

沙棘叶醇提物的化学成分与降糖活性研究

闫昌誉^{1,2,3,4}, 丁肇俊^{3,4}, 李晓敏^{1,2}, 毛新亮^{1,2}, 余宗盛^{1,2}, 王志芳^{1,2}, 叶健文^{1,2},
栗原博^{1,2,3,4,5}, 李怡芳^{3,4,5}, 梁磊^{3,4,5*}, 何蓉蓉^{3,4,5*}

(1. 完美(广东)日用品有限公司, 广东 中山 528400; 2. 广东完美生命健康科技研究院有限公司, 广东 中山 528400;
3. 广东省中药药效物质基础及创新药物研究重点实验室, 暨南大学药学院, 广东 广州 510632; 4. 教育部中药与创新药物研究国际合作联合实验室, 暨南大学药学院, 广东 广州 510632; 5. 广东省疾病易感性及中医药研发工程技术研究中心, 暨南大学中医学院, 广东 广州 510632)

摘要: 本研究旨在检测沙棘叶提取物 (sea buckthorn leaves extract, SBLE) 的化学成分并探究其降糖生物活性。通过 65% 乙醇热回流制备 SBLE, 经 UHPLC-PDA-MS/MS (ultra-high-performance liquid chromatography-photodiode array-mass spectrometry/mass spectrometry) 系统分析其化学成分。本研究中的动物实验方案及程序均符合动物使用和护理的伦理原则, 并已获暨南大学动物实验伦理委员会批准。昆明小鼠通过注射链脲佐菌素 (streptozocin, STZ) 构建高血糖动物模型, SBLE (1.5 g·kg⁻¹) 连续灌胃给药 5 周, 检测高血糖小鼠的空腹血糖 (fasting blood glucose, FBG) 与口服葡萄糖耐量。正常昆明小鼠 SBLE (1.5 g·kg⁻¹) 连续灌胃给药 10 天, 给予蔗糖或淀粉负荷, 尾静脉取血检测 120 min 内的血糖变化, 并收取小鼠小肠黏膜检测 α -葡萄糖苷酶 (α -glucosidase, AG) 的活性。体外直接将 SBLE 与酵母来源的 AG 共孵育检测其对糖苷酶活性的影响。Caco-2 细胞经 SBLE 处理后, 通过荧光显微镜和细胞流式术检测细胞对葡萄糖的摄取, 并采用实时定量 PCR 技术检测 *SGLT1* (sodium-dependent glucose transporter 1) 和 *GLUT2* (glucose transporter 2) 基因的表达。质谱分析共检测了 18 个化合物, 主要类型为鞣质和黄酮。SBLE 能降低 STZ 高血糖小鼠的 FBG 并增加口服葡萄糖耐量。SBLE 可有效抑制正常小鼠由淀粉摄入引起的血糖升高。SBLE 对酵母来源 AG 具有较好的抑制活性 ($IC_{50} = 16.94 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 同时能降低正常小鼠小肠黏膜 AG 的活性, 抑制率为 15.48%。SBLE (25~100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 可剂量依赖性地抑制 Caco-2 细胞对葡萄糖的摄取, 并且 SBLE 可显著降低 *SGLT1* 基因的水平, 但不影响 *GLUT2* 的表达。本研究建立了 SBLE 的 UHPLC 特征指纹图谱, 质谱检测了 18 个化学成分; 发现 SBLE 可通过抑制 AG 的活性与肠道上皮细胞对葡萄糖的吸收发挥降糖作用。

关键词: 沙棘叶; 化学成分; 降血糖; α -葡萄糖苷酶; 糖耐受; 链脲佐菌素

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)02-0396-09

The chemical constituents and hypoglycemic activity of alcoholic extract of sea buckthorn leaves

YAN Chang-yu^{1,2,3,4}, DING Zhao-jun^{3,4}, LI Xiao-min^{1,2}, MAO Xin-liang^{1,2}, YU Zong-sheng^{1,2},
WANG Zhi-fang^{1,2}, YE Jian-wen^{1,2}, HIROSHI Kurihara^{1,2,3,4,5}, LI Yi-fang^{3,4,5}, LIANG Lei^{3,4,5*}, HE Rong-rong^{3,4,5*}

(1. Perfect (Guangdong) Co., Ltd., Zhongshan 528400, China; 2. Perfect Life Sciences Research Institute Co., Ltd., Zhongshan 528400, China; 3. Guangdong Province Key Laboratory of Pharmacodynamic Constituents of TCM and New Drugs Research, College of Pharmacy, Jinan University, Guangzhou 510632, China; 4. International Cooperative Laboratory of Traditional Chinese Medicine Modernization and Innovative Drug Development of Chinese Ministry of Education (MOE), College of Pharmacy, Jinan University, Guangzhou 510632, China; 5. Guangdong Engineering Research Center of Chinese Medicine & Disease Susceptibility, College of Traditional Chinese Medicine, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: The purpose of this research is to identify the chemical constituents of sea buckthorn leaves extract

收稿日期: 2022-07-08; 修回日期: 2022-08-11.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (U1801284, 81973718); 广东省自然科学基金资助项目 (2021A1515011297); 中山市院士工作站建设项目 (中山科发 [2019] 187 号).

*通讯作者 Tel: 86-20-85221559, E-mail: rongronghe@jnu.edu.cn; leiliang@jnu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-0840

(SBLE) and explore its hypoglycemic biological activity. SBLE was prepared by hot reflux extraction with 65% ethanol, and its chemical composition was analyzed by ultra-high-performance liquid chromatography-photodiode array-mass spectrometry/mass spectrometry (UHPLC-PDA-MS/MS) system. The animal experiments were compliant with ethical principles for animal use and had been approved by the Animal Experiment Ethics Committee of Jinan University. Mice were injected with streptozocin (STZ) to establish a hyperglycemic animal model, and SBLE ($1.5 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) was administered by gavage for 5 weeks. The fasting blood glucose (FBG) and oral glucose tolerance were detected. Normal mice were given SBLE ($1.5 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) by intragastric administration for 10 days, and blood was collected from the tail vein to detect the changes in blood glucose within 120 min after sucrose or starch loading. The mucous membrane of the small intestine of mice was taken to detect the activity of α -glucosidase (AG), and the activity of yeast-derived AG incubated with SBLE was evaluated. The glucose uptake by Caco-2 cells treated with SBLE was detected by fluorescence microscopy and cytometry, and the gene expression of sodium-dependent glucose transporter 1 (*SGLT1*) and glucose transporter 2 (*GLUT2*) in Caco-2 cells were detected by real-time quantitative PCR (qPCR). A total of 18 compounds were identified, mainly including tannins and flavonoids. SBLE reduced FBG and increased oral glucose tolerance in STZ hyperglycemic mice. SBLE effectively inhibited the increase of blood glucose caused by starch intake in normal mice. SBLE exerted good inhibitory activity on yeast-derived AG ($\text{IC}_{50} = 16.94 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) and small intestinal mucosa AG with an inhibition rate of 15.48%. SBLE ($25\text{--}100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) dose-dependently inhibited glucose uptake by Caco-2 cells, and SBLE significantly reduced the mRNA level of *SGLT1* without changing the expression of *GLUT2*. In conclusion, the UHPLC characteristic fingerprint of SBLE is established with 18 chemical components identified by mass spectrometry, and SBLE exerts hypoglycemic effect by inhibiting the activity of AG and the absorption of glucose by intestinal epithelial cells.

