

青钱柳多糖对 α -葡萄糖苷酶及 HepG2 细胞葡萄糖消耗的影响

表 1 α -葡萄糖苷酶活力抑制实验反应体系
Table 1 The reaction system of the inhibition effect on α -glucosidase

组别	酶液 (mL)	抑制剂 (mL)	PBS (mL)	pNPG (mL)	Na ₂ CO ₃ (mL)
空白管	0.4	-	0.8	0.4	1.0
空白对照管	-	-	1.2	0.4	1.0
抑制管	0.4	0.8	-	0.4	1.0
背景对照管	-	0.8	0.4	0.4	1.0

张浩¹, 李东山¹, 谭开祥², 向极钎³, 刘卫¹, * (1. 华中科技大学生命科学与技术学院, 湖北武汉 430074; 2. 湖北思慧生物科技有限公司, 湖北恩施 445099; 3. 恩施州农业科学院, 湖北恩施 445099)

摘要: 以 α -葡萄糖苷酶和 HepG2 细胞作为体外受体模型, 研究青钱柳多糖 (Se-CPP) 体外降血糖活性, 并与青钱柳多糖 (CPP)、CPP + 硒酵母、CPP + 亚硒酸钠复配物比较。结果表明, Se-CPP 对 α -葡萄糖苷酶活性具有良好的抑制效果且呈现明显的剂量依赖性, 其半抑制浓度 (IC₅₀) 为 0.054 mg/mL, 低于阿卡波糖、CPP、CPP + 硒酵母、CPP + 亚硒酸钠复配物。适宜浓度的 Se-CPP 可促进胰岛素抵抗状态 HepG2 细胞对葡萄糖的消耗, 效果显著优于 CPP、CPP + 硒酵母、CPP + 亚硒酸钠复配物 ($p < 0.05$)。关键词: 青钱柳多糖, α -葡萄糖苷酶, 降血糖, 胰岛素抵抗, HepG2 细胞

Effects of selenium polysaccharide from Cyclocarya

paliurus (Batal) Ijinskaja on α -glucosidase and glucose consumption

in HepG2 cells ZHANG Hao¹, LI Dong-shan¹, TAN Kai-xiang², XIANG Ji-qian³, LIU Wei¹, *

(1. College of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China; 2. Hubei Savant Biological Technology Co., Ltd., Enshi 445099, China; 3. Enshi Academy of

Agricultural Sciences, Enshi 445099, China) Abstract: The α -glucosidase and HepG2 cells were used to study the hypoglycemic activity of selenium polysaccharide from *Cyclocarya paliurus* (Batal) Ijinskaja (Se - CPP) in vitro. The hypoglycemic activity of Se - CPP was compared with *Cyclocarya paliurus* (Batal) Ijinskaja polysaccharide (CPP) , CPP + selenium yeast and CPP + sodium selenite. The results showed that appropriate dose of Se - CPP could effectively inhibit the activity of α -glucosidase in a dose dependent and its 50% inhibitory concentration was 0.054 mg /mL, which was lower than acarbose, CPP, CPP + selenium yeast and CPP + sodium selenite. Furthermore, appropriate dose of Se - CPP could improve the glucose consumption of insulin resistance HepG2 cells and the effect was better than that of CPP, CPP + selenium yeast and CPP + sodium selenite ($p < 0.05$). Key words: selenium polysaccharide from *Cyclocarya paliurus* (Batal) Ijinskaja; α -glucosidase; hypoglycemia; insulin resistance; HepG2 cells 中图分类号: TS201.2 文献标识码: A 文章编号: 1002-0306(2018)02-0040-05 doi: 10. 13386/j. issn1002 - 0306. 2018. 02. 008

青钱柳(*Cyclocarya paliurus*(Batal) Ijinskaja) 又名青钱李、甜茶树, 为我国特有珍稀树种, 系双子叶植物纲胡桃科青钱柳属落叶乔木, 分布于湖南、湖北、江西、贵州等地区 [1]。2014 年, 青钱柳被批准为食品新资源, 研究表明, 青钱柳叶富含多糖、黄酮等代谢产物, 其中, 青钱柳多糖 (*Cyclocarya paliurus*(Batal) Ijinskaja polysaccharide, CPP) 具有降血糖、降血脂等生物活性 [2-4]。硒为人体必需的一种微量元素, 具有降血糖、免疫调节、抗肿瘤等生物活性 [5-6]。

