

引用本文:汤澎,赵娟,杨光.柚皮素对体外糖尿病视网膜新生血管形成的抑制作用及机制[J].安徽医药,2021,25(11):2165-2169.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2021.11.010.



◇ 药学研究 ◇

柚皮素对体外糖尿病视网膜新生血管形成的抑制作用及机制

汤澎,赵娟,杨光

作者单位:临潼区汤澎眼科医院眼科,陕西 西安 710605

摘要: 目的 观察柚皮素对体外高糖诱导的视网膜血管生成过程的影响及机制。方法 将猴视网膜血管内皮细胞(RF/6A)采用随机数字表法分为对照组、高糖组、高糖+柚皮素组,对照组在常规培养基中培养,高糖组在培养基中加入30 mmol/L D-葡萄糖,高糖+柚皮素组在培养基中加入30 mmol/L D-葡萄糖及3 mg/L柚皮素。培养24 h后,分别采用cck-8、Transwell和Matrigel实验检测细胞增殖、迁移及管腔形成。采用蛋白质印迹法(Western blotting)检测细胞自噬标志蛋白微管相关蛋白1轻链3(LC3)及哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)的表达。结果 高糖组细胞增殖率(72.08±2.12)%比对照组(99.43±0.67)%减小,高糖+柚皮素组(90.54±1.47)%明显高于高糖组;细胞迁移数和管腔形成比较,高糖组明显高于对照组,高糖+柚皮素组显低于高糖组;Western blotting结果表明高糖组细胞LC3-II的表达明显高于对照组,高糖+柚皮素组细胞的表达明显低于高糖组;高糖组细胞p-mTOR的表达明显低于对照组,高糖+柚皮素组细胞的表达明显高于高糖组。结论 柚皮素可通过抑制细胞自噬在体外抑制糖尿病视网膜新生血管形成。

关键词: 黄酮类; 糖尿病视网膜病变; 内皮,血管; 柚皮素; 视网膜新生血管; 自噬; 高糖; 血管生成

Inhibitory effect and mechanism of naringenin on diabetic retinal neovascularization in vitro

TANG Peng,ZHAO Juan,YANG Guang

Author Affiliation:Department of Ophthalmology,Lintong District Tangpeng Ophthalmology Hospital, Xi'an, Shaanxi 710605, China

Abstract: **Objective** To observe the effect and mechanism of naringenin on retinal angiogenesis induced by high glucose in vitro. **Methods** Monkey retinal vascular endothelial cells (RF/6A) were randomly divided into three groups: control group (regular culture), the high glucose group (adding 30 mmol/L D-glucose to the medium), high glucose + naringenin group (adding 30 mmol/L D-glucose and 3 mg/L naringenin to the medium). After 24 h of culture, the cck-8, transwell and matrigel assay was used to detect cell proliferation, migration and tube formation, respectively. The expression of microtubule-related protein 1 light chain 3 (LC3) and mammalian target of rapamycin (mTOR) were detected by western blotting. **Results** The cell proliferation rate of the high-glucose group(72.08±2.12)% was significantly lower than that of the control group(99.43±0.67)%, and this rate of the high-glucose + naringenin group(90.54±1.47)% was significantly higher than that of the high-glucose group. The results of cell migration and tube formation showed that the high-glucose group was significantly higher than the control group, and the high glucose + naringenin group was significantly lower than the high-glucose group. Western blotting results showed that the expression of LC3-II in the high-glucose group was significantly higher than that in the control group, and that in the high-glucose + naringenin group was significantly lower than that in the high-glucose group. The expression of p-mTOR in the high-glucose group was significantly lower than that in the control group, and that in the high-glucose + naringenin group was significantly higher than that in the high-glucose group. **Conclusion** Naringenin can inhibit diabetic retinal neovascularization in vitro by inhibiting autophagy.