Key words: sea buckthorn leave; chemical composition; hypoglycemic; α -glucosidase; glucose tolerance; streptozocin

糖尿病是全球高发的慢性疾病之一, 2021年国际糖尿病联合会 (International Diabetes Federation, IDF) 公布的最新数据显示^[1], 全球逾5亿成年人患有糖尿病, 其中约90%患者为2型糖尿病 (type 2 diabetes, T2D)。糖尿病患者伴有糖代谢紊乱而表现出高血糖特征, 而持续性的高血糖会损害神经、视网膜、心血管等组织与器官, 引发多种糖尿病并发症, 严重危害人类的生命健康^[2]。临床上现有胰岛素、二甲双胍、阿卡波糖、格列美脲等多种降糖药, 但需终生服用, 会产生一定的不良反应。近年来的研究表明^[3], 天然植物蕴含大量降糖活性成分, 是开发降糖相关保健食品与药品的重要资源。

沙棘 (*Hippophae rhamnoides* L.) 为胡颓子科沙棘属的落叶灌木或乔木, 兼具生态、药用和食用价值, 我国拥有世界上90%的沙棘资源^[4]。然而, 相较于沙棘果实, 沙棘叶易采摘保存, 蕴藏量巨大, 但资源利用率较低。传统医药中沙棘常用于止咳、助消化、活血化瘀、止痛等, 现代科学研究提示沙棘具有抗氧化、抗癌和降血脂等药理作用^[5,6]。关于沙棘叶在降糖方面的研究较少, 仅有以下两项体内研究报道了其糖尿病大鼠的改善作用: 研究显示沙棘叶水提物能降低链脲佐菌素 (streptozocin, STZ) 诱导糖尿病大鼠的血糖, 同时改善其受损的肾功能, 对糖尿病肾病显示出潜在的

治疗作用^[7]; 此外, 沙棘叶三萜酸粗提物可降低高糖高脂饮食联合四氧嘧啶导致的T2D大鼠的空腹血糖 (fasting blood glucose, FBG), 改善胰岛素抵抗, 并调节紊乱的脂代谢过程^[8]。但仍未有研究报道沙棘叶乙醇提取物的抗糖尿病活性, 而中药与天然植物的生物活性与其提取方式关联较大。本研究主要评价沙棘叶醇提物的降糖活性并对其生物机制进行初步探究, 通过建立相应的指纹图谱分析其发挥生物活性的物质基础, 有利于促进沙棘叶资源的开发利用, 具有重要的社会与经济效益。

材料与方法

动物 SPF级雄性昆明小鼠 (6周龄), 体重22~25 g, 购于南方医科大学实验动物中心 [许可证号: SCXK (粤) 2016-0041, 生产批号: No. 44002100028714、44002100029996]。饲养条件: 温度 $22 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, 湿度 $55\% \pm 5\%$, 每日光照12 h。实验方案及程序均符合动物使用和护理的伦理原则, 并已获暨南大学动物实验伦理委员会批准。

细胞与培养 人结直肠癌细胞 (Caco-2细胞) 由南方医科大学吴少瑜教授馈赠, 培养于含10%胎牛血清 (FBS) 的DMEM培养基中, 当细胞汇合至80%~90%时, 用胰酶消化后传代培养。

仪器 超级纯水仪 (Milli Q, 美国 Millipore 公司); 电子天平 (BS224S, 德国 Sartorius 公司); 旋转蒸发器 (N-1001, 东京理化 Eycla 公司); 高速冷冻离心机 (3K15, 德国 Sigma 公司); 高效液相色谱仪 (Ultimate 3000)、高分辨轨道离子阱质谱仪 (Q-Exactive)、酶标仪 (Multiskan Mk 3) (美国 Thermo 公司); 罗康全®活力型血糖检测仪 (Accu-Chek Active, 德国罗氏公司); 细胞培养箱 (CCL-170B-8, 新加坡 ESCO 公司); 倒置荧光显微镜 (IX71, 日本 Olympus 公司); 流式细胞仪 (Coulter CytoFLEX S, 美国 Beckman 公司); 超微量分光光度计 (NanoPhotometer N50 Touch, 德国 Implen GmbH 公司); 实时荧光 PCR 仪 (CFX Connect System, 美国 Bio-Rad 公司)。

药品与试剂 沙棘叶 (青海平安, 批号: 20200805) 由完美 (广东) 日用品有限公司提供, 经暨南大学岭南传统中药研究中心张英老师鉴定为胡颓子科植物沙棘 (*Hippophae rhamnoides* L.) 的干燥叶 (参照四川省藏药材标准 2014 年版)。DMEM 培养基 (C11995500BT, 美国 Thermo 公司); STZ (S110910, 上海阿拉丁公司); 无水葡萄糖 (G6172)、蔗糖 (S818046)、盐酸二甲双胍 (M813341)、无水碳酸钠 (S818014-500 g) (上海麦克林公司); 阿卡波糖片 [国药准字 H19990205, 拜耳医药 (北京) 公司]; α -葡萄糖苷酶 (α -glucosidase, AG, S10050-100 U)、对硝基苯基- α -D-吡喃葡萄糖苷 (*p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside, *p*-NPG, S10137-1 g)、阿卡波糖 (B20003-20 mg) (上海源叶生物公司); 对硝基苯酚 (R013436, 上海罗恩公司); MTT (1334GR001, Bio Froxx 公司); 2-NBDG [2-(*N*-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl) amino)-2-deoxyglucose, 11046, 美国 Cayman 公司]; Trizol 试剂 (DP424, 北京天根公司); 反转录试剂盒 (AQ201)、SYBR Green 荧光探针 (AQ141-01) (北京全式金公司)。

