

陈春宇, 张佳琪, 李依萍, 等. 8 种别样茶对 AGEs 抑制能力的筛选及其抑制机制探究 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(24): 32–37. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022020105

CHEN Chunyu, ZHANG Jiaqi, LI Yiping, et al. Research of 8 Non-*Camellia* Teas on AGEs Inhibitory Ability and Their Mechanisms[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(24): 32–37. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022020105

· 研究与探讨 ·

8 种别样茶对 AGEs 抑制能力的筛选及其抑制机制探究

陈春宇^{1,2}, 张佳琪^{1,2}, 李依萍^{1,2}, 米娜^{1,2}, 李丽^{1,2}, 易帆^{1,2,*}

(1. 北京工商大学化学与材料工程学院, 北京市植物资源研究开发重点实验室, 北京 100048;

2. 北京工商大学, 中国轻工业化妆品重点实验室, 北京 100048)

摘要: 目的: 本研究通过检测非酶糖基化终末产物 (advanced glycation end-products, AGEs) 生成量评价 8 种别样茶的糖基化抑制能力, 并探究抑制效果较好的别样茶对 AGEs 生成各阶段的抑制作用机制。方法: 本研究首先对 8 种别样茶水提液中总黄酮含量进行检测, 接着通过构建体外蛋白质非酶糖基化模型实验检测了 8 种别样茶抑制 AGEs 生成的能力, 最后择优测定其对糖基化早期产物果糖胺、中期产物活性羰基化合物以及蛋白质交联的抑制能力, 从而探究其对非酶糖基化反应的抑制机制。结果: 大叶苦丁茶 (*Ilex latifolia* Thunb) 和甜茶 (*Rubus suavissimus* S. Lee) 对 AGEs 的抑制效果在 8 种别样茶中较为突出, 50 $\mu\text{g/mL}$ 时 AGEs 抑制率分别达到了 $76.31\% \pm 0.87\%$ 和 $81.75\% \pm 0.41\%$; 大叶苦丁茶和甜茶主要通过抑制糖基化早期、中期产物的生成量来减少 AGEs 的产生。其中, 500 $\mu\text{g/mL}$ 甜茶对果糖胺抑制率最高 (59.12%), 蛋白质交联抑制率最高 (81.41%), 5000 $\mu\text{g/mL}$ 大叶苦丁茶对活性羰基化合物抑制率最高 (94.24%)。结论: 大叶苦丁茶及甜茶可以作为抑制糖基化反应的功能食品, 本研究可为具有抑制 AGEs 产生功效原料的综合开发利用提供一定的理论依据。

关键词: 别样茶, 抑制非酶糖基化, 糖基化终末产物, 非酶糖基化反应, 大叶苦丁茶, 甜茶

中图分类号: TS272

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2022)24-0032-06

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022020105



本文网刊:

Research of 8 Non-*Camellia* Teas on AGEs Inhibitory Ability and Their Mechanisms

CHEN Chunyu^{1,2}, ZHANG Jiaqi^{1,2}, LI Yiping^{1,2}, MI Na^{1,2}, LI Li^{1,2}, YI Fan^{1,2,*}

(1. Beijing Key Laboratory of Plant Resources Research and Development, School of Chemistry and Materials Engineering, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China;

2. China Light Industry Cosmetics Key Laboratory, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China)

Abstract: Objective: The glycation inhibition of 8 different non-*Camellia* teas was evaluated by detecting the content of non-enzymatic advanced glycation end-products (AGEs) and the inhibition mechanism of different teas with good inhibition effect on AGEs formation at various stages were investigated. Methods: Firstly, the total flavonoid content of the water extracts of 8 non-*Camellia* teas water extracts were detected, then all teas were tested by constructing an *in vitro* protein non-enzymatic glycation model experiment to evaluate the ability of inhibit the production of AGEs. Finally, the inhibitory ability of fructosamine (early glycation product), active carbonyl compound (intermediate glycation product), and the protein cross-linking were determined to explore the inhibitory mechanism of the non-enzymatic glycation reaction. Results: The inhibitory effect of *Ilex latifolia* tea and *Rubus suavissimus* tea on AGEs showed more prominent among the eight non-*Camellia* teas, and the inhibitory rate of AGEs reached at $76.31\% \pm 0.87\%$ and $81.75\% \pm 0.41\%$ at 50 $\mu\text{g/mL}$

收稿日期: 2022-02-15

基金项目: 北京市教委一般科技项目 (KM202010011009)。

作者简介: 陈春宇 (1997-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 特色植物资源研究与开发, E-mail: chenchunyu97@163.com。

