DOI:10.12441/spyswjs.20230913007 [文章编号] 1673-1689(2024)09-0153-10

苦荞多酚对HepG2细胞糖代谢功能的影响

田 晶[1] 弓玉红[1,2] 李 俊[2]

(1. 吕梁学院生物与食品工程系,山西 吕梁 033001; 2. 江南大学食品学院,江苏 无锡 214122)

摘要: 为了探究苦荞多酚对胰岛素抵抗HepG2细胞糖代谢功能的影响,作者采用葡萄糖胺(glucosamine,GluN)诱导HepG2细胞构建胰岛素抵抗模型,并通过纯化后的苦荞多酚干预,明确苦荞多酚对胰岛素抵抗的改善作用及其潜在作用机制。结果表明,苦荞多酚能显著改善胰岛素抵抗HepG2细胞的葡萄糖消耗水平,效果与阳性药物二甲双胍相当。在氧化应激方面,苦荞多酚能显著增强超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)、过氧化氢酶(catalase,CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase,GSH-Px)的酶活力,抑制脂质过氧化产物丙二醛产生,保护胰岛β细胞免受自由基损害。在糖异生途径中,苦荞多酚的干预使葡萄糖-6-磷酸酶(gluose-6-phosphatase,G-6-P)和磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(phosphoenolpyruvate carboxykinase,PEPCK)的酶活力降至模型组的24.56%和50.69%,同时调控G-6-P和PEPCK的*FOXO1*基因表达量,比模型组下调了49.66%。在糖原合成方面,苦荞多酚能促使胰岛素抵抗HepG2细胞糖原合成量增加了74.55%,同时能够显著下调*GSK-3β*基因的表达量。因此,苦荞多酚表现出良好的改善氧化应激和肝糖代谢能力。

关键词: 苦荞多酚;降血糖;HepG2细胞;胰岛素抵抗;糖代谢

Effects of Tartary Buckwheat Polyphenols on the Glucose Metabolism of HepG2 Cells

TIAN Jing[1] *GONG Yuhong*[1,2] *LI Jun*[2]

(1. Department of Biological and Food Engineering, Lyuliang University, Lyuliang 033001 China; 2. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: To investigate the effect of tartary buckwheat polyphenols on glucose metabolism in insulin resistant HepG2 cells, a model of IR was established by inducing HepG2 cells with glucosamine (GluN), then intervened with purified tartary buckwheat polyphenols to clarify the improvement effect and potential mechanism of tartary buckwheat polyphenols on insulin resistance. The results showed that tartary buckwheat polyphenols significantly improved the glucose consumption level of insulin resistant HepG2 cells, which was equivalent to the positive control drug, metformin. In terms of improving oxidative stress, tartary buckwheat polyphenols significantly enhanced the activities of antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GSH-Px), inhibited the production of malondialdehyde, and protected pancreatic β-cells from free radical damage. In the gluconeogenic pathway, the intervention of tartary buckwheat polyphenols resulted in a reduction to 24.56% and 50.69% of glucose-6-phosphatase (G-6-P) and phosphoenolpyruvate carboxyl kinase (PEPCK) activity, respectively, compared to the model group. Concurrently the expression of *FOXO1* gene, which regulates G-6-P and PEPCK, was down regulated by 49.66% compared to the model group. In terms of glycogen synthesis, tartary buckwheat polyphenols promoted a 74.55% increase in glycogen synthesis in insulin resistant HepG2 cells, while significantly downregulating *GSK-3β* gene expression. Overall, tartary buckwheat polyphenols showed a strong potential to improve oxidative stress and hepatic glucose metabolism.

Keywords: tartary buckwheat polyphenols; hypoglycemic; HepG2 cells; insulin resistance; glucose metabolism

---

基金项目: 山西省高等学校科技创新计划项目(2021L566);吕梁市科技计划项目(2023NYYF14)。

通信作者: 田晶(1987—),女,博士,教授,硕士研究生导师,主要从事食品营养与功能因子研究。E-mail:396462640@qq.com

收稿日期: 2023-09-13 **修回日期:** 2023-11-10

糖尿病作为一种慢性代谢性疾病，严重影响人们的身体健康和生活质量，已成为全球健康问题之一。2型糖尿病（Type 2 diabetes mellitus，T2DM患者是指有胰岛素抵抗症状，并且伴随着胰岛素分泌相对缺乏的人群，占糖尿病患者的90%以上[1]。肝脏是胰岛素的重要靶器官，对于T2DM患者，其肝脏胰岛素敏感性降低，容易发生糖代谢失调，常表现为糖异生作用增强和糖原分解量增加，最终导致高血糖和胰岛素抵抗症状。因此，改善肝糖代谢紊乱是减轻胰岛素抵抗的有效途径，通过调节胰岛素信号转导通路（如JNK/IRS-1、PI3K/AKT等）以及糖代谢相关酶（如G6Pase、PEPCK、GSK3β、GYS2等）的酶活力，可有效抑制糖异生和肝糖输出[2]。双胍类降糖药如二甲双胍可通过上述机制缓解肝细胞的胰岛素抵抗症状，但长期服用会引起呕吐、腹泻等副作用。一些多酚类物质如姜黄素[3]、金丝桃苷[4]等也可促进肝糖吸收利用及细胞内的糖原合成，减轻胰岛素抵抗症状，同时具有作用温和持久、副作用小等优势。

苦荞含有丰富的芦丁、槲皮素等多酚类成分，具有显著的降血糖作用，可作为天然来源的膳食补充剂应用于食品、保健品中，具有很好的开发前景[5]。Wang等[6]采用富含苦荞的杂粮粉干预高脂饮食小鼠，发现杂粮粉减轻了小鼠附睾和肾周脂肪的积累，改善了葡萄糖耐量，并降低了血清总胆固醇、甘油三酯和低密度脂蛋白胆固醇水平。Peng等[7]也证实了苦荞中的槲皮素能显著降低大鼠体质量、血清三酰甘油、低密度脂蛋白胆固醇、TNF-α和胰岛素含量，改善糖耐量，同时能够减少大鼠肝脏中脂肪的沉积，但对短链脂肪酸的产生几乎没有影响。目前，用于糖代谢功能研究的体内或体外模型较多，包括小鼠、大鼠、仓鼠以及来源于肝脏、脂肪和骨骼肌的胰岛素抵抗细胞株[8]。HepG2细胞因其操作方便以及良好的生物学特性被广泛用于氧化应激损伤、糖代谢、脂质代谢、抗炎等功能评价[9]。但关于苦荞多酚对HepG2细胞的糖代谢影响及其机制仍有待进一步探讨。因此，作者研究了苦荞多酚对胰岛素抵抗HepG2细胞的改善作用，明确苦荞的降血糖功效。考察苦荞多酚干预对胰岛素抵抗HepG2细胞糖原合成量、糖异生限速酶的酶活力以及胰岛素信号通路关键基因等的影响，旨在从分子水平上阐释苦荞多酚对肝糖代谢和胰岛素抵抗的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