沙棘叶提取物 (sea buckthorn leaves extract, SBLE) 的制备 称取干燥沙棘叶 30 g 置于 1 L 圆底烧瓶, 加入 600 mL 65% 乙醇 (料液比 1:20) 进行热回流提取 2 h, 重复提取 2 次, 合并提取液, 抽滤、减压浓缩、干燥, 得 SBLE。称重计算收率为 41.23%。

SBLE 化学成分分析 精确称取 2 mg SBLE, 加入 1 mL 50% 色谱级甲醇进行超声溶解, 14 000 r·min⁻¹ 离心 20 min, 吸取上清液过 0.22 μ m 微孔滤膜得到质量浓度为 2 mg·mL⁻¹ 的样品溶液, 进行 UHPLC-MS 分析。分析所用仪器为 Ultimate 3000 DGLC 液相色谱串联 Q-Exactive 高分辨质谱仪, 色谱柱为 Waters ACQUITY UPLC HSS T3 (100 mm \times 2.1 mm, 1.8 μ m)。以 0.1% 甲酸水-乙腈为流动相, 洗脱程序如下, 0 min: 5% (乙腈), 1 min: 12% (乙腈), 10 min: 16% (乙腈), 14 min: 32% (乙

腈), 15 min: 100% (乙腈), 18.5 min: 100% (乙腈), 19 min: 5% (乙腈), 25 min: 5% (乙腈), 流速为 0.3 mL·min⁻¹, 柱温 40 $^{\circ}$ C, 紫外扫描波长为 254 nm, 进样体积为 2 μ L。质谱各项采集参数设置如下: 正负离子同时扫描, 扫描质量范围为 *m/z* 100~1 000, 一级扫描分辨率为 35 000, 最大注射时间为 100 ms, 二级扫描分辨率为 17 500, 最大注射时间为 100 ms, 动态排除时间为 10 s, 分离窗口为 *m/z* 0.8, 碰撞能设置为: 20、30、40 V, 鞘气为 30 arb, 辅助气为 15 arb, 反吹气为 1 arb, 正离子喷雾电压 3.2 kV, 负离子喷雾电压 -2.8 kV, 毛细管柱温为 350 $^{\circ}$ C, 辅助气温度为 320 $^{\circ}$ C, S-lens 为 60。

高血糖小鼠模型与给药 小鼠在禁食 12 h 后腹腔注射 1% 的 STZ 溶液 (40 mg·kg⁻¹), 连续注射 5 天, 于第 7 天再次注射 (50 mg·kg⁻¹) 1 次, 造模期间在饮水中加入 10% 蔗糖。首次注射 STZ 后 3、7、11、21 天测定小鼠 FBG, 当 FBG 稳定高于 11.1 mmol·L⁻¹ 被认为高血糖造模成功。高血糖小鼠随机分为模型组、SBLE 组和二甲双胍组, 同周龄的正常昆明小鼠作为正常对照组, 每组 5 只小鼠。SBLE (1.5 g·kg⁻¹) 连续灌胃给药 5 周; 二甲双胍组第 1~2 周按 0.2 g·kg⁻¹ 剂量给药, 第 3~5 周按 0.4 g·kg⁻¹ 剂量给药; 正常对照组与模型组灌胃等体积纯净水。

FBG 与口服糖耐量的检测 高血糖小鼠在 SBLE 给药后每周测定 FBG。测定前小鼠禁食 9~11 h 后尾静脉取血, 利用便携式血糖仪检测血糖值即为 FBG。口服糖耐量实验: 给药第 5 周, 一次性灌胃给予小鼠 20% 葡萄糖溶液 (2 g·kg⁻¹), 灌胃后 30、60、120 min 测定小鼠血糖值, 糖耐受前的 FBG 作为起始血糖值, 根据各时段血糖值计算糖耐量曲线下面积 (area under curve, AUC), 计算方法如公式 (1):

$$\text{AUC} = (\text{BG}_0 + \text{BG}_{30\text{min}}) \times 0.25 + (\text{BG}_{30\text{min}} + \text{BG}_{60\text{min}}) \times 0.25 + (\text{BG}_{60\text{min}} + \text{BG}_{120\text{min}}) \times 0.5 \quad (1)$$

其中, BG_0 为糖耐受前血糖, $\text{BG}_{30\text{min}}$ 、 $\text{BG}_{60\text{min}}$ 、 $\text{BG}_{120\text{min}}$ 分别为糖耐受后 30、60、120 min 的血糖。

正常小鼠蔗糖与淀粉负荷实验 正常昆明小鼠分为糖负荷模型组 (4 g·kg⁻¹ 蔗糖或 6 g·kg⁻¹ 淀粉)、阿卡波糖组 (30.75 mg·kg⁻¹) 和 SBLE 组 (1.5 g·kg⁻¹), 每组 7 只小鼠。阿卡波糖与 SBLE 连续灌胃给药 10 天, 禁食 18 h 于第 11 天糖负荷前 30 min 灌胃给予阿卡波糖及 SBLE, 再给予相应的蔗糖或淀粉溶液, 并于 0、15、30、60、90、120 min 从小鼠尾静脉取血测血糖。

体外 AG 抑制活性检测 将 20 μ L SBLE 与 20 μ L 酵母来源的 AG 加到 80 μ L 磷酸盐缓冲液 (PBS) 中, 于 37 $^{\circ}$ C 放置 10 min, 再加入 5 mmol·L⁻¹ *p*-NPG 溶液

20 μL, 低速振荡混匀, 37 °C 反应 20 min, 最后加入 0.2 mol·L⁻¹ Na₂CO₃ 溶液 80 μL 终止反应, 使用酶标仪检测 405 nm 处的吸光度 (*A*) 值。阿卡波糖作为阳性对照药。根据公式 (2) 计算体外 AG 活性抑制率 (inhibition, *I*):

$$I(\%) = [1 - (A_s - A_{sb}) / (A_c - A_b)] \times 100 \quad (2)$$

其中, *A_b* 为空白组 (不加样品和 AG)、*A_c* 为对照组 (不加化合物)、*A_s* 为样品组、*A_{sb}* 为样品空白组 (不加 AG)。

正常小鼠肠黏膜 AG 活性检测 正常小鼠 SBLE 灌胃给药 10 天后处死, 收取十二指肠至空肠部分的小肠组织, 生理盐水洗涤肠腔后剪开, 用玻片刮取收集小肠黏膜, 加入适量 PBS 制备组织匀浆, 4 °C、8 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 收取上清。用 BCA (bicinchoninic acid) 试剂盒测定上清蛋白含量, 并稀释成蛋白含量相同的待测样品酶溶液。将样品溶液与 *p*-NPG 混匀后置于 37 °C 反应 20 min, Na₂CO₃ 终止反应后测定 405 nm 处的 *A* 值。根据公式 (3)、(4) 分别计算各组小鼠小肠黏膜 AG 活性 (*U*, U·mg protein⁻¹) 和酶活性抑制率 (*I*):

$$U = [(A - 0.0802) / 0.0367] \times V_{反} / (M \times t) / (V_{样} \times C_{pr}) \quad (3)$$

