

## ◆ 中药学 ◆

## 龙眼叶黄酮类有效组分配伍体外降糖作用的研究\*

梁晶春<sup>1,2</sup>, 胡珏<sup>1,2</sup>, 安施佳<sup>1,2</sup>, 郑飘雪<sup>1,2</sup>, 陆春莲<sup>1,2</sup>, 梁炎丽<sup>1,2</sup>, 陈明伟<sup>1\*\*</sup>, 梁洁<sup>1,2,3\*\*</sup>

(1. 广西中医药大学药学院, 广西南宁 530200; 2. 广西高校中药提取纯化与质量分析重点实验室, 广西南宁 530200; 3. 广西壮瑶药重点实验室, 广西南宁 530200)

**摘要:** 基于体外降糖活性优选龙眼(*Dimocarpus longan* Lour.) 叶黄酮有效成分山柰酚、槲皮素、槲皮苷的配伍比例。建立 HepG2 细胞胰岛素抵抗模型, 分别考察不同浓度的胰岛素及不同诱导时间对胰岛素抵抗模型的诱导情况, 并以山柰酚、槲皮素、槲皮苷三者用量为考察因素, 以对胰岛素抵抗的 HepG2 细胞葡萄糖消耗率为指标, 运用星点设计-效应面法(CCD-RSM)优化三者配伍比例。结果表明, 建立 HepG2 细胞胰岛素抵抗模型的最佳条件为  $1 \times 10^{-7}$  mol/L 胰岛素诱导 24 h; 山柰酚、槲皮素、槲皮苷体外降糖最佳配伍比例为山柰酚 105.0  $\mu$ mol/L、槲皮素 78.9  $\mu$ mol/L、槲皮苷 194.0  $\mu$ mol/L, 配伍比例优化试验拟合方程为  $Y = 20.94 + 1.55 \times A - 0.44 \times B - 2.05 \times C - 0.66 \times AB + 1.68 \times AC - 1.53 \times A^2 - 3.2 \times B^2 - 2.68 \times C^2$ 。山柰酚、槲皮素、槲皮苷 3 种单体的联合使用对 HepG2 细胞的葡萄糖消耗率预测值是 21.52%, 实验值是 (21.05  $\pm$  0.52)%。优选出的最佳配伍比例的龙眼叶黄酮类有效组分, 对 HepG2 细胞的葡萄糖消耗率最高, 降糖活性较好, 可为龙眼叶治疗糖尿病的有效性提供科学方法与实验依据。

**关键词:** 龙眼叶; 组分配伍; 山柰酚; 槲皮素; 槲皮苷

中图分类号: R285 文献标识码: A 文章编号: 1002-7378(2024)02-0135-10

DOI: 10.13657/j.cnki.gxkxyxb.20240709.005

龙眼叶是无患子科(Sapindaceae)龙眼属(*Dimocarpus*)植物龙眼(*Dimocarpus longan* Lour.)的叶子或嫩芽, 具有清热解毒、祛风除湿等功效<sup>[1]</sup>。主要用于治疗发热、湿疹、肠炎等<sup>[2]</sup>, 常以单方形式治疗糖

收稿日期: 2023-11-18

修回日期: 2023-12-11

\* 国家自然科学基金项目(82160771), 广西壮瑶药重点实验室项目(桂科基字[2014]32号), 国家中医药管理局高水平中医药重点学科建设项目“少数民族药学(壮药学)”(zyyzdxk-2023165), 广西中医药多学科交叉创新团队项目(GZKJ2309), 广西高等学校千名中青年骨干教师培育计划项目(桂教人[2019]5号), 壮瑶药协同创新中心项目(桂教科研[2013]20号), 广西壮族自治区民族药资源与应用工程研究中心项目(桂发改高技函[2020]2605号), 广西重点研发计划项目(桂科 AB21196016), 广西中医药重点学科壮药学项目(GZXK-Z-20-64), 广西一流学科中药学(民族药学)项目(桂教科研[2018]12号), 广西科技基地和人才专项(桂科 AD20238058、桂科 AD21238031)和广西中医药大学第三批“岐黄工程”高层次人才团队培育项目(202406)资助。

【第一作者简介】

梁晶春(1997—), 女, 在读硕士研究生, 主要从事中药分析研究, E-mail: 1513963958@qq.com。

【\*\*通信作者简介】

陈明伟(1977—), 女, 硕士, 副教授, 主要从事药物分析研究, E-mail: 262584687@qq.com。

梁洁(1979—), 女, 博士, 教授, 主要从事中药药效物质基础研究, E-mail: liangjie1101@126.com。

【引用本文】

梁晶春, 胡珏, 安施佳, 等. 龙眼叶黄酮类有效组分配伍体外降糖作用的研究[J]. 广西科学院学报, 2024, 40(2): 135-144.

LIANG J C, HU J, AN S J, et al. Study on Hypoglycemic Effect of Flavonoids Active Component Compatibility from the Leaves of *Dimocarpus longan* Lour. *in vitro* [J]. Journal of Guangxi Academy of Sciences, 2024, 40(2): 135-144.

尿病。前期研究发现龙眼叶的乙酸乙酯部位具有一定的降糖活性<sup>[3]</sup>,其降血糖作用机制可能与胰岛细胞损伤修复、炎性反应因子水平降低有关<sup>[4]</sup>。初步推测黄酮类成分山柰酚、槲皮苷、槲皮素为龙眼叶抗 2 型糖尿病的药效物质基础<sup>[5]</sup>。因此,本研究通过星点设计-效应面法(CCD-RSM)设立优化实验方案,进行龙眼叶黄酮单体组分配伍的降糖作用研究,探讨山柰酚、槲皮苷、槲皮素最佳配伍比例,为提高龙眼叶组分配伍的科学性和临床治疗的有效性提供科学方法与实验依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

人肝癌 HepG2 细胞(购自中国科学院上海生命科学研究所细胞资源中心),1640 高糖培养基[赛默飞世尔生物化学制品(北京)有限公司],胎牛血清(浙江天杭生物科技股份有限公司),磷酸盐缓冲溶液(PBS,江苏凯基生物技术股份有限公司),0.25%胰酶细胞消化液和 CCK-8 试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司),葡萄糖试剂盒(上海荣盛生物药业股份有限公司),盐酸二甲双胍片(中美上海施贵宝制药有限公司),山柰酚对照品、槲皮苷对照品和槲皮素对照品(成都麦德生科技有限公司),无水乙醇为分析纯。

