保留时间到 MS/MS 上寻找相应的母离子被撞击后形成的子离子,根据丢失的碎片数结合相关文献最终推测出物质的结构。

具体的多酚化合物分析以峰 9(b)为例,图 3(A)为峰 9(b)的 EIC 图, (B)为一级质谱图, (C)为二级质谱图。

从图 3(A)和(B)中可以看出该组分存在 $[M+H]^+$ 、 $[M+Na]^+$ 和 $[M+K]^+$ 峰,响应和峰形良好,其母离子为 m/z 611.1974,软件自动生成分子式 $C_{28}H_{34}O_{15}$,计算出 $[M+H]^+$ 理论值为 m/z 611.1970,实际值与理论值偏差为 0.39,图 3(C)为母离子 m/z 611.1960 打碎后得到的碎片离子,子离子峰 m/z 303 是 $[M+H-146-162]^+$ 得到的, m/z 465 是 $[M+H-146]^+$ 得到的,其中 m/z 146 为鼠李糖基($C_6H_{10}O_4$)、 m/z 162 为葡萄糖基($C_6H_{10}O_5$),结合软件分析和于国华等^[17]的鉴定结果最终推测峰 9(b)组分为橙皮苷,通过文献检索比对和软件分析共鉴别出 12 种物

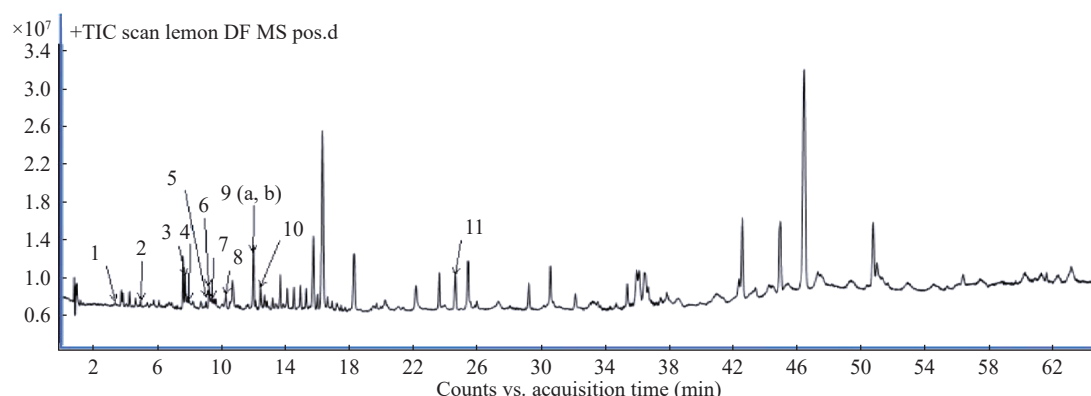


图 1 柠檬皮多酚总离子流色谱图

Fig.1 TIC chromatography of lemon peel polyphenols