国内外有学者对灰树花、茶树等进行富硒处理, 得到具有较好生物活性的富硒多糖 [7-8]。基于此, 本文在前期工作中, 采用人工喷雾施加有机硒肥的方式对青钱柳进行富硒处理, 得到青钱柳叶 [9], 并提取分离得到青钱柳多糖 (Se - CPP) 和 CPP [10]。对 CPP 降血糖活性及作用机制的研究现已较多, 关于 Se - CPP 生物活性研究目前国内外尚无文献报道。本文主要探讨了 Se - CPP 对 α -葡萄糖苷酶活性及 HepG2 细胞葡萄糖消耗的影响, 并与 CPP、CPP 添加微量硒复配物进行比较, 研究结果为青钱柳多糖的开发利用提供实验依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与amp;仪器

青钱柳多糖(Se-CPP)、青钱柳多糖(CPP)参考文献[10]方法制备,检测硒含量分别为 3.30 和 0.11 mg/kg [11]; HepG2 细胞株 国家纳米药物工程技术研究中心; α -葡萄糖苷酶 (19.3 U/mg)、4-硝基苯- α -D-吡喃葡萄糖苷(pNPG)、四甲基偶氮唑蓝(MTT)、胰岛素 美国 Sigma 公司; 阿卡波糖片 拜耳医药保健有限公司; 亚硒酸钠 上海天赐福生物工程技术有限公司; 西维尔硒酵母片 牡丹江灵泰药业股份有限公司; 胎牛血清(FBS)、青链霉素、DMEM 高糖培养基、0.25% 胰蛋白酶 美国 Gibco 公司; DMEM 低糖培养基(含 10% FBS、1% 青链霉素) 美国 HyClone 公司; 盐酸二甲双胍肠溶片 贵州天安药业股份有限公司; 葡萄糖测定试剂盒 上海荣盛生物药业有限公司; 其它试剂 均为国产分析纯。TU-1901 型双光束紫外可见分光光度计 北京普析通用仪器有限责任公司; BPN-150C RH 型二氧化碳培养箱 上海一恒科学仪器有限公司; DSZ2000X 型倒置显微镜 重庆澳浦光电技术有限公司; 318C 型酶标仪 成都华衡仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 α -葡萄糖苷酶活力抑制实验

参考文献[12]方法,以磷酸盐缓冲液(PBS, 0.1 mol/L, pH6.8)为溶剂配制酶液(α -葡萄糖苷酶溶液,浓度为 1.0 U/mL)、底物(pNPG 溶液,浓度为 10 mmol/L)及抑制剂(各受试样品溶液,具体浓度见图 1)。根据 Se-CPP 与 CPP 硒含量,向 CPP 溶液中分别加入微量的硒酵母或亚硒酸钠溶液(采用 PBS 溶液溶解配制,硒浓度为 10 μ g/mL),使溶液硒含量与等浓度 Se-CPP 相等,配制得到复配物溶液。根据文献方法[12-13]设计抑制实验流程如下:取 0.4 mL 酶液和 0.8 mL PBS 缓冲液于空白管,37 $^{\circ}$ C 预热 10 min,加入 0.4 mL 37 $^{\circ}$ C 预热(10 min)好的底物溶液,将反应体系迅速置于 37 $^{\circ}$ C 水浴锅水浴 20 min 后加入 1.0 mL Na₂CO₃ 溶液(浓度为 0.05 mol/L)终止反应,反应体系 PBS 稀释 10 倍后于 405 nm 处测定吸光度。根据上述反应程序及表 1,分别向空白对照管、抑制管和背景对照管加入相应试剂进行反应。每个样品设置 3 个重复,计算抑制率和半抑制浓度 IC₅₀ [12]。抑制率(%) = $1 - \frac{A_3 - A_4}{A_1 - A_2} \times 100$ 式中:空白管、空白对照管、抑制管、背景对照管吸光度值分别为 A₁、A₂、

A3、A4。 1.2.2 HepG2 细胞存活率及葡萄糖消耗实验 Se- CPP、CPP 及盐酸二甲双胍用 DMEM 低糖培养基溶解配制成所需浓度。另向 CPP 溶液中加入微量硒酵母或亚硒酸钠，使溶液硒含量与等浓度 Se- CPP 相等，采用孔径为 0.22 μm 的水溶性滤膜，针筒过滤除菌备用。