SW-CJ-1FD 型单人单面净化工作台(苏州智净净化设备有限公司),MCO-18AIC 型 CO<sub>2</sub> 细胞培养箱(日本 SAYO 生物科技有限公司),CK40+PM20 型倒置系统显微镜(日本 OLYMPUS OPTICAL 有限公司),Multiskan SkyHigh 全波长酶标仪、Sorrall ST 16R 型高速冷冻离心机 and Forma 89000 型超低温冰箱(美国 Thermo Fisher 科技公司),SQP 型万分之一电子分析天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司]。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 细胞复苏

用 75%乙醇擦拭 SW-CJ-1FD 型单人单面净化工作台后,摆放好实验所需的物品,并开启紫外灯照射 30 min 后,将 HepG2 细胞从-80℃冰箱中取出,快速放入 37℃水浴锅中,轻摇使其冻存液溶解;然后把细胞转移到装有 5 mL 含 10%胎牛血清的 1640 高糖培养基(完全培养基)的离心管中,1 000 r/min 离心 5 min,弃去上清液;用完全培养基轻轻吹打细胞,使细胞悬浮,接种到装有 3 mL 完全培养基的 25 cm<sup>3</sup> 细胞培养瓶中,倒置系统显微镜下观察,标记好细胞

名称、代数、日期后,放入 37℃、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养,24 h 内观察细胞状态及贴壁状况,待培养瓶中的培养液颜色变黄时换液,即用巴氏吸管将旧的培养液吸出培养瓶,再沿壁加入 2 mL PBS 冲洗细胞 2 次,最后加入新的完全培养基,后续每隔 2-3 d 换液 1 次。

#### 1.2.2 细胞传代

在倒置系统显微镜下观察 HepG2 细胞生长状况,当细胞的密度达到倒置系统显微镜视野下的 80%时,对细胞进行传代。弃去培养基,用 PBS 冲洗 2 次;加入 1-2 mL 0.25%胰蛋白酶消化,将培养瓶放回培养箱 2 min,倒置系统显微镜下观察至细胞相互分离且变圆,表明消化完成;加入完全培养基,轻轻吹打细胞使之成细胞悬液,1 000 r/min 离心 5 min,弃去上清液,重新加入新鲜的完全培养基,制成单细胞悬液,按 1:3 的比例传代,相同条件下扩大培养。

#### 1.2.3 HepG2 细胞胰岛素抵抗模型的建立

HepG2 细胞传代后,用完全培养基培养,按 4×10<sup>3</sup> 个/孔接种于 96 孔板,在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 24 h。弃去培养液,分别加入含 1×10<sup>-5</sup>、1×10<sup>-6</sup>、1×10<sup>-7</sup>、1×10<sup>-8</sup>、1×10<sup>-9</sup> mol/L 胰岛素的无血清培养液,加入不含胰岛素的无血清培养液作为对照组,另设一组不含细胞以及不加胰岛素作为空白组。设立 5 个复孔,并分别于 24、48 h 之后用葡萄糖测定试剂盒检测培养液上清液中的葡萄糖含量<sup>[6-8]</sup>。计算对照组与不同胰岛素浓度组细胞葡萄糖的消耗量和消耗率。葡萄糖消耗量=空白组葡萄糖含量-模型组葡萄糖含量<sup>[9-11]</sup>,葡萄糖消耗率(%)=(空白组葡萄糖含量-模型组葡萄糖含量)/空白组葡萄糖含量<sup>[12-13]</sup>。选择葡萄糖消耗率最小,即达到胰岛素抵抗最高状态的胰岛素作用浓度与时间分别为胰岛素最佳浓度与时间。

#### 1.2.4 山柰酚、槲皮素、槲皮苷对 HepG2 细胞存活率的影响

将 HepG2 细胞按 5×10<sup>4</sup> 个/mL 细胞悬液接种于 96 孔板内,每孔 100 μL,设置 5 个复孔。将接种后的细胞分为空白组、给药组和对照组 3 个组,空白组只加完全培养基不接种细胞,对照组则只加细胞悬液不加药物,给药组按以下不同药物浓度给药:山柰酚和槲皮素浓度梯度均为 20、40、60、80、100、120、140、160 μmol/L,槲皮苷浓度梯度为 100、120、140、160、180、200、220、240、260、280、300 μmol/L。依次加完后将细胞放入 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱内培养 24

h后将96孔板取出,轻轻吸出板孔内液体,并用PBS缓冲液清洗细胞2次,每孔加入90  $\mu\text{L}$ 的完全培养基和CCK-8溶液10  $\mu\text{L}$ 后,放入37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 培养箱内继续培养。1 h后取出96孔板,在450 nm波长下用酶标仪检测吸光度<sup>[14]</sup>。计算细胞存活率,实验重复3次。细胞存活率=(给药孔吸光度-空白孔吸光度)/(对照孔吸光度-空白孔吸光度) $\times 100\%$ <sup>[15]</sup>。根据CCK-8实验结果筛选出可促进HepG2细胞增殖的槲皮素、山柰酚、槲皮苷最适给药浓度。

### 1.2.5 龙眼叶黄酮成分的组分配伍优化

#### (1) CCD-RSM 实验

根据前期实验结果,在药物对细胞没有毒性的剂量范围内,确定各药的最适给药浓度范围。山柰酚用量用A ( $\mu\text{mol/L}$ )表示,槲皮素用量用B ( $\mu\text{mol/L}$ )表示,槲皮苷用量用C ( $\mu\text{mol/L}$ )表示,A、B、C为自变量,分别以山柰酚、槲皮素、槲皮苷对胰岛素抵抗的HepG2细胞葡萄糖消耗率Y(%)为考察指标,进行三因素五水平(-1.732, -1, 0, +1, +1.732)的CCD-RSM,因素水平见表1<sup>[16]</sup>。通过Design expert 8.0.6软件生成20组实验组合,按照表1列出的每组单体药物配比浓度加药。在相同条件下测定HepG2细胞的葡萄糖消耗率Y(%),记录每组因素组合的实验结果,并将实验结果填入对应列。