Key words: Flavones; Diabetic retinopathy; Endothelium, vascular; Naringenin; Retinal neovascularization; Autophagy; High glucose; Angiogenesis

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是导致成人致盲的关键原因,大部分患者晚期预后较差^[1-2]。根据严重程度,DR分为增殖性(PDR)与非增殖性(NPDR)两种类别,其中,以视网膜新生血管为特征的PDR对患者造成的损伤最为严重^[3]。DR的病理机制十分复杂,多种因素参与其中。近年来,针对DR的药物治理取得了较大进展,最主要的是血管内皮生长因子(VEGF)拮抗剂,但它需要眼

内重复注射,费用高,易复发,且长期的生物安全性还有待观察^[4]。因此,寻找安全有效防治视网膜新生血管的药物具有重要的医学和社会意义。

柚皮素是柚皮苷的苷元,是一种广泛存在于芸香科柑橘属植物中的二氢黄酮类化合物。研究显示,柚皮素具有抗炎、清除自由基、抑制过氧化,降血脂以及抑制肿瘤生长等作用^[5-6],显示出巨大的药用价值。眼科领域的研究显示,柚皮素可在体外抑

制人脐静脉内皮细胞生长^[7],具有抑制大鼠脉络膜新生血管的能力^[8-9]。然而,柚皮素对DR的视网膜新生血管形成的影响还鲜见报道。基于此,本研究自2019年3—9月采用高糖诱导的RF/6A为模型,评价柚皮素对糖尿病视网膜新生血管形成的作用及机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 RF/6A细胞系购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库;DMEM细胞培养基、0.25%胰酶,胎牛血清购自美国Gibco公司;柚皮素购自美国Sigma公司;LC3、mTOR、GAPDH抗体及HRP标记二抗购自美国Cell signaling公司;CCK-8细胞增殖检测试剂盒购自碧云天生物技术有限公司;Transwell小室和Matrigel购自美国BD公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞处理及分组 将RF/6A细胞置于含有10%胎牛血清、100 U/mL青霉素和100 U/mL链霉素的DMEM培养基中,在37℃、饱和湿度下的二氧化碳培养箱中培养。以每孔 5.0×10^5 个细胞接种于6孔板内,贴壁后按随机数字表法分组并处理细胞:对照组在DMEM培养基中培养,高糖组在DMEM培养基中加入30 mmol/L D-葡萄糖、高糖+柚皮素组在DMEM培养基中加入30 mmol/L D-葡萄糖及3 mg/L柚皮素。

1.2.2 细胞增殖 将细胞以 $10^4 \sim 10^5$ 个/孔的密度在96孔板中,每孔100 μ L培养基,含有或不含有待测化合物。根据不同分组处理细胞,然后在二氧化碳培养箱中于37℃培养24 h。使用重复移液器向96孔板的每个孔中加入10 μ L CCK-8溶液,将培养板在培养箱中孵育4 h。在轨道振动器上轻轻混合10 min,使用酶标仪测量450 nm处的吸光度。细胞增殖率(%)=[(As-Ab)/(Ac-Ab)] \times 100。As为实验孔吸光度,Ab为空白孔吸光度,Ac为对照孔吸光度。

1.2.3 细胞迁移 以每孔 5×10^5 个细胞将RF/6A细胞接种至6孔板中,37℃、5%二氧化碳饱和湿度条件过夜培养。按照不同分组加药处理24 h,0.25%胰酶消化收集细胞,离心去上清,无血清培养基重悬细胞,稀释细胞浓度至 2×10^5 个/毫升。在24孔板中加入800 μ L含10%胎牛血清的培养基,并放入Transwell小室,在上室分别接入200 μ L各组细胞悬液,37℃、5%二氧化碳培养箱培养48 h。取出Transwell小室,清洗后用70%冰乙醇固定细胞1 h。0.5%结晶紫染色,室温放置20 min,擦净上室一侧的未迁移的细胞,显微镜下观察拍照。每个小室随机选取3个视野,对迁移的细胞进行计数。