* 通信作者: 易帆 (1989-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 中国特色植物资源开发及中医组方信息挖掘、中国人群皮肤本态研究, E-mail: fantasyee@btbu.edu.cn。

respectively. Further experimental results showed that *Ilex latifolia* tea and *Rubus suavissimus* tea mainly reduced the production of AGEs by inhibiting the formation of early and intermediate products of glycation, and 500 $\mu\text{g/mL}$ *Rubus suavissimus* tea had the highest inhibition rate of fructosamine(59.12%) and protein cross-linking inhibition rate (81.41%), 5000 $\mu\text{g/mL}$ *Ilex latifolia* tea had the highest inhibition rate of active carbonyl compounds (94.24%). Conclusion: *Ilex latifolia* tea and *Rubus suavissimus* tea could be used as functional foods to inhibit glycation reaction. This study could provide a theoretical basis for the comprehensive development and utilization of anti-glycation diet materials.

Key words: non-*Camellia* tea; anti-glycation; advanced glycation end products; glycation; *Ilex latifolia*; *Rubus suavissimus*

非酶糖基化反应又称美拉德反应^[1],当还原糖与氨基反应生成不稳定的希夫碱(Schiff bases),继而重排形成较稳定的阿马多里(Amadori)重排产物,称早期糖化产物;阿马多里重排产物与蛋白质的氨基作用,糖基部分经脱水反应后形成不饱和醛酮化合物;醛酮化合物再与蛋白质的游离氨基作用,蛋白质因分子间或分子内交联及裂解而变性,最终生成不可逆的非酶糖基化终末产物(Advanced Glycation End Products, AGEs)^[2]。

AGEs 的积累与许多退行性过程或疾病的发展相关^[3-4],包括糖尿病^[5]、心血管疾病^[6]、神经紊乱^[7]、动脉粥样硬化^[8]及其并发症等,以及加重涉及氧化应激机制的病理过程和加快衰老的进程^[9]。AGEs 能激活受体 RAGE,进而诱导并进一步促进氧化应激反应发生,同样诱导炎症级联反应发生以及促进促炎细胞因子、生长因子的表达^[10]。AGEs 还可以通过交联胞内外蛋白质,破坏蛋白结构、变形,最终使蛋白失去生物学特性。因此,AGEs 抑制剂作为预防或减轻这些疾病的治疗药物十分具有前景。

AGEs 抑制剂主要分为合成和天然两大类。化学合成抑制剂如氨基胍(AG)、吡哆胺、二甲双胍等虽然具有抑制 AGEs 的作用,但也伴随着肠胃功能紊乱、罕见血管炎等副作用和安全隐患^[11]。因此,从食物中提取天然生物活性物质开发成 AGEs 抑制剂已引起研究人员的广泛关注。研究表明,多酚类化合物是天然 AGEs 抑制剂的重要来源,肉桂酸及其衍生物、绿原酸、丁香酸、香草酸、鞣花酸、槲皮素、染料木素、没食子酸等重要酚类化合物有效抑制糖基化已见报道^[12]。

别样茶(*non-Camellia* teas)在民间常作为预防及治疗疾病的药物,在部分地区和民族范围内有作茶

饮用的悠久历史,有一定的安全性基础,具有作为新药研究和保健品开发的潜力^[13]。有研究分析别样茶含有丰富的黄酮类、多酚类、萜类、挥发油、生物碱和有机酸类化合物,其中黄酮类、多酚类化合物在别样茶中占比最大^[14],具有较强的降糖作用和抗氧化活性。

目前国内确认属于可食用的别样茶有 20 余种,我们对其中具有降血糖、降血脂和抗氧化的别样茶进行了筛选,共整理出 8 种。本研究以此 8 种别样茶(大麦茶、大叶苦丁茶、枸杞茶、甜茶、湖北海棠、连翘叶茶、青钱柳茶、小叶苦丁茶)为研究对象,通过还原日常茶饮过程的水提法对其有效成分进行提取,并检测其中总黄酮化合物含量。随后通过构建体外牛血清白蛋白-果糖反应液孵育体系,模拟体内蛋白质非酶糖基化过程检测 8 种别样茶抑制晚期糖基化终末产物(AGEs)生成的能力,最终对筛选出抑制 AGEs 活性较好的大叶苦丁茶及甜茶进一步检测其对非酶糖基化反应早期产物果糖胺、中期产物活性羰基化合物以及蛋白质交联的抑制能力。本文旨在探索别样茶抑制非酶糖基化功效,并阐明其对糖基化过程的抑制机制。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

8 种别样茶(见表 1) 分别采购于相应产区;芦丁标准品、亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠、十二水合磷酸氢二钠、二水合磷酸二氢钠 国药集团化学试剂有限公司;果糖、牛血清白蛋白 碧云天生物技术有限公司;硫酸氨基胍、叠氮化钠 西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司;果糖胺检测试剂盒、活性羰基化合物检测试剂盒 北京百瑞极生物科技有限公司。

