

多花黄精提取物体外干预 3T3-L1 前脂肪细胞并缓解其脂质积累

李婷婷, 严晓雪, 周溯, 鲍星宇, 蒋益虹*

(浙江大学生物系统工程与食品科学学院, 浙江杭州 310058)

摘要: 研究多花黄精提取物对 3T3-L1 前脂肪细胞以及分化后成熟脂肪细胞的作用。用 $\varphi=70\%$ 乙醇和复合酶 (纤维素酶:木瓜蛋白酶=3:7) 为提取剂, 分别提取出多花黄精生品乙醇提取物 (Raw Products Extract, RPE)、多花黄精九蒸九制品乙醇提取物 (Processed Products Extract, PPE) 和多花黄精生品多糖 (Polysaccharide from *Polygonatum cyrtonema* Hua, CPP); 得到的九蒸九制品提取物中多糖质量百分比减少 (RPE 29.83%, PPE 1.92%), 但表现出更高的皂苷、总黄酮和总酚含量 (13.63%、5.37 mg/g、14.52 mg/g)。各多花黄精提取物处理 3T3-L1 细胞后, 均观察到 3T3-L1 前脂肪细胞被阻滞在 G0/G1 和 S 期, 细胞被诱导凋亡从而抑制细胞的增殖, 成熟脂肪细胞内脂滴沉积量和甘油三酯 (Triglyceride, TG) 所占比例显著降低, 且高剂量组的 PPE (380 $\mu\text{g/mL}$) 对降低 TG 占比的效果最显著, 与市售多花黄精九蒸九制品多糖 (Polysaccharides from Purchased Products, PP) 无显著差异。此外, 脂肪生成和脂肪酸氧化有关基因也可受到调控, 包括抑制 PPAR γ 、C/EBP α 、FABP4 和 LPL 的 mRNA 表达, 促进 CPT-1 的 mRNA 表达。结果提示, 多花黄精提取物可防止脂肪细胞在体外积聚脂肪, 表明多花黄精可能具有抗肥胖作用。

关键词: 多花黄精; 乙醇提取物; 多糖; 3T3-L1; 脂肪堆积

文章编号: 1673-9078(2023)12-95-106

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.12.0057

Polygonatum cyrtonema Hua Extracts Inhibits 3T3-L1 Preadipocytes *in Vitro* and Alleviates Lipid Accumulation

LI Tingting, YAN Xiaoxue, ZHOU Su, BAO Xingyu, JIANG Yihong*

(College of Biosystems Engineering and Food Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract: The effects of *Polygonatum cyrtonema* Hua extract on 3T3-L1 preadipocytes and differentiated adipocytes were examined. Raw product extract (RPE), processed product extract (PPE), and polysaccharides (CPP) were obtained using $\varphi=70\%$ ethanol and complex enzymes (cellulase: papain=3:7). Higher saponin, total flavonoid, and total phenol contents (13.63%, 5.37 mg/g, 14.52 mg/g) were obtained in the extract of processed products. Following treatment of 3T3-L1 cells with the extract, it was observed that the preadipocytes were blocked in the G0/G1 phases, thereby inducing apoptosis and inhibiting cell proliferation; in addition, mature adipocytes exhibited significantly less lipid droplet formation and triglyceride (TG) content. PPE at 380 $\mu\text{g/mL}$ had the most remarkable effect on reducing TG content, showing no significant difference compared to commercially available polysaccharide products (PP). Furthermore, the expression of genes associated with lipogenesis and fatty acid oxidation could be regulated, including inhibiting the mRNA expression of PPAR γ , C/EBP α , FABP4, and LPL and promoting the mRNA expression of CPT-1. Thus, the findings of this study show that *P. cyrtonema* extract has the potential to prevent fat accumulation *in vitro*, suggesting its possible anti-obesity effects.

Key words: *Polygonatum cyrtonema* Hua; ethanol extract; polysaccharide; 3T3-L1; fat accumulation

引文格式:

李婷婷, 严晓雪, 周溯, 等. 多花黄精提取物体外干预 3T3-L1 前脂肪细胞并缓解其脂质积累[J]. 现代食品科技, 2023, 39(12): 95-106

LI Tingting, YAN Xiaoxue, ZHOU Su, et al. *Polygonatum cyrtonema* Hua extracts inhibits 3T3-L1 preadipocytes *in vitro* and alleviates lipid accumulation [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(12): 95-106

收稿日期: 2023-01-17

基金项目: 浙江省科技厅重大研发项目 (2021C02020); 宁波市重点研发项目 (2022Z174)

作者简介: 李婷婷 (1998-), 女, 硕士生, 研究方向: 药食同源食品的研究开发, E-mail: 22013029@zju.edu.cn

通讯作者: 蒋益虹 (1972-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 药食同源食品的研究开发, E-mail: yhjiang6@zju.edu.cn

肥胖属于慢性疾病的范畴,由体内脂肪过度堆积致使体质量异常增长引起,与相关种类癌症、心血管疾病、中风等的发病率和死亡率上升具有密切关系^[1]。迄今为止,已有许多研究对天然食品成分的抗肥胖活性进行了评估。先前临床试验表明,天然植物提取物中的黄酮类^[2]、萜类^[3]、多酚类^[4]等化合物具有降低肥胖小鼠体重和抑制脂肪细胞增大等作用。一些研究还表明,甘油三酯、胆固醇等代谢生物标志物水平与植物多糖水平呈负相关,且植物多糖因相对无毒、副作用少的优势,在天然植物通过调节肠道菌群减肥方面更受关注^[5-7]。Yuan 等^[8]发现,植物多糖还可以通过降低过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (Peroxisome Proliferators-Activated Receptors Gamma, PPAR γ)、CCAAT/增强子结合蛋白 α (CCAAT/Enhancer Binding Protein Alpha, C/EBP α)、甾醇调节元件结合蛋白-1c (Sterol Regulatory Element Binding Proteins-1c, SREBP-1c)、脂肪酸合酶 (Fatty Acid Synthase, FAS) 等脂代谢相关 mRNA 的水平发挥作用,使 3T3-L1 细胞在分化之后胞内脂肪积累受阻。这些表明含有丰富多糖的植物提取物可能有助于防止脂肪积累。

黄精 (*Rhizoma polygonati*) 是百合科 (Liliaceae) 黄精属 (*Polygonatum* Mill.) 多年生草本植物,根茎可药食两用。黄精属植物包括 71 种,约 40 种有药用记录^[9]。黄精主要生长在北温带,并在中国、日本和韩国广泛食用。药用黄精有 3 种^[10],其中多花黄精(俗称“姜形黄精”)含有丰富的多糖、皂苷、黄酮类、生物碱、木质素、凝集素等功能成分,尤其是多糖,具有潜在的治疗作用^[11-18]。已有研究证明,黄精中的多糖成分能够控制能量和脂质代谢,减小脂肪细胞直径和脂滴,具有抗肥胖作用^[19]。因此预计多花黄精提取物可能具有抑制 3T3-L1 细胞脂肪积累的作用。然而,多花黄精提取物抑制脂肪积累这方面研究较少,仍有待探索。

因此本文中自制多花黄精生品乙醇提取物(RPE)、多花黄精九蒸九制品乙醇提取物(PPE)、多花黄精生品多糖(CPP),并购买市售九蒸九制多花黄精多糖(PP),通过体外培养 3T3-L1 细胞,检测了四种提取物处理后 3T3-L1 细胞的增殖、细胞周期、细胞凋亡、细胞分化程度、胞内脂质水平以及脂代谢关键基因表达水平的改变,研究探讨多花黄精提取物对 3T3-L1 细胞分化和脂质积累的作用及机制。此外,比较了自制多花黄精乙醇提取物、多花黄精生品多糖和市售九蒸九制多花黄精多糖的预防效果和相关活性成分的质

量分数,为多花黄精系列食品在肥胖及相关疾病防治的效果提供了科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

多花黄精 (*Polygonatum cyrtonema* Hua) 生品采自浙江省宁波市宁海县;九蒸九制品购自湖南省娄底市新化县颐朴源黄精科技有限公司;市售多花黄精九蒸九制品多糖(PP)来自上海源叶生物科技有限公司。

3T3-L1 前脂肪细胞,中科院上海细胞库;胰岛素 (Insulin, INS), Solarbio 公司;3-异丁基-1-甲基黄嘌呤 (3-Isobutyl-1-Methylxanthine, IBMX)、地塞米松 (Dexamethasone, DEX), Sigma-Aldrich 公司;TG 试剂盒,南京建成生物工程研究所;芦丁标准品、纤维素酶 (50 U/g)、木瓜蛋白酶 (≥ 200 U/g)、MTT,上海源叶生物科技有限公司;葡萄糖标准品,上海麦克林生物科技有限公司;薯蓣皂苷元、没食子酸标准品,杭州金百奥生物科技有限公司;胎牛血清,四季青公司;1%青霉素/链霉素溶液 (100 U/mL)、DMEM 培养基、0.25%胰蛋白酶, Biosharp 公司;RNAiso Plus、PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser、TB Green Premix Ex TaqTM II, TaKaRa 公司;引物序列,根据 GenBank 提供的小鼠 PPAR γ 、C/EBP α 、LPL、SREBP-1c、FABP4、CPT-1 和 β -actin 基因 mRNA 的 CDS 序列,于 NCBI 网站自行设计上下游引物(表 1),交由北京擎科生物有限公司合成。

