

# 浒苔多酚的抗氧化及改善胰岛素抵抗作用

李锋<sup>1,2</sup>, 蔡振辉<sup>2</sup>, 陈金梅<sup>2</sup>, 郭养浩<sup>2</sup>

(1. 福州大学化学学院, 福建福州 350116) (2. 福州大学药物生物技术与工程研究所, 福建福州 350116)

**摘要:** 本文提取分离了浒苔多酚并对其抗氧化及改善胰岛素抵抗 (IR) 作用进行了研究。测定浒苔多酚对 DPPH· 的清除率以评价其体外抗氧化能力; 测定 IR-HepG2 细胞的葡萄糖消耗量以评价在体外细胞水平改善 IR 的能力; 通过 DIO 小鼠实验, 评价其在小鼠体内抗氧化、改善 IR 的能力。结果表明: 所得组份 EP1 具有较好的抗氧化作用, 其体外 DPPH 清除 IC<sub>50</sub> 为 1.08 mg/mL, 与模型组相比, EP1 能显著提高小鼠肝脏抗氧化酶 SOD、CAT 活性达 25.04%、36.28%, 降低血清 MDA 水平可达 42.92%; EP1 可显著改善 HepG2 细胞及 DIO 小鼠的 IR 状态 ( $p < 0.05$ ), 其抑制 HOMA-IR 指数幅度可达 16.8%; EP1 还能抑制 DIO 小鼠的肥胖程度, 降低脂肪比例 ( $p < 0.05$ ); 而另一组份 EP2 的抗氧化及改善胰岛素抵抗作用均不及 EP1。综上, 浒苔多酚 EP1 具有较好的抗氧化能力, 能明显改善 IR 状态, 其机制可能与其发挥抗氧化作用抑制机体 ROS 水平有关。

**关键词:** 浒苔多酚; 抗氧化; 胰岛素抵抗; 膳食诱导型肥胖

文章编号: 1673-9078(2016)8-34-41

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.8.006

## Antioxidant Activity of *Enteromorpha prolifera* Polyphenols and Their Effect on Improving Insulin Resistance

LI Feng<sup>1,2</sup>, CAI Zhen-hui<sup>2</sup>, CHEN Jin-mei<sup>2</sup>, GUO Yang-hao<sup>2</sup>

(1. College of Chemistry, Fuzhou University, Fuzhou 350116, China)

(2. Institute of Pharmaceutical Biotechnology and Bioengineering, Fuzhou University, Fuzhou 350116, China)

**Abstract:** *Enteromorpha prolifera* polyphenols (EPs) were extracted and separated, and their antioxidant activity and effect on insulin resistance (IR) were investigated in this paper. The 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH·) radical scavenging assay was used to evaluate the *in vitro* antioxidant capacities of EPs; the capability of EPs for reducing IR was evaluated *in vitro* by measuring the glucose consumption of IR-HepG2 cells. Experiments with diet-induced obese (DIO) mice were used to evaluate the *in vivo* antioxidant activities of EPs and their effects on IR *in vivo*. The results showed that the fraction EP1 had good DPPH· radical scavenging ability with an IC<sub>50</sub> value of 1.08 mg/mL. Compared to the control group, EP1 significantly increased the liver SOD and CAT activities in mice by 25.04% and 36.28%, respectively, and decreased the serum malondialdehyde (MDA) level by 42.92%. EP1 improved IR states of HepG2 cells and DIO mice significantly ( $p < 0.05$ ), reduced the homeostatic model assessment (HOMA)-IR index by 16.8%, and decreased the degree of obesity and reduce the fat percentage in DIO mice significantly ( $p < 0.05$ ). On the other hand, EP2 was inferior to EP1 in terms of antioxidant activity and IR-improving effect. In summary, EP1 has good *in vitro* and *in vivo* antioxidant capacities, and can improve IR state significantly, which may be associated with its antioxidant activity by suppressing levels of reactive oxygen species (ROS).

**Key words:** *Enteromorpha prolifera* polyphenol; antioxidant; insulin resistance; dietary induced obesity

浒苔, 俗称“青海苔”、“苔条”等, 属绿藻门绿藻纲石莼目石莼科浒苔属<sup>[1]</sup>, 作为一种大型绿藻广泛分布于世界各海域, 我国东海和黄海浒苔资源丰富, 近海滩涂多有生长。浒苔营养丰富, 作为一种药食两用材料在我国民间有着悠久的历史, 收载于许多

收稿日期: 2015-10-11

基金项目: 国家海洋公益性行业科研专项 (201205022); 福建省教育厅科技项目 (JA13045)

作者简介: 李锋 (1976-), 男, 助理研究员, 研究方向: 海洋天然产物

通讯作者: 郭养浩 (1950-), 男, 教授, 研究方向: 生物工程

药物及食谱典籍<sup>[2]</sup>。为了有效利用丰富的浒苔资源, 近年来对其进行了大量研究, 主要有: 浒苔多糖的结构及药理研究<sup>[3-6]</sup>、浒苔提取物抗氧化作用<sup>[7]</sup>、制备生物柴油<sup>[8]</sup>和生物乙醇<sup>[9]</sup>等方面。而有关浒苔多酚提取分离及其相关药理研究, 国内外尚未见报道。

代谢过程中所产生的活性氧 (Reactive oxygen species, ROS) 和自由基, 会使细胞和机体处于氧化应激状态 (Oxidative stress), 这是导致许多严重慢性疾病的重要因素, 例如类风湿性关节炎、肥胖、高血压等疾病<sup>[10]</sup>。化学合成抗氧化剂虽然有较好的抗氧化