表 1 α-葡萄糖苷酶活力抑制实验反应体系
Table 1 The reaction system of the inhibition effect on α-glucosidase

组别	酶液 (mL)	抑制剂 (mL)	PBS (mL)	pNPG (mL)	Na ₂ CO ₃ (mL)
空白管	0.4	-	0.8	0.4	1.0
空白对照管	-	-	1.2	0.4	1.0
抑制管	0.4	0.8	-	0.4	1.0
背景对照管	-	0.8	0.4	0.4	1.0

1.2.2.1 HepG2 细胞的培养 HepG2 细胞采用 DMEM 低糖培养基培养于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱，每隔 3 d 用 0.25% 胰蛋白酶消化传代。传代 3 次后取对数生长期细胞用于实验。 1.2.2.2 MTT 实验 取对数生长期细胞培养于 96 孔细胞培养板，调整细胞密度为 5000 个/孔。细胞贴壁后弃去培养液，设置正常组、给药组 (Se- CPP、CPP、CPP + 硒酵母、CPP + 亚硒酸钠) 和盐酸二甲双胍对照组。其中，正常组每孔加入 200 μL DMEM 低糖培养基，给药组和盐酸二甲双胍对照组每孔加入 200 μL 含药 DMEM 低糖培养基 (各组给药浓度均分别为 400、200、100 μg/mL)。培养 24 h 弃上清液，加入 100 μL MTT 溶液 (1.0 mg/mL) 继续培养 4 h 弃上清液，加入 150 μL 二甲基亚砷振荡混匀，15 min 后测定 570 nm 处 OD 值，计算细胞存活率。细胞存活率 (%) = 给药组 (或对照组) OD 值 / 正常组 OD 值 × 100 1.2.2.3 葡萄糖消耗实验 取对数生长期细胞培养于 96 孔细胞培养板 (5000 个/孔)。细胞贴壁后弃去培养液，分组及给药同 MTT 实验过程。培养 24 h 后测定上清液葡萄糖浓度 (测定过程依照试剂盒说明书)，计算葡萄糖消耗量 (DMEM 低

糖培养基葡萄糖浓度减去上清液葡萄糖浓度)。参考文献方法 [14-15], 建立胰岛素抵抗 (Insulin Resistance, IR) HepG2 细胞模型。取对数生长期细胞培养于 96 孔细胞培养板 (5000 个/孔)。细胞贴壁后弃去培养液, 设置正常组、IR 模型组、给药组 (Se-
- CPP、CPP、CPP + 硒酵母、CPP + 亚硒酸钠) 和盐酸二甲双胍对照组。正常组每孔加入 200 μ L DMEM 低糖培养基, IR 模型组、给药组和盐酸二甲双胍对照组每孔加入 200 μ L 含胰岛素和葡萄糖浓度分别为 2×10^{-6} mol/L 和 40 mmol/L 的 DMEM 低糖培养基, 培养 24 h。培养结束弃去培养基, 正常组和 IR 模型组每孔加入 200 μ L DMEM 低糖培养基, 给药组和盐酸二甲双胍组每孔加入 200 μ L 含药 DMEM 低糖培养基 (各组给药浓度均分别为 400、200、100 μ g/mL), 继续培养 24 h。培养结束弃去培养基, 每孔加入 200 μ L DMEM 高糖培养基, 培养 18 h 后采用葡萄糖氧化酶法测定上清液葡萄糖浓度, 计算葡萄糖消耗量。

1.2.3 数据分析 实验结果以均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS 19.0 软件对实验数据进行统计分析。先进行方差齐性检验, 方差齐则进行单因素方差分析 (方差不齐采用秩和检验), 差异显著后采用 LSD 法进行组间比较, $p < 0.05$ 表示差异显著, $p < 0.01$ 表示差异极显著。

