

鞘氨醇单胞菌胞外多糖对油酸诱导的 IR-HepG2 细胞糖脂代谢紊乱的影响

宋燕¹, 姚凯月^{1,2,3}, 徐京^{1,2}, 赵亚东¹, 水珊珊¹, 王家星², 胡一鸣¹,
孙继鹏^{2*}, 马明珠^{2*}

1 浙江海洋大学 食品与药学学院, 浙江 舟山

2 浙江省海洋开发研究院, 浙江 舟山

3 浙江海洋大学 比萨海洋研究生学院, 浙江 舟山

宋燕, 姚凯月, 徐京, 赵亚东, 水珊珊, 王家星, 胡一鸣, 孙继鹏, 马明珠. 鞘氨醇单胞菌胞外多糖对油酸诱导的 IR-HepG2 细胞糖脂代谢紊乱的影响[J]. 微生物学报, 2025, 65(7): 2948-2964.

SONG Yan, YAO Kaiyue, XU Jing, ZHAO Yadong, SHUI Shanshan, WANG Jiaxing, HU Yiming, SUN Jipeng, MA Mingzhu. Effects of extracellular polysaccharides from *Sphingomonas echinoides* on oleic acid-induced glucose and lipid metabolism disorders in IR-HepG2 cells[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2025, 65(7): 2948-2964.

摘要: 【目的】以鞘氨醇单胞菌(*Sphingomonas echinoides*) 1K04342 为研究对象, 提取、分离纯化其胞外多糖(extracellular polysaccharide, EPS), 并探究纯化后的多糖对油酸(oleic acid, OA)诱导人肝癌细胞(HepG2)糖脂代谢紊乱的改善作用及机制。【方法】选取超声功率、超声时间和培养时间 3 个因素进行响应面试验设计, 确定超声辅助法提取 *S. echinoides* 1K04342 胞外多糖的最佳工艺条件; 对提取后的粗 EPS 进行脱蛋白处理, 随后通过 DEAE-琼脂糖凝胶 FF (DEAE-Sepharose Fast Flow)阴离子柱分离, 研究分离纯化后的 EPS 对 HepG2 细胞增殖活性、葡萄糖消耗率、 α -葡萄糖苷酶和胰脂肪酶抑制率的影响, 筛选出能减轻 OA 诱导胰岛素抵抗-HepG2 (insulin resistance-HepG2, IR-HepG2)细胞糖脂代谢紊乱的最佳活性组分, 并对所得组分进行理化分析和进一步活性分析。【结果】EPS 的最佳提取工艺为: 超声功率 59.39 W; 超声时间 42.08 s, 培养时间 9.24 h, 该条件下 EPS 的理论提取量为 2.13 g/L。根据实际试验条件, 将提取参数调整为超声功率 60 W, 超声时间 42 s, 培养时间 9.2 h, 在此条件下进行试验得到 EPS 的提取量为 2.10 g/L, 与理论提取量(2.13 g/L)差异不显著。经过活性筛选得到降低 IR-HepG2 细胞糖脂代谢紊乱的最佳组分是 EPS-2。同时, 对 EPS-2 进行理化分析, EPS-2 的总糖含量为 74.3%, 单糖组成包括岩藻糖、鼠李糖、阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖和甘露糖。EPS-2 减轻了 OA 诱导的 IR-HepG2 细胞糖脂代谢紊乱。

资助项目: 国家级大学生创新创业训练计划(202410340025); 舟山科技计划(2024C61001)

This work was supported by the National University Student Innovation & Entrepreneurship Development Program (202410340025) and the Zhoushan Science and Technology Program (2024C61001).

*Corresponding authors. E-mail: SUN Jipeng, jipengsun@yeah.net; MA Mingzhu, 18363010902@163.com

Received: 2024-12-15; Accepted: 2025-03-29; Published online: 2025-05-20

EPS-2 能够逆转 OA 对 HepG2 细胞活力所产生的负面作用。EPS-2 可能通过激活 IR-HepG2 中 IRS-1/PI3K/AKT 信号通路, 上调下游 GSK3 β 和 FoxO1 蛋白表达, 下调 PEPCK 和 G6Pase mRNA 和蛋白表达, 进而缓解糖代谢紊乱。EPS-2 可能通过激活 IR-HepG2 中 AMPK/ACC1/SREBP-1C 信号通路降低甘油三酯(triacylglycerol, TG)、总胆固醇(total cholesterol, TC)和低密度脂蛋白(low-density lipoprotein, LDL)水平, 提高高密度脂蛋白(high-density lipoprotein, HDL)水平, 进而缓解 OA 诱导的脂质代谢紊乱。【结论】*S. echinoides* 1K04342 胞外多糖 EPS-2 在 IR-HepG2 细胞中能有效改善糖脂代谢紊乱。

关键词: 鞘氨醇单胞菌; 胞外多糖; 提取; 分离纯化; 糖脂代谢紊乱; HepG2 细胞

Effects of extracellular polysaccharides from *Sphingomonas echinoides* on oleic acid-induced glucose and lipid metabolism disorders in IR-HepG2 cells

SONG Yan¹, YAO Kaiyue^{1,2,3}, XU Jing^{1,2}, ZHAO Yadong¹, SHUI Shanshan¹, WANG Jiaying², HU Yiming¹, SUN Jipeng^{2*}, MA Mingzhu^{2*}

1 Food and Pharmacy College, Zhejiang Ocean University, Zhoushan, Zhejiang, China

2 Zhejiang Marine Development Research Institute, Zhoushan, Zhejiang, China

3 Pisa Marine Graduate School, Zhejiang Ocean University, Zhoushan, Zhejiang, China

Abstract: [Objective] To extract and purify extracellular polysaccharides (EPS) from *Sphingomonas echinoides* 1K04342 and investigate the ameliorating effects and mechanisms of the purified EPS on glucose and lipid metabolism disorders induced by oleic acid (OA) in human hepatoma cells (HepG2). [Methods] A response surface methodology was employed to optimize the ultrasound power, ultrasound time, and incubation time for maximizing the EPS yield of *S. echinoides* 1K04342 from ultrasound-assisted extraction. The crude EPS underwent deproteinization and was further purified through a DEAE-Sepharose Fast Flow anion exchange column. The effects of the purified EPS on the proliferation, glucose uptake, and α -glucosidase inhibition and pancreatic lipase inhibition rates in HepG2 cells were evaluated. The most effective EPS component for mitigating OA-induced glucose and lipid metabolism disorders in IR-HepG2 cells was selected for in-depth physicochemical and bioactivity analyses. [Results] The optimal EPS extraction parameters were as follows: ultrasound power at 59.39 W, extraction for 42.08 s, and incubation for 9.24 h, under which the estimated yield of EPS reached 2.13 g/L. Under the adjusted parameters (60 W, 42 s, and 9.2 h), the EPS yield was 2.10 g/L, which was statistically consistent with the theoretical value (2.13 g/L). The optimal component for ameliorating glucose and lipid metabolism disorders in IR-HepG2 cells was EPS-2, which showed the total sugar content of 74.3%, with a monosaccharide profile comprising fucose, rhamnose, arabinose, galactose, glucose, and mannose. EPS-2 alleviated OA-induced glucose and lipid metabolic disorders in

IR-HepG2 cells. EPS-2 reversed OA-induced decreases in cell viability. EPS-2 may activate the IRS-1/PI3K/AKT pathway, up-regulating the protein levels of GSK3 β and FoxO1 and down-regulating the mRNA and protein levels of PEPCK and G6Pase, thereby mitigating glucose metabolism disorders. EPS-2 may regulate OA-induced lipid metabolism disorders by activating the AMPK/ACC1/SREBP-1C pathway, lowering the triacylglycerol (TG), total cholesterol (TC), and low-density lipoprotein (LDL) levels, and increasing the high-density lipoprotein (HDL) level. **[Conclusion]** EPS-2 derived from *S. echinoides* 1K04342 could effectively ameliorate glucose and lipid metabolism disorders in IR-HepG2 cells.

Keywords: *Sphingomonas echinoides*; extracellular polysaccharide; extraction; separation and purification; glucose and lipid metabolism disorders; HepG2 cells

2 型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)是内分泌系统的常见疾病,其主要特征是胰岛素敏感性下降或胰岛素分泌不足,进而出现高血糖、高血脂等糖脂代谢紊乱症状^[1]。近年来,T2DM 的发病率呈明显上升趋势,在中国其患病人数已超过 1 亿,成为影响公众健康的重大公共卫生问题^[2]。尽管有许多抗糖尿病药物可用于 T2DM 治疗,如二甲双胍、格列本脲和噻唑烷二酮类药物,但这些药物的持续使用会导致细胞毒性和体内毒副作用,如心力衰竭、体重增加和低血糖等^[3]。因此,寻找安全有效的生物活性物质对预防和减缓 T2DM 的发生具有重要意义。T2DM 的非药物干预方法具有安全性高、疗效持久等优势,备受关注。研究表明,天然活性多糖具有降血糖、降血脂的作用。从植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*) RJF4 提取的胞外多糖能抑制 α -葡萄糖苷酶活性,具有潜在的降血糖功能^[4]。Hao 等^[5]研究发现,从瓦宁桑黄(*Sanghuangporus vaninii*)中提取纯化出的多糖有效降低了高脂血症小鼠的血脂水平。Gong 等^[6]研究表明,海参中分离出的中性多糖有一定降血糖活性。Bai 等^[7]对 6 种豆科植物粗多糖的化学组成进行研究,发现多糖结构的不同及分子量大小影响其降血糖活性。鞘氨醇单胞菌在自然界中分布非常广泛,包括一些极端环境,如深海和极地等,其可分泌高分子量的细胞外聚合物,且大部分是水溶性胞外杂多糖^[8]。目前,

