

文章编号:1001-6880(2016)11-1777-07

# 酵母源葡萄糖耐量因子的提取纯化研究

许乐<sup>1,2</sup>, 刘鹭<sup>2</sup>, 汪建明<sup>1\*</sup>, 吕加平<sup>2\*</sup><sup>1</sup>天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津 300457; <sup>2</sup>中国农业科学院农产品加工研究所, 北京 100193

**摘要:**为探究葡萄糖耐量因子(GTF)分离纯化工艺,简化纯化步骤,以期得到GTF纯品,本实验在前人氨水提取基础上,采用有机溶剂沉淀除去杂蛋白,在有机溶剂的种类、溶剂的浓度、提取组分以及沉淀时间的确定等方面进行了试验,以有机铬含量( $\mu\text{g}$ )与总蛋白含量( $\text{mg}$ )的比值为纯化评价标准,高相液相色谱对纯化结果进行验证,同时将纯化前后的GTF作用于胰岛素抵抗型Hep-G2肝癌细胞,测定细胞葡萄糖消耗量,检测GTF纯化品对细胞葡萄糖代谢的调节活性。最终确定用30%低温乙醇沉淀20 min,  $10000 \times g$ 离心取上清液分离纯化GTF,此方法相较于氨水直接提取,有机铬含量与总蛋白含量的比值提高了6倍多,GTF提取率和纯度都得到了显著提高,且纯化后的GTF对胰岛素抵抗型Hep-G2细胞葡萄糖代谢具有显著调节作用( $P < 0.01$ )。

**关键词:**富铬酵母;葡萄糖耐量因子;提取纯化;凝胶层析

中图分类号:Q939.99

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2016.11.016

## Extraction and Purification of Glucose Tolerance Factor from Yeast

XU Le<sup>1,2</sup>, LIU Lu<sup>2</sup>, WANG Jian-ming<sup>1\*</sup>, LV Jia-ping<sup>2\*</sup><sup>1</sup>College of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China;<sup>2</sup>Institute of agricultural products processing, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China

**Abstract:** In order to explore the separation and purification process of glucose tolerance factor (GTF), the purification steps were simplified in order to obtain GTF with high purity. Previous ammonia extraction experiments were based on organic solvent precipitation to remove protein. In the present study, based on the previous study, the purification process was further optimized with different organic solvents, using the ratio of organic chromium content ( $\mu\text{g}$ ) and total protein content ( $\text{mg}$ ) as evaluation criteria. The purity of isolated GTF was further verified by high performance liquid chromatography analysis. In addition, the glucose consumptions in insulin resistance type Hep-G2 cells treated with GTF before and after purification were measured for the detection of its glucose metabolism regulating activity. As a result, the optimized purification process was with 30% cold ethanol precipitation for 20 min,  $10000 \times g$  centrifugation. Compared with traditional ammonia extraction, the organic chromium content and the content of total protein ratio improved 6 times using the developed method. The extraction rate and purity of GTF were significantly improved and the purified GTF showed a regulating effect on insulin resistance type Hep-G2 cells in glucose metabolism ( $P < 0.01$ ).

**Key words:** high chromium yeast; glucose tolerance factor; extraction and purification; gel chromatograph

葡萄糖耐量因子(GTF)是一种由三价铬、甘氨酸、谷氨酸、半胱氨酸、烟酸组成的分子量为400~1500 Da的小分子有机铬化合物,其活性中心为三价铬。现代医学认为,铬(III)是生物体必需的微量元素,具有多项生物学功能,主要是通过GTF协同或增强胰岛素作用,进而影响糖、脂类、蛋白质和核酸代谢<sup>[1]</sup>。近年来,在人类营养研究方面还发现有机铬对减肥、降低胆固醇及维持运动员正常状态等

方面都有很大作用<sup>[2]</sup>,同时铬对机体的酶和辅助因子也具有重要作用,McCarty<sup>[3]</sup>发现,GTF有增加机体肝细胞葡萄糖激酶和辅酶Q与亚油酸结合的功能。且有相关试验证明富铬酵母为GTF的优良载体<sup>[4]</sup>,将富铬酵母作用于Ⅱ型糖尿病病人,可显著降低其血糖和糖耐量,其效果优于啤酒酵母<sup>[5]</sup>,从富铬酵母中提取纯化得到的GTF,毒副作用小,在机体内的吸收利用率大,胰岛素生物效应高,且有利于发挥GTF调节血糖、降脂及降胆固醇的作用。因此研究从富铬酵母菌中提取纯化葡萄糖耐受因子的方法是非常必要和有意义的。