其中, *A* 为吸光度值, *V_反* 为反应体系总体积, *M* 为产物 (*p*-NP) 的相对分子质量, *t* 为样品与底物反应时间, *V_样* 为样品溶液体积, *C_{pr}* 为样品溶液的蛋白浓度。

$$I(\%) = (U_{正常对照组} - U_{药物处理组}) / U_{正常对照组} \times 100 \quad (4)$$

Caco-2 细胞活力检测 处于对数生长期的 Caco-2 细胞种于 96 孔板, 在 37 °C、5% CO₂ 环境中培养贴壁后, 加入不同浓度 SBLE, 24 h 后加入 MTT 溶液, 放入培养箱继续孵育 4 h, 加入 DMSO 溶解甲瓩结晶, 使用酶标仪于 570 nm 波长检测吸光度 (*A₅₇₀*) 值。

Caco-2 细胞对 2-NBDG 的摄取分析 将 Caco-2 细胞种于 6 孔板中, 用含 10% FBS 的 DMEM 培养基分化培养 15 天, 加入含不同浓度 SBLE 的无血清培养基孵育 24 h, 弃去含药物培养基, 使用预冷 PBS 润洗细胞 2 次, 加入 100 μmol·L⁻¹ 2-NBDG 工作液, 37 °C 孵育 30 min。弃去 2-NBDG 工作液, 使用预冷 PBS 清洗细胞 2 次, 胰酶消化收集细胞并用 PBS 重悬, 使用流式细胞仪在 FITC 通道下检测细胞荧光强度。

qPCR 检测基因表达 给予分化 15 天的 Caco-2 细胞 50 和 100 μg·mL⁻¹ 的 SBLE, 24 h 后收集细胞检测 *SGLT1* (sodium-dependent glucose transporter 1) 和 *GLUT2* (glucose transporter 2) 基因的水平。Trizol 试剂裂解细胞抽提 RNA, 超微量分光光度计测定总 RNA 浓度。使用反转录试剂盒合成 cDNA 第一链, 采用 SYBR

Green 荧光探针进行扩增反应。qPCR 参数如下: 95 °C、60 s, 激活 DNA 聚合酶; 95 °C、15 s 变性, 60 °C、30 s 退火, 共 40 个循环。*β*-Actin 作为内参基因, 使用的引物序列如下: *SGLT1* (forward: GGGCAGCTTCAGGCATC; reverse: AAACAGCCAGCCCAGCA); *GLUT2* (forward: ATGTCAGTGGGACTTGTGCTGC; reverse: AACTCAGCCACCATGAACCAGG); *β*-actin (forward: ACCCTGAAGTACCCCATCGA; reverse: TGATCTGGGTCATCTTCTCGC)。

统计学分析 使用 GraphPad Prism 8.0 进行作图, 采用 SPSS 26.0 对实验数据进行统计学分析, 计量资料以均数 ± 标准误 [$\bar{x} \pm \text{SEM}$ (standard error of the mean)] 表示。多组间比较采用 one way ANOVA 或 two way ANOVA, *P* < 0.05 表明有统计学差异。

结果

1 SBLE 的指纹图谱与化学成分检识

为了明晰沙棘叶的化学轮廓, 采用 UHPLC-PDA-MS/MS 技术对沙棘叶化学成分进行定性分析。图 1 为 UHPLC 指纹图谱 (254 nm), 表 1^[9-17] 为质谱定性结果, 共检识 18 个化合物, 主要为鞣质和黄酮类, 其中芦丁 (rutin)、没食子酸 (ellagic acid)、山柰酚-3-*O*-芸香糖苷 (kaempferol-3-*O*-rutoside) 和异鼠李素-3-*O*-葡萄糖苷 (isorhamnetin-3-*O*-glucoside) 经标准品准确比对。在 254 nm 紫外波长下, 没食子酸 (峰 10) 在鞣质类化合物中的相对百分含量最高, 其峰面积约占总峰面积的 17.43%, galloyl-HHDP-glucopyranose (峰 3) 与 galloyl-bis-HHDP-glucopyranose (峰 4) 的相对百分含量次之, 分别为 11.78% 和 11%。

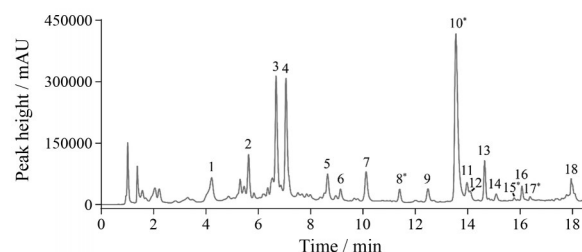


Figure 1 The characteristics fingerprint of the sea buckthorn leaves extract. The compound information of peaks 1-18 is presented in Table 1. Asterisk (*) indicates the compounds which are identified with the corresponding standard

2 SBLE 对 STZ 糖尿病小鼠 FBG 和口服葡萄糖耐量的影响

FBG 是表征糖尿病的直观指标, SBLE 给药后每周测定小鼠的 FBG。如图 2A 所示, 正常组小鼠在 5 周

Table 1 Identification of chemical compounds of sea buckthorn leaves extract. *Compared with standards; MS: Mass spectrometry; HHDP: Hexahydroxydiphenic acid