苦荞全粉：贵州省威宁县东方神谷有限责任公司，用石磨去壳，粉碎机粉碎，过80目网筛；HepG2细胞：中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心；二甲双胍、芦丁、槲皮素、山柰酚-3-O-芸香糖苷、山柰酚、水仙苷、金丝桃苷（纯度≥98%）：上海源叶生物科技有限责任公司；亚硝酸钠、氯化铝、氢氧化钠、乙酸：分析纯，国药集团化学试剂有限公司；磷酸盐缓冲液（phosphate buffered saline，PBS）：北京兰杰柯科技有限公司；DMEM高糖培养基、青霉素-链霉素溶液和胰蛋白酶（含质量分数0.25%的EDTA）：美国Gibco公司；胎牛血清（Fetal bovine serum，FBS）：美国Hyclone公司；D101大孔树脂：上海弘顺生物科技有限公司；葡萄糖检测试剂盒：南京建成生物工程研究所；葡萄糖-6-磷酸酶（G-6-P）检测试剂盒：上海酶联生物科技有限公司；DMSO、糖原含量检测试剂盒、PEPCK检测试剂盒：北京索莱宝科技有限公司；RNase Free dH_2O、SYBR Green Realtime PCR Master Mix、GluN、WST-1细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒、Ripa细胞裂解液、BCA蛋白质含量测定试剂盒：上海碧云天生物技术股份有限公司；RNA提取试剂盒和qScript™cDNA合成试剂盒：江苏康为世纪生物科技股份有限公司。

1.2 主要设备

高效液相色谱仪：LC-20AT型，日本岛津公司；紫外可见分光光度计：L8型，上海仪电分析仪器有限公司；磁力搅拌器：RW20型，德国IKA公司；旋转蒸发器：RV8型，德国IKA公司；冷冻干燥机：Alpha™ 1-2 LDplus型，德国Christ公司；酶标仪：M5型，美国Molecular Devices公司；实时荧光定量PCR仪：Bio-Rad Q200型，美国伯乐公司；超低温冰箱：TSX400型，美国Thermo Fisher公司；生化培养箱：SPX-250型，上海跃进医疗仪器有限公司；离心机：CenLee16R型，湖南湘立科学仪器有限公司；倒置显微镜：Axio Observer A1型，德国蔡司公司；超微量分光光度计：NanoDrop OneC型，赛默飞世尔（上海）仪器有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 苦荞多酚的提取、纯化与鉴定

1）苦荞多酚的提取：准确称取苦荞全粉1 g，

加入体积分数80%的甲醇溶液20 mL，超声提取15 min，功率80 W，然后在10 000 r/min下离心15 min，取上清液。重复提取3次，合并上清液，于−20 ℃冰箱里密封避光保存。

2）苦荞多酚的纯化：参考Yu等[10]的方法使用D101大孔树脂纯化苦荞多酚。提取液以1.5 mL/min的流量加载到填充柱（2 cm×30 cm）中，用蒸馏水洗至洗脱液无色，然后用体积分数70%的乙醇以1.5 mL/min的流量对大孔树脂中的多酚进行解吸。收集洗脱液，在50 ℃条件下旋蒸。最后，将浓缩后的洗脱液用真空冷冻干燥机干燥，并在−4 ℃的密封容器中保存。

3）苦荞多酚的鉴定：参考Li等[11]的方法采用氯化铝比色法测定总黄酮质量分数。将1 mL提取物（溶于体积分数70%的乙醇中）或芦丁标准溶液（0.05~0.50 mg/mL）与0.3 mL质量分数5%的亚硝酸钠混合，反应5 min。然后，将0.3 mL质量分数10%氯化铝添加到试管中，反应6 min。然后，加入4 mL的1 mol/L氢氧化钠混合均匀，补足蒸馏水使最终体积为10 mL。混合物在室温下反应12 min，用紫外可见分光光度计在510 nm下测定溶液的吸光度[11]。外标法定量，标准曲线为y=1.155 8x+0.003 8，R^2=0.999 5。

参考Li等[11]的方法使用高效液相色谱仪并配备紫外检测器测定单体酚质量分数。色谱柱为GL Sciences Inertsil ODS-SP C18反相分析柱（4.6 mm×250 mm×3 μm）。流动相为：溶剂A（含体积分数0.1%乙酸的水），溶剂B（含体积分数0.1%乙酸的乙腈）。梯度洗脱条件：0~5 min，7%~30% B；5~12 min，30%~40% B；12~16 min，40%~100% B；16~17 min，100%~7% B；17~22 min，7% B。波长280 nm，流量0.8 mL/min，柱温30 ℃，进样量20 μL。采用外标法定量。

1.3.2　细胞复苏、培养及传代

细胞复苏，培养及传代参照Wang等[12]的方法。冻存的HepG2细胞贮存于−80 ℃冰箱，取出后立即置于37 ℃的水浴锅中解冻，解冻后以1 000 r/min离心5 min。将细胞冻存液吸出，加入5 mL的DMEM完全培养基（含有体积分数10%的FBS和体积分数1%的青霉素-链霉素溶液），反复吹打形成细胞悬浮液。之后将细胞悬浮液全部吸出转移到培养瓶内，做好标识后置于细胞培养箱（37 ℃、体积分数5% CO_2）中培养。使用倒置显微镜进行细胞形态的观测，当细胞生长至最佳传代时期，吸净细胞培养基上清液，用PBS冲洗2次，加入1 mL胰蛋白酶（625 U/mL），当观察到大部分细胞呈现悬浮状态时，加入5 mL完全培养基终止消化，将细胞悬浮液分装至2~3个培养瓶中并补充适量完全培养基进行传代。