TB-2002 电子天平 北京赛多利斯仪器系统有

表 1 8 种别样茶功效成分
Table 1 functional ingredients of 8 non-*Camellia* teas

名称	基源植物 ^[15]	主要成分 ^[14]	降血糖	抗氧化	降血脂	参考文献
大麦茶	大麦 <i>Hordeum vulgare</i> L.	蛋白质、氨基酸、不饱和脂肪酸等	√	√	√	[16]
大叶苦丁茶	大叶冬青 <i>Ilex latifolia</i> Thunb	黄酮类、三萜及其皂苷类 ^[17]	√	√	√	[17]
枸杞茶	枸杞 <i>Lycium chinense</i> Mill.	黄酮类、多糖 ^[18-19]	√	√	√	[18-19]
甜茶 ^[20]	甜茶 <i>Rubus suavissimus</i> S. Lee	甜茶素、黄酮类、酚酸类	√	√	√	[20]
湖北海棠	湖北海棠 <i>Malus hupehensis</i> (Pamp.) Rehder	黄酮类、多酚类、蛋白质和微量元素 ^[21]	√	√		[21]
连翘叶茶	连翘 <i>Forsythia suspensa</i> (Thunb.) Vahl	黄酮类、木脂素类、酯、醇等类化合物 ^[22]	√	√	√	[22]
青钱柳茶 ^[20]	青钱柳 <i>Cyclocarya paliurus</i> (Batal.) Iljinsk.	黄酮类、多糖类和三萜类 ^[15]	√	√	√	[15]
小叶苦丁茶	粗壮女贞 <i>Ligustrum pricei</i> Hayata	萜类、苯丙素类及黄酮类 ^[23]		√	√	[23]

限公司;XS205 分析天平 梅特勒-托利多国际贸易(上海)有限公司;XL-10B 粉碎机 广州市旭朗机械设备有限公司;DW-86L388A 超低温保存箱 海尔集团;VIRTIS 冷冻干燥机 北京艾泽信科技公司;N-1200A 旋转蒸发仪 上海爱朗仪器有限公司;ILMVAC GmbH 真空抽滤机 上海易晟机电科技有限公司;M200PRO 多功能酶标仪,TECAN;KYC-100B 恒温箱 上海福玛实验设备有限公司;QL861 涡旋器 海门市其林贝尔仪器制造公司;HWS24 型水浴锅 上海一恒科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 别样茶活性成分提取 将 8 种别样茶烘干粉碎,过 50 目筛备用。按料液比 1:50(g/mL),称取原料 4.0 g,去离子水 200 mL,80 ℃ 下回流提取 2 h,过滤。利用旋转蒸发仪将滤液真空浓缩 10 倍。将浓缩提取液倒入培养皿中,-80 ℃ 下冷冻 24 h,取出,用冻干机将别样茶有效物质干燥,称重,备用。

1.2.2 黄酮含量测定 采用亚硝酸钠-硝酸铝-氢氧化钠比色法进行实验,用 75% 乙醇将芦丁对照品溶解,制备质量浓度为 1.0 g/L 的芦丁溶液;用乙醇稀释得质量浓度分别为 0.0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg/mL 的对照品溶液;分别取 1 mL 不同浓度的芦丁对照品溶液于容量瓶(10 mL)中,依次加入 4 mL 去离子水和 0.3 mL 质量分数为 5% 的 NaNO_2 ,摇匀;5 min 后分别加入 0.3 mL 质量分数为 10% 的 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$,摇匀;待反应 6 min 后分别加入 2 mL 质量分数为 1 mol/L 的 NaOH;加入去离子水补齐至刻度线,静置 10 min 后测定 510 nm 处吸光值,以 75% 乙醇作为空白对照,得标准曲线 $y=7.1408x+0.0039$, $R^2=0.9979$ ($n=6$)。

分别称取适量 8 种别样茶冻干粉溶于去离子水中,配制质量浓度为 1 mg/mL 的溶液,分别取出 1 mL 于 10 mL 容量瓶中,依次加入 4 mL 去离子水和 0.3 mL 质量分数为 5% 的 NaNO_2 ,摇匀;5 min 后分别加入 0.3 mL 质量分数为 10% 的 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$,摇匀;待反应 6 min 后分别加入 2 mL 质量分数为 1 mol/L 的 NaOH;最后加入去离子水补齐至刻度线,静置 10 min 后测定 510 nm 处吸光值,以 75% 乙醇作为空白对照。黄酮得率计算如以下公式:

$$\text{黄酮得率}(\%) = \frac{V \times (y - 0.0039)}{7.1408 \times m} \times 100 \quad \text{式 (1)}$$