关于鞘氨醇单胞菌的研究大多集中在环境保护方面,而关于鞘氨醇单胞菌胞外多糖的研究尚未见报道,有必要进行研究。

糖脂代谢紊乱是 2 型糖尿病的主要特征,以高血糖、高血脂等症状单一或合并出现为主要临床表现特点^[9]。高血糖症是指血液中葡萄糖浓度高于正常范围的一种病理状态^[10]。Sun 等^[11]研究发现,蛹虫草(*Cordyceps militaris*)产生的胞外多糖(extracellular polysaccharide, EPS)-III 可有效抑制 α -葡萄糖苷酶活性,降低链脲佐菌素诱导的糖尿病小鼠血浆葡萄糖浓度,提高糖耐量,修复血糖异常。Ye 等^[12]研究表明,来自浒苔(*Enteromorpha prolifera*)的胞外多糖改善了 T2DM 小鼠的糖耐量,缓解了胰岛素抵抗。Zhao 等^[13]研究发现,鞘氨醇单胞菌(*Sphingomonas* sp.) RW 的胞外多糖具有良好的羟自由基清除能力。Folli 等^[14]报道降低自由基含量会减轻体内氧化应激,从而降低血糖水平。高脂血症指血浆中脂肪或脂质过量,特征是甘油三酯(triacylglycerol, TG)、总胆固醇(total cholesterol, TC)和低密度脂蛋白(low-density lipoprotein, LDL)水平升高以及 HDL 水平降低^[15]。鼠李糖乳酸杆菌(*Lactobacillus rhamnosus*) LGG 来源的胞外多糖已被证明具有减少动物脂肪生成,改善脂代谢的作用^[16]。Huang 等^[17]发现云芝(*Trametes versicolor*)的胞外多糖能降低高脂血症小鼠血清中 TC、TG 和 LDL 水平并升高 HDL 水平。以上研究表明,鞘

氨醇单胞菌胞外多糖可能具有潜在改善糖脂代谢紊乱的作用,有必要进一步研究。

本研究建立了鞘氨醇单胞菌(*Sphingomonas echinoides*) 1K04342 胞外多糖的超声辅助提取工艺并对其进行分离纯化。以 HepG2 细胞为研究对象,构建糖脂代谢紊乱模型,探讨了 *S. echinoides* 1K04342 胞外多糖对糖脂代谢的影响及作用机制。本研究为鞘氨醇单胞菌的开发利用提供了理论依据。

1 材料与方 法

1.1 菌株

菌株为分离自深层海水的 *S. echinoides* 1K04342 (简称 1K04342),购自中国海洋微生物菌种保藏管理中心; HepG2 细胞购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。

1.2 主要试剂和仪器

2216E 培养基,青岛高科技工业园海博生物技术有限公司; DEAE-琼脂糖凝胶 FF,北京索莱宝科技有限公司; CCK-8 试剂盒,武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司; 葡萄糖测试盒、甘油三酯(TG)测定试剂盒、总胆固醇测定试剂盒、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)测定试剂盒和高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)测定试剂盒,南京建成生物工程研究所; 油酸,上海碧云天生物科技股份有限公司; PrimeScript™ RT 试剂盒和 PrimeScript RT 试剂盒, TaKaRa 公司; p-IRS-1 抗体、IRS-1 抗体、p-PI3K 抗体、PI3K 抗体、p-AKT 抗体、AKT 抗体、p-GSK-3 β 抗体、GSK-3 β 抗体、p-FoxO1 抗体、FoxO1 抗体、PEPCK 抗体、G6Pase 抗体、p-AMPK 抗体、AMPK 抗体、p-ACC1 抗体、ACC1 抗体、SREBP-1C 抗体、 β -actin 抗体和 HRP 羊抗兔 IgG 二抗,武汉爱博泰克生物科技股份有限公司; 其他试剂均为国产分析纯。

超声波细胞粉碎机,宁波新芝生物科技股份有限公司; 离心机,长沙湘智离心机仪器有

限公司; 酶标仪,北京伯腾仪器有限公司; 高效液相色谱仪和实时荧光定量 PCR 仪,赛默飞世尔科技公司; 倒置荧光显微镜,奥林巴斯公司; 紫外-可见分光光度计,安捷伦科技有限公司。

1.3 超声辅助提取菌株 1K04342 胞外多糖及工艺优化

1.3.1 菌株培养

将-80 °C 甘油管保藏的菌株 1K04342 接种于 2216E 固体培养基活化 2 次后,接种到 100 mL 2216E 液体培养基中,20 °C、120 r/min 振荡培养 12 h 获得种子发酵液。将种子发酵液按体积分数为 2% 接种到 500 mL 2216E 液体培养基中,20 °C、160 r/min 振荡培养 48 h,得到菌株 1K04342 发酵液。

1.3.2 超声处理

根据 Li 等^[18]的方法对菌株 1K04342 发酵液进行超声处理。将发酵液转移到离心管中,超声探针浸入液面下 1 cm 处进行处理,处理过程中离心管始终处于冰浴。频率(25 kHz)和占空比(1.0 s ON 和 1.0 s OFF)保持不变。超声处理完成后继续培养至 30 h。

1.3.3 胞外多糖提取工艺流程

胞外多糖的提取工艺参照王芸^[19]的方法。菌株 1K04342 发酵液抽滤后 4 °C、5 000 r/min 离心 15 min 得发酵液上清液。上清液 50 °C 旋转蒸发浓缩至原体积 1/5。用 Sevage 试剂与浓缩液 1:4 混合振荡,4 °C、10 000 r/min 离心 20 min 去除沉淀,重复 3 次。将除去变性蛋白的发酵液用无水乙醇沉淀,4 °C 过夜,8 000 r/min 离心 15 min 收集沉淀,沉淀真空冷冻干燥得粗品胞外多糖(EPS)。

1.3.4 胞外多糖总糖含量测定

采用苯酚-硫酸法^[20]测定总糖含量。

1.3.5 响应面设计

根据前期单因素试验筛选出对 EPS 提取量影响较大的 3 个因素为超声功率、超声时间和菌株 1K04342 培养时间。因此,响应面设计采

用 Box-Behnken 中心组合试验设计原理, 对影响 EPS 提取量的以上 3 个因素进行考察。试验因素和水平见表 1。

实验数据拟合为二次多项式模型方程, 如方程式(1)所示。

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^3 \sum_{j=i+1}^3 \beta_{ij} X_i X_j \quad (1)$$

式中: Y 为预测响应值, β_0 、 β_i 、 β_{ii} 、 β_{ij} 分别表示常数、线性、二次式和交互作用的回归系数; X_i 和 X_j 是自变量。

1.4 胞外多糖的分离纯化

胞外多糖采用 DEAE-Sepharose Fast Flow 纯化。在已处理好的 DEAE-Sepharose Fast Flow 离子柱中加入粗多糖溶液(0.5 g/mL), 用蒸馏水和 NaCl 溶液(0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mol/L)洗脱, 采用苯酚-硫酸法检测多糖的含量。收集相同的组分, 后浓缩、透析, 冷冻干燥后得到纯化多糖 EPS-1、EPS-2 和 EPS-3。

1.5 胞外多糖活性组分的筛选

1.5.1 HepG2 细胞培养

采用 10% 的胎牛血清和 DMEM 培养基, 在 37 °C、5% CO₂ 条件下培养。

1.5.2 细胞活力测定

CCK-8 的处理方法参照蓝兆^[21]的方法。

1.5.3 EPS 对 OA 诱导 IR-HepG2 细胞葡萄糖消耗率的影响

参照朱水兰等^[22]方法, 利用 OA 诱导建立胰岛素抵抗-HepG2 (insulin resistance-HepG2, IR-HepG2) 细胞模型。试验分为 Control 组、OA

组(模型组)、Metformin 组(400 μg/mL 二甲双胍处理 IR-HepG2 细胞 24 h, 阳性对照组)以及 EPS、EPS-1、EPS-2 和 EPS-3 组, 其中后 4 组分别用 200 μg/mL EPS、EPS-1、EPS-2 和 EPS-3 处理 IR-HepG2 细胞 24 h。使用葡萄糖测定试剂盒测定培养基中的葡萄糖消耗率。

1.5.4 EPS 对 α-葡萄糖苷酶和胰脂肪酶抑制率的影响

α-葡萄糖苷酶抑制率和胰脂肪酶抑制率的测定分别参照潘章超等^[23]和 Cai 等^[24]的方法。

1.5.5 EPS-2 总糖含量测定

测定方法同 1.3.4 节。

1.5.6 EPS-2 分子量测定

将 EPS-2 溶解于含 NaN₃ 的质量分数为 0.02% 的 0.1 mol/L NaNO₃ 水溶液, 终浓度为 1 mg/mL, 经过 0.45 μm 孔径滤膜过滤后上机检测^[25]。用高效凝胶渗透色谱分析其分子量分布。采用 Ohpak SB-805 HQ 和 Ohpak SB-803 HQ (300 mm×8 mm) 串联。柱温 45 °C, 进样量 100 μL, 流动相 A (0.02% NaN₃, 0.1 mol/L NaNO₃), 流速 0.6 mL/min, 等度洗脱 75 min。标准品为分子量分别为 9 750、13 050、36 800、64 650、135 350、300 600 Da 的右旋糖酐。根据马克·霍温克方程计算各组分分子量^[26]。

1.5.7 EPS-2 单糖组成测定

检测 EPS-2 单糖组成的方法参照 Wang 等^[27]。称取适量 EPS-2, 加入 1 mL 2 mol/L TFA 酸溶液, 121 °C 加热 2 h, 氮气吹干。加入 99.99% 甲醇清洗, 再吹干, 重复清洗 2–3 次。加水溶解后转入色谱瓶待测。采用 DionexTM CarboPacTM PA20 (150 mm×3.0 mm, 10 μm) 液相色谱柱; 进样量为 5 μL。流动相 A (H₂O), 流动相 B (0.1 mol/L NaOH), 流动相 C (0.1 mol/L NaOH, 0.2 mol/L NaAc), 流速 0.5 mL/min; 柱温为 30 °C; 洗脱梯度: 0 min, 95% A、5% B; 26 min, 85% A、5% B、10% C; 42 min, 85% A、5% B、10% C; 42.1 min, 60% A、40% C;

表1 因子和水平表

Table 1 Factor and level table

Level	Ultrasound power X_1 (W)	Ultrasound time X_2 (s)	Incubation time X_3 (h)
-1	30	20	5
0	60	40	10
1	90	60	15