2 结果与分析

2.1 Se-CPP 对 α -葡萄糖苷酶活力的影响

α -葡萄糖苷酶分布于小肠上皮细胞刷状边缘处, 通过催化 α -1, 4 糖苷键水解来促进对蔗糖、麦芽糖等糖类的消化吸收。抑制 α -葡萄糖苷酶活性可减缓葡萄糖的生成与吸收, 降低糖尿病患者餐后血糖 [16]。表 2 各样品对 α -葡萄糖苷酶的半抑制浓度 Table 2 50% Inhibitory concentration of samples to α -glucosidase 样品 Se-CPP CPP 阿卡波糖 CPP + 硒酵母 CPP + 亚硒酸钠 IC₅₀ (mg/mL) 0.054 0.401 4.504 0.467 0.339 表 3 HepG2 细胞存活率测定结果比较 (n = 6) Table 3 Comparing of cell viability of HepG2 cells (n = 6) 浓度 (μ g/mL) 细胞存活率 (%) Se-CPP CPP CPP + 硒酵母 CPP + 亚硒

酸钠 盐酸二甲双胍 400 97.3 ± 2.0 95.6 ± 7.9 111.2 ± 2.0 106.6 ± 4.0 $58.3 \pm 0.4^{**}$ 200 92.8 ± 3.6 108.3 ± 2.9 94.7 ± 3.5 100.9 ± 1.3 $65.2 \pm 1.7^{**}$ 100 $85.7 \pm 1.6^*$ 98.6 ± 3.7 103.7 ± 3.4 112.2 ± 2.5 $81.4 \pm 2.4^{**}$ **注: 与正常组 (细胞存活率为 100%) 比较, $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ 。由图 1 可知, 各抑制剂对 α -葡萄糖苷酶活力均有较好的抑制效果且呈明显的剂量依赖性。其中, 在 $0.2 \sim 2.0$ mg/mL 浓度范围内, Se-CPP 对 α -葡萄糖苷酶活力抑制效果明显优于 CPP、CPP + 硒酵母、CPP + 亚硒酸钠复配物。在 $0.2 \sim 4.0$ mg/mL 浓度范围内, CPP 添加与 Se-CPP 同样硒剂量的硒酵母、亚硒酸钠后, 对 α -葡萄糖苷酶抑制活性没有明显影响, 因此, 向 CPP 人工添加微量硒, 并不能增强其对 α -葡萄糖苷酶活力的抑制活性。根据各抑制剂对 α -葡萄糖苷酶的 IC₅₀ (如表 2), 确定各抑制剂抑制活性强弱顺序为: Se-CPP > CPP + 亚硒酸钠 > CPP > CPP + 硒酵母 > 阿卡波糖。

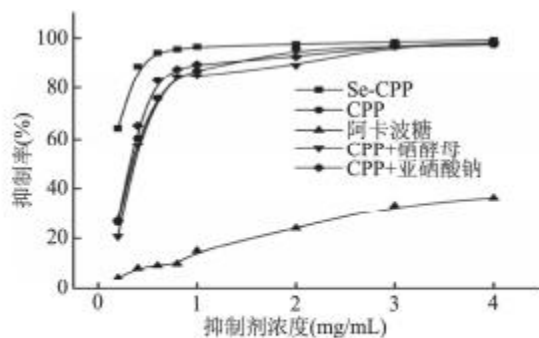


图 1 样品对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用
Fig1 Inhibition effect of samples on α -glucosidase

有研究表明, α -葡萄糖苷酶抑制剂主要通过竞争性地与酶催化位点结合来抑制底物的分解, 从而降低机体餐后血糖 [17]。Se-CPP 对 α -葡萄糖苷酶抑制作用类型尚未明确, 还有待研究。Se-CPP 对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性明显强于 CPP, 可能是因为青钱柳多糖与硒元素结合后化学结构发生变化, 生物活性有所提高, 其中详细作用机制还有待后期深入研究。同时, 我们前期研究发现, Se - CPP 可明显降低糖尿病小鼠餐后血糖, 效果优于 CPP,

原因可能与 Se - CPP 具有更好的 α - 葡萄糖苷酶抑制活性有关。向 CPP 添加与 Se - CPP 同样剂量硒元素对 α - 葡萄糖苷酶抑制活性未见明显变化。

2.2 Se - CPP 对 HepG2 细胞存活率及葡萄糖消耗的影响

2.2.1 MTT 实验

由表 3 可知, Se - CPP 各剂量组细胞存活率均低于正常组,且当 Se - CPP 浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,差异具有显著性 ($p < 0.05$),表明 Se - CPP 对 HepG2 细胞生长具有微弱的抑制作用, HepG2 细胞存活率随 Se - CPP 浓度的升高有所降低,原因可能与硒的 U 型剂量曲线有关,当剂量过高或过低时,生物活性反而降低 [18 - 19]。CPP、CPP + 硒酵母、CPP + 亚硒酸钠各剂量组 HepG2 细胞存活率与正常组比较,差异无显著性。盐酸二甲双胍各剂量组细胞存活率均低于正常组($p < 0.01$),且具有明显的浓度依赖性,提示盐酸二甲双胍对 HepG2 细胞生长具有较强的抑制作用,此结果与相关文献报道相符 [20 - 21]。