表1 CCD-RSM的因素水平

Table 1 Levels of factors for star design

水平 Level	因素 Factor		
	Kaempferol (A)	Quercetin (B)	Quercitrin (C)
-1.732	80	60	160
-1	88	68	177
0	100	80	200
+1	112	92	223
+1.732	120	100	240

#### (2) 最佳配比组合预测与验证

采用Design Expert 8.0.6软件对实验结果建立二次回归数学模型预测。根据二项式拟合方程,绘制葡萄糖消耗率影响趋势的三维效应面和二维等高图,选择最佳配伍比例并进行实验验证。

## 2 结果与分析

### 2.1 胰岛素抵抗模型的建立

#### 2.1.1 24 h不同浓度胰岛素对HepG2细胞胰岛素抵抗的影响

如表2所示,模型组HepG2细胞对葡萄糖的消

耗率相比于对照组均有不同程度的减少。其中,模型组 $1\times 10^{-7}$  mol/L与对照组相比,差异具有极显著统计学意义( $P<0.01$ ),说明胰岛素浓度为 $1\times 10^{-7}$  mol/L时,HepG2细胞对葡萄糖消耗率明显减少,为20.62%;模型组 $1\times 10^{-8}$ 、 $1\times 10^{-9}$  mol/L与对照组相比,差异具有统计学意义( $P<0.05$ ),说明胰岛素浓度为 $1\times 10^{-8}$ 、 $1\times 10^{-9}$  mol/L时,HepG2细胞对葡萄糖消耗率减少,分别为21.76%、23.26%;其余浓度与对照组相比,差异无显著性。由此可判定胰岛素浓度 $1\times 10^{-7}$  mol/L为HepG2细胞产生胰岛素抵抗的最佳作用浓度。

表2 24 h不同浓度胰岛素对HepG2细胞胰岛素抵抗的影响  
Table 2 Effects of different concentrations of insulin on insulin resistance of HepG2 cells at 24 h

组别 Group	胰岛素浓度/ (mol/L) Insulin concentration/ (mol/L)	葡萄糖消耗量/ (mmol/L) Glucose consumption/ (mmol/L)	葡萄糖 消耗率/% Glucose consumption rate/%
Control group	0	3.26 $\pm$ 0.02	29.16
Model group	$1\times 10^{-5}$	2.89 $\pm$ 0.19	25.82
	$1\times 10^{-6}$	2.74 $\pm$ 0.16	24.54
	$1\times 10^{-7}$	2.31 $\pm$ 0.11 * *	20.62
	$1\times 10^{-8}$	2.43 $\pm$ 0.08 *	21.76
	$1\times 10^{-9}$	2.60 $\pm$ 0.07 *	23.26

Note: compared with the control group, \* \* means  $P<0.01$ , \* means  $P<0.05$ .

#### 2.1.2 48 h不同浓度胰岛素对HepG2细胞胰岛素抵抗的影响

如表3所示,模型组HepG2细胞对葡萄糖的消耗率相比于对照组均有不同程度的减少。其中,模型组 $1\times 10^{-7}$ 、 $1\times 10^{-8}$  mol/L与对照组相比差异具有统计学意义( $P<0.05$ ),说明胰岛素浓度为 $1\times 10^{-7}$ 、 $1\times 10^{-8}$  mol/L时,HepG2细胞对葡萄糖消耗率减少,分别为25.55%、27.04%;其余浓度与对照组相比差异无显著性。与胰岛素浓度 $1\times 10^{-8}$  mol/L组相比,浓度为 $1\times 10^{-7}$  mol/L时,HepG2细胞对葡萄糖的消耗率更小,由此可判定胰岛素浓度 $1\times 10^{-7}$  mol/L为HepG2细胞产生胰岛素抵抗的最佳作用浓度。在胰岛素浓度同为 $1\times 10^{-7}$  mol/L的情况下,与作用时间48 h相比,作用24 h时HepG2细胞对葡萄糖的消耗率更小,耗时更少,因此选择胰岛素浓度 $1\times 10^{-7}$  mol/L、时间24 h作为HepG2细胞产生胰岛素抵抗的实验条件。

表 3 48 h 不同浓度胰岛素对 HepG2 细胞胰岛素抵抗的影响  
Table 3 Effects of different concentrations of insulin on insulin resistance of HepG2 cells at 48 h

组别 Group	胰岛素浓度/ (mol/L) Insulin concentration/ (mol/L)	葡萄糖消耗量/ (mmol/L) Glucose consumption/ (mmol/L)	葡萄糖 消耗率/% Glucose consumption rate/%
Control group	0	3.36±0.07	32.66
Model group	1×10 <sup>-5</sup>	2.98±0.35	28.53
	1×10 <sup>-6</sup>	2.84±0.19	26.43
	1×10 <sup>-7</sup>	2.33±0.07 *	25.55
	1×10 <sup>-8</sup>	2.67±0.03 *	27.04
	1×10 <sup>-9</sup>	3.05±0.15	29.21

Note: compared with the control group, \* means  $P < 0.05$ .

## 2.2 山柰酚、槲皮素、槲皮苷浓度对 HepG2 细胞存活率的影响

用 CCK-8 法检测不同浓度山柰酚、槲皮素和槲皮苷浓度对 HepG2 细胞存活率的影响,结果见表 4 和表 5。根据《医疗器械生物学评价 第 5 部分:体外细胞毒性试验》(GB/T 16886.5-2017),当细胞活力降低超过 30% 时表示药物具有细胞毒性作用。因此,在药物对细胞没有毒性的剂量范围内,确定了各药的最适给药浓度:山柰酚 80-120  $\mu\text{mol/L}$ 、槲皮素 60-100  $\mu\text{mol/L}$ 、槲皮苷 160-240  $\mu\text{mol/L}$ 。

表 4 山柰酚、槲皮素浓度对 HepG2 细胞存活率的影响

Table 4 Effects of kaempferol and quercetin concentration on survival rate of HepG2 cells

给药浓度/ ( $\mu\text{mol/L}$ ) Dose concentration/ ( $\mu\text{mol/L}$ )	HepG2 细胞存活率/% Survival rate of HepG2 cells/%	
	山柰酚 Kaempferol	槲皮素 Quercetin
0	100.00	100.00
20	127.99±6.43 *	113.23±6.41
40	114.22±8.87	105.86±7.33
60	104.93±13.21	95.28±6.50
80	95.83±1.43 *	87.80±3.19
100	84.64±0.99 * *	68.19±2.27 * *
120	75.70±2.87 * *	62.79±7.89 * *
140	66.77±2.96 * *	58.21±2.90 * *
160	62.98±4.92 * *	55.55±5.24 * *

Note: compared with the blank group (0  $\mu\text{mol/L}$ ), \* means  $P < 0.05$ , \* \* means  $P < 0.01$ .

