

彭东, 罗志锋, 陶倩, 等. 发酵巴戟天中蒽醌提取及其抗氧化与降血糖活性 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(7): 214–223. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080091

PENG Dong, LUO Zhifeng, TAO Qian, et al. Extraction of Anthraquinone from Fermented *Morinda officinalis* and Its Antioxidant and Hypoglycemic Activities[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(7): 214–223. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080091

· 工艺技术 ·

发酵巴戟天中蒽醌提取及其抗氧化与降血糖活性

彭东¹, 罗志锋¹, 陶倩², 安苗青¹, 朱思阳³, 黎攀¹, 杜冰^{1,*}

(1. 华南农业大学食品学院, 广东广州 510642;

2. 无限极(中国)有限公司, 广东广州 510623;

3. 花安堂生物科技集团有限公司, 广东广州 511500)

摘要:目的: 优化发酵巴戟天蒽醌的提取工艺, 并评价其抗氧化和降血糖活性。方法: 以蒽醌提取率为指标, 通过响应面法确定最佳提取工艺; 测定蒽醌对 DPPH 自由基、OH 自由基和超氧阴离子的清除能力来评价体外抗氧化活性; 测定蒽醌对线虫寿命和运动能力的影响来评价体内抗氧化活性; 测定蒽醌对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶的抑制率来评价体外降血糖活性; 测定蒽醌对 IR-HepG2 细胞葡萄糖消耗量的影响来评价体内降血糖活性。结果: 蒽醌最佳提取工艺为乙醇体积分数 45%、料液比 1:41 (g/mL)、提取温度 65 °C、提取时间 1.60 h, 在此工艺下蒽醌提取率为 90.37%。蒽醌在体外对 DPPH 自由基、羟自由基和超氧阴离子具有良好的清除能力; 在体内能显著延长线虫的寿命 ($P<0.05$), 增强线虫的运动能力。蒽醌对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的 IC_{50} 值分别为 0.588 mg/mL 和 0.575 mg/mL; 在 1.2 mg/mL 蒽醌组中 IR-HepG2 细胞葡萄糖消耗量较模型组细胞显著提高 47.42% ($P<0.01$)。结论: 发酵巴戟天蒽醌具有良好的抗氧化和降血糖活性, 为治疗糖尿病的天然药物的开发提供基础数据。

关键词: 巴戟天, 蒽醌, 提取, 抗氧化, 降血糖, 发酵

中图分类号: R284.2

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2022)07-0214-10

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080091



本文网刊:

Extraction of Anthraquinone from Fermented *Morinda officinalis* and Its Antioxidant and Hypoglycemic Activities

PENG Dong¹, LUO Zhifeng¹, TAO Qian², AN Miaoqing¹, ZHU Siyang³, LI Pan¹, DU Bing^{1,*}

(1. College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

2. Infinitus(China) Co., Ltd., Guangzhou 510623, China;

3. Hua An Tang Biological Technology Group Co., Ltd., Guangzhou 511500, China)

Abstract: Objective: Optimization of the extraction process of anthraquinone from fermented *Morinda officinalis* and investigated its antioxidant and hypoglycemic activities. Methods: Taking the extraction ratio of anthraquinone as the evaluation index, the optimal conditions were obtained by response surface methodology. *In vitro*, the antioxidant activity was evaluated by determining the scavenging ability of anthraquinone against DPPH free radical, hydroxyl free radical and superoxide anion assays. *In vivo*, the antioxidant activity was evaluated by measuring the effect of anthraquinone on the life span and motility of *Caenorhabditis elegans*. The hypoglycemic activity *in vitro* was evaluated by determining the inhibition rate of anthraquinone against α -glucosidase and α -amylase. The hypoglycemic activity *in vivo* was evaluated by measuring the effect of anthraquinone on glucose consumption of IR-HepG2 cells. Results: The optimal conditions were obtained as follows: ethanol concentration, 45%; solid-to-solvent ratio, 1:41 (g/mL); temperature, 65 °C;

收稿日期: 2021-08-09

基金项目: 财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系资助 (CARS-21); 广东省自然科学基金面上项目 (2020A151501268); 广东省重点领域研发计划项目 (2020B020226008)。

作者简介: 彭东 (1995-), 男, 博士研究生, 研究方向: 功能性食品研究, E-mail: darrendong@163.com。

* 通信作者: 杜冰 (1973-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 新资源食品与天然功能性原料研究与评价, E-mail: dubing@scau.edu.cn。

and time, 1.60 h. Under these conditions, the extraction ratio of anthraquinone was 90.37%. In the antioxidant assay *in vitro*, anthraquinone exhibited good scavenging ability against DPPH free radicals, hydroxyl free radicals, and superoxide anions. In the antioxidant assay *in vivo*, anthraquinone significantly prolonged the life span ($P < 0.05$), and enhanced the motility of *Caenorhabditis elegans* ($P < 0.05$). The IC_{50} values of anthraquinone on α -amylase and α -glucosidase were 0.588 and 0.575 mg/mL, respectively. Glucose consumption of IR-HepG2 cells in the anthraquinone group (1.2 mg/mL) was increased by 47.42% compared with the model group. Conclusion: The anthraquinone from fermented *Morinda officinalis* exhibited good antioxidant and hypoglycemic activities, facilitating the development of natural therapeutic agents for diabetes treatment.

Key words: *Morinda officinalis*; anthraquinone; extraction; anti-oxidation; hypoglycemic activity; fermentation

糖尿病是世界性三大疾病之一,全球糖尿病患者 90% 以上属于 II 型糖尿病^[1]。在 II 型糖尿病早期,胰岛素抵抗细胞从血液中摄取葡萄糖的能力下降,导致人体血糖水平升高^[2]。 α -葡萄糖苷酶将食物中的碳水化合物水解成葡萄糖,通过酶抑制剂减缓葡萄糖生成来降低餐后血糖水平被认为是治疗 II 型糖尿病的有效手段。当前的 α -葡萄糖苷酶抑制剂容易导致胃肠道功能紊乱、食欲减退等副作用,故天然的 α -葡萄糖苷酶抑制剂开发已经成为国内外科研人员的研究热点^[3-4]。

II 型糖尿病是由于胰岛素分泌缺陷和胰岛素抵抗引起的代谢性疾病。II 型糖尿病的发生与氧化应激具有密切关联,当过多的自由基在体内积累时会引发氧化应激反应,对胰岛 β 细胞造成氧化损伤和胰岛素抵抗^[5]。抗氧化剂能淬灭糖尿病患者体内的自由基,改善氧化应激,进而治疗 II 型糖尿病。因此,具有抗氧化能力的活性物质是治疗 II 型糖尿病的潜力资源。

巴戟天(*Morinda officinalis* How.)是茜草科巴戟属双子叶植物巴戟天的干燥根,具有抗氧化^[6]、降血糖^[7]、抗炎^[8]、抗癌^[9]和治疗阳痿遗精^[10]等多种功效,在我国可用于保健食品中。研究表明巴戟天中主要的活性物质有蒽醌类、糖类、环烯醚萜类、生物碱类、黄酮类、氨基酸类、挥发性成分和微量元素^[11-12]。巴戟天的炮制方式主要有盐制、煮制、蒸制、酒制、甘草水制和发酵法等^[13]。发酵法较其他方法具有多种优势,如微生物在发酵过程中代谢生成的酶类会溶解植物细胞壁,有助于物质的释放,进而提高活性物质的得率^[13]。DU-106 是本课题组从传统发酵奶酪中筛选出的一株益生菌,经鉴定为蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)^[14]。课题组前期使用 DU-106 发酵巴戟天,发现提取出的蒽醌含量要显著高于未发酵的巴戟天^[13]。目前对发酵法炮制巴戟天的研究较少,对发酵巴戟天蒽醌的提取、抗氧化及降血糖功效的研究更鲜有报道。本试验利用响应面法优化发酵巴戟天蒽醌的提取工艺,对其抗氧化和降血糖活性进行初步研究,旨在更加有效的利用巴戟天资源,为开发发酵巴戟天蒽醌作为药物治疗 II 型糖尿病提供一定的数据支持。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