1.2.4 管腔形成 将Matrigel放于冰盒中,在4℃冰箱中过夜融化,并预冷枪头和24孔板。向24孔板内缓慢加入液态Matrigel,每孔200 μ L,37℃孵育1 h。取不同分组的细胞,消化后用无血清培养基制备单细胞悬液,以每孔 2×10^5 个将细胞接种到铺好胶的24孔板,37℃过夜后显微镜拍照,随机取3个放大100倍的视野,Image J软件对血管腔进行计数。

1.2.5 蛋白质印迹法(Western blotting) 常规提取单层贴壁细胞总蛋白,测定蛋白浓度和蛋白变性。制备电泳胶,将40 μ g等量总蛋白加样到SDS-PAGE凝胶上进行电泳分离。取出凝胶根据Marker切下目的条带,然后将蛋白转移至PVDF膜上。在室温下用含5%脱脂奶粉的TBST封闭PVDF膜2 h,用封闭液稀释的一抗LC3、mTOR、p-mTOR及GAPDH(均为1:1 000)浸泡PVDF膜,4℃孵育过夜。充分洗膜,用稀释的HRP标记二抗浸泡PVDF膜,37℃摇床孵育2 h。TBST充分洗膜后ECL显色曝光,晾干、扫描胶片,用BandScan分析胶片灰度值。

1.3 统计学方法 本研究的实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用统计软件SPSS 19.0进行分析,组间差异采用方差分析和LSD法比较,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 柚皮素促进高糖下的细胞增殖 CCK-8实验结果显示,培养24 h后,各组RF/6A细胞均有不同程度生长(图1)。三组RF/6A细胞的增殖率:对照组(99.43 \pm 0.07)%,高糖组(72.08 \pm 2.12)%,高糖+柚皮素组(90.54 \pm 1.47)%。三组间的细胞增殖率差异有统计学意义($F=246.35$, $P=0.000$);组间两两比较显示,高糖组细胞增殖率比对照组减小($t=21.31$, $P=0.000$),柚皮素增加高糖条件下的细胞增殖率($t=12.39$, $P=0.000$)。以上结果提示,高糖条件下的RF/6A增殖明显减弱,柚皮素对高糖下的细胞生长具有保护作用。

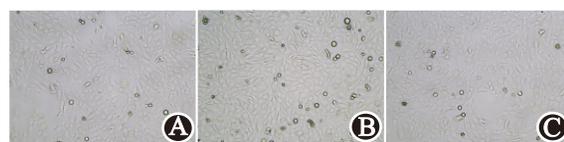


图1 各组RF/6A细胞形态($\times 100$):A为对照组;B为高糖组;C为高糖+柚皮素组

2.2 柚皮素抑制高糖下的细胞迁移 Transwell实验结果显示,各组细胞均发生不同程度的迁移。对照组、高糖组、高糖+柚皮素组RF/6A细胞的迁移数分别为(120.33 \pm 6.03)、(149.00 \pm 9.17)、(76.33 \pm 5.51)个。统计比较显示,三组间的细胞迁移数的差异有

统计学意义($F=80.03$, $P=0.000$);组间两两比较显示,高糖组细胞迁移数比对照组增加($t=4.53$, $P=0.011$),柚皮素减少高糖条件下的细胞迁移数($t=11.77$, $P=0.000$)(图2)。以上结果提示,高糖下的RF/6A迁移增强,柚皮素对高糖下的细胞迁移具有抑制作用。