## 2.3 龙眼叶黄酮成分组分配伍的优化

### 2.3.1 CCD-RSM 实验结果

根据 CCD-RSM 得到的实验结果如表 6 所示,单

表 5 槲皮苷浓度对 HepG2 细胞存活率的影响

Table 5 Effects of quercitrin concentration on survival rate of HepG2 cells

槲皮苷浓度/( $\mu\text{mol/L}$ ) Quercitrin concentration/ ( $\mu\text{mol/L}$ )	HepG2 细胞存活率/% Survival rate of HepG2 cells/%
0	100.00
100	104.09±4.13
120	99.36±4.47
140	97.35±8.47
160	94.66±2.78
180	88.44±1.38 * *
200	84.54±2.42 * *
220	80.62±2.00 * *
240	76.80±5.17 * *
260	74.60±3.18 * *
280	73.29±2.16 * *
300	69.88±7.28 * *

Note: compared with the blank group (0  $\mu\text{mol/L}$ ), \* \* means  $P < 0.01$ .

表 6 CCD-RSM 实验设计与结果

Table 6 Experimental design and results of CCD-RSM

试验号 Test number	A/ ( $\mu\text{mol/L}$ )	B/ ( $\mu\text{mol/L}$ )	C/ ( $\mu\text{mol/L}$ )	Y/%
1	-1	-1	-1	15.36
2	1	-1	-1	16.97
3	-1	1	-1	15.73
4	1	1	-1	14.62
5	-1	-1	1	8.32
6	1	-1	1	16.58
7	-1	1	1	7.57
8	1	1	1	13.24
9	-1.732	0	0	14.24
10	1.732	0	0	18.41
11	0	-1.732	0	11.34
12	0	1.732	0	11.25
13	0	0	-1.732	16.26
14	0	0	1.732	9.49
15	0	0	0	21.52
16	0	0	0	20.75
17	0	0	0	20.73
18	0	0	0	21.34
19	0	0	0	20.63
20	0	0	0	20.66

体药物的葡萄糖消耗率结果如表 7 所示,其中,二甲双胍为阳性对照组。配伍给药组降糖的作用较明显,

葡萄糖消耗率均较高,其各单体药物的浓度值相对较低(表6);3种单体分别有一定的降血糖作用,但没有配伍给药组降糖的效果明显,而且单体给药组降糖作用较好的组别,其单体浓度普遍偏高(表7),不如配伍给药组以相对较低的浓度配比获得较高的葡萄糖消耗率。

表7 不同浓度单体药物对胰岛素抵抗的 HepG2 细胞的葡萄糖消耗率

Table 7 Glucose consumption rate of insulin-resistant HepG2 cells with different concentrations of monomer drugs

药物名称 Drug name	给药浓度/ $(\mu\text{mol/L})$ Dose concentration/ $(\mu\text{mol/L})$	葡萄糖消耗率/% Glucose consumption rate/%
Metformin	16 000	14.80±1.05
	8 000	14.16±0.87
	4 000	21.98±0.84
Kaempferol	80	13.88±1.06
	88	9.88±1.07
	100	17.23±1.32
	112	12.65±0.79
	120	10.40±0.96
Quercetin	60	16.13±0.55
	68	5.07±1.37
	80	8.26±0.90
	92	11.79±0.64
	100	7.79±1.02
Quercitrin	160	4.90±0.96
	177	8.72±0.98
	200	14.40±0.93
	223	11.64±1.01
	240	7.50±1.00

表8 消耗率模型及回归系数的回归分析结果

Table 8 Regression analysis results of consumption rate model and regression coefficient

来源 Source	离差平方和 Sum of squares of deviation	自由度 Degree of freedom	均方 Mean square	F 值 F value	P 值 P value	显著性 Significance
Model	378.86	9	42.1	107.04	< 0.000 1	**
A	33.49	1	33.49	85.16	< 0.000 1	**
B	2.77	1	2.77	7.04	0.024 2	*
C	58.82	1	58.82	149.57	< 0.000 1	**
AB	3.52	1	3.52	8.96	0.013 5	*
AC	22.55	1	22.55	57.33	< 0.000 1	**
BC	0.56	1	0.56	1.42	0.261 7	
A <sup>2</sup>	36.78	1	36.78	93.53	< 0.000 1	**
B <sup>2</sup>	161.77	1	161.77	411.35	< 0.000 1	**
C <sup>2</sup>	112.97	1	112.97	287.26	< 0.000 1	**

### 2.3.2 回归模型建立与显著性分析

运用 Design expert 8.0.6 数据分析软件对试验数据进行多元回归拟合,结果见表8,得到二次多项回归模型为  $Y = 20.94 + 1.55 \times A - 0.44 \times B - 2.05 \times C - 0.66 \times AB + 1.68 \times AC - 0.26 \times BC - 1.53 \times A^2 - 3.2 \times B^2 - 2.68 \times C^2$ 。

在  $\alpha = 0.05$  显著性水平下,剔除对影响不显著的因素得到回归方程为  $Y = 20.94 + 1.55 \times A - 0.44 \times B - 2.05 \times C - 0.66 \times AB + 1.68 \times AC - 1.53 \times A^2 - 3.2 \times B^2 - 2.68 \times C^2$ ,  $R^2 = 0.989 7$ 。说明用二项式数学模型预测实验的数据结果是可信的。对方程进行方差分析可知回归方程具有显著性差异 ( $P < 0.01$ ),3个因素对 HepG2 细胞葡萄糖消耗率的影响排序为  $C > A > B$ ,其中,槲皮苷、山柰酚对葡萄糖消耗率影响极显著 ( $P < 0.01$ ),回归方程的失拟项不显著 ( $P > 0.05$ ),表明未知因素对实验结果的干扰小,模型能充分拟合实验数据。

