

青钱柳活性成分对 IR-HepG2 细胞葡萄糖消耗量及 α -葡萄糖苷酶活性的影响

王胤康¹, 吕萌², 许琦², 陈伟鸿³, 谭开祥⁴, 向极钎⁵, 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. 武汉百思凯瑞纳米科技有限公司, 湖北 武汉 430075; 3. 无限极(中国)有限公司, 广东 广州 510665; 4. 湖北思慧生物科技有限公司, 湖北 恩施 445099; 5. 恩施州农业科学院, 湖北 恩施 445099)

摘要: 研究青钱柳多糖(CPP)和青钱柳黄酮(CPF)对胰岛素抵抗的人源肝癌细胞(IR-HepG2)葡萄糖消耗量及 α -葡萄糖苷酶活性影响。用高浓度胰岛素诱导培养 HepG2 细胞, 建立 IR-HepG2 细胞模型, 将 IR-HepG2 细胞分为模型组、CPP 高、中、低剂量组、CPF 高、中、低剂量组和二甲双胍组, 各组以相应药物孵育 24 h, 采用葡萄糖试剂盒测定细胞葡萄糖消耗量(Δ GC), MTT 法测定单位细胞葡萄糖消耗量(Δ GC/OD); 以阿卡波糖为阳性对照, 比较不同浓度梯度的 CPP 与 CPF 对 α -葡萄糖苷酶活性影响。与模型组比较, 阴性对照组、二甲双胍组、CPP 组与 CPF 组细胞 Δ GC 与 Δ GC/OD 显著性升高; 不同浓度的 CPP 与 CPF 对 α -葡萄糖苷酶均有抑制作用。提示青钱柳活性提取物降血糖功效与其提高细胞葡萄糖摄取量, 抑制 α -葡萄糖苷酶活性有关。

关键词: 青钱柳; HepG2 细胞; 多糖; 黄酮; α -葡萄糖苷酶

中图分类号: R 285 文章编号: 1673-1689(2019)02-0120-06 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.02.017

Effects of *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinskaja Extracts on Glucose Consumption of Insulin Resistance HepG2 Cell and Activity of Alpha-Glucosidase

WANG Yinkang¹, LYU Meng², XU Qi¹, CHEN Weihong³, TAN Kaixiang⁴, XIANG Jiqian⁵, LIU Wei^{*1}

(1. College of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China; 2. Wuhan Best-Carrier Nanotechnology Co. Ltd, Wuhan 430075, China; 3. Infinitus Co. Ltd, Guangzhou 510665, China; 4. Sihui Biotechnology Co. Ltd, Enshi 445099, China; 5. Enshi Academy of Agricultural Science, Enshi 445099, China)

Abstract: The effects of *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinskaja Extracts on glucose consumption of insulin resistance HepG2 cell and activity of alpha-glucosidase is studied. HepG2 cell with high concentration insulin (10 μ g/mL) is induced to establish insulin resistance cell model and divided model cell into *Cyclocarya paliurus* polysaccharide (CPP), *Cyclocarya paliurus* flavone (CPF) and dimethylbiguanide groups. After 24 h administration, glucose assay is used fit to measure the gross

收稿日期: 2016-04-11

基金项目: 湖北省科技支撑计划项目(2013BEC048)。

* 通信作者: 刘卫(1966—), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 从事生物制药领域的研究。E-mail: wliu@hust.edu.cn

引用本文: 王胤康, 吕萌, 许琦, 等. 青钱柳活性成分对 IR-HepG2 细胞葡萄糖消耗量及 α -葡萄糖苷酶活性的影响[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(02): 120-125.

glucose consumption of cells (Δ GC), glucose consumption of unite cell (Δ GC/OD) is detected by MTT assay. The inhibitory activity on α -glucosidase of CPP and CPF is evaluated, compared with acarbose, in vitro. Compared with model group, Δ GC and Δ GC/OD of IR-HepG2 cell is increased by CPF and CPP significantly. CPP and CPF have inhibitory effect on the activity of α -glucosidase. Those results indicate that CPF and CPP have effects on increasing the glucose consumption of cell and decreasing the activity of α -glucosidase, thus alleviating hyperglycemia.