巴戟天(已抽芯) 购买于广东省云浮市郁南县

大方镇巴戟天市场,华南农业大学食品学院杜冰教授鉴定为茜草科植物巴戟天(*Morinda officinalis* How.)的干燥根;产乳酸芽孢杆菌 DU-106(筛选于传统发酵奶酪,并委托广州市微生物所制成 1×10^{12} CFU/g 菌粉)、野生 N2 型秀丽隐杆线虫 由华南农业大学新资源食品与功能性原料评价及研究中心保藏并提供;HepG2 细胞 购买于中国科学院细胞库;1,8-二羟基蒽醌($\geq 99.5\%$) 广州分析测试中心科力技术开发公司;阿卡波糖 齐云生物试剂有限公司; α -葡萄糖苷酶(50 U/mg)、 α -淀粉酶(1000 U/mg)、牛胰岛素、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)、对硝基苯基- α -D-吡喃葡萄糖苷(PNPG) 美国 Sigma 公司;盐酸二甲双胍 贵州天安药业股份有限公司;葡萄糖测定试剂盒 上海荣盛生物药业有限公司;四甲基偶氮唑盐 美国 Amresco 公司;CCK-8 试剂 广州松鼠生物科技有限公司;DMEM 高糖培养基 美国 Gibco 公司。

Varioskan™ LUX 多功能酶标仪、Countess II 细胞计数仪 美国 Thermo Fisher 公司;ScanSpeed 40 真空冷冻干燥机 丹麦 LaboGene 公司;UV759 紫外分光光度计 上海精密科学仪器有限公司;BPNZ-300CD CO₂ 细胞培养箱 上海一恒科学仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 样品制备 取 0.10 g 芽孢杆菌 DU-106 菌粉溶于 50 mL 生理盐水中,在 37 °C、160 r/min 条件下振荡 30 min 得到活化液。巴戟天用 100 °C 清水煮制 20 min 后,取 150 g 置于发酵培养基(含 2% 葡萄糖和 1% NaCl)中,接种 1 mL 芽孢杆菌活化液,于 30 °C 发酵 12 d^[11]。取出巴戟天,于 60 °C 烘干 24 h,粉碎后过 20 目筛,即得发酵巴戟天样品。

1.2.2 发酵巴戟天蒽醌提取 将发酵巴戟天样品加到一定量的乙醇溶液中,在一定温度和时间下进行提取,得到样品提取液。提取液在 4000 r/min 条件下离心 15 min,取上清液在 60 °C 下进行减压浓缩,再将浓缩后的溶液冷冻干燥备用。

1.2.3 单因素实验 以蒽醌提取率为指标,考察不同乙醇体积分数、料液比、提取温度及提取时间对发酵巴戟天蒽醌提取效率的影响。四个单因素设计方案如下:梯度乙醇体积分数为 20%、25%、30%、35%、

40%、45%、50%，料液比为 1:40 (g/mL)，提取温度为 65 ℃，提取时间为 1.5 h；梯度料液比为 1:20、1:25、1:30、1:35、1:40、1:45、1:50 (g/mL)，乙醇体积分数为 45%，提取温度为 65 ℃，提取时间为 1.5 h；梯度提取温度为 50、55、60、65、70 ℃，乙醇体积分数为 45%，料液比为 1:40 (g/mL)，提取时间为 1.5 h；梯度提取时间为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 h，乙醇体积分数为 45%，料液比为 1:40 (g/mL)，提取温度为 65 ℃。

1.2.4 响应面优化试验 在单因素实验基础上进行响应面优化，每个因素设计三个水平，蒽醌提取率为响应值。试验因素和水平见表 1。

表 1 响应面试验因素和水平表
Table 1 Factors and levels of response surface methodology

因素	水平		
	-1	0	1
A 乙醇体积分数(%)	40	45	50
B 料液比(g/mL)	1:35	1:40	1:45
C 提取温度(℃)	60	65	70
D 提取时间(h)	1.0	1.5	2.0

1.2.5 发酵巴戟天蒽醌测定 采用 0.5% 醋酸镁-甲醇法测量蒽醌含量^[13]，标准曲线方程为： $y=1.9508x+0.0011$ ， $R^2=0.999$ ($n=7$)。取 1 g 发酵巴戟天样品，按照单因素实验方法提取蒽醌，根据标准曲线测定蒽醌。蒽醌提取率计算公式如式(1)。

$$\text{蒽醌提取率}(\%) = \frac{M_1}{M_2} \times 100 \quad \text{式(1)}$$

式中： M_1 为提取所得蒽醌质量，mg； M_2 为发酵巴戟天中蒽醌质量，mg。

1.2.6 体外抗氧化活性测定

1.2.6.1 DPPH 自由基清除能力测定 取 2 mL 样品溶液(1~5 mg/mL)于试管中，加入 2 mL DPPH 无水乙醇溶液(0.1 mmol/L)，混匀，在室温下放置反应 30 min 后，517 nm 处测定吸光值^[15]。 V_C 作为阳性对照，计算公式如式(2)。

$$\text{DPPH自由基清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100 \quad \text{式(2)}$$

式中： A_0 为 DPPH+无水乙醇的吸光值； A_1 为样品+DPPH 的吸光值； A_2 为样品+无水乙醇的吸光值。

1.2.6.2 羟自由基清除能力测定 取 2 mL 样品溶液(1~5 mg/mL)于试管中，加入 2 mL FeSO_4 溶液(6 mmol/L)和 2 mL H_2O_2 溶液(6 mmol/L)，混匀，在室温下避光反应 10 min 后，加入 2 mL 水杨酸溶液(6 mmol/L)，510 nm 处测定吸光值^[16]。 V_C 作为阳性对照，计算公式如式(3)。

$$\text{羟自由基清除率}(\%) = \left(1 - \frac{B_1 - B_2}{B_0}\right) \times 100 \quad \text{式(3)}$$

式中： B_0 为 $\text{FeSO}_4+\text{H}_2\text{O}_2$ +水杨酸的吸光值； B_1 为样品+ $\text{FeSO}_4+\text{H}_2\text{O}_2$ +水杨酸的吸光值； B_2 为样品+ $\text{FeSO}_4+\text{H}_2\text{O}_2$ 的吸光值。

1.2.6.3 超氧阴离子清除能力测定 取 4 mL 样品溶液(1~5 mg/mL)于试管中，加入 5 mL 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH8.2)，混匀，在 25 ℃ 水浴 15 min 后，加入 0.15 mL 3 mmol/L 邻苯三酚溶液反应 4 min，320 nm 处测定吸光值^[17]。 V_C 作为阳性对照，计算公式同式(2)。其中， A_0 为 Tris-HCl 缓冲液+邻苯三酚的吸光值； A_1 为样品+Tris-HCl 缓冲液+邻苯三酚的吸光值； A_2 为样品+Tris-HCl 缓冲液的吸光值。