2.2.2 Se - CPP 对 HepG2 葡萄糖消耗的影响

HepG2 细胞葡萄糖消耗实验结果如表 4 所示, Se - CPP 各剂量组均能显著促进 HepG2 细胞对葡萄糖的消耗($p < 0.01$ 或 $p < 0.05$),但不具备明显的浓度依赖性,具体原因还有待深入研究。当 CPP 浓度为 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,可显著提高 HepG2 细胞葡萄糖消耗量。CPP 添加微量硒酵母或亚硒酸钠后, HepG2 细胞葡萄糖消耗量有所提高,但与正常组比较差异无显著性。阳性对照盐酸二甲双胍各剂量组均能显著促进 HepG2 细胞对葡萄糖的消耗($p < 0.01$)且具有明显的浓度依赖性。胰岛素抵抗指胰岛素作用的靶组织或细胞对胰岛素敏感性降低,胰岛素促进靶组织细胞摄取利用葡萄糖、抑制糖原水解的能力降低 [22]。IR 的发生机制及药物改善 IR 的研究工作对于降血糖药物筛选与作用机制研究具有重要意义。肝脏是机体摄取利用葡萄糖的重要器官,肝细胞可将葡萄糖转化成肝糖原进行储存,从而维持机体血糖处于正常水平 [23]。HepG2 细胞源于人肝胚胎瘤细胞,是一种表型与肝细胞极为相似的细胞株,保留了肝细胞的许多生物

表2 各样品对 α -葡萄糖苷酶的半抑制浓度Table 2 50% Inhibitory concentration of samples to α -glucosidase

样品	Se-CPP	CPP	阿卡波糖	CPP + 硒酵母	CPP + 亚硒酸钠
IC ₅₀ (mg/mL)	0.054	0.401	4.504	0.467	0.339

表3 HepG2 细胞存活率测定结果比较 (n = 6)

Table 3 Comparing of cell viability of HepG2 cells (n = 6)

浓度 (μ g/mL)	细胞存活率 (%)				
	Se-CPP	CPP	CPP + 硒酵母	CPP + 亚硒酸钠	盐酸二甲双胍
400	97.3 \pm 2.0	95.6 \pm 7.9	111.2 \pm 2.0	106.6 \pm 4.0	58.3 \pm 0.4**
200	92.8 \pm 3.6	108.3 \pm 2.9	94.7 \pm 3.5	100.9 \pm 1.3	65.2 \pm 1.7**
100	85.7 \pm 1.6*	98.6 \pm 3.7	103.7 \pm 3.4	112.2 \pm 2.5	81.4 \pm 2.4**

注:与正常组(细胞存活率为100%)比较,* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 。

表4 HepG2 细胞及 IR-HepG2 细胞葡萄糖消耗量比较 (n = 6)

Table 4 Comparison of glucose consumption of HepG2 cells and IR-HepG2 cells (n = 6)

组别	浓度 (μ g/mL)	葡萄糖消耗量 (mmol/L)	
		HepG2 细胞	IR-HepG2 细胞
正常组	-	1.07 \pm 0.09	2.44 \pm 0.19
IR 模型组	-	-	1.83 \pm 0.11*
Se-CPP	400	2.25 \pm 0.09**	2.28 \pm 0.16*
	200	1.59 \pm 0.07*	2.10 \pm 0.16*
	100	1.77 \pm 0.07**	1.96 \pm 0.26
CPP	400	1.73 \pm 0.05**	1.99 \pm 0.15
	200	1.13 \pm 0.20	1.95 \pm 0.22
	100	1.19 \pm 0.13	1.68 \pm 0.29*
CPP + 硒酵母	400	1.42 \pm 0.07	1.60 \pm 0.44*
	200	1.52 \pm 0.06	1.65 \pm 0.48*
	100	1.20 \pm 0.11	1.76 \pm 0.34*
CPP + 亚硒酸钠	400	1.42 \pm 0.16	1.88 \pm 0.15
	200	1.42 \pm 0.08	1.83 \pm 0.55
	100	1.50 \pm 0.10	1.90 \pm 0.22
盐酸二甲双胍	400	4.07 \pm 0.03**	2.60 \pm 0.32**
	200	3.79 \pm 0.06**	2.30 \pm 0.25*
	100	2.72 \pm 0.15**	1.76 \pm 0.20*