### 2.3.3 各因素的交互作用

根据回归方程,考察响应面曲面图及等高线图的形状,分析山柰酚、槲皮素、槲皮苷对葡萄糖消耗率的影响。响应面曲面图和等高线图可以很好地反映自变量之间的相互作用。通过观察响应面曲面图的坡度陡峭程度,可确定两者对响应值的影响程度,响应面曲面图越陡峭说明两者的交互作用越明显。

续表

Continued table

来源 Source	离差平方和 Sum of squares of deviation	自由度 Degree of freedom	均方 Mean square	F 值 F value	P 值 P value	显著性 Significance
Residual error	3.93	10	0.39			
Missing fit	3.18	5	0.64	4.24	0.069 6	ns
Pure error	0.75	5	0.15			
Sum total	382.79	19				

$R^2=0.989 7$  Adj  $R^2=0.980 5$

Note:  $P < 0.01$  means extremely significant and is represented by \* \* ;  $P < 0.05$  means significant and is represented by \* ;  $P > 0.05$  means not significant and is represented by ns.

山柰酚和槲皮素交互作用对葡萄糖消耗率的影响如图 1 所示。在槲皮苷浓度为  $200 \mu\text{mol/L}$  的情况下,当山柰酚浓度小于  $100 \mu\text{mol/L}$  时,随着槲皮素浓度的逐渐升高,葡萄糖消耗率先升高后降低;当山柰酚浓度大于  $100 \mu\text{mol/L}$  时,随着槲皮素浓度的逐渐升高,葡萄糖消耗率呈现先缓慢升高后迅速降低的变化趋势;当槲皮素浓度小于  $80 \mu\text{mol/L}$  时,随着山柰酚浓度的逐渐升高,葡萄糖消耗率呈逐渐升高的趋势,当槲皮素浓度大于  $80 \mu\text{mol/L}$  时,随着山柰酚浓度的逐渐升高,葡萄糖消耗率呈先升高后缓慢降低的趋势。说明山柰酚和槲皮素之间存在显著的交互作用,且山柰酚的变化陡峭程度大于槲皮素,说明山柰酚对葡萄糖消耗率的影响大于槲皮素。

山柰酚和槲皮苷交互作用对葡萄糖消耗率的影响如图 2 所示。当槲皮素浓度为  $80 \mu\text{mol/L}$ 、槲皮苷浓度一定时,随着山柰酚浓度的逐渐升高,葡萄糖消耗率呈先升高后降低的趋势。在槲皮素浓度为  $80$

$\mu\text{mol/L}$  的情况下,当山柰酚浓度小于  $100 \mu\text{mol/L}$  时,随着槲皮苷浓度的逐渐升高,葡萄糖消耗率逐渐减小;当山柰酚浓度大于  $100 \mu\text{mol/L}$  时,随着槲皮苷浓度的逐渐升高,葡萄糖消耗率先升高后降低。说明山柰酚和槲皮苷之间存在显著的交互作用,且槲皮苷的变化陡峭程度大于山柰酚,说明槲皮素对葡萄糖消耗率的影响大于山柰酚。

槲皮素和槲皮苷交互作用对葡萄糖消耗率的影响如图 3 所示。当山柰酚浓度为  $100 \mu\text{mol/L}$ 、槲皮素浓度一定时,随着槲皮苷浓度的逐渐升高,葡萄糖消耗率先升高后降低;当山柰酚浓度为  $100 \mu\text{mol/L}$ 、槲皮苷浓度一定时,随着槲皮素浓度的逐渐升高,葡萄糖消耗率呈现先升高后降低的变化趋势。说明槲皮素和槲皮苷之间无显著的交互作用,且槲皮苷的变化陡峭程度大于槲皮素,说明槲皮苷对葡萄糖消耗率的影响大于槲皮素。

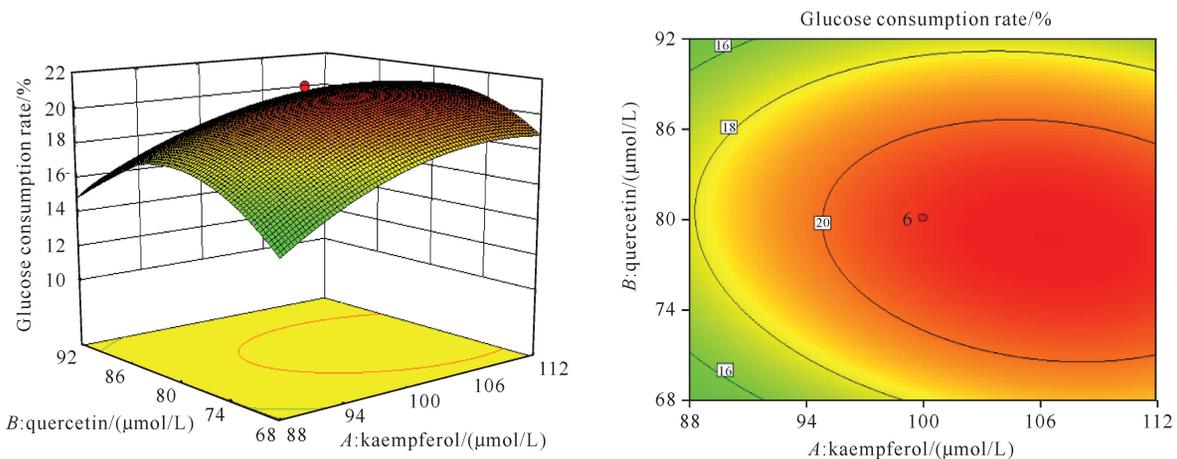


图 1 山柰酚和槲皮素交互作用对葡萄糖消耗率的响应面曲面图和等高线图

Fig. 1 Response surface diagram and contour chart of the interaction between kaempferol and formed quercetin on glucose consumption rate