式中, V: 水提液总体积,200 mL; y: 黄酮含量测定中 510 nm 处的吸光度; m: 提取中加入样品的质量,4000 mg。

1.2.3 体外非酶糖基化抑制试验 参考 Spagnuolo 等^[24]的方法,配制 pH 为 7.3~7.4 的 PBS 溶液,并向其中加入 0.02% 叠氮化钠;以配制的 PBS 溶液为溶剂分别配制 20 mg/mL 牛血清白蛋白(BSA)溶液和 0.5 mol/L 果糖溶液,前者 0.45 μm 水系滤膜过滤;20 mg/mL BSA 溶液与 0.5 mol/L 果糖溶液 1:1 混匀得 BSA-果糖反应液备用。

用配制好的 PBS 稀释 1.2.1 中的别样茶提取物至 5000、500、50、10 $\mu\text{g/mL}$ 四个浓度。将受试物与反应液混合,作为样品组(A 组);将 PBS 与反应液混合,作为阴性对照组;以氨基胍为阳性对照物,与反应液混合作为阳性对照;受试物与 PBS 混合,作为空白对照。按表 2 给出的配比配制不同试验组作为孵育体系,于 37 ℃ 恒温培养箱避光孵育 5 d。

表 2 反应体系建立
Table 2 Establishment of reaction system

添加试剂	受试样品(mL)	PBS(mL)	反应液(mL)	阳性对照物(mL)
样品组(A组)	0.5	—	0.5	—
阴性对照组	—	0.5	0.5	—
阳性对照组	—	—	0.5	0.5
空白对照组	0.5	0.5	—	—

第 5 d,每个样品设定 3 个平行,使用荧光酶标仪,设定激发波长 370 nm 和发射波长 440 nm 检测结果为 3 次测定的算数平均值,计算 RSD(相对标准偏差)。3 个平行测定的荧光值 RSD 应 $\leq 3\%$,有时其中一个数值偏差大,导致 $\text{RSD} > 3\%$,应适当选取另两个平行测定的算数平均值作为检测结果。并根据公式 2 计算抑制率(IR):

$$\text{IR}(\%) = 1 - \frac{\text{RFU}_{\text{抑制组}} - \text{RFU}_{\text{空白组}}}{\text{RFU}_{\text{阴性对照组}}} \times 100 \quad \text{式 (2)}$$

1.2.4 果糖胺含量测定 参考 Liu 等^[25]的方法,非酶糖基化孵育体系的建立参照“1.2.3”中“表 3”所示,孵育时间调整为 3 d。将 10 μL 糖化牛血清白蛋白与硝基四氮唑蓝 NBT 显色液 200 μL 充分混匀作为样品孔,10 μL 牛血清白蛋白与 2 mmol/L N,N-二甲基甲酰胺(DMF)标准液混合作为标准孔,在 37 ℃ 下孵育 15 min,530 nm 下测定 OD 值。

$$\text{GSP 含量}(\text{mmol/L}) = \frac{\text{测定 OD 值} - \text{空白 OD 值}}{\text{标准 OD 值} - \text{标准空白 OD 值}} \times \text{标准品浓度}(2 \text{ mmol/L}) \quad \text{式 (3)}$$

式中,1 mmol/L=1 mmol/L $\times$ 分子量(249) $\times 10^{-3}$ =0.249 g/L

1.2.5 活性羰基化合物含量的检测 参考 Shin 等^[26]的方法,试验方法参照试剂盒说明书,非酶糖基化孵育体系的建立参照 1.2.4 中方法,孵育时间调整为 4 d。将 0.125 mL 样本与 0.750 mL 双蒸水进行混合后加入 0.125 mL 2,4-二硝基苯肼(DNPH)溶液,静置 5 mL,在 370 nm 测定吸光度值。

$$\begin{aligned} \text{羰基化合物含量}(\text{mg/mL}) = & \frac{\text{测定管吸光度} - \text{空白管吸光度}}{\text{标准管吸光度} - \text{空白管吸光度}} \times \text{标准品浓度}(1 \text{ mg/mL}) \times \\ & \text{样本测定前稀释倍数} \end{aligned} \quad \text{式 (4)}$$

1.2.6 硫黄素-T 分析蛋白质交联抑制率 参考吴夏青^[27]的方法,配制硫黄素 T(ThT)工作液,置于 4 ℃ 避光储存待用。将 10 μL 待测液(“1.2.4”中的孵育

体系)与 200 μL ThT 工作液(稀释 10 倍)混合,用酶标仪振荡均匀,在激发波长 440 nm,发射波长 482 nm 下测定荧光值。

$$IR(\%) = 1 - \frac{RFU_{\text{抑制组}} - RFU_{\text{空白组}}}{RFU_{\text{阳性对照组}}} \times 100$$

式 (5)

1.3 数据处理

所有实验重复 3 次,采用 Graph Prism 9 和 SPSS 软件整理分析数据,不同浓度的组间两两比较采用 two-way ANOVA 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义, $P<0.01$ 为差异高度显著, $P<0.001$ 为差异极显著,所得结果以平均值±标准偏差表示。