性能,但大多具有相当的毒副作用,在人体中并无应用,只作为工业抗氧化防腐剂使用,因此寻找天然抗氧化剂日益受到人们的关注。胰岛素抵抗(Insulin resistance, IR)是形成II型糖尿病最直接因素,常伴有肥胖、高血脂和高血压等症状。全世界有近5%人群遭受II型糖尿病的困扰,这一数字仍在不断增加中<sup>[1]</sup>,其发病原因大多是由于高碳水化合物、高脂的膳食习惯以及运动缺乏的生活习惯所致,最终导致碳水化合物及脂质代谢紊乱综合症,形成胰岛素抵抗。近年来已开发了许多通过改善胰岛素抵抗来控制II型糖尿病的药物,如罗格列酮、吡格列酮、苯乙双胍等,但大多长期服用都会产生耐药性及其他严重副作用<sup>[2]</sup>。

本工作以新鲜浒苔为原料,提取分离其中多酚组分,考察其抗氧化作用;以IR-HepG2细胞和DIO小鼠两种模型,研究其改善胰岛素抵抗状态效果。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料与试剂

新鲜浒苔藻体由福建海兴保健食品公司提供;糖原测定试剂盒、总胆固醇测定试剂盒、葡萄糖测定试剂盒、甘油三酯测定试剂盒、低密度脂蛋白和高密度脂蛋白测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所;胰岛素ELISA测定试剂盒购自上海源叶生物科技有限公司;DPPH(1,1-二苯基-2-三硝基苯肼)、BHT(2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚)、Folin-Ciocaltea试剂购自Sigma公司;其他试剂均为分析纯。

### 1.2 实验仪器与设备

UV-1800紫外可见分光光度计,日本岛津公司;SHB-III循环水式真空泵,郑州长城科工贸公司;YRE-202A真空旋转蒸发器,日本EYELA公司;二氧化碳培养箱,美国Thermo公司;倒置显微镜,重庆光电仪器公司。

### 1.3 细胞株及实验动物

HepG2细胞系本实验传代保存;ICR小鼠,雄性,购自上海斯莱克实验动物有限公司(实验动物许可证号:SCXK沪2012-0002)。

### 1.4 实验方法

#### 1.4.1 浒苔多酚的提取及分离

新鲜浒苔藻体10 kg洗净,冷冻干燥,粉碎得到1.15 kg;用95%乙醇按料液比1:20于35℃摇床200

r/min提取三次,每次2 h,过滤收集提取液;合并滤液,减压浓缩去除乙醇;浓缩液用等体积石油醚剧烈震荡萃取以除去油脂,分液漏斗静置分层,收集上层水相,重复萃取操作2次;浓缩萃取分离后的水相,冷冻干燥即得粗提物;多次分批提取可得粗提物约73 g。由于水相层提取物中含有较多的糖分,采用硅胶柱层析以去除糖分。硅胶柱高径比20:1(40×2 cm)湿法装柱,上样之后,采用乙酸乙酯-甲醇体系梯度洗脱(按乙酸乙酯:甲醇=10:0、9:1、7:3、5:5、3:7、1:9、0:10顺序阶梯洗脱,每一种比例洗脱1 Bv),洗脱流速0.5 Bv/h,部分收集器收集过柱液。每只试管取样于微孔板中,减压干燥去除有机溶剂,每孔加入同体积积水,以消除有机溶剂对后续分析的干扰;硫酸苯酚法测定糖分含量,采用Folin-Ciocaltea试剂分析多酚含量;绘制洗脱曲线,收集多酚洗脱峰;收集液减压浓缩去除有机溶剂,冷冻干燥即得浒苔多酚(Enteromorpha prolifera polyphenol, EP)样品;为了得到可用于动物实验样品量,在以上实验基础上放大进行硅胶柱层析(60×5 cm柱),相同条件洗脱收集制备样品,多次制备样品后,-20℃保存备用。

#### 1.4.2 浒苔多酚体外抗氧化DPPH·自由基清除实验

采用Shon等<sup>[3]</sup>的方法,略有改动,简述如下:2 mL DPPH·甲醇或水溶液(1 mM)与5 mL提取物溶液混合,振荡摇匀,室温避光放置30 min。用2 mL蒸馏水代替样品作为阴性对照,相同方法处理;以BHT为阳性对照受试物作参考。于517nm波长测定吸光值。结果用相对于阴性对照的DPPH·清除率(%)来表示,计算公式如下:

$$\text{清除率}(\%) = \frac{A_0 - (A_i - A_j)}{A_0} \times 100\%$$

式中: $A_0$ 表示样品与溶剂混合液的吸光度; $A_i$ 表示DPPH·与样品反应后的吸光度; $A_j$ 表示DPPH·与溶剂混合后的吸光度。实验重复三次求平均值。

#### 1.4.3 浒苔多酚改善HepG2胰岛素抵抗实验

首先考察浒苔多酚样品对HepG2细胞毒性作用,将HepG2细胞以 $10^4$ 个/孔接种于96孔板培养,培养24 h,换成含有不同浓度的EP1、EP2及二甲双胍的RPMI-1640培养基(含10% FBS)继续培养48 h,接着吸去培养基,PBS清洗一次,加入100  $\mu$ L的MTT溶液(0.5 mg/mL溶于PBS中),作用4 h,随后吸去MTT溶液,加入150  $\mu$ L DMSO以溶解所生成的甲簪结晶,低速摇动溶解后于酶标仪上测定OD<sub>570 nm</sub>值。样品处理组与对照组相比较可得细胞的相对细胞活性。