国内外很多研究者对 GTF 的分离纯化工作进行了大量的研究<sup>[6-13]</sup>: 2012 年 Weksler<sup>[14]</sup>用甲醇从啤酒酵母中提取, 经过多级膜分离取 1200 ~ 3500 Da 物质, 进行离子交换和凝胶过滤, 最后用反相高效液相色谱进行分离得到 GTF, 将其作用于高血糖症小鼠, 得出 GTF 在体外起到类胰岛素、增强胰岛素效果的作用, 可作为治疗糖尿病的一种口服药物; 2013 年 Liu L<sup>[15,16]</sup> 和 Vincent<sup>[17]</sup> 等通过凝胶过滤层析和高效液相色谱对酵母氨水提取物进行初步分离, 得到  $m/z$  比值分别为 712. 2535 和 769. 2747 的铬结合物; 2014 年孔凡华<sup>[18]</sup> 等人用葡聚糖凝胶层析柱对 GTF 进行分离纯化, 且初步作用于 3T3-L1 脂肪细胞, 证明有显著的葡萄糖代谢调节活性。

本实验在前人研究基础上, 优化纯化方法, 通过氨水初步提取, 低浓度乙醇去除杂蛋白, 其中常用的沉淀杂蛋白的有机溶剂有很多, 如甲醇、乙醇、丙酮等, 乙醇具有沉淀作用强、易挥发、无毒, 不影响 GTF 活性等优点, 是优良的提取溶剂; 甲醇虽对蛋白质的变性作用小, 但毒性强, 沉淀蛋白作用不如乙醇; 丙酮虽沉淀作用大, 但沸点低, 对肝脏有一定毒性。且有试验证明<sup>[19]</sup> GTF 可以显著促进超高浓度 (very high gravity, VHG) 乙醇发酵, 这也侧面说明即便在很高浓度的乙醇沉淀作用下, 也不会对 GTF 结构或生物活性造成损伤。所以从经济效益和除去杂蛋白能力、毒性大小等综合考虑, 最终选择乙醇进行试验, 优化乙醇除去杂蛋白的各种参数, 再经过 Superdex<sup>TM</sup>75 和 Sephadex G25 两级柱层析纯化, 以期提高 GTF 提取率, 得到 GTF 纯化物。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

Hep-G2 肝癌细胞株(购自中国农业科学院上海细胞库); 高糖 DMEM 培养基、磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS)、胰蛋白酶(美国 Corning 公司); 胎牛血清、胰岛素(美国 Gibco 公司); Superdex<sup>TM</sup>75、Sephadex G25(美国 GE 公司); 层析柱(上海华美实验仪器厂); 铬标准液(1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )(中国计量科学院); 葡萄糖测定试剂盒(中生北控生物科技有限公司); 硝酸、高氯酸均为优级纯; 三氯化铬、氨水、葡萄糖等均为国产分析纯; 酵母浸粉、大豆蛋白胨、琼脂粉为生化试剂; 分析用水为去离子水。

### 1.2 仪器与设备

CXG 常压生物电脑层析系统(上海沪西分析仪

器厂); UV2300 分光光度计(上海天美科学仪器有限公司); MDS-6 微波消解/萃取仪(上海新仪微波化学科技有限公司); 3K-15 离心机(美国 Sigma 公司); AA6300 火焰原子吸收分光光度计(日本岛津公司); HZQ-F160 摆床培养箱(哈尔滨市东联公司); BIOTECH-500BG 自动控制发酵罐(上海保兴生物设备工程有限公司); RE52-99 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂); Virtis Genesis 冷冻干燥机(美国 Virtis 公司); 1525 Binary HPLC 系统(美国 Waters 公司)。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 氨水提取法

0.1 mol/L 氨水提取菌粉中有机铬, 富铬酵母菌粉与氨水质量体积比为 1:10, 放入 37 °C、200 rpm 的振荡培养箱中, 振荡培养 3 h 后, 放入转速为 10000 × g, 温度 4 °C 的离心机中, 离心 30 min, 取上清, 初步提取酵母菌粉中的有机铬。