1.2 仪器与设备

Eon 酶标仪, BioTek 公司;BD FACSVerser 流式细胞仪,碧迪公司;CP-ST200A CO₂ 培养箱,长沙长锦科技有限公司;SW-CJ-2F 超净工作台,上海博讯实业有限公司;CKX41GF 倒置显微镜, Olympus 公司;RE-52AAA 旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器厂;SHZ-D (III) 循环水式真空泵,杭州瑞佳精密科学仪器有限公司;DK-S24 恒温水浴锅,上海精宏实验设备有限公司;万能粉碎机,温岭市林大机械有限公司;FE20 实验室 pH 计, METTLER TOLEDO (上海) 有限公司;Centrifuge 5423 R 冷冻离心机, Eppendorf 公司;FD-1C-50 冷冻干燥机,北京博医康实验仪器有限公司;Long Gene A200 梯度热循环仪,杭州朗基科学仪器有限公司;Nanodrop 2000 微量核酸蛋白分析仪, Thermo Fisher Scientific 公司;QuantStudio3 实时荧光定量 PCR 仪, Life Technologies ABI 公司。

1.3 方法

1.3.1 提取物制备

预处理: 新鲜根茎样品用水冲洗后烘干(干燥前后质量差小于 0.000 3 g), 用植物万能粉碎机制粉。

RPE 的制备: 多花黄精生品粉末按料液比 1:5 (g/mL) 加入 $\varphi=70\%$ 乙醇, 25 °C 浸泡 3 d 后纱布过滤, 滤液浓缩冻干, -18 °C 冰箱保存。

PPE 的制备: 多花黄精九蒸九制品粉末同 RPE 步骤。

CPP 的制备参考苑璐等^[20]的方法并改进: 称取 10 g 多花黄精生品粉末, 按料液比 1:10 (g/mL) 加入石油醚 100 mL, 用索氏法 85 °C 提取 2 h, 抽提后将残留石油醚挥干。转移滤渣, 按料液比 1:10 (g/mL) 加入 $\varphi=80\%$ 乙醇, 80 °C 水浴回流 2 h, 纱布过滤, 105 °C 烘干滤渣备用。向脱脂多花黄精粉中加入活化好的复合酶(酶活力比值为纤维素酶:木瓜蛋白酶=3:7), 用磷酸盐缓冲液调节 pH 值至 4.5, 在 45 °C 恒温振荡器中酶解 120 min。提取结束后迅速升温, 沸水浴回流 2 h, 趁热过滤。滤液蒸发浓缩至 10 mL, 再加入 40 mL 无水乙醇。搅拌均匀后 4 °C 静置 24 h, 离心 10 min, 沉淀按 $\varphi=95\%$ 乙醇-无水乙醇-丙酮-无水乙醚顺序洗涤, 冷冻干燥。

样品药物制备: 将各冻干粉按生药量 50 000 $\mu\text{g/mL}$ 溶解于蒸馏水中, 在超净台中过 0.22 μm 滤膜, 配置成母液置于 4 °C 保存, 工作时再完全培养基稀释。

1.3.2 提取物中功能成分的测定

多糖参照 2020 版《中国药典》一部, 采用硫酸蒽酮法。总皂苷参考苑璐等^[20,21]的方法测定 OD_{560 nm}, 根据标准曲线计算。总黄酮根据何兰香等^[22]的方法并稍加修改, 采用铝盐显色法。总酚采用福林-酚法, 参照焦劼等^[23,24]的步骤, 并稍作修改。

1.3.3 细胞培养

将 50 mL 胎牛血清和 5 mL 青霉素/链霉素溶液(100 U/mL) 加入 500 mL Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) 高糖培养基制备完整培养基。将细胞复苏后移入 25 cm² 细胞培养瓶, 保持 8~10 mL 体积, 在 37 °C 和 $\varphi=5\%$ CO₂ 环境培养。

1.3.4 MTT 法检测细胞存活率

吸走旧培养基, 换成配制好的给药培养基。每种药物设置 9 个药物质量浓度组, 含有不同质量浓度 RPE (10、50、100、500、1 000、5 000、8 000、10 000、12 000 $\mu\text{g/mL}$), PPE (10、50、100、500、1 000、4 000、5 000、8 000、10 000 $\mu\text{g/mL}$), CPP (10、50、100、500、800、1 000、1 500、2 000、3 000 $\mu\text{g/mL}$) 和 PP (10、30、50、100、500、800、1 000、1 500、2 000 $\mu\text{g/mL}$),

一个溶剂对照组以及一个细胞对照组, 每个处理组设置 6 个平行。培养 24、48、72 h 后, 在各个时间点吸弃原培养液, 换含 MTT (终质量浓度 0.5 mg/mL) 的培养基。4 h 后将培养板上液体不碰底地吸走, 添加 150 μL 二甲基亚砜, 摇床震荡, 待紫色晶体完全溶解, 测定 OD_{570 nm}。计算经药物处理 24、48、72 h 的细胞相对活力和半抑制浓度 (Semi-Inhibitory Concentration, IC₅₀)。

1.3.5 细胞周期检测

将 3T3-L1 前脂肪细胞以每孔 2×10^5 个密度接种到 6 孔板中培养 24 h 贴壁, 换含 RPE、PPE、CPP 和 PP (终质量浓度分别为 50、500、1 000 $\mu\text{g/mL}$) 的新培养基, 并设置对照组。24 h 后每孔加入 $m=0.25\%$ 胰蛋白酶消化收集细胞, 轻柔吹打, 转入 1.5 mL 离心管, 4 °C 1 200 r/min 离心 5 min。每个离心管弃上清后加 PBS 重悬, 同样条件下离心, 再加 500 μL PBS, 细胞轻轻吹散, 调整细胞浓度每毫升 1×10^6 个, 重复离心。去上清, 离心管搭在涡旋器上震荡, 同时滴加 -20 °C 预冷的 $\varphi=70\%$ 冰乙醇, 4 °C 固定 24 h。4 °C 3 000 r/min 离心 5 min, 去上清, 加入 1 mL 4 °C PBS 重悬, 4 °C 3 000 r/min 离心 5 min, 去上清, 轻弹管底使细胞散开。锡箔纸包住离心管, 避光加入 500 μL PI 染料, 37 °C 避光水浴 30 min, 上机。

1.3.6 细胞凋亡检测

按 1.3.4 接种细胞, 24 h 后换含 RPE (终质量浓度分别为 95、190、380 $\mu\text{g/mL}$)、PPE (终质量浓度分别为 95、190、380 $\mu\text{g/mL}$)、CPP (终质量浓度分别为 95、190、380 $\mu\text{g/mL}$)、PP (终质量浓度分别为 25、50、100 $\mu\text{g/mL}$) 的新培养基, 并设置对照组。24 h 后每孔加入无 EDTA 的 $m=0.25\%$ 的胰蛋白酶消化收集细胞。4 °C PBS 重悬, 1 200 r/min 离心 5 min, 重复 2 次。去上清, 加入结合型缓冲液, 调整细胞浓度每毫升 5×10^6 个。取 100 μL 于新 1.5 mL 离心管, 包锡箔纸, 加 5 μL Annexin-V-FITC 染液混匀, 避光 5 min 后加 5 μL PI 染液, 最后加 400 μL PBS。空白管取对照组细胞悬液; 单染管取 380 $\mu\text{g/mL}$ PPE 组细胞悬液分两份单染。混匀后上机, 计算凋亡率。

1.3.7 细胞分化和油红 O 染色

按 1.3.4 接种细胞, 当细胞铺满瓶底后换液, 继续培养 2 d 达到接触抑制。换含 10 $\mu\text{g/mL}$ INS、0.5 mmol/L IBMX、1 $\mu\text{mol/L}$ DEX 的分化剂 I, 同时加入 RPE、PPE、CPP、PP, 质量浓度同 1.3.6, 并设置细胞对照组分别培养 48 h。更换只含 INS 的分化剂 II 培养 48 h, 再更换正常培养基培养, 隔天换液一次, 每次换液重新加入多花黄精提取物, 至第 12 天约 90%

以上的脂滴明显,即为培养分化成熟。细胞诱导分化完成后小心吸尽上层液体,用预热 PBS 小心漂洗 3 次,每次 1 mL。加入 $m=4\%$ 多聚甲醛, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 固定 0.5 h。弃去液体, PBS 漂洗 3 次,控制时间加 1 mL $\varphi=60\%$ 异丙醇 30 s 后除去, PBS 清洗,将孔板置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 至孔底干燥。避光加 1 mL 预热油红 O,避光静置 30 min 后弃染液, PBS 清洗两次。异丙醇漂洗、脱色 15 s 弃去,重蒸水漂洗 2 次,随后加入 500 μL 苏木素染色 4 min,水洗。保留最后一次液体,显微镜观察,拍照。弃去液体,每孔加 1 mL 异丙醇,低速摇晃至胞内脂滴溶解,充分吹打,混匀后的异丙醇吸入到 96 孔板,检测 $\text{OD}_{510\text{ nm}}$,计算相对脂滴体积分数。