No.	t_r /min	Formula	Mode	Detected (m/z) /error (ppm)	MS/MS (m/z)	Identification	Ref.
1	4.22	C ₃₄ H ₂₄ O ₂₂	[M-H] ⁻	783.069 5/2.518	481.064 7, 300.999 4, 275.020 2	Pedunculagin isomer	[9]
2	5.63	C ₃₄ H ₂₄ O ₂₂	[M-H] ⁻	783.069 8/2.824	481.063 6, 300.999 3, 275.020 1	Pedunculagin isomer	[9]
3	6.68	C ₂₇ H ₂₂ O ₁₈	[M-H] ⁻	633.074 0/2.069	300.999 4, 275.019 8, 249.040 5, 169.013 6	Galloyl-HHDP-glucopyranose	[9]
4	7.05	C ₄₁ H ₂₈ O ₂₆	[M-H] ⁻	935.080 4/2.003	633.074 5, 300.999 9, 169.013 3	Galloyl-bis-HHDP-glucopyranose	[9]
5	8.64	C ₂₇ H ₁₄ O ₉	[M-H] ⁻	481.052 4/-6.254	300.999 5, 275.020 3	HHDP-glucopyranose	[9]
6	9.15	C ₃₄ H ₄₂ O ₂₁	[M-H] ⁻	785.215 8/2.898	315.051 7	Isorhamnetin-3- <i>O</i> -sophoroside-7- <i>O</i> -rhamnoside	[10]
7	10.12	C ₉ H ₁₀ O ₅	[M-H] ⁻	197.044 8/1.878	169.013 3, 124.015 3	Syringic acid	[11]
8*	11.40	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	[M-H] ⁻	609.146 7/2.723	463.087 4, 447.094 1, 301.036 1, 271.025 9, 151.002 9	Rutin	[10]
9	12.48	C ₁₉ H ₁₄ O ₁₂	[M-H] ⁻	433.041 7/3.551	300.999 3	Ellagic acid pentoside	[12]
10*	13.55	C ₁₄ H ₆ O ₈	[M-H] ⁻	300.999 2/4.274	283.997 7, 257.009 4, 229.014 2, 201.019 9	Ellagic acid	[13]
11	13.97	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	[M-H] ⁻	593.151 8/2.855	447.093 7, 431.099 1, 285.040 7	Kaempferol-3- <i>O</i> -glucoside-7- <i>O</i> -rhamnoside	[10]
12	14.09	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	[M-H] ⁻	609.146 5/2.411	301.035 7, 300.027 8, 271.023 6, 151.002 9	Quercetin-3- <i>O</i> -glucoside-7- <i>O</i> -rhamnoside	[14]
13	14.65	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	[M-H] ⁻	623.162 4/2.710	477.104 9, 461.110 0, 445.078 5, 315.051 7	Isorhamnetin-3- <i>O</i> -rutinoside isomer	[10]
14	15.08	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	[M-H] ⁻	593.152 1/3.479	461.109 9, 447.093 8, 313.085 9, 285.040 5	Kaempferol-3- <i>O</i> -rhamnoside-7- <i>O</i> -glucoside	[15]
15*	15.77	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	[M-H] ⁻	593.152 1/3.378	285.040 7, 255.030 3, 151.002 7	Kaempferol-3- <i>O</i> -rutinoside	[16]
16	16.07	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	[M-H] ⁻	623.162 2/2.518	477.103 2, 315.051 7	Isorhamnetin-3- <i>O</i> -rutinoside isomer	[10]
17*	16.38	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	[M-H] ⁻	477.104 5/3.705	315.051 8, 285.040 8, 271.025 2, 243.029 9	Isorhamnetin-3- <i>O</i> -glucoside	[10]
18	17.95	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₃	[M-H] ⁻	593.130 7/2.989	447.091 8, 285.040 8, 229.050 0, 151.002 7	Kaempferol-3- <i>O</i> -β- <i>D</i> -(6"- <i>O</i> - <i>p</i> -coumaryl) glycoside	[17]

内FBG基本稳定在6~9 mmol·L⁻¹的正常水平, STZ模型组小鼠各周FBG均高于正常组 ($P < 0.05$), 高血糖实验模型稳定。血糖监测期间SBLE组小鼠FBG较模型组均显著降低 ($P < 0.05$), 血糖值可稳定在15 mmol·L⁻¹以下。给药5周后糖尿病小鼠进行口服葡萄糖耐量实验, 结果如图2B, 各组小鼠的血糖浓度在30 min时达到峰值, 之后呈现逐渐下降的趋势。SBLE组小鼠的血糖值在血糖监测期间均低于模型组小鼠, 且在120 min时血糖下降至糖负荷前的水平。各组小鼠的葡萄糖耐

量AUC计算结果表明(图2C), SBLE组和二甲双胍组的糖耐量AUC值均低于模型组小鼠 ($P < 0.001$, $P < 0.05$), 口服葡萄糖耐量增加。

3 SBLE对正常小鼠淀粉和蔗糖摄入后血糖升高的影响

正常小鼠口服淀粉或蔗糖溶液的糖耐量实验结果显示(图3), 给予淀粉溶液后, 血糖浓度在60 min达到峰值。阿卡波糖在30 min开始降低淀粉组血糖水平, 而SBLE在给予淀粉后15 min即显著降低血糖水平

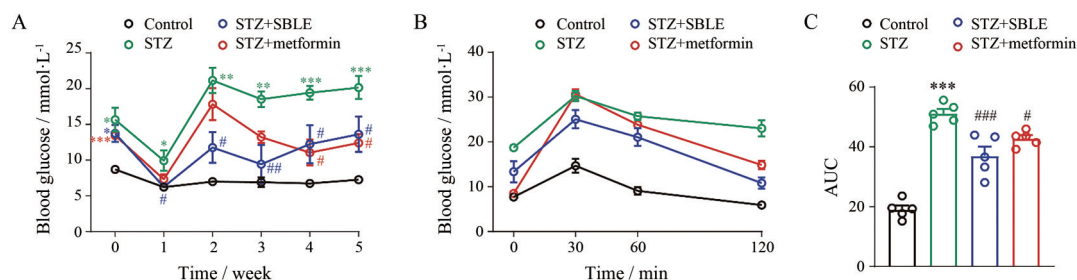


Figure 2 Effects of sea buckthorn leaves extract (SBLE) on fasting blood glucose (FBG) and glucose tolerance test in streptozocin (STZ)-induced diabetic mice. A: FBG of mice every week; B, C: Glucose tolerance test (B) and the area under the curve (AUC, C) within 120 min of oral glucose. $n = 5$, $\bar{x} \pm$ standard error of the mean (SEM). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs STZ

($P < 0.05$), 延缓了葡萄糖的吸收入血 (图 3A)。给予蔗糖溶液后血糖浓度在 15 min 达到峰值, SBLE 对小鼠血糖升高仅有微弱的抑制作用, 无统计学意义 (图 3B)。以上结果提示 SBLE 有助于延缓淀粉类膳食引起的餐后血糖升高。

4 SBLE 对 AG 活性的影响

首先在体外检测 SBLE 对酵母来源 AG 活性的影响, 结果显示, SBLE 在 $6.25 \sim 50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时对 AG 的活性抑制呈明显剂量依赖关系, 剂量大于 $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时可完全抑制酶活性, 其半数抑制浓度 IC_{50} 为 $16.94 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (图 4A)。而阳性药阿卡波糖的 AG 半数抑制浓度 (IC_{50}) 为 $5.33 \times 10^{-7} \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (图 4B)。为了验证 SBLE 在体内对 AG 的抑制作用, 正常小鼠给予 SBLE ($1.5 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) 10 天后收取小鼠小肠黏膜, 通过 *p*-NPG 法测定其 AG 的活性。结果显示 (表 2), SBLE ($1.5 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) 与阿卡波糖 ($30.75 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 均可显著降低小肠黏膜 AG 活力 ($P < 0.01$, $P < 0.001$), 抑制率分别为 15.48% 和 53.91%。