Keywords: *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinskaja, HepG2 cell, polysaccharide, flavone, α -glucosidase

青钱柳, 俗称摇钱树, 系胡桃科青钱柳属植物, 是我国特有的单种属植物, 分布于湖北、湖南、江西、贵州等地山区, 长期以来民间取其叶制茶, 饮之味甜兼有清热解暑、降血压、降血糖等保健功效^[1]。青钱柳作为我国特有的保健食品资源, 具有很高的应用开发价值^[2]。近年来研究表明, 青钱柳叶含有多种生物活性物质, 如黄酮、多糖、皂苷、三萜类、蛋白质、微量元素和酚类物质等^[3], 其水提物和醇提物具有显著的降血糖效果^[4-8], 但少有文献探讨青钱柳活性成分降血糖机制。

肝细胞是糖代谢作用的靶细胞之一, 是摄取、储存和合成葡萄糖的主要场所, 在维持血糖稳定的过程中发挥着最直接和最重要的作用^[9]。HepG2 细胞是一种表型与肝细胞极为相似的人源肝癌细胞, 具有肝细胞的形态和功能, 且易于体外培养, 同时 HepG2 细胞还具有表达胰岛素样生长因子和胰岛素受体的代谢反应。在高浓度的胰岛素作用下, HepG2 细胞表面胰岛素受体数量下降, 其下降程度与胰岛素浓度及刺激持续的时间呈正相关^[10]。因此 HepG2 细胞是体外研究胰岛素抵抗发病机制和降糖药物作用机制的理想细胞模型^[11]。 α -葡萄糖苷酶是水解食物中多糖及二糖的常见酶, 主要分布在小肠上。 α -葡萄糖苷酶抑制剂可以抑制位于小肠内的 α -葡萄糖苷酶, 使淀粉类多糖分解为葡萄糖的速率下降, 延缓对葡萄糖的吸收, 进而降低餐后血糖升高速度, 长期使用后亦可降低空腹血糖^[12]。

为了从体外葡萄糖摄入量控制, 以及体内葡萄糖消耗两方面来探讨青钱柳活性成分降血糖机制, 本研究采用高糖高胰岛素培养基诱导培养胰岛素抵抗 HepG2 细胞 (IR-HepG2), 观察水提活性成分青钱柳多糖 (CPP) 和醇提活性成分青钱柳黄酮 (CPF) 对 IR-HepG2 细胞葡萄糖消耗量的影响, 同

时在体外进行 α -葡萄糖苷酶活力抑制实验, 以探讨青钱柳活性成分降血糖机制, 为青钱柳降血糖保健食品的研发提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料与试剂

青钱柳叶, 采自湖北恩施思慧生物科技有限公司青钱柳苗圃基地; CPP 与 CPF 由本实验室参照文献提取制备。

HepG2 细胞, 由武汉大学中国典型培养物保藏中心提供。

盐酸二甲双胍肠溶片 (生产批号: 20150475), 购自贵州天安药业股份有限公司; 葡萄糖试剂盒, 购自上海名典生物技术有限公司; DMEM 高糖培养基, 购自 HyClone 公司; 四甲基偶氮唑盐 (MTT), 购自 Sigma 公司; 牛胰岛素, 购自 Sigma 公司; 无酚红 DMEM 高糖培养基, 购自吉诺生物有限公司; 阿卡波糖, 购自拜耳医药保健有限公司; α -葡萄糖苷酶 (S10049), 购自上海源叶生物有限公司。

1.2 主要仪器设备

MQX200 型酶标仪, 美国伯腾公司; CKX41 倒置显微镜, 日本 Olympus 公司; 3100 型 CO₂ 细胞培养箱, 美国 Thermo Forma 公司; WCD2S-03 型微波萃取设备, 南京三乐微波技术发展有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 CPP 的提取和纯化 参照文献 [13] 加以改进。青钱柳叶经过石油醚脱脂脱色后, 进行提取, 过滤, 将所得滤液浓缩、醇沉、脱蛋白、干燥, 得到棕红色粗多糖。粗多糖复溶后, 进行透析、氧化镁脱色、过滤并真空干燥, 即得淡黄色精制 CPP, 经硫酸蒽酮法^[14]检测多糖含量为 66.3%。