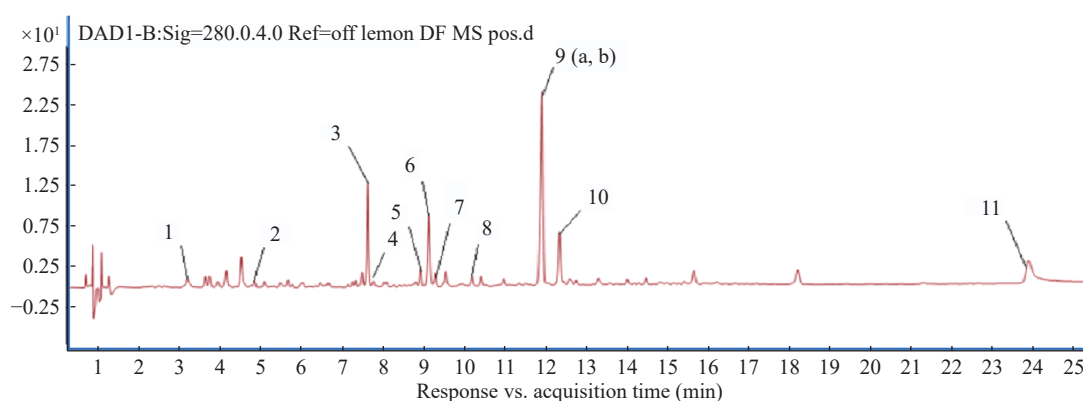


图 2 柠檬皮多酚高效液相色谱图

Fig.2 HPLC chromatography of lemon peel polyphenols

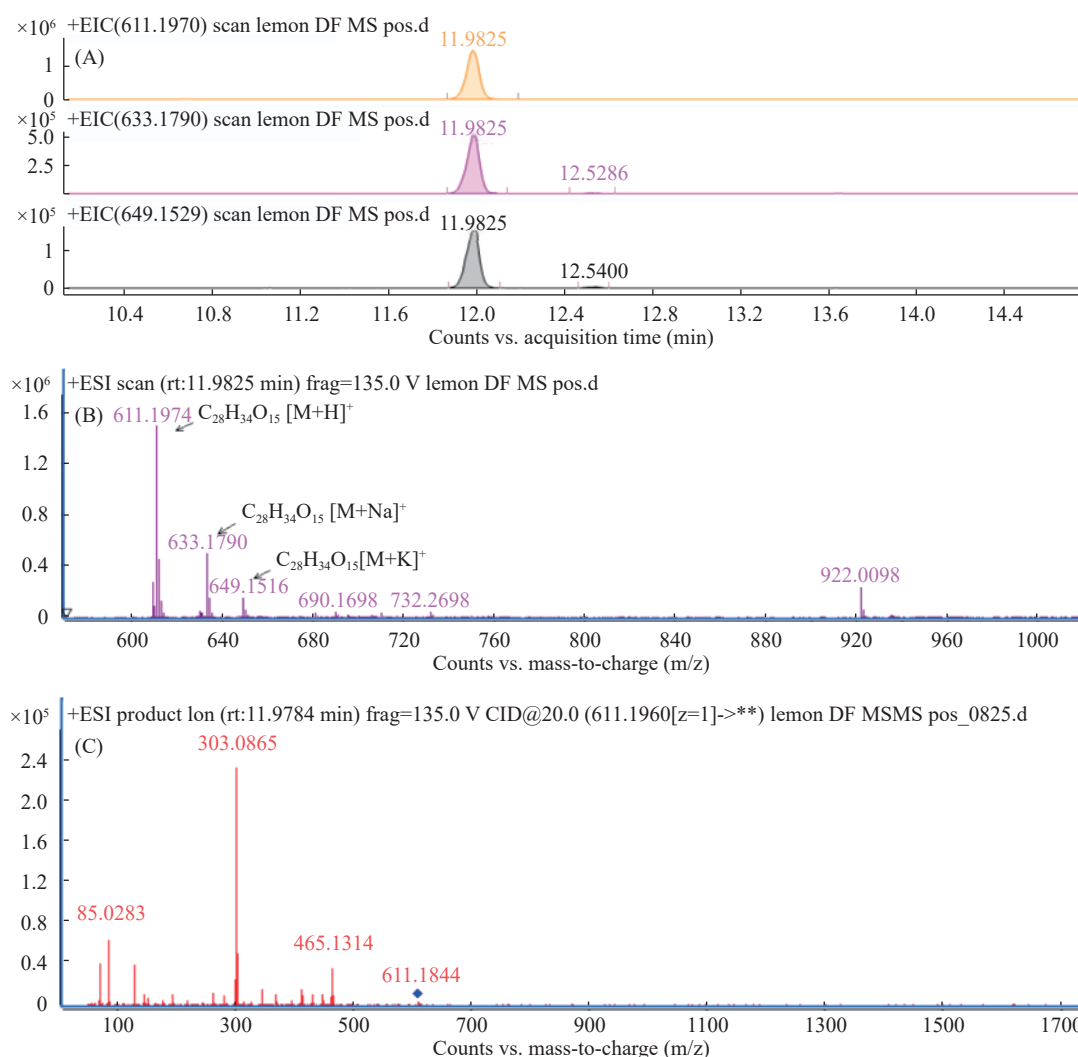


图 3 峰 9(b) 的 EIC 图(A)、一级质谱图(B)和二级质谱图(C)

Fig.3 EIC spectra (A), MS spectra (B) and MS/MS spectra (C) of peak 9(b)

质,结果见表 1。本文仅对 LPP 的成分做了初步推测,为了验证推测成分的准确性,后续需进一步做傅里叶红外光谱分析、核磁共振氢谱分析或者购买标准品进行验证试验。

2.2 LPP 对 IR-HepG2 细胞葡萄糖消耗量及存活率的影响

用 0.1~2.5 mg/mL 的 LPP 分别作用于 IR-HepG2 细胞 24、48、72 h,测定葡萄糖含量,如图 4。

由图 4 可知,各组葡萄糖消耗量随着时间的增加逐渐降低,出现这个趋势的原因极可能是与细胞活性有关,随着培养时间增加,细胞存活率逐渐下降,利用葡萄糖的能力有所下降^[25]。模型组的葡萄糖消耗量在各时间段均显著低于空白对照组,说明细胞出现了葡萄糖代谢异常。与模型组相比,阳性对照组和 LPP 浓度为 0.1~1 mg/mL 时的葡萄糖消耗量在各时间段均显著($P<0.05$)高于模型组,且在 LPP 浓度为