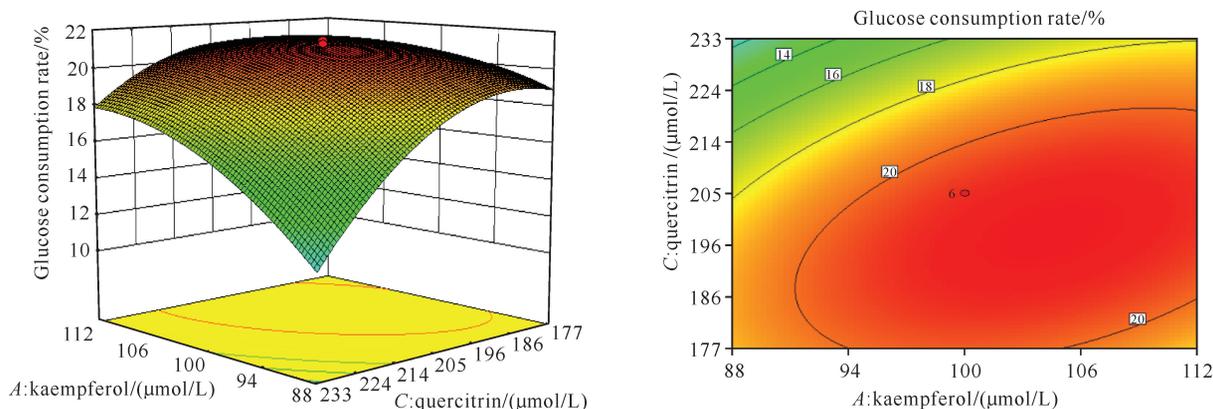


图2 山柰酚和槲皮苷交互作用对葡萄糖消耗率的响应面曲面图和等高线图

Fig. 2 Response surface diagram and contour chart of kaempferol and quercetin interaction on glucose consumption rate

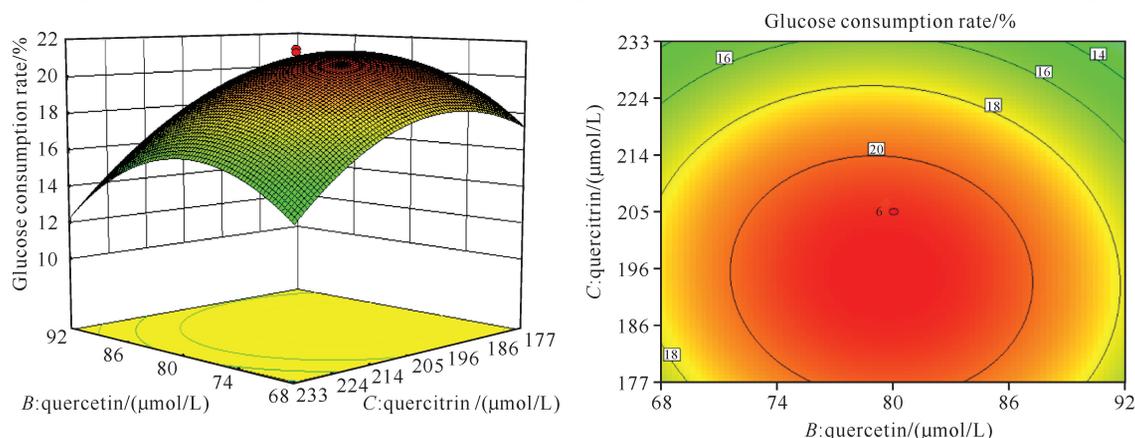


图3 槲皮素和槲皮苷交互作用对葡萄糖消耗率的响应面曲面图和等高线图

Fig. 3 Response surface diagram and contour chart of quercetin and quercetin interaction on glucose consumption rate

## 2.4 验证实验结果

根据回归方程模型,得到预测的最优条件:山柰酚浓度为  $104.807 \mu\text{mol/L}$ 、槲皮素浓度为  $78.855 \mu\text{mol/L}$ 、槲皮苷浓度为  $194.078 \mu\text{mol/L}$ ,根据实际情况将该条件修正为山柰酚浓度为  $105.0 \mu\text{mol/L}$ 、槲皮素浓度为  $78.9 \mu\text{mol/L}$ 、槲皮苷浓度为  $194.0 \mu\text{mol/L}$ (根据实验可调整的参数进行设置),在此最优条件下经6次平行实验,实际得到的葡萄糖消耗率为  $(21.05 \pm 0.52)\%$ ,与预测值  $21.52\%$  相差  $2.19\%$ ,证实了预测值和实验值之间具有良好的相关性。

## 3 讨论

龙眼叶是一味具有广西民族特色的中药材,其性味甘、淡、平,具有发表清热、利湿解毒等功效。随着研究的深入,发现龙眼叶有多种化学成分,如多酚类、黄酮类以及挥发油物质<sup>[17,18]</sup>,其中黄酮类化合物为其主要活性物质。黄酮类成分具有抑制  $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性,延缓机体对葡萄糖的吸收,从而降低血糖的作用<sup>[19-21]</sup>。

本研究建立 HepG2 细胞胰岛素抵抗模型,通过 CCK8 法筛选出 3 种黄酮类成分的最佳给药浓度,并采用 CCD-RSM 的设计方案,优选出龙眼叶黄酮类成分的最佳组分配伍比例。CCD-RSM 是一种在药学领域中常用的设计方法,具有实验精度高、实验次数少、预测性较好等特点,可用于优化制剂工艺以及组分配伍<sup>[22,23]</sup>。配伍是中药应用的基本形式之一<sup>[24]</sup>,中药配伍是通过比例或药味之间的搭配,促进不同药物之间相互作用,从而发挥药物的最大疗效,主要表现在药物的体内过程如代谢、排泄等不同环节<sup>[25]</sup>。因此,本研究通过龙眼叶黄酮类单体成分组分配伍来协同降糖以增强龙眼叶治疗糖尿病的效果。

本课题组前期研究了龙眼叶在 2 型糖尿病模型大鼠体内的代谢成分,并根据实验结果,结合黄酮类成分为龙眼叶的主要药效基础,初步推测山柰酚、槲皮苷、槲皮素为龙眼叶抗 2 型糖尿病的药效物质基础<sup>[26]</sup>。目前的研究多数集中在黄酮类单体成分的降血糖作用。如汤小平等<sup>[27]</sup>研究发现槲皮苷可改善糖尿病大鼠的糖耐量异常,存在一定的降血糖作用。吴