2 结果与分析

2.1 总黄酮含量

对 8 种别样茶总黄酮含量进行测定,表 3 为 8 种别样茶总黄酮含量及得率。结果表明:大叶苦丁茶的总黄酮含量最高,高达 4.8835 mg/mL,明显高于其他 7 种别样茶,其余 7 种别样茶的提取得率都低于 5.2%,黄酮含量相对较低。大麦茶中未检测出黄酮成分。

表 3 8 种别样茶提取物中总黄酮含量及总黄酮得率
Table 3 Flavonoid content and flavonoid extraction rate in 8 non-Camellia teas

别样茶种类	总黄酮含量(mg/mL)	总黄酮得率(%)
湖北海棠茶	1.0395	5.198
大麦茶	—	—
连翘叶茶	0.3823	1.911
小叶苦丁茶	0.7725	3.862
青钱柳茶	0.5385	2.682
甜茶	0.526	2.630
枸杞茶	0.5355	2.678
大叶苦丁茶	4.8835	24.42

注:—表示未检测到数值。

2.2 别样茶抑制非酶糖基化反应能力与总黄酮含量的相关性分析

非酶糖基化反应又称美拉德(Millard)反应,是发生在还原糖的羰基和蛋白质游离的氨基上的一系列复杂反应,最终生成晚期糖基化终末产物(AGEs),以 AGEs 抑制率作为指标,研究 8 种别样茶抑制非酶糖基化反应能力,结果见表 4。如表 4 所示,在最高浓度 5000 μg/mL 时,别样茶提取物均表现出较强烈的抑制作用,大叶苦丁茶、枸杞茶、甜茶、连翘叶茶以及青钱柳茶的提取物均表现出高于 90% 的抑制率,除了小叶苦丁茶外均呈现浓度依赖性。浓度降低至 50 μg/mL 时,大叶苦丁茶、甜茶提取物仍然保持较高的抑制率,远远高于同等浓度下的其他别样茶提取物以及阳性对照氨基胍 AG,大麦茶在该浓度下没有抑制效果。即使是最低浓度 10 μg/mL 下,大叶苦丁茶糖基化抑制率 19.26%±0.15%,甜茶抑制率 15.11%±0.86%,这两种别样茶提取物仍有抑制效果,远高于同等浓度下的其余的别样茶提取物。综合考

虑,大叶苦丁茶、甜茶的抑制 AGEs 产生的能力最强,因此选择这两种别样茶进行进一步的研究,探索它们的抑制非酶糖基化反应的机制。

表 4 8 种别样茶对体外非酶糖基化抑制率的影响
Table 4 Influence of 8 non-Camellia teas on the inhibition rate of non-enzymatic glycosylation in vitro

样品名称	抑制率(%)			
	5000 μg/mL	500 μg/mL	50 μg/mL	10 μg/mL
大麦茶提取物	67.67±0.31	7.840±2.00	—	—
大叶苦丁茶提取物	96.86±0.18	83.92±0.74	76.31±0.87	19.26±0.15
枸杞茶提取物	91.60±0.24	87.48±0.47	5.10±1.01	2.10±1.27
甜茶提取物	95.70±0.30	90.08±0.43	81.75±0.41	15.11±0.86
湖北海棠茶提取物	107.50±0.50	108.10±2.35	37.28±1.26	11.99±1.27
连翘叶茶提取物	95.81±0.22	90.95±0.20	20.36±1.51	9.10±1.94
青钱柳茶提取物	94.20±0.44	83.55±0.12	4.38±2.14	—
小叶苦丁茶提取物	81.18±0.23	88.47±0.27	7.90±1.29	1.74±1.52
氨基胍	96.93±0.03	74.65±0.36	14.64±0.70	—

注:“—”表示无抑制效果。

总黄酮得率较高的别样茶中,大叶苦丁茶、湖北海棠茶提取物均表现出较好的抗糖基化活性,在 50 μg/mL 浓度下仍有较高的抑制率。而没有总黄酮含量的大麦茶提取物在 50 μg/mL 时对糖基化反应无抑制效果。根据结果推测黄酮类化合物含量高的别样茶相较于含量低的别样茶抑制糖基化效果更好。随后采用 GraphPad Prism 9.0 进行糖基化抑制率与总黄酮含量的相关性分析,未能发现明显强相关性($r=0.6493$, $P=0.115$, 95% 置信区间: $-0.2030\sim 0.9418$)。