表 1 LPP 成分分析结果
Table 1 The results of LPP component analysis

序号	保留时间 (min)	母离子	子离子	分子式	误差	名称	参考文献
1	3.34	169.0495	93 [M+H-甲氧基-CO-羟基] ⁺	C ₈ H ₈ O ₄	0.06	香草酸	[18]
2	4.93	355.1024	193 [M+H-葡萄糖] ⁺	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	-0.12	新绿原酸	[19]
3	7.70	625.1760	487 [M+H-138] ⁺	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	0.56	Chrysoeriol-7-O-(2'-O-mannopyranosyl) allopuranoside	—
4	7.93	449.1080	329 [M+H-120] ⁺	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	-0.21	荜草素	[20]
5	9.18	433.1131	283 [M+H-阿拉伯糖] ⁺	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	-0.85	山奈黄苷	[21]
6	9.19	597.1815	289 [M+H-新橙皮糖] ⁺	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₅	-0.27	圣草枸橼苷	[22]
7	9.37	579.1708	271 [M+H-新橙皮糖] ⁺ , 433 [M+H-鼠李糖] ⁺	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	-0.56	野漆树苷	[17]
8	10.26	463.1233	313 [M+H-阿拉伯糖] ⁺	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	-0.4	金雀花素	—
9(a)	11.94	609.1813	301 [M+H-新橙皮糖] ⁺ , 463 [M+H-鼠李糖] ⁺	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₅	-0.86	地奥司明	[23]
9(b)	11.98	611.1960	303 [M+H-鼠李糖-葡萄糖] ⁺ , 465 [M+H-鼠李糖] ⁺	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅	0.39	橙皮苷	[17]
10	12.41	353.0855	147 [M+H-206] ⁺	C ₁₆ H ₁₆ O ₉	0.61	4-甲基-7-乙酰氧基香豆素-β-D-葡萄糖醛酸苷	—
11	24.59	515.2277	161 [M+H-C ₁₈ H ₂₈ O ₈] ⁺ , 411 [M+H-C ₃ H ₄ O ₄] ⁺	C ₂₈ H ₃₄ O ₉	-0.2	诺米林	[24]

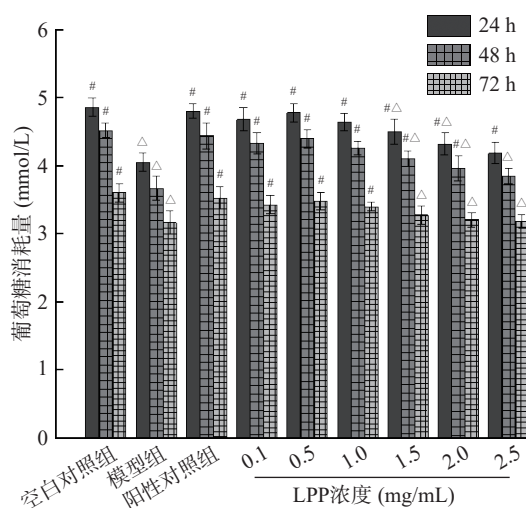


图 4 LPP 对 IR-HepG2 细胞葡萄糖消耗量的影响

Fig.4 Effect of LPP on the glucose consumption of IR-HepG2 cells

注: 相同培养时间条件下, #表示与模型组相比差异显著 ($P < 0.05$); Δ 表示与阳性对照组相比差异显著 ($P < 0.05$), 未标注表示差异不显著 ($P > 0.05$)。

0.5 mg/mL 时葡萄糖消耗量整体达到了峰值, 在 24 h 时最高 (4.78 ± 0.13 mmol/L), 比模型组的葡萄糖消耗率提高 15.1%。与阳性对照相比在 LPP 浓度为 0.1~1 mg/mL 时各时段的葡萄糖消耗量与阳性对照差异不显著 ($P > 0.05$), 说明 LPP 在这个浓度范围内与 0.05 mg/mL 的二甲双胍改善胰岛素抵抗的能力相近, 因此后续试验的浓度设置在 0.1~1 mg/mL。

用 0.1~2.5 mg/mL 的 LPP 分别作用于 IR-HepG2 细胞 24、48、72 h, 测定细胞存活率, 评价 LPP 在缓解胰岛素抵抗时对 IR-HepG2 细胞活性的影响, 探究 LPP 的细胞毒性作用, 结果见图 5。

从图 5 中可以看出, 各组细胞存活率均在 80% 以上, 且样品组随 LPP 浓度的降低细胞存活率上升, 呈现剂量依赖性, 说明高浓度的 LPP 对 IR-HepG2