1.3.2 CPF 的提取和纯化 参照文献 [15]。青钱柳

叶粉末(过 40 目筛)干燥后,经微波萃取、过滤浓缩、喷雾干燥,得粉状粗制品。将粗制品复溶,过聚酰胺吸附柱,控制流速 2.5 mL/min,过柱完成后,用 60%乙醇洗脱,合并洗脱液,减压浓缩并真空干燥。将真空干燥所得物再过 2 次聚酰胺柱,即得精制 CPF,经亚硝酸钠-硝酸铝-氢氧化钠比色法^[16]检测,黄酮含量为 80.5%。

1.3.3 CPF、CPP 对 IR-HepG2 细胞葡萄糖摄取量的影响 参照文献[17-18]。取活化后的 HepG2 细胞,用 DMEM 全培养基(含 10%胎牛血清和 1%双抗)培养至 80%细胞贴壁后,改用含 10 μ g/mL 胰岛素的 DMEM 全培养基培养,24 h 后用无血清无酚红 DMEM 高糖培养基继续培养 12 h,使细胞同步化,即得 IR-HepG2 细胞。

用胰蛋白酶消化 IR-HepG2 细胞,1 500 r/min 离心 5 min 去上清,加入无血清无酚红 DMEM 高糖培养基使其均匀悬浮,通过细胞计数仪计数并控制细胞浓度为 10^5 个/mL。实验分为空白组、阴性对照组、模型组、二甲双胍组(终质量分数 1.0 mg/mL)、CPF 与 CPP 低、中、高剂量组(终质量浓度依次为 0.01、0.1、1.0 mg/mL)。取 96 孔细胞培养板点板,空白组每孔加入 200 μ L 无血清无酚红的 DMEM 高糖培养基,阴性对照组每孔加入 200 μ L 正常 HepG2 细胞培养液,模型组每孔加入 200 μ L IR-HepG2 细胞培养液,实验组除每孔加入 200 μ L IR-HepG2 细胞培养液外,还加入相应受试样品。每组设置 6 个复孔,加药孵育 24 h 后,以葡萄糖氧化酶法检测上清液中的葡萄糖含量。以未接种细胞的空白组葡萄糖含量均值减去测得的培养液中葡萄糖含量,即得各孔细胞的葡萄糖消耗量。孵育结束后,每孔加入 20 μ L MTT 原液(5 mg/mL),继续培养 4 h,终止培养后,吸弃上清液,每孔加入 150 μ L 二甲基亚砷终止反应,微型震荡器震荡 10 min 至紫色结晶溶解,用酶标仪于 490 nm 波长下检测各孔的光密度(OD)值,以光密度值反映细胞活性和数量的多少。

1.3.4 CPF 与 CPP 对 α -葡萄糖苷酶活力的影响 参照文献[19-20],加以改进。实验分为空白组、阴性对照组(不加抑制剂)、阳性对照组(终质量浓度 1.00 mg/mL 阿卡波糖)、不同质量分数梯度的 CPF 与 CPP 组(终质量浓度依次为 0.13、0.25、0.50、1.00、2.00、4.00 mg/mL)。以 100 mg/mL 蔗糖溶液为底物,0.2 mol/L HAc-NaAc(pH 5.2)为缓冲液,所有

试剂事先均于 55 $^{\circ}$ C 预热 10 min,然后于 1.5 mL EP 管中,按照表 1 依次加入各试剂,55 $^{\circ}$ C 温育 60 min。温育结束后,95 $^{\circ}$ C 水浴 5 min 终止反应,取 3 μ L 反应液,分别加入 450 μ L 葡萄糖工作液中,37 $^{\circ}$ C 水浴 10 min 后,492 nm 波长处测定 OD 值,并计算抑制率。

$$I = \frac{Y-S}{Y-K} \times 100\%$$

式中: I 表示抑制率; Y 表示阴性对照组 OD 值; S 表示待测样品组 OD 值; K 表示空白组 OD 值。

表 1 实验分组所加试剂

Table 1 Reagents in each experimental group μ L

组别	缓冲液	底物	抑制剂	α -葡萄糖苷酶
空白组	400	400	—	200(灭活)
阴性对照组	400	400	—	200
阳性对照组	200	400	200	200
待测样品组	200	400	200	200