注:与正常组比较,* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$;与 IR 模型组比较,* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 。

学特性,是目前应用较广的研究 IR 的细胞模型。在高浓度胰岛素或葡萄糖作用下,HepG2 细胞表面胰岛素受体数量降低,产生 IR [24-25]。采用高浓度葡萄糖和胰岛素处理后,HepG2 细胞葡萄糖消耗量显著降低($p < 0.05$),表明 IR 模型建立成功。与 IR 模型

组比较, Se— CPP 各剂量组均能提高 IR—HepG2 细胞葡萄糖消耗量, 且浓度为 400 和 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时差异具有显著性 ($p < 0.05$)。CPP 浓度为 400 和 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 可提高 IR—HepG2 细胞葡萄糖消耗量, 但与模型组比较, 差异无显著性 ($p > 0.05$)。CPP 添加微量硒酵母或亚硒酸钠后, 对 IR—HepG2 细胞葡萄糖消耗量没有明显影响。盐酸二甲双胍浓度为 400 和 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 可显著提高 IR—HepG2 细胞葡萄糖消耗量 ($p < 0.05$ 或 $p < 0.01$)。3 结论本文结果表明, 适宜浓度的 Se—CPP 可以显著抑制 α —葡萄糖苷酶活性, 可促进 HepG2 细胞对葡萄糖的摄取利用, 改善 HepG2 细胞胰岛素抵抗, 效果优于 CPP。CPP 添加微量硒后, 对 HepG2 细胞和 IR—HepG2 细胞葡萄糖的消耗未见明显影响。Se—CPP 抑制 α —葡萄糖苷酶活性及改善 HepG2 细胞胰岛素抵抗的详细作用机制还有待深入研究。

参考文献 [1] 谢明勇, 谢建华. 青钱柳研究进展 [J]. 食品与生物技术学报, 2008, 27(1) : 113—121. [2] Xie J H, Shen M Y, Nie S P, et al. Analysis of monosaccharide composition of Cyclocarya paliurus polysaccharide with anion exchange chromatography [J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 98: 976—981. [3] Xie J H, Dong C J, Nie S P, et al. Extraction, chemical composition and antioxidant activity of flavonoids from Cyclocarya paliurus (Batal.) Iljinskaja leaves [J]. Food Chemistry, 2015, 186: 97—105. [4] Xie J H, Liu X, Shen M Y, et al. Purification, physicochemical characterisation and anticancer activity of a polysaccharide from Cyclocarya paliurus leaves [J]. Food Chemistry, 2013, 136: 1453—1460. [5] Mao G H, Ren Y, Li Q, et al. Anti—tumor and immunomodulatory activity of selenium (Se) — polysaccharide from Se — enriched Grifola frondosa [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 82: 607—613. [6] Haque M M, Moghal M R, Sarwar M S, et al. Low serum selenium concentration is associated with preeclampsia in pregnant women from Bangladesh [J]. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 2016, 33: 21—25. [7] Wang Y, Chen J, Zhang D, et al. Tumoricidal effects of a selenium (Se) — polysaccharide from Ziyang green tea on

human osteosarcoma U-2 OS cells [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2013, 98 (1) : 1186-1190. [8]