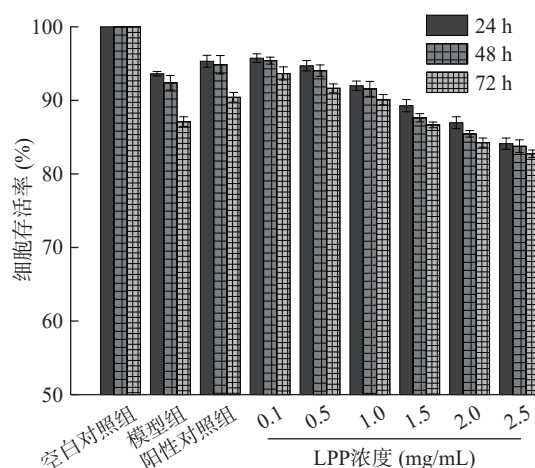


图 5 LPP 对 IR-HepG2 细胞存活率的影响

Fig.5 Effect of LPP on survival rate of IR-HepG2 cells

细胞有一定的抑制作用。整体趋势表明 24 h 时细胞存活率高于其他时间组, 72 h 时细胞存活率最低。24 h 可作为 LPP 改善胰岛素抵抗干预的最佳时间, 因此后续试验设置培养时间为 24 h^[26]。

2.3 LPP 对 IR-HepG2 细胞糖代谢途径的影响

2.3.1 LPP 对 IR-HepG2 细胞糖原含量的影响 人体内糖原主要分为肝糖原和肌糖原, 肝脏通过分解、合成肝糖原来调节血糖, 维持机体血糖平衡^[27]。根据上述试验结果, LPP 组设置浓度为 0.1、0.5、1 mg/mL, 培养 24 h 后, 测定 LPP 对 IR-HepG2 细胞中糖原含量的影响, 以此来探究 LPP 缓解胰岛素抵抗调节血糖平衡的能力, 结果见图 6。

由图 6 可知, 在培养 24 h 后, 空白对照组的糖原含量最高, 模型组糖原含量最低, 比空白对照组降低 15.2% ($P < 0.001$); 阳性对照组的糖原含量比模型组提高了 14.7% ($P < 0.001$), LPP 组的糖原含量均显著 ($P < 0.001$) 高于模型组, 且从 0.1 mg/mL 到 1 mg/mL 分别高了 11.6%、14.1% 和 10.5%; 当 LPP 浓度为

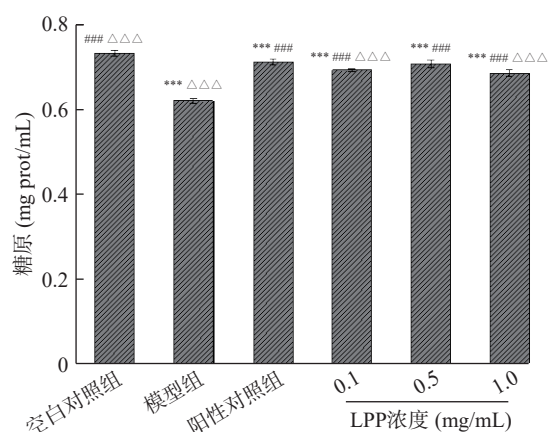


图 6 LPP 对 IR-HepG2 细胞中糖原含量的影响

Fig.6 Effect of LPP on the glycogen content in IR-HepG2 cells
注:与空白对照组相比,*表示 $P<0.05$,**表示 $P<0.01$,***表示 $P<0.001$;与模型组相比,###表示 $P<0.001$;与阳性对照组相比,△表示 $P<0.01$,△△表示 $P<0.001$;未标记表示 $P>0.05$,图 7~图 10 同。

0.5 mg/mL 时,糖原含量与阳性对照组差异不显著 ($P>0.05$)。该结果表明 LPP 在一定浓度范围内能够通过促进 IR-HepG2 细胞糖原合成,从而发挥调节血糖的作用。KIM 等^[28]和 MALGORZATA 等^[29]研究发现,绿茶多酚和木瓜多酚通过促进 HepG2 细胞糖原合成,调节 PEPCK 的表达,从而发挥调节糖代谢的作用,与 LPP 调节糖代谢的作用方式一致。

2.3.2 LPP 对 IR-HepG2 细胞 HK、PK 活性的影响

糖酵解是糖在无氧条件下发生的氧化反应,是体内葡萄糖分解代谢的关键途径,催化糖酵解反应的一系列酶都存在于细胞质内,因此催化反应也在细胞质内进行,HK 和 PK 是糖酵解中的两个关键限速酶,如果能提高这两个酶的活性就可以降低血糖浓度^[30]。图 7、图 8 为 LPP 对 IR-HepG2 细胞中 HK、PK 活性影响的测定结果。

由图 7、图 8 可知,模型组 HK 和 PK 的酶活力分别为 27.61 ± 0.18 nmol/min/mg prot 和 96.77 ± 1.34 U/g prot,均显著低于空白对照组 ($P<0.001$);阳