IR-HepG2 细胞模型, 采用以前报道方法建模<sup>[14]</sup>, 略作改动简述如下, HepG2 细胞接种于 96 孔板中, 培养条件为: RPMI-1640 培养基, 10% FBS, 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 培养。接种培养 24 h 贴壁后, 改用含 1% FBS 和 5×10<sup>-7</sup> mol/L 高胰岛素浓度的培养基来诱导 IR 模

$$\text{葡萄糖消耗量}(\mu\text{mol}/\text{mg}\text{蛋白}) = \frac{\text{胞外葡萄糖量}(\mu\text{mol})_{\text{oh}} - \text{胞外葡萄糖量}(\mu\text{mol})_{24\text{h}}}{\text{细胞蛋白量}(\text{mg})}$$

式中采用 BCA 试剂盒分析细胞蛋白质。

#### 1.4.4 小鼠实验分组与给药方案

本实验采用食物诱导型肥胖小鼠 (Dietry induced obesity, DIO) 作为研究模型。健康雄性的 6 周龄小鼠正式实验前适应性喂养一周, 喂食普通饲料; 动物房恒温 27 °C, 光照/黑暗各持续 12 h, 周期循环。小鼠随机分为 5 组, 每组 10 只, 每日上午灌胃给药一次, 持续 6 周, 组别设置如下所示:

阴性对照组: 喂食普通基础饲料 (Normal diet, ND), 灌胃生理盐水, 每日一次;

DIO 模型对照组: 喂食高脂饲料 (High fat diet, HFD), 灌胃生理盐水, 每日一次;

EP1 组: 喂食 HFD, 灌胃 EP1 生理盐水溶液, 剂量 100 mg/kg, 每日一次;

EP2 组: 喂食 HFD, 灌胃 EP2 生理盐水溶液, 剂量 100 mg/kg, 每日一次;

盐酸二甲双胍组: 喂食 HFD, 灌胃二甲双胍生理盐水溶液, 剂量 20 mg/kg, 每日一次。

实验中基础饲料的脂肪热量百分比为 10%, 而高脂饲料的为 60%。实验期间每周称重一次, 实验结束时, 禁食过夜, 眼眶取血, 收集血清测定各指标; 颈椎断裂处死小鼠, 解剖, 测定各指标。

#### 1.4.5 OGTT、HOMA-ISI 及 HOMA-IR 的测定

口服葡萄糖耐量测试 (oral glucose tolerance test, OGTT): 小鼠禁食过夜, 用 20% 葡萄糖水溶液灌胃, 灌胃量 2 g/kg 体重, 于第 0、30、60、120 min 分别尾静脉穿刺取血测定血糖, 血糖浓度用强生 OneTouch Ultra 血糖仪测定, 计算血糖曲线下面积 (area under curve, AUC)。

稳态模式评估法测定胰岛素抵抗指数 (Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance, HOMA-IR) 和胰岛素敏感指数 (Homeostasis Model Assessment of Insulin Sensitivity Index, HOMA-ISI) 测定: 小鼠禁食过夜, 眼眶静脉毛细管采血, 分离血清, 分别测定空腹血糖值 (FBG) 和空腹血胰岛素值 (FINS),

$$\text{HOMA-IR} = \text{FBG}(\text{mmol}/\text{L}) \times \text{FINS}(\text{mU}/\text{L}) / 22.5,$$

$$\text{HOMA-ISI} = \ln[22.5 / (\text{FBG} \times \text{FINS})]。$$

型, 诱导培养 24 h 即可得到 IR-HepG2 细胞。

HepG2 细胞造模后, 用含有 1×10<sup>-9</sup> mol/L 胰岛素和各种不同浓度受试样品的培养基处理 IR-HepG 细胞 24 h, 各微孔取 10 μL 培养基测定葡萄糖浓度, 计算葡萄糖消耗量。计算公式为:

#### 1.4.6 生化测定

小鼠禁食过夜后, 腹腔注射水合氯醛, 麻醉后摘除眼球采血, 血液放置凝血后 3500 r/min 离心收集血清, 分装, -80 °C 保存待测。总胆固醇 (TCHO)、甘油三酯 (TG)、高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C)、血糖、胰岛素、SOD、MDA 和 CAT 等生化指标按照所购试剂盒说明书以微板法测定。另解剖小鼠, 取肝脏及大腿肌肉, -80 °C 保存以备糖原测定, 肝糖原和肌糖原测定按照试剂盒说明书操作。

#### 1.4.7 小鼠肝脏指数、体脂比及 Lee's 指数的测定

先测定各组小鼠体重及体长 (鼻尖至肛门距离); 小鼠采血后颈椎脱臼处死, 解剖取肝脏和下腹各部脂肪, 用水清洗, 滤纸吸干表面水分后称重; 肝脏指数 = 肝脏重量/体重 × 100%; 体脂比 = 脂肪重/体重 × 100%; Lee's 指数 = [体重(g)]<sup>1/3</sup>/体长(cm) × 1000。

### 1.5 数据处理

采用 Origin 软件单因素方差分析,  $p < 0.05$  表明差异有显著性,  $p < 0.01$  表明差异极为显著。结果用 mean ± SE 表示。

## 2 结果与讨论

### 2.1 浒苔多酚的提取分离

结果如图 1 所示, 经石油醚萃取除去油脂而分离得到的浒苔多酚粗提物中还有较高含量的糖类物质, 主要为海藻中含量较高的小分子碳水化合物类物质 (low molecular mass carbohydrates, LMMCs), 在海藻体内主要发挥维持渗透压的作用, 较易溶于乙酸乙酯等中等极性溶剂。本实验采用硅胶柱层析来分离小分子量糖类物质及多酚类物质。采用乙酸乙酯/甲醇体系进行梯度洗脱, 流动相组成由 100% 乙酸乙酯逐渐过渡到 100% 甲醇, 可得如图 1 所示洗脱效果, 浒苔多酚与浒苔小分子糖份 (小分子量的寡糖、糖苷可溶于有机溶剂, 而较大分子量的多糖则不溶于有机溶剂) 可基本实现分离。

