

灵芝多糖及其菌群代谢产物对HepG2细胞胰岛素抵抗的改善作用及机制

刘世锋, 董文静, 杨 兰, 周佳丽, 刘东波

Improvement and Mechanism of *Ganoderma lucidum* Polysaccharides and Its Flora Metabolites on Insulin Resistance in HepG2 Cells

LIU Shifeng, DONG Wenjing, YANG Lan, ZHOU Jiali, and LIU Dongbo

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023020035>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

异鼠李素调控AKT-FOXO1通路改善胰岛素抵抗HepG2细胞糖代谢作用机制

The Mechanism of Isorhamnetin Regulating AKT-FOXO1 Pathways on Improve the Insulin Resistance Model of HepG2 Cells

食品工业科技. 2020, 41(23): 320-324 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020020179>

壳三糖胍盐酸盐对胰岛素抵抗细胞模型的改善作用

Improving Effect of Chitotriose Guanidine Hydrochloride on Insulin Resistance Cell Model

食品工业科技. 2021, 42(19): 350-356 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020100020>

菊粉复配灵芝多糖对2型糖尿病大鼠的降血糖作用

Hypoglycemic Effect of Inulin Combined with *Ganoderma lucidum* Polysaccharides on Type 2 Diabetes Mellitus Rats

食品工业科技. 2019, 40(20): 310-315,324 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.20.050>

紫色马铃薯花色苷改善HepG2细胞胰岛素抵抗模型糖代谢的机制

The mechanism of purple potato anthocyanins improve the insulin resistance model of HepG2 cells*

食品工业科技. 2018, 39(5): 319-324 <https://doi.org/>

豌豆肽缓解胰岛素抵抗形成效果探究

Effect of Pea Oligopeptides on Relieving Insulin Resistance

食品工业科技. 2019, 40(12): 145-148 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.12.024>

薯蓣粥对T2DM大鼠肠道微生物、血糖、胰岛素的影响

Effects of Yam Gruel on Gut Microflora, Blood Glucose and Insulin in T2DM Rats

食品工业科技. 2021, 42(14): 341-347 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020090192>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

刘世锋,董文静,杨兰,等.灵芝多糖及其菌群代谢产物对 HepG2 细胞胰岛素抵抗的改善作用及机制 [J].食品工业科技,2023,44(23):314–321. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023020035

LIU Shifeng, DONG Wenjing, YANG Lan, et al. Improvement and Mechanism of *Ganoderma lucidum* Polysaccharides and Its Flora Metabolites on Insulin Resistance in HepG2 Cells[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(23): 314–321. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023020035

· 营养与保健 ·

灵芝多糖及其菌群代谢产物对 HepG2 细胞胰岛素抵抗的改善作用及机制

刘世锋^{1,2},董文静^{1,2},杨 兰^{1,2,3},周佳丽^{1,2},刘东波^{1,2,*}

(1.湖南农业大学园艺学院,湖南长沙 410128;

2.国家中医药管理局亚健康干预技术实验室,湖南长沙 410128;

3.川北医学院,四川南充 637000)

摘要:目的:探讨灵芝多糖及其菌群代谢产物对 HepG2 细胞胰岛素抵抗状态的影响及其作用机制。方法:以胰岛素 (10^{-3} $\mu\text{mol/L}$) 和地塞米松 (10 $\mu\text{mol/L}$) 联合建立 HepG2 细胞胰岛素抵抗模型 (insulin resistant HepG2, IR-HepG2); 使用 CCK-8 法评价灵芝多糖 (*Ganoderma lucidum* polysaccharides, GLP) 和灵芝多糖肠道菌群代谢物 (*Ganoderma lucidum* polysaccharide flora metabolite, GLP-F) 的细胞毒性; 使用葡萄糖试剂盒、糖原试剂盒法评价 GLP 和 GLP-F 对 IR-HepG2 细胞葡萄糖消耗及糖原合成的影响; 使用 Western blot 法检测了 GLP 与 GLP-F 对 IR-HepG2 细胞胰岛素信号级联中的关键蛋白 IRS-1、AKT、GSK-3 β 、GLUT2、以及 PEPCK 的磷酸化或表达量的影响。结果:GLP 和 GLP-F 均能显著增加 IR-HepG2 细胞的葡萄糖摄取量及糖原合成量 ($P<0.05$), 且 GLP-F 对 IR-HepG2 细胞葡萄糖消耗促进作用显著高于 GLP ($P<0.05$); Western blot 实验显示, GLP 和 GLP-F 均能促进 IR-HepG2 细胞 IRS-1、P-AKT、P-GSK-3 β 、GLUT2 蛋白的表达, 抑制 PEPCK 蛋白的表达, 且 GLP-F 对 PEPCK 的抑制效用显著高于 GLP ($P<0.05$)。结论:GLP 与其在肠道菌群的介导下代谢产生的 GLP-F 具有同样的缓解肝脏胰岛素抵抗的生物学作用, 并且在促进 IR-HepG2 细胞葡萄糖消耗以及抑制其糖异生限速酶活性方面, GLP-F 比 GLP 具有更加显著的效果。

关键词:2 型糖尿病,胰岛素抵抗,灵芝多糖,灵芝多糖肠道菌群代谢物,胰岛素信号级联

中图分类号:TS201.4

文献标识码:A

文章编号:1002-0306(2023)23-0314-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023020035



本文网刊:

Improvement and Mechanism of *Ganoderma lucidum* Polysaccharides and Its Flora Metabolites on Insulin Resistance in HepG2 Cells

LIU Shifeng^{1,2}, DONG Wenjing^{1,2}, YANG Lan^{1,2,3}, ZHOU Jiali^{1,2}, LIU Dongbo^{1,2,*}

(1.College of Horticulture and Landscape, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China;

2.State Key Laboratory of Subhealth Intervention Technology, Changsha 410128, China;

3.North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, China)

Abstract: Objective: To investigate the effects of *Ganoderma lucidum* polysaccharides and its flora metabolites on the insulin resistance status of HepG2 cells and its mechanisms. Methods: Insulin resistant HepG2 (IR-HepG2) model was established with the combination of insulin (10^{-3} $\mu\text{mol/L}$) and dexamethasone (10 $\mu\text{mol/L}$). The cytotoxicity of *Ganoderma lucidum* polysaccharides (GLP) and *Ganoderma lucidum* polysaccharide flora metabolite (GLP-F) was evaluated using the CCK-8 method. The effects of GLP and GLP-F on glucose consumption and glycogen synthesis in IR-HepG2 cells were

收稿日期: 2023-02-09

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81773850); 湖南省科技重大专项 (2017SK1020)。

作者简介: 刘世锋 (1999-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 功能产品开发与评价研究, E-mail: sfliu2021@163.com。

* 通信作者: 刘东波 (1970-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 功能产品开发与评价研究, E-mail: chinasaga@163.com。

evaluated using the glucose kit and glycogen kit methods. Western blot assay was used to detect the effects of GLP and GLP-F on the phosphorylation or expression of IRS-1, AKT, GSK-3 β , GLUT2, and PEPCK, key proteins in the insulin signaling cascade in IR-HepG2 cells. Results: Both GLP and GLP-F significantly increased glucose uptake and glycogen synthesis in IR-HepG2 cells ($P<0.05$). GLP-F promoted glucose consumption in IR-HepG2 cells significantly more than GLP ($P<0.05$). Western blot experiments showed that both GLP and GLP-F promoted IR-HepG2 cells IRS-1, P-AKT, P-GSK-3 β , GLUT2 protein expression and inhibited PEPCK protein expression, and the inhibitory utility of GLP-F on PEPCK was significantly higher than that of GLP ($P<0.05$). Conclusions: GLP and its metabolism by intestinal flora-mediated production of GLP-F have the same biological effect of alleviating hepatic insulin resistance, and GLP-F has a more significant effect than GLP in promoting glucose consumption in IR-HepG2 cells and inhibiting their gluconeogenic rate-limiting enzyme activity.