1.2.7 体内抗氧化活性测定

1.2.7.1 线虫同期化 用 M9 缓冲液冲洗含有产卵期线虫的培养基，无菌 EP 管收集洗得的液体，涡旋 30 s，4000 r/min 离心 1 min，弃上清液。每管加入 1 mL 线虫裂解液(ddH₂O、2 mol/L NaOH 溶液和 60% NaClO 溶液按照 1:1:1 的比例混合)，涡旋 1 min 后静置 5 min，4000 r/min 离心 1 min，弃上清液。用 M9 缓冲液重复清洗 2 次，转移到线虫培养基(含 OP50 大肠杆菌)中，20 ℃ 培养 48 h 得到同期化 L4 期线虫。

1.2.7.2 线虫寿命测定 挑选 L4 期线虫进行实验，分为空白组和实验组(蒽醌浓度 1.2、2.4、4.8 mg/mL)，每组设置 3 板，每板 30 条^[18]。20 ℃ 恒温培养，每 2 d 记录线虫的寿命，直至最后一条线虫死亡即实验结束。

1.2.7.3 线虫运动能力测定 线虫培养同线虫寿命培养方法。从空白组和实验组中分别挑选 15 条状态较好、培养时间为 3 d 的线虫转移到新的线虫培养基中，在线虫恢复运动 2 min 后，记录每分钟线虫头部摆动的次数及 20 s 内线虫身体弯曲的总次数。

1.2.8 酶抑制率测定

1.2.8.1 α -葡萄糖苷酶抑制率测定 取 10 μL 样品溶液(0.4、0.8、1.2、1.6、2.0、2.4 mg/mL)于试管中，加入 10 μL α -葡萄糖苷酶溶液(0.2 U/mL)，混匀，置于 37 ℃ 恒温培养箱中反应 15 min 后，加入 20 μL PNPG 溶液，混匀，用塑料膜密封并置于 37 ℃ 恒温培养箱中反应 30 min，最后加入 80 μL 1 mol/L Na_2CO_3 溶液终止反应，405 nm 处测定吸光值^[19]。阿卡波糖为阳性对照，计算公式如式(4)。

$$\text{抑制率}(\%) = \left(1 - \frac{C_1 - C_2}{C_3 - C_4}\right) \times 100 \quad \text{式(4)}$$

式中： C_1 为样品+ α -葡萄糖苷酶+PNPG 的吸光值； C_2 为样品+PNPG 的吸光值； C_3 为 α -葡萄糖苷酶+PNPG 的吸光值； C_4 为 PNPG 的吸光值。

1.2.8.2 α -淀粉酶抑制率测定 取 0.5 mL α -淀粉酶溶液(1 U/mL)于试管中，加入 0.5 mL 样品溶液(0.25、0.5、1、2、4、8 mg/mL)，混匀，置于 37 ℃ 恒温箱中 10 min。加入 0.5 mL 1% 淀粉溶液，混匀，在 37 ℃ 下反应 10 min 后加入 1 mL 3,5-二硝基水

杨酸(DNS),沸水浴中反应 5 min 后立即冰浴,冷却后用去离子水稀释并在 520 nm 处测定吸光值^[4]。阿卡波糖为阳性对照,计算公式同式(4)。其中, C_1 为样品+ α -淀粉酶+1%淀粉的吸光值; C_2 为样品+1%淀粉的吸光值; C_3 为 α -淀粉酶+1%淀粉的吸光值; C_4 为 1% 淀粉的吸光值。

1.2.9 胰岛素抵抗细胞模型的建立 HepG2 细胞用 DMEM 高糖培养基(含 10% 胎牛血清和 1% 双抗)在 37 ℃、5% CO₂ 细胞培养箱中培养,待细胞贴壁生长且细胞覆盖率超过 80% 后,PBS 清洗 3 次后用 0.25% 胰蛋白酶进行消化传代^[20]。取生长状态良好且处于对数生长期的细胞,用含 10 μ g/mL 胰岛素的 DMEM 培养基培养 24 h,建立胰岛素抵抗 HepG2 (IR-HepG2)细胞模型。IR-HepG2 细胞培养使用无血清无酚红 DMEM 专用高糖培养基,待细胞贴壁覆盖率达到 80% 后,测定上清液中葡萄糖浓度。通过比较正常细胞与模型细胞组中葡萄糖消耗量来判断造模是否成功,造模成功后调整 IR-HepG2 细胞密度为 1×10^5 个/mL 用于后续试验。

1.2.10 IR-HepG2 细胞活性测定 取对数期 IR-HepG2 细胞,以每孔 100 μ L 接种至 96 孔细胞培养板中,培养至细胞贴壁覆盖率达到 80% 后,加入 100 μ L 蒽醌溶液(0.5、1、2、4、8 mg/mL),每个浓度设置 6 个复孔,于 37 ℃、5% CO₂ 条件下培养 24 h 后,每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液,在培养箱中孵育 2 h 后在 450 nm 处测定吸光值^[20]。细胞存活率计算公式如式(5)。

$$\text{细胞存活率}(\%) = \frac{D_1 - D_0}{D_2 - D_0} \times 100 \quad \text{式(5)}$$

式中: D_0 为 CCK-8 溶液的吸光值; D_1 为细胞+蒽醌+CCK-8 溶液的吸光值; D_2 为细胞+CCK-8 溶液的吸光值。

1.2.11 IR-HepG2 细胞葡萄糖消耗量测定 分为模型组、正常组、阳性对照组和实验组。取对数期 IR-HepG2 细胞,以每孔 200 μ L 接种至 96 孔细胞培养板中,实验组加入 100 μ L 蒽醌溶液(0.6、1.2 mg/mL),模型组加入 100 μ L DMEM 培养基,阳性对照组加入 100 μ L 二甲双胍溶液使最终浓度为 1 mg/mL。正常组为对数期 HepG2 细胞,其余操作同模型组^[21]。每个浓度设置 6 个复孔,于 37 ℃、5% CO₂ 条件下培养 24 h 后,用葡萄糖试剂盒测定葡萄糖消耗量。

1.3 数据处理

试验至少进行 3 次平行。使用 SPSS 22 进行方差分析,Origin 9.1 进行可视化处理。利用 Duncan 法进行显著性差异分析。

2 结果与分析

2.1 单因素实验分析

乙醇体积分数对蒽醌提取率的影响如图 1a 所示,在乙醇体积分数 20%~50% 范围内,蒽醌提取率曲线呈先上升后下降趋势。这可能是当乙醇体积分

数较大时,溶液极性减弱使得更多的脂溶性、醇溶性杂质被释放出来,与蒽醌组分竞争而降低其纯度^[22]。在乙醇体积分数为 45% 时,蒽醌提取率最高,且与其他水平存在显著性差异($P < 0.05$),故确定最佳乙醇体积分数为 45%。