52 min, 60% A、40% B; 52.1 min, 95% A、5% B; 60 min, 95% A、5% B。

1.6 EPS-2 减轻 OA 引起的 IR-HepG2 细胞糖脂代谢紊乱

1.6.1 HepG2 细胞培养、活力测定及 EPS-2 对 OA 诱导 IR-HepG2 细胞葡萄糖消耗率的影响

HepG2 细胞培养及其活力和葡萄糖消耗率的测定方法同 1.5.1–1.5.3 节。

1.6.2 EPS-2 对 OA 诱导的 IR-HepG2 细胞脂质分泌和 TG、TC、LDL、HDL 含量的影响

将 HepG2 细胞经 OA (1 mmol/L) 处理 24 h 后, 用 EPS-2 处理 24 h。利用油红 O 染色法^[28]测定 IR-HepG2 细胞脂质分泌, 根据试剂盒说明书测定 IR-HepG2 细胞 TG、TC、LDL 和 HDL 含量。

1.6.3 逆转录实时定量聚合酶链式反应 (RT-qPCR) 分析

将 HepG2 细胞经 OA (1 mmol/L) 处理 24 h 后, 用 EPS-2 处理 24 h。提取总 RNA 后, 使用 PrimeScript™ RT 试剂盒将 RNA 反转录成 cDNA。以 cDNA 为模板, 在 PCR 仪上进行 PCR 扩增。PCR 反应体系 (20 μ L): 2 $\times$ BeyoFast™ SYBR Green qPCR Mix 10 μ L, 上、下游引物 (3 μ mol/L) 各 1 μ L, DNA 模板 2 μ L, ddH₂O 6 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 20 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s, 40 个循环。结果以 GAPDH 为内参, 以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 表示目的基因 mRNA 的相对表达量。引物序列为 PEPCK-F (5'-CAATG CCGACCTCCCCTGTG-3') 和 PEPCK-R (5'-CTG CTCCCGGTGTGGTGATG-3'), G6Pase-F (5'-TC ATCTTGGTGTCCGTGATCG-3') 和 G6Pase-R (5'-TTTATCAGGGGCACGGAAGTG-3'), GAPDH-R (5'-TGGCATGGTCTGTGGTCATGAGT-3') 和 GAPDH-F (5'-CAACAGCCTCAAGATCATCAGCA-3')。

1.6.4 蛋白免疫印迹分析 (Western blotting)

Western blotting 的方法如 Xu 等^[29]所述。提取总蛋白后, 等量蛋白样品经 SDS-PAGE, 然后转移到 PVDF 膜并在室温下用 5% 脱脂牛奶封闭 2 h。用相应的一抗 (p-IRS-1、IRS-1、p-PI3K、PI3K、p-AKT、AKT、p-GSK-3 β 、GSK-3 β 、p-FoxO1、FoxO1、PEPCK、G6Pase、p-AMPK、AMPK、p-ACC1、ACC1、SREBP-1C、 β -actin) 于 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜后加入二抗孵育 2 h。最后, 使用 ECL 发光剂进行显影, 用化学发光成像系统进行成像, 用 ImageJ 软件对蛋白条带进行定量分析。选择 β -actin 蛋白作为内参蛋白, 目的蛋白信号强度表示为相对 β -actin 的信号强度, 结果表示为处理组相对于对照组相对表达。

1.7 数据分析

本研究均设置 3 组重复试验, 试验结果以平均值 $\pm$ 标准差 (mean $\pm$ SD) 表示。使用 SPSS 23.0 对所有结果进行单因素方差分析 (ANOVA), 检验处理组之间的差异显著性。P<0.05 表示差异具有显著性。

2 结果与分析

2.1 超声辅助提取菌株 1K04342 胞外多糖及工艺优化

2.1.1 响应面优化试验结果及方差分析

根据 Design Expert 13.0 中的 Box-Behnken 试验设计原理, 选取超声功率、超声时间和菌株 1K04342 培养时间 3 个因素设计 17 组试验, 优化 EPS 提取条件, 试验设计和结果见表 2。对实验数据进行方差分析, 结果见表 3。以 EPS 提取量结果 (Y) 作为响应值进行回归分析, 得回归方程为: $Y=2.12-0.033\times A+0.084\times B-0.11\times C+0.009\ 42\times AB-0.11\times AC-0.013\times BC-0.39\times A^2-0.41\times B^2-0.38\times C^2$ 。由回归方程系数可知, 3 个因素对 EPS 提取量 (Y) 的影响大小为: C (培养时间)>B (超声时间)>A (超声功率)。

对回归方程进行方差和显著性分析, 可以

表2 试验设计方案和结果

Table 2 Experimental design program and results

Group	Ultrasound power (W)	Ultrasound time (s)	Incubation time (h)	EPS (g/L)
1	90	40	5	1.617 42
2	30	60	10	1.415 92
3	60	20	5	1.302 32
4	60	60	5	1.494 77
5	60	40	10	2.146 11
6	30	40	5	1.485 46
7	60	20	15	1.241 03
8	90	20	10	1.197 45
9	90	60	10	1.384 37
10	60	40	10	2.173 46
11	60	40	10	2.070 45
12	60	40	10	2.074 44
13	30	40	15	1.360 68
14	60	40	10	2.117 64
15	60	60	15	1.380 14
16	90	40	15	1.062 83
17	30	20	10	1.266 29

检验响应面的拟合程度,对模型以及回归数据的显著性检验结果如表3所示。该方程模型及因素 A^2 、 B^2 、 C^2 的 F 检验结果均达到极显著水平($P<0.000\ 1$), C 的 F 检验结果也达到了较显著水平($P<0.01$), AC 、 B 的 F 检验结果均达到显著水平($P<0.05$)。该模型的决定系数 $R^2=0.982\ 7$, 失拟项 $P=0.069\ 2$ 不显著,表明该方程与实际拟合很好,正确反映了超声功率、超声时间、菌株 1K04342 培养时间和 EPS 提取量之间的关系。

2.1.2 预测结果验证分析

基于上述所建模型,通过软件分析预测超声辅助提取 EPS 的最佳工艺条件为:超声功率 59.39 W,超声时间 42.08 s,培养时间 9.24 h,在此条件下预测 EPS 提取量为 2.13 g/L。考虑实际操作方便,将最佳工艺参数调整为超声功率 60 W,超声时间 42 s,培养时间 9.2 h,进行重复试验以验证模型可靠性,得 EPS 实际提取量为 2.10 g/L,证明了所建模型及所得工艺条件的

可行性,为鞘氨醇单胞菌 EPS 的工业化生产提供一定的依据。

2.2 胞外多糖的分离纯化

将菌株 1K04342 发酵上清液经过醇沉后获得的粗多糖样品脱蛋白后上样到 DEAE-Sepharose Fast Flow 阴离子交换层析柱上,通过梯度洗脱收集多糖。粗多糖 EPS 经阴离子柱分离后得 3 个组分,分别命名为 EPS-1、EPS-2 和 EPS-3。

2.3 胞外多糖活性组分的筛选

2.3.1 EPS 分离组分对 HepG2 细胞增殖活性的影响

进行生物活性评价之前,首先测定了粗多糖和 3 种 EPS 分离组分在 100–300 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内对 HepG2 细胞增殖活性的影响。如图 1 所示,当粗多糖和 3 种 EPS 分离组分处理浓度为 200 $\mu\text{g/mL}$ 时,细胞增殖活性最佳($P<0.05$)。因此,选用 200 $\mu\text{g/mL}$ 为后续各试验浓度。

2.3.2 EPS 分离组分对 OA 诱导 IR-HepG2 细胞葡萄糖消耗率的影响

检测粗多糖和 3 种 EPS (200 $\mu\text{g/mL}$)对 OA 诱导 IR-HepG2 细胞葡萄糖消耗率的影响,以筛选最佳 EPS 组分。如图 2 所示,与对照组相比,OA 处理显著降低了葡萄糖消耗率($P<0.05$)。与 OA 单独处理组相比,Metformin、EPS、EPS-1、EPS-2 和 EPS-3 均能显著逆转 OA 引起的葡萄糖消耗率降低($P<0.05$); EPS-2 处理后的葡萄糖消耗率显著高于 EPS、EPS-1 和 EPS-3 处理组($P<0.05$),但显著低于 Metformin 组($P<0.05$)。

2.3.3 EPS 分离组分对 α -葡萄糖苷酶和胰脂肪酶抑制率的影响

检测 3 种 EPS 分离组分在 0.25–2.0 mg/mL 浓度范围内对 α -葡萄糖苷酶和胰脂肪酶抑制率的影响,以筛选活性多糖。如图 3A 所示, EPS-1、EPS-2 和 EPS-3 浓度在 0.25–1.5 mg/mL 时可剂量依赖性抑制 α -葡萄糖苷酶活力,1.5 mg/mL 之后抑制率变化不大,同浓度下 EPS-2 抑制作用强于 EPS-1 和 EPS-3。如图 3B 所示,0.25–0.5 mg/mL

表3 方差分析结果

Table 3 Analysis of variance (ANOVA) results

Source of variance	Sum of squares	Degree of freedom	Mean square	<i>F</i> value	<i>P</i> value	Significance
Model	2.280	9	2.280	44.09	<0.000 1	***
<i>A</i> -ultrasound power	0.009	1	0.009	1.54	0.255 0	
<i>B</i> -ultrasound time	0.056	1	0.056	9.72	0.016 9	*
<i>C</i> -incubation time	0.091	1	0.091	15.91	0.005 3	**
<i>AB</i>	0.000	1	0.000	0.06	0.810 9	
<i>AC</i>	0.005	1	0.004	8.03	0.025 2	*
<i>BC</i>	0.001	1	0.000	0.12	0.735 4	
<i>A</i> ²	0.630	1	0.630	109.50	<0.000 1	***
<i>B</i> ²	0.720	1	0.720	125.34	<0.000 1	***
<i>C</i> ²	0.510	1	0.510	88.70	<0.000 1	***
Residual	0.040	7	0.005			
Lack of fit	0.032	3	0.011	5.36	0.069 2	Not significant
Pure error	0.008	4	0.002			
Cor Total	2.380	16				
	<i>R</i> ² =0.982 7	<i>R</i> _{adj} ² =0.960 4	CV=4.81%			

*影响显著($P<0.05$); **影响高度显著($P<0.01$); ***影响极显著($P<0.001$)。

* indicates significant effect ($P<0.05$); ** indicates highly significant effect ($P<0.01$); *** indicates extremely significant effect ($P<0.001$).