Key words: T2DM; insulin resistance; *Ganoderma lucidum* polysaccharides; *Ganoderma lucidum* polysaccharide flora metabolite; insulin signaling cascade

糖尿病是一种以糖脂代谢紊乱为标志的慢性内分泌疾病,其发病受遗传及环境等因素综合影响^[1]。2 型糖尿病是糖尿病分类中发病率最高、患病人数最多的一个分型,占糖尿病患病人群总数的 90% 以上^[2]。持续的高血糖是糖尿病的主要特征,长期的高血糖会引起心脑血管、肾、眼、足及神经等病变,并引发酮症酸中毒、乳酸性酸中毒等急性并发症,甚至威胁生命^[3-4]。2 型糖尿病患者中,组织细胞产生胰岛素抵抗是机体发生高血糖的主要诱因,85% 的 2 型糖尿病患者存在明显的胰岛素抵抗,胰岛素抵抗贯穿 2 型糖尿病发生发展的全过程^[5]。

肝脏作为糖脂代谢的中枢,在 2 型糖尿病的发生发展中起到至关重要的作用^[6]。正常生理状态下,肝脏处胰岛素浓度足够调节肝脏细胞的糖代谢途径,促进肝脏细胞摄取葡萄糖、加速肝糖原的合成,维持血糖稳态^[7];当肝脏细胞对胰岛素信号敏感性下降,肝脏发生胰岛素抵抗时,胞内胰岛素信号级联受抑制,蛋白激酶 B (protein kinase B, AKT/PKB) 介导的转录因子叉头盒蛋白 O1 (forkhead box protein O1, FoxO1) 磷酸化失活水平降低^[8],使依赖于 FoxO1 的糖异生限速酶磷酸烯醇丙酮酸羧激酶 (phosphoenolpyruvate carboxy kinase, PEPCK) 水平上调^[9],糖异生作用过度激活,造成高血糖。胰岛素对肝脏细胞糖代谢调控能力减弱,肝脏细胞糖异生过度激活、糖原合成受阻、糖脂代谢紊乱。现有的肝脏胰岛素抵抗靶向治疗药物主要通过影响肝脏细胞的葡萄糖转运、糖异生及糖酵解等方面来调节肝脏糖脂代谢,包括钠-葡萄糖协同转运蛋白 (sodium-glucose cotransporter, SGLT) 抑制剂、糖原磷酸化酶 (glycogen phosphorylase, GP) 抑制剂、葡萄糖激酶 (glucokinase, GK) 激活剂、肝脏糖异生抑制剂等^[10-12]。

灵芝 (*Ganoderma lucidum* Karst) 是我国传统的食药两用真菌,具有调节糖脂代谢、抗炎、抗氧化、调节免疫等药理作用^[13]。灵芝多糖 (*Ganoderma lucidum* polysaccharides, GLP) 是灵芝的关键药效成分之一,是其改善糖脂代谢的主要有效成分;灵芝多糖可通过提高胰岛素敏感性^[14]、调控葡萄糖代谢酶活性^[15]、抑制胰岛 β 细胞凋亡^[16] 等多途径缓解胰岛素抵抗,

从而维持血糖的稳定。体外模拟消化研究发现,大分子碳水化合物难以在人体消化酶系统的单独加持下代谢为人体易吸收的寡糖或单糖^[17],其大多数都是在结肠部经微生物菌群代谢酵解。微生物在代谢的过程中会生成一系列的代谢产物,如乙酸、丙酸和丁酸等短链脂肪酸 (short-chain fatty acid, SCFAs)^[18];而乙酸、丙酸和丁酸则可以通过调节糖脂代谢,改善机体生理功能^[19-23]。在以往的研究中,多糖的菌群代谢产物已经表现出了其绝佳的生物活性;Lin 等^[24] 研究发现,亚麻籽多糖经肠道微生物酵解的代谢产物能够通过下调 GLUT2、SGLT、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferators-activated receptor γ , PPAR γ) 和增强子结合蛋白 (CCAAT-enhancer-binding proteins, C/EBP) 的 mRNA 及蛋白表达水平,改善机体糖脂代谢水平。而灵芝多糖经肠道微生物代谢后的生物活性变化目前尚不可知。本试验使用 HepG2 细胞构建肝脏胰岛素抵抗模型,并使用该模型来评价微生物酵解前后的灵芝多糖对肝脏胰岛素抵抗的作用,系统地深入阐明其具体机制;以期为解释灵芝多糖缓解 2 型糖尿病的胰岛素抵抗提供新思路和理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

HepG2 人肝癌细胞 由湖南农业大学国家中医药管理局亚健康干预实验室提供;湘赤芝壹号子实体购自长沙九峰生物科技有限公司,经湖南农业大学园艺学院刘东波教授鉴定为湘赤芝壹号 *G. lucidum* Xiangchizhi No.1 干燥子实体);苯酚、浓硫酸、酒石酸钾钠、3,5 二硝基水杨酸、无水硫酸钠、氢氧化钠、无水乙醇、香草醛、冰乙酸、高氯酸、乙酸乙酯、磷酸、盐酸 国药集团化学试剂北京有限公司;葡萄糖、熊果酸、牛血清白蛋白 绿叶生物科技有限公司;胰岛素、地塞米松 Invitrogen; FBS Biological Industries, BI; DMEM 培养基、0.25% Trypsin-EDTA、Pen Strep Gibco; DMSO、糖原合成试剂盒 Solarbio; CCK-8 试剂盒、考马斯亮蓝 G-250、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、细胞膜蛋白、细胞浆蛋白抽提试剂盒 (Beyotime)、葡萄糖氧化酶法测定试剂盒 南京

建成生物工程研究所; GAPDH(CST)、Recombinant mAb to IRS1 antibody(abcam, GR98847-22)、AKT Rabbit Polyclonal antibody(Proteintech, 10176-2-AP)、Phospho-Akt(Ser473) Mouse Monoclonal antibody(Proteintech, 66444-1-Ig)、GSK3 β Rabbit Polyclonal antibody(Proteintech, 22104-1-AP)、Phospho-GSK3 β (Ser389) Rabbit、Polyclonal antibody(Proteintech, 14850-1-AP)、PEPCK(Proteintech)、GLUT2 Monoclonal antibody(Proteintech, 66889-1-Ig)、HRP 标记山羊抗兔 IgG(H+L)(Beyotime, A0208)、HRP 标记山羊抗小鼠 IgG(H+L)(Beyotime, A0192)、Immobilon Western HRP 底物 默克生物科技有限公司。