料液比对蒽醌提取率的影响如图 1b 所示,在料液比 1:20~1:40 (g/mL) 范围内,蒽醌提取率曲线呈上升趋势,这是由于在一定范围内随着料液比的升高

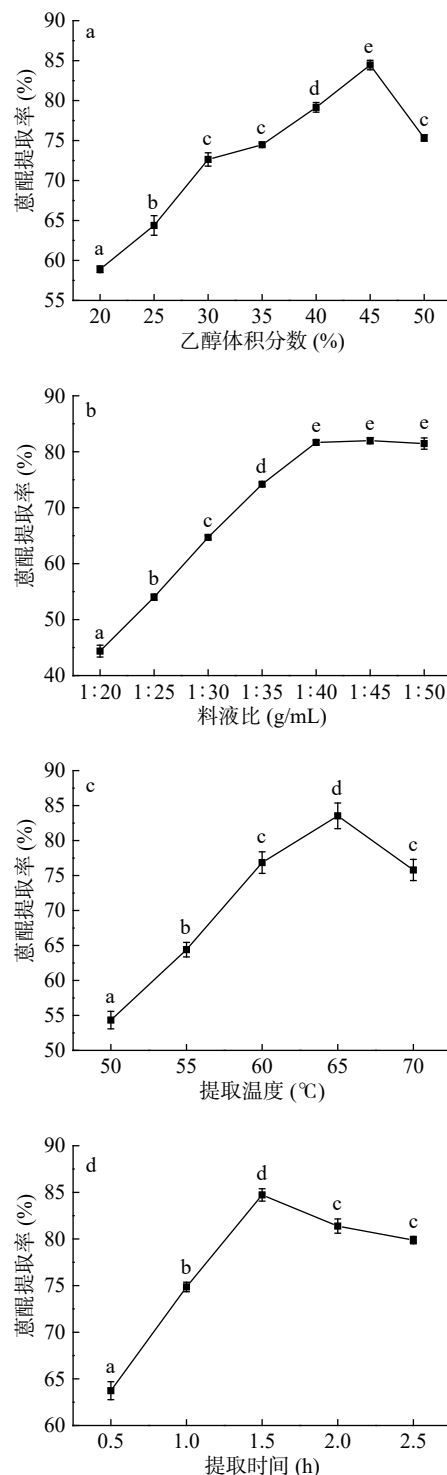


图 1 单因素对蒽醌提取率的影响

Fig.1 The effect of single factor on the extraction ratio of anthraquinone

注:图中不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

会使巴戟天细胞壁内外浓度差增大,从而提高蒺藜提取率^[23]。在料液比 1:40~1:50 (g/mL) 范围内,蒺藜提取率曲线趋于平稳,故确定最佳料液比为 1:40 (g/mL)。

提取温度对蒺藜提取率的影响如图 1c 所示,在温度 50~70 ℃ 范围内,蒺藜提取率曲线呈先上升后下降趋势。随着温度的升高,溶剂渗透能力会得到一定的增强,有利于蒺藜的提取。但温度过高,会导致蒺藜的分子结构被破坏,从而导致提取率降低^[24]。在温度为 65 ℃ 时,蒺藜的提取率最高,且与其他水平差异显著($P<0.05$),故确定最佳提取温度为 65 ℃。

提取时间对蒺藜提取率的影响如图 1d 所示,在提取时间 0.5~2.5 h 范围内,蒺藜提取率曲线呈先上升后下降趋势。这可能是由于长时间的高温提取使蒺藜的结构受到一定的破坏,产生较多的杂质,进而影响蒺藜的提取率^[25]。在提取时间为 1.5 h 时,蒺藜提取率达到最高点,故确定最佳提取时间为 1.5 h。

2.2 响应面回归模型建立

以单因素结果为依据,进行 Box-Behnken 响应面分析试验,试验设计及结果见表 2。利用 Design-Expert 对表 2 中的变量和蒺藜提取率响应值作多元回归拟合,回归方程见公式(6)。

表 2 Box-Behnken 响应面试验设计与结果

Table 2 Design and results of Box-Behnken response surface test

试验号	A 乙醇体积分数	B 料液比	C 提取温度	D 提取时间	Y 蒺藜提取率(%)
1	0	-1	0	-1	60.34
2	1	0	-1	0	70.78
3	-1	0	0	-1	78.35
4	1	1	0	0	75.54
5	0	0	1	-1	70.32
6	0	0	0	0	89.56
7	1	0	0	-1	64.61
8	1	-1	0	0	60.93
9	0	0	-1	-1	74.79
10	0	-1	1	0	60.35
11	0	0	0	0	90.49
12	1	0	0	1	77.67
13	0	-1	0	1	70.21
14	-1	0	1	0	66.71
15	-1	-1	0	0	63.17
16	0	1	0	-1	73.43
17	0	0	0	0	88.49
18	0	1	1	0	75.44
19	-1	1	0	0	71.11
20	0	0	1	1	78.68
21	0	1	0	1	76.91
22	-1	0	-1	0	73.56
23	0	1	-1	0	71.93
24	0	-1	-1	0	70.34
25	0	0	0	0	91.01
26	-1	0	0	1	75.31
27	0	0	0	0	90.37
28	0	0	-1	1	75.37
29	1	0	1	0	70.15

$$Y = 89.98 - 0.71A + 4.92B - 1.26C + 2.69D + 1.67AB + 1.56AC + 4.02AD + 3.37BC - 1.60BD + 1.94CD - 10.09A^2 - 12.36B^2 - 8.77C^2 - 6.58D^2 \quad \text{式(6)}$$

由表 3 可知,回归模型的 R^2_{Adj} 为 0.9522, P 值小于 0.0001 表明模型极显著,失拟项不显著($P>0.05$),说明得到的回归模型与实际结果拟合良好。影响蒺藜提取率的因素排列顺序为:料液比(B)>提取时间(D)>提取温度(C)>乙醇体积分数(A)。

表 3 回归模型方差分析表

Table 3 Analysis of variance table for the regression model

变异来源	平方和	自由度	方差	F值	P值	显著性
模型	2177.97	14	155.57	40.81	<0.0001	***
A-乙醇体积分数	6.06	1	6.06	1.59	0.2279	
B-料液比	290.28	1	290.28	76.15	<0.0001	***
C-提取温度	19.05	1	19.05	5	0.0422	*
D-提取时间	86.99	1	86.99	22.82	0.0003	***
AB	11.12	1	11.12	2.92	0.1097	
AC	9.67	1	9.67	2.54	0.1335	
AD	64.80	1	64.8	17	0.0010	**
BC	45.56	1	45.56	11.95	0.0038	**
BD	10.21	1	10.21	2.68	0.1240	
CD	15.13	1	15.13	3.97	0.0662	
A ²	660.26	1	660.26	173.2	<0.0001	***
B ²	991.39	1	991.39	260.06	<0.0001	***
C ²	499.22	1	499.22	130.95	<0.0001	***
D ²	280.55	1	280.55	73.59	<0.0001	***
残差	53.37	14	3.81			
失拟项	49.50	10	4.95	5.12	0.0648	
纯误差	3.87	4	0.9674			
总离差	2231.34	28				

注: *差异显著($P<0.05$); **差异高度显著($P<0.01$); ***差异极显著($P<0.001$)。

2.3 各因素交互效应分析

为了研究各因素对蒺藜提取率的影响,绘制的响应面图见图 2。响应面坡度可以反映两个因素交互作用对响应值的影响程度,坡度越陡则表示影响越大。等高线形状反映两个因素交互作用的显著性,椭圆形表示交互作用显著,圆形则表示交互作用不显著^[26]。图 2c、d 中的曲面较陡峭,对应的等高线形状呈椭圆形,表明乙醇体积分数和提取时间、料液比和提取温度两两因素之间的交互作用对蒺藜提取率的影响较大,这与表 3 中的方差分析数据一致。