1.3.3　胰岛素抵抗HepG2细胞模型的建立

对数生长期的HepG2细胞经过胰蛋白酶消化后，加入完全培养基，以每孔100 μL（细胞密度1×10^5个/mL）接种于96孔板，试验分为空白组（不加入诱导剂GluN）和模型组（加入诱导剂GluN）。待细胞贴壁后，吸出上清液，用PBS清洗细胞2次，弃去上清液，空白组加入不含GluN的完全培养基，模型组加入含18 mmol/L的GluN完全培养基[13]，将不同处理组放入细胞培养箱内分别诱导细胞36 h。按照以上方法处理细胞后，按照葡萄糖测定试剂盒说明书，检测葡萄糖消耗量[14]。

1.3.4　细胞存活率测定

使用水溶性四唑盐（water-soluble tetrazolium salt，WST）法[15]评价不同化合物对HepG2细胞存活率的影响，确定苦荞多酚和二甲双胍的最适处理质量浓度。将胰蛋白酶消化后的HepG2细胞悬液（细胞密度1×10^5个/mL）以每孔100 μL接种于96孔板，继续培养至对数生长期。吸净培养基，每孔加入100 μL含不同浓度（32.5~500.0 μmol/L）化合物，分别处理HepG2细胞和GluN诱导的胰岛素抵抗HepG2细胞24 h。按照WST-1细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒说明书测试细胞存活率，空白组以完全培养基替代不同质量浓度化合物，存活率计为100%。

1.3.5　苦荞降血糖因子胰岛素抵抗改善能力评价

采用1.3.3的方法最终获得胰岛素抵抗模型组后，分别设置空白组、模型组以及不同质量浓度的药物处理组，每孔以100 μL接种在96孔板中。待细胞贴壁后，吸出上清液，用PBS清洗细胞2次，弃去上清液。结合1.3.4细胞存活率试验的结果，确定药物的最适质量浓度，按照下述方法继续培养细胞36 h，按照葡萄糖测定试剂盒测定葡萄糖消耗量。

1）空白组：正常细胞，加入100 μL完全培养基。

2）模型组：胰岛素抵抗HepG2细胞。

3）二甲双胍组（阳性对照）：胰岛素抵抗

HepG2 细胞，分别加入含 32.5 μg/mL（二甲双胍组-低）、125.0 μg/mL（二甲双胍组-中）、500.0 μg/mL（二甲双胍组-高）二甲双胍的完全培养基。

4）苦荞多酚组：胰岛素抵抗 HepG2 细胞，分别加入含 32.5 μg/mL（苦荞多酚组-低）、125.0 μg/mL（苦荞多酚组-中）、500.0 μg/mL（苦荞多酚组-高）苦荞多酚的完全培养基。

1.3.6 HepG2 细胞糖原浓度的测定

研究了苦荞多酚对 HepG2 细胞糖原合成的影响。试验分为空白组、模型组以及苦荞多酚组，其中，空白组为不含 GluN 的处理组。其余处理组均采用 1.3.3 的方法构建胰岛素抵抗模型。HepG2 细胞的给药质量浓度设置为低、中、高剂量组，分别为 32.5、125.0、500.0 μg/mL，二甲双胍（500.0 μg/mL）为阳性对照。HepG2 细胞悬液（细胞密度 1×10^5 个/mL）以每孔 100 μL 接种于 96 孔板，继续培养至对数生长期。吸净培养基后给药处理 36 h，前处理完毕后，参照糖原检测试剂盒进行 HepG2 细胞糖原浓度的测定。

1.3.7 细胞生化指标的测定

HepG2 细胞不同处理组的设置与 1.3.5 相同。分别用 PEPCK 检测试剂盒和 G-6-P 检测试剂盒测定细胞样品中的 PEPCK 和 G-6-P 的酶活力。参考相应试剂盒说明书测定 SOD、CAT、GSH-Px 的酶活力及丙二醛（malondialdehyde，MDA）质量摩尔浓度。

1.3.8 肝糖代谢相关基因表达

1）总 RNA 的提取：细胞分组及处理同 1.3.5。使用 RNA 提取试剂盒提取不同 HepG2 细胞处理样本的总 RNA。RNA 提取液通过 NanoDrop 超微量分光光度计进行纯度检测。当 A_{260}/A_{280} 处于 1.8~2.0 时，认为 RNA 纯度达到要求，可进行后续试验。

2）逆转录反应：按照 qScript™cDNA 合成试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA。

3）实时荧光定量聚合酶链式（real-time quantitative polymerase chain reaction，RT-qPCR）分析：于冰上配制反应混合液，混合液由 2.0 μL cDNA 模板、10.0 μL SYBR Green Supermix、上游和下游引物各 0.4 μL、7.2 μL 无酶水组成，配制完毕后转移至 PCR 八联管中。上下游引物信息见表 1[16]。PCR 扩增分析程序设置如下：95 ℃预变性 2 min，95 ℃变性 10 s，60 ℃退火 30 s，共 40 个循环，测定各个处理组细胞中各基因的 C_t 值，并以 *β-actin* 基因为内参，以公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算待测基因的 mRNA 相对表达倍数。

1.3.9 数据分析

数据表示为均值±标准偏差（n=3）。用 SPSS 软件对样品进行相关性和方差分析（ANOVA），利用 Duncan 多范围测试来确定多组样本间的差异显著性（$P<0.05$）。

表 1 PCR 引物序列信息

Table 1 PCR primer sequence information

基因	上游引物（5′—3′）	下游引物（5′—3′）
β-actin	TCATGAAGTGTGACGTGGACATC	CAGGAGGAGCAATGATCTTGATCT
G6Pase	GTGGTGCGAGCAGCCAGAATG	CCAAAGAGCGTGCCCAGAATG
PEPCK	GGCTGAGAATACTGCCACACT	ACCGTCTTGCTCTCTACTCGT
FOXO1	TTCACCCAGCCCAAACTAGC	GAGTCCAGGCGCACAGTTAT
GYS2	TGAAGTTGCTTGGGAAGTGAC	CCGATGGCAGATTCCAAAGG
GSK-3β	AGACGCTCCCTGTGATTTATGT	CCGATGGCAGATTCCAAAGG