#### 1.3.2 不同有机溶剂提取效果的比较

冻干富铬酵母菌粉在氨水提取离心后, 取上清液加入相同浓度(30%)的不同有机溶剂, 选取常见且易挥发的有机溶剂, 如甲醇、乙醇、丙酮, 在冰上沉淀 20 min 后, 置于转速为 10000 × g, 温度 4 °C 的离心机中, 离心 10 min, 分别收集上清和沉淀。采用微波消解、火焰原子吸收测定样品有机铬、总铬含量, 考马斯亮蓝法测定样品总蛋白浓度。计算有机铬含量( $\mu\text{g}$ )与蛋白含量(mg)的比值, 分析其提取效率。

#### 1.3.3 乙醇提取法

在氨水提取离心后, 取上清液分别加入不同浓度的冷乙醇, 在冰上沉淀数分钟后, 置于转速为 10000 × g, 温度 4 °C 的离心机中, 离心 10 min, 分别收集上清和沉淀。采用微波消解、火焰原子吸收测定样品有机铬、总铬含量, 考马斯亮蓝法测定样品总蛋白浓度。计算有机铬含量( $\mu\text{g}$ )与蛋白含量(mg)的比值, 分析其提取效率。

#### 1.3.4 Superdex<sup>TM</sup>75 凝胶过滤层析

去离子水溶解 GTF 提取物冻干菌粉, 过 0.22  $\mu\text{m}$  膜, 上 Superdex<sup>TM</sup>75(1.6 cm × 80 cm)凝胶过滤层析柱, 以 50 mmol/L 醋酸铵和 0.15 mol/L 氯化钠(调 pH 6.0)混合液为洗脱液, 洗脱流速为 0.3 mL/min, 每 10 min 收集一管洗脱液, 在紫外分光光度计吸收波长为 254 nm 处对各管洗脱液进行检测, 收集洗脱液进行微波消解, 用火焰原子吸收分光光度计测定洗脱液有机铬含量, 绘制有机铬、蛋白含量双坐

标图谱。收集铬峰处洗脱液,冷冻干燥备用。

### 1.3.5 Sephadex G25 凝胶过滤层析

去离子水溶解收集的 Superdex<sup>TM</sup> 75 层析第二个铬峰洗脱液冻干粉,过 0.22 μm 水系膜后上规格为 1.0 cm × 80 cm 的 Sephadex G25 凝胶过滤层析柱,以过 0.22 μm 膜后的去离子水为洗脱液,洗脱流速为 0.3 mL/min,每 10 min 收集一管,用紫外分光光度计在吸收波长为 254 nm 处对各管洗脱液进行蛋白吸光值的检测,收集洗脱液进行微波消解,火焰原子吸收分光光度计测定洗脱液中有机铬含量,绘制有机铬、蛋白含量双坐标图谱,收集铬峰处洗脱液,冷冻干燥备用。

### 1.3.6 高效液相色谱验证试验

参照本实验室前人色谱条件<sup>[18]</sup>进行试验,用去离子水溶解冷冻干燥的 Sephadex G25 凝胶过滤层析铬峰洗脱液,进一步用高效液相色谱制备性层析柱验证纯化结果。色谱柱为 XBridge<sup>TM</sup> C<sub>18</sub> 色谱柱(10 mm × 250 mm,10 μm),流动相 A 液,乙腈-三氟乙酸(trifluoroacetic acid, TFA),体积比 1000:0.8;B 液,水-TFA,体积比 1000:1。采用梯度洗脱的方法,洗脱 15 min,乙腈 20% ~ 22%,洗脱流速为 1.5 mL/min,对纯化后的 GTF 进行纯度验证。

### 1.3.7 GTF 对胰岛素抵抗型 Hep-G2 细胞葡萄糖消耗的影响

取对数生长期的 Hep-G2 细胞,调细胞密度为  $1 \times 10^5$ /mL 接种于 48 孔板中,待细胞汇合度达到 85% 以上时,换用含 10<sup>-6</sup> mol/L 胰岛素和 2% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养液,培养 48 h 建立胰岛素抵抗型细胞模型。之后 PBS 洗 2 遍,换用含 10<sup>-7</sup> mmol/L 胰岛素的 DMEM 培养液,加入纯化前后的 GTF 共同作用 24 h,以铬添加量反映 GTF 添加量,观察纯化前后 GTF 对细胞葡萄糖消耗量的影响。