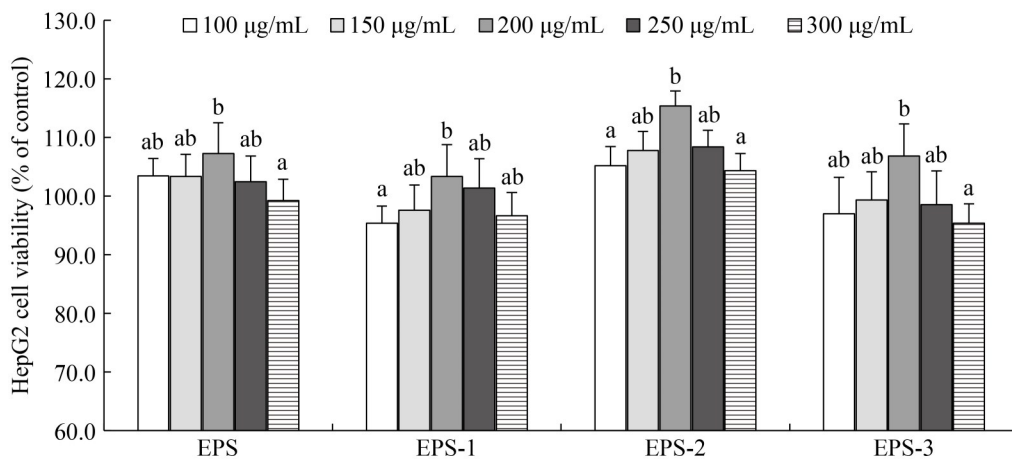


图1 粗多糖和EPS分离组分对HepG2细胞增殖活性的影响。结果表示为平均值±标准差($n=3$)。不同字母表示的数值有显著差异($P<0.05$)。

Figure 1 Effects of crude polysaccharide and EPS isolate fractions on proliferative activity of HepG2 cells. Results are expressed as the mean±SD ($n=3$). Values having different letters are significantly different ($P<0.05$).

浓度范围内除 EPS-1 外其余组别对胰脂肪酶抑制作用提升; 在 0.5–1.5 mg/mL 浓度范围内 EPS 各组分抑制作用渐升; 3 种多糖浓度从 1.5 mg/mL

提至 2.0 mg/mL 时, EPS-1 对胰脂肪酶抑制率基本不变, 其余 2 种组分抑制率下降, 且各浓度的 EPS-2 对胰脂肪酶抑制效果优于其余 2 个组分。

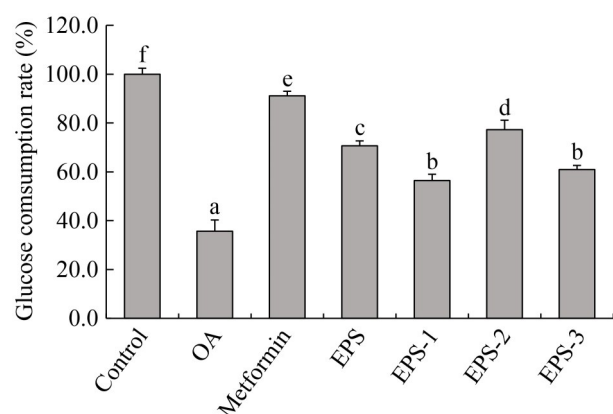


图2 粗多糖和3种EPS组分对OA诱导IR-HepG2细胞葡萄糖消耗的影响。结果表示为平均值±标准差($n=3$)。不同字母表示的数值有显著差异($P<0.05$)。

Figure 2 Effects of crude polysaccharides and three EPS components on glucose consumption of IR-HepG2 cells induced by OA. Results are expressed as the mean±SD ($n=3$). Values having different letters are significantly different ($P<0.05$).

2.3.4 EPS-2 的总糖含量、分子量和单糖组成

经苯酚硫酸法测得 EPS-2 的总糖含量占比高达 74.3%。EPS-2 重均分子质量为 15 684 Da,

由 6 种单糖组成, 包括岩藻糖、鼠李糖、阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖和甘露糖, 物质的量比为: 2:9.35:0.7:14.71:33.57:39.66。葡萄糖和甘露糖是 EPS-2 的主要单糖组分, 分别占总体的 33.57% 和 39.66%。

2.4 EPS-2 减轻 OA 引起的 IR-HepG2 细胞糖脂代谢紊乱

2.4.1 EPS-2 对 HepG2 细胞活力的影响

如图 4 所示, 与对照组相比, 单独 OA 处理显著降低了 HepG2 细胞的活力($P<0.05$); 与单独 OA 处理组相比, OA+EPS-2 组的 HepG2 细胞的活力明显提高($P<0.05$), 说明 EPS-2 有助于逆转 OA 对 HepG2 细胞活力的负面影响。

2.4.2 EPS-2 对 OA 诱导 IR-HepG2 细胞糖代谢紊乱的影响

EPS-2 对 OA 诱导的 IR-HepG2 细胞糖代谢紊乱相关参数的影响如图 5 所示。如图 5A 所示, 与对照组相比, OA 处理显著降低了葡萄糖消耗率($P<0.05$); 与 OA 单独处理组相比, OA+EPS-2 组显著逆转了葡萄糖消耗率的降低($P<0.05$)。

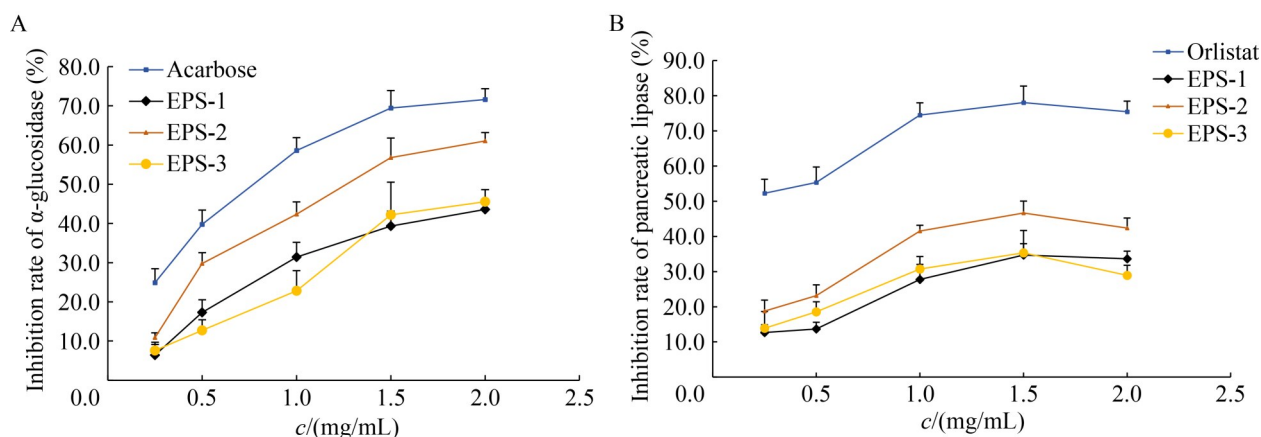


图3 三种EPS分离组分对α-葡萄糖苷酶和胰脂肪酶抑制率的影响。A: 三种EPS分离组分对α-葡萄糖苷酶抑制率的影响; B: 三种EPS分离组分对胰脂肪酶抑制率的影响。结果表示为平均值±标准差($n=3$)。

Figure 3 Effect of three EPS isolation fractions on the inhibition rate of α-glucosidase and pancreatic lipase. A: Effect of three EPS isolation fractions on the inhibition rate of α-glucosidase; B: Effect of three EPS isolation fractions on the inhibition rate of pancreatic lipase. Results are expressed as the mean±SD ($n=3$).

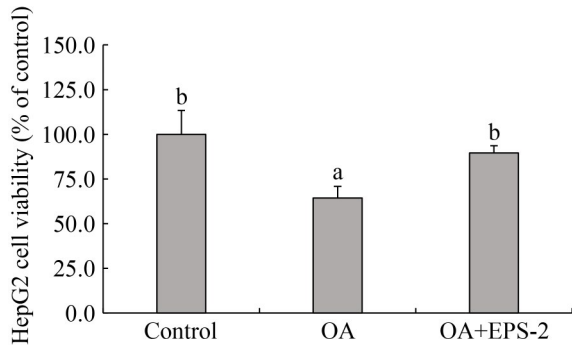


图4 EPS-2对HepG2细胞活力的影响。结果表示为平均值±标准差($n=3$)。不同字母表示的数值有显著差异($P<0.05$)。

Figure 4 Effect of EPS-2 on HepG2 cell viability. Results are expressed as the mean±SD ($n=3$). Values having different letters are significantly different ($P<0.05$).

如图 5B 所示, 与对照组相比, OA 处理 HepG2 细胞后 PEPCK 和 G6Pase mRNA 水平显著提高($P<0.05$); 与 OA 单独处理组相比,

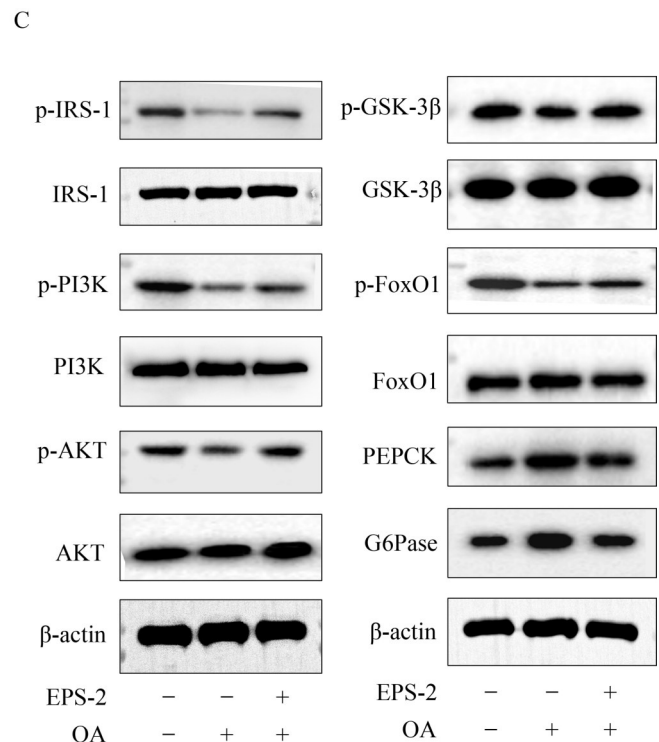
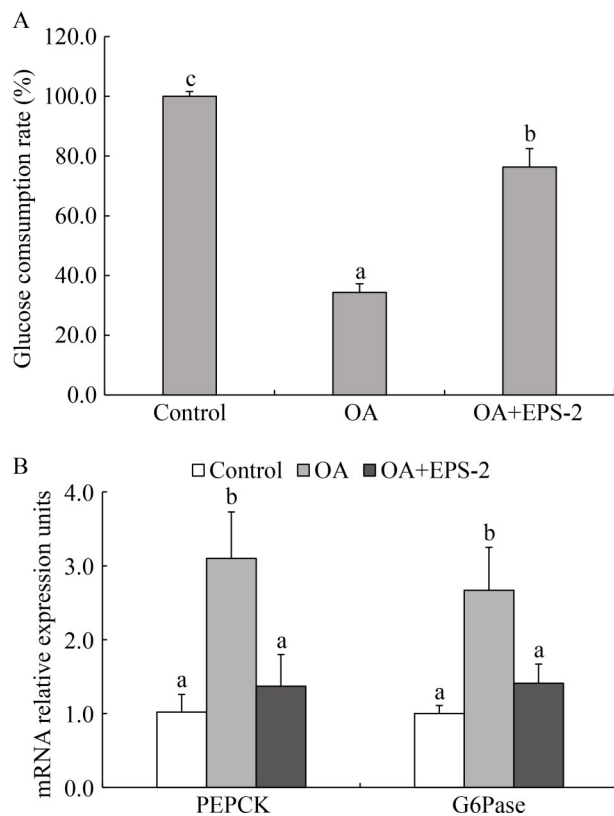
OA+EPS-2 组 HepG2 细胞中 PEPCK 和 G6Pase mRNA 水平显著降低($P<0.05$)。