2.4 模型验证

回归模型预测蒺藜的最佳提取工艺为乙醇体积分数 45.08%、料液比 1:40.93 (g/mL)、提取温度 64.93 ℃、提取时间 1.59 h,在此工艺条件下蒺藜的提取率为 90.69%。为了便于实际操作,调整为乙醇体积分数 45%、料液比 1:41 (g/mL)、提取温度 65 ℃、提取时间 1.60 h,运用调整后的工艺条件进行实验验证,蒺藜提取率为 90.37%,与预期值契合度较高,表明建立的回归模型可以用来预测发酵巴戟天中蒺藜的提取率。崔瀚元等^[27]利用响应面优化决明子蒺藜的提取工艺,蒺藜提取率为 74.51%。这表明本实验

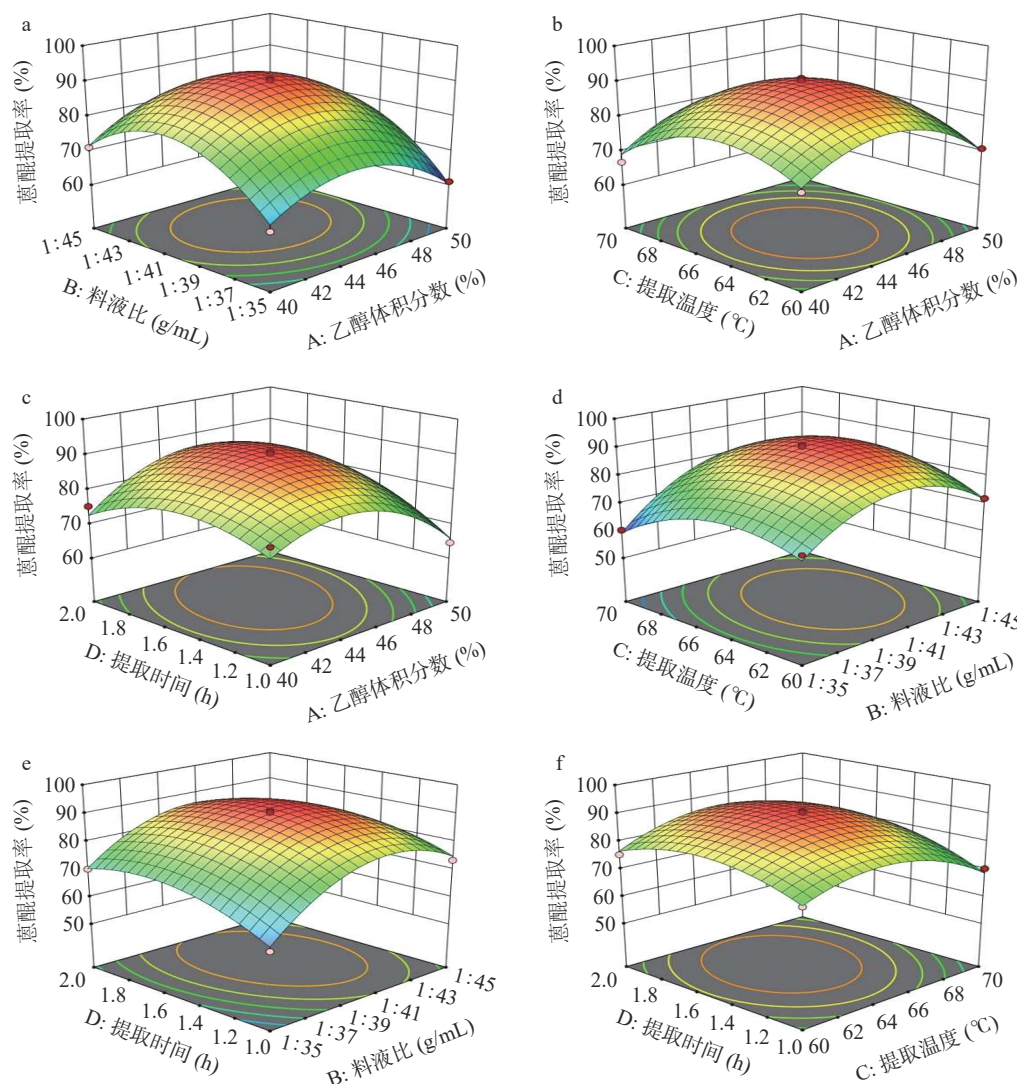


图 2 各因素交互作用对蒽醌提取率影响的响应面和等高线图

Fig.2 Response surface and contour lines plots of effects of interaction between each factors on the extraction ratio of anthraquinone

中的提取工艺可以用来提取发酵巴戟天蒽醌,且提取出的蒽醌提取率较高。

2.5 蒽醌体外抗氧化活性

植物药中蒽醌多以羟基蒽醌存在,往往具有抗氧化活性^[28]。如 PONGNARAVANE 等^[29]从海巴戟(*Morinda citrifolia*)中提取蒽醌,发现其具有较好的 DPPH 自由基清除能力。图 3 中,发酵巴戟天蒽醌对 DPPH 自由基、OH 自由基和超氧阴离子表现出一定的清除能力,且清除效果随着浓度的增加而增强,当发酵巴戟天蒽醌浓度为 5 mg/mL 时对 DPPH 自由基、OH 自由基和超氧阴离子的清除率分别为 74.18%、85.48% 和 90.24%。虽然比相同浓度的 V_C 对三种自由基的清除率要弱,但后续可通过提升纯度或与其他抗氧化成分互配来进一步增强其抗氧化能力。

2.6 蒽醌体内抗氧化活性

秀丽隐杆线虫具有生命周期短、繁殖能力强、易于计数等优点,是研究抗氧化活性的理想模式生物^[30]。线虫的氧化系统失衡会导致其衰老和运动能

力下降,因此可通过线虫的寿命和运动能力来评价其抗氧化能力。由表 4 可知,在蒽醌浓度 1.2、2.4 和 4.8 mg/mL 组中线虫的平均寿命分别为 12.43、13.67 和 15.25 d,较空白组线虫寿命分别延长 7.71%($P<0.05$)、18.46%($P<0.01$)和 32.15%($P<0.001$),且线虫的最长寿命也从空白组的 19.67 d 分别延长至 21.45($P<0.05$)、23.05($P<0.01$)和 26.76($P<0.001$) d,表明蒽醌能显著延长线虫的平均寿命和最长寿命。头部摆动频率和身体弯曲频率可用来评估线虫的运动能力。在图 4b 中,较空白组,蒽醌浓度 1.2、2.4

表 4 蒽醌对线虫寿命的影响

Table 4 Effects of anthraquinone on the life span of *C. elegans*

蒽醌浓度(mg/mL)	平均寿命(d)	最长寿命(d)	平均寿命延长率(%)
0(空白组)	11.54±0.34	19.67±0.50	
1.2	12.43±0.26*	21.45±0.26 [#]	7.71
2.4	13.67±0.55**	23.05±0.68 ^{##}	18.46
4.8	15.25±0.31***	26.76±0.63 ^{###}	32.15

注:与空白组线虫平均寿命相比,*表示差异显著($P<0.05$),**表示差异高度显著($P<0.01$),***表示差异极显著($P<0.001$);与空白组线虫最长寿命相比,[#]表示差异显著($P<0.05$),^{##}表示差异高度显著($P<0.01$),^{###}表示差异极显著($P<0.001$)。