Meng M, Cheng D, Han L, et al. Isolation, purification, structural analysis and immunostimulatory activity of water - soluble polysaccharides from *Grifola frondosa* fruiting body[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2017, 157: 1134-1143. [9] 吕萌, 陈伟鸿, 许琦, 等. 有机富硒肥对青钱柳叶中硒、微量元素及功效成分的影响 [J]. *农学学报*, 2016, 6(5) : 39-42. [10] 谢建华, 谢明勇, 聂少平, 等. 青钱柳多糖提取工艺的研究 [J]. *食品科学*, 2007, 28(10) : 188-191. [11] 高建忠, 秦顺义, 黄克和. 氢化物发生-原子荧光光谱法测定富硒酵母中的有机硒和无机硒 [J]. *分析科学学报*, 2006, 22 (2) : 157-160. [12] 董义, 王斯慧, 曾里, 等. 六种保健食品原料的辅助降血糖功效研究 [J]. *食品研究与开发*, 2014(23) : 121-124. [13] Adefegha S A, Oboh G, Omojokun O S, et al. In vitro antioxidant activities of African birch (*Anogeissus leiocarpus*) leaf and its effect on the α -amylase and α -glucosidase inhibitory properties of acarbose [J]. *Journal of Taibah University Medical Sciences*, 2016, 11(3) : 236-242. [14] 汤彬, 薛平, 李祥, 等. 南方红豆杉多糖的含量测定及体外降血糖活性研究 [J]. *食品工业科技*, 2013, 34(9) : 128-131. [15] Hwang Y P, Choi J H, Kim H G, et al. Saponins from *Platycodon grandiflorum* inhibit hepatic lipogenesis through induction of SIRT1 and activation of AMP - activated protein kinase in high - glucose - induced HepG2 cells [J]. *Food Chemistry*, 2013, 140(1-2) : 115-123. [16] 戴甜甜, 沈建福. 油茶果壳提取物及分级相对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用 [J]. *食品科学*, 2011, 32(9) : 107-110. [17] 张红城, 孙庆申, 王光新, 等. 蜂胶乙醇提取物对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用 [J]. *食品科学*, 2011, 32(5) : 108-110.

科技, 2011(8) : 196-201. [4] 臧茜茜, 邓乾春, 从仁怀, 等. 沙棘油功效成分及药理功能研究进展 [J]. *中国油脂*, 2015, 40(5) : 76-81. [5] Ali H. Nitrogen fixation by non leguminous plant seabuckthorn in semi arid climatic conditions of Gilgit - Baltistan [J]. *Pakistan Journal of Weed Science Research*, 2013, 19(4) : 305-314. [6] 陈云明, 刘国彬, 侯喜录. 黄土丘陵半干旱区人工沙棘林水土保持和土壤水分生

态效益分析 [J].应用生态学报, 2002, 13(11) : 1389—1393. [7] Alexandrakis Z, Kyriakopoulou K, Katsaros G, et al. Selection of process conditions for high pressure pasteurization of seabuckthorn juice retaining high antioxidant activity [J]. Food and Bioprocess Technology, 2014, 7(11) : 3226—3234. [8] 范兆军, 牛广财, 朱丹, 等. 响应面法优化沙棘果酒发酵条件的研究 [J]. 食品与机械, 2009, 25(1) : 58—62. [9] Ting H C, Hsu Y W, Tsai C F, et al. The in vitro, and in vivo, antioxidant properties of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) seed oil [J]. Food Chemistry, 2011, 125(2) : 652—659. [10] Jolivet P, Bergeron E, Zimierski A, et al. Metabolism of elemental sulphur and oxidation of sulphite by wheat and spinach chloroplasts [J]. Phytochemistry, 1995, 38(1) : 9—14. [11] 黄国平, 姚玉静, 陈黎斌. 叶绿体脱除亚硫酸盐效果研究 [J]. 食品科学, 2010, 31(4) : 21—23. [12] 王向丽, 丁力, 黄国平, 等. 叶绿体催化脱除二氧化硫的研究 [J]. 现代食品科技, 2009, 25(10) : 1140—1143. [13] 黄国平, 王向丽, 胡飞. 叶绿体的提取方法与其脱除二氧化硫的活性 [J]. 食品科技, 2011(7) : 211—214. [14] 任家荣, 刘霁欣, 李瑞年, 等. 气体放电法氧化高浓度亚硫酸盐 [J]. 物理化学学报, 2004, 20(6) : 656—658. [15] Covello P S, Thompson J E. Spin trapping evidence for formation of the sulfite radical anion during chloroplast-mediated oxidation of bisulfite ion [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) — General Subjects, 1985, 843(1—2) : 150—154. [16] Bharali B, Bates J W. Detoxification of dissolved SO₂ (Bisulfite) by Terricolous Mosses [J]. Annals of Botany, 2006, 97(2) : 257—263. [17] Li B, Xing D, Zhang L. Involvement of NADPH oxidase in sulfur dioxide — induced oxidative stress in plant cells [J]. Photochemical and Photobiological Sciences, 2007, 6(6) : 628—634. [18] 李永裕, 潘腾飞, 余东, 等. 模拟酸雨对龙眼叶片 PS II 反应中心和自由基代谢的影响 [J]. 生态学报, 2012, 32(24) : 7866—7873. [19] Lin S C, Georgiou. A biocatalyst for the removal of sulfite from alcoholic beverages [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2005, 89(1) : 123—127. [20] 黄国平, 刘岩, 陈黎斌. 叶绿体清除白葡萄酒中二氧化硫效果研究 [J]. 安徽农业科学, 2013(2) : 804—806. [21] 金争平, 温秀凤, 张吉科. 沙棘叶生理年龄与源库功能转化的关系 [J]. 国际沙棘研究与开发, 2012, 10(2) : 22—27. [22] Rowe