1.4 数据分析

实验结果均以平均值 $\pm$ 标准偏差($\bar{x} \pm s$)形式表示,采用 SPSS 19.0 统计学软件进行分析, $p < 0.05$ 为差异显著,具有统计学意义。

2 结果与分析

由表 2 可知,与阴性对照组比较,模型组 Δ GC 与 Δ GC/OD 显著性降低,差异有统计学意义($p < 0.05$ 或 $p < 0.01$),说明 IR-HepG2 细胞模型造模成功;与阴性对照组比较,二甲双胍组、CPF 低、中、高剂量组、CPP 中、高剂量组 Δ GC 显著性增加($p < 0.01$ 或 $p < 0.05$),增率分别为 269.75%、40.12%、71.60%、125.31%、74.07%、94.44%;与阴性对照组比较,二甲双胍组、CPF 高剂量组、CPP 中、高剂量组 Δ GC/OD 显著性增加($p < 0.01$),增率分别为 415.47%、102.68%、89.29%、110.12%;与模型组比较,二甲双胍组、CPF 低、中、高剂量组和 CPP 低、中、高剂量组 GC 明显上升($p < 0.01$),增率分别为 621.69%、173.49%、234.94%、339.76%、96.39%、239.76%、279.52%;与模型组比较,二甲双胍组、CPF 低、中、高剂量、CPP 中、高剂量组 Δ GC/OD 显著性增加($p < 0.01$),增率分别为 906.98%、137.21%、163.37%、295.93%、269.77%、310.47%。实验结果表明,青钱柳活性成分(CPF、CPP)能够改善胰岛素抵抗,增加 IR-HepG2 细胞葡萄糖消耗量,且优于正常 HepG2 细胞,其降血糖活性机制也可能与此有关。

表 2 CPF 与 CPP 对 IR-HepG2 细胞葡萄糖消耗量的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)
Table 2 Effect of CPFs and CPPs on Glucose Consumption of IR-HepG2 Cell($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	质量浓度/(mg/mL)	Δ GC/(mmol/L)	OD 值	Δ GC/OD
阴性对照	—	1.62±0.60	0.48±0.02	3.36±1.21
模型	—	0.83±0.22**	0.51±0.07	1.72±0.71*
二甲双胍	1.0	5.99±0.76***	0.35±0.02	17.32±2.46***
CPF	0.01	2.27±0.21**	0.57±0.08	4.08±0.75#
	0.1	2.78±0.64***	0.61±0.04	4.53±0.84#
	1.0	3.65±0.30***	0.54±0.08	6.81±0.93***
CPP	0.01	1.63±0.51#	0.59±0.10	2.81±1.00
	0.1	2.82±0.32***	0.45±0.03	6.36±0.99***
	1.0	3.15±0.13***	0.45±0.02	7.06±0.55***

注:与阴性对照组比较,* $p<0.05$,** $p<0.01$;与模型组比较,# $p<0.01$ 。

以各组 OD 值与阴性对照组 OD 值的比值来反应细胞存活率,计阴性对照组细胞平均存活率为 100.00%,那么模型组细胞平均存活率为 106.25%,二甲双胍组细胞平均存活率为 72.92%,CPF 低、中、高剂量组细胞平均存活率分别为 118.75%、127.08%、112.50%,CPP 低、中、高剂量组细胞平均

存活率分别为 122.92%、93.75%、93.75%。由此可知,与阴性对照组比较,模型组,CPF 低、中、高剂量组,CPP 低、中、高剂量组细胞生长状态良好存活率高,而二甲双胍组细胞存活率较低,细胞生长状态较差(见图 1)。