SHZ-D(Ⅲ)循环水真空泵、LC-RE-52A 旋转蒸发器 上海保玲仪器设备有限公司; ST-16R 高速冷冻离心机、A2 超净工作台、IBright FL1500 多色荧光成像系统 Thermo Fisher Scientific; ME54E/02 电子天平、XS205 专业型分析天平 Mettler-Toledo 公司; 3503-2 无菌培养箱 美国 Shel-lab; AE2000 光学显微镜 Motic 公司; Spark 多功能酶标仪 瑞士 TECAN; LDZX-75KBS 立式压力蒸汽灭菌锅 上海申安医疗器械厂; S210 pH 计 Mettler Toledo; BV-3 蛋白垂直电泳仪 上海天能科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 灵芝多糖提取纯化 GLP 提取参考文献 [18], 以 2 kg 湘赤芝壹号子实体为原料, 以 1:10 的料液比 100 ℃ 蒸馏水浸提 1 h, 重复 3 次并真空抽滤, 滤液合并, 55 ℃ 减压浓缩为原体积的五分之一; 加入乙醇至终浓度为 75%, 4 ℃ 过夜, 高速离心机 7500 r/min 离心 20 min 获得多糖沉淀物; 所得沉淀使用少量蒸馏水溶解, 采用 Sevage 法脱蛋白; 将脱蛋白多糖溶液置于透析袋(3500 Da)中透析过夜以去除小分子物质; 将获得的多糖溶液 55 ℃ 减压浓缩并冷冻干燥获得灵芝多糖样品。前期研究发现, 该灵芝多糖的平均分子量为 133.1 kDa, 主要由葡萄糖、半乳糖、甘露糖、焦糖、木糖、葡萄糖胺和葡萄糖醛酸组成, 摩尔比为 58.97:17.54:8.63:2.79:2.02:1.13:6.77^[18]。

1.2.2 灵芝多糖体外模拟结肠酵解 灵芝多糖肠道菌群代谢物 (*Ganoderma lucidum* polysaccharide flora metabolite, GLP-F)由所提取灵芝多糖经过体外模拟结肠厌氧发酵获得; 具体过程参考 Liu 等^[21]的方法进行, 分别取 3 名 3 月内没有服用任何抗生素的健康志愿者新鲜粪便 12.5 g 于 250 mL PBS 中匀浆、离心取上清。将灵芝多糖溶液和配制好的酵解培养基与菌液以 5 g:250 mL:250 mL 的比例混匀, 在 Forma 厌氧系统中进行体外模拟酵解, 48 h 停止酵解, 迅速采集样品, 以 0.22 μ m 微孔滤膜过滤, 滤过液-80 ℃ 冷冻保存, 用于后续机制研究。

1.2.3 灵芝多糖及酵解产物主要理化表征测定 主要理化表征包括多糖、还原糖、三萜及蛋白质的含量测定。总糖含量采用苯酚-硫酸法^[25]进行测定, 以葡

萄糖质量浓度(mg/mL)为横坐标, 吸光度值 A 为纵坐标, 于 490 nm 处测定吸光值, 绘制葡萄糖标准曲线, 得回归方程为 $y=5.1417x+0.0036$, $R^2=0.9977$ 。二硝基水杨酸法^[26]测定还原糖含量, 以葡萄糖质量浓度(mg/mL)为横坐标, 吸光度值 A 为纵坐标, 于 540 nm 处测定吸光值, 绘制葡萄糖标准曲线, 得回归方程为 $y=6.7698x-0.0143$, $R^2=0.9962$ 。香草醛-熊果酸-高氯酸法^[27]测定三萜含量, 以熊果酸质量(mg)为横坐标, 吸光度值 A 为纵坐标, 于 542 nm 处测定吸光值, 绘制熊果酸标准曲线, 得回归方程为 $y=3.5463x-0.015$, $R^2=0.9945$ 。考马斯亮蓝法^[28]测定蛋白质含量, 以牛血清白蛋白浓度(mg/mL)为横坐标, 吸光度值 A 为纵坐标, 于 595 nm 处测定吸光值, 绘制标准曲线, 得回归方程为 $y=2.7847x+0.0038$, $R^2=0.9991$ 。

1.2.4 GLP 和 GLP-F 对 HepG2 细胞毒性与增殖的影响测定 将 HepG2 细胞以 1.5×10^4 个/mL 浓度接种于 96 孔板中, 每孔 100 μ L。待细胞贴壁后移除上清液换用无血清的 DMEM 高糖培养基饥饿处理 12 h, 饥饿完成后随机分为对照组(Control, CON)、模型组(Model, M)、GLP 组和 GLP-F 组; 将 CON 组培养基换成 DMEM 完全培养基, M 组及 GLP 和 GLP-F 组培养基置换成含 Ins+Dex(Insulin+Dexamethasone)($10^{-3}+10$) μ mol/L 的 DMEM 完全培养基, 继续培养 24 h^[29]; 诱导 HepG2 细胞成为 IR-HepG2 细胞后, 吸取上清, 100 μ L PBS 缓冲溶液清洗 2 次。CON 组和 M 组分别加入 100 μ L DMEM 完全培养基继续培养 24 h, GLP 和 GLP-F 组分别加入 100 μ L 含 250、500、750、1000 μ g/mL GLP 和 GLP-F、以及 50、100、200、400 μ g/mL GLP 和 GLP-F 的 DMEM 完全培养基干预 24 h。24 h 后, 吸取细胞上清液, 各孔加 100 μ L 10% CCK-8 检测液, 37 ℃、5% CO₂ 培养箱继续培养 2 h 后, 酶标仪 490 nm 处检测吸光值, 计算各组细胞生长情况^[30], 考察不同浓度灵芝多糖及其菌群代谢物对细胞毒性与增殖的影响。

1.2.5 GLP 和 GLP-F 对 HepG2 细胞葡萄糖消耗量的影响测定 依据 1.2.4 得出 GLP 和 GLP-F 干预 IR-HepG2 细胞作用浓度范围, 设定适宜浓度梯度进行后续试验。CON 组和 M 组分别加 100 μ L DMEM 完全培养基继续培养 24 h, GLP 和 GLP-F 组分别加入 100 μ L 含 0、50、100、200、400 μ g/mL GLP 和 GLP-F 的 DMEM 完全培养基干预 24 h, 依据分组吸取上清至离心管, 按照葡萄糖氧化酶法检测试剂盒详细步骤操作, 37 ℃ 培养箱反应 10 min 后, 酶标仪 505 nm 处检测吸光值, 计算葡萄糖消耗量^[31]。

1.2.6 GLP 和 GLP-F 对 HepG2 细胞糖原含量的影响测定 调整细胞浓度为 1.5×10^5 个/mL, 接种于 6 孔板中, 每孔 2 mL, 进行胰岛素抵抗模型的建立、给药干预方法同 1.2.4。干预 24 h 后, 移除旧培养基, PBS 重复清洗 2~3 次, 每孔加入适量胰酶进行消化, 待细胞微微变圆, 吸去胰酶, 加入 1 mL PBS 缓冲

液重悬,将细胞悬液移至 1.5 mL 离心管,以 1000 r/min,离心 15 min,弃上清液,加入 300 μ L PBS 缓冲液,混匀并进行匀浆。加入 0.75 mL 糖原提取液,冰水浴条件下超声破碎(300 W, 3~5 s/次,间隙 10 s,重复 30 次),使细胞充分破碎,取超声破碎后的细胞悬液按照 BCA 总蛋白定量试剂盒说明书测定总蛋白含量。其余部分采用糖原测定试剂盒检测糖原合成量。