巧敏等<sup>[28]</sup>研究发现山柰酚能够降低 2 型糖尿病大鼠的血糖并改善胰岛素抵抗。王建礼等<sup>[29]</sup>发现槲皮素能降低 2 型糖尿病大鼠的血糖。本研究将龙眼叶中 3 种黄酮类成分以不同比例配伍,通过 CCD-RSM 实验设计,优选出龙眼叶黄酮成分的最佳组分配伍比例。研究结果显示,山柰酚、槲皮素、槲皮苷配伍能显著改善胰岛素抵抗 HepG2 细胞的葡萄糖消耗率,消耗率越高则降血糖效果越好,改善情况与三者的配伍比例有一定关系。在槲皮苷浓度一定的前提下,随着槲皮素浓度升高,疗效先增强后减弱,当槲皮素浓度小于 80  $\mu\text{mol/L}$  时,随着山柰酚用量增加,疗效逐渐增加;当槲皮素浓度大于 80  $\mu\text{mol/L}$  时,随着山柰酚用量增加,疗效先增强后减弱。在槲皮素浓度一定的前提下,随着山柰酚浓度升高,疗效先增强后减弱,当山柰酚浓度小于 100  $\mu\text{mol/L}$  时,随着槲皮苷用量增加,疗效逐渐减弱;当山柰酚浓度大于 100  $\mu\text{mol/L}$  时,随着槲皮苷用量增加,疗效先增强后减弱。在山柰酚浓度一定的前提下,随着槲皮苷和槲皮素用量增加,疗效先增强后减弱。最终优选出龙眼叶黄酮单体成分最佳配伍比例为山柰酚 105.0  $\mu\text{mol/L}$ 、槲皮素 78.9  $\mu\text{mol/L}$ 、槲皮苷 194.0  $\mu\text{mol/L}$ 。

综上所述,龙眼叶组分配伍可以提高药物临床疗效,但配伍组分治疗糖尿病的作用机制后续还需要开展更进一步的研究。

#### 4 结论

本研究通过高浓度胰岛素诱导建立胰岛素抵抗模型,分别考察了不同浓度的胰岛素及不同诱导时间对胰岛素抵抗模型的诱导情况。结果显示,HepG2 细胞建立胰岛素抵抗模型的最佳条件为  $1 \times 10^{-7}$  mol/L 胰岛素诱导 24 h;并通过 CCD-RSM 实验优选山柰酚、槲皮素、槲皮苷的最佳配伍比例,最终确定龙眼叶黄酮类单体成分最佳配伍比例为山柰酚 105.0  $\mu\text{mol/L}$ 、槲皮素 78.9  $\mu\text{mol/L}$ 、槲皮苷 194.0  $\mu\text{mol/L}$ 。本研究可为确定龙眼叶最佳配伍比例提供数据支撑,为后期龙眼叶配伍组分调节糖脂代谢机制的研究奠定基础。

#### 参考文献

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草:13 卷 [M]. 上海:上海科学技术出版社,1999:112.
- [2] 福建省医药研究所. 福建中药志(第一册)[M]. 福州:福建人民出版社,1979:296.
- [3] 梁洁,金青青,黄团心,等. 龙眼叶不同极性部位对 2 型糖尿病小鼠的降血糖作用研究[J]. 中国药房,2018,29(7):950-954.
- [4] 梁洁,金青青,黄团心,等. 龙眼叶乙酸乙酯提取物对 2 型糖尿病大鼠降血糖作用机制的研究[J]. 中华中医药杂志,2019,34(2):563-568.
- [5] 梁洁,韦金玉,黄冬芳,等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术的龙眼叶入血成分分析[J]. 中药材,2021,44(3):615-621.
- [6] 李秀丽,贺嵩敏,朱莹,等. HepG2 细胞胰岛素抵抗模型的建立与鉴定[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(5):203-207.
- [7] 肖婷,唐永瑜,张道宏,等. 黑树莓花色苷对 HepG2 细胞胰岛素抵抗作用研究[J]. 药物评价研究,2022,45(9):1810-1815.
- [8] 王瑞雪,房一明,郭娜,等. 柠檬皮多酚对胰岛素抵抗的 HepG2 细胞葡萄糖消耗量的影响[J]. 食品工业,2022,43(9):161-165.
- [9] 刘迪迪,邱军强,程翠林,等. HepG2 细胞胰岛素抵抗模型建立影响因素研究[J]. 食品与药品,2018,20(1):1-6.
- [10] 马永强,韩焯,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.
- [11] 蒋国君,刘天旭,黄桂红,等. 异槲皮苷对 HepG2 细胞中 Raf/MEK/ERK 信号通路的干预作用[J]. 中国药理学通报,2017,33(10):1382-1387.
- [12] TIE F F, DING J, HU N, et al. Kaempferol and kaempferide attenuate oleic acid-induced lipid accumulation and oxidative stress in HepG2 cells [J]. International Journal of Molecular Sciences,2021,22(16):8847.
- [13] 陈琪,刘婷婷,白图雅,等. 槲皮素通过调节 AhR 和 Nrf2 通路对 HepG2 细胞中药物代谢酶 GSTP1 的影响[J]. 中南药学,2022,20(1):8-13.
- [14] 容子玲,刘玉晖,朱洪杨,等. 葛根抑制高糖诱导巨噬细胞损伤与调控内质网应激信号通路的关系探讨[J]. 中国实验方剂学杂志,2022,28(24):58-64.
- [15] 范泽萍,陈兰英,刘鹏,等. 白头翁皂苷 A3 通过 M2 型巨噬细胞提高人结肠癌 SW480 细胞对 5-FU 的化疗敏感性[J]. 中国医院药学杂志,2022,42(18):1868-1875.
- [16] 朱秀珍,席啸虎. 星点设计-效应面法优化茯苓、厚朴、郁金配伍比例的研究[J]. 中国民间疗法,2021,29(17):85-88,114.
- [17] 梁洁,滕建北,柳贤福,等. 龙眼叶化学成分预试研究[J]. 中国民族民间医药,2010,19(4):142-143.
- [18] 梁洁,王雯慧,甄汉深,等. 广西产龙眼叶及花挥发油成分气质联用分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(9):52-55.