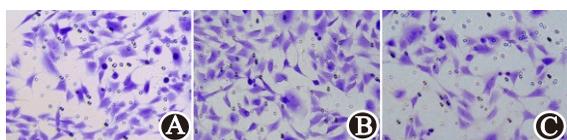


图2 各组RF/6A细胞迁移(结晶紫染色 $\times 200$):A为对照组;B为高糖组;C为高糖+柚皮素组

2.3 柚皮素抑制高糖下的细胞管腔形成 Matrigel实验结果显示,各组细胞均有管腔样结构的形成。对照组、高糖组、高糖+柚皮素组RF/6A细胞管腔形成数分别为(11.00 ± 1.00)、(17.33 ± 2.52)、(7.67 ± 1.53)个。统计比较显示,三组间的细胞管腔形成数差异有统计学意义($F=22.45$, $P=0.002$);组间两两比较显示,高糖组细胞管腔形成数比对照组增加($t=4.05$, $P=0.015$),柚皮素可减少高糖条件下的细胞管腔形成数($t=5.69$, $P=0.005$)(图3)。以上结果提示,高糖下的RF/6A血管样结构形成增强,柚皮素对高糖下的细胞管腔形成具有抑制作用。

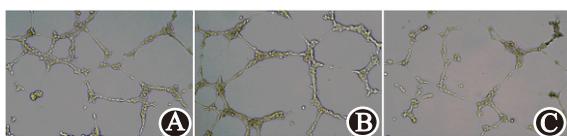
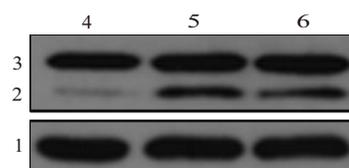


图3 各组RF/6A细胞管腔形成($\times 100$):A为对照组;B为高糖组;C为高糖+柚皮素组

2.4 柚皮素抑制高糖下的自噬激活 Western blotting实验结果显示,对照组、高糖组、高糖+柚皮素组RF/6A细胞LC3-I的相对表达量分别为(0.74 ± 0.09)、(0.73 ± 0.15)、(0.78 ± 0.14),三组间比较总体差异无统计学意义($F=0.131$, $P=0.880$)。对照组、高糖组、高糖+柚皮素组RF/6A细胞LC3-II的相对表达量分别为(0.14 ± 0.03)、(0.48 ± 0.05)、(0.28 ± 0.10),三组间比较总体差异有统计学意义($F=18.87$, $P=0.003$)。组间两两比较显示,高糖组LC-II的表达比对照组增加($t=9.99$, $P=0.001$),柚皮素可减少高糖条件下的LC-II表达($t=3.13$, $P=0.035$)(图4)。以上结果提示,高糖下的RF/6A自噬增强,柚皮素对高糖诱导的细胞自噬具有抑制作用。

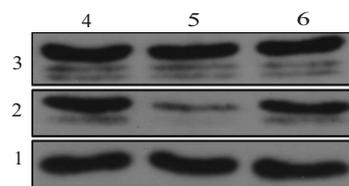
2.5 柚皮素抑制高糖下自噬激活的机制 Western blotting实验结果显示,对照组、高糖组、高糖+柚皮素组RF/6A细胞mTOR的相对表达量为($0.73\pm$



注:1—GAPDH;2—LC3-II;3—LC3-I;4—对照组;5—高糖组;6—高糖+柚皮素组。

图4 各组RF/6A细胞LC3的蛋白表达

0.10)、(0.79 ± 0.07)、(0.83 ± 0.05),三组间比较总体差异无统计学意义($F=1.22$, $P=0.359$)。对照组、高糖组、高糖+柚皮素组RF/6A细胞p-mTOR的相对表达量为(0.69 ± 0.09)、(0.18 ± 0.04)、(0.58 ± 0.09),三组间比较总体差异有统计学意义($F=36.82$, $P=0.000$)。组间两两比较显示,高糖组p-mTOR的表达比对照组减少($t=9.39$, $P=0.001$),柚皮素可增加高糖条件下的p-mTOR表达($t=6.87$, $P=0.002$)(图5)。以上结果提示,高糖条件下mTOR信号通路受到抑制,柚皮素可促进高糖下mTOR自噬信号通路的激活。