1.2.7 Western blot 蛋白免疫印迹检测胰岛素信号通路蛋白表达 生长状况良好的细胞消化铺板至 6 孔板,胰岛素抵抗模型构建与药物干预方法同 1.2.4。干预完成后,每孔加入 100 μ L 2% SDS 裂解液,枪头顺时针搅动提取各组细胞总蛋白;取部分样品利用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度,确定蛋白免疫印迹上样量;其余部分加入 5 $\times$ 上样缓冲液 95 $^{\circ}$ C 金属浴 10 min 使蛋白变性,作为蛋白免疫印迹检测供试样品。以 GAPDH 为内参,检测 IRS-1、P-AKT/AKT、P-GS3K β /GS3K β 、PEPCK、GLUT2 的蛋白表达量^[32]。取等量蛋白样品进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,后转至 PVDF 膜。5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h,加入一抗,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。弃去残液,清洗后对应加入 HRP 标记的山羊抗兔/抗小鼠二抗,室温孵育 1 h。滴加 ECL 于化学发光成像分析系统曝光显影。Image J 软件对蛋白条带进行定量分析。

1.3 数据处理

所有数据均表示为平均值 $\pm$ 平均值的标准误差 (SEM)。采用单因素方差分析(ANOVA)评估统计学意义,以确定每组之间的显著差异。 $P<0.05$ 被认为有显著性差异。

2 结果与分析

2.1 灵芝多糖的得率及 GLP 和 GLP-F 物质组分差异

2 kg 灵芝子实体经提取纯化等流程后,共获得 17.138 g 灵芝多糖,得率为 0.8569%;GLP 和 GLP-F 物质组分差异如表 1 所示,灵芝多糖样品(GLP)中总糖含量为 64.84% $\pm$ 1.96%,还原糖含量为 6.14% $\pm$ 0.004%,三萜含量为 0.53% $\pm$ 0.02%,蛋白含量为 5.51% $\pm$ 0.04%。灵芝多糖经菌群代谢所生成产物中总糖含量下降至 15.48% $\pm$ 0.03%($P<0.01$);还原糖含量降低为 1.43% $\pm$ 0.03%($P<0.01$),三萜含量为 0.55% $\pm$ 0.03%,蛋白含量为 5.56% $\pm$ 0.26%。

表 1 GLP 和 GLP-F 基本组成成分分析 (n=3)				
Table 1 Basic component analysis of GLP and GLP-F (n=3)				
样品	总糖含量 (%)	还原糖含量 (%)	三萜含量 (%)	蛋白质含量 (%)
GLP	64.84 $\pm$ 1.96	6.14 $\pm$ 0.004	0.53 $\pm$ 0.02	5.51 $\pm$ 0.04
GLP-F	15.48 $\pm$ 0.03**	1.43 $\pm$ 0.03**	0.55 $\pm$ 0.03	5.56 $\pm$ 0.26

注: **表示该组分在GLP与GLP-F之间有显著性差异($P<0.01$)。

2.2 GLP 和 GLP-F 对细胞活力的影响

本实验使用胰岛素+地塞米松(Ins+Dex(10^{-3} +10)

10) μ mol/L)诱导 HepG2 细胞建立胰岛素抵抗细胞模型(IR-HepG2),并在此模型基础上研究 GLP 和 GLP-F 对胰岛素抵抗模型的作用。如图 1 所示,Ins+Dex(10^{-3} +10) μ mol/L 不影响细胞活力;但随着 GLP 和 GLP-F 的浓度升高(500~1000 μ g/mL)HepG2 细胞活力逐渐降低,当 GLP 和 GLP-F 浓度分别为(GLP 500、750、1000 μ g/mL;GLP-F 500、750、1000 μ g/mL)时,细胞活力与 CON 组以及 M 组相比显著下降($P<0.05$);随后,测试了 GLP 和 GLP-F(50~400) μ g/mL 对细胞活力的影响,发现(50~400) μ g/mL 的 GLP 与 GLP-F 均未显著影响细胞活力($P>0.05$)。

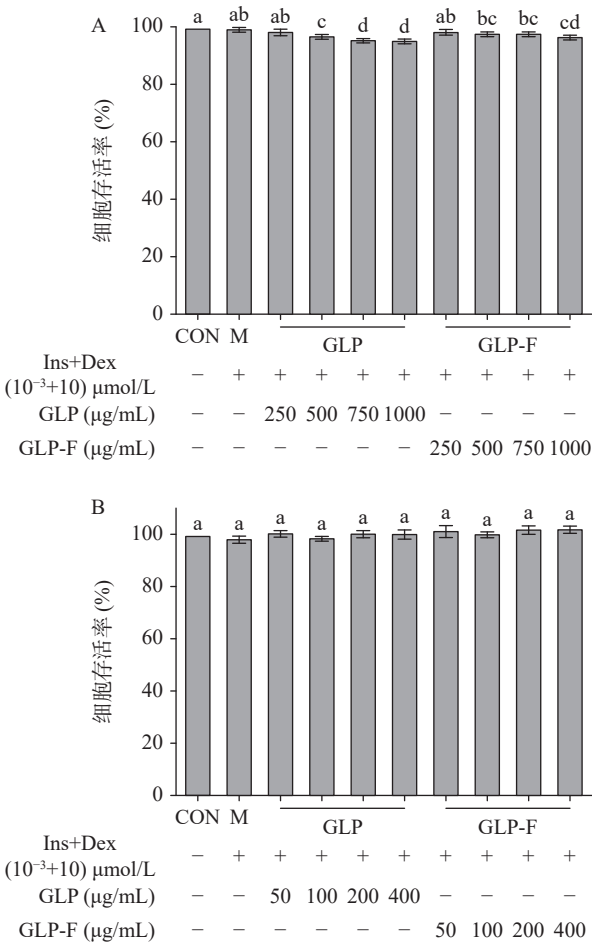


图 1 GLP 和 GLP-F 对 HepG2 细胞活力的影响(n=3)
Fig.1 The effect of GLP and GLP-F on the viability of HepG2 cells (n=3)

注: A: GLP 和 GLP-F 250~1000 μ g/mL 对 HepG2 细胞活力的影响; B: GLP 和 GLP-F 50~400 μ g/mL 对 HepG2 细胞活力的影响; 小写字母不同表示不同处理组之间差异显著($P<0.05$),图 2~图 4 同。

2.3 GLP 和 GLP-F 对葡萄糖消耗量的影响

分别使用不同质量浓度(50、100、200、400 μ g/mL)的 GLP 和 GLP-F 干预 Ins+Dex(10^{-3} +10) μ mol/L 处理后的 IR-HepG2 细胞。如图 2 所示,IR-HepG2 细胞葡萄糖消耗量显著降低($P<0.05$);经 GLP 和 GLP-F 处理后,IR-HepG2 细胞葡萄糖消耗量显著上升($P<0.05$);GLP 和 GLP-F 组细胞均在 400 μ g/mL 有最大葡萄糖消耗量(15.80 $\pm$ 2.15、17.66 $\pm$ 1.28 mmol/L),且

GLP-F 组显著高于 GLP 组($P<0.05$)。当细胞发生胰岛素抵抗时,细胞对胰岛素的敏感度降低,胰岛素信号转导受限,导致细胞对葡萄糖的摄取量降低;(100~400 $\mu\text{g/mL}$)的 GLP-F 促进葡萄糖消耗显著优于同浓度的 GLP, GLP 的微生物发酵促进了其改善胰岛素抵抗的功能。