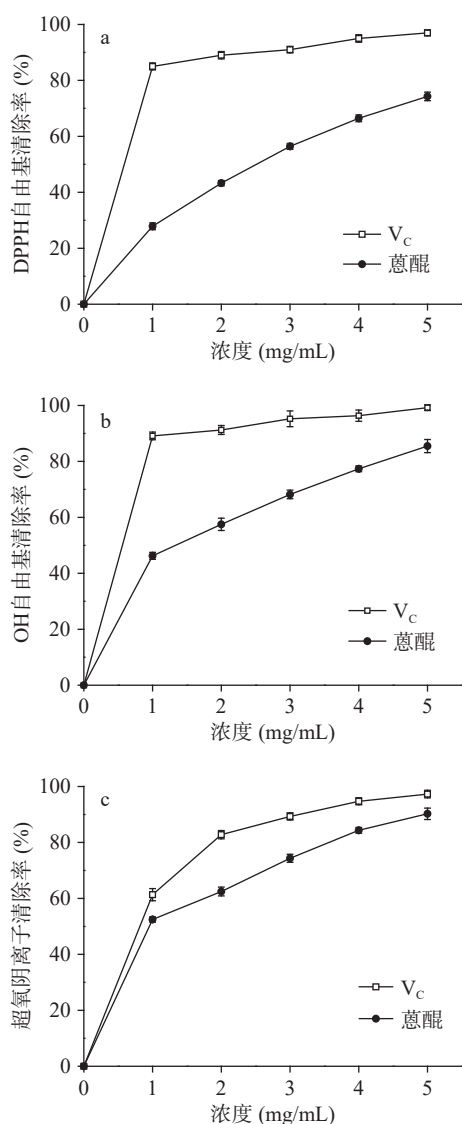


图3 蒽醌体外抗氧化能力

Fig.3 Antioxidant ability of anthraquinone *in vitro*

和 4.8 mg/mL 组中线虫每分钟头部摆动频率分别提高了 4、9 ($P<0.05$) 和 18 ($P<0.01$) 次; 在图 4c 中, 蒽醌浓度 1.2、2.4 和 4.8 mg/mL 组中线虫每 20 秒身体弯曲频率较空白组分别提高了 2、7 ($P<0.05$) 和 13 ($P<0.01$) 次。结果表明蒽醌能显著增强线虫的运动能力, 且呈剂量依赖关系。LUO 等^[31]证明具有抗氧化能力的橄榄叶提取物能显著延长线虫的寿命。这与本实验的研究结果一致, 发酵巴戟天蒽醌能显著延长线虫的寿命和增强线虫的运动能力, 推测是提升了线虫的抗氧化应激能力。

2.7 蒽醌对酶的抑制作用

在人体中, α -淀粉酶将碳水化合物水解成寡糖, 寡糖在 α -葡萄糖苷酶的作用下进一步水解成葡萄糖。抑制 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的活性, 能减缓葡萄糖生成, 从而降低人体血糖水平^[32]。如图 5a 所示, 蒽醌和阿卡波糖对 α -葡萄糖苷酶的抑制率曲线变化趋势相似, 在 0~2 mg/mL 范围呈快速上升的趋势, 随后逐渐趋于平稳。在浓度为 2.4 mg/mL 时, 蒽醌对 α -葡萄糖苷酶的抑制率为 86.04%, 高于阿卡波

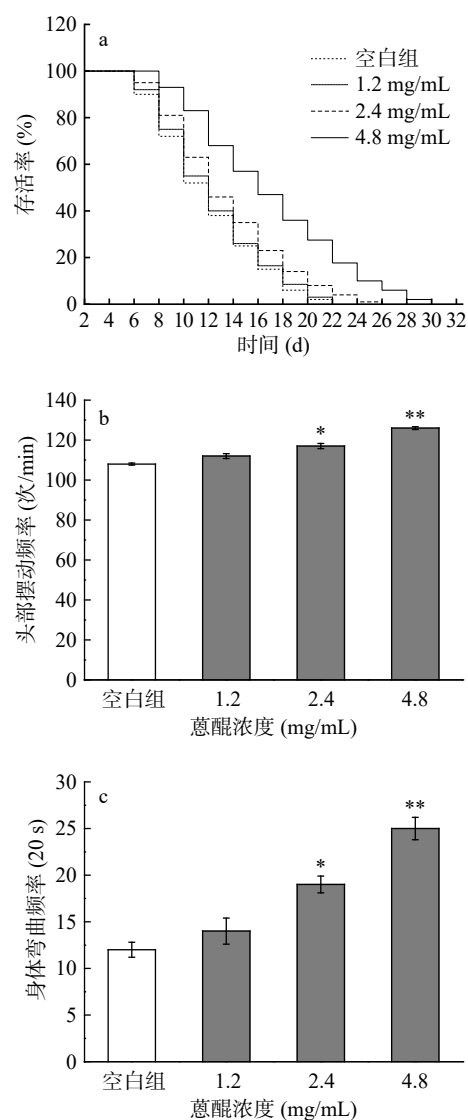


图4 蒽醌体内抗氧化能力

Fig.4 Antioxidant ability of anthraquinone *in vivo*

注: 与空白组相比, *表示差异显著 ($P<0.05$), **表示差异极显著 ($P<0.01$)。

糖 (68.39%)。蒽醌对 α -葡萄糖苷酶的 IC_{50} 值为 0.575 mg/mL, 明显低于阿卡波糖 IC_{50} 值 (1.05 mg/mL), 表明蒽醌具有较强的 α -葡萄糖苷酶抑制活性。曾铁鑫等^[33]发现巴戟天氯仿萃取相对 α -葡萄糖苷酶的抑制率要强于阿卡波糖, 但并未对其活性成分进行解析, 结合本试验的结果推测蒽醌是提取物中发挥 α -葡萄糖苷酶抑制活性的重要成分。在图 5b 中, 在蒽醌浓度较低时 (0~1 mg/mL), 蒽醌对 α -淀粉酶的抑制率低于阿卡波糖, 但随着浓度升高, 两者抑制率曲线趋近, 在 8 mg/mL 时蒽醌对 α -淀粉酶的抑制率高达 96.17%。蒽醌对 α -淀粉酶的 IC_{50} 值为 0.588 mg/mL, 高于阿卡波糖的 IC_{50} 值 (0.441 mg/mL)。蒽醌表现出较强的 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶抑制活性, 作用机制可能是其与酶分子活性部位结合并改变酶分子构象, 进而抑制酶的活性^[34]。

2.8 蒽醌对 IR-HepG2 细胞的影响

HepG2 细胞是一种人源肝癌细胞, 具有与肝细

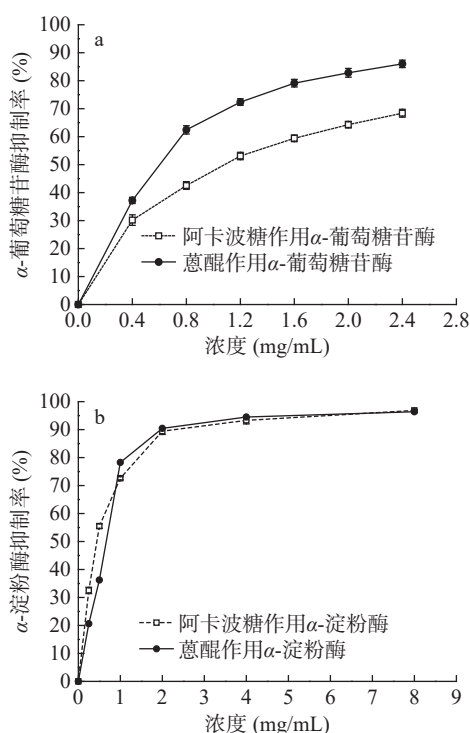


图 5 蒽醌对酶的抑制作用

Fig.5 The inhibitory effect of anthraquinone on enzymes

胞高度相似的形态与功能,是研究药物降糖活性的重要细胞模型^[35]。如图 6a 所示,蒽醌浓度在 0.5~8 mg/mL 范围内,随着浓度的增大,IR-HepG2 细胞存活率会出现轻微的下降,但无显著性差异($P>0.05$),均能达到 94% 以上,表明在此浓度范围内蒽