- [19] KIMURA A, LEE J H, LEE I S, et al. Two potent competitive inhibitors discriminating alpha-glucosidase family I from family II [J]. Carbohydrate Research, 2004, 339(6): 1035-1040.
- [20] TADERA K, MINAMI Y, TAKAMATSU K, et al. Inhibition of alpha-glucosidase and alpha-amylase by flavonoids [J]. Journal of Nutritional Science and Vitamins, 2006, 52(2): 149-153.
- [21] 吴小杰, 邹滨, 赵海桃, 等. 刺玫果黄酮对胰岛素抵抗 HepG2 细胞糖代谢功能研究[J]. 林产化学与工业, 2023, 43(3): 41-48.
- [22] 方哲正, 黄味子, 戚建平, 等. 星点设计-效应面优化法在国内制剂处方优化中的应用进展[J]. 药学学报, 2021, 56(1): 169-177.
- [23] 谢静静, 杨永寿, 郝芳芳, 等. 星点设计-响应面法优选美洲大蠊抗肝纤维化颗粒的成型工艺[J]. 医药导报, 2021, 40(12): 1710-1715.
- [24] 王阶, 郭丽丽, 杨戈, 等. 方剂配伍理论研究方法及研究前景[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2006, 8(1): 1-5.
- [25] 王旭华, 徐顶巧, 黄露, 等. 黄连-吴茱萸药对配伍机制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(3): 266-274.
- [26] 胡珏, 梁洁, 李萍, 等. 基于 UHPLC-Q-Orbitrap MS 技术的龙眼叶乙酸乙酯部位体内代谢研究[J]. 中华中医药学刊, 2023, 41(7): 173-180.
- [27] 汤小平, 施宁川, 丁志山, 等. 槲皮苷对原发性糖尿病大鼠血糖的作用研究[J]. 中国药师, 2016, 19(8): 1449-1451, 1454.
- [28] 吴巧敏, 金雅美, 倪海祥. 山柰酚对 2 型糖尿病大鼠慢性并发症相关因子的影响[J]. 中草药, 2015, 46(12): 1806-1809.
- [29] 王建礼, 杨作成, 王聪, 等. 槲皮素对糖尿病大鼠的降糖作用及机制研究[J]. 济宁医学院学报, 2018, 41(2): 135-138.

## Study on Hypoglycemic Effect of Flavonoids Active Component Compatibility from the Leaves of *Dimocarpus longan* Lour. *in vitro*

LIANG Jingchun<sup>1,2</sup>, HU Jue<sup>1,2</sup>, AN Shijia<sup>1,2</sup>, ZHENG PiaoXue<sup>1,2</sup>, LU Chunlian<sup>1,2</sup>,  
LIANG Yanli<sup>1,2</sup>, CHEN Mingwei<sup>1\*\*</sup>, LIANG Jie<sup>1,2,3\*\*</sup>

(1. College of Pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning, Guangxi, 530200, China; 2. Key Laboratory of TCM Extraction and Purification and Quality Analysis in Guangxi Universities, Nanning, Guangxi, 530200, China; 3. Guangxi Key Laboratory of Zhuang and Yao Ethnic Medicine, Nanning, Guangxi, 530200, China)

**Abstract:** Based on the hypoglycemic activity *in vitro*, the compatibility ratio of kaempferol, quercetin and quercitrin of flavonoids from the leaves of *Dimocarpus longan* Lour. was optimized. The insulin resistance model of HepG2 cells was established. The induction of insulin resistance model by different concentrations of insulin and different induction time was investigated. The dosage of kaempferol, quercetin and quercitrin was used as the investigation factor, and the glucose consumption rate of insulin-resistant HepG2 cells was used as the index. The star design-response surface method was used to optimize the compatibility ratio of the three. The results showed that the optimal condition for establishing the insulin resistance model of HepG2 cells was  $1 \times 10^{-7}$  mol/L insulin induction for 24 h. The optimal compatibility ratio of kaempferol, quercetin and quercitrin *in vitro* was kaempferol 105.0  $\mu$ mol/L, quercetin 78.9  $\mu$ mol/L and quercitrin 194.0  $\mu$ mol/L. The fitting equation of compatibility ratio optimization test was  $Y = 20.94 + 1.55 \times A - 0.44 \times B - 2.05 \times C - 0.66 \times AB + 1.68 \times AC - 1.53 \times A^2 - 3.2 \times B^2 - 2.68 \times C^2$ . The combined use of kaempferol, quercetin and

quercitrin predicted a glucose consumption rate of 21.52% in HepG2 cells, and the experimental value was  $(21.05 \pm 0.52)$ %. The optimal compatibility ratio has the highest glucose consumption rate and better hypoglycemic activity for HepG2 cells, which could provide scientific methods and experimental basis for the effectiveness of *D. longan* Lour. leaves in the treatment of diabetes.

**Key words:** the leaves of *Dimocarpus longan* Lour.; component compatibility; kaempferol; quercetin; quercitrin

责任编辑:陆雁

## 广西植物研究所参与起草的国家标准《岩溶区水土资源开发利用规范》正式发布

国家标准《岩溶区水土资源开发利用规范》(GB/T 43937—2024)由国家市场监督管理总局、国家标准化管理委员会于2024年4月25日正式发布,并将于2024年8月1日起实施。该标准由广西植物研究所与中国地质科学院岩溶地质研究所、水利部珠江水利委员会共同起草,广西植物研究所植被生态学与岩溶植被修复创新团队成员陆树华研究员参与了起草工作。

该标准为推荐性国家标准,主要规定了岩溶区的水资源开发、水资源高效利用、土地整理、土壤改良、水土保持、内涝防治等要求,适用于我国南方典型岩溶发育地区水土资源开发利用、国土整治、石漠化综合治理、生态修复、水土保持等工作,其他相似岩溶地区也可参照使用。

多年来,广西植物研究所积极参与岩溶山区石漠化治理研究工作,不断探索岩溶区水土资源高效利用技术,在石山地区引进了多种具有良好水土保持效果的树种和牧草,提高了生态环境调蓄水资源和保持水土能力。同时,开发了具有自主知识产权的适用于岩溶石山区的重力滴灌施肥系统,在石漠化山地果树种植上应用并取得良好效果,显著提高了石山地区水肥资源利用效率。相关研究和技术措施为这一国家标准的制订提供了支撑材料。

转载自微信公平台:广西科学院



微信公众号投稿更便捷

联系电话:0771-2503923

邮箱:gxxkxyxb@gxas.cn

投稿系统网址:<http://gxxk.ijournal.cn/gxxkxyxb/ch>