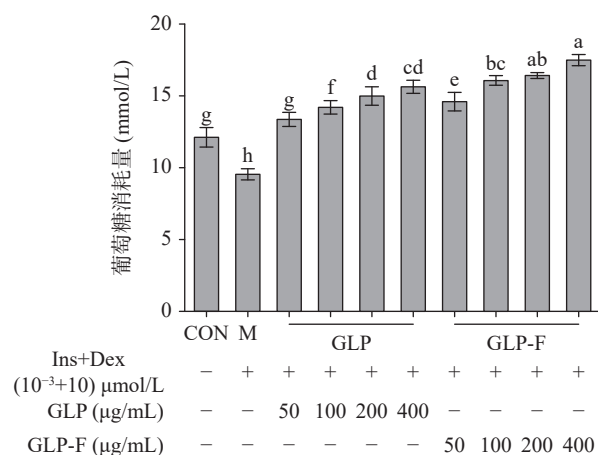


图2 GLP 和 GLP-F 对 IR-HepG2 细胞葡萄糖消耗量的影响 ($n=6$)

Fig.2 The effect of GLP and GLP-F on glucose consumption of IR-HepG2 cells ($n=6$)

2.4 GLP 和 GLP-F 对糖原合成的影响

肝糖原是肝脏细胞储存葡萄糖的主要形式,其合成水平受胰岛素信号级联调控,当人体细胞产生胰岛素抵抗时,糖原合成受抑制,糖原合成量降低。结果如图3所示,IR-HepG2 细胞糖原合成量显著低于 CON 组($P<0.05$);经不同质量浓度的 GLP 和 GLP-F 处理后,IR-HepG2 细胞糖原合成水平显著恢复($P<0.05$),且 GLP 和 GLP-F (200、400 $\mu\text{g/mL}$)处理组糖原合成水平显著高于 CON 组($P<0.05$),GLP 和 GLP-F 均表现出高浓度(200、400 $\mu\text{g/mL}$)促进肝细胞糖原合成的作用。

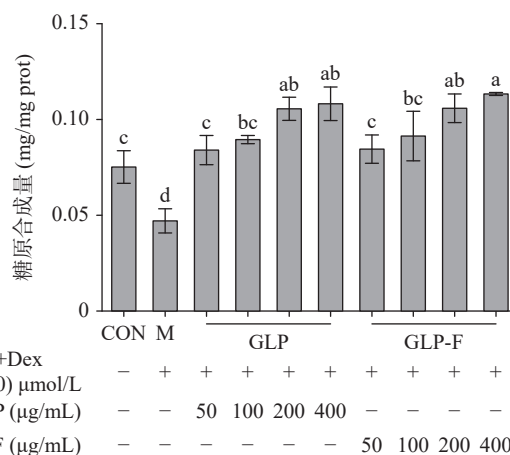


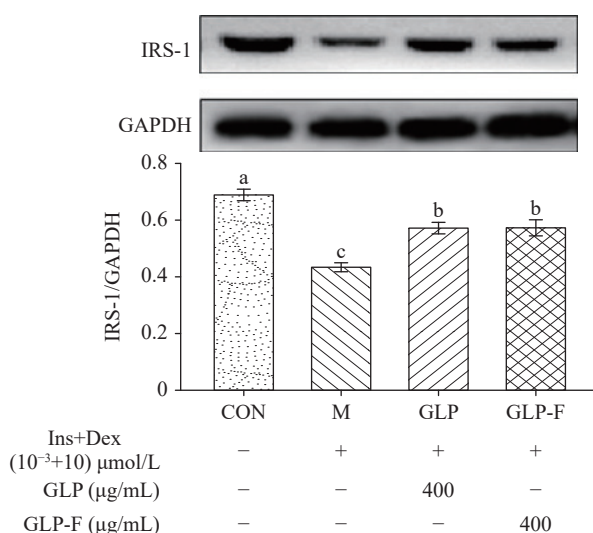
图3 GLP 和 GLP-F 对 IR-HepG2 细胞糖原合成的影响 ($n=3$)

Fig.3 The effect of GLP and GLP-F on glycogen synthesis of IR-HepG2 cells ($n=3$)

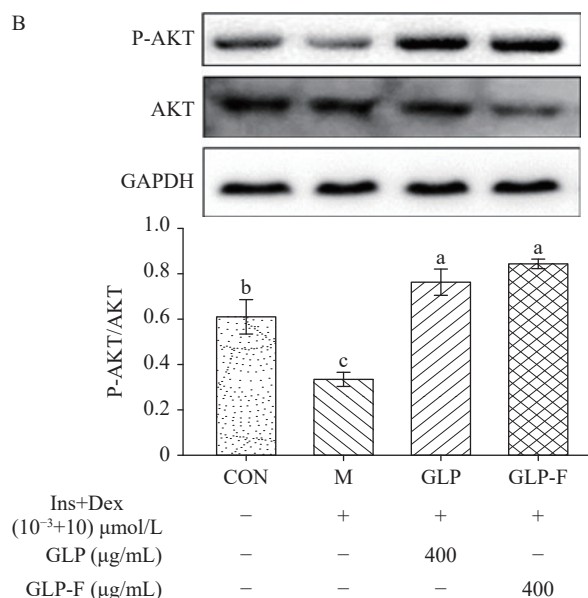
2.5 GLP 和 GLP-F 对胰岛素信号级联关键蛋白的影响

实验发现(图4),与 CON 组相比,Ins+Dex 处理后的 IR-HepG2 细胞 IRS-1 表达量极显著降低了 36.715%($P<0.01$)、P-AKT/AKT 极显著降低了 44.62%($P<0.01$)、PEPCK 极显著升高了 23.60%($P<0.01$)、P-GSK-3 β /GSK-3 β 及 GLUT2 分别极显著降低了 23.90%、37.07%($P<0.01$);经 GLP 和 GLP-F 400 $\mu\text{g/mL}$ 干预后,其蛋白水平与模型组相比,IRS-1、P-AKT/AKT、PEPCK、P-GSK-3 β /GSK-3 β 、GLUT2 水平分别改变了(+31.58%、+31.81%)、(+125.09%、+148.88%)、(-31.83%、-51.59%)、(+59.40%、+80.71%)、(+40.04%、+43.54%),经过干预后这些蛋白的水平与 M 组相比均具有显著性差异($P<0.01$);其中,GLP-F 对糖异生关键限速酶 PEPCK 的蛋白表达水平抑制极显著高于 GLP($P<0.01$);GLP 经微生物代谢后的产物 GLP-F 对 IR-HepG2 细胞糖异生途径的抑制作用强于 GLP, GLP-F 对缓解肝脏细胞胰岛素抵抗具有比 GLP 更强的效用。