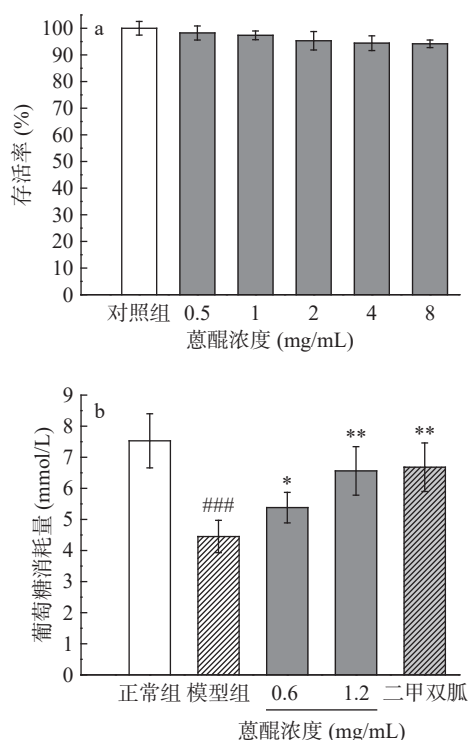


图 6 蒽醌对 IR-HepG2 细胞活性的影响

Fig.6 The effect of anthraquinone on IR-HepG2 cell activity
注:与正常组相比,###表示差异极显著($P<0.001$);与模型组相比,*表示差异显著($P<0.05$),**表示差异高度显著($P<0.01$),***表示差异极显著($P<0.001$)。

醌对 IR-HepG2 细胞没有明显的毒性,可以在此范围内进行后续试验。图 6b 中,与正常组相比,模型组消耗的葡萄糖较正常组显著降低 40.90%($P<0.001$),表明 IR-HepG2 细胞模型构建成功。基于发酵巴戟天蒽醌对 α -葡萄糖苷酶、 α -淀粉酶的 IC_{50} 值,以及便于配置浓度,选择蒽醌的 IC_{50} (0.6 mg/mL)、 $2 \times IC_{50}$ (1.2 mg/mL)值进一步研究对 IR-HepG2 细胞的影响。与模型组相比,蒽醌浓度 0.6、1.2 mg/mL 组葡萄糖消耗量分别提高了 20.90%($P<0.05$)、47.42%($P<0.01$),表明蒽醌能够促进 IR-HepG2 细胞对葡萄糖的消耗,且在浓度 1.2 mg/mL 时降糖效果最明显。IR-HepG2 细胞在 1.2 mg/mL 蒽醌组中的葡萄糖消耗量(6.56 mmol/L)与二甲双胍组(6.68 mmol/L)相当,表明蒽醌具有较强的降血糖活性。这与 GAO 等^[36]的研究结果一致,其发现 4,5-二羟基蒽醌-2-羧酸能显著降低高血糖老鼠血浆中葡萄糖水平。GLUT4 是一种重要的葡萄糖转运蛋白,发酵巴戟天蒽醌可能是提高了 IR-HepG2 细胞 GLUT4 mRNA 的表达量,从而消耗更多的葡萄糖^[37]。

3 结论

发酵巴戟天蒽醌的最佳提取工艺条件为:乙醇体积分数 45%、料液比 1:41 (g/mL)、提取温度 65 $^{\circ}\text{C}$ 、提取时间 1.60 h,该条件下蒽醌提取率为 90.37%。对发酵巴戟天蒽醌的抗氧化活性研究发现:在体外,发酵巴戟天蒽醌浓度为 5 mg/mL 时对 DPPH 自由基、OH 自由基和超氧阴离子的清除率分别为 74.18%、85.48% 和 90.24%;在体内,发酵巴戟天蒽醌浓度为 4.8 mg/mL 时能显著延长线虫的寿命和显著增强线虫的运动能力。对发酵巴戟天的降血糖活性进行研究发现:在体外,发酵巴戟天蒽醌对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶的 IC_{50} 值分别为 0.575 和 0.588 mg/mL,对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用明显优于阿卡波糖;在体内,发酵巴戟天蒽醌浓度为 1.2 mg/mL 时对 IR-HepG2 细胞无毒性作用,经此浓度的蒽醌干预后,IR-HepG2 细胞的葡萄糖消耗量为 6.56 mmol/L,与降血压药物二甲双胍作用效果相当。

综上所述,发酵巴戟天蒽醌在体内、外均表现出一定的抗氧化活性,能有效抑制 α -淀粉酶、 α -葡萄糖苷酶活性,且能改善 IR-HepG2 细胞胰岛素抵抗,提高对葡萄糖消耗量,表明发酵巴戟天蒽醌具有天然抗氧化剂和降血糖药物的开发潜力。本试验的体内降血糖模型为 IR-HepG2 细胞,有待于构建高血糖小鼠模型进行更深一步的研究。

参考文献

- [1] LIAO Z Z, ZHANG J Y, LIU B, et al. Polysaccharide from okra(*Abelmoschus esculentus*(L.) Moench) improves antioxidant capacity via PI3K/AKT pathways and Nrf2 translocation in a type 2 diabetes model[J]. *Molecules*, 2019, 24(10): 1906.
- [2] ORME C M, BOGAN J S. Sorting out diabetes[J]. *Science*, 2009, 324(5931): 1155-1156.