2 结果与讨论

2.1 纯化后苦荞多酚的组成

对纯化后苦荞多酚提取物进行定量分析，结果见表 2。苦荞多酚主要由芦丁、槲皮素、山柰酚-3-O-芸香糖苷、山柰酚、水仙苷、金丝桃苷等黄酮类物质组成。其中芦丁为最主要的成分，达 486.39 mg/g，其次是槲皮素（215.17 mg/g）。苦荞多酚的组成已经被广泛报道[5,11]，芦丁作为苦荞中最主要的酚类物质，已经成为苦荞加工产品的重要“标签”。槲皮素作为芦丁去糖基化后的主要产物，也是芦丁的主要衍生物。同时，纯化后苦荞多酚的总黄酮质量分数达 705.19 mg/g，说明 D101 大孔树脂能够有效富集苦荞多酚组分。纯化后的苦荞多酚纯度较高，可用于进一步的细胞试验。

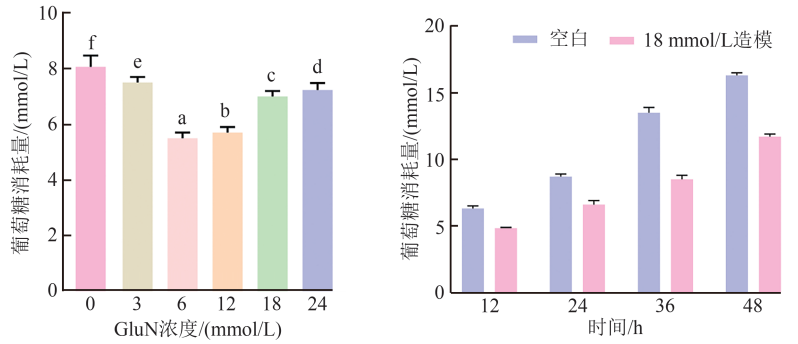
表2　纯化后苦荞多酚提取物中总黄酮和主要单体酚质量分数

Table 2　Mass fraction of total flavonoids and major monomeric phenolic in the purified extract of tartary buckwheat polyphenols

物质	质量分数/(mg/g)
芦丁	486.39±10.26
槲皮素	215.17±6.38
山柰酚-3-O-芸香糖苷	32.15±2.04
山柰酚	8.27±0.95
水仙苷	1.15±0.42
金丝桃苷	7.62±1.58
总黄酮	705.19±22.47

2.2　胰岛素抵抗HepG2细胞模型的建立

细胞经过一段时间的培养，培养基上清液中葡萄糖的浓度和培养基本身葡萄糖浓度的差值为葡萄糖消耗量，即细胞对葡萄糖利用的能力。胰岛素抵抗细胞利用生长环境中葡萄糖的能力下降，最直观表现为葡萄糖消耗量的降低[17]。对比空白组，当HepG2细胞的培养基添加18 mmol/L的GluN时，葡萄糖消耗量显著降低，降低率达到21.49%，见图1(a)。Zhang等[18]在构建胰岛素抵抗模型时，通过18 mmol/L的GluN成功诱导得到胰岛素抵抗HepG2细胞。因此，选择浓度为18 mmol/L的GluN对HepG2细胞进行诱导。随着诱导时间的增加，模型组与空白组之间葡萄糖消耗量的差距逐渐增大，在18 mmol/L的GluN诱导36 h时，下降率达到36.65%，下降明显，见图1(b)。



不同字母代表差异显著(P<0.05)。

(a) 不同浓度GluN对细胞葡萄糖消耗量的影响　(b) 诱导时间对细胞葡萄糖消耗量的影响

图1　GluN诱导HepG2细胞胰岛素抵抗模型

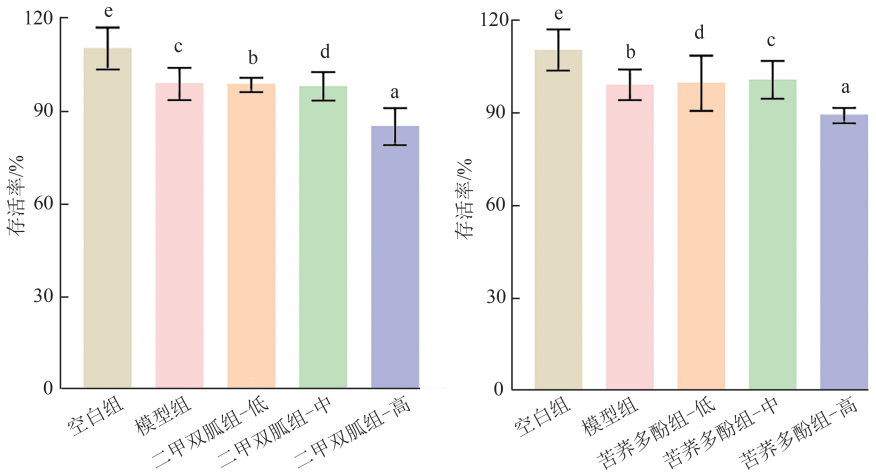
Fig. 1　GluN-induced insulin resistance model of HepG2 cell model

2.3　安全剂量的确定

为明确苦荞多酚对HepG2细胞的安全剂量范围，将苦荞多酚的质量浓度设置为32.5~500.0 μg/mL，分别处理HepG2细胞和GluN诱导的胰岛素抵抗HepG2细胞[19]。从图2可以看出，在32.5~500.0 μg/mL的条件下，苦荞多酚和二甲双胍直接作用HepG2细胞时，细胞存活率均大于80%。随着二甲双胍和苦荞多酚的质量浓度逐渐升高，细胞存活率呈下降趋势。当质量浓度低于125.0 μg/mL时，细胞存活率基本保持在90%以上。因此，为确保不超过安全剂量及剂量的有效性，苦荞多酚和二甲双胍质量浓度范围为32.5~125.0 μg/mL。

2.4　苦荞多酚对HepG2细胞胰岛素抵抗的改善作用

当细胞对葡萄糖消耗量增加时，血糖浓度降低，胰岛素抵抗细胞由于对葡萄糖的利用效率较低，因此葡萄糖消耗量普遍偏低，会造成机体高血糖症状[20-21]。如图3所示，HepG2细胞经18 mmol/L的GluN处理后，模型组细胞的葡萄糖消耗量显著低于空白组(P<0.05)，说明模型组造模成功。此外，苦荞多酚和二甲双胍均能显著改善胰岛素抵抗HepG2细胞的葡萄糖消耗水平(P<0.05)。随着化合物质量浓度的增加，相应的葡萄糖消耗量也呈剂量依赖性增加，见图3(a)~(b)。作为主要的降血糖药物，二甲双胍组的葡萄糖消耗量随质量浓度增加而提高。当给药质量浓度为500.0 μg/mL时，葡萄糖消耗量为7.7 mmol/L。苦荞多酚最大质量浓度处理组(500.0 μg/mL)中葡萄糖消耗量为模型组的1.59倍。苦荞多酚在质量浓度为32.5 μg/mL和125.0 μg/mL时，葡萄糖消耗量分别是模型组的1.16倍和1.04倍。比较特定质量浓度(125.0 μg/mL)的