2.3 别样茶对果糖胺生成的抑制作用

果糖胺是非酶糖基化早期 Amadori 加合物的氧化产物,是非酶糖基化反应的早期阶段的标志性产物^[25],通过测定对果糖胺的抑制率,考察 2 种筛选出的别样茶提取物对非酶糖基化反应早期的抑制能力。如图 1 所示,在 50、500 和 5000 μg/mL 的浓度下,两种别样茶对果糖胺生成的抑制率均极显著高于阳性对照氨基胍的抑制作用($P<0.01$),大叶苦丁茶和

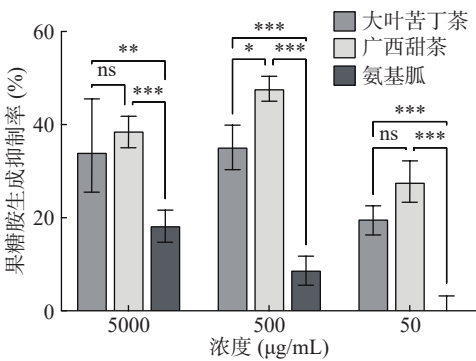


图 1 别样茶对果糖胺的抑制率

Fig.1 Inhibition rate of non-Camellia teas on fructosamine
注: *表示差异显著($P<0.05$); **表示差异高度显著($P<0.01$); ***表示差异极显著($P<0.001$); ns 表示差异不显著; 图 2~图 3 同。

甜茶抑制果糖胺能力较强,与 5000、50 $\mu\text{g/mL}$ 相比,在 500 $\mu\text{g/mL}$ 浓度时大叶苦丁茶和甜茶均表现出更强的抑制效果。甜茶相对大叶苦丁茶抑制能力更强,但两者并未表现出显著的差异性。

2.4 别样茶对活性羰基化合物的抑制率

非酶糖基化反应的第二阶段是羰基中间体的形成。羰基中间体是糖基化反应的标志物之一且具有高度的生理损害性,因此抑制活性羰基化合物的生成能抑制糖基化反应的发生及进程^[28]。通过测定糖化反应过程中期活性羰基化合物的水平,考察 2 种别样茶提取物对非酶糖基化反应中期的抑制能力,结果见图 2。在 50、500 和 5000 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度下,两种别样茶对蛋白质活性羰基化合物的抑制作用依然显著地高于阳性对照氨基胍的抑制作用,呈现出极其显著性差异($P<0.001$),大叶苦丁茶结果呈浓度依赖性。在高浓度(5000 $\mu\text{g/mL}$)时大叶苦丁茶的抑制能力要极显著高于甜茶($P<0.001$),而在低浓度(50 $\mu\text{g/mL}$)时甜茶的抑制能力要强于大叶苦丁茶($P<0.01$)。

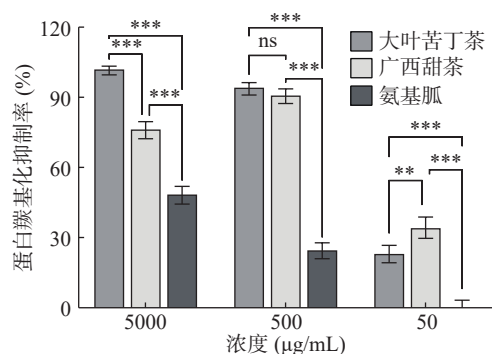


图 2 别样茶对活性羰基化合物的抑制率

Fig.2 Inhibition rate of non-Camellia teas on protein carbonylation

2.5 别样茶提取物对蛋白质交联结构的抑制作用

牛血清蛋白被糖基化后分子内活分子间含有大量淀粉样 β -交联结构,蛋白质与 AGEs 进行交联后会失去生物学特性,根据 ThT 结合交联结构后的荧光强度大小判定 β -交联结构水平。如图 3 所示,5000

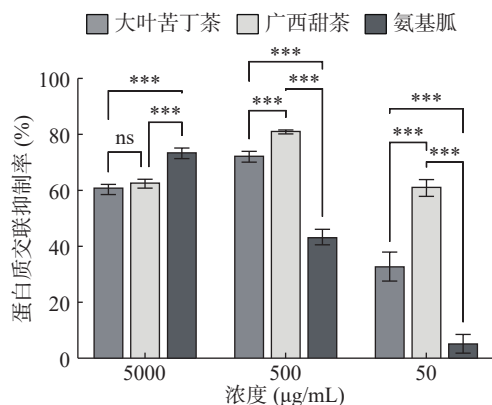


图 3 别样茶提取物浓度对蛋白质交联抑制率的影响

Fig.3 Effect of the concentration of non-Camellia tea extracts on the inhibition rate of protein cross-linking

$\mu\text{g/mL}$ 时,氨基胍的抑制能力极显著强于两种别样茶提取物($P<0.001$),在 50 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度下两种别样茶表现出较好的 AGEs 与蛋白质交联抑制能力,极显著性强于阳性对照氨基胍($P<0.001$),且甜茶的抑制能力要极其显著强于大叶苦丁茶($P<0.001$)。