注:1—GAPDH;2—p-mTOR;3—mTOR;4—对照组;5—高糖组;6—高糖+柚皮素组。

图5 各组RF/6A细胞mTOR和p-mTOR的蛋白表达

3 讨论

DR的发病机制很复杂,临床治疗棘手,目前主要以防治视网膜新生血管产生和抑制其发展为主。近年来,中药抑制眼部新生血管形成已经成为眼科药物研究的热点。酚类化合物是植物次生代谢产物的重要组成部分,黄酮类化合物是在天然药物中发现的主要酚类化合物。有研究显示,多种黄酮类药物有较强的抑制眼部新生血管的作用,如柚皮素、柚皮素、芹黄素等^[10-11]。早期对视网膜上皮和内皮细胞的研究显示,柚皮素能够促进人视网膜色素上皮细胞增殖,抑制人脐静脉内皮细胞生长,同时对这两种细胞均有抗氧化作用,认为柚皮素是治疗老年性黄斑变性的很有前景的候选药物^[7]。本研究利用DR的细胞模型,参考上述研究的柚皮素作用浓度,在体外首次观察了柚皮素对糖尿病视网膜新生血管形成的影响。结果提示,柚皮素对高糖环境下的视网膜血管内皮细胞存活与增殖具有保护作用,对细胞迁移和管腔形成具有明显的抑制作用,即提示柚皮素能抑制DR中视网膜新生血管的

形成。

柚皮素广泛存在于芸香科柑橘属植物的果皮和果肉中,如葡萄皮、番茄皮、葡萄柚、橙、枸橼等^[12]。近年来,大量国内外学者对柚皮素的结构、理化性质及其在氧化应激、炎症、癌症、糖尿病、心血管疾病和神经系统疾病中的应用和在不同疾病中的治疗作用进行了研究^[13]。在细胞研究方面,Zygmunt等^[14]发现柚皮素治疗能通过增加AMPK的活化增强L6肌细胞对葡萄糖的摄取。柚皮素可显著降低3T3-L1前体脂肪细胞增殖,且效应呈剂量依赖性,伴随乳酸脱氢酶(LDH)释放量的增加而不影响甘油三酯的累积或脂肪细胞分化过程中脂肪发生基因(PPAR-g和STAT3)的表达^[15]。柚皮素处理人肝癌细胞HepG2能明显减少载脂蛋白B(ApoB)的累积和细胞胆固醇酯质量,降低乙酰辅酶A乙酰转移酶2(ACAT2)mRNA水平和微粒体三酰甘油转运蛋白(MTP)的水平和活性,增加低密度脂蛋白(LDL)受体mRNA水平及LDL的摄取和降解。这些结果提示柚皮素的这些效应可能会减弱体内高血糖、高脂血症和胰岛素抵抗^[16]。观察柚皮素对胰腺β细胞的研究发现,柚皮素处理大鼠胰腺INS-1E细胞,增强了葡萄糖刺激的胰岛素分泌和几个β细胞基因的表达,还能降低促凋亡标志物mRNA水平,提示柚皮素在β细胞中的作用可增加葡萄糖敏感性和防止β细胞凋亡^[17]。动物实验表明,在链脲佐菌素(STZ)诱导的糖尿病动物中应用柚皮素可恢复血糖和血脂水平,减少糖尿病肾病,柚皮素给药可产生抗炎和抗氧化作用^[18]。临床研究发现,每天摄入柚皮素(5.0 mg/kg)可降低缺血性心脏病、脑血管疾病、特定癌症和哮喘的死亡率,降低2型糖尿病风险^[19]。血液中柚皮素水平与肥胖、收缩压、舒张压呈负相关,与血清三酰甘油水平、腰围、胰岛素抵抗呈负相关,与血清高密度脂蛋白(HDL)水平呈正相关^[20]。每天给予柚皮素400 mg 8周,高胆固醇血症者的血浆总胆固醇和LDL胆固醇降低,而HDL和甘油三酯的浓度则不受影响。此外,柚皮素治疗显著降低ApoB水平,显著提高红细胞SOD和CAT活性,降低GSH-Px活性和血浆TBARS水平^[21]。在另一项研究中,给超重个体服用含有柚皮素的柑橘多酚提取物(900 mg/kg)12周,其体重和血糖水平显著降低^[22]。