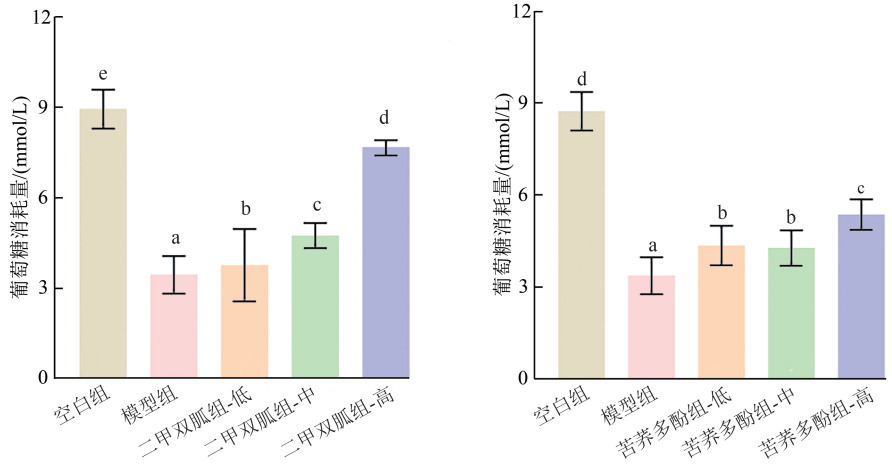


不同字母表示不同处理组的差异显著(P<0.05)。
(a) 不同浓度二甲双胍对细胞存活率的影响

不同字母表示不同处理组的差异显著(P<0.05)。
(b) 不同浓度苦荞多酚对细胞存活率的影响

图 2　HepG2 细胞存活率的变化

Fig. 2　Changes in viability of HepG2 cells



不同字母表示不同处理组的差异显著(P<0.05)。
(a) 二甲双胍对细胞葡萄糖消耗量的影响

不同字母表示不同处理组的差异显著(P<0.05)。
(b) 苦荞多酚细胞葡萄糖消耗量的影响

图 3　HepG2 细胞葡萄糖消耗量的变化

Fig. 3　Changes in glucose consumption of HepG2 cells

苦荞多酚和二甲双胍处理后葡萄糖消耗量可发现，苦荞多酚的葡萄糖消耗量与传统降糖药物二甲双胍相当，说明苦荞多酚可通过增强肝细胞的葡萄糖利用能力来增加葡萄糖消耗量，从而改善胰岛素抵抗症状[13]。因此，重点研究苦荞多酚对 HepG2 细胞的糖原合成和糖异生作用的改善作用。

2.5　苦荞多酚对 HepG2 细胞氧化应激的影响

胰岛素由胰岛 β 细胞分泌，而胰岛 β 细胞极易受自由基损害。细胞内 SOD、CAT、GSH-Px 等抗氧化酶能有效清除自由基，阻止脂质过氧化产物 MDA 产生，是评价抗氧化能力的重要指标[22]。多酚能有效增强抗氧化酶的酶活力，保护胰岛 β 细胞免受自由基损害，从而促进胰岛素分泌，达到降血糖的目的[11]。与空白组相比，模型组的 SOD、CAT 和 GSH-Px 的酶活力均显著降低（P<0.05），MDA 质量摩尔浓度显著增加（P<0.05），表明链脲佐菌素（streptozotocin，STZ）的注射会打破 HepG2 细胞内的抗氧化系统平衡，对细胞造成氧化损伤[23]，见图 4。苦荞多酚和二甲双胍干预处理对受损细胞内 SOD、CAT、GSH-Px 和 MDA 水平的变化均有不同程度改善。总体来看，苦荞多酚与阳性药物二甲双胍的作用效果相当。上述结果表明，苦荞多酚能显著增强 HepG2 细胞的抗氧化能力，保护细胞免受氧化应激损伤。