如图 5C 和 5D 所示, 与对照组相比, OA 处理显著降低 p-IRS-1、p-PI3K、p-AKT、p-GSK-3 β 和 p-FoxO1 蛋白水平, 显著提高 PEPCK 和 G6Pase 蛋白水平($P<0.05$); 与 OA 单独处理组相比, OA+EPS-2 组 p-IRS-1、p-PI3K、p-AKT、p-GSK-3 β 和 p-FoxO1 蛋白水平显著提高, 而 PEPCK 和 G6Pase 蛋白水平显著降低($P<0.05$)。各组间 IRS-1、PI3K、AKT、GSK-3 β 和 FoxO1 蛋白水平差异均无统计学意义($P>0.05$)。

2.4.3 EPS-2 对 OA 诱导 IR-HepG2 细胞脂质代谢紊乱的影响

EPS-2 对 OA 诱导的 IR-HepG2 细胞脂质代谢紊乱相关参数的影响如图 6 所示。如图 6A 所示, 与对照组相比, 单独 OA 处理后 HepG2 细胞脂质分泌增加; 与 OA 单独处理组相比, OA+EPS-2 组中的 HepG2 细胞脂质分泌降低。

如图 6B 所示, 与对照组相比, OA 处理显



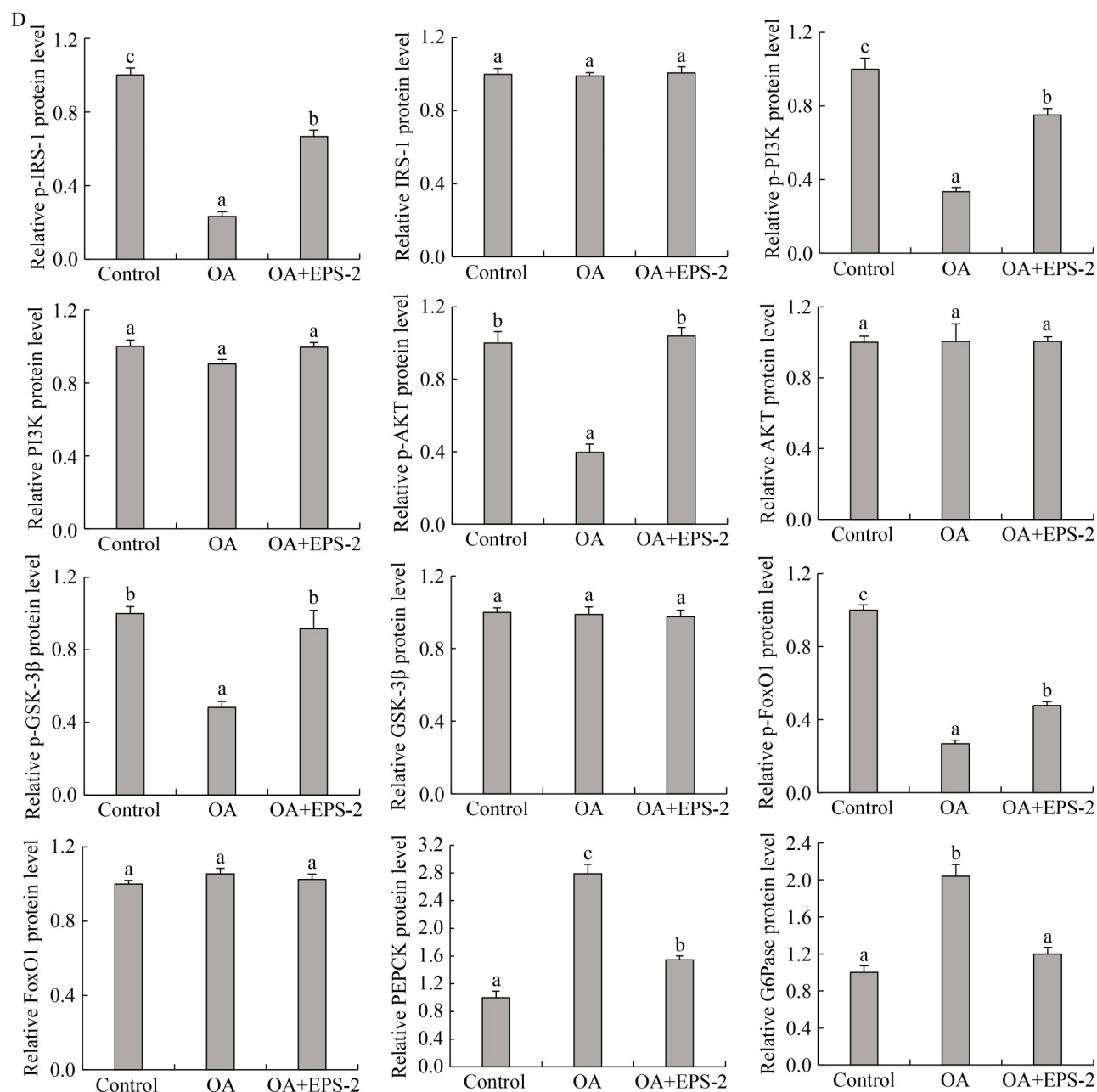


图5 EPS-2对OA诱导的IR-HepG2细胞糖代谢紊乱的影响。A: EPS-2对葡萄糖消耗率的影响; B: EPS-2对PEPCCK、G6Pase mRNA水平的影响; C, D: EPS-2对p-IRS-1、IRS-1、p-PI3K、PI3K、p-AKT、AKT、p-GSK-3 β 、GSK-3 β 、p-FoxO1、FoxO1、PEPCCK、G6Pase的相对蛋白水平的影响。结果表示为平均值 $\pm$ 标准差($n=3$)。不同小写字母表示的数值有显著差异($P<0.05$)。

Figure 5 Effect of EPS-2 on glucose metabolism disorder of IR-HepG2 cells induced by OA. A: Effects of EPS-2 on glucose consumption rate; B: Effects of EPS-2 on PEPCCK and G6Pase mRNA levels; C, D: Effects of EPS-2 on the relative protein levels of p-IRS-1, IRS-1, p-PI3K, PI3K, p-AKT, AKT, p-GSK-3 β , GSK-3 β , p-FoxO1, FoxO1, PEPCCK and G6Pase. Results are expressed as the mean $\pm$ SD ($n=3$). Values having different lowercase letters are significantly different ($P<0.05$).