浒苔多酚被大致分成三个组分,洗脱峰2、3占比约80%,而峰1与糖份主峰重叠无法分离。故单独收集峰2、峰3作为纯化的组分EP1、EP2,减压浓缩,冻干样品,用以后续实验。经放大后进行柱层析制备,每次上柱粗提物5 g,可得EP1约1.34 g,EP2约0.26 g。

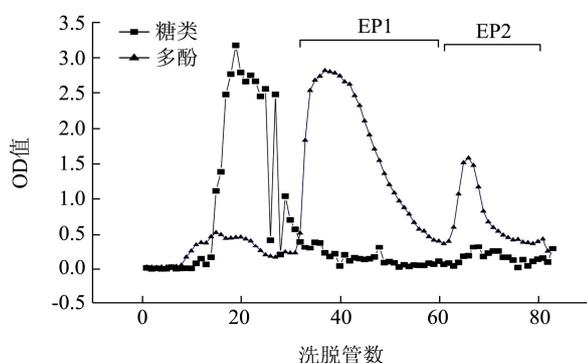


图1 浒苔多酚硅胶柱层析洗脱图谱

Fig.1 Silica gel column chromatogram of EPs

## 2.2 浒苔多酚体外抗氧化 DPPH·自由基清除

实验

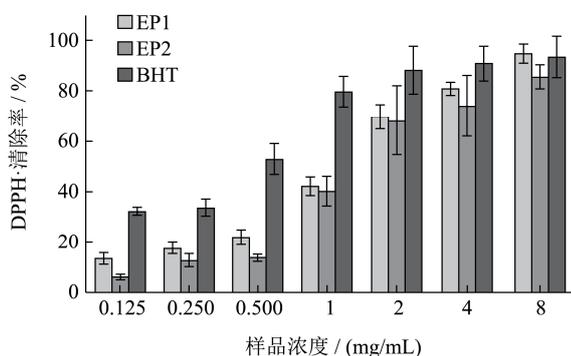


图2 浒苔多酚体外抗氧化DPPH·自由基清除率

Fig.2 Effects of EPs on the DPPH scavenging rate

表1 浒苔多酚清除DPPH自由基 IC50值比较

Table 1 IC<sub>50</sub> of EPs on the DPPH scavenging

样品	IC <sub>50</sub> /(μg/mL)
EP1	1084.22
EP2	1427.8
BHT	439.32

DPPH 作为一种较稳定的自由基供体,广泛用于天然抗氧化剂自由基清除能力的评估。化合物对 DPPH·的清除能力主要取决于其对未成对电子的配对能力。自由基清除实验结果如图 2、表 1 所示。几种受试物相比较,阳性对照品 BHT 的 DPPH·清除能力最强,在 2、4、8 mg/mL 浓度时清除率均超过 90%,在最低浓度 0.125 mg/mL 时清除率也超过 32%,计算其 IC<sub>50</sub>约为 0.44 mg/mL;其次是 EP1,其 DPPH·清除

能力呈现明显的浓度依赖性,8 mg/mL 浓度时清除率为 94.5%,0.125 mg/mL 时为 13%,其 IC<sub>50</sub>约为 1.08 mg/mL;EP2 同样也具有较弱的清除能力,最高浓度时仅为 85.4%,IC<sub>50</sub>约为 1.43 mg/mL。由此可见,浒苔多酚的两种组分都具有较强的 DPPH 自由基清除能力,其中 EP1 优于 EP2,但二者的 IC<sub>50</sub> 值均小于化学合成阳性对照品 BHT。

## 2.3 浒苔多酚对正常 HepG2 细胞活性的影响

结果如图3所示,通过MTT法各组细胞活性,在正常后续处理剂量下(0~50 μg/mL),浒苔多酚EP1、EP2对实验细胞株并无毒性作用,细胞活性都保持在95%以上,而只有浒苔多酚浓度增加到500 μg/mL以上时,才表现出明显的细胞抑制作用,此时细胞活性降低至约60%。由此可见,浒苔多酚对实验细胞株较安全,在正常实验剂量下不具有明显的细胞抑制作用,不影响细胞活性。

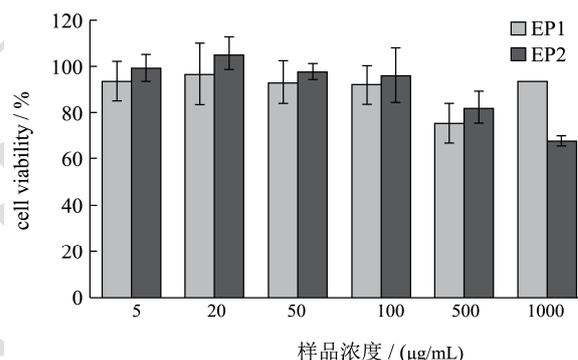


图3 浒苔多酚对HepG2细胞活性的影响

Fig.3 Effect of EPs on HepG2 cell viability

## 2.4 浒苔多酚对 IR-HepG2 细胞吸收葡萄糖的

影响

结果如表 2 所示,与空白对照组相比,模型对照组的葡萄糖消耗量显著降低 ( $p < 0.01$ ),说明在高浓度胰岛素作用下 ( $5 \times 10^{-7}$  mol/L) 能成功建造 IR 细胞模型。在适当浓度的胰岛素 ( $1 \times 10^{-9}$  mol/L) 介导下,浒苔多酚样品可显著改善 HepG2 的胰岛素抵抗状态,EP1 在 10 g/mL 时可将葡萄糖消耗量提升至 38.17 mol/mg 细胞蛋白 ( $p < 0.05$ ),而当剂量增加到 20 g/mL 时,葡糖消耗值随之增加到 40.65 mol/mg,剂量为 50 g/mL 时,葡糖消耗值反而会下降至 34.37 mol/mg,并无剂量依赖性;而 EP2 在三个剂量下,葡糖消耗值虽然较模型对照有所上升,但并没有明显统计学差异;二甲双胍的提升作用则很明显,20 g/mL 剂量可提升至 45.49 ( $p < 0.01$ ),甚至高于空白对照组的 41.34