5 SBLE 对 Caco-2 细胞葡萄糖摄取的影响

Caco-2 细胞是一种人源结肠癌细胞, 可分化产生刷状缘膜和基底外侧膜, 表达多种营养转运蛋白, 具有

Table 2 The effect of SBLE on AG in small intestinal mucosa of mice. $n = 7$, $\bar{x} \pm \text{SEM}$. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control

Group	AG/U·mg protein ⁻¹	Inhibition rate/%
Control	0.063 ± 0.002	—
SBLE ($1.5 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	$0.053 \pm 0.001^{**}$	15.48
Acarbose ($30.75 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	$0.029 \pm 0.000^{***}$	53.91

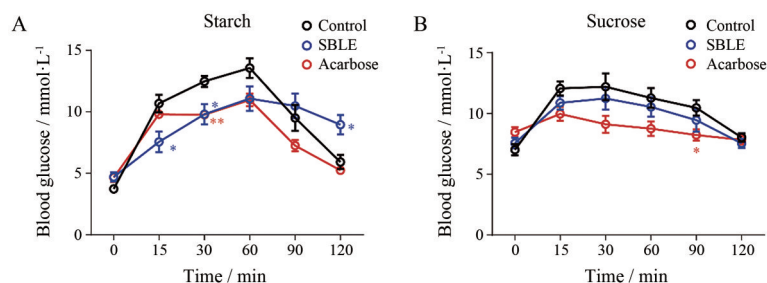


Figure 3 Effects of SBLE on carbohydrate tolerance test of normal mice. A: The time course of blood glucose after oral starch; B: The time course of blood glucose after oral sucrose. $n = 7$, $\bar{x} \pm \text{SEM}$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control

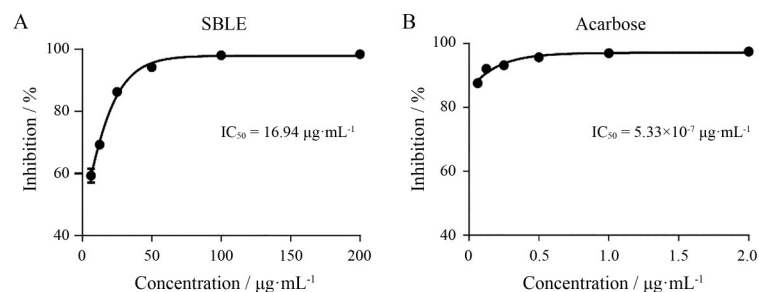


Figure 4 The effects of SBLE and acarbose on α -glucosidase (AG) *in vitro*. A: The inhibition curve of SBLE on AG ($n = 3$); B: The inhibition curve of acarbose on AG ($n = 3$). $\bar{x} \pm \text{SEM}$. IC_{50} : Half-maximal inhibitory concentration

类似小肠上皮的吸收特性, 被广泛用于模拟体内肠转运的研究, 因此进一步采用该细胞评估 SBLE 是否影响小肠对葡萄糖的吸收过程。首先采用 MTT 法评价不同剂量 SBLE 对 Caco-2 细胞活力的影响。结果如图 5A 所示, SBLE 给药浓度在 $6.25 \sim 100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的细胞存活率无显著改变。随后采用 25、50 和 $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 SBLE 探究其对 Caco-2 细胞吸收葡萄糖的影响, 通过荧光显微镜和流式细胞仪检测细胞内 2-NBDG (一种带有荧光标记的葡萄糖类似物) 的水平可表征细胞的葡萄糖的摄入量。荧光显微镜观察结果显示 (图 5B), 与对照组相比, SBLE 各剂量组均可不同程度地降低 Caco-2 细胞内 2-NBDG 的水平。进一步的流式细胞术检测结果 (图 5C、D) 也表明 SBLE 显著抑制了细胞对 2-NBDG 的摄取 ($P < 0.001$)。

6 SBLE 对 Caco-2 细胞 SGLT1 和 GLUT2 基因表达的影响

糖类物质在肠道中消化分解为葡萄糖后, 游离的葡萄糖需跨越肠道上皮进入循环系统, 这个过程主要包括 SGLT1 介导的主动转运与 GLUT2 介导的易化扩散。基于图 5 中发现 SBLE 对 Caco-2 细胞葡萄糖摄取具有一定的抑制效果, 采用 qPCR 技术进一步检测了 SGLT1 和 GLUT2 基因的表达。结果如图 6A、B 所示, SBLE 可显著降低 SGLT1 基因的表达水平 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 但对 GLUT2 基因无显著影响。

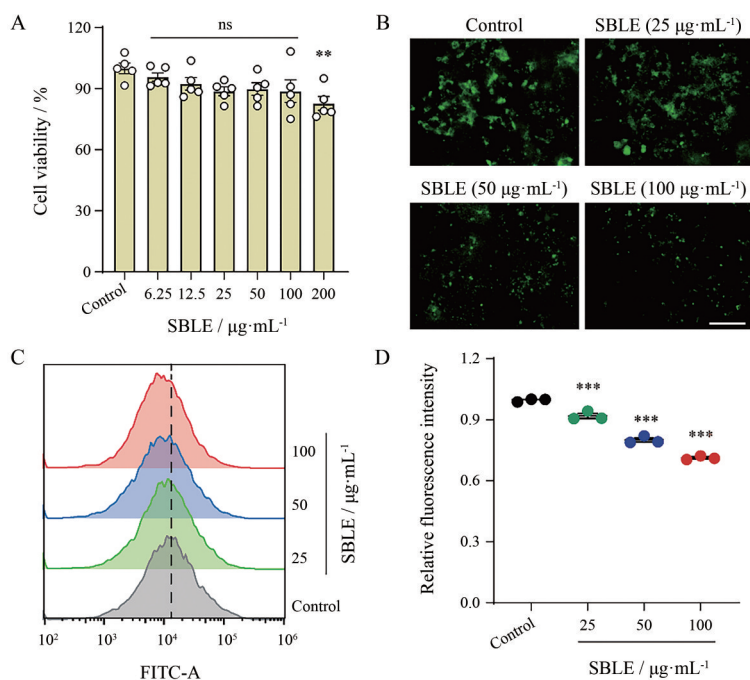


Figure 5 The effect of SBLE on glucose uptake by Caco-2 cells. A: The viability of Caco-2 cells ($n = 5$); B: The 2-(*N*-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl) amino)-2-deoxyglucose (2-NBDG) signal by fluorescence microscope ($n = 3$). Scale bar: 500 μm ; C, D: The intracellular 2-NBDG detected by cytometry ($n = 3$). $\bar{x} \pm \text{SEM}$. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; ns: Not significant vs control; FITC: Fluorescein isothiocyanate