由表 3 可知,阿卡波糖、CPF 与 CPP 均能抑制

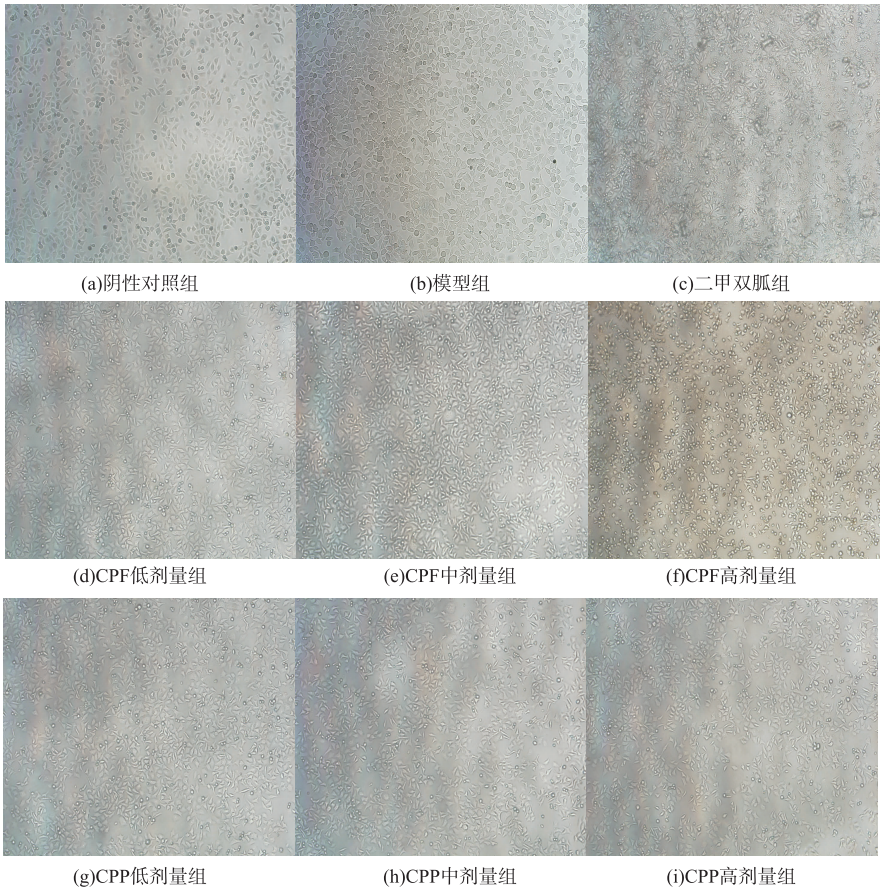


图 1 实验条件下细胞生长状态
Fig. 1 Cell growth state under experimental conditions

α -葡萄糖苷酶活性, 其中 CPF 对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用随着质量浓度升高呈正效应, 这与文献[21]一致, 当 CPF 质量浓度为 4.00 mg/mL 时抑制率最高达 86.00%, 而 CPP 对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用随浓度变化不大。与阿卡波糖(1.00 mg/mL)比较, CPF (0.13、0.25、0.50、1.00 mg/mL)、CPP (0.13、0.50、1.00、2.00、4.00 mg/mL) 对 α -葡萄糖苷酶的抑制率均显著性低于阿卡波糖($p<0.05$ 或 $p<0.01$), 而 CPF (4.00 mg/mL) 对 α -葡萄糖苷酶的抑制率显著性高于阿卡波糖($p<0.01$), 表明以蔗糖为底物时, 同等质量分数的 CPF 与 CPP 对 α -葡萄糖苷酶的抑制效果不如阿卡波糖, 这与刘杰等人以 4-硝基酚- α -D-吡喃葡萄糖苷(PNPG)为底物所进行的研究有所不同^[12], 这可能与反应条件以及 α -葡萄糖苷酶对蔗糖与 PNPG 的亲和力不同有关。

表 3 CPF 与 CPP 对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 3 Inhibition of CPF and CPP on alpha-glucosidase ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	质量浓度/(mg/mL)	抑制率/%
阿卡波糖	1.00	47.52 $\pm$ 0.02
CPF	0.13	35.78 $\pm$ 0.02**
	0.25	33.53 $\pm$ 0.02**
	0.50	35.91 $\pm$ 0.05**
	1.00	37.46 $\pm$ 0.04**
	2.00	46.17 $\pm$ 0.03
CPP	4.00	86.00 $\pm$ 0.05**
	0.13	43.95 $\pm$ 0.07*
	0.25	45.46 $\pm$ 0.02
	0.50	35.62 $\pm$ 0.11*
	1.00	42.28 $\pm$ 0.09*
	2.00	43.16 $\pm$ 0.05*
	4.00	44.82 $\pm$ 0.03*