mol/mg 细胞蛋白。结果表明在体外细胞模型水平上, 泮苔多酚 EP1 可有效改善 HepG2 细胞的胰岛素抵抗状态, 而 EP2 则无明显的作。

表 2 泮苔多酚对 IR-HepG2 细胞吸收葡萄糖的影响(mean±SE, n=6)

**Table 2 Effects of EPs on the glucose intake of IR-HepG2 cells (mean ± SE, n = 6)**

组别	剂量/(μg/mL)	胞外葡萄糖消耗量/(μmol/mg 细胞蛋白)
空白对照组	-	41.34±2.15 <sup>a</sup>
模型对照组	-	33.24±1.92 <sup>b</sup>
	10	38.17±1.32 <sup>c</sup>
EP1	20	40.65±2.17 <sup>c</sup>
	50	34.37±1.03 <sup>b</sup>
	10	35.61±2.24 <sup>b</sup>
EP2	20	34.45±1.53 <sup>b</sup>
	50	34.11±1.87 <sup>b</sup>
二甲双胍	20	45.49±2.68 <sup>d</sup>

注: 不同字母表示不同组间显著性差异。

### 2.5 泮苔多酚对肥胖小鼠肝脏指数、体脂比及 Lee's 指数的影响

体脂比与 Lee's 指数是衡量动物肥胖程度的重要指标, 体脂比反映了脂肪所占比重, 直接反映了肥胖程度, Lee's 指数与脂肪重量、血脂等指标密切相关<sup>[15]</sup>。结果如表 3 所示, 与空白组相比, 模型组的肝脏指数增加至 5.83 差异显著 ( $p<0.05$ ), EP1 和 EP2 组与模型组相比分别降低至 4.92 和 4.84 ( $p<0.05$ ), 而二甲双胍组则不具有显著性差异; 体脂比指标, 模型组与空白组相比显著增加至 2.95 ( $p<0.01$ ), 说明脂肪含量

显著增加, EP1 和 EP2 组与模型组相比分别减少至 2.24 和 2.31 ( $p<0.05$ ), 二甲双胍组下降至 2.19 ( $p<0.01$ ); Lee's 指数, 三种药物组与模型组的 323.18 相比都显著降低 ( $p<0.05$ )。以上结果表明, EP1 和 EP1 都能在一定程度上抑制由于高脂饲料所致的小鼠致肥胖作用, 降低脂肪含量, 减轻体重和肝脏重量, 但其具体作用机理还需后续进一步研究。

表 3 泮苔多酚对肥胖小鼠肝脏指数、体脂比及 Lee's 指数的影响(mean±SE, n=10)

**Table 3 Effects of EPs on liver index/body fat ratio/Lee's index (mean ± SE, n = 10)**

组别	肝脏指数	体脂比	Lee's
空白对照	4.74±0.57 <sup>a</sup>	1.53±0.23 <sup>a</sup>	305.79±21.54 <sup>a</sup>
模型对照	5.83±0.46 <sup>b</sup>	2.95±0.37 <sup>b</sup>	323.18±9.63 <sup>b</sup>
EP1	4.92±0.55 <sup>a</sup>	2.24±0.18 <sup>c</sup>	311.42±10.03 <sup>a</sup>
EP2	4.84±0.41 <sup>a</sup>	2.31±0.32 <sup>c</sup>	312.13±13.46 <sup>a</sup>
二甲双胍	5.24±0.27 <sup>b</sup>	2.19±0.27 <sup>c</sup>	310.77±12.58 <sup>a</sup>

注: 不同字母表示不同组间显著性差异。

### 2.6 泮苔多酚对肥胖小鼠口服葡萄糖耐量 (OGTT) 的影响

如表 4 所示, 与空白对照组相比模型对照组的 AUC 为 1610.9, 增加极显著 ( $p<0.01$ ), 表明模型组小鼠葡萄糖耐受能力显著降低。通过 6 周的药物干预, 泮苔多酚能在一定程度上改善肥胖小鼠的葡萄糖耐受能力, 与模型组相比, EP1 组的 AUC 为 1533.7 ( $p<0.05$ ), 而 EP2 也能降低但不具有显著性; 二者降低 AUC 幅度明显低于二甲双胍组 ( $p<0.01$ ), 其 AUC 值为 1345.7。说明泮苔多酚 EP1 具有轻度改善肥胖小鼠口服葡萄糖耐受作用。

表 4 泮苔多酚对肥胖小鼠糖耐量的影响(mean±SE, n=10)