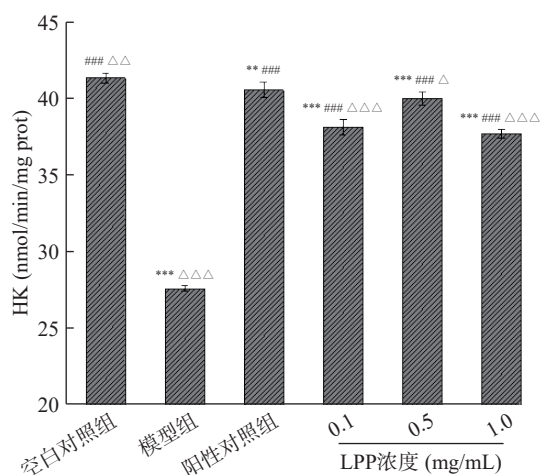


图 7 LPP 对 IR-HepG2 细胞中 HK 活性的影响

Fig.7 Effect of LPP on the activity of HK in IR-HepG2 cells

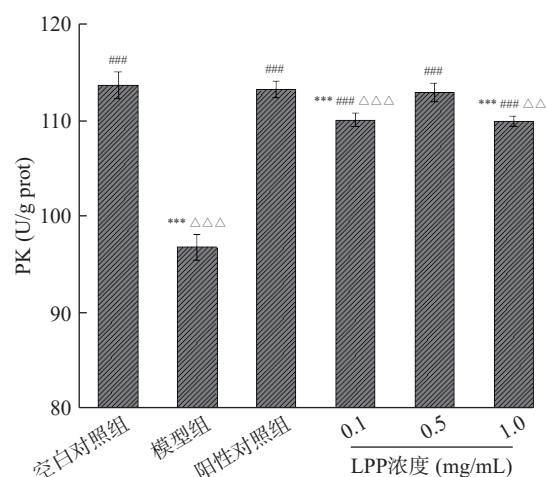


图 8 LPP 对 IR-HepG2 细胞中 PK 活性的影响

Fig.8 Effect of LPP on the activity of PK in IR-HepG2 cells

性对照组与模型组相比,HK 和 PK 的酶活性分别提高了 46.8% 和 16.9%;与模型组相比,LPP 样品组从 0.1 mg/mL 到 1 mg/mL HK 的活性分别提高了 38.1%、44.8% 和 36.6%,PK 的活性分别提高 13.7%、16.6% 和 13.5%,由此可以看出 0.1~1 mg/mL 的 LPP 能够显著提高 IR-HepG2 细胞 HK 和 PK 活性 ($P<0.001$),且在浓度 LPP 为 0.5 mg/mL 时效果最好。该结果表明在一定浓度范围内 LPP 能够提高糖酵解关键酶活性,加速葡萄糖的利用,从而达到调节糖代谢的作用。符群等^[31]的研究发现鸡树条荚蒾果多酚可提高 IR-HepG2 细胞的 HK、PK 活性,加快糖酵解,从而减少细胞内源性葡萄糖的产生,虽然鸡树条荚蒾果多酚与柠檬皮多酚组成不尽相同,但是其调节糖代谢的作用途径相同。

2.3.3 LPP 对 IR-HepG2 细胞 PEPCK、G6Pase 活性的影响 糖异生是体内的生糖反应,能将乳酸、丙酮酸、氨基酸和甘油等非糖物质转化为糖,糖异生主要是在肝脏进行,小部分在肾脏进行,因此通过抑制 PEPCK 和 G6Pase 这两种酶的活性可以抑制非糖物质转化为葡萄糖,从而降低血糖浓度,调节血糖平衡^[32]。图 9、图 10 为 LPP 对 IR-HepG2 细胞中 PEPCK、G6Pase 活性影响的测定结果。

由图 9、图 10 可知,模型组 PEPCK 和 G6Pase 的酶活力分别为 13.94 ± 0.30 和 43.87 ± 0.78 IU/g prot,均显著高于空白对照组 ($P<0.001$),说明此时 IR-HepG2 细胞的糖异生反应高于正常细胞,表现出了糖代谢紊乱现象;阳性对照组与模型组相比,PEPCK 和 G6Pase 的活性分别降低了 42.5% 和 24.3%;与模型组相比,LPP 样品组从 0.1~1 mg/mL PEPCK 的活性分别降低了 33.1%、41.2% 和 18.6%,G6Pase 的活性分别降低了 20.2%、22.8% 和 13.3%;0.5 mg/mL 的 LPP 组与阳性对照组相比 PEPCK 和 G6Pase 的活性差异均不显著 ($P>0.05$)。该结果表明在一定浓度范围内 LPP 能够通过抑制糖异生关键酶的活性,减少生糖反应,从而发挥调节糖代谢的作用,且当浓度为 0.5 mg/mL 时与 0.05 mg/mL 的二甲双胍具有