1.3.8 细胞甘油三酯含量测定

各药物干预细胞分化成熟后,取出放冰袋上操作。吸去培养液,用预冷 PBS 温和洗三次,每孔加 200 μL 放射免疫沉淀法缓冲液 (Radioimmunoprecipitation Assay Buffer, RIPA 裂解液),含 1 mmol/L 苯甲基磺酰氟 (Phenylmethanesulfonyl Fluoride, PMSF),室温裂解 10 min,刮下细胞,转移到离心管,振荡,插入碎冰裂解 30 min。 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 12 000 r/min 离心 5 min 得到上清液,按 TG 试剂盒操作。

1.3.9 荧光定量 PCR

用 RNAiso Plus 提取细胞总 RNA。用 Nanodrop 2000 仪器分析 RNA 纯度及浓度, A260/280 在 1.8~2.1 可用。按照逆转录试剂盒的操作说明书,先去除基因组 DNA,再进行逆转录反应。按 TaKaRa TB Green Premix Ex TaqTM II 试剂盒操作 qRT-PCR 反应。各引物序列详见表 1, β -Actin 为内参基因。

1.3.10 数据分析

采用 IBM SPSS 20.0 软件 (IBM Corp. Armonk, NY, USA) 统计分析,用 Graphpad Prism 7.0 软件 (Graphpad Software, San Diego, USA) 作图。所有实验结果以平均值 \pm 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示。根据单因素方差 (ANOVA) 检验,分析实验组与空白对照组之

间的显著性差异,以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

表 1 引物序列

基因名	引物序列
β -actin-F	CATCCGTAAAGACCTCTATGCCAAC
β -actin-R	ATGGAGCCACCGATCCACA
PPAR γ -F	GGAGCCTAAGTTTGAGTTTGCTGTG
PPAR γ -R	TGCAGCAGGTTGTCTTGGATG
C/EBP α -F	ACCGGGTTTCGGGACTTGA
C/EBP α -R	CCCGCAGGAACATCTTTAAGTGA
LPL-F	AACACAACCAGGCCTTCGAGA
LPL-R	CCGATGTCCACCTCCGTGTA
SREBP-1c-F	GCTACCGGTCTTCTATCAATGA
SREBP-1c-R	CGCAAGACAGCAGATTTATTCA
FABP4-F	TGGGAACCTGGAAGCTTGTCTC
FABP4-R	GAATTCACGCCAGTTTGA
CPT-1-F	CTACATCACCCCAACCCATATT
CPT-1-R	GATCCAGAAAGACGAATAGGTT

2 结果与讨论

2.1 多花黄精提取物的得率及功能性成分含量的比较

用 70%乙醇提取 RPE、PPE 和用复合酶提取 CPP 得到提取物占原料的质量分数分别为 53.35%、53.30% 和 14.02%。表 2 四种提取物主要功能成分在含量上各不相同。其中多糖在原料中的质量分数在 CPP 中 73.33% 是最高的,皂苷在 PPE 中 13.63% 最高,黄酮在 PPE 中 5.37 mg/g 最高,总酚在 PP 中 47.65 mg/g 最高。两种多花黄精生品提取物 RPE、CPP 中的多糖组分质量分数要明显高于两种九蒸九制品提取物 PPE 和 PP,但总皂苷更低。另外,PPE、PP 中的总黄酮、总酚酸质量分数也高于 RPE 和 CPP。

表 2 多花黄精各提取物中总多糖、总皂苷、总黄酮、总酚质量分数的比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Table 2 Comparison of *Polygonatum cyrtoneuma* Hua extract yield, total polysaccharides, total saponins, total flavonoids, and total phenols

样品	得率/%	总多糖(以葡萄糖计)/%	总皂苷(以薯蓣皂苷元计)/%	总黄酮(以芦丁计)/(mg/g)	总酚(以没食子酸计)/(mg/g)
RPE	53.35	29.83 \pm 0.76 ^c	5.47 \pm 0.24 ^b	0.64 \pm 0.06 ^a	0.83 \pm 0.08 ^a
PPE	53.30	1.92 \pm 0.38 ^a	13.63 \pm 0.26 ^d	5.37 \pm 0.23 ^b	14.52 \pm 0.26 ^b
CPP	14.02	73.33 \pm 2.60 ^d	2.55 \pm 0.11 ^a	1.03 \pm 0.10 ^a	0.28 \pm 0.08 ^a
PP	-	10.42 \pm 3.01 ^b	11.49 \pm 0.26 ^c	5.22 \pm 0.51 ^b	47.65 \pm 1.36 ^c

注:数值以平均值 \pm 标准差表示 ($n=3$)。根据 Duncan 检验,同列右肩不同的小写字母表示具有显著差异 ($P<0.05$); RPE 为多花黄精生品乙醇提取物, PPE 为九蒸九制品乙醇提取物, CPP 为多花黄精多糖, PP 为市售多花黄精九蒸九制品多糖。

多花黄精的药理作用与其主要的多糖、皂苷、黄酮、多酚等活性成分密切相关^[25-28]。生黄精在炮制过

程中,多糖减少可能是由于黏液质消失水解,出现糖异构化,单糖成分变化,半乳糖含量升高,葡萄糖、

甘露糖降低, β -1,4-Galp 出现, β -1,4-Manp 增加^[29,30]。黏液质水解可显著减少引起黄精刺激性的物质, 从而降低毒性, 而多糖分解成小分子糖类, 易被机体吸收, 薯蓣皂苷元、黄酮等有效功能性成分增加, 可达增效

目的^[31]。Wang 等^[32]发现黄精的九制品比生品具有更显著的“益气活血, 补脾、肾、肝”的作用。因此, 多花黄精九蒸九制品乙醇提取物和九蒸九制品多糖中的多糖低但可能得到了更多的有效成分, 作用更佳。

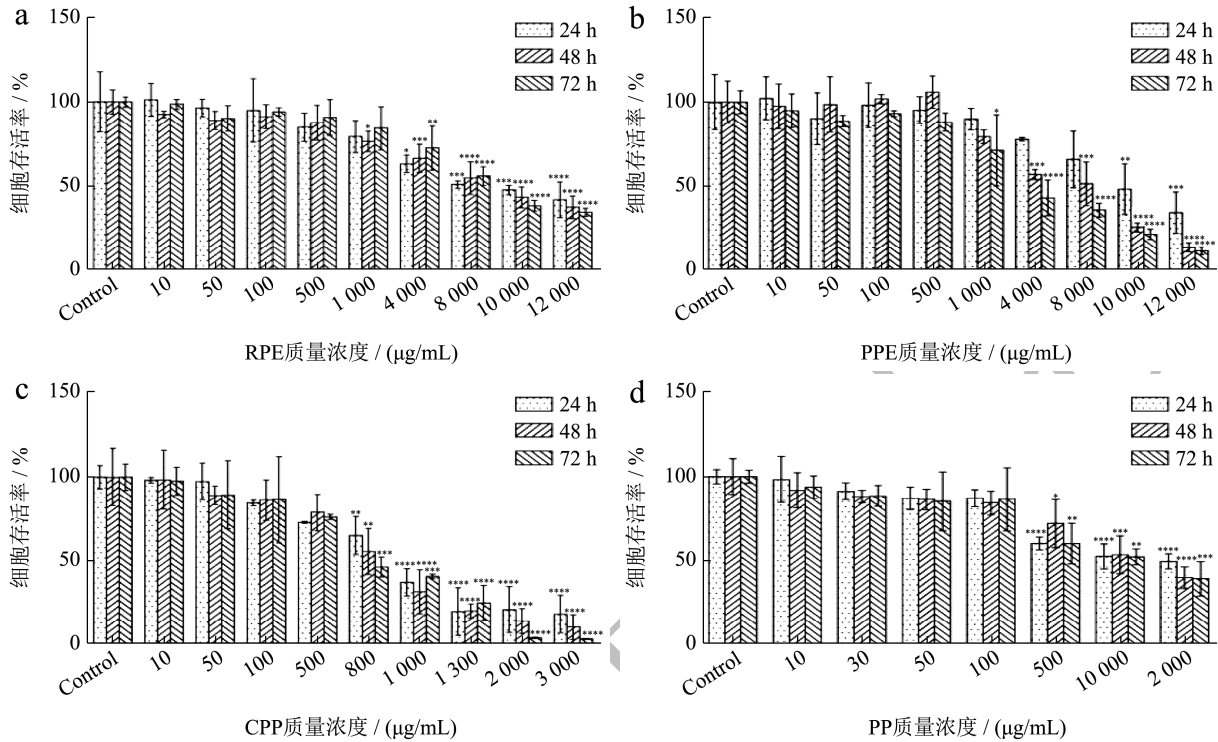


图1 多花黄精提取物对 3T3-L1 前脂肪细胞的增殖抑制作用 (剂量效应)

Fig.1 Inhibitory effect of *Polygonatum cyrtonema* Hua extract on proliferation of 3T3-L1 preadipocytes (Dose effect)