以上细胞、动物和临床研究均证实,柚皮素对糖尿病及其并发症具有治疗作用,但在DR视网膜新生血管中的作用还不清楚,本研究初步证实柚皮素可有效抑制DR视网膜新生血管的形成。有关柚皮素在DR中的作用机制,Al-Dosari等给糖尿病大

鼠口服柚皮素,发现它能改善糖尿病大鼠体内硫代巴比妥酸反应性物质水平的升高和谷胱甘肽水平的降低,能使下降的糖尿病视网膜神经保护因子脑源性神经营养因子、原肌球蛋白相关激酶B和突触素水平升高,改善细胞凋亡调节蛋白水平,认为柚皮素具有抗糖尿病、抗氧化和抗凋亡的作用,可通过提供神经营养支持来阻止DR中的视网膜损伤^[23]。自噬是一种重要的细胞机制,在正常的生理过程中起着“管家”的作用,包括清除长寿、聚集和错误折叠的蛋白质,清除受损的细胞器,调节生长和衰老。自噬还涉及多种生物功能,如发育、细胞分化、抵御病原体和营养缺乏^[24]。LC3是最常用的自噬分子标记物,当自噬发生时,LC3- I在泛素样反应酶的作用下与磷脂酰乙醇胺偶联生成LC3- II,采用Western blotting检测LC3- I与LC3- II之间的转化是常用的自噬活性检测手段^[25]。mTOR是自噬信号通路的重要分子,mTOR主要通过其下游分子p70S6K和eIF4E调节Atg1/ULK等自噬相关分子的活性,最终发挥对细胞自噬的负性调控作用,而磷酸化的mTOR(p-mTOR)是通路活化的生物学标志^[26-27]。自噬的分子机制非常复杂,涉及多个信号通路在各个步骤的协同作用。近年来研究提示自噬过程参与DR的病理生理学机制,如mTOR,自噬相关基因(ATG)等在DR中的表达水平发生明显改变^[28-29]。既往研究提示自噬可被高糖激活,进而促进RF/6A细胞的血管生成过程^[30]。心血管方面的研究提示,柚皮素可对抗高糖诱导的人心肌细胞自噬^[31]。肺部疾病的研究也发现,柚皮素可抑制自噬介导的肺炎和纤维化,对肺炎支原体感染后气道重塑发挥保护作用^[32]。鉴于自噬在细胞稳态和疾病中的重要性,本研究探讨了柚皮素抑制RF/6A血管形成与自噬的关系,发现高糖诱导的LC3- II表达增加可被柚皮素明显抑制。高糖条件可减少p-mTOR的表达,而柚皮素处理可增强p-mTOR的表达,提示柚皮素可通过增强自噬抑制蛋白mTOR的表达来减轻高糖诱导的细胞自噬,进而抑制血管形成。

在全世界范围内,糖尿病的发病率正在逐年攀升。糖尿病患者罹患多种全身和眼部疾患,其中最常见眼部微血管并发症就是DR。DR是全球视力下降和失明的主要原因之一,有效防治DR已是全球关注的热点,更是我国亟须解决的重大课题,本研究结果提示利用具有抗糖尿病和调节自噬的黄酮类化合物柚皮素来预防和治疗DR为临床提供了一种可能。

参考文献

- [1] FLAXMAN SR, BOURNE RRA, RESNIKOFF S, et al. Global causes of blindness and distance vision impairment 1990 - 2020:

- a systematic review and meta-analysis [J/OL]. *Lancet Glob Health*, 2017, 5(12): e1221-e1234. DOI: 10.1016/S2214-109X(17)30393-5.
- [2] SONG P, YU J, CHAN KY, et al. Prevalence, risk factors and burden of diabetic retinopathy in China: a systematic review and meta-analysis [J/CD]. *J Glob Health*, 2018, 8(1): 010803. DOI: 10.7189/jogh.08.010803.
- [3] WILKINSON CP, FERRIS FL 3RD, KLEIN RE, et al. Proposed international clinical diabetic retinopathy and diabetic macular edema disease severity scales [J]. *Ophthalmology*, 2003, 110(9): 1677-1682.
- [4] BAHRAMI B, HONG T, GILLES MC, et al. Anti-VEGF therapy for diabetic eye diseases [J]. *Asia Pac J Ophthalmol (Phila)*, 2017, 6(6): 535-545.
- [5] ANNADURAI T, THOMAS PA, GERALDINE P. Ameliorative effect of naringenin on hyperglycemia-mediated inflammation in hepatic and pancreatic tissues of Wistar rats with streptozotocin-nicotinamide-induced experimental diabetes mellitus [J]. *Free Radic Res*, 2013, 47(10): 793-803.
- [6] ALAM MA, SUBHAN N, RAHMAN MM, et al. Effect of citrus flavonoids, naringin and naringenin, on metabolic syndrome and their mechanisms of action [J]. *Adv Nutr*, 2014, 5(4): 404-417.
- [7] LIN BQ, CHIOUGEORGE CY. Antioxidant activity of naringenin on various oxidants induced damages in ARPE-19 cells and HUVEC [J]. *Int J Ophthalmol*, 2008, 8(10): 1963-1967.
- [8] JIE JI, XU XR, CHIOUGEORGE CY. Effects of naringenin on ocular blood flow and choroidal neovascularization in experimental animals [J]. *Int J Ophthalmol*, 2009, 2(4): 320-323.
- [9] 徐新荣, 于海涛, 杭丽, 等. 柚皮素铜、锌配合物的制备及其对大鼠实验性脉络膜新生血管的抑制作用[J]. *南京中医药大学学报*, 2013, 29(6): 544-547.
- [10] 岳岩坤, 王海伟, 邓禹, 等. 槲皮素通过整合素信号通路调控视网膜脉络膜新生血管生成的机制研究[J]. *中华实验眼科杂志*, 2018, 36(8): 602-607.
- [11] ZOU Y, CHIOU GC. J Apigenin inhibits laser-induced choroidal neovascularization and regulates endothelial cell function [J]. *Ocul Pharmacol Ther*, 2006, 22(6): 425-430.
- [12] PATEL K, SINGH GK, PATEL DK. A review on pharmacological and analytical aspects of naringenin [J]. *Chin J Integr Med*, 2018, 24(7): 551-560.
- [13] JOSHI R, KULKARNI YA, WAIRKAR S. Pharmacokinetic, pharmacodynamic and formulations aspects of naringenin: an update [J]. *Life Sci*, 2018, 215: 43-56.
- [14] ZYGMUNT K, FAUBERT B, MACNEIL J, et al. Naringenin, a citrus flavonoid, increases muscle cell glucose uptake via AMPK [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 398(2): 178-183.
- [15] HARMON AW, HARP JB. Differential effects of flavonoids on 3T3-L1 adipogenesis and lipolysis [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2001, 280(4): C807-813. DOI: 10.1152/ajpcell.2001.280.4.C807.
- [16] WILCOX LJ, BORRADAILE NM, de Dreu LE, et al. Secretion of hepatocyte apoB is inhibited by the flavonoids, naringenin and hesperetin, via reduced activity and expression of ACAT2 and MTP [J]. *J Lipid Res*, 2001, 42(5): 725-734.