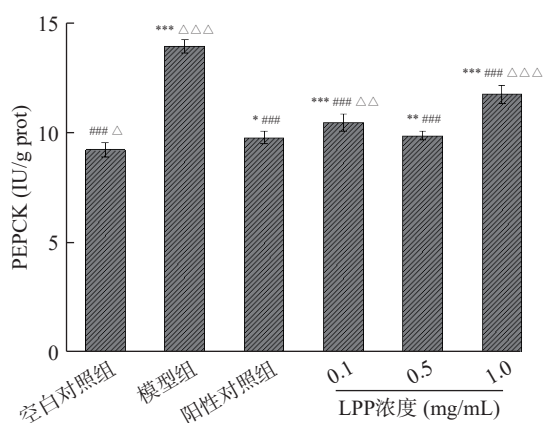


图9 LPP对IR-HepG2细胞中PEPCK活性的影响

Fig.9 Effect of LPP on the activity of PEPCK in IR-HepG2 cells

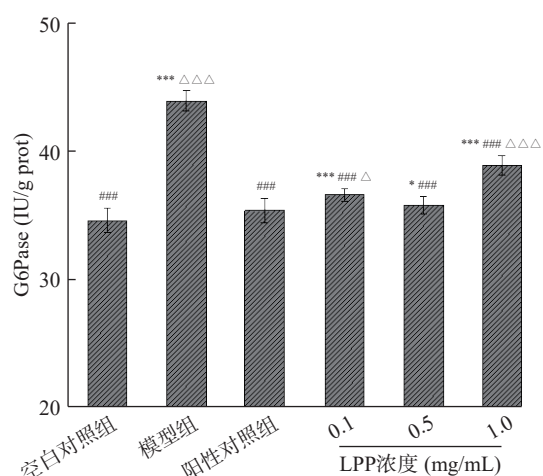


图10 LPP对IR-HepG2细胞中G6Pase活性的影响

Fig.10 Effect of LPP on the activity of G6Pase in IR-HepG2 cells

相似效果。ELUMALAI^[33]和JU等^[34]研究发现橙皮苷可以增加糖尿病大鼠和小鼠的HK活性,降低G6Pase活性,并能改善其肝组织中的糖原含量,这一结果与本文结论相符,据此可以推测LPP能够发挥调节糖代谢作用可能与其中的橙皮苷成分密切相关。

3 结论

本试验利用HPLC-QTOF-MS对柠檬皮多酚进行初步成分分析,共分析出12种物质,分别为香草酸、新绿原酸、荜草素、山奈黄苷、圣草枸橼苷、野漆树苷、Chrysoeriol-7-O-(2'-O-mannopyranosyl)allopyranoside、金雀花素、地奥司明、橙皮苷、4-甲基-7-乙酰氧基香豆素- β -D-葡萄糖醛酸苷和诺米林;进一步通过测定柠檬皮多酚对IR-HepG2细胞葡萄糖消耗量的影响,发现在前48 h内浓度为0.1~2 mg/mL的LPP组与模型组比较可以显著提高($P<0.05$)IR-HepG2细胞的葡萄糖消耗量,缓解胰岛素抵抗状态,通过测定LPP作用后IR-HepG2细胞的糖原含量、HK、PK、PEPCK和G6Pase的活性来研究LPP调节糖代谢的途径,结果表明,柠檬皮多酚能够显著提高IR-HepG2细胞的糖原含量和糖酵解关键限速酶

HK和PK的酶活力($P<0.001$),显著降低糖异生关键酶PEPCK和G6Pase的活性($P<0.001$),从而达到调节血糖的作用,且当LPP浓度为0.5 mg/mL时,其提高细胞糖原含量、促进糖酵解、抑制糖异生的效果最好。本试验为后续进行体内试验提供了数据支持,为今后开发功能性产品或添加剂提供了可靠依据。