A



B



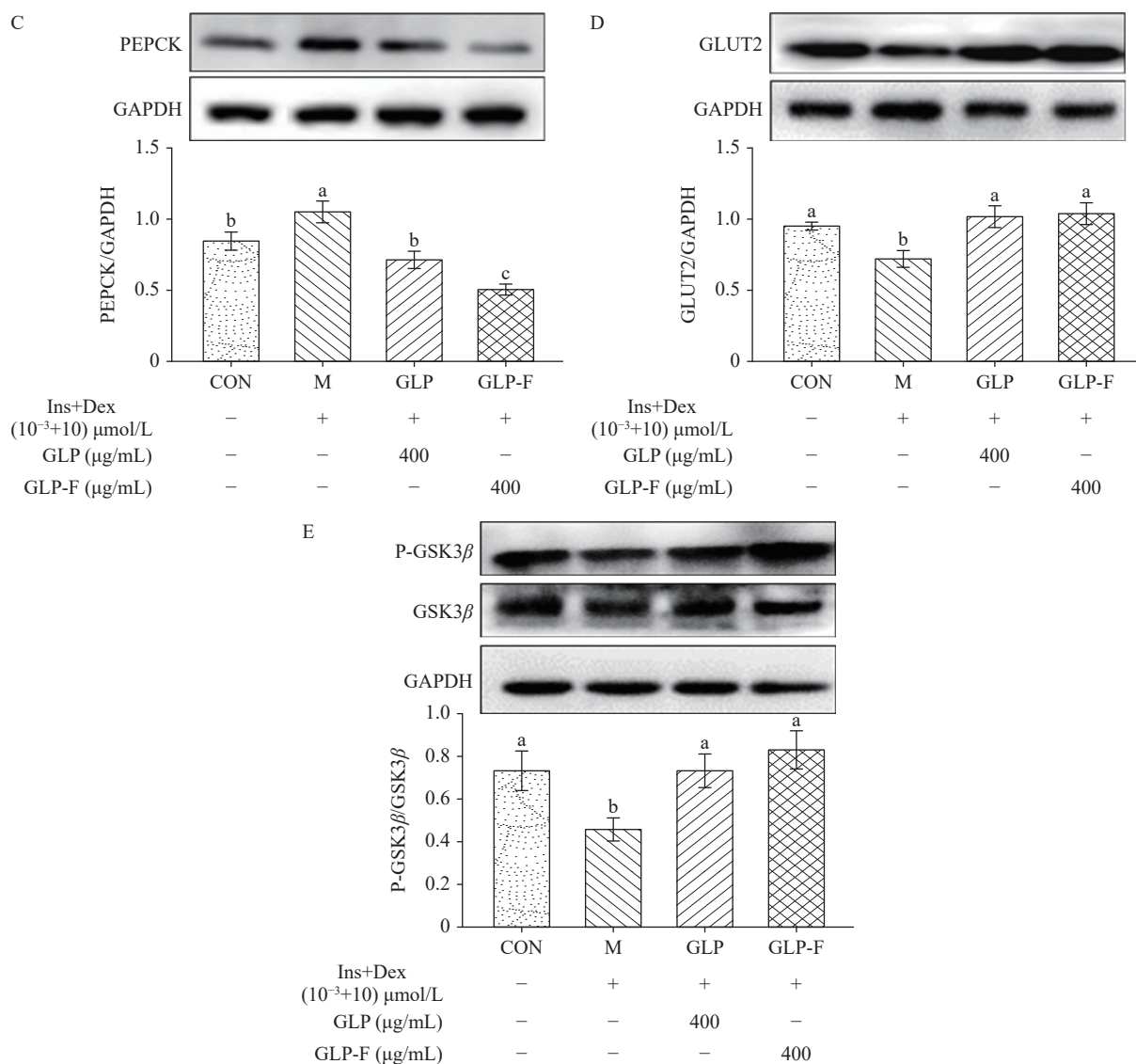


图 4 GLP 和 GLP-F 对 IR-HepG2 细胞胰岛素信号级联的影响(n=3)

Fig.4 Effect of GLP and GLP-F on insulin signaling cascade of IR-HepG2 cells (n=3)

3 讨论

肝脏作为胰岛素的主要靶器官,是调节体内血糖稳态的重要中枢^[33];当肝脏细胞受到内源性或外源性信号的刺激,胰岛素信号级联出现异常,胰岛素不能正常调节其糖原合成、糖异生等糖脂代谢途径,引发肝脏胰岛素抵抗^[34-35]。使用胰岛素+地塞米松(Ins+Dex(10⁻³+10)μmol/L)诱导人肝癌细胞 HepG2 细胞 24 h 后, HepG2 细胞葡萄糖消耗量以及糖原合成量显著降低($P<0.05$),表现出了明显的胰岛素抵抗表型(IR-HepG2)。而 GLP 和 GLP-F 以剂量依赖的形式恢复了 Ins+Dex 对 HepG2 细胞造成的葡萄糖消耗和糖原合成的抑制(图 2、图 3), GLP 和 GLP-F 表现出了显著的缓解胰岛素抵抗的效用。在以往的研究中, GLP 也表现出了缓解胰岛素抵抗的活性^[9,36-37]; Shao 等^[36]在高脂饮食(HFD)和链脲佐菌素(STZ)诱导的糖尿病小鼠实验中发现, GLP 能够降低糖尿病小鼠的血糖水平、促进肝糖原合成和储存、修复胰岛细胞并增加胰岛素分泌,缓解胰岛素抵抗。此外,本研究发现 50~400 μg/mL 的 GLP-F 促进 IR-HepG2

葡萄糖消耗的能力比同等浓度的 GLP 更加显著($P<0.05$)。这表明,肠道微生物的代谢使得 GLP 发挥出了更强的恢复细胞糖代谢稳态的生物活性。本实验数据表明, GLP 经体外模拟结肠发酵 48 h 后,碳水化合物含量显著下降;其中, GLP 中总糖含量从 64.84%±1.96%降低至 15.48%±0.03%($P<0.01$),还原糖含量从 6.14%±0.004%降低至 1.43%±0.03%($P<0.01$)(表 1),这表明 GLP 可以被肠道菌群作为能量源所代谢利用^[38]。本课题组前期研究表明 GLP 可以富集肠道中降解和发酵多糖的优势菌种,拟杆菌属(*Bacteroides*)的水平^[18];发酵液中乙酸、丙酸、丁酸等 SCFAs 水平显著升高^[18]。邓邦利^[39]的研究表明,乙酸、丙酸、丁酸均能增加葡萄糖转运蛋白 4(glucose transporter 4, GLUT4)的表达,并促进其进行膜转位,提高细胞摄取葡萄糖的能力。在肥胖和 T2DM 动物模型中口服和静脉注射乙酸盐^[40-42]、丁酸盐^[43]和丙酸盐^[43]可以通过增加肝脏 AMPK 磷酸化和脂肪酸氧化、糖原储存、产热、糖异生通路相关靶基因,减少肝脏脂质积累并改善葡萄糖耐量。此

外,用产丁酸盐细菌治疗大鼠可以预防饮食诱导的非酒精性脂肪肝的进展,并改善胰岛素抵抗^[44]。由此推测, GLP-F 更强的糖代谢恢复能力可能是由 GLP 经肠道微生物发酵产生的 SCFAs 所介导的。