### 1.3.8 有机铬、总铬含量的测定

称取 0.1 g 左右样品,溶于 0.1 mol/L 氨水溶液中,于 37 °C、200 rpm 提取 3 h,5000 rpm 离心 10 min,收集上清液于溶样杯中,加入 6 mL 硝酸在加热板上 160 °C,预加热 30 min,再加入 0.5 mL 高氯酸和 5 mL 质量分数为 5% 的过硫酸铵,用微波消解仪进行微波消解,参数如表 1,消解完成后,用 10% 氯化铵定容至 25 mL,最后用火焰原子吸收分光光度计,参照 GB/T15555.6-1995 火焰原子吸收光谱法测定消化液中有机铬含量。

总铬测定方法:称取 0.1 g 左右样品于溶样杯中,微波消解,方法同有机铬测定。

表 1 微波消解仪消化参数表

Table 1 Parameters of microwave digestion instrument

压力 Pressure ( mPa )	时间 Time ( min )	功率 Power ( kw )
0.3	4	800
0.6	3	800
1.0	3	800
1.5	6	800

### 1.3.9 蛋白含量的测定

用考马斯亮蓝法测定蛋白含量,具体方法:取牛血清白蛋白用 0.9% 生理盐水稀释为不同浓度,制作蛋白标曲,将样品稀释 10 倍,加 20 μL 到 96 孔板,5 × G250 染液用前混合匀,用双蒸水稀释至 1 × G250,各孔加入 200 μL 1 × G250 染液,混合均匀,室温放置 3 ~ 5 min,酶标仪在吸收波长为 595 nm 处测定样品吸光值,据标准曲线计算样品蛋白浓度。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同有机溶剂提取葡萄糖耐量因子的比较

由表 2 可以得出,用相同浓度的不同有机溶剂

提取葡萄糖耐量因子,有机铬与蛋白的比值相较于对照组均有提高。同一溶剂中上清液中的有机铬含量均高于沉淀中的有机铬含量,说明在有机溶剂提取后,有机铬大部分存在于上清液中,且用乙醇提取较其他两种有机溶剂提取效率更高,更加安全经济,因此最终选择用乙醇进行提取。

### 2.2 低温乙醇沉淀提取葡萄糖耐量因子

#### 2.2.1 提取组分的分析

在氨水提取离心后取上清液分别加入 50%、30%、15% 的乙醇沉淀离心后,将样品分为沉淀和上清液两部分,测其铬含量和蛋白含量,结果由表 3 可以看出,上清液中测得的有机铬含量分别为 65.039、

表2 不同有机溶剂提取样品有机铬含量及蛋白含量表( $n = 6, \bar{x} \pm s$ )Table 2 Organic chromium content and protein content in samples extracted with different organic solvents ( $n = 6, \bar{x} \pm s$ )

组别 Group		总有机铬含量 Organic chromium content (μg)	总蛋白含量 Protein content (mg)	$\text{Cr}(\mu\text{g})/\text{Pro}(\text{mg})$
	氨水提取(对照组) Ammonia extraction			
甲醇 Methanol	上清液 Supernatant	$60.624 \pm 0.003$	$36.924 \pm 0.017$	1.642
	沉淀 Precipitate	$32.713 \pm 1.446$	$27.156 \pm 0.139$	1.205
乙醇 Ethanol	上清液 Supernatant	$84.530 \pm 0.003$	$35.094 \pm 0.039$	2.409
	沉淀 Precipitate	$21.016 \pm 2.438$	$16.197 \pm 0.003$	1.298
丙酮 Acetone	上清液 Supernatant	$62.064 \pm 0.003$	$7.92 \pm 0.069$	1.637
	沉淀 Precipitate	$23.210 \pm 0.005$	$17.92 \pm 0.227$	1.295

133.492、52.899 μg, 沉淀中有机铬含量分别为62.713、33.016、3.310 μg, 可以得出, 上清液中有机铬的含量明显高于沉淀, 这也与表2结果一致。且随乙醇浓度的降低, 沉淀中的有机铬含量也逐渐降低, 在乙醇浓度为30%时上清液中的有机铬含量为最大。由此表还可得出, 上清液中有机铬与蛋白的

比值分别为0.812、5.015、1.412, 沉淀中铬与蛋白的比值分别为0.491、0.994、0.185, 与对照组相比, 上清液中目的物的纯度都有一定提高, 最大可达到6.13倍, 由此可得出上清液中含有较高纯度的有机铬, 因此最终选择提取成分为上清液。