- [17] BHATTACHARYA S, OKSBJERG N, YOUNG JF, et al. Caffeic acid, naringenin and quercetin enhance glucose-stimulated insulin secretion and glucose sensitivity in INS-1E cells [J]. *Diabetes Obes Metab*, 2014, 16(7): 602-612.
- [18] AHMED OM, HASSAN MA, ABDEL-TWAB SM, et al. Navel orange peel hydroethanolic extract, naringin and naringenin have anti-diabetic potentials in type 2 diabetic rats [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 94: 197-205.
- [19] KNEKT P, KUMPULAINEN J, JÄRVINEN R, et al. Flavonoid intake and risk of chronic diseases [J]. *Am J Clin Nutr*, 2002, 76(3): 560-568.
- [20] FAROOK VS, REDDIVARI L, CHITTOOR G, et al. Metabolites as novel biomarkers for childhood obesity-related traits in Mexican-American children [J]. *Pediatr Obes*, 2015, 10(4): 320-327.
- [21] JUNG UJ, KIM HJ, LEE JS, et al. Naringin supplementation lowers plasma lipids and enhances erythrocyte antioxidant enzyme activities in hypercholesterolemic subjects [J]. *Clin Nutr*, 2003, 22(6): 561-568.
- [22] DALLAS C, GERBI A, ELBEZ Y, et al. Clinical study to assess the efficacy and safety of a citrus polyphenolic extract of red orange, grapefruit, and orange (Sinetrol-XPur) on weight management and metabolic parameters in healthy overweight individuals [J]. *Phytother Res*, 2014, 28(2): 212-218.
- [23] AL-DOSARI DI, AHMED MM, AL-REJAIE SS, et al. Flavonoid naringenin attenuates oxidative stress, apoptosis and improves neurotrophic effects in the diabetic rat retina [J]. *Nutrients*, 2017, 9(10): 9101161. DOI: 10.3390/nu9101161.
- [24] RAVANAN P, SRIKUMAR IF, TALWAR P. Autophagy: The spotlight for cellular stress responses [J]. *Life Sci*, 2017, 188: 53-67.
- [25] KLIONSKY DJ, ABDELMOHSEN K, ABE A, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition) [J]. *Autophagy*, 2016, 12(1): 1-222.
- [26] NAZIO F, STRAPPAZZON F, ANTONIOLI M, et al. mTOR inhibits autophagy by controlling ULK1 ubiquitylation, self-association and function through AMBRA1 and TRAF6 [J]. *Nat Cell Biol*, 2013, 15(4): 406-416.
- [27] ANNOVAZZI L, MELLAI M, CALDERA V, et al. mTOR, S6 and AKT expression in relation to proliferation and apoptosis/autophagy in glioma [J]. *Anticancer Res*, 2009, 29(8): 3087-3094.
- [28] ROSA MD, DISTEFANO G, GAGLIANO C, et al. Autophagy in diabetic retinopathy [J]. *Curr Neuropharmacol*, 2016, 14(8): 810-825.
- [29] WANG W, WANG Q, WAN D, et al. Histone HIST1H1C/H1.2 regulates autophagy in the development of diabetic retinopathy [J]. *Autophagy*, 2017, 13(5): 941-954.
- [30] DU JH, LI X, LI R, et al. Role of autophagy in angiogenesis induced by high glucose condition in RF/6A cells [J]. *Ophthalmologica*, 2017, 237(2): 85-95.
- [31] 梁国标. 柚皮素通过上调 miR-30d-5p 的水平对抗高糖诱导的人 AC16 心肌细胞的凋亡和自噬 [D]. 湛江: 广东医科大学, 2017.
- [32] LIN Y, TAN D, KAN Q, et al. The protective effect of naringenin on airway remodeling after mycoplasma pneumoniae infection by inhibiting autophagy-mediated lung inflammation and fibrosis [J]. *Mediators Inflamm*, 2018, 2018: 8753894. DOI: 10.1155/2018/8753894.

(收稿日期: 2019-10-15, 修回日期: 2019-12-03)