3 结论

为获得抑制非酶糖基化能力强的别样茶,本研究通过模拟日常饮用状态对 8 种别样茶进行提取,并对其抑制 AGEs 生成的作用进行检测。筛选得到抑制效果较强的大叶苦丁茶和甜茶,实验表明这两种别样茶在最低浓度(10 $\mu\text{g/mL}$)下仍然发挥一定的抗糖基化能力。本研究同时检测各别样茶提取物的总黄酮含量,结果表明黄酮类化合物含量高的别样茶相较于含量低的别样茶抑制糖基化效果更好,但并未呈现出黄酮含量与其抗糖化之间的量效关系。

糖基化反应分为三个阶段,而果糖胺是早期阶段的标志性产物,活性羰基化合物是中期阶段的标志性产物。本研究筛选出大叶苦丁茶和甜茶并进一步探究其抑制非酶糖基化的机制。结果表明,2 种别样茶的抑制作用都主要集中在抑制糖基化中期产物活性羰基化合物的产生,抑制率达到了 90% 以上。且甜茶对蛋白质交联抑制率最高,为 81.41%。本研究首次报道大叶苦丁茶与甜茶具有强抑制 AGEs 生成的效果,并对其作用机制进行初步的探究。

AGEs 的积累与许多退行性过程或疾病的发展或加重有关,包括老化、动脉粥样硬化和糖尿病等。本研究为大叶苦丁茶和广西甜茶作为具有抑制非酶糖基化功效保健食品或抗糖基化功效化妆品原料提供科学理论依据。

参考文献

- [1] 齐睿婷.竹茹多糖的分离纯化及其抗糖化作用研究[D].杭州:浙江大学,2015. [QI R T. Isolation, purification and anti-glycation effect of bamboo Ru polysaccharide[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2015.]
- [2] DA M S C, WEBB M, WALLER H, et al. Skin autofluorescence, a non-invasive marker of advanced glycation end products: Clinical relevance and limitations[J]. *Postgraduate Medical Journal*, 2017, 93(1099): 289-294.
- [3] PALANISSAMI G, PAUL S F D. RAGE and its ligands: molecular interplay between glycation, inflammation, and hallmarks of cancer-a review[J]. *Horm Cancer*, 2018, 9(5): 295-325.
- [4] AHMAD S, KHAN H, SIDDIQUI Z, et al. AGEs, RAGEs and s-RAGE; friend or foe for cancer[J]. *Semin Cancer Biol*, 2018, 49: 44-55.
- [5] MAASEN K, VAN GREEVENBROEK M M J, SCHEIJEN J, et al. High dietary glycemic load is associated with higher concentrations of urinary advanced glycation endproducts: The cohort on diabetes and atherosclerosis maastricht (CODAM) study[J]. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2018, 110(2): 358-366.
- [6] LEE E J, KIM J Y, OH S H. Advanced glycation end products (AGEs) promote melanogenesis through receptor for AGEs[J]. *Sci-*

entific Reports, 2016, 6: 27848.

[7] LI J, LIU D, SUN L, et al. Advanced glycation end products and neurodegenerative diseases: Mechanisms and perspective[J]. *Journal of the Neurological Sciences*, 2012, 317(1-2): 1-5.

[8] MARTIN-VENTURA J L, RODRIGUES-DIEZ R, MARTINEZ-LOPEZ D, et al. Oxidative stress in human atherosclerosis: Sources, markers and therapeutic targets[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, 18(11): 2315.

[9] ZHOU L, WANG W, YANG C, et al. GADD45a promotes active DNA demethylation of the MMP-9 promoter via base excision repair pathway in AGEs-treated keratinocytes and in diabetic male rat skin[J]. *Endocrinology*, 2018, 159(2): 1172-1186.

[10] CHAVAKIS T, BIERHAUS A, NAWROTH P P. RAGE (receptor for advanced glycation end products): A central player in the inflammatory response[J]. *Microbes And Infection*, 2014, 6(13): 1219-1225.

[11] KHANGHOLI S, MAJID F A, BERWARY N J, et al. The mechanisms of inhibition of advanced glycation end products formation through polyphenols in hyperglycemic condition[J]. *Planta Med*, 2016, 82(1-2): 32-45.

[12] SADOWSKA-BARTOSZ I, BARTOSZ G. Prevention of protein glycation by natural compounds[J]. *Molecules*, 2015, 20(2): 3309-3334.

[13] 韩碧群, 彭勇, 肖培根. 中国别样茶的整理研究[J]. *中国现代中药*, 2013, 15(4): 259-269. [HAN B Q, PENG Y, XIAO P G. Research on the arrangement of Chinese different kinds of tea[J]. *Chinese Journal of Modern Chinese Medicine*, 2013, 15(4): 259-269.]