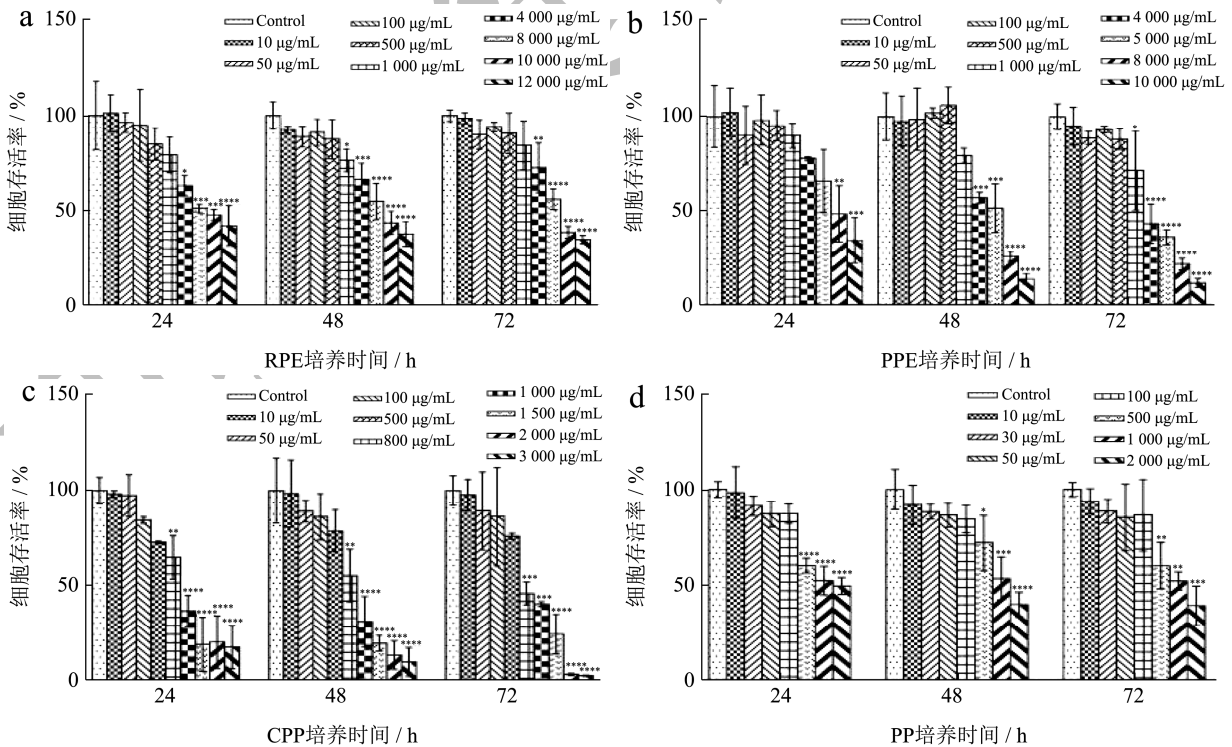


图2 多花黄精提取物对 3T3-L1 前脂肪细胞的增殖抑制作用 (时间效应)

Fig.2 Inhibitory effect of *Polygonatum cyrtonema* Hua extract on proliferation of 3T3-L1 preadipocytes (Time effect)

2.2 多花黄精提取物对 3T3-L1 前脂肪细胞增殖的影响

表 3 多花黄精各提取物作用下 3T3-L1 细胞的 IC₅₀

Table 3 IC₅₀ of 3T3-L1 cells under the action of *Polygonatum cyrtonema* Hua extract

<i>cyrtonema</i> Hua extract		
药物	时间/h	IC ₅₀ /(μg/mL)
RPE	24	8 334.00
	48	8 115.00
	72	7 829.00
PPE	24	7 450.00
	48	4 492.00
	72	2 617.00
CPP	24	866.80
	48	822.20
	72	798.40
PP	24	1 406.00
	48	1 340.00
	72	1 062.00

注：数据用各细胞样本拟合后的计算值表示。

如图 1、2 所示，RPE、PPE、CPP 和 PP 能够以剂量关系和时间关系的方式抑制 3T3-L1 前脂肪细胞的活力。如表 3 所示，处理 24、48 和 72 h 后，各提取物对 3T3-L1 前脂肪细胞增殖的半抑制质量浓度 (IC₅₀) 均呈下降趋势，RPE、PPE、CPP、PP 分别从 8 334.00、7 450.00、866.80、1 406.00 μg/mL 降到 7 829.00、2 617.00、798.40、1 062.00 μg/mL。且 IC₅₀ 顺序为 RPE>PPE>PP>CPP。几项研究表明，多花黄精提取物抑制各种代谢疾病细胞增殖，包括 HepG2 细胞、3T3-L1 细胞、C2C12 肌管细胞和内皮细胞^[33-37]。RPE、PPE 对 3T3-L1 前脂肪细胞的细胞毒性较小，且 500 μg/mL 以内的醇提取物和 100 μg/mL 以内的黄精多糖对 3T3-L1 脂肪细胞的存活率基本没有影响，这对于后续的体外抗肥胖实验是安全质量浓度。

2.3 多花黄精提取物对 3T3-L1 前脂肪细胞周期的影响

3T3-L1 细胞经四种多花黄精提取物处理 24 h 后，细胞周期变化结果如图 3 所示，与对照组相比，随着 RPE 和 PP 处理质量浓度的增加 (50、500、1 000 μg/mL)，3T3-L1 前脂肪细胞进入 S 期的比例逐渐减少，进入 G2/M 期的比例无明显变化，G0/G1 期有所上升。当 PPE 和 CPP 组质量浓度为 50 μg/mL 时，部分细胞被阻滞在 G0/G1

期，阻碍向 S 期进程。PPE 组和 CPP 组未看出明显的剂量关系，这可能是由于当质量浓度大于 PPE 应选用的最大剂量 380 μg/mL 和 CPP 应选用的 100 μg/mL 后，细胞本身活力明显下降，状态变差，导致 G0/G1 期比例大幅下降而 G2/M 期比例大幅上升。由上推测多花黄精提取物抑制前脂肪细胞增殖可能与 G0/G1 期阻滞有关。

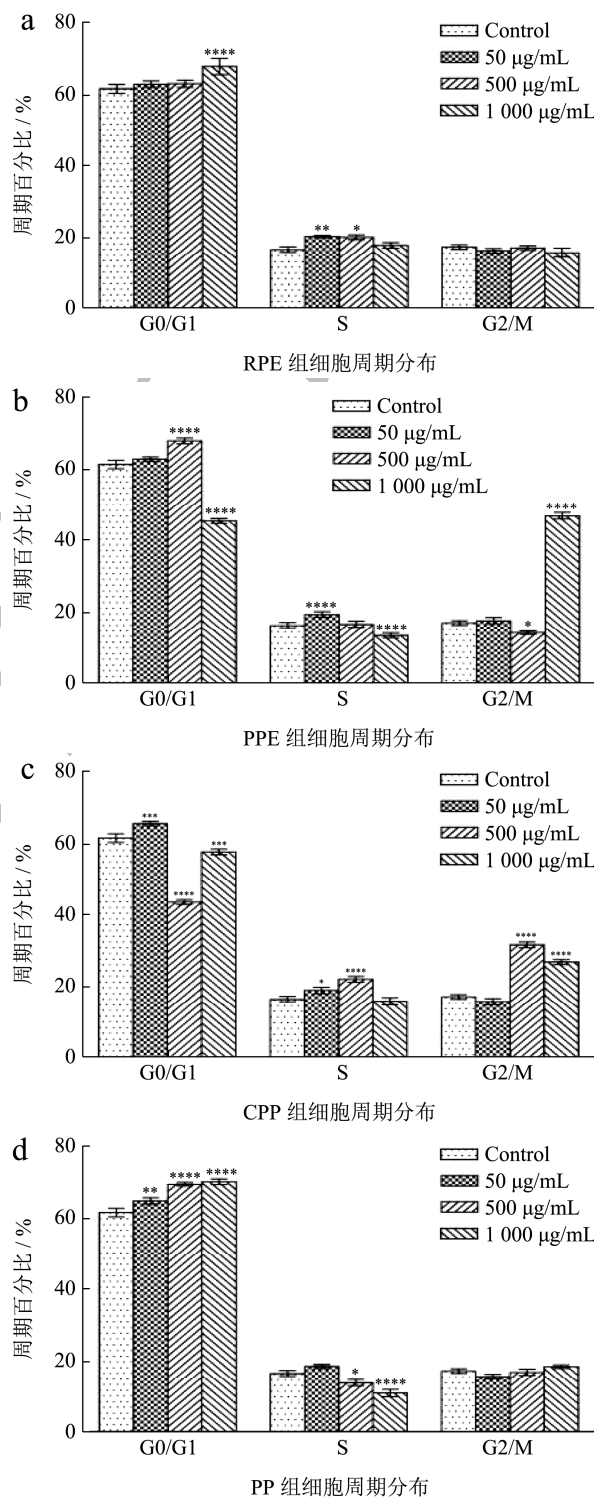


图 3 多花黄精提取物对 3T3-L1 前脂肪细胞周期的影响
Fig.3 Effect of *Polygonatum cyrtonema* Hua extract on 3T3-L1 preadipocyte cycle