**Table 4 Effects of EPs on OGTT (mean ± SE, n = 10)**

组别	血糖/(mmol/L)				AUC/(mmol/L×min)
	0 min	30 min	60 min	120 min	
空白对照组	7.2±0.2 <sup>a</sup>	15.4±0.6 <sup>a</sup>	10.3±0.5 <sup>a</sup>	7.5±0.3 <sup>a</sup>	1257.3±54.6 <sup>a</sup>
模型对照组	9.4±0.4 <sup>b</sup>	20.5±1.3 <sup>b</sup>	13.6±0.9 <sup>b</sup>	9.3±0.7 <sup>b</sup>	1610.9±45.3 <sup>b</sup>
EP1	8.1±0.3 <sup>c</sup>	17.7±1.1 <sup>c</sup>	13.9±0.4 <sup>b</sup>	8.1±0.5 <sup>c</sup>	1533.7±59.5 <sup>c</sup>
EP2	8.3±0.7 <sup>c</sup>	17.2±1.3 <sup>ac</sup>	14.6±1.5 <sup>b</sup>	8.6±0.9 <sup>c</sup>	1582.1±72.5 <sup>cb</sup>
二甲双胍	7.5±0.8 <sup>ac</sup>	16.8±1.4 <sup>ac</sup>	10.6±0.8 <sup>a</sup>	7.9±0.6 <sup>c</sup>	1345.7±38.7 <sup>d</sup>

注: 不同字母表示不同组间显著性差异。

### 2.7 泮苔多酚对肥胖小鼠血糖、胰岛素、HOMA-IR 及 HOMA-ISI 指数的影响

如表 5 所示, 实验结束时, 模型组小鼠的 HOMA-IR 为 3.75, 显著高于空白组的 2.35 ( $p<0.01$ ), 表明胰岛素抵抗造模成功。与模型组相比, EP1 组的 HOMA-IR 指数为 3.12 显著降低 ( $p<0.05$ ), 降低幅度

为 16.8%，二甲双胍组的为 2.67 ( $p<0.01$ )，降低幅度为 28.8%；而 EP2 组的指数虽有所降低，但同样不具有显著性。对于 HOMA-ISI 指数，除二甲双胍组外 ( $p<0.05$ ) 外，EP1 和 EP2 组与模型组相比都不具有

显著性差异。以上结果表明，浒苔多酚 EP1 可降低肥胖小鼠空腹血糖及胰岛素含量，改善胰岛素抵抗状态，而 EP2 不具有改善胰岛素抵抗的作用。

表 5 浒苔多酚对血糖、胰岛素、HOMA-IR 及 HOMA-ISI 指数的影响 (mean±SE, n=10)

Table 5 Effects of EPs on blood glucose, blood insulin, HOMA-IR, HOMA-ISI (mean ± SE, n = 10)

组别	血糖含量/(mmol/L)	胰岛素/(mU/L)	HOMA-ISI	HOMA-IR
空白对照	7.1±0.7 <sup>a</sup>	7.82±0.91 <sup>a</sup>	-0.91±0.11 <sup>a</sup>	2.35±0.39 <sup>a</sup>
模型对照	9.2±0.6 <sup>b</sup>	9.34±0.77 <sup>b</sup>	-1.35±0.25 <sup>b</sup>	3.75±0.47 <sup>b</sup>
EP1	8.0±1.1 <sup>c</sup>	8.87±1.17 <sup>b</sup>	-1.17±0.28 <sup>b</sup>	3.12±0.18 <sup>c</sup>
EP2	8.5±0.9 <sup>b</sup>	9.15±1.23 <sup>b</sup>	-1.26±0.17 <sup>b</sup>	3.43±0.51 <sup>c</sup>
二甲双胍	7.6±0.7 <sup>ac</sup>	8.23±0.87 <sup>c</sup>	-1.07±0.13 <sup>ac</sup>	2.67±0.35 <sup>ad</sup>

注：不同字母表示不同组间显著性差异。

## 2.8 浒苔多酚对肥胖小鼠血脂水平的影响

如表 6 所示，与空白组相比，模型组的各项血脂生化指标都显著升高。对于甘油三酯 (TG) 指标，与模型组相比，二甲双胍组含量为 1.21 mmol/L，显著降低 ( $p<0.05$ )，而 EP1 和 EP2 组不具有显著差异；对于总胆固醇 (TCHO) 指标，EP1 和二甲双胍组含量分别为 4.07 和 3.58 mmol/L，与模型组的 4.87 mmol/L 相比显著降低 ( $p<0.05$ )，降低幅度分别为 16.6%和

26.5%，而 EP2 组不具有显著性差异；对于高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C) 指标，三种受试样品与模型组相比并无明显区别；对于低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 指标，模型组含量最高为 0.58 mmol/L，EP1 和 EP2 组分别为 0.47 和 0.44 mmol/L，与模型组比显著降低 ( $p<0.05$ )。以上结果表明，浒苔多酚 EP1 能显著降低肥胖小鼠的 TCHO 和 LDL-C 水平，而对 TG 和 HDL-C 影响不明显；EP2 则只对 LDL-C 有显著抑制，对其他指标影响不明显。

表 6 浒苔多酚提取物对肥胖小鼠血脂水平的影响 (mean±SE, n=10)

Table 6 Effects of EPs on blood lipids (mean ± SE, n = 10)

组别	TG/(mmol/L)	TCHO/(mmol/L)	HDL-C/(mmol/L)	LDL-C/(mmol/L)
空白对照	1.07±0.21 <sup>a</sup>	3.15±0.68 <sup>a</sup>	2.11±0.13 <sup>a</sup>	0.34±0.02 <sup>a</sup>
模型对照	1.48±0.34 <sup>b</sup>	4.87±0.54 <sup>b</sup>	3.24±0.66 <sup>bc</sup>	0.58±0.04 <sup>b</sup>
EP1	1.35±0.15 <sup>b</sup>	4.06±0.71 <sup>c</sup>	3.36±0.48 <sup>b</sup>	0.47±0.08 <sup>c</sup>
EP2	1.40±0.37 <sup>b</sup>	4.37±0.82 <sup>c</sup>	2.97±0.15 <sup>c</sup>	0.44±0.07 <sup>c</sup>
二甲双胍	1.21±0.23 <sup>c</sup>	3.58±0.77 <sup>ac</sup>	3.59±0.27 <sup>b</sup>	0.42±0.06 <sup>c</sup>