表3 不同提取组分样品有机铬含量及蛋白含量表( $n = 6, \bar{x} \pm s$ )Table 3 Organic chromium content and protein content in samples extracted with different methods ( $n = 6, \bar{x} \pm s$ )

组别 Group		总有机铬含量 Organic chromium content (μg)	总蛋白含量 Protein content (mg)	$\text{Cr}(\mu\text{g})/\text{Pro}(\text{mg})$
	氨水提取(对照组) Ammonia extraction	$153.441 \pm 7.658$	$187.648 \pm 7.381$	0.818
50% 乙醇 50% Ethanol	上清液 Supernatant	$65.039 \pm 2.517$	$80.071 \pm 2.041$	0.812
	沉淀 Precipitate	$62.713 \pm 1.446$	$127.837 \pm 15.954$	0.491
30% 乙醇 30% Ethanol	上清液 Supernatant	$133.492 \pm 11.362$	$25.687 \pm 1.671$	5.015
	沉淀 Precipitate	$33.016 \pm 2.438$	$33.201 \pm 2.034$	0.994
15% 乙醇 15% Ethanol	上清液 Supernatant	$52.899 \pm 2.187$	$55.963 \pm 26.261$	1.412
	沉淀 Precipitate	$3.310 \pm 1.629$	$17.92 \pm 12.267$	0.185

表4 不同乙醇浓度提取样品有机铬含量及蛋白含量表( $n = 6, \bar{x} \pm s$ )Table 4 Organic chromium content and protein content in samples extracted with different ethanol concentrations ( $n = 6, \bar{x} \pm s$ )

组别 Group		总有机铬含量 Organic chromium content (μg)	总蛋白含量 Protein content (mg)	$\text{Cr}(\mu\text{g})/\text{Pro}(\text{mg})$
	氨水提取 Ammonia extraction	$147.846 \pm 2.581$	$183.708 \pm 11.275$	0.804
60% 乙醇 60% Ethanol		$71.612 \pm 3.416$	$66.507 \pm 10.382$	1.077
50% 乙醇 50% Ethanol		$65.039 \pm 2.517$	$80.071 \pm 2.041$	0.812
40% 乙醇 40% Ethanol		$60.724 \pm 0.622$	$102.943 \pm 4.856$	0.590
30% 乙醇 30% Ethanol		$133.492 \pm 11.362$	$25.687 \pm 1.671$	5.015
15% 乙醇 15% Ethanol		$52.899 \pm 2.187$	$55.963 \pm 26.261$	1.412

## 2.2.2 不同乙醇浓度的分析

由表4可以看出, 在氨水提取离心取得上清液,

分别加入60%、50%、40%、30%、15%这五个不同浓度的低温乙醇, 设置氨水提取(不加乙醇沉淀样

品)为对照组,0℃冰浴沉淀20 min,离心取上清液测得铬/蛋白的比值分别为1.077、0.812、0.595、0.015、1.412,对照组铬/蛋白比值为0.804,可以得出在60%、50%、30%、15%乙醇浓度提取下有机铬的提取率都有了提高,分别为对照组的1.34、1.01、6.24、1.76倍,可得出在30%的乙醇浓度沉淀下提取物的纯度提高最为显著。因此最终选择30%乙醇进行提取沉淀。

### 2.2.3 不同沉淀时间的分析

由表5可以看出,氨水提取离心取得上清液,加

表5 不同沉淀时间样品有机铬含量及蛋白含量表( $n=6, \bar{x} \pm s$ )

Table 5 Effects of different precipitation times on organic chromium content and protein content in sample ( $n=6, \bar{x} \pm s$ )

组别 Group	总有机铬含量 Organic chromium content (μg)	总蛋白含量 Protein content (mg)	Cr(μg)/Pro(mg)
沉淀15 min Precipitating 15 min	61.170 ± 6.412	30.587 ± 1.594	1.999
沉淀20 min Precipitating 20 min	133.492 ± 11.362	25.687 ± 1.671	5.015
沉淀30 min Precipitating 30 min	120.051 ± 3.657	56.902 ± 0.547	2.11
过夜沉淀 Precipitating overnight	57.383 ± 6.253	14.506 ± 1.913	3.956