2.4 多花黄精提取物诱导 3T3-L1 前脂肪细胞的

的凋亡

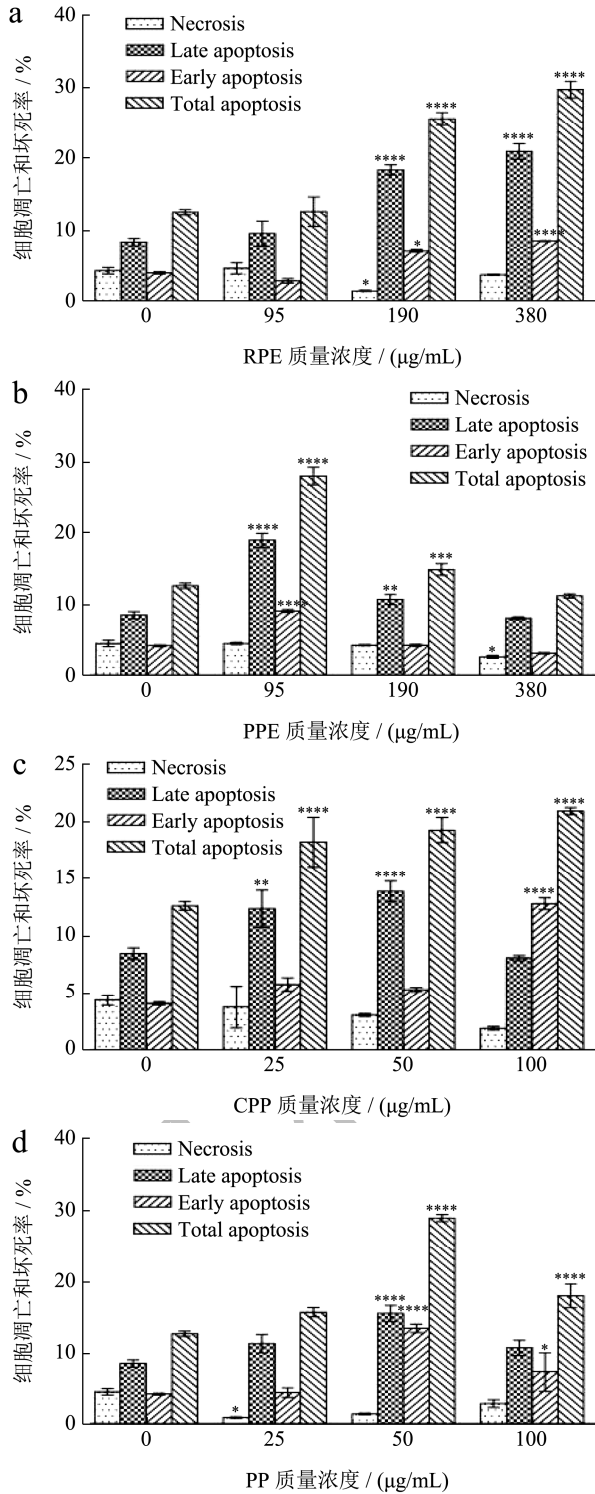


图 4 多花黄精提取物诱导 3T3-L1 前脂肪细胞凋亡的作用
Fig.4 Effect of *Polygonatum cyrtoneuma* Hua extract on 3T3-L1 preadipocyte apoptosis

如图 4 所示，四种多花黄精提取物均能有效促进前脂肪细胞凋亡。当以 RPE 处理 3T3-L1 前脂肪细胞

后，早期凋亡率、晚期凋亡率及总体凋亡率均随质量浓度上升而显著升高 ($P < 0.05$)，促早期凋亡作用呈现出明显的剂量依赖性。当以 PPE 处理后，早期凋亡率、晚期凋亡率以及总体凋亡率先上升后降低，在 95 µg/mL 凋亡最明显 (早期凋亡率 9.12%，晚期凋亡率 19.00%，总体凋亡率 28.12%)。当以 CPP 处理后，早期凋亡率以及总体凋亡率总体上升，晚期凋亡率呈先上升后平稳趋势。当以 PP 处理后，早期凋亡率、晚期凋亡率及总体凋亡率先上升后降低，在 50 µg/mL 凋亡最明显 (早期凋亡率 15.50%，晚期凋亡率 13.40%，总体凋亡率 28.90%)。其他研究表明，400 µg/mL 剂量黄精多糖可诱导 HepG2 细胞凋亡，阻滞 G1 期细胞周期^[35]，可反映本文多花黄精提取物将部分细胞阻滞在 G0/G1 期延缓 3T3-L1 前脂肪细胞的细胞周期进程，促进早期凋亡。

2.5 多花黄精提取物对 3T3-L1 前脂肪细胞分化的影响

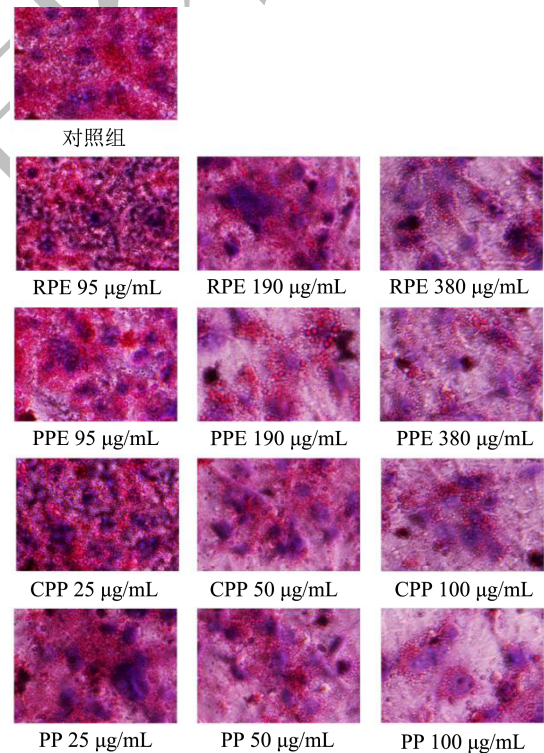


图 5 多花黄精提取物对 3T3-L1 前脂肪细胞分化的影响 (×400)
Fig.5 Effect of *Polygonatum cyrtoneuma* Hua extract on 3T3-L1 preadipocyte differentiation (×400)

IBMX、地塞米松和胰岛素联用的情况下可诱导 3T3-L1 前脂肪细胞分化^[38]。如图 5 所示，诱导分化后，对照组细胞出现较大的红色斑点，说明细胞内存在较大的脂质沉积。加入多花黄精提取物后，3T3-L1 前脂肪细胞分化受到不同程度的抑制，细胞内脂肪堆积减少，

脂滴变小,油红 O 染色较空白组弱。抑制程度随质量浓度升高而加重。对细胞中总脂质的体积分数进行了分析,如表 4 所示。在四种多花黄精提取物的干预下,成熟脂肪细胞内的脂滴体积分数均减少,脂滴沉积情况均得到显著改善,且高剂量组的 PP (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 和 PPE (380 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 脂滴体积分数降低的程度最大 (28.39%、37.97%),效果最好。体内研究表明黄精乙醇提取物改善了肥胖小鼠的代谢特征^[33,34]。在本研究中可以发现,多花黄精提取物能通过促进成熟脂肪细胞脂解降低脂滴的体积分数,抑制 3T3-L1 细胞向成熟脂肪细胞的分化,其中多花黄精九蒸九制品提取物 PPE 的干预效果比生品提取物 RPE、CPP 的效果更好。

表 4 多花黄精提取物对 3T3-L1 前脂肪细胞分化的影响

Table 4 Effect of *Polygonatum cyrtonema* Hua extract on TG content in mature adipocytes

样品名称	质量浓度/ $(\mu\text{g}/\text{mL})$	$\text{OD}_{510\text{nm}}$	总脂质体积分数/%
对照组	0	1.49 ± 0.12^i	100.00 ± 3.87^i
RPE	95	$0.93 \pm 0.03^{\text{de}}$	$62.09 \pm 1.78^{\text{de}}$
	190	$0.77 \pm 0.02^{\text{c}}$	$51.88 \pm 1.64^{\text{c}}$
	380	$1.01 \pm 0.02^{\text{efg}}$	$67.66 \pm 1.17^{\text{efg}}$
PPE	95	$0.85 \pm 0.02^{\text{cd}}$	$56.66 \pm 1.28^{\text{cd}}$
	190	$0.79 \pm 0.02^{\text{c}}$	$53.20 \pm 1.47^{\text{c}}$
	380	$0.57 \pm 0.01^{\text{b}}$	$37.97 \pm 0.96^{\text{b}}$
CPP	25	$1.11 \pm 0.01^{\text{fgh}}$	$74.47 \pm 0.65^{\text{fgh}}$
	50	$1.13 \pm 0.01^{\text{gh}}$	$75.64 \pm 0.08^{\text{gh}}$
	100	$1.19 \pm 0.05^{\text{h}}$	$79.49 \pm 2.92^{\text{h}}$
PP	25	$0.99 \pm 0.0378^{\text{ef}}$	$66.56 \pm 2.54^{\text{ef}}$
	50	$1.00 \pm 0.04^{\text{ef}}$	$66.90 \pm 2.80^{\text{ef}}$
	100	$0.42 \pm 0.01^{\text{a}}$	$28.39 \pm 0.72^{\text{a}}$