GLP 和 GLP-F 可以通过上调 IRS-1 的表达水平从而促进 AKT 的磷酸化, P-AKT 通过调节下游效应蛋白 GSK3 β 的磷酸化、降低 PEPCK 的表达以及促进 GLUT2 的表达,从而促进肝细胞糖原合成、抑制糖异生水平以及葡萄糖转运,缓解肝细胞胰岛素抵抗(图 4)。这与在动物水平上的研究结果相似; Liu 等^[45] 研究发现, GLP 能通过上调肝脏及肌肉组织中 AKT 的磷酸化水平,以及糖异生关键限速酶糖原合酶(glycogen synthase, GS)和 GLUT4 的表达水平,改善 HFD 和 STZ 诱导的 T2DM 大鼠机体胰岛素抵抗状态;另外,在 Xiao 等^[46] 的研究中,发现 GLP 能够下调 db/db 小鼠肝脏中糖异生限速酶(glucose-6-phosphatase, G6Pase)和 PEPCK 的 mRNA 及蛋白水平,并上调了葡萄糖转运蛋白 GLUT2 的蛋白水平及 mRNA 水平。而在本文的研究中发现, GLP 与 GLP-F 对 IR-HepG2 细胞中糖异生限速酶 PEPCK 的抑制效果存在显著的差异,与 GLP 组相比, GLP-F 组对 PEPCK 的抑制效用更强($P<0.01$)。这种效应似乎是由 GLP-F 中存在的 SCFAs 所导致的, GLP-F 中含有较多的乙酸^[18],而有研究表明,乙酸可以通过增加 AMP/ATP 的比例直接激活 AMPK,而在肝脏细胞中, AMPK 的激活降低了糖异生关键限速酶葡萄糖 6-磷酸酶(G6Pase)和磷酸烯醇丙酮酸羧激酶(PEPCK)的表达^[41]。本文证明了 GLP 以及其在经过肠道微生物的代谢后的产物 GLP-F 对 IR-HepG2 细胞胰岛素抵抗的缓解作用,同时发现发酵后的 GLP 在促进肝细胞葡萄糖消耗以及抑制其糖异生通路具有更强的活性,这可能与发酵后产生的 SCFAs 有关。

4 结论

本研究探讨了肠道菌群在介导灵芝多糖(GLP)发挥药理活性中的潜在影响。利用 HepG2 细胞胰岛素抵抗模型发现 GLP-F 能够通过调节葡萄糖转运、糖原合成以及糖异生通路来缓解肝脏胰岛素抵抗;与 GLP 相比, GLP-F 在促进其葡萄糖消耗、抑制其糖异生通路上具有更强的生物学效用。通过本实验发现,肠道菌群促进了 GLP 缓解胰岛素抵抗的活性。本研究旨在为肠道菌群介导的灵芝多糖缓解肝脏胰岛素抵抗提供理论依据,为灵芝大健康产业的发展提供理论基础。

参考文献

- [1] KUMAR P S, NARESH R, SHUSHIL U, et al. Status of diabetes control and knowledge about diabetes in patients[J]. *Endocrinologia, Diabetes & Nutricion*, 2021, 68(10): 716-727.
- [2] 韩旭. 2 型糖尿病中医药治疗与管理方法探索[D]. 北京: 北京中医药大学, 2020. [HAN X. Exploration of TCM treatment and management methods for type 2 diabetes[D]. Beijing: Beijing Uni-

versity of Chinese Medicine, 2020.]

- [3] WANG F, ZHENG R Z, LI L, et al. Novel subgroups and chronic complications of diabetes in middle-aged and elderly Chinese: A prospective cohort study[J]. *Frontiers in Endocrinology*, 2022, 12: 802114.
- [4] MEDINA-CHÁVEZ J H, VÁZQUEZ-PARRODI M, SANTOYO-GÓMEZ D L, et al. Integrated care protocol: Chronic complications of diabetes mellitus 2 [J]. *Revista Medica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 2022, 60(Supl 1): S19-S33.
- [5] 周琼, 彭葆坤, 周松兰, 等. 初诊断早发 2 型糖尿病患者胰岛素抵抗及胰岛 β 细胞功能分析[J]. *重庆医学*, 2022, 51(6): 945-948. [ZHOU Q, PENG B S, ZHOU S L, et al. Analysis of insulin resistance and pancreatic β -cell function in patients with newly diagnosed early-onset type 2 diabetes mellitus[J]. *Chongqing Medicine*, 2022, 51(6): 945-948.]
- [6] ZHAO X, CHEN Z, ZHOU Z Y, et al. High-throughput sequencing of small RNAs and analysis of differentially expressed microRNAs associated with high-fat diet-induced hepatic insulin resistance in mice[J]. *Genes and Nutrition*, 2019, 14: 6.
- [7] WATT M J, MIOTTO P M, DE N W, et al. The liver as an endocrine organ-linking NAFLD and insulin resistance[J]. *Endocrine Reviews*, 2019, 40(5): 1367-1393.
- [8] MALIK S A, ACHARYA J D, MEHENDALE N K, et al. Pterostilbene reverses palmitic acid-mediated insulin resistance in HepG2 cells by reducing oxidative stress and triglyceride accumulation[J]. *Free Radical Research*, 2019, 53(7): 815-827.
- [9] XIAO C, WU Q P, ZHANG J M, et al. Antidiabetic activity of *Ganoderma lucidum* polysaccharides F31 down-regulated hepatic glucose regulatory enzymes in diabetic mice[J]. *Ethnopharmacol*, 2017, 196: 47-57.
- [10] GASTALDELLI A, STEFAN N, HÄRING H U. Liver-targeting drugs and their effect on blood glucose and hepatic lipids[J]. *Diabetologia*, 2021, 64(7): 1461-1479.
- [11] RINES A K, SHARABI K, TAVARES C D J, et al. Targeting hepatic glucose metabolism in the treatment of type 2 diabetes[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2016, 15(11): 786-804.
- [12] SHARABI K, LIN H, TAVARES C D J, et al. Selective chemical inhibition of PGC-1 α gluconeogenic activity ameliorates type 2 diabetes[J]. *Cell*, 2017, 169(1): 148-160.e15.
- [13] 马传贵, 张志秀, 闫梅霞, 等. 灵芝的活性成分及其抗肿瘤研究进展[J]. *食药菌*, 2022, 30(2): 114-118. [MA C G, ZHANG Z X, YAN M X, et al. Research status of bio-active components and anti-tumor of *Ganoderma lucidum* [J]. *Edible and Medicinal Mushrooms*, 2022, 30(2): 114-118.]
- [14] ZHU K X, NIE S P, LI C, et al. A newly identified polysaccharide from *Ganoderma atrum* attenuates hyperglycemia and hyperlipidemia[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2013, 57: 142-150.
- [15] 陈嘉骏, 王颖, 桑婷婷, 等. 灵芝多糖在糖尿病及其并发症防治中的研究进展[J]. *中草药*, 2022, 53(3): 937-947. [CHEN J J, WANG Y, SANG T T, et al. Research progress on *Ganoderma* polysaccharide in prevention and treatment of diabetes and its complications[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2022, 53(3): 937-947.]
- [16] ZHENG J S, YANG B, YU Y H, et al. *Ganoderma lucidum* polysaccharides exert anti-hyperglycemic effect on streptozotocin-induced diabetic rats through affecting β -cells[J]. *Comb Chem High Throughput Screen*, 2012, 15(7): 542-550.
- [17] 杨扬. 猴头菌多糖的结构分析及其改善肠道菌群和免疫调节活性的机制研究[D]. 长春: 吉林大学, 2021. [YANG Y. Study on structural characterization of *Hericium erinaceus* polysaccha-