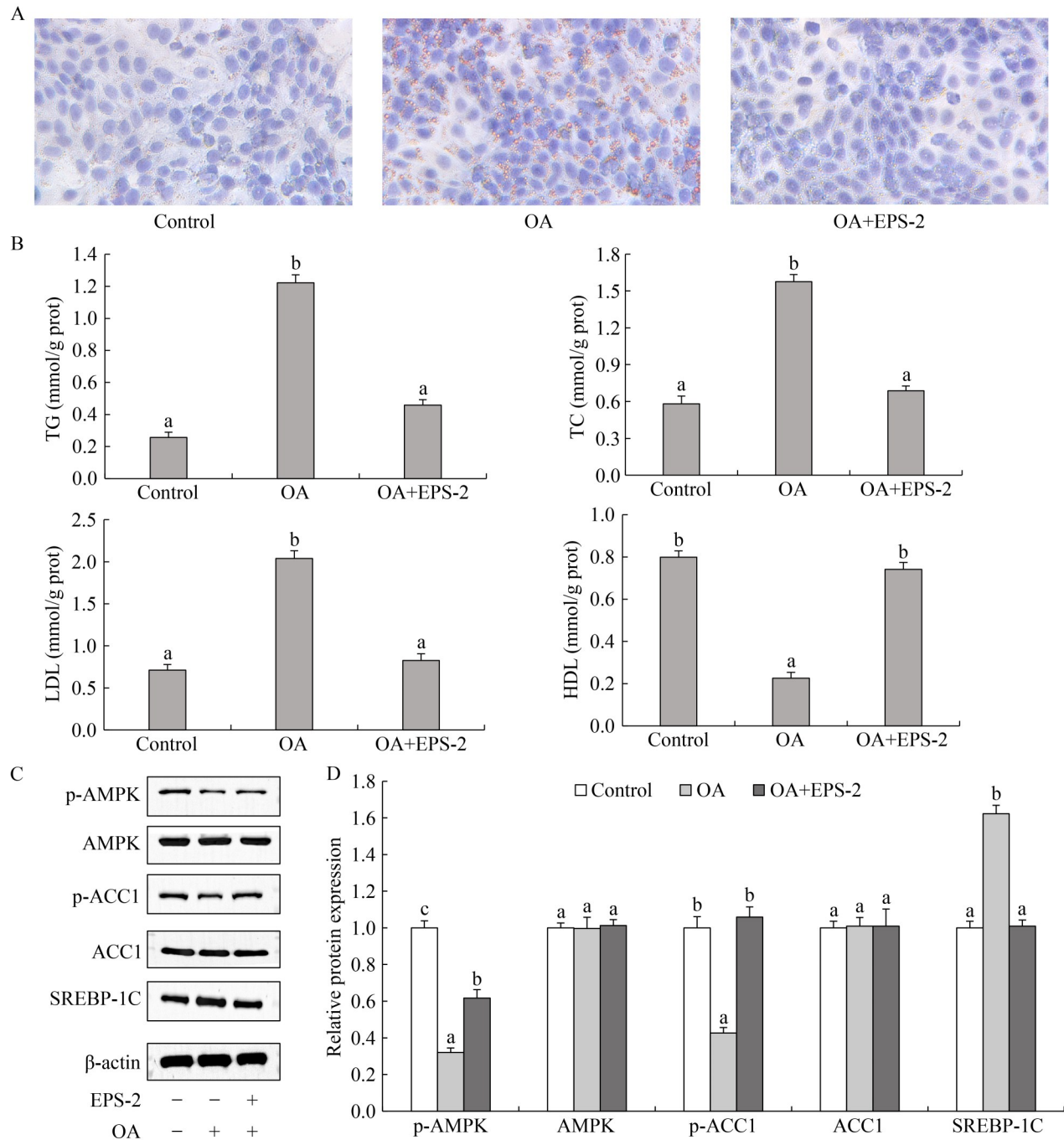


图6 EPS-2对OA诱导的IR-HepG2细胞脂质代谢紊乱的影响。 A: 油红O染色图; B: EPS-2对TG、TC、LDL和HDL含量的影响; C、D: EPS-2对p-AMPK、AMPK、p-ACC1、ACC1和SREBP-1C的相对蛋白水平的影响。结果表示为平均值±标准差($n=3$)。不同小写字母表示的数值有显著差异($P<0.05$)。

Figure 6 Effect of EPS-2 on lipid metabolism of IR-HepG2 cells induced by OA. A: Oil red O staining diagram; B: Effects of EPS-2 on TG, TC, LDL and HDL contents; C, D: The effect of EPS-2 on the relative protein levels of p-AMPK, AMPK, p-ACC1, ACC1, SREBP-1C. Results are expressed as the mean±SD ($n=3$). Values having different lowercase letters are significantly different ($P<0.05$).

著增加 HepG2 细胞中 TG、TC 和 LDL 含量,显著降低了 HDL 含量($P<0.05$);与 OA 单独处理组相比,OA+EPS-2 组 HepG2 细胞中 TG、TC 和 LDL 含量显著减少, HDL 含量显著增加($P<0.05$)。

如图 6C 和 6D 所示,与对照组相比,OA 处理显著降低 p-AMPK 和 p-ACC1 蛋白水平($P<0.05$),显著提高了 SREBP-1C 蛋白水平($P<0.05$);与 OA 单独处理组相比,OA+EPS-2 组的 p-AMPK 和 p-ACC1 蛋白水平显著升高, SREBP-1C 蛋白水平显著降低($P<0.05$)。各组间 AMPK 和 ACC1 蛋白水平均无显著性差异($P>0.05$)。

3 讨论

3.1 响应面优化菌株 1K04342 胞外多糖的提取

超声波辅助法可破坏细菌细胞结构,增加提取率,缩短提取时间,常用于细菌胞外多糖的提取^[30]。响应面分析法是优化提取工艺条件的理想方法,能通过多项拟合以响应面模型方式更直观地观察考察因素与考察指标之间的交互作用关系^[31]。本研究采用超声波辅助法,以超声功率、超声时间和菌株 1K04342 培养时间为考察因素, EPS 提取量为响应值,优化得到 EPS 的最佳提取工艺条件为超声功率 59.39 W,超声时间 42.08 s,培养时间 9.24 h,在此条件下预测得到 EPS 的提取量为 2.13 g/L。根据实际操作调整最佳工艺参数并验证模型的准确度,得出 EPS 的提取量为 2.10 g/L,与预测值基本相符,表明试验结果准确度较高,通过该响应面法优化后的提取方法可行。

3.2 菌株 1K04342 胞外多糖的分离纯化、活性初筛及理化性质分析

多糖因其功能多样性和细胞低毒性等特点,受到越来越多研究者的关注,关于多糖活性和结构的研究也越来越多。研究表明,多糖的生物活性与其结构特征(如分子量、单糖组成等)紧

密相关。本研究初步筛选出菌株 1K04342 EPS 中减轻 OA 诱导 IR-HepG2 细胞糖脂代谢紊乱的最佳活性组分,并对其理化性质进行分析,为后续系统深入地探究多糖生物活性奠定基础。

本研究对该多糖进行分离纯化,并初步筛选活性组分。DEAE-Sepharose Fast Flow 是一种弱阴离子交换柱,随着洗脱液 NaCl 浓度的提高,多糖组分会根据结合能力强弱被分开,洗脱后得到 3 种多糖 EPS-1、EPS-2 和 EPS-3。通过测定 3 个分离组分对 HepG2 细胞活性、葡萄糖消耗率、 α -葡萄糖苷酶和胰脂肪酶抑制率的影响,初步筛选活性最佳的组分。 α -葡萄糖苷酶是一种附着于小肠上皮细胞的酶,可催化葡萄糖从二糖中裂解,抑制该酶活性是降低血清葡萄糖含量,缓解糖代谢紊乱的有效方法^[32]。胰脂肪酶是甘油三酯在胃肠道水解的关键酶,抑制其活性可减少食物中摄入脂肪的水解与吸收,从而减轻脂代谢紊乱,有效改善肥胖、心血管疾病等各类慢性病^[33]。研究表明,3 种多糖组分相比, EPS-2 对 OA 诱导的 IR-HepG2 细胞葡萄糖消耗率的恢复作用优于另 2 个组分,且各个浓度对 α -葡萄糖苷酶和胰脂肪酶的抑制率都优于另 2 个组分,表明 3 种 EPS 组分中 EPS-2 对 IR-HepG2 细胞的降糖降脂效果最佳。多糖的生物活性跟其理化性质和结构特征密切相关。EPS-2 理化分析结果显示, EPS-2 的总糖含量大于 70.0%,重均分子量为 1.5684×10^4 Da,单糖组成包括岩藻糖、鼠李糖、阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖和甘露糖,摩尔比为: 2:9.35:0.7:14.71:33.57:39.66,这与 Wang 等^[34]分离出的 c-EPS 单糖组成类似。

3.3 EPS-2 减轻 OA 引起的 IR-HepG2 细胞糖脂代谢紊乱

糖脂代谢紊乱在糖尿病的发病机制中至关重要^[35]。本研究利用 OA 处理 HepG2 细胞构建糖脂代谢紊乱模型,研究菌株 1K04342 EPS 调节 IR-HepG2 细胞糖脂代谢紊乱的作用及相关机制。

3.3.1 EPS-2 减轻 OA 诱导 IR-HepG2 细胞糖代谢紊乱

糖代谢异常与胰岛素抵抗(IR)密切相关,其特点是胰岛素分泌异常或机体对胰岛素利用率降低,导致机体的糖代谢无法正常进行,从而诱发糖尿病^[36]。IR 的发生主要与胰岛素信号阻断和糖原合成失调有关,导致细胞对葡萄糖消耗减少,糖异生过度增加^[37]。 α -葡萄糖苷酶在糖代谢中直接参与糖原的代谢途径, α -葡萄糖苷酶抑制率越高,葡萄糖消耗率越高^[32]。在本研究中发现,EPS-2 处理提高了葡萄糖消耗率和 α -葡萄糖苷酶抑制率,表明 EPS-2 可以通过提高 α -葡萄糖苷酶抑制率从而增加葡萄糖消耗量。这与 Bajpai 等^[38]的研究结果类似,从清酒乳杆菌(*Lactobacillus sakei*) Probio 65 中分离的 EPS 能通过抑制 α -葡萄糖苷酶活性增加葡萄糖消耗量。在糖异生过程,PEPCK 和 G6Pase 是肝脏调节非糖物质转化为葡萄糖的关键酶,它们表达的提高与增强糖异生密切相关^[39]。本研究发现,EPS-2 处理逆转了 OA 引起的 PEPCK 和 G6Pase 表达(mRNA 和蛋白水平)升高,与 Qi 等^[40]的研究结果类似。胰岛素引起 IR 受体磷酸化,进而活化胰岛素受体底物(insulin receptor substrate, IRS)家族蛋白,然后这些蛋白激活下游蛋白 PI3K 和 Akt^[41],该途径通过激活糖原合酶激酶 3 β (glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β)和叉头盒蛋白 O1 (forkhead box protein O1, FoxO1)之间的复杂相互作用来调节葡萄糖消耗和糖异生^[42]。在肝脏中,可以通过调节 GSK-3 β 蛋白表达来提高 α -葡萄糖苷酶抑制率,从而增加葡萄糖消耗^[43]; FoxO1 可抑制 PEPCK 和 G6Pase 的表达^[44]。本研究发现,EPS-2 逆转了 OA 引起的 p-IRS-1、p-AKT、p-PI3K、p-GSK-3 β 和 p-FoxO1 蛋白表达水平的降低,表明 EPS-2 可能通过激活 IR-HepG2 中 IRS-1/PI3K/AKT 信号通路,上调下游 GSK-3 β 和 FoxO1 蛋白表达,促进葡萄糖消耗、抑制糖原生成,进而减轻 IR-HepG2 细胞的糖代谢紊乱。Qi 等^[40]发现植物乳杆菌

(*Lactiplantibacillus plantarum*) JLAU103 胞外多糖可以通过上调 IRS-1、PI3K 和 Akt 磷酸化水平以及 GSK-3 β 的磷酸化增加葡萄糖消耗率,同时下调 PEPCK 和 G6Pase 的蛋白表达,减少糖异生,减轻小鼠的糖代谢紊乱,从而缓解小鼠的 2 型糖尿病。Alaaeldin 等^[45]发现孟加拉榕树叶中提取的天然活性物质 carpachromene 可能通过激活 IRS-1/PI3K/AKT/GSK-3 β /FoxO1 信号通路改善 IR-HepG2 细胞的胰岛素抵抗。细菌和植物中提取的天然多糖都可能通过激活 IRS-1/PI3K/AKT 信号通路减轻糖代谢紊乱。