注:数值用平均值 \pm 标准差表示 ($n=3$)。根据 Duncan 检验,同列右肩不同的小写字母表示具有显著差异 ($P<0.05$); RPE 为多花黄精生品乙醇提取物, PPE 为九蒸九制品乙醇提取物, CPP 为多花黄精多糖, PP 为市售多花黄精九蒸九制品多糖。

2.6 多花黄精提取物对成熟脂肪细胞内甘油三酯含量的影响

如表 5 所示,与对照组相比,四种多花黄精提取物能促进成熟脂肪细胞的脂解, RPE、CPP 组体现出了明显的剂量关系,但 PPE、PP 组没有明显的剂量关系。此外,多花黄精九蒸九制品提取物高剂量组的甘油三酯下降程度比生品提取物组更大,计算得 380 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PPE 组细胞 TG 含量下降了 89.07%,是同样质量浓度 RPE 组 (79.19%) 的 1.12 倍,是 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CPP 组 (85.28%) 的 1.04 倍。本实验证明了多花黄精提取物

能通过促进成熟脂肪细胞脂解降低甘油三酯的含量,从而达到减小脂肪细胞体积的效果,有效阻止 3T3-L1 细胞向成熟脂肪细胞的分化。相似地,其他研究在添加 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 黄精提取物的分化培养基中培养前脂肪细胞 14 d,发现显著减少了细胞内脂肪的积累,降低脂肪含量至对照组的 80% 以下^[34]。

表 5 多花黄精提取物对成熟脂肪细胞内 TG 含量的影响

Table 5 Effect of *Polygonatum cyrtonema* Hua extract on TG content in mature adipocytes

样品名称	质量浓度/ $(\mu\text{g}/\text{mL})$	TG 含量/ $(\text{mmol}/\text{mg prot})$
对照组	0	$244.10 \pm 91.30^{\text{d}}$
RPE	95	$71.24 \pm 8.81^{\text{bc}}$
	190	$64.63 \pm 11.85^{\text{bc}}$
	380	$50.79 \pm 11.00^{\text{abc}}$
PPE	95	$25.79 \pm 2.05^{\text{a}}$
	190	$34.06 \pm 11.35^{\text{ab}}$
	380	$26.66 \pm 13.33^{\text{a}}$
CPP	25	$60.97 \pm 21.12^{\text{abc}}$
	50	$47.80 \pm 11.53^{\text{ab}}$
PP	100	$35.92 \pm 12.66^{\text{ab}}$
	25	$71.22 \pm 4.74^{\text{ab}}$
	50	$88.38 \pm 25.66^{\text{c}}$
	100	$23.53 \pm 1.82^{\text{a}}$

注:数值用平均值 \pm 标准差表示 ($n=3$)。根据 Duncan 检验,同列右肩不同的小写字母表示具有显著差异 ($P<0.05$); RPE 为多花黄精生品乙醇提取物, PPE 为九蒸九制品乙醇提取物, CPP 为多花黄精多糖, PP 为市售多花黄精九蒸九制品多糖。

2.7 多花黄精提取物对 3T3-L1 细胞分化相关基因 mRNA 的影响

脂肪生成是指成纤维细胞由前脂肪细胞转化为脂肪细胞,脂肪细胞标志物的表达和脂质的聚集是在 3T3-L1 成纤维细胞系中被化学诱导的。前脂肪细胞的分化受一系列因素调控,其中 C/EBP α 和 PPAR γ 作为核心转录因子,诱导脂肪细胞分化和增殖,在分化过程中协同促进脂肪生成。C/EBP β 在分化早期表达,并刺激 C/EBP α 和 PPAR γ 的转录。脂代谢酶如 FABP4、LPL 和 FAS 的表达在脂肪形成过程中受到 PPAR γ 和 C/EBP α 的调控。分化抗原簇 36 (Cluster of Differentiation, CD36) 与 PPAR γ 正相关,CD36 基因沉默导致 PPAR γ 表达降低可能导致脂肪细胞分化受损,这与 PPAR γ 下调损害前脂肪细胞分化的发现一致^[39,40]。甾醇调节元件结合蛋白-1c (SREBP-1c) 是一种辅助脂肪形成的调节因子,参与脂质代谢并调节

FAS^[41]。从总体趋势看,虽然各质量浓度 RPE 组(95、190、380 μg/mL) PPAR γ mRNA 表达水平与对照组无显著差异,但 RPE、PPE、CPP、PP 均不同程度下调了 3T3-L1 脂肪细胞 PPAR γ 和 C/EBP α mRNA 表达。但是,在完全分化的脂肪细胞中,RPE、PPE、CPP 和 PP 对 SREBP-1c mRNA 表达无影响。之前的研究发现,黄精中多糖成分的 12 周干预显著抑制了 PPAR γ 和 C/EBP α 的 mRNA 水平^[42],与实验结果吻合。LPL 是脂肪分化过程中的关键因素之一,也在脂肪生成的早期阶段表达,并且在成熟脂肪细胞中达到稳定水平。LPL 在脂质代谢中也起着重要作用,LPL 催化脂蛋白

衍生的三酰基甘油的水解,并允许脂肪酸在脂肪组织中积累,脂肪酸在脂肪细胞中重新酯化以形成储存的三酰基甘油^[43,44]。如图 6d 所示,经 RPE、PPE、PP 处理后,3T3-L1 小鼠前脂肪细胞 LPL mRNA 表达水平下降,随剂量增加而降低,而经 CPP 处理后 LPL mRNA 表达水平未见下降趋势。这些控制脂肪细胞分化的转录物是关键的前期脂肪形成调节因子,表明 RPE、PPE、CPP、PP 均能有效的抑制 PPAR γ , C/EBP α 这两种转录因子,RPE、PPE、PP 抑制 LPL mRNA 水平,从而阻滞早期脂肪细胞分化。

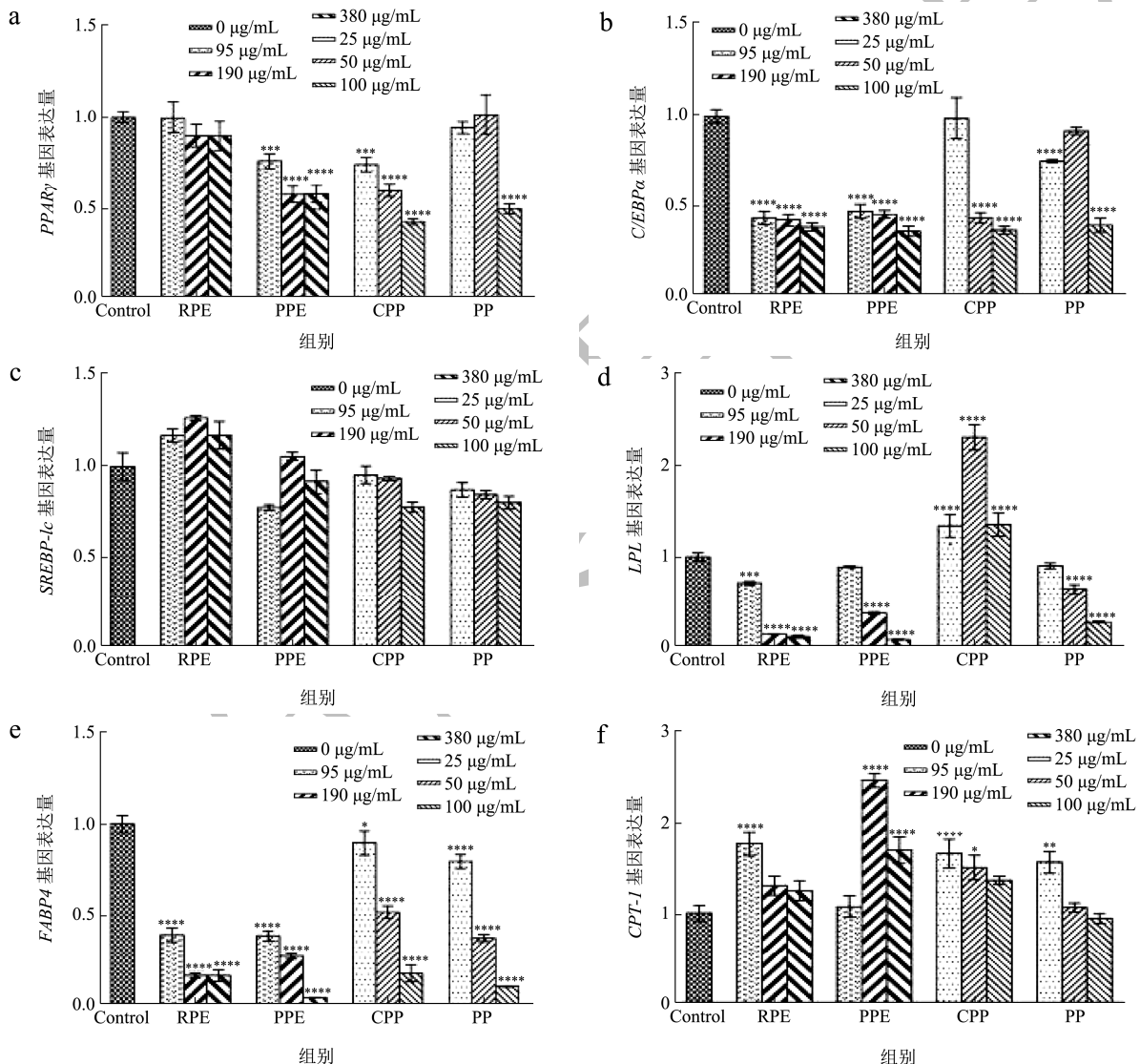


图 6 多花黄精提取物对分化后细胞相关基因 mRNA 表达水平的影响

Fig.6 Effect of *Polygonatum cyrtoneuma* Hua extract on mRNA expression of related genes in differentiated adipocytes