注：不同字母表示不同组间显著性差异。

## 2.9 浒苔多酚对肥胖小鼠肝糖原、肌糖原及抗氧化指标的影响

结果如表 7 所示，与空白组相比，模型组的肝糖原指标都显著低于空白组的 9.74 mg/g ( $p<0.01$ )，EP1 和 EP2 组与模型组相比并无明显改善，而二甲双胍组能显著提高肥胖小鼠的肝糖原至 7.78 mg/g ( $p<0.05$ )；肌糖原指标的结果与肝糖原的大致相似；模型组的肝葡萄糖激酶活性为 2.87 U/mg 蛋白，与空白组相比降低约 35.5% ( $p<0.01$ )，EP1 组、二甲双胍组与模型组相比，其酶活增加幅度分别为 31.1%和 35.2% ( $p<0.05$ )；模型组的 SOD 活性为 44.92 U/mg 蛋白、CAT 为 2.15 U/mg 蛋白，与空白组相比显著降低，三

种药物组与模型组相比 SOD 活性都显著增加 ( $p<0.05$ )，而 CAT 活性除二甲双胍组为 2.35U/mg 不具有显著性外，EP1 和 EP2 都具有显著性差异 ( $p<0.05$ )；模型组的 MDA 含量为 9.39 mmol/L 高于空白组 ( $p<0.01$ )，EP1 组为 5.36 mmol/L 与模型组相比显著降低 ( $p<0.01$ )，EP2 组为 7.38 mmol/L 也具有显著性 ( $p<0.05$ )，而二甲双胍组不具有显著性差异。

胰岛素可通过一些重要的组织器官诸如肝脏、肌肉组织和脂肪组织来调节血糖。当机体处于胰岛素抵抗状态，由于血糖浓度较高，致使肝糖原、肌糖原等储能物质降低。本实验结果表明，浒苔多酚虽能一定程度改善 IR 状态，但提升肝糖原、肌糖原效果却并不显著，而二甲双胍却能同步改善胰岛素抵抗状态和提高肝糖原、肌糖原水平。

葡萄糖激酶是调节血糖的重要酶,催化葡萄糖磷酸化来监控血糖水平。较高的葡萄糖激酶活性有助于肝脏中葡萄糖的利用和吸收<sup>[16]</sup>,而葡萄糖激酶基因的表达水平又与机体 IR 状态密切相关<sup>[17]</sup>。实验结果表明,浒苔多酚 EP1 能提高 IR 肥胖小鼠的肝葡萄糖激酶活性,也证明了其具有改善肥胖小鼠 IR 状态的功能。

机体正常水平的自由基和脂质过氧化反应对维持机体的代谢过程必不可少,但当二者处于过高的水平时,会破坏机体平衡,形成自由基连锁反应,损害生物膜,对一些重要的细胞器甚至细胞的结构和功能会产生不可逆性损伤,例如内质网、线粒体等。现已发

现高血压、II 型糖尿病和肥胖等慢性疾病都和体内过高的活性氧(Reactive oxygen species, ROS)或内质网应激状态(Endoplasmic reticulum stress, ERS)密切相关<sup>[18]</sup>。超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)是机体重要的自由基清除酶,丙二醛(MDA)为机体脂质过氧化产物。实验结果表明,浒苔多酚 EP1 和 EP2 都能显著改善肥胖小鼠的体内抗氧化指标,结合前述实验结果 EP1 具有一定的改善 IR 作用,而 EP2 改善 IR 作用并不显著却能降低小鼠的肥胖程度,推测 EP1 和 EP2 可能是通过发挥抗氧化作用来抑制机体 ROS 水平,从而改善 IR 状态和降低肥胖程度,但其中具体机制还需进一步深入研究。

表 7 浒苔多酚提取物对肥胖小鼠肝糖原、肌糖原及抗氧化指标的影响(mean±SE, n=10)

Table 7 Effects of EPs on hepatic glycogen, muscle glycogen, and antioxidant indexes (mean ± SE, n = 10)

组别	肝糖原 /(mg/g)	肌糖原 /(mg/g)	肝葡萄糖激酶 /(U/mg 蛋白)	SOD /(U/mg 蛋白)	CAT /(U/mg 蛋白)	MDA /(nmol/mL)
空白对照	9.74±1.32 <sup>a</sup>	1.61±0.21 <sup>a</sup>	4.45±0.57 <sup>a</sup>	67.51±12.64 <sup>a</sup>	3.97±0.73 <sup>a</sup>	4.49±0.58 <sup>a</sup>
模型对照	6.35±1.46 <sup>b</sup>	1.34±0.19 <sup>b</sup>	2.87±0.40 <sup>b</sup>	44.92±5.28 <sup>b</sup>	2.15±0.41 <sup>b</sup>	9.39±2.01 <sup>b</sup>
EP1	7.16±1.75 <sup>b</sup>	1.39±0.38 <sup>b</sup>	3.76±0.48 <sup>c</sup>	56.17±15.32 <sup>c</sup>	2.93±0.84 <sup>c</sup>	5.36±1.14 <sup>a</sup>
EP2	6.54±1.01 <sup>b</sup>	1.41±0.33 <sup>b</sup>	3.42±0.33 <sup>cb</sup>	54.73±9.87 <sup>c</sup>	2.63±0.24 <sup>c</sup>	7.38±1.80 <sup>c</sup>
二甲双胍	7.78±1.93 <sup>c</sup>	1.59±0.44 <sup>a</sup>	3.88±0.52 <sup>c</sup>	56.13±13.44 <sup>c</sup>	2.35±0.53 <sup>b</sup>	8.67±2.10 <sup>b</sup>