注: 与阿卡波糖比较, * $p<0.05$, ** $p<0.01$ 。

参考文献:

- [1] WU Y, LI Y Y, WU X, et al. Chemical constituents from *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinsk [J]. **Biochemical Systematics and Ecology**, 2014, 57(7): 216-220.
- [2] XIE Mingyong, XIE Jianhua. Review about the research on *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinskaja [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2008, 27(1): 113-121.
- [3] XIE J H, SHEN M Y, NIE S P, et al. Separation of water-soluble polysaccharides from *Cyclocarya paliurus* by ultrafiltration

3 讨论

葡萄糖是血糖主要来源, 而葡萄糖的转运活动是由葡萄糖转运蛋白(GLUTs)介导完成的。GLUT4 为一种跨膜转运蛋白, 是葡萄糖转运蛋白家族中最主要的葡萄糖运载体, 存在于胰岛素敏感的脂肪组织、心肌组织和骨骼肌组织中^[22]。青钱柳提取物能够显著提高受试大鼠肝脏细胞 GLUT4 mRNA 表达量, 进而增加细胞对葡萄糖的消耗^[23]。提示 CPF 可能发挥着信使分子的作用, 促进 IR-HepG2 细胞 GLUT4 mRNA 表达, 进而提高葡萄糖消耗量。参照文献 [24], CPF 还有可能通过激活 AMPK 磷酸化过程, 来调节 IR-HepG2 细胞的糖代谢。根据文献[25], CPP 提高 IR-HepG2 细胞葡萄糖消耗量的机理可能是通过活化 Akt 蛋白激酶介导的磷酸化过程, 抑制 GSK-3 活性, 阻止糖原合成酶被 GSK-3 磷酸化, 进而刺激糖原的合成, 同时被激活的 Akt 蛋白激酶又可以促进糖酵解过程, 进一步促进细胞对葡萄糖的消耗。

食物中的淀粉类多糖, 经糖苷酶水解成小分子单糖后, 才能被机体吸收转化为血糖。青钱柳主要活性成分为黄酮、多糖等, 通过 α -葡萄糖苷酶活性抑制实验发现, CPF 与 CPP 能够明显的抑制 α -葡萄糖苷酶活性, 说明 CPF 与 CPP 口服进入机体内后, 可能通过抑制位于小肠上的 α -葡萄糖苷酶活性, 使淀粉类多糖分解为葡萄糖的速度减慢, 从而减缓肠道内葡萄糖的吸收, 降低餐后血糖, 改善机体对葡萄糖的耐受量。

4 结语

CPF 与 CPP 能够改善胰岛素抵抗, 提高 IR-HepG2 细胞葡萄糖摄取量, 抑制 α -葡萄糖苷酶活性。本研究结果提示青钱柳提取物降血糖机制可能与 CPF、CPP 能够增加外周细胞葡萄糖消耗量, 抑制 α -葡萄糖苷酶活性, 延缓餐后血糖升高有关。