脂肪形成遵循一个多阶段的过程,根据脂肪形成水平的不同来组织转录物和蛋白质的表达模式,在不同阶段相互协调。脂肪酸结合蛋白 4 (Fatty Acid Binding Protein 4, FABP4),也称 aP2,是脂质结合蛋白超家族一员,多在脂肪细胞中表达,可调节脂肪酸

的氧化,并在生命体内脂肪酸摄取、运输及氧化还原过程具有关键的调控作用。FABP4 决定了脂肪细胞后期的分化阶段,相关脂肪酸和甘油三酯的生物合成受到 SREBP、PPAR γ 和 C/EBP α 的调控。研究显示,FABP4 能够与长链脂肪酸紧密结合,促进脂肪酸的跨膜转运,

影响脂质在脂肪细胞中的蓄积及脂质代谢^[45]。FABP4 表达降低可显著阻断甘油三酯的从头合成和脂肪细胞分化^[46,47]。FABP4 mRNA 表达水平的结果如图 6e 所示。随着成熟脂肪细胞处理剂量的增加, RPE、PPE、CPP 和 PP 组 FABP4 mRNA 的相对表达量均随剂量增大而逐渐降低, 由此抑制分化后期脂肪细胞内脂质产生与累积。

脂肪形成不仅影响脂质代谢, 而且影响葡萄糖和蛋白质代谢。研究表明, 脂肪形成的机制与多种信号通路有关, 包括一磷酸腺苷活化蛋白激酶 (Adenosine Monophosphate-Activated Protein Kinase, AMPK) 通路、胰岛素信号通路、PPAR 调控、葡萄糖通路等, 这些信号通路可作治疗肥胖和代谢性疾病的药物靶点的主要来源^[48]。例如 AMPK 的激活还通过改变参与脂肪酸代谢的酶, 如肉碱棕榈酰转移酶-1 (CPT-1) 的表达来调节脂肪酸的生物合成和氧化, CPT-1 是调节酰基辅酶 A 向 β 氧化的主要限速酶, 增加 CPT-1 的活性或表达将促进 3T3-L1 分化后细胞中积累的脂肪酸的氧化, 这有利于减轻脂肪的积累^[49]。肉碱棕榈酰转移酶-1 (CPT-1) mRNA 表达结果见图 6f。经多花黄精提取物处理后, 3T3-L1 前脂肪细胞中 CPT-1 mRNA 表达增加, 表明多花黄精提取物促进 CPT-1 的活性, 可能是通过激活 AMPK 介导减少脂质积累。Yang 等^[50]研究也表明, 黄精灌胃 NAFLD 大鼠 14 周后, CPT-1 的 mRNA 表达显著上调。

糖苷、类黄酮、生物碱和萜类是增强抗脂肪活性的植物化学物质的主要组成部分, 含有这些活性成分的药食两用植物可通过各种代谢和细胞靶点对肥胖起有益作用。已有研究证明一些天然产物可以在 3T3-L1 模型中通过调节脂代谢相关因子产生抗肥胖活性。例如, Lamichhane 等^[51]研究证实枸杞子乙醇提取物、正己烷馏分、乙酸乙酯馏分和三种分离的化合物均显示出抗脂肪形成活性, 下调了关键的脂肪形成标志物 PPAR γ 、SREBP-1、FABP4、aP2、LPL 和瘦素。Nallamuthu 等^[52]比较评价了甘蓝、罗勒和辣木叶醇提取物对 3T3-L1 前脂肪细胞的抗脂肪形成作用及其脂肪酶抑制特性, 发现罗勒在抑制胞内甘油三酯的积累作用最强, 下调了脂肪生成的关键转录因子 (PPAR γ 、C/EBP α 和 FAS 酶), 并调节了瘦素和脂联素的释放曲线, 具有显著抗脂肪生成活性以及脂肪酶抑制特性。目前多花黄精提取物体外干预 3T3-L1 前脂肪细胞和分化后脂肪细胞的研究未见报道, 本实验研究表明, 多花黄精提取物可通过抑制促脂肪生成基因 PPAR γ 、C/EBP α 、FABP4 和 LPL 的表达和促进脂肪酸氧化相关基因 CPT-1 的 mRNA 表达来抑制 3T3-L1 细胞的分

化, 减少脂质积聚。

3 结论

综上, 多花黄精提取物富含多糖、皂苷、黄酮、多酚等关键活性成分, 九蒸九制品提取物中的多糖质量分数降低, 但其他活性成分增多。多花黄精提取物能够以剂量和时间依赖性方式抑制 3T3-L1 前体脂肪细胞的增殖, 将部分 3T3-L1 前脂肪细胞阻滞在 G0/G1 期, 延缓 3T3-L1 前脂肪细胞的细胞周期进程, 并具有促进该细胞凋亡的作用。多花黄精提取物可通过减少胞内甘油三酯的含量、抑制促脂肪生成蛋白 (PPAR γ 、C/EBP α 、FABP4 和 LPL) 的表达来抑制 3T3-L1 细胞的分化, 并且它能够通过促进脂肪酸氧化相关基因 CPT-1 的 mRNA 表达来减少分化的 3T3-L1 细胞中的脂质积聚。从实验结果上看, RPE 主要是抑制 C/EBP α 、LPL 和 FABP4 的 mRNA 基因的表达, PPE 主要是抑制 C/EBP α 、LPL 和 FABP4 的 mRNA 的表达量并促进 CPT-1 的 mRNA 基因表达, CPP 主要抑制了 PPAR γ 的 mRNA 基因的表达。本研究为黄精向食品的进一步研发提供理论依据, 推动黄精产业向高新技术、新领域、深加工方向发展, 对中国黄精食品的可持续发展具有重要意义和作用。未来黄精提取物在体内的抗肥胖作用, 如对肥胖相关肠道菌群的调节以及产热相关基因和蛋白质的调节, 还需进一步验证。

参考文献

- [1] Rahman M, Islam M, Shohag S, et al. The multifunctional role of herbal products in the management of diabetes and obesity: A comprehensive review [J]. *Molecules*, 2022, 27(5): 1713.
- [2] Nemes A, Homoki J, Kiss R, et al. Effect of anthocyanin-rich tart cherry extract on inflammatory mediators and adipokines involved in type 2 diabetes in a high fat diet induced obesity mouse model [J]. *Nutrients*, 2019, 11(9): 1966.
- [3] Ko D, Ku K. Effect of anti-obesity and antioxidant activity through the additional consumption of peel from 'Fuji' pre-washed apple [J]. *Foods*, 2022, 11(4): 497.
- [4] Li H, Kuang J, Liu G, et al. Myostatin is involved in ginsenoside Rb1-mediated anti-obesity [J]. *Pharm Biol*, 2022, 60(1): 1106-1115.
- [5] Wang X, Chen X, Tang Y, et al. The therapeutic potential of plant polysaccharides in metabolic diseases [J]. *Pharmaceuticals-Base*, 2022, 15(11).
- [6] Kanwal S, Aliya S, Xin Y. Anti-obesity effect of dictyophora indusiata mushroom polysaccharide (DIP) in high fat