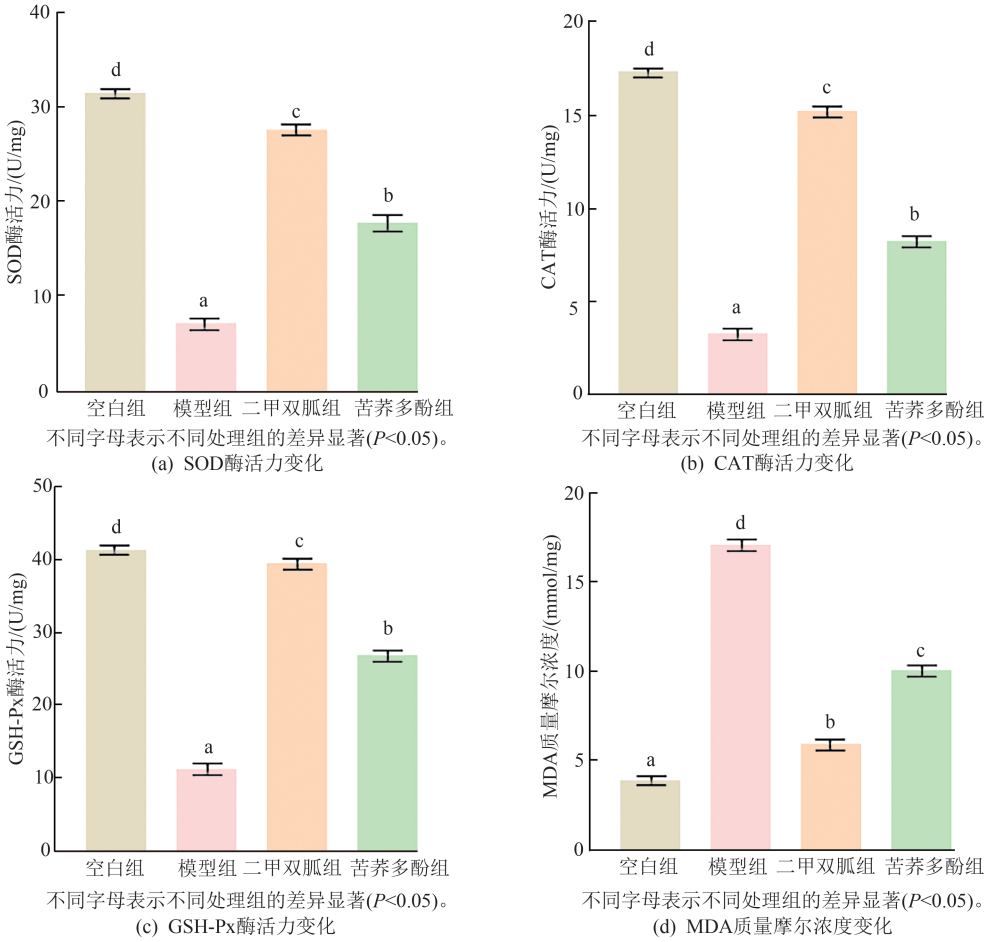


图4　苦荞多酚和二甲双胍对HepG2细胞氧化应激指标的影响

Fig. 4　Effects of tartary buckwheat polyphenols and metformin on oxidative stress indicators in HepG2 cells

2.6　苦荞多酚对胰岛素抵抗HepG2细胞肝糖代谢的影响

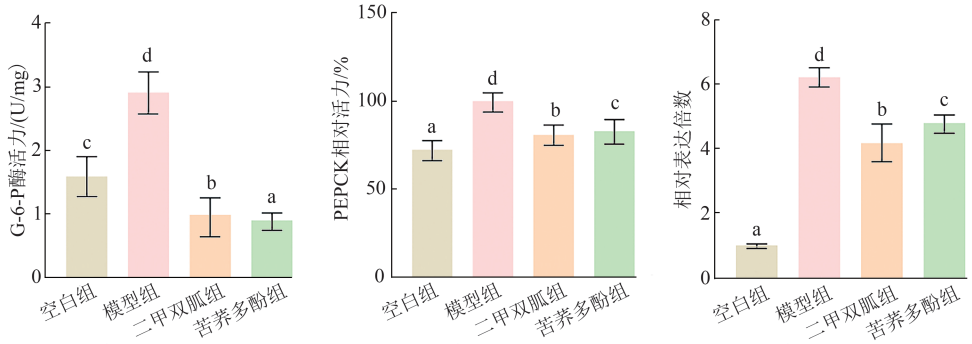
肝脏中的胰岛素抵抗会进一步造成肝糖代谢异常，例如糖原合成能力降低或者糖异生作用加重。肝糖代谢能力的异常会使肝脏对葡萄糖利用效率降低，进一步加重胰岛素抵抗效应[24]。因此，作者评价了苦荞多酚对糖原异生和糖原合成途径的调控效果，进一步研究其对肝糖代谢的影响。

2.6.1　苦荞多酚对糖异生关键酶及相关基因表达的影响

肝糖代谢的一个重要环节是糖异生作用。如图5所示，HepG2细胞经GluN诱导后，G-6-P和PEPCK的酶活力比空白组显著上升，意味着模型组的糖异生作用明显增强。苦荞多酚和二甲双胍干预能够显著降低G-6-P和PEPCK的酶活力。相对造模组，苦荞多酚和二甲双胍（125.0 μg/mL）的干预下，G-6-P的酶活力仅分别为模型组的31.23%和34.39%，PEPCK的酶活力仅分别为模型组的82.76%和80.64%。研究表明，G-6-P和PEPCK作为糖异生作用中的糖异生关键限速酶，其酶活力的提升也会引发糖异生作用的增强[21]。苦荞多酚能够通过抑制糖异生关键酶G-6-P和PEPCK的酶活力，有效抑制肝脏糖异生作用，并改善胰岛素抵抗效应。

FOXO1是胰岛素PI3K-AKT通路上重要的转录因子，是调控糖异生作用的主要靶点。FOXO1可结合G-6-P和PEPCK启动子区域的DNA靶序列，调控两种糖异生关键酶的基因表达水平。当FOXO1的转录活性受到抑制时，G-6-P和PEPCK的表达也会受到抑制[25]。因此，作者从基因水平进一步验证了苦荞多酚对G-6-P和PEPCK的抑制效果。由图5(c)可看出，模型组*FOXO1*基因的表达量相对正常的HepG2细胞显著上调，在苦荞多酚和二甲双胍（125.0 μg/mL）的作用下，*FOXO1*基

因的表达量下调了 22.87% 和 36.67%。这证明了苦荞多酚通过下调 *FOXO1* 基因的表达，抑制了糖异生关键酶 G-6-P 和 PEPCK 的酶活力。类似的研究[26]也表明硫酸化岩藻糖-甘露糖醛酸-半乳聚糖可通过抑制 *FOXO1* 基因的表达，从而抑制糖异生效应，对高血糖起到一定的调控作用。



不同字母表示不同处理组的差异显著(P<0.05)。

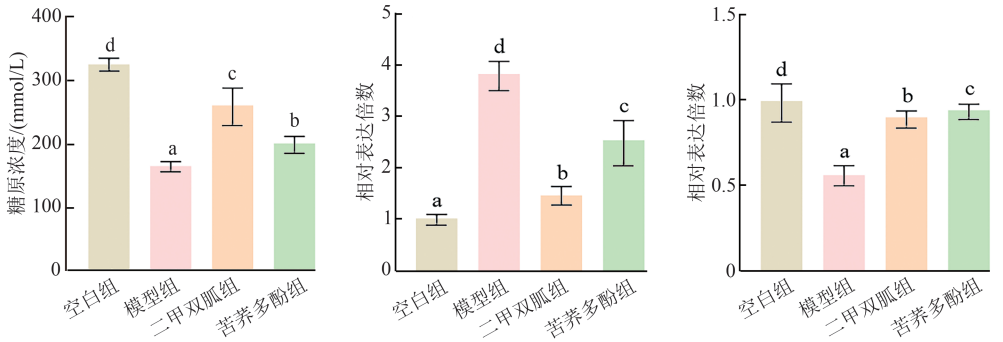
(a) G-6-P酶活力变化　(b) PEPCK酶活力变化　(c) *FOXO1*基因表达量变化