3.3.2 EPS-2 减轻 OA 诱导 IR-HepG2 细胞脂质代谢紊乱

脂质代谢紊乱会导致高血脂的发生,从而诱发心血管疾病的风险^[46]。高脂血症的症状包括 TC、TG 和 LDL 水平的升高, HDL 水平的降低^[47]。本研究发现,EPS-2 处理显著逆转了 OA 引起的 TC、TG、LDL 含量上升和 HDL 含量的降低。这与已有的一些研究结果类似。从 *L. rhamnosus* GG 菌株分离得到的胞外多糖改善了高脂饮食喂养小鼠的脂质代谢,包括肝脏和血清中的 TC 和 TG 水平^[48]。Huang 等^[17]发现 *T. versicolor* 的胞外多糖能降低高脂血症小鼠血清中 TC、TG 和 LDL 水平,提高 HDL 水平。

SREBP-1C 的表达受乙酰辅酶 A 羧化酶-1 (acetyl-CoA carboxylase-1, ACC1)脂肪生成基因的表达的调控,在 TG 合成中发挥重要作用, SREBP-1C 是腺苷单磷酸活化蛋白激酶[adenosine 5'-monophosphate (AMP)-activated protein kinase, AMPK]的体内靶点^[49]。有证据表明可以通过 AMPK/ACC1/SREBP-1C 通路来减少肝脏中脂肪的生成,进而缓解脂质代谢紊乱^[50]。本研究发现,EPS-2 处理能显著逆转 OA 引起的 p-AMPK 和 p-ACC1 蛋白水平的降低和 SREBP-1C 蛋白水平的上升。这表明 EPS-2 可能通过激活 IR-HepG2 中 AMPK/ACC1/SREBP-1C 信号通路,降低 TG、TC 和 LDL 水平,提高 HDL 水平,进而减轻 OA 诱导的 IR-HepG2 细胞的脂质代谢紊乱。

本研究结果与已有报道类似。Lu 等^[51]发现,黑根霉中分离出的胞外多糖上调 CT26 细胞中 p-AMPK 的蛋白表达。Zeng 等^[52]研究结果显示,波罗蜜(*Artocarpus heterophyllus* Lam.)中分离的多糖可通过上调 p-AMPK 的蛋白表达,抑制 SREBP-1C 的蛋白表达,从而减轻大鼠高脂饮食诱导的非酒精性脂肪性肝病。Wu 等^[53]研究发现,菊苣(*Cichorium intybus* L.)多糖上调了 p-AMPK 和 p-ACC 的蛋白表达,减弱了大鼠高脂饮食诱导的非酒精性脂肪性肝病。

4 结论

本研究成功建立了 *S. echinoides* 1K04342 胞外多糖的超声提取工艺,通过分离纯化得到 EPS-2,发现其能有效减轻 IR-HepG2 细胞糖脂代谢紊乱。本研究为 EPS-2 作为潜在的活性成分应用于 T2DM 的防治提供了科学依据。

作者贡献声明

宋燕:研究构思和设计,论文撰写和修改;姚凯月:数据收集和处理,论文修改;徐京:数据收集和处理;赵亚东:论文修改;水珊珊:研究设计;王家星:研究设计;胡一鸣:数据收集和处理;孙继鹏:研究构思和设计,论文修改;马明珠:研究构思和设计,论文修改。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] SINGH AK, YADAV D, SHARMA N, JIN JO. Dipeptidyl peptidase (DPP)-IV inhibitors with antioxidant potential isolated from natural sources: a novel approach for the management of diabetes[J]. *Pharmaceuticals*, 2021, 14(6): 586.
- [2] LIARAKOS AL, LIM JZM, LEELARATHNA L, WILMOT EG. The use of technology in type 2 diabetes and prediabetes: a narrative review[J]. *Diabetologia*, 2024, 67(10): 2059-2074.
- [3] 周得喜. *Clostridium butyricum*-pMTL007-GLP-1 工程菌株对 II 型糖尿病小鼠的改善效果及作用机制研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2023.
- [4] ZHOU DX. Improvement and mechanism of engineered *Clostridium butyricum*-pMTL007-GLP-1 on type 2 diabetes in mice[D]. Nanchang: Nanchang University, 2023 (in Chinese).
- [5] DILNA SV, SURYA H, ASWATHY RG, VARSHA KK, SAKTHIKUMAR DN, PANDEY A, NAMPOOTHIRI KM. Characterization of an exopolysaccharide with potential health-benefit properties from a probiotic *Lactobacillus plantarum* RJF4[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2015, 64(2): 1179-1186.
- [6] HAO J, ZHU YF, ZHANG YF, LI LZ, LI ZG, WANG L, QU YD, QI LL, YU HL, WANG D. Structural characterization and hypolipidemic activity of a heterogalactan purified from *Sanghuangporus vaninii* based on modulation of TLR4/NF- κ B pathway[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2025, 347: 122702.
- [7] GONG PX, WU YC, LIU Y, LV SZ, YOU Y, ZHOU ZL, CHEN X, LI HJ. Structure and hypoglycemic effect of a neutral polysaccharide isolated from sea cucumber *Stichopus japonicus*[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2022, 216: 14-23.
- [8] BAI ZY, MENG JX, HUANG XJ, WU GJ, ZUO S, NIE SP. Comparative study on antidiabetic function of six legume crude polysaccharides[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 154: 25-30.
- [9] HUANG HL, LIN JZ, WANG WD, LI S. Biopolymers produced by *Sphingomonas* strains and their potential applications in petroleum production[J]. *Polymers*, 2022, 14(9): 1920.
- [10] ARORA A, BEHL T, SEHGAL A, SINGH S, SHARMA N, BHATIA S, SOBARZO-SANCHEZ E, BUNGAU S. Unravelling the involvement of gut microbiota in type 2 diabetes mellitus[J]. *Life Sciences*, 2021, 273: 119311.
- [11] BARYŁA I, STYCZEŃ-BINKOWSKA E, PŁUCIENNIK E, KOŚLA K, BEDNAREK AK. The *WWOX/HIF1A* axis downregulation alters glucose metabolism and predispose to metabolic disorders[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(6): 3326.
- [12] SUN HQ, YU XF, LI T, ZHU ZY. Structure and hypoglycemic activity of a novel exopolysaccharide of *Cordyceps militaris*[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 166: 496-508.
- [13] YE H, SHEN ZP, CUI JF, ZHU YJ, LI YY, CHI YZ, WANG JF, WANG P. Hypoglycemic activity and mechanism of the sulfated rhamnose polysaccharides chromium (III) complex in type 2 diabetic mice[J]. *Bioorganic Chemistry*, 2019, 88: 102942.
- [14] ZHAO M, HU Y, YAO H, HUANG JS, LI S, XU H. Sustainable production and characterization of medium-molecular weight welan gum produced by a *Sphingomonas* sp. RW[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2022, 289: 119431.
- [15] FOLLI F, CORRADI D, FANTI P, DAVALLI A, PAEZ A, GIACCARI A, PEREGO C, MUSCOGIURI G. The role of oxidative stress in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus micro- and macrovascular complications: avenues for a mechanistic-based