- diet-induced obesity via regulating inflammatory cascades and intestinal microbiome [J]. *Front Endocrinol*, 2020, 11: 558874.
- [7] Zhang P, Jia J, Jiang P, et al. Polysaccharides from edible brown seaweed *Undaria pinnatifida* are effective against high-fat diet-induced obesity in mice through the modulation of intestinal microecology [J]. *Food Funct*, 2022, 13(5): 2581-2593.
- [8] Yuan Y, Wang D, Zhang W, et al. Protective effects of *Radix Isatidis* polysaccharide ameliorates obesity via promotion AMPK pathway in high-fat-diet-induced obese rats and 3T3-L1 adipocyte cells [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2022, 74(8): 1170-1179.
- [9] Li X, Ma R, Zhang F, et al. Evolutionary research trend of *Polygonatum* species: A comprehensive account of their transformation from traditional medicines to functional foods [J]. *Crit Rev Food Sci*, 2023, 63(19): 3803-3820.
- [10] Zhao P, Zhao C, Li X, et al. The genus *Polygonatum*: A review of ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology [J]. *J Ethnopharmacol*, 2018, 214: 274-291.
- [11] Liu N, Dong Z, Zhu X, et al. Characterization and protective effect of *Polygonatum sibiricum* polysaccharide against cyclophosphamide-induced immunosuppression in Balb/c mice [J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 107: 796-802.
- [12] Gu W, Wang Y, Zeng L, et al. Polysaccharides from *Polygonatum kingianum* improve glucose and lipid metabolism in rats fed a high fat diet [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 125: 109910.
- [13] Zhang H, Cai X, Tian Q, et al. Microwave-assisted degradation of polysaccharide from *Polygonatum sibiricum* and antioxidant activity [J]. *J Food Sci*, 2019, 84(4): 754-761.
- [14] Yan H, Lu J, Wang Y, et al. Intake of total saponins and polysaccharides from *Polygonatum kingianum* affects the gut microbiota in diabetic rats [J]. *Phytomedicine*, 2017, 26: 45-54.
- [15] Li L, Thakur K, Liao B, et al. Antioxidant and antimicrobial potential of polysaccharides sequentially extracted from *Polygonatum cyrtonema* Hua [J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 114: 317-323.
- [16] Shen W, Li X, Deng Y, et al. *Polygonatum cyrtonema* Hua polysaccharide exhibits anti-fatigue activity via regulating osteocalcin signaling [J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 175: 235-241.
- [17] Zong S, Zeng G, Zou B, et al. Effects of *Polygonatum sibiricum* polysaccharide on the osteogenic differentiation of bone mesenchymal stem cells in mice [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(6): 6169-6180.
- [18] Cui X, Wang S, Cao H, et al. A review: The bioactivities and pharmacological applications of *Polygonatum sibiricum* polysaccharides [J]. *Molecules*, 2018, 23(5): 1170.
- [19] Lee J, Kim E, Kim M, et al. *Polygonatum stenophyllum* improves menopausal obesity via regulation of lipolysis-related enzymes [J]. *J Nat Med-Tokyo*, 2016, 70(4): 789-796.
- [20] 苑璐.黄精中总皂苷和多糖的制备及其在栽培过程中土壤水分含量对其质量的影响研究[D].青岛:青岛大学,2015.
- [21] 苑璐,薛洁,周三,等.崂山产黄精总皂苷提取工艺的响应面优化[J].食品与药品,2015,17(1):9-13.
- [22] 何兰香,丁科,谢明华,等.酶法-超声提取黄精总黄酮及其抗氧化活性研究[J].中国现代应用药学,2019,36(9):1075-1080.
- [23] 焦劫.黄精种质资源研究[D].咸阳:西北农林科技大学,2018.
- [24] 焦劫,陈黎明,孙瑞泽,等.不同产地黄精主要化学成分比较及主成分分析[J].中药材,2016,39(3):519-522.
- [25] Hu J, Cheng H, Xu J, et al. Determination and analysis of monosaccharides in *Polygonatum cyrtonema* Hua polysaccharides from different areas by ultra-high-performance liquid chromatography quadrupole trap tandem mass spectrometry [J]. *J Sep Sci*, 2021, 44(18): 3506-3515.
- [26] Tang C, Yu Y, Qi Q, et al. Steroidal saponins from the rhizome of *Polygonatum sibiricum* [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2019, 21(3): 197-206.
- [27] Luo L, Qiu Y, Gong L, et al. A review of *Polygonatum* Mill. genus: Its taxonomy, chemical constituents, and pharmacological effect due to processing changes [J]. *Molecules*, 2022, 27(15).
- [28] Liu S, Jia Q, Peng Y, et al. Advances in mechanism research on *polygonatum* in prevention and treatment of diabetes [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 4821.
- [29] Fan B, Wei G, Gan X, et al. Study on the varied content of *Polygonatum cyrtonema* polysaccharides in the processing of steaming and shining for nine times based on HPLC-MS/MS and chemometrics [J]. *Microchem J*, 2020, 159: 105352.
- [30] Chen Z, Zhu B, Chen Z, et al. Effects of steam on polysaccharides from *Polygonatum cyrtonema* based on saccharide mapping analysis and pharmacological activity assays [J]. *Chin Med-Uk*, 2022, 17(1): 97.
- [31] Zhu S, Liu P, Wu W, et al. Multi-constituents variation in medicinal crops processing: Investigation of nine cycles of steam-sun drying as the processing method for the rhizome of

- Polygonatum cyrtonema* [J]. J Pharmaceut Biomed, 2022, 209: 114497.
- [32] Wang J, Wang F, Yuan L, et al. Blood-enriching effects and immune-regulation mechanism of steam-processed *Polygonatum sibiricum* polysaccharide in blood deficiency syndrome mice [J]. Front Immunol, 2022, 13: 813676.
- [33] Liu B, Tang Y, Song Z, et al. *Polygonatum sibiricum* F. Delaroche polysaccharide ameliorates HFD-induced mouse obesity via regulation of lipid metabolism and inflammatory response [J]. Mol Med Rep, 2021, 24(1): 501.
- [34] Ko J, Kwon H, Yoon J, et al. Effects of *Polygonatum sibiricum* rhizome ethanol extract in high-fat diet-fed mice [J]. Pharm Biol, 2015, 53(4): 563-570.
- [35] Li M, Liu Y, Zhang H, et al. Anti-cancer potential of polysaccharide extracted from *Polygonatum sibiricum* on HepG2 cells via cell cycle arrest and apoptosis [J]. Front Nutr, 2022, 9: 1054565.
- [36] Cai J, Zhu Y, Zuo Y, et al. *Polygonatum sibiricum* polysaccharide alleviates inflammatory cytokines and promotes glucose uptake in high-glucose- and high-insulin-induced 3T3-L1 adipocytes by promoting Nrf2 expression [J]. Mol Med Rep, 2019, 20(4): 3951-3958.
- [37] Yang J, Wu S, Huang X, et al. Hypolipidemic activity and antiatherosclerotic effect of polysaccharide of *Polygonatum sibiricum* in rabbit model and related cellular mechanisms [J]. Evid-Based Compl Alt, 2015, 2015: 391065.
- [38] Zebisch K, Voigt V, Wabitsch M, et al. Protocol for effective differentiation of 3T3-L1 cells to adipocytes [J]. Anal Biochem, 2012, 425(1): 88-90.
- [39] Jemai R, Drira R, Makni M, et al. Colocynth (*Citrullus colocynthis*) seed extracts attenuate adipogenesis by down-regulating PPAR gamma/SREBP-1c and C/EBP alpha in 3T3-L1 cells [J]. Food Biosci, 2020, 33: 100491.
- [40] Singh D, Sharma S, Choudhary M, et al. Role of plant-derived products through exhilarating peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (ppar-gamma) in the amelioration of obesity induced insulin resistance [J]. Curr Nutr Food Sci, 2022, 18(6): 549-558.
- [41] Ferre P, Phan F, Fougelle F. SREBP-1c and lipogenesis in the liver: An update [J]. Biochem J, 2021, 478(20): 3723-3739.
- [42] Liang J, Xu R, Zong K, et al. Structural analysis and anti-obesity effect of *Polygonatum cyrtonema* polysaccharide against obesity induced by high-fat diet in mice [J]. Int J Food Sci Tech, 2021, 56(9): 4473-4483.
- [43] Zhang X, Cheng B, Liu C, et al. A novel regulator of preadipocyte differentiation, transcription factor TCF21, functions partially through promoting LPL expression [J]. Front Physiol, 2019, 10: 458.
- [44] Ference B, Kastelein J, Ray K, et al. Association of triglyceride-lowering LPL variants and LDL-C-lowering LDLR variants with risk of coronary heart disease [J]. JAMA Am Med Assoc, 2019, 321(4): 364-373.
- [45] Floresta G, Patamia V, Zagni C, et al. Adipocyte fatty acid binding protein 4 (FABP4) inhibitors. An update from 2017 to early 2022 [J]. Eur J Med Chem, 2022, 240: 114604.
- [46] Liu S, Wu D, Fan Z, et al. FABP4 in obesity-associated carcinogenesis: Novel insights into mechanisms and therapeutic implications [J]. Front Mol Biosci, 2022, 9: 973955.
- [47] Li H, Wu X, Xu A, et al. A-FABP in metabolic diseases and the therapeutic implications: An update [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(17): 9386.
- [48] Guru A, Issac P, Velayutham M, et al. Molecular mechanism of down-regulating adipogenic transcription factors in 3T3-L1 adipocyte cells by bioactive anti-adipogenic compounds [J]. Molecular Biology Reports, 2021, 48(1): 743-761.
- [49] Shi X, Zhou X, Wang J, et al. Tartronic acid promotes de novo lipogenesis and inhibits CPT-1 beta by upregulating acetyl-CoA and malonyl-CoA [J]. Life Sci, 2020, 258: 118240.
- [50] Yang X, Wang X, Shi T, et al. Mitochondrial dysfunction in high-fat diet-induced nonalcoholic fatty liver disease: The alleviating effect and its mechanism of *Polygonatum kingianum* [J]. Biomed Pharmacother, 2019, 117: 109083.
- [51] Lamichhane G, Pandeya P, Lamichhane R, et al. Anti-obesity potential of ponciri fructus: effects of extracts, fractions and compounds on adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes [J]. Molecules, 2022, 27(3): 676.
- [52] Nallamuthu I, Jain A, Anand T. Comparative evaluation of *Brassica oleracea*, *Ocimum basilicum*, and *Moringa oleifera* leaf extracts on lipase inhibition and adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes [J]. Journal of Food Biochemistry, 2022, 46(7): 14158.