- rides and improving intestinal bacteria and their mechanisms of immunomodulatory activity[D]. Changchun: Jilin University, 2021.]
- [18] YANG L, KANG X C, DONG W J, et al. Prebiotic properties of *Ganoderma lucidum* polysaccharides with special enrichment of *Bacteroides ovatus* and *B. uniformis* *in vitro*[J]. *Journal of Functional Foods*, 2022, 92: 105069.
- [19] SHAO W M, XIAO C, YONG T Q, et al. A polysaccharide isolated from *Ganoderma lucidum* ameliorates hyperglycemia through modulating gut microbiota in type 2 diabetic mice[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 197: 23–38.
- [20] GUO C L, GUO D D, FANG L, et al. *Ganoderma lucidum* polysaccharide modulates gut microbiota and immune cell function to inhibit inflammation and tumorigenesis in colon[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2021, 267: 118231.
- [21] LIU Y T, LI Y W, KE Y, et al. *In vitro* saliva-gastrointestinal digestion and fecal fermentation of *Oudemansiella radicata* polysaccharides reveal its digestion profile and effect on the modulation of the gut microbiota[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2021, 251: 117041.
- [22] 丁翹. 基于肠道菌群探讨黑灵芝多糖对 2 型糖尿病大鼠的影响机制[D]. 南昌: 南昌大学, 2020. [DING Q. The mechanism of polysaccharides from *Ganoderma Atrum* on type 2 diabetic rats through gut microbiota[D]. Nanchang: Nanchang University, 2020.]
- [23] 张冠亚. 铁皮石斛多糖在模拟消化、酵解体系中的代谢特点及其改善肠道功能的研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2015. [ZHANG G Y. Research on metabolic characteristics of *Dendrobium officinale* polysaccharides in simulating digestion and fermentation system and its effect on the improvement of intestinal function[D]. Nanchang: Nanchang University, 2015.]
- [24] LIN X H, XU W Y, LIU L, et al. *In vitro* fermentation of flaxseed polysaccharide by fecal bacteria inhibits energy intake and adipogenesis at physiological concentration[J]. *Food Research International*, 2021, 139: 109920.
- [25] ZAVŘEL T, OČENÁŠOVÁ P, SINETOVA M A, et al. Determination of storage (starch/glycogen) and total saccharides content in algae and cyanobacteria by a phenol-sulfuric acid method[J]. *Bio-Protocol*, 2018, 8(15): e2966.
- [26] 高文军, 李卫红, 王喜明, 等. 3, 5-二硝基水杨酸法测定菱蒿中还原糖和总糖含量[J]. *中国药业*, 2020, 29(9): 113–116. [GAO W J, LI W H, WANG X M, et al. Determination of reducing sugar and total sugar in turnip by 3, 5-dinitro salicylic acid colorimetry[J]. *China Pharmaceuticals*, 2020, 29(9): 113–116.]
- [27] 宋福江, 王玉乐. 紫外分光光度法测定灵芝孢子油中总三萜含量[J]. *中国医药导刊*, 2017, 19(9): 940–942. [SONG F J, WANG Y L. Determination of total triterpenoids in *Ganoderma lucidum* spores oil by ultraviolet spectrophotometry[J]. *Chinese Journal of Medicinal Guide*, 2017, 19(9): 940–942.]
- [28] 贺建华, 鹿麟, 邵纯君, 等. 福林酚法与考马斯亮蓝法测定甘露聚糖肽口服溶液中蛋白质含量的比较[J]. *中国药师*, 2017, 20(10): 1861–1863. [HE J H, LU L, SHAO C J, et al. Comparison of protein content determination respectively by Folin-Ciocalteu method and coomassie brilliant blue binding method for mannate oral solution[J]. *China Pharmacist*, 2017, 20(10): 1861–1863.]
- [29] DING Y T, XIA S J, FANG H W, et al. Loureirin B attenuates insulin resistance in HepG2 cells by regulating gluconeogenesis signaling pathway[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2021, 910: 174481.
- [30] ZHANG Q, WEI L, YANG H C, et al. Bromodomain-containing protein represses the Ras/Raf/MEK/ERK pathway to attenuate human hepatoma cell proliferation during HCV infection[J]. *Cancer Letters*, 2016, 371(1): 107–116.
- [31] LAN T X, MEI M X, XIAO Q X, et al. Alizarin increases glucose uptake through PI3K/Akt signaling and improve alloxan-induced diabetic mice[J]. *Future Medicinal Chemistry*, 2019, 11(5): 395–406.
- [32] ZHOU Q L, YANG C X, LIANG H, et al. Propofol reduces MMPs expression by inhibiting PI3K/AKT activity in human HepG2 cells[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2013.
- [33] HAN H S, KANG G, KIM J S, et al. Regulation of glucose metabolism from a liver-centric perspective[J]. *Experimental and Molecular Medicine*, 2016, 48(3): e218.
- [34] YANG R Y, WANG L, XIE J, et al. Treatment of type 2 diabetes mellitus via reversing insulin resistance and regulating lipid homeostasis *in vitro* and *in vivo* using cajanonic acid A[J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2018, 42(5): 2329–2342.
- [35] CHENG F, HAN L, XIAO Y, et al. D-Dhio-inositol ameliorates high fat diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance via PKC ϵ -PI3K/AKT pathway[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(21): 5957–5967.
- [36] SHAO W M, XIAO C, YONG T Q, et al. A polysaccharide isolated from *Ganoderma lucidum* ameliorates hyperglycemia through modulating gut microbiota in type 2 diabetic mice[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2022, 197: 23–38.
- [37] HOLMES D. Obesity: Medicinal mushroom reduces obesity by modulating microbiota[J]. *Nature Reviews Endocrinology*, 2015, 11(9): 504.
- [38] GAO Y Y, GUO Q B, ZHANG K L, et al. Polysaccharide from *Pleurotus nebrodensis*: Physicochemical, structural characterization and *in vitro* fermentation characteristics[J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 165(Pt B): 1960–1969.
- [39] 邓邦利. 钙信号和短链脂肪酸调节糖代谢机制研究[D]. 天津: 天津医科大学, 2018. [DENG B L. Study the mechanism of calcium signal and short chain fatty acids-regulated glucose metabolism[D]. Tianjin: Tianjin Medical University, 2018.]
- [40] ROPELLE E R, PAULI J R, FERNANDES M F A, et al. A central role for neuronal AMP-activated protein kinase (AMPK) and mammalian target of rapamycin (mTOR) in high-protein diet-induced weight loss[J]. *Diabetes*, 2008, 57: 594–605.
- [41] SAKAKIBARA S, YAMAUCHI T, OSHIMA Y, et al. Acetic acid activates hepatic AMPK and reduces hyperglycemia in diabetic KK-A(y) mice[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006, 344(2): 597–604.
- [42] KONDO T, KOSHI M, FUSHIMI T, et al. Acetic acid upregulates the expression of genes for fatty acid oxidation enzymes in liver to suppress body fat accumulation[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, 57(13): 5982–5986.
- [43] DEN BESTEN G, BLEEKER A, GERDING A, et al. Short-chain fatty acids protect against high-fat diet-induced obesity via a PPAR γ -dependent switch from lipogenesis to fat oxidation[J]. *Diabetes*, 2015, 64(7): 2398–2408.
- [44] ENDO H, NIIOKA M, KOBAYASHI N, et al. Butyrate-producing probiotics reduce nonalcoholic fatty liver disease progression in rats: New insight into the probiotics for the gut-liver axis[J]. *PLoS One*, 2013, 8(5): e63388.
- [45] LIU Y P, LI Y M, ZHANG W L Z, et al. Hypoglycemic effect of inulin combined with *Ganoderma lucidum* polysaccharides in T2DM rats[J]. *Journal of Functional Foods*, 2019, 55: 381–390.
- [46] XIAO C, WU Q P, XIE Y Z, et al. Hypoglycemic mechanisms of *Ganoderma lucidum* polysaccharides F31 in db/db mice via RNA-seq and iTRAQ[J]. *Food & Function*, 2018, 9(12): 6495–6507.