- [3] POTIPIRANUN T, ADISAKWATTANA S, WORAWALAI W, et al. Identification of pinocembrin as an anti-glycation agent and -glucosidase inhibitor from fingerroot(*Boesenbergia rotunda*): The tentative structure-activity relationship towards MG-trapping activity[J]. *Molecules*, 2018, 23(12): 3365.
- [4] 杨小倩, 孙佳明, 吴楠, 等. 玉蜀黍不同部位提取物对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶抑制作用[J]. *食品工业科技*, 2021, 42(1): 15–21, 27. [YANG X Q, SUN J M, WU N, et al. Inhibitory effects of extracts from different parts of maize on α -glucosidase and α -amylase[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2021, 42(1): 15–21, 27.]
- [5] CHAI W F, TANG K S. Protective potential of cerium oxide nanoparticles in diabetes mellitus[J]. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 2021, 66: 126742.
- [6] WU Z Q, CHEN D L, LIN F H, et al. Effect of bajijiasu isolated from *Morinda officinalis* F. C. how on sexual function in male mice and its antioxidant protection of human sperm[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2015, 164: 283–292.
- [7] ZHANG J H, XIN H L, XU Y M, et al. *Morinda officinalis* How. – A comprehensive review of traditional uses, phytochemistry and pharmacology[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2018, 213: 230–255.
- [8] LUO H, WANG Y, QIN Q Y, et al. Anti-inflammatory naphthoates and anthraquinones from the roots of *Morinda officinalis*[J]. *Bioorganic Chemistry*, 2021, 110: 104800.
- [9] WANG J H, XU S Q, MEI Y, et al. A high-quality genome assembly of *Morinda officinalis*, a famous native southern herb in the Lingnan region of southern China[J]. *Horticulture Research*, 2021, 8(1): 135–135.
- [10] SONG B, WANG F J, WANG W. Effect of aqueous extract from *Morinda officinalis* F. C. How on microwave-induced hypothalamic-pituitary-testis axis impairment in male sprague-dawley rats[J]. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2015, 2015: 360730.
- [11] ZHANG S N, YI W N, WANG Z H, et al. Ultrahigh pressure extraction of polysaccharide from *Morinda officinalis* and effect on the polysaccharide structure[J]. *Separation Science and Technology*, 2021, 56(10): 1741–1751.
- [12] PHUONG A V T, VO V M, CHAU T V, et al. Iridoids and anthraquinones from the roots of *Morinda officinalis*[J]. *Vietnam Journal of Chemistry*, 2021, 59(1): 27–31.
- [13] 谭丽容, 代文豪, 罗志锋, 等. 不同菌种发酵对巴戟天活性成分含量的影响[J]. *中国酿造*, 2018, 37(12): 121–125. [TAN L R, DAI W H, LUO Z F, et al. Effect of fermentation with different strains on active components content in *Morinda officinalis* How[J]. *China Brewing*, 2018, 37(12): 121–125.]
- [14] LI P, TIAN W N, ZHUO J, et al. Genomic characterization and probiotic potency of *Bacillus* sp. DU-106, a highly effective producer of L-lactic acid isolated from fermented yogurt[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 2216.
- [15] YU G Y, ZHAO J, WEI Y L, et al. Physicochemical properties and antioxidant activity of pumpkin polysaccharide(*Cucurbita moschata* Duchesne ex Poir) modified by subcritical water[J]. *Foods*, 2021, 10(1): 197.
- [16] SMIRNOFF N, CUMBES Q J. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes[J]. *Pergamon*, 1989, 28(4): 1057–1060.
- [17] TANG Q L, HUANG G L. Preparation and antioxidant activities of cuaurbit polysaccharide[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 117: 362–365.
- [18] WANG C Y, SAAR V, LEUNG K L, et al. Human amyloid β peptide and tau co-expression impairs behavior and causes specific gene expression changes in *Caenorhabditis elegans*[J]. *Neurobiology of Disease*, 2018, 109: 88–101.
- [19] AMIRI B, HOSSEINI N S, TAKTAZ F, et al. Inhibitory effects of selected antibiotics on the activities of α -amylase and α -glucosidase: *In-vitro*, *in-vivo* and theoretical studies[J]. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2019, 138: 105040.
- [20] DONATO M T, TOLOSA L, GÓMEZ-LECHÓN M J. Culture and functional characterization of human hepatoma HepG2 cells[J]. *Methods in molecular biology*, 2015, 1250: 77–93.
- [21] LI Y M, SUN M Z, LIU Y P, et al. Gymnemic acid alleviates type 2 diabetes mellitus and suppresses endoplasmic reticulum stress *in vivo* and *in vitro*[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(13): 3662–3669.
- [22] 孟煜嘉, 徐逸凡, 王艳妮, 等. 微波及超声法提取苦丁茶中熊果酸的对比研究[J]. *机电信息*, 2017(17): 36–42. [MENG Y J, XU Y F, WANG Y N, et al. Comparison of microwave and ultrasonic extraction of ursolic acid from leaf of Chinese holly[J]. *Mechanical and Electrical Information*, 2017(17): 36–42.]
- [23] 侯敏娜, 侯少平, 刘艳红, 等. 响应面法优化超声辅助提取浙贝母萜醌工艺及其抑菌活性研究[J]. *江西农业学报*, 2020, 32(10): 81–86. [HOU M N, HOU S P, LIU Y H, et al. Optimization of ultrasonic assisted extraction of quinone from *Fritillaria thunbergii* by response surface methodology and its antibacterial activity[J]. *Acta Agriculturae Jiangxi*, 2020, 32(10): 81–86.]
- [24] 高洁, 王勇, 张泉荣, 等. 大黄总萜醌超声辅助提取工艺优化及抑菌活性研究[J]. *化学与生物工程*, 2019, 36(4): 24–27. [GAO J, WANG Y, ZHANG Q R, et al. Optimization in ultrasonic-assisted extraction process of total anthraquinone from *Radix et Rhizoma Rhei* and its antibacterial activity[J]. *Chemistry & Bioengineering*, 2019, 36(4): 24–27.]
- [25] 刘媛洁, 张良, 等. 响应面法优化复合酶辅助超声波提取柚子皮总黄酮工艺[J]. *食品工业科技*, 2019, 40(23): 143–150. [LIU Y J, ZHANG L. Optimization of enzymatic assisted ultrasonic extraction of total flavonoids from grapefruit peel by response surface methodology[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2019, 40(23): 143–150.]
- [26] MEHMET Ü, İŞİL I G, ERSİN Ü, et al. Optimisation of biomass catalytic depolymerisation conditions by using response surface methodology[J]. *Waste Management & Research*, 2020, 38(3): 322–331.
- [27] 崔瀚元, 宋兆伟, 张越, 等. 响应面法优化决明子总萜醌的超声辅助提取工艺研究[J]. *食品研究与开发*, 2019, 40(21): 126–131. [CUI H Y, SONG Z W, ZHANG Y, et al. Optimization of ultrasonic assist extracting anthraquinone from *Semen cassia* by

- response surface method[J]. Food Research and Development, 2019, 40(21): 126–131.]
- [28] LI Y, JIANG J G. Health functions and structure-activity relationships of natural anthraquinones from plants[J]. Food & Function, 2018, 9(12): 6064–6081.
- [29] PONGNARAVANE B, GOTO M, SASAKI M, et al. Extraction of anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia* by pressurized hot water: Antioxidant activity of extracts[J]. *Journal of Supercritical Fluids*, 2006, 37(3): 390–396.
- [30] WATTS J L, RISTOW M. Lipid and carbohydrate metabolism in *Caenorhabditis elegans* [J]. Genetics, 2017, 207(2): 413–446.
- [31] LUO S Y, JIANG X L, JIA L P, et al. *In vivo* and *in vitro* antioxidant activities of methanol extracts from olive leaves on *Caenorhabditis elegans* [J]. *Molecules*, 2019, 24(4): 704.
- [32] WANG B H, CAO J J, ZHANG B, et al. Structural characterization, physicochemical properties and alpha-glucosidase inhibitory activity of polysaccharide from the fruits of wax apple[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2019, 211: 227–236.
- [33] 曾铁鑫, 姚志仁, 李豫, 等. 巴戟天不同极性萃取相的抗氧化及降血糖活性[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(19): 192–196.
- [ZENG T X, YAO Z R, LI Y, et al. Antioxidant and hypoglycemic activities of different parts partitioned from the ethanol extract of *Morinda officinalis* How [J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(19): 192–196.]
- [34] 梁宗瑶, 魏园园, 任维维, 等. 橡子仁萃取物成分分析及对 α -淀粉酶、 α -葡萄糖苷酶的抑制作用 [J]. 食品工业科技, 2021, 42(17): 47–55. [LIANG Z Y, WEI Y Y, REN W W, et al. Composition analysis and inhibitory effect against α -amylase and α -glucosidase of acorn kernel extractions [J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(17): 47–55.]
- [35] LIN C L, HUANG H C, LIN J K. Theaflavins attenuate hepatic lipid accumulation through activating AMPK in human HepG2 cells [J]. *Journal of Lipid Research*, 2007, 48(11): 2334–2343.
- [36] GAO Q, QIN W S, JIA Z H, et al. Rhein improves renal lesion and ameliorates dyslipidemia in db/db mice with diabetic nephropathy [J]. *Planta Medica*, 2010, 76(1): 27–33.
- [37] 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.