J D, Harbertson J F, Osborne J P, et al. Systematic identification of yeast proteins extracted into model wine during aging on the yeast lees [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 58(4) : 2337—2346. [23] 李华.葡萄酒工艺学 [M].北京: 科学出版社, 2007. [24] 中华人民共和国质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会.GB/T 15038—2006 葡萄酒、果酒通用分析方法 [S].北京: 中国标准出版社, 2007. [25] 李华.葡萄酒品尝学 [M].北京: 科学出版社, 2006. [26] 中华人民共和国质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会.GB 15037—2006 葡萄酒 [S].北京: 中国标准出版社, 2007. [27] 卫瑾, 汤小仪, 李有则.乙醇对菠菜叶绿体的光合作用的影响 [J].*植物生理学报*, 1982(2) : 51—57. [28] 韩俊华, 周君一, 牛天贵, 等.乙醇对鲜切西兰花抗氧化酶及叶绿体超微结构的影响 [J].*食品科学*, 2008, 29(3) : 283—287. [29] 周文彬, 邱保胜.植物细胞内 pH 的测定 [J].*植物生理学报*, 2004, 40(6) : 724—728. [30] 焦雨歆, 赵琦, 王雪英, 等.环境因子对植物叶绿体结构的影响 [J].*生物技术通报*, 2008(2) : 5—10. [31] 黎明, 杨芳绒, 商卫卫.低温对宜昌润楠生理指标及叶片超微结构的影响 [J].*西北林学院学报*, 2010, 25(4) : 19—22. [32] 王荣, 杜红波, 秦艳芬, 等.两种亚硫酸氢盐对“红富士”叶片光合色素含量的影响及其原因探析 [J].*昭通学院学报*, 2013(5) .

[18] 让欧艳, 让蔚清.低剂量兴奋效应及其医学应用 [J].*实用预防医学*, 2009, 16(1) : 300—303. [19] Harding L E. Non — linear uptake and hormesis effects of selenium in red — winged blackbirds (*Agelaius phoeniceus*) [J]. *Science of the Total Environment*, 2008, 389(2—3) : 350—366. [20] Kumar C S, Raja M D, Sundar D S, et al. Hyaluronic acid co — functionalized gold nanoparticle complex for the targeted delivery of metformin in the treatment of liver cancer (HepG2 cells) [J].*Carbohydrate Polymers*, 2015, 128: 63—74. [21] 彭晓初, 刘燕, 邹大进.二甲双胍对人肝癌细胞 HepG2 增殖及乙酰辅酶 A 羧化酶影响的实验研究 [J].*临床肿瘤学杂志*, 2015, 20(3) : 203—207. [22] 张晓英, 王鹏翔, 张致英, 等.红景天苷改善胰岛素抵抗 HepG2 细胞糖代谢及分子机制初探 [J].*中药药理与临床*, 2014(1) : 28—31. [23] 盛军庆, 章常华, 涂秀英, 等.葛根素对 HepG2 细胞胰岛素抵抗状态的改善作用 [J].*时珍国医国药*, 2014(8) : 1831 —1833. [24] Gu J F, Zheng Z Y, Yuan J R, et al. Comparison on hypoglycemic

and antioxidant activities of the fresh and dried *Portulaca oleracea* L. in insulin-resistant HepG2 cells and streptozotocin-induced C57BL/6J diabetic mice [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2015, 161: 214-223. [25] 柳嘉, 郭孝萱, 吴薇, 等. 高糖高脂诱导胰岛素抵抗 HepG2 细胞模型的建立及活性成分的功能评价 [J]. *食品科技*, 2012(3): 73-78.