### 2.3 Superdex™75 凝胶层析

由图1可知,高铬酵母菌粉经氨水初步提取、低温低浓度乙醇再次提取除杂后,取上清液,过0.22 μm膜,上Superdex™75凝胶过滤层析后,得到4个A<sub>254</sub>蛋白峰,2个铬峰。根据凝胶层析分离原理,大分子物质先被洗脱,而有文献参考GTF为小分子物质<sup>[12,20,21]</sup>,且从图1可以看出,第二个铬峰和蛋白峰有很好的重合性,测得的铬含量最高,因此可以判断第二个铬峰为目的物,收集第二个铬峰洗脱液,真空浓缩备用。

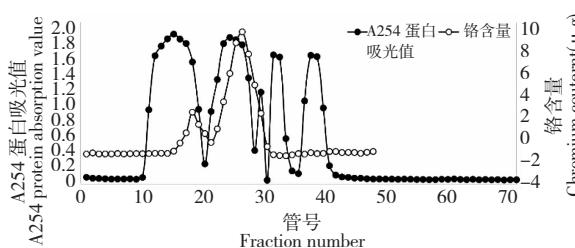


图1 Superdex™75凝胶过滤层析图谱

Fig. 1 Purification with Superdex™75 gel chromatography

### 2.4 Sephadex G25凝胶层析

收集Superdex™75第2个铬峰洗脱液,过Sephadex G25凝胶过滤层析柱,从图2可以看出,得到1个A<sub>254</sub>蛋白峰,1个铬峰。其中铬峰与蛋白峰重合。由此可以得到,经过氨水和低温低浓度乙醇最大程

入30%乙醇进行沉淀,分别沉淀15、20、30 min以及过夜沉淀后,测得的总有机铬的含量分别为61.17、133.492、120.051、57.383 μg,沉淀20 min和30 min,有机铬的含量都较高。同时测得的总蛋白含量分别为30.587、25.687、56.902、14.506 mg,在沉淀20 min后,目的物的剩余蛋白含量较少。综合比较,虽加入乙醇沉淀后,铬量/蛋白含量的比值都有了一定的提高,但在沉淀20 min时,其比值最大,此时有机铬的含量也最高,剩余杂蛋白含量最少,因此最终选择沉淀20 min进行离心,收集目的物。

度从冻干酵母菌粉中提取出GTF,再经Superdex™75和Sephadex G25凝胶过滤层析后,可以去除大量杂蛋白,使GTF得到纯化。

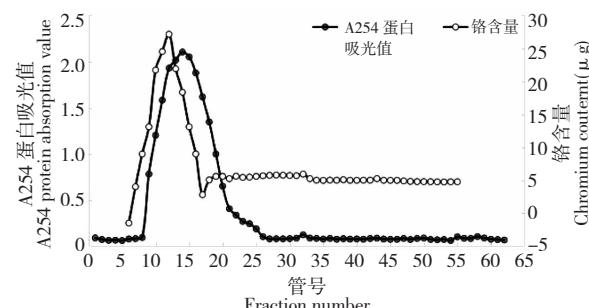


图2 Sephadex G25凝胶过滤层析图谱

Fig. 2 Purification with Sephadex G25 gel chromatographic

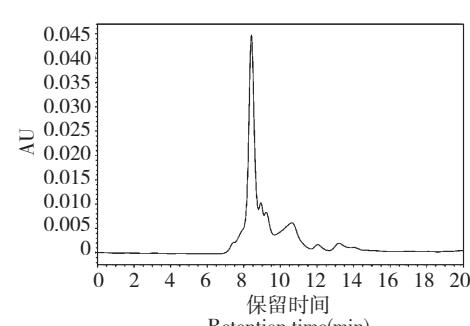


图3 纯化后GTF高效液相色谱图

Fig. 3 HPLC chromatogram of purified GTF

## 2.5 高效液相色谱验证试验

由图3可以看出,经高效液相色谱分离后,得到1个明显的A<sub>254</sub>蛋白峰,可以得出,经氨水提取、乙醇除去杂蛋白,再经过两级葡聚糖凝胶层析柱分离纯化后,GTF纯度得到提高,可得到较为单一的GTF物质。

## 2.6 GTF对胰岛素抵抗型Hep-G2肝癌细胞葡萄糖消耗的影响

由图4可以看出,加入纯化前后的GTF作用Hep-G2细胞,对细胞葡萄糖消耗均有促进作用,这可能是因为GTF通过p38MAKP途径促进了细胞葡萄糖的消耗<sup>[22]</sup>。且纯化后的GTF相较于纯化前的,对细胞葡萄糖消耗具有明显的促进作用。在铬含量为1.0 μg/mL时,纯化后的GTF葡萄糖消耗量与对照组相比差异极显著。可以得出,纯化后得到的GTF,具有显著调节葡萄糖代谢活性的作用。