图 5　苦荞多酚和二甲双胍对糖异生相关指标的影响

Fig. 5　Effects of tartary buckwheat polyphenols and metformin on gluconeogenesis markers

2.6.2　苦荞多酚对糖原合成量及相关基因表达的影响

相比于空白组，经过 GluN 诱导的模型组的糖原浓度明显较低，苦荞多酚和二甲双胍（125.0 μg/mL）使模型组 HepG2 细胞内糖原合成量分别增加了 21.73% 和 63.88%，见图 6(a)。上述结果说明苦荞多酚可通过促进 HepG2 细胞糖原合成作用调节肝糖代谢，从而改善胰岛素抵抗细胞的葡萄糖利用效率。作者进一步分析了糖原合成可能的分子机制，结果见图 6(b)~(c)。模型组 HepG2 细胞中的 *GSK-3β* 基因表达水平显著高于空白组（P<0.05），而 *GYS-2* 基因表达水平显著低于空白组（P<0.05）。苦荞多酚能够显著下调 *GSK-3β* 基因的表达，并增加 *GYS-2* 基因的表达。说明苦荞多酚能够促进胰岛素抵抗 HepG2 细胞合成糖原。Han 等[27]也证实了 *GSK-3β* 基因表达的降低可解除 *GSK-3β* 对糖原合成酶的酶活力的抑制，进而加速糖原合成，提高葡萄糖利用率，最终达到调控血糖的目的。



不同字母表示不同处理组的差异显著(P<0.05)。

(a) 糖原浓度变化　(b) *GSK-3β*基因表达量变化　(c) *GYS-2*基因表达量变化

图 6　苦荞多酚和二甲双胍对糖原合成的影响

Fig. 6　Effects of tartary buckwheat polyphenols and metformin on glycogen synthesis

2.6.3　苦荞多酚改善肝糖代谢的潜在机制分析

综上所述，苦荞多酚通过对 PI3K/Akt 通路上糖异生和糖原合成的信号分子定向调控，达到改善肝糖代谢和胰岛素抵抗的目的。图 7 显示了苦荞多酚改善肝糖代谢可能的机制。苦荞多酚能够增强胰腺细胞抗氧化酶的酶活力、清除自由基、保护胰岛 β 细胞；苦荞多酚可下调 PI3K/Akt 通路上 *FOXO1* 基因的表达。而 FOXO1 是一种转录因子，它负责调

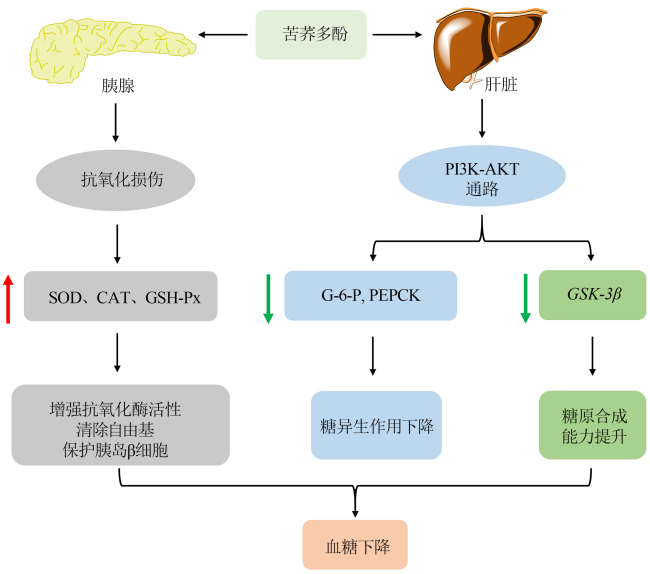


图7　苦荞多酚通过PI3K/AKT通路调节肝糖代谢的分子机制

Fig. 7　Molecular mechanism of tartary buckwheat polyphenols in the regulation of hepatic glucose metabolism *via* PI3K/AKT pathway

节编码G-6-P和PEPCK酶的基因表达水平。G-6-P和PEPCK的酶活力均相应下降，说明苦荞多酚能够通过下调*FOXO1*基因的表达和降低G-6-P、PEPCK的酶活力，实现对糖异生的抑制作用[20-23]。其次，苦荞多酚可通过激活PI3K/Akt通路，下调*GSK-3β*基因的表达。*GSK-3β*主要对糖原合成酶呈负性调节，其表达量下降可解除对糖原合成酶的抑制作用，从而加速糖原合成[28]。

3　结论

作者采用GluN诱导HepG2细胞，成功构建出胰岛素抵抗细胞模型。通过苦荞多酚干预胰岛素抵抗HepG2细胞，发现苦荞多酚表现出良好的改善氧化应激和肝糖代谢的能力。在促进胰岛素生成途经中，苦荞多酚能显著增强SOD、CAT、GSH-Px等抗氧化酶的酶活力，抑制脂质过氧化产物MDA的产生，保护胰岛β细胞免受自由基损害。在糖异生途径中，苦荞多酚干预使细胞模型的G-6-P和PEPCK的酶活力降低，同时也进一步下调负责调控G-6-P和PEPCK的*FOXO1*基因表达量。在糖原合成方面，苦荞多酚能促使胰岛素抵抗HepG2细胞糖原合成量增加，同时能够显著下调*GSK-3β*的基因表达量。总的来说，苦荞多酚通过缓解抗氧化损伤、下调糖异生作用、提升糖原合成能力等3个方面调节体内的糖代谢。该研究可以作为体外快速评价苦荞多酚降血糖效果的有效方法，为苦荞多酚在降血糖功能性食品开发方面提供技术支撑。

参考文献

[1] 马永强，韩烨，张凯，等. 甜玉米芯多糖对胰岛素抵抗HepG2细胞糖代谢功能的影响[J]. 食品科学，2021，42（17）：170-176.
MA Y Q，HAN Y，ZHANG K，et al. Effect of sweet corncob polysaccharide on glucose metabolism in insulin resistant HepG2 cells[J]. Food Science，2021，42（17）：170-176.

[2] ALAM M M，MEERZA D，NASEEM I. Protective effect of quercetin on hyperglycemia，oxidative stress and DNA damage in alloxan induced type 2 diabetic mice[J]. Life Sciences，2014，109（1）：8-14.