参考文献

- [1] YUAN M, GAO W N, YU Y J, et al. Research progress of quercetin in prevention and treatment of type 2 diabetes mellitus[J]. *Journal of nutrition*, 2020, 42(6): 618-622.
- [2] 爱伟, 刘莉莉, 杨亚晋, 等. 植物多酚的生物活性及其在家禽生产中的应用[J]. *动物营养学报*, 2019, 31(2): 491-499. [AI Wei, LIU Lili, YANG Yajin, et al. Bioactivity of plant polyphenols and their application in poultry production[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2019, 31(2): 491-499.]
- [3] 李晓东. 榛子果仁中酚类物质的制备及其抗氧化、抗菌活性的研究[D]. 长春: 长春理工大学, 2019. [LI Xiaodong. Preparation of phenols from hazelnut kernels and their antioxidant and antibacterial activities[D]. Changchun: Changchun University of Science and Technology, 2018.]
- [4] ZHANG Y, LI A, YANG X. Effect of lemon seed flavonoids on the anti-fatigue and antioxidant effects of exhausted running exercise mice[J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2021, 45(8): 157-163.
- [5] TINH N, SITOLO G C, YAMAMOTO Y, et al. *Citrus limon* peel powder reduces intestinal barrier defects and inflammation in a colitic murine experimental model[J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2021, 183(24): 1147-1156.
- [6] DONG L, XIN S. Induction of apoptosis by D-limonene is mediated by inactivation of Akt in LS174T human colon cancer cells[J]. *Oncology Reports*, 2013, 121(3): 177-184.
- [7] TEJPAL S, WEMYSS A M, BASTIE C C, et al. Lemon extract reduces angiotensin converting enzyme (ACE) expression and activity and increases insulin sensitivity and lipolysis in mouse adipocytes[J]. *Nutrients*, 2020, 12(8): 23-48.
- [8] 张放. 2010—2020年全球柑桔生产变化简析[J]. *中国果业信息*, 2022, 39(1): 26-43. [ZHANG Fang. Changes of global citrus production from 2010 to 2020[J]. *China Fruit News*, 2022, 39(1): 26-43.]
- [9] 容欧, 刘珊. 柠檬精深加工研究现状[J]. *现代食品*, 2019(4): 5-7, 11. [RONG Ou, LIU Shan. Research status of lemon intensive and deep processing[J]. *Modern Food*, 2019(4): 5-7, 11.]
- [10] SIMEONE G, MATTEO A D, RAO M A, et al. Variations of peel essential oils during fruit ripening in four lemon (*Citrus limon* (L.) Burm. F.) cultivars[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2020, 100(1): 193-200.
- [11] 黄修晴. 柠檬皮多酚生物活性及其对肠道菌群的影响[D]. 哈尔滨: 黑龙江东方学院, 2021. [HUANG Xiuqing. Bioactivity of polyphenols from lemon peel and its effect on intestinal microflora[D]. Harbin: East University of Heilongjiang, 2021.]
- [12] 高亚东, 朱安, 李璐迪, 等. 吴茱萸碱对HepG2细胞毒性及其机制[J]. *北京大学学报(医学版)*, 2021, 53(6): 1107-1114. [GAO Yadong, ZHU An, LI Ludi, et al. Cytotoxicity and underlying mechanism of evodiamine in HepG2 cells[J]. *Journal of Peking University (Health Sciences)*, 2021, 53(6): 1107-1114.]
- [13] LI J, LUO J, CHAI Y, et al. Hypoglycemic effect of *Tarax-*