- therapeutic approach[J]. *Current Diabetes Reviews*, 2011, 7(5): 313-324.
- [15] JUBAYER F, KAYSHAR S, RAHAMAN M. Effects of Ajwa date seed powder on serum lipids in humans: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial[J]. *Journal of Herbal Medicine*, 2020, 24: 100409.
- [16] 张震. 鼠李糖乳酸杆菌 LGG 来源胞外多糖抑制动物脂肪生成的研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2017.
- ZHANG Z. Isolated exopolysaccharides from *Lactobacillus rhamnosus* GG inhibit adipogenesis in animals[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2017 (in Chinese).
- [17] HUANG ZF, ZHANG ML, WANG YH, ZHANG S, JIANG XW. Extracellular and intracellular polysaccharide extracts of *Trametes versicolor* improve lipid profiles via serum regulation of lipid-regulating enzymes in hyperlipidemic mice[J]. *Current Microbiology*, 2020, 77(11): 3526-3537.
- [18] LI ZQ, HUANG YL, ZHANG J, MI D, ZHOU WW. Ultrasound stimulated production of exopolysaccharide with anti-UV radiation activity by increasing cell permeability of *Paenibacillus polymyxa*[J]. *Process Biochemistry*, 2023, 126: 252-259.
- [19] 王芸. 深海细菌胞外多糖 EPS364 的性质及抗肿瘤机制研究[D]. 青岛: 中国科学院大学(中国科学院海洋研究所), 2021.
- WANG Y. Study on the properties and anti-tumor mechanism of exopolysaccharide EPS364 from a deep-sea bacterium[D]. Qingdao: University of Chinese Academy of Sciences (Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences), 2021 (in Chinese).
- [20] 吕亭亭, 杨志华, 韩永红, 孟鑫, 陶娟, 刘旭. 响应面法优化苯酚-硫酸法测定泡桐花多糖含量[J]. *化学与生物工程*, 2020, 37(7): 62-68.
- LÜ TT, YANG ZH, HAN YH, MENG X, TAO J, LIU X. Optimization in phenol-sulfuric acid method for determination of content of paulowniae *Flos* polysaccharide by response surface methodology[J]. *Chemistry & Bioengineering*, 2020, 37(7): 62-68 (in Chinese).
- [21] 蓝兆. 八宝丹通过 AKT 与 ERK 信号通路抑制小鼠乳腺癌 4T1 细胞增殖机制研究[D]. 福州: 福建中医药大学, 2021.
- LAN Z. BaBao Dan inhibits the proliferation of breast cancer 4T1 cells through the AKT and ERK signaling pathways[D]. Fuzhou: Fujian University of Traditional Chinese Medicine, 2021 (in Chinese).
- [22] 朱水兰, 黎宇, 严奉东, 涂珺. 油酸诱导胰岛素抵抗 HepG2 细胞模型优化及小檗碱、黄芩苷、葛根素和甘草苷的体外降糖作用研究[J]. *药物评价研究*, 2017, 40(10): 1402-1407.
- ZHU SL, LI Y, YAN FD, TU J. Optimization of oleic acid-induced insulin resistance HepG2 cell model and anti-hyperglycemic effect of berberine, baicalin, puerarin and liquiritin[J]. *Drug Evaluation Research*, 2017, 40(10): 1402-1407 (in Chinese).
- [23] 潘章超, 张人谕, 黎欢昶, 曾念开, 王勇. 暗褐脉柄牛肝菌子实体多糖的分离纯化、结构表征及体外降血糖活性[J]. *食品科学*, 2024, 45(8): 55-62.
- PAN ZC, ZHANG RY, LI HC, ZENG NK, WANG Y. Extraction, purification, characterization and *in vitro* hypoglycemic activity of polysaccharides from fruiting body of *Phlebopus portentosus*[J]. *Food Science*, 2024, 45(8): 55-62 (in Chinese).
- [24] CAI SB, WANG O, WANG MQ, HE JF, WANG Y, ZHANG D, ZHOU F, JI BP. *In vitro* inhibitory effect on pancreatic lipase activity of subfractions from ethanol extracts of fermented Oats (*Avena sativa* L.) and synergistic effect of three phenolic acids[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, 60(29): 7245-7251.
- [25] ZHENG ZM, HUANG QL, LING CQ. Water-soluble yeast β -glucan fractions with different molecular weights: extraction and separation by acidolysis assisted-size exclusion chromatography and their association with proliferative activity[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 123: 269-279.
- [26] HU T, HUANG QL, WONG K, YANG H. Structure, molecular conformation, and immunomodulatory activity of four polysaccharide fractions from *Lignosus rhinocerotis sclerotia*[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017, 94: 423-430.
- [27] WANG L, ZHANG B, XIAO J, HUANG Q, LI C, FU X. Physicochemical, functional, and biological properties of water-soluble polysaccharides from *Rosa roxburghii* Tratt fruit[J]. *Food Chemistry*, 2018, 249: 127-135.
- [28] YU J, LIU S, CHEN L, WU B. Combined effects of arsenic and palmitic acid on oxidative stress and lipid metabolism disorder in human hepatoma HepG2 cells[J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 769: 144849.
- [29] XU J, ZHANG XF, SONG Y, ZHENG B, WEN ZS, GONG M, MENG LT. Heat-killed *Lactocaseibacillus paracasei* ameliorated UVB-induced oxidative damage and photoaging and its underlying mechanisms[J]. *Antioxidants*, 2022, 11(10): 1875.
- [30] LUO W, WANG JQ, SUN L, LI R, WU D, TANG J, ZHANG JM, GENG F. Metabolome analysis shows that ultrasound enhances the lethality of chlorine dioxide against *Salmonella* Typhimurium by disrupting its material and energy metabolism[J]. *Food Research International*, 2022, 162: 112135.
- [31] 盛思杰, 吴媛媛, 叶海波, 徐铃琳, 朱天乐, 吴学进, 温欣黎, 郝连奇, 屠幼英. 响应面法优化铁观音新式茶饮配方的研究[J]. *中国茶叶*, 2025, 47(2): 40-45.
- SHENG SJ, WU YY, YE HB, XU LL, ZHU TL, WU XJ, WEN XL, HAO LQ, TU YY. Optimization of the formula of 'tieguanyin' new tea drink by response surface methodology[J]. *China Tea*, 2025, 47(2): 40-45 (in Chinese).
- [32] SADEGHI M, MIROLIAEI M, GHANADIAN M, SZUMNY A, RAHIMMALEK M. Exploring the inhibitory properties of flavonoids on α -glucosidase: computational and experimental approaches[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023, 253(Pt 7): 127380.
- [33] ZHANG ZH, GE JY, WEI LH, SHI J, JI YR, XING XY, SHI Y, DONG Y. Isolation and identification of novel hemp seed protein-derived pancreatic lipase inhibitory peptides[J]. *Food Bioscience*, 2025, 63: 105834.

- [34] WANG K, NIU MM, YAO D, ZHAO J, WU Y, LU BX, ZHENG XQ. Physicochemical characteristics and *in vitro* and *in vivo* antioxidant activity of a cell-bound exopolysaccharide produced by *Lactobacillus fermentum* S1[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 139: 252-261.
- [35] CHEN XT, SHI CZ, WANG Y, YU H, ZHANG Y, ZHANG JX, LI PF, GAO JN. The mechanisms of glycolipid metabolism disorder on vascular injury in type 2 diabetes[J]. *Frontiers in Physiology*, 2022, 13: 952445.
- [36] ELFAKI I, MIR R, ELNAGEEB ME, HAMADI A, ALHARBI ZM, BEDAIWI RI, JAVID J, ALRASHEED T, ALATAWI D, ALROHAF BM, ABUNAB MK, MUQRI TA. Identification of interactive genetic loci linked to insulin resistance in metabolic syndrome-an update[J]. *Medicina*, 2025, 61(1): 83.
- [37] LI JS, JI T, SU SL, ZHU Y, CHEN XL, SHANG EX, GUO S, QIAN DW, DUAN JA. Mulberry leaves ameliorate diabetes *via* regulating metabolic profiling and AGEs/RAGE and p38 MAPK/NF- κ B pathway[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2022, 283: 114713.
- [38] BAJPAI VK, AHMAD RATHER I, PARK YH. Partially purified exo-polysaccharide from *Lactobacillus Sakei* Probio 65 with antioxidant, α -glucosidase and tyrosinase inhibitory potential[J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2016, 40(3): 264-274.
- [39] WEI M, CAO WB, ZHAO RD, SUN DP, LIANG YZ, HUANG YD, CHENG ZW, OUYANG J, YANG WS, YU WB. Fibroblast growth factor 15, induced by elevated bile acids, mediates the improvement of hepatic glucose metabolism after sleeve gastrectomy[J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2023, 29(21): 3280-3291.
- [40] QI Y, WANG DY, FANG L, LIU XT, LIU CL, ZHAO FR, WU D, WANG XY, WANG J, MIN WH. Hypoglycemic effect of exopolysaccharide from *Lactiplantibacillus plantarum* JLAU103 on streptozotocin and high-fat diet-induced type 2 diabetic mice[J]. *Foods*, 2022, 11(22): 3571.
- [41] MARTÍNEZ BÁEZ A, CASTRO ROMERO I, CHIHU AMPARAN L, CASTAÑEDA JR, AYALA G. The insulin receptor substrate 2 mediates the action of insulin on HeLa cell migration *via* the PI3K/Akt signaling pathway[J]. *Current Issues in Molecular Biology*, 2023, 45(3): 2296-2308.
- [42] AHMED SA, SARMA P, BARGE SR, SWARGIARY D, DEVI GS, BORAH JC. Xanthosine, a purine glycoside mediates hepatic glucose homeostasis through inhibition of gluconeogenesis and activation of glycogenesis *via* regulating the AMPK/FoxO1/AKT/GSK3 β signaling cascade[J]. *Chemico-Biological Interactions*, 2023, 371: 110347.
- [43] HE SQ, XU ZY, LI J, GUO YP, LIN QX, JIN HX. Peptides from *Harpadon nehereus* protect against hyperglycemia-induced HepG2 *via* oxidative stress and glycolipid metabolism regulation[J]. *Journal of Functional Foods*, 2023, 108: 105723.
- [44] LI DF, FAN JL, DU L, REN GY. Prenylated flavonoid fractions from *Glycyrrhiza glabra* alleviate insulin resistance in HepG2 cells by regulating the ERK/IRS-1 and PI3K/Akt signaling pathways[J]. *Archives of Pharmacol Research*, 2024, 47(2): 127-145.
- [45] ALAAELDIN R, ABDEL-RAHMAN IAM, HASSAN HA, YOUSSEF N, ALLAM AE, ABDELWAHAB SF, ZHAO QL, FATHY M. Carpachromene ameliorates insulin resistance in HepG2 cells *via* modulating IR/IRS1/PI3k/Akt/GSK3/FoxO1 pathway[J]. *Molecules*, 2021, 26(24): 7629.
- [46] TANG C, WANG YX, XU ZY, CHEN D, XU JG, YANG D, ZHANG L, LIU J, KAN J. The relationships between high-fat diet and metabolic syndrome: potential mechanisms[J]. *Food Bioscience*, 2024, 59: 104261.
- [47] WU LJ, WANG XJ, JIANG JH, CHEN Y, PENG B, JIN W. Mechanism of rhubarb in the treatment of hyperlipidemia: a recent review[J]. *Open Medicine*, 2023, 18(1): 20230812.
- [48] ZHANG Z, ZHOU ZG, LI Y, ZHOU LK, DING QW, XU L. Isolated exopolysaccharides from *Lactobacillus rhamnosus* GG alleviated adipogenesis mediated by TLR2 in mice[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 36083.
- [49] XIONG JF, CHEN GF, HE Y, ZHAO CQ, CHEN DY, LIU YH, ZHANG ZL, WU YJ, XU H. Oxymatrine reduces hepatic lipid synthesis in rat model of nonalcoholic steatohepatitis by regulating Sirt1/AMPK and LXR/Plin2/SREBP-1c pathways[J]. *Chemico-Biological Interactions*, 2025, 407: 111370.
- [50] YAN Q, LI CY, LI JF, YAO YH, ZHAO J. Protective effects of isostrictinin against high-fat, high-sugar diet-induced steatosis in MASLD mice *via* regulation of the AMPK/SREBP-1c/ACC pathway[J]. *Nutrients*, 2024, 16(22): 3876.
- [51] LU Y, ZHANG XJ, WANG JY, CHEN KS. Exopolysaccharides isolated from *Rhizopus nigricans* induced colon cancer cell apoptosis *in vitro* and *in vivo* *via* activating the AMPK pathway[J]. *Bioscience Reports*, 2020, 40(1): BSR20192774.
- [52] ZENG SJ, CHEN YZ, WEI CX, TAN LH, LI C, ZHANG YJ, XU F, ZHU KX, WU G, CAO J. Protective effects of polysaccharide from *Artocarpus heterophyllus* Lam. (jackfruit) pulp on non-alcoholic fatty liver disease in high-fat diet rats *via* PPAR and AMPK signaling pathways[J]. *Journal of Functional Foods*, 2022, 95: 105195.
- [53] WU YL, ZHOU F, JIANG HT, WANG ZJ, HUA C, ZHANG YS. Chicory (*Cichorium intybus* L.) polysaccharides attenuate high-fat diet induced non-alcoholic fatty liver disease *via* AMPK activation[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 118(Pt A): 886-895.