[3] ZHU X Y，XU X L，DU C G，et al. An examination of the protective effects and molecular mechanisms of curcumin，a polyphenol curcuminoid in diabetic nephropathy[J]. Biomedecine & Pharmacotherapie，2022，153：113438.

[4] ZHANG Y L，YU X M，WANG M M，et al. Hyperoside from *Z. bungeanum* leaves restores insulin secretion and mitochondrial function by regulating pancreatic cellular redox status in diabetic mice[J]. Free Radical Biology & Medicine，2021，162：412-422.

[5] RUAN J J，ZHOU Y X，YAN J，et al. Tartary buckwheat：an under-utilized edible and medicinal herb for food and nutritional security[J]. Food Reviews International，2022，38（4）：440-454.

[6] WANG C X，CHEN Z Z，BRENNAN M A，et al. The effect of extruded multigrain powder on metabolism and intestinal flora of high-fat-diet induced C57BL/6J mice[J].

Food Research International，2023，169：112878.
[7] PENG L X，ZHANG Q，ZHANG Y H，et al. Effect of tartary buckwheat，rutin，and quercetin on lipid metabolism in rats during high dietary fat intake[J]. Food Science & Nutrition，2020，8(1)：199-213.
[8] SUN C D，LIU Y L，ZHAN L H，et al. Anti-diabetic effects of natural antioxidants from fruits[J]. Trends in Food Science & Technology，2021，117：3-14.
[9] QIU G H，XIE X J，XU F，et al. Distinctive pharmacological differences between liver cancer cell lines HepG2 and Hep3B[J]. Cytotechnology，2015，67：1-12.
[10] YU Q，FAN L P. Antityrosinase and antioxidant activity of asparagus and its inhibition on B16F10 melanoma cells before and after hydrothermal treatment [J]. Food Bioscience，2021，41：101026.
[11] LI J，GONG Y H，LI J W，et al. *In vitro* inhibitory effects of polyphenols from tartary buckwheat on xanthine oxidase：identification，inhibitory activity，and action mechanism[J]. Food Chemistry，2022，379：132100.
[12] WANG H L，CHENG J，YANG S N，et al. Rosemary extract reverses oxidative stress through activation of Nrf2 signaling pathway in hamsters fed on high fat diet and HepG2 cells[J]. Journal of Functional Foods，2020，74：104136.
[13] KONG X Z，ZHANG L N，LU X，et al. Effect of high-speed shearing treatment on dehulled walnut proteins[J]. LWT-Food Science and Technology，2019，116：108500.
[14] ALÍA M，RAMOS S，MATEOS R，et al. Quercetin protects human hepatoma HepG2 against oxidative stress induced by *tert*-butyl hydroperoxide[J]. Toxicology and Applied Pharmacology，2006，212(2)：110-118.
[15] WU J S，HUANG R，JIAO D X，et al. Protection by *Hosta ventricosa* polysaccharides against oxidative damage induced by t-BHP in HepG2 cells *via* the JNK/Nrf2 pathway[J]. International Journal of Biological Macromolecules，2022，208：453-462.
[16] Li Y P，Deng D D，Zhang X B，et al. Direct detection of rutin-degrading isozymes with polyacrylamide gel electrophoresis [J]. Analytical Biochemistry，2013，443(2)：240-242.
[17] ARAÚJO F F，PAULO FARIAS D，NERI-NUMA I A，et al. Polyphenols and their applications：an approach in food chemistry and innovation potential[J]. Food Chemistry，2021，338：127535.
[18] ZHANG Q，YUAN H，ZHANG C，et al. Epigallocatechin gallate improves insulin resistance in HepG2 cells through alleviating inflammation and lipotoxicity[J]. Diabetes Research and Clinical Practice，2018，142：363-373.
[19] PAULO FARIAS D，ARAÚJO F F，NERI-NUMA I A，et al. Antidiabetic potential of dietary polyphenols：a mechanistic review [J]. Food Research International，2021，145：110383.
[20] 钱凯. 葛根多糖的分离、结构表征及其降糖活性研究[D]. 南昌：江西中医药大学，2020.
[21] PRABOWO R，MARIANA S. Measurement of malondialdehyde（MDA）level and superoxide dismutase（SOD）activity in the pancreatic tissue after the intervention of orange water kefir in the hyperlipidemic rats model[J]. International Journal of Surgery，2022，100：106527.
[22] PANG X Y，MIAO Z Q，DONG Y Y，et al. Dietary methionine restriction alleviates oxidative stress and inflammatory responses in lipopolysaccharide-challenged broilers at early age [J]. Frontiers in Pharmacology，2023，14：1120718.
[23] ZHANG S，HE B，GE J B，et al. Characterization of chemical composition of *Agaricus brasiliensis* polysaccharides and its effect on myocardial SOD activity，MDA and caspase-3 level in ischemia-reperfusion rats[J]. International Journal of Biological Macromolecules，2010，46(3)：363-366.
[24] PRABOWO R，MARIANA S，PRAMANINGTYAS M D. The effect of orange water kefir on malondialdehyde（MDA）level and superoxide dismutase（SOD）activity in the kidney tissue of the hyperlipidemic rats（*Rattus norvegicus*）[J]. Clinica Chimica Acta，2022，530：S237-S238.
[25] GURUMAYUM S，BHARADWAJ S，SHEIKH Y，et al. Taxifolin-3-O-glucoside from *Osbeckia nepalensis* Hook. mediates antihyperglycemic activity in CC1 hepatocytes and in diabetic Wistar rats *via* regulating AMPK/G6Pase/PEPCK signaling axis[J]. Journal of Ethnopharmacology，2023，303：115936.
[26] ZHANG W J，WU N，WANG H，et al. Sulfated fuco-manno-glucuronogalactan alleviates pancreatic beta cell senescence *via* PI3K/AKT/FoxO1 pathway[J]. International Journal of Biological Macromolecules，2023，236：123846.
[27] HAN B S，ZHANG L N，HOU Y M，et al. Phosphoproteomics reveals that camel and goat milk improve glucose homeostasis in HDF/STZ-induced diabetic rats through activation of hepatic AMPK and GSK3-GYS axis[J]. Food Research International，2022，157：111254.
[28] Wang F，Chang C，Li R，et al. Retinol binding protein 4 mediates MEHP-induced glucometabolic abnormalities in HepG2 cells[J]. Toxicology，2019，424：152236.

（责任编辑：闫林红）