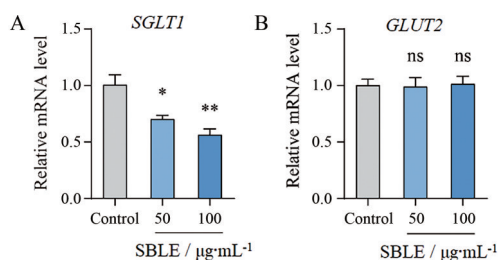


Figure 6 The effect of SBLE on the expressions of sodium-dependent glucose transporter 1 (*SGLT1*, A) and glucose transporter 2 (*GLUT2*, B) in Caco-2 cells. The mRNA levels were detected by real-time quantitative PCR (qPCR). β -Actin was set as the house-keeping gene. Gene expressions presented as fold changes relative to the control group ($n = 3$). $\bar{x} \pm \text{SEM}$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control

讨论

机体的糖吸收与代谢过程包括多种生物途径, 中药与天然植物提取物往往因富含多种活性成分, 其降血糖的机制也涉及多个方面^[18]。同样, 本研究发现 SBLE 不仅能通过抑制 AG 与小肠黏膜对葡萄糖的摄取来改善餐后血糖升高, 增加机体糖耐量; 还能降低 STZ 诱导 1 型糖尿病小鼠的 FBG, 提示 SBLE 对机体糖代谢也有潜在调控作用。

AG 是一类能催化水解 α -1,4-糖苷键的酶的总称, 广泛分布于小肠黏膜的刷状缘, 通过外切酶活性水解低聚糖非还原端的 α -葡萄糖糖基, 生成葡萄糖和果糖

等单糖, 其活性高低决定着碳水化合物在肠道内释放可吸收单糖的速率。因此, 抑制 AG 可降低餐后血糖水平, 是预防和治疗糖尿病及其并发症的经典策略^[19]。研究表明^[20], 沙棘叶甲醇提取物显示出对 AG 的体外抑制活性 (IC_{50} 为 $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$); 同时沙棘叶乙酸乙酯提取物和正丁醇提取物对 AG 同样具有较强抑制活性 (IC_{50} 分别为 46.89 和 $51.33 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)^[21]。本研究发现沙棘叶的乙醇提取物对 AG 的 IC_{50} 为 $16.94 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 这与不同溶剂和提取方式导致的提取成分不同有关, 提示在以沙棘叶为原料制备 AG 抑制剂时, 采用乙醇作为提取溶剂更好。近年来的研究表明天然植物中的黄酮类化合物对肠道 AG 具有较好的抑制活性^[22]。本研究发现 SBLE 中含有多种黄酮类物质, 包括山柰酚 (kaempferol) 及其衍生物山柰酚-3-*O*-芸香糖苷 (kaempferol-3-*O*-rutinoside) 等都是较好的 AG 抑制剂^[23,24]。此外, 研究表明沙棘叶总多酚也可抑制 AG^[25], SBLE 中的没食子酸与 pedunculagin 等多酚成分可能是其发挥活性的物质基础。同时本研究还证实了 SBLE 能降低小肠黏膜中的 AG 的活性, 因此 SBLE 能在体内有效抑制葡萄糖的释放, 进而缓解机体餐后血糖升高。此外, 沙棘叶作为新资源食品, 可开发为食品与保健品, 长期服用具有较好的安全性, 相较于阿卡波糖具有更为广泛的应用优势。

葡萄糖释放后在肠道的吸收分为 2 个阶段: ① 由

SGLT1 介导的主动转运, 运载葡萄糖进入肠上皮细胞; ② 位于肠上皮细胞基底外侧膜的 GLUT2 介导的易化扩散, 将葡萄糖从细胞内转运到门静脉系统^[26]。本研究提示 SBLE 对葡萄糖释放后的糖转运过程亦有干预作用, 并发现 SBLE 可显著降低 Caco-2 细胞 SGLT1 基因的水平, 但对 GLUT2 无显著影响。因此, SBLE 可能通过抑制肠道 AG 减少葡萄糖释放, 降低 SGLT1 的表达抑制其介导的葡萄糖转运, 两方面协同作用降低餐后血糖与提高机体糖耐量。

沙棘叶水提物可显著降低 STZ 诱导糖尿病大鼠的血糖水平^[7], 与本研究结果一致, SBLE 可降低 STZ 糖尿病小鼠 FBG, 改善小鼠生理状态, 提示 SBLE 有助于增强机体对葡萄糖的代谢。最新的一项研究发现^[27], SBLE 能促进细胞内 GLUT4 向细胞膜表面的转位, 有利于促进外周组织细胞摄入葡萄糖, 增强对葡萄糖的吸收利用。因此, 沙棘叶中或存在能发挥胰岛素样效应的活性成分, 进而对 1 型糖尿病发挥改善作用。沙棘叶中的科罗索酸是一种“植物胰岛素”, 同样能在哺乳动物体内发挥降糖活性^[28]。Zhang 等^[29]采用水-乙醇提取法制备的 SBLE, 其中科罗索酸含量高达 0.8%。

此外, 一些研究对沙棘叶中活性成分的降糖功能也进行了探索。沙棘叶黄酮显著延缓正常小鼠口服葡萄糖引起血糖升高, 其降糖活性可能归因于异鼠李素、槲皮素和山柰酚等活性物质^[30]。从沙棘叶中分离得到的白雀木醇也可促进胰岛素抵抗的 HepG2 细胞摄取葡萄糖, 对糖代谢紊乱有良好的调节作用^[31]。因此, SBLE 中蕴含的活性成分仍需进一步探索解析, 找寻活性更好的降糖成分。

作者贡献: 何蓉蓉和梁磊负责实验设计与指导; 闫昌誉进行体外实验与文章撰写; 丁肇俊进行动物实验与数据收集分析; 李晓敏与毛新亮负责背景调研与实验管理; 余宗盛、王志芳和叶健文协助实验与样品处理; 栗原博和李怡芳协助修改论文。