- process[J]. **Carbohydrate Polymers**, 2014, 101(1):479-483.
- [4] WANG Q Q, JIANG C H, FANG S Z, et al. Antihyperglycemic, antihyperlipidemic and antioxidant effects of ethanol and aqueous extracts of *Cyclocarya paliurus* leaves in type 2 diabetic rats[J]. **Journal of Ethnopharmacology**, 2013, 150(3):1119-1127.
- [5] LI S, LI J, GUAN X L, et al. Hypoglycemic effects and constituents of the barks of *Cyclocarya paliurus* and their inhibiting activities to glucosidase and glycogen phosphorylase[J]. **Fitoterapia**, 2011, 82(7):1081-1085.
- [6] XU Mingsheng, SHEN Yonggen, WU Hailong, et al. The hypoglycemic effects of *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinsk water extracts on diabetes mice[J]. **Acta Nutrimenta Sinica**, 2004, 26(3):230-234. (in Chinese)
- [7] JIANG C H, YAO N, WANG Q Q, et al. Cyclocarya paliurus extract modulates adipokine expression and improves insulin sensitivity by inhibition of inflammation in mice[J]. **Journal of Ethnopharmacology**, 2014, 153(2):344-351.
- [8] KURIHARA H, FUKAMI H, KUSUMOTO A, et al. Hypoglycemic action of *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinsk in normal and diabetic mice[J]. **Biosci Biotechnol Biochem**, 2003, 67(4):877-880.
- [9] 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**, 161(23):214-223.
- [10] WILLIAMS J F, OLEFSKY J M. Defective insulin receptor function in down-regulated HepG2 cell[J]. **Endocrinology**, 1990, 127(4):1706-1717.
- [11] LIN C L, HUANG H C, LIN J K. The aflavins attenuate hepatic lipid accumulation through activating AMPK in human HepG2 cells[J]. **Journal of Lipid Research**, 2007, 48(11):2334-2343.
- [12] LIU Jie, XIANG Yanru, DING Jiayu, et al. Screening the active fraction from *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinskaja which inhibit α -glucosidase and study its effects on hyperglycemia in mice with type II diabetes mellitus[J]. **Science and Technology of Food Industry**, 2015, 36(14):363-369. (in Chinese)
- [13] XIE J H, XIE M Y, NIE S P, et al. Chemical composition and antioxidant activities of a water-soluble polysaccharide from *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinskaja[J]. **Food Chemistry**, 2010, 119(4):1626-1632.
- [14] LAURENTIN A, EDWARDS C A. A microtiter modification of the anthrone-sulfuric acid colorimetric assay for glucose-based carbohydrates[J]. **Analytical Biochemistry**, 2003, 315(1):143-145.
- [15] 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(2):97-105.
- [16] AMIR M, MUJEEB M, KHAN A, et al. Phytochemical analysis and in vitro antioxidant activity of *Uncaria gambir* [J]. **International Journal of Green Pharmacy**, 2012, 6(1):67-72.
- [17] SU Jin, JIAO Jun, YU Lian, et al. Effects of *Dioscorea japonica* polysaccharide on glucose consumption capacity and insulin resistance of human lung cancer HepG2 cells[J]. **China Pharmacy**, 2015, 26(4):458-460.
- [18] 方飞. 桑叶有效部位改善 HepG2 胰岛素抵抗及其机制的研究[D]. 广州:华南理工大学, 2012.
- [19] LYU Huan, LUO Mingli, FANG Fei, et al. In vitro inhibitory effect of mulberry leaf extract on α -glucosidase activity[J]. **Lishizhen Medicine and Materia Medica Research**, 2012, 23(1):41-42. (in Chinese)
- [20] TONG Xing, TANG Qiusong, WU Yufei, et al. Cloning of the gene encoding α -glucosidase from *Aspergillus niger* and its expression in *Pichia pastoris* [J]. **Acta Microbiologica Sinica**, 2009, 49(2):262-268. (in Chinese)
- [21] YANG Wuying, SHANG GUAN Xinchun, XU Mingsheng, et al. Effects of *Cyclocarya paliurus* flavonoids on activity of α -glucosidase and blood glucose level in diabetic mice[J]. **Acta Nutrimenta Sinica**, 2007, 29(5):507-509. (in Chinese)
- [22] JAMES D E, BROWN R, NAVARRO J, et al. Insulin-regulatable tissues express a unique insulin-sensitive glucose transport protein[J]. **Nature**, 1988, 333(6169):183-185.
- [23] LI Nan, ZHAO Jing, WU Ru, et al. Effects of *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinskaja polysaccharides on lipid metabolism and expressions of PPAR α , FAS, and GLUT4 mRNA in hyperlipidemic Rats [J]. **Modern Food Science and Technology**, 2015, 31(4):29-35. (in Chinese)
- [24] JIN M N, SHI G R, TANG S A, et al. Flavonoids from *Tetrastigma obtectum* enhancing glucose consumption in insulin-resistance HepG2 cells via activating AMPK[J]. **Fitoterapia**, 2013, 90(20):240-246.
- [25] MA X L, ZHOU F C, CHEN Y Y, et al. A polysaccharide from *Grifola frondosa* relieves insulin resistance of HepG2 cell by Akt-GSK-3 pathway[J]. **Glycoconjugate Journal**, 2014, 31(5):355-363.