注:不同字母表示不同组间显著性差异。

### 3 结论

本工作从绿藻浒苔中提取分离得到了两种多酚组分 EP1 和 EP2。EP1 具有较好的抗氧化作用,其体外 DPPH·清除 IC<sub>50</sub> 为 1.08 mg/mL,与模型组相比,EP1 能显著提高小鼠肝脏抗氧化酶 SOD、CAT 活性达 25.04%、36.28%,降低血清 MDA 水平可达 42.92%;EP1 可显著改善 HepG2 细胞及 DIO 小鼠的 IR 状态 ( $p<0.05$ ),其抑制 HOMA-IR 指数幅度可达 16.8%;EP1 还能抑制 DIO 小鼠的肥胖程度,降低脂肪比例 ( $p<0.05$ );而另一组份 EP2 的抗氧化及改善胰岛素抵抗作用均不及 EP1。EP1 的改善 IR 状态机制可能与其发挥抗氧化作用抑制机体 ROS 水平有关。

### 参考文献

- [1] 杨欢,黎中宝.浒苔在动物营养中的研究进展[J].安徽农业科学,2015,43(6):158-160  
YANG Huan, LI Zhong-bao. Research progress of enteromorpha prolifera in animal nutrition [J]. Journal of Anhui Agricultural Science, 2015, 43(6): 158-160
- [2] 魏鉴腾,裴栋,刘永峰,等.浒苔多糖的研究进展[J].海洋科学,2014,38(1):91-95  
WEI Jian-teng, PEI Dong, LIU Yong-feng, et al. Research

- progress of polysaccharides from enteromorpha [J]. Marine Sciences, 2014, 38(1): 91-95
- [3] 林文庭,张智芳.浒苔多糖降血脂及抗脂质过氧化作用[J].中国公共卫生,2009,25(5):567-569  
LIN Wen-ting, ZHANG Zhi-fang. Study on effect of enteromorpha prolifera polysaccharide on hyperlipidemia and anti-lipid peroxidation in rats [J]. China public Health, 2009, 25(5): 567-569
- [4] Bing L, Song L, Xing R, et al. Degradation of sulfated polysaccharides from enteromorpha prolifera and their antioxidant activities [J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 92(2): 1991-1996
- [5] Tang Z, Gao H, Shuai W, et al. Hypolipidemic and antioxidant properties of a polysaccharide fraction from enteromorpha prolifera [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2013, 58(7): 186-189
- [6] Kim J K, Cho M L, Karnjanapratum S, et al. In vitro and in vivo immunomodulatory activity of sulfated polysaccharides from enteromorpha prolifera [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2011, 49(5): 1051-1058
- [7] Cho M L, Lee H S, Kang I J, et al. Antioxidant properties of extract and fractions from enteromorpha prolifera, a type of green seaweed [J]. Food Chemistry, 2011, 127(3): 999-1006

- [8] Li J, Wang G, Wang Z, et al. Conversion of enteromorpha prolifera to high-quality liquid oil via deoxy-liquefaction [J]. Journal of Analytical & Applied Pyrolysis, 2013, 104(11): 494-501
- [9] Dong Z, Zhang S, Fu H, et al. Liquefaction of macroalgae enteromorpha prolifera in sub-/supercritical alcohols: direct production of ester compounds [J]. Energy & Fuels, 2012, 26(4): 2342-2351
- [10] Kovatcheva E G, Koleva I I, Ilieva M, et al. Antioxidant activity of extracts from lavandula vera MM cell cultures [J]. Food Chemistry, 2001, 72(3): 295-300
- [11] Ma X, Zhou F, Chen 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
- [12] Zhang H J, Ji B P, Chen G, et al. A combination of grape seed-derived procyanidins and gypenosides alleviates insulin resistance in mice and HepG2 Cells [J]. Journal of Food Science, 2009, 74(1): H1-H7
- [13] Shon M Y, Kim T H, Sung N J. Antioxidants and free radical scavenging activity of *Phellinus baumii* (*Phellinus* of *Hymenochaetaceae*) extracts [J]. Food Chemistry, 2003, 82(4): 593-597
- [14] Xie W, Wang W, Su H, et al. Effect of ethanolic extracts of Ananas comosus L. leaves on insulin sensitivity in rats and HepG2 [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 2006, 143(4): 429-435
- [15] 何明,涂长春,黄起壬,等.Lee's 指数用于评价成年大鼠肥胖程度的探讨[J].中国临床药理学与治疗学杂志,1997,2(3): 177-179  
HE Ming, TU Chang-chun, HUANG Qi-ren, et al. Approach on exerting Lee's index to evaluate the obese degree of mature rats [J]. Chinese Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics, 1997, 2(3): 177-179
- [16] Jung U J, Baek N I, Chung H G, et al. Effects of the ethanol extract of the roots of brassica rapa on glucose and lipid metabolism in C57BL/KsJ-db/db mice [J]. Clinical Nutrition, 2008, 27(1): 158-167
- [17] Granner D, Pilkis S. The genes of hepatic glucose metabolism [J]. Journal of Biological Chemistry, 1990, 265(18): 10173-10176
- [18] Hosoi T, Yamaguchi R, Noji K, et al. Flurbiprofen ameliorated obesity by attenuating leptin resistance induced by endoplasmic reticulum stress [J]. EMBO Molecular Medicine, 2014, 6(3): 335-346