利益冲突: 所有作者均声明没有利益冲突。

References

- [1] Sun H, Saecedi P, Karuranga S, et al. IDF Diabetes Atlas: global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045 [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2022, 183: 109119.
- [2] Zheng Y, Ley SH, Hu FB. Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2018, 14: 88-98.
- [3] Osadebe PO, Odoh EU, Uzor PF. The search for new hypoglycemic agents from plants [J]. *Afr J Pharm Pharmacol*, 2014, 8: 292-303.
- [4] Yan CY, Yu GY, He XJ, et al. Research progress and industrial application of sea buckthorn leaves [J]. *Pharm Today (今日药)*, 2021, 31: 481-492.
- [5] Ciesarová Z, Murkovic M, Cejpek K, et al. Why is sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) so exceptional? A review [J]. *Food Res Int*, 2020, 133: 109170.
- [6] Pundir S, Garg P, Dwiwedi A, et al. Ethnomedicinal uses, phytochemistry and dermatological effects of *Hippophae rhamnoides* L.: a review [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 266: 113434.
- [7] Khajuria P, Raghuvanshi P, Rastogi A, et al. Ameliorating effect of seabuckthorn leaf extract supplementation on streptozotocin induced diabetes mellitus in Wistar rats [J]. *J Anim Res*, 2016, 6: 787.
- [8] Zhang L. The Experimental Study on Hypoglycemic Activity of Triterpenic Acids from Seabuckthorn Leaf (沙棘叶三萜酸粗提物降血糖活性实验研究) [D]. Taiyuan: Shanxi University, 2016.
- [9] Al-Sayed E, Singab AN, Ayoub N, et al. HPLC-PDA-ESI-MS/MS profiling and chemopreventive potential of *Eucalyptus gomphocephala* DC [J]. *Food Chem*, 2012, 133: 1017-1024.
- [10] Dong RF. The Quality Evaluation of *Hippophae rhamnoides* L. Leaves and Its Function Research of Antilipidemic and Antifatigue (沙棘叶品质评价及其降血脂抗疲劳作用研究) [D]. Shanghai: Shanghai Normal University, 2016.
- [11] Lu WG, Cao LM, Xu MH, et al. Chemical constituents from active components of semen plantaginis by stir-frying with wine on cure of retained fetal membranes in cows by LC-MS/MS [J]. *Chin J Vet Sci (中国兽医学报)*, 2020, 40: 1590-1597.
- [12] Singh A, Bajpai V, Kumar S, et al. Profiling of gallic and ellagic acid derivatives in different plant parts of *Terminalia arjuna* by HPLC-ESI-QTOF-MS/MS [J]. *Nat Prod Commun*, 2016, 11: 239-244.
- [13] Mullen W, Yokota T, Lean ME, et al. Analysis of ellagitannins and conjugates of ellagic acid and quercetin in raspberry fruits by LC-MSⁿ [J]. *Phytochemistry*, 2003, 64: 617-624.
- [14] Qin ZX, Zhang Y, Qi MD, et al. Rapid analysis of compounds in leaves of Chinese seabuckthorn and Tibetan seabuckthorn by UPLC/Q-TOF-MS [J]. *China J Chin Mater Med (中国中药杂志)*, 2016, 41: 1461-1468.
- [15] Karar MGE, Pletzer D, Jaiswal R, et al. Identification, characterization, isolation and activity against *Escherichia coli* of quince (*Cydonia oblonga*) fruit polyphenols [J]. *Food Res Int*, 2014, 65: 121-129.
- [16] Said RB, Rahali S, Aissa MAB, et al. Fingerprinting profile of flavonol glycosides from *Bassia eriophora* using negative electrospray ionization, computational studies and their antioxidant activities [J]. *J Mol Struct*, 2021, 1241: 130689.
- [17] Felipe DF, Brambilla LZ, Porto C, et al. Phytochemical analysis of *Pfaffia glomerata* inflorescences by LC-ESI-MS/MS [J]. *Molecules*, 2014, 19: 15720-15734.

- [18] Hui H, Tang G, Go VL. Hypoglycemic herbs and their action mechanisms [J]. Chin Med, 2009, 4: 11.
- [19] Kumar S, Narwal S, Kumar V, et al. α -Glucosidase inhibitors from plants: a natural approach to treat diabetes [J]. Pharmacogn Rev, 2011, 5: 19.
- [20] Bhardwaj P, Varshneya C, Kaistha K, et al. *In vitro* evaluation of antidiabetic and antioxidant activity of Seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaves [J]. J Med Plant Res, 2015, 9: 929-932.
- [21] Yuca H, Özbek H, Demirezer LÖ, et al. α -Glucosidase and α -amylase inhibitory potential of main compounds and drug candidates from *Elaeagnus rhamnoides* (L.) A. Nelson [J]. Chem Pap, 2022, 76: 913-922.
- [22] Şöhretoğlu D, Sari S. Flavonoids as alpha-glucosidase inhibitors: mechanistic approaches merged with enzyme kinetics and molecular modelling [J]. Phytochem Rev, 2020, 19: 1081-1092.
- [23] Peng X, Zhang G, Liao Y, et al. Inhibitory kinetics and mechanism of kaempferol on α -glucosidase [J]. Food Chem, 2016, 190: 207-215.
- [24] Habtemariam S. α -Glucosidase inhibitory activity of kaempferol-3-*O*-rutinoside [J]. Nat Prod Commun, 2011, 6: 201-203.
- [25] Kim JS, Kwon YS, Sa YJ, et al. Isolation and identification of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) phenolics with antioxidant activity and α -glucosidase inhibitory effect [J]. J Agric Food Chem, 2011, 59: 138-144.
- [26] Koepsell H. Glucose transporters in the small intestine in health and disease [J]. Pflugers Arch, 2020, 472: 1207-1248.
- [27] Ollinger N, Neuhauser C, Schwarzinger B, et al. Anti-hyperglycemic effects of oils and extracts derived from sea buckthorn - a comprehensive analysis utilizing *in vitro* and *in vivo* models [J]. Mol Nutr Food Res, 2022, 66: e2101133.
- [28] Qian XP, Zhang XH, Sun LN, et al. Corosolic acid and its structural analogs: a systematic review of their biological activities and underlying mechanism of action [J]. Phytomedicine, 2021, 91: 153696.
- [29] Zhang L, Tian XD, Wang B, et al. Method for determination of corosolic acid concentration in seabuckthorn leaf [J]. J Shanxi Agric Sci (山西农业科学), 2016, 44: 30-32.
- [30] Chen YL. Medicinal Ingredients in *Hippophae rhamnoides* L. and the Preliminary Study of Activity (沙棘药用成分的研究及其活性初步探讨) [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2017.
- [31] Mu Y, Tao C, Yuan W, et al. Sea buckthorn leaf *L*-quebrachitol extract for improved glucose and lipid metabolism in insulin resistant HepG2 cells [J]. BioResources, 2022, 17: 527.