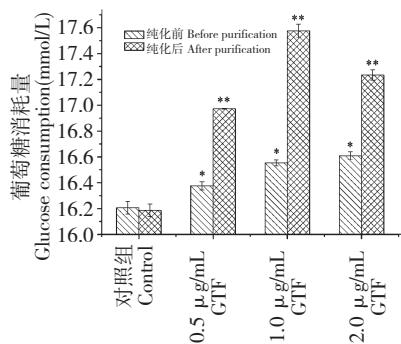


图4 GTF对胰岛素抵抗型Hep-G2肝癌细胞葡萄糖消耗的影响

Fig. 4 Effect of GTF on glucose consumption in Hep-G2 hepatocellular carcinoma cells with insulin resistance

注:与空白对照组比较,\*P<0.05;\*\*P<0.01;\*\*\*P<0.001

Note: Compared with control, \*P < 0.05; \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001

## 3 结论

本实验用氨水提取高铬酵母菌粉中葡萄糖耐量因子,用低温低浓度乙醇除去葡萄糖耐量因子中的杂蛋白再次纯化GTF,最后经过两次葡聚糖凝胶层析柱得到纯化葡萄糖耐量因子。本实验重点探讨了从不同乙醇浓度、不同的提取成分、不同的提取时间这三个因素来优化纯化试验,最终确定在30%体积浓度的低温乙醇提取20 min后,10000×g、4℃离心取上清液,得到的GTF提取率最高,纯度最大,与之前只是氨水提取离心得到上清液,测得的有机铬含

量与蛋白含量的比值提高了6倍多,GTF提取率和纯度都得到了显著提高。且将纯化前后的GTF作用于胰岛素抵抗型Hep-G2肝癌细胞,通过测定细胞葡萄糖消耗量,得到纯化后的GTF可显著促进细胞葡萄糖消耗,调节细胞葡萄糖代谢活性。

## 参考文献

- Tu BQ (涂白青), Weng YJ (翁宇静), Tong Z (童智), et al. Establishment of blood glucose fluctuation model on diabetes mice and its damage to viscera. *J Fudan Univ, Nat Sci* (复旦大学, 自科版), 2008, 47:647-651.
- Sun CH (孙长颢). Nutrition and food hygiene(营养与食品卫生学). Beijing: People's Medical Publishing House, 2007. 114-160.
- McCarty MF. Toward practical prevention of type 2 diabetes. *Med Hypotheses*, 2000, 54:786-793.
- Wang SL (王盛良). The development of the rich chromium yeast. *Food Sci*(食品科学), 2001, 22(2):32-35.
- Jiang GR (姜桂荣). Effects of chromium yeast on diabetic sugar tolerance. *J Nutr* (营养学报), 1988, 10:253-257.
- Toepfer EW, Mertz W, Roginski EE, et al. Chromium in foods in relation to biological activity. *J Agric Food Chem*, 1973, 21:69-71.
- Anderson RA, Bryden NA, Polansky MM, et al. Dietary chromium effects on tissue chromium concentrations and chromium absorption in rats. *Trace Elem Exp Med*, 1996, 9(1):11-25.
- Toepfer EW, Mertz W, Polansky MM, et al. Preparation of chromium-containing material of glucose tolerance factor activity from brewer's yeast extracts and by synthesis. *J Agric Food Chem*, 1977, 25:162-166.
- Davies DM, Holdsworth ES, Sherriff JL. The isolation of glucose tolerance factors from brewer's yeast and their relationship to chromium. *Biochem Med*, 1985, 33:297-311.
- Anderson RA, Bryden NA, Ecock-Clover CM, et al. Beneficial effects of chromium on glucose and lipid variables in control and somatotropin-treated pigs are associated with increased tissue chromium and altered tissue copper, iron, and zinc. *Anim Sci*, 1997, 75:657-661.
- Anderson RA, Cheng N, Bryden NA, et al. Elevated intakes of supplemental chromium improve glucose and insulin variables in individuals with type 2 diabetes. *Diabetes*, 1997, 46:1786-1791.
- Anderson RA. Nutrition factors influencing the glucose/insulin system, chromium. *Am Coll Nutr*, 1997, 16:404-410.

(下转第1770页)