- acum officinale* root extract and its synergism with *Radix astragali* extract[J]. *Food Science Natural*, 2021, 26;9(4): 2075–2085.
- [14] BIAN G, YANG J, ELANGO J, et al. Natural triterpenoids isolated from *Akebia trifoliata* stem explants exert a hypoglycemic effect via α -glucosidase inhibition and glucose uptake stimulation in insulin-resistant HepG2 cells[J]. *Chemical Biodivers*, 2021, 18(5): 1178–1187.
- [15] 王梦丽. 鸡树条荚蒾果中降血糖成分的提取及其活性研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2020. [WANG Mengli. Study on extraction and activity of hypoglycemic components from *Viburnum burnum* fruit[D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2020.]
- [16] GHASEMI M, TURNBULL T, SEBASTIAN S, et al. The MTT assay: Utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(23): 12–17.
- [17] 于国华, 杨洪军, 李俊芳, 等. 基于 UHPLC-LTQ-Orbitrap-MS/MS 技术分析枳实中的化学成分[J]. *中国中药杂志*, 2016, 41(18): 3371–3378. [YU Guohua, YANG Hongjun, LI Junfang, et al. UHPLC-LTQ-Orbitrap-MS/MS was used to analyze the chemical constituents of *Aurantii trifoliata*[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2016, 41(18): 3371–3378.]
- [18] 陈金梅, 廖锦红, 高金薇, 等. UPLC-Q-TOF-MS/MS 研究胆木药材水提物的化学成分[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(18): 49–56. [CHEN Jinmei, LIAO Jinhong, GAO Jinwei, et al. UPLC-Q-TOF-MS/MS was used to study the chemical constituents of the water extract of *Gallwood*[J]. *Chinese Journal of Experimental Formulae*, 2018, 24(18): 49–56.]
- [19] 何峰, 王永林, 郑林, 等. UPLC-PDA-ESI-MS 分析杜仲中化学成分[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2014, 20(3): 59–62. [HE Feng, WANG Yonglin, ZHENG Lin, et al. Analysis of chemical constituents in *Eucommia ulmoides* by UPLC-PDA-ESI-MS[J]. *Chinese Journal of Experimental Formulae*, 2014, 20(3): 59–62.]
- [20] 石芳, 廖霞, 卢可可, 等. UPLC-DAD/ESI-TOF-MS 鉴定黑脉羊肚菌多酚化合物[J]. *食品科学*, 2017, 38(16): 115–121. [SHI Fang, LIAO Xia, LU Keke, et al. Identification of polyphenol compounds in *Morchella nigricae* by UPLC-DAD/ESI-TOF-MS[J]. *Food Science*, 2017, 38(16): 115–121.]
- [21] 郑亚美. 侧柏叶多酚的分离纯化、结构鉴定及相关活性研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2017. [ZHENG Yamei. Isolation, purification, structure identification and related activities of polyphenols from the leaves of *Platycladus orientalis*[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2017.]
- [22] 李汀, 邹波, 吴继军, 等. 蜜柚果肉膳食多酚的结构鉴定及抗氧化机理[J]. *食品科学*, 2021, 42(19): 202–210. [LI Ting, ZOU Bo, WU Jijun, et al. Structural identification and antioxidant mechanism of dietary polyphenols in *Pomelo* pulp[J]. *Food Science*, 2021, 42(19): 202–210.]
- [23] 李哲, 宋瑞, 许凤国, 等. 大鼠灌服枳实提取液后体内黄酮类代谢产物的 LC-MS/MS 分析[J]. *中国药科大学学报*, 2010, 41(6): 539–547. [LI Zhe, SONG Rui, XU Fengguo, et al. LC-MS/MS analysis of flavonoid metabolites in rats after gavage of *Immaturus aurantii* extract[J]. *Journal of China Pharmaceutical University*, 2010, 41(6): 539–547.]
- [24] 孟鹏. 金柑柠檬苦素类化合物的提取纯化、结构鉴定及生物活性研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2013. [MENG Peng. Extraction, purification, structure identification and biological activity of limonin compounds from kumquat[D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2013.]
- [25] 陈欢, 张铭珈, 倪慧, 等. 应激损伤糖尿病细胞模型的建立及不同浓度逍遥散含药血清对其生存率的影响[J]. *时珍国医国药*, 2019, 30(1): 26–29. [CHEN Huan, ZHANG Minjia, NI Hui, et al. The establishment of diabetic cell model with stress injury and the effect of different concentrations of Xiao Yao San-containing serum on survival rate[J]. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research*, 2019, 30(1): 26–29.]
- [26] 魏奇. 姬松茸多酚降血糖活性及其作用机制的研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2020. [WEI Qi. Hypoglycemic activity of polyphenols in *Agaricus blazei* and its mechanism[D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2020.]
- [27] 盛瑜, 白丽丹, 段懿涵, 等. 北虫草刺五加组合物抗疲劳活性及机理研究[J]. *食品研究与开发*, 2020, 41(20): 15–21. [SHENG Yu, BAI Lidan, DUAN Yihan, et al. Study on antifatigue activity and mechanism of *Acanthopanax* composition from *Cordyceps sinensis*[J]. *Food Research and Development*, 2020, 41(20): 15–21.]
- [28] KIM J J Y, TAN Y, XIAO L, et al. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate enhance glycogen synthesis and inhibit lipogenesis in hepatocytes[J]. *BioMed Research International*, 2013, 9(20): 128–136.
- [29] MALGORZATA Z S, PAWLIK N. Japanese quince (*Chaenomeles japonica* L.) fruit polyphenolic extract modulates carbohydrate metabolism in HepG2 cells via AMP-activated protein kinase[J]. *Acta Biochimica Polonica*, 2018, 65(1): 67–78.
- [30] 刘嘉婧, 刘荣花, 储以微. 免疫代谢研究进展[J]. *中国免疫学杂志*, 2017, 33(1): 148–151. [LIU Jiajing, LIU Ronghua, CHU Yiwei. Progress in immune metabolism research[J]. *Chinese Journal of Immunology*, 2017, 33(1): 148–151.]
- [31] 符群, 王梦丽, 邹滨, 等. 鸡树条荚蒾果多酚改善胰岛素抵抗 HepG2 细胞的糖代谢效应[J]. *北京林业大学学报*, 2020, 42(2): 106–113. [FU Qun, WANG Mengli, KUAI Bin, et al. Effects of *Viburnum* fruit polyphenols on glucose metabolism in insulin-resistant HepG2 cells[J]. *Journal of Beijing Forestry University*, 2020, 42(2): 106–113.]
- [32] 崔继变. LAMTOR1 通过 LKB1/SIK 途径调节糖异生[D]. 厦门: 厦门大学, 2018. [CUI Jiwen. LAMTOR1 regulates gluconeogenesis through the LKB1/SIK pathway[D]. Xiamen: Xiamen University, 2018.]
- [33] ELUMALAI N. Hesperidin, a citrus flavonoid ameliorates hyperglycemia by regulating key enzymes of carbohydrate metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 2019, 29(1): 1–32.
- [34] JU J U, MI-KYUNG L, KYU-SHIK J, et al. The hypoglycemic effects of hesperidin and naringin are partly mediated by hepatic glucose-regulating enzymes in C57BL/KsJ-db/db mice[J]. *Journal of Nutrition*, 2004, 134(10): 24–29.