[14] 韩碧群. 中国别样茶的系统整理研究[D]. 北京: 北京协和医学院, 2012. [HAN B Q. Research on the systematic arrangement of chinese different kinds of tea[D]. Beijing: Peking Union Medical College, 2012.]

[15] 姜保平, 许利嘉, 乐亮, 等. 中国别样茶的多酚及其降糖作用[J]. *中国药理学杂志*, 2014, 49(9): 712-716. [JIANG B P, XU L J, LE L, et al. Polyphenols and their hypoglycemic effect of Chinese different kinds of tea[J]. *Chinese Journal of Pharmacy*, 2014, 49(9): 712-716.]

[16] 邢家宝. 大麦茶的研究应用概况[J]. *广东茶业*, 2021(1): 2-4. [XING J B. Research and application of barley tea[J]. *Guangdong Tea Industry*, 2021(1): 2-4.]

[17] 易帆, 彭勇, 许利嘉, 等. 大叶苦丁茶的研究进展[J]. *中国现代中药*, 2013, 15(8): 710-717. [YI F, PENG Y, XU L J, et al. Research progress of big-leaf Kuding tea[J]. *China Modern Chinese Medicine*, 2013, 15(8): 710-717.]

[18] 陈敏, 林淑芳, 邵爱娟, 等. 桑叶、茶叶及枸杞叶粗多糖样品的含量分析[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2008(8): 6-7. [CHEN M,

LIN S F, SHAO A J, et al. Content analysis of crude polysaccharide samples from mulberry leaves, tea leaves and *Lycium barbarum* leaves[J]. *Chinese Journal of Experimental Formulas*, 2008(8): 6-7.]

[19] 杨玉英, 闫永利, 李红英. 宁夏枸杞茶中黄酮含量测定方法[J]. *宁夏工程技术*, 2009, 8(2): 135-136. [YANG Y Y, YAN Y L, LI H Y. Determination method of flavonoids in Ningxia wolfberry tea[J]. *Ningxia Engineering Technology*, 2009, 8(2): 135-136.]

[20] 杨立昌, 冯淳, 杨臣菊, 等. 几种习用代茶植物体外降糖活性研究[J]. *食品科技*, 2020, 45(9): 62-66. [YANG L C, FENG C, YANG C J, et al. *In vitro* hypoglycemic activity of several conventional tea substitute plants[J]. *Food Science and Technology*, 2020, 45(9): 62-66.]

[21] 陈雅林, 谭哲谔, 彭勇. 湖北海棠叶的应用历史与研究现状[J]. *中国现代中药*, 2017, 19(10): 1505-1510. [CHEN Y L, TAN Z Z, PENG Y. The application history and research status of Hubei Begonia leaves[J]. *Chinese Journal of Modern Chinese Medicine*, 2017, 19(10): 1505-1510.]

[22] 许志泽. 连翘叶绿茶制备及活性成分研究[J]. *农业工程技术*, 2018, 38(17): 73,77. [XU Z Z. Preparation and active components of green tea with forsythia leaves[J]. *Agricultural Engineering Technology*, 2018, 38(17): 73,77.]

[23] 易帆, 彭勇, 许利嘉, 等. 小叶苦丁茶的研究进展[J]. *中国现代中药*, 2013, 15(10): 906-912. [YI F, PENG Y, XU L J, et al. Research progress of Xiaoye Kudingcha[J]. *China Modern Chinese Medicine*, 2013, 15(10): 906-912.]

[24] SPAGNUOLO L, DELLA POSTA S, FANALI C, et al. Antioxidant and antiglycation effects of polyphenol compounds extracted from hazelnut skin on advanced glycation end-products (AGEs) formation[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2021, 10(3): 424.

[25] LIU H, WANG C, QI X, et al. Antiglycation and antioxidant activities of mogroside extract from (Swingle) fruits[J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2018, 55(5): 1880-1888.

[26] SHIN S, SON D, KIM M, et al. Ameliorating effect of *Akebia quinata* fruit extracts on skin aging induced by advanced glycation end products[J]. *Nutrients*, 2015, 7(11): 9337-9352.

[27] 吴夏青. 儿茶素对糖苷酶和蛋白质非酶糖基化的抑制作用及机制研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2019. [WU X Q. Inhibitory effect and mechanism of catechins on glycosidase and protein non-enzymatic glycosylation[D]. Nanchang: Nanchang University, 2019.]

[28] 郑子锋, 孙培冬. 龙眼核多酚对蛋白非酶糖基化的抑制及机制研究[J]. *食品与发酵工业*, 2021, 47(9): 25-31. [ZHENG Z F, SUN P D. Inhibition and mechanism of longan seed polyphenols on non-enzymatic glycation of protein[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2021, 47(9): 25-31.]