

不同发酵茶体外 α -葡萄糖苷酶和巨噬细胞泡沫化抑制活性初步研究*

程悦¹, 吴文玉¹, 苗爱清², 徐索文¹, 庞式²,
王铁桥¹, 刘培庆¹, 王冬梅¹

(1. 中山大学药学院, 广东 广州 510006;
2. 广东省农业科学院茶叶研究所, 广东 英德 513000)

摘要: 采用白叶单枞茶鲜叶为原料, 按照常规加工工艺分别制成乌龙茶、红茶和黑茶3种不同发酵茶。对这3种茶的水提物, 以麦芽糖为底物, 采用比色法测定了其体外对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性, 结果显示抑制活性从高到低依次为红茶、黑茶、乌龙茶。采用体外培养小鼠巨噬细胞系 Raw264.7 细胞, 以氧化低密度脂蛋白诱导建立泡沫细胞模型, 分别用3种茶水提物进行干预, 酶法测定细胞内总胆固醇含量的变化, 探讨了3种茶对细胞因过量摄取胆固醇而致泡沫化的抑制作用。结果显示, 黑茶、红茶和乌龙茶对巨噬细胞泡沫化的抑制率分别为73.29%、62.31%和51.93%。

关键词: 乌龙茶; 红茶; 黑茶; α -葡萄糖苷酶; 巨噬细胞泡沫化

中图分类号: R285.5; R931.71; R961 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-6579(2010)05-0083-04

Studies of Different Fermented Tea Products on the Inhibitory Activities toward α -Glucosidase and Transformation of Macrophage-to-Foam Cells

CHENG Yue¹, WU Wenyu¹, MIAO Aiqing², XU Suowen¹, PANG Shi²,
WANG Tieqiao¹, LIU Peiqing¹, WANG Dongmei¹

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China;
2. Tea Research Institute, Agricultural Science Academy of Guangdong Province, Yingde 513000, China)

Abstract: Oolong tea, black tea and dark tea were prepared from *Camellia sinensis* var. *baiye dangcong* according to their corresponding manufacturing processes, respectively. The *in vitro* inhibitory activities of the water extracts from the three tea products towards α -glucosidase were investigated by Colorimetry using maltose as the substrate. Black tea and dark tea showed higher inhibitory activities than oolong tea. On the other hand, the mouse Raw264.7 cells were induced into foam cells by incubation with oxidized low density lipoprotein to examine the protective effects of the three tea products. The cellular contents of total cholesterol was detected by enzymatic colorimetry. The results showed that dark tea processed the highest inhibitory activity on transformation of macrophage-to-foam cells. The inhibitory rates of dark tea, black tea and oolong tea were observed to be 73.29%, 62.31% and 51.93%, respectively.

Key words: oolong tea; black tea; dark tea; α -glucosidase; macrophage-to-foam cells transformation

茶叶中含有多种酚类抗氧化成分, 已有研究证明茶多酚类成分有抗动脉粥样硬化的作用^[1-3], 并对 α -葡萄糖苷酶有抑制作用^[4]。同一茶鲜叶在各

种茶的独特的加工过程中, 茶叶中原有的化学成分分别发生着不同的变化, 形成了不同发酵类型茶的各自独特的风味品质, 同时也使它们在药理活性上

* 收稿日期: 2010-04-15

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(9151064001000038)

作者简介: 程悦(1987年生), 女, 硕士研究生; 通讯作者: 王冬梅; E-mail: lsswdm@mail.sysu.edu.cn

表现出不同的特点。乌龙茶、红茶、黑茶分别为半发酵茶、发酵茶和后半发酵茶。为了比较这 3 种不同发酵茶在降糖降脂抗动脉粥样硬化活性上的差异, 本论文以白叶单枞茶同一季节、同一标准采摘的茶鲜叶为原料, 按照传统加工工艺, 分别制成乌龙茶、红茶、黑茶, 对它们的体外 α -葡萄糖苷酶抑制活性和对 Raw264.7 巨噬细胞泡沫化形成的抑制活性进行了研究比较。

1 材料与方 法

1.1 供试材料

采摘秋季白叶单枞一芽三、四叶及同等嫩度的对莱叶后, 按照如下方法分别加工制成乌龙茶、红茶和黑茶。

乌龙茶: 茶鲜叶→晒青→凉青→做青(4次)→杀青→揉捻→毛火→足火→拣梗、黄片→茶样。

红茶: 茶鲜叶→萎凋→揉切→筛分→发酵→毛火→足火→捞筛→茶样。

黑茶: 茶鲜叶→摊青→杀青→揉捻→晒干→发水沤堆→翻堆(6次)→晾→烘干→筛分→拣梗→茶样。

各种茶样粉碎后过 40 目筛, 置于干燥器中贮存备用。

1.2 实验试剂与仪器

α -葡萄糖苷酶 (*Saccharomyce sp.*) (日本和光公司), 葡萄糖测定试剂盒 (南京建成生物工程研究所), 阿卡波糖 (北京拜耳医药保健有限公司)。小鼠巨噬细胞系 Raw264.7 细胞株由中山大学公共卫生学院凌文华教授馈赠。健康人新鲜血浆购自中山大学第一附属医院血液科, 氧化低密度脂蛋白 (ox-LDL) 自制。RPMI-1640 培养基 (美国 Gibco 公司), 胎牛血清 (FBS) (美国 Hyclone 公司), 四甲基噻唑蓝 (MTT)、牛血清白蛋白 (BSA)、聚乙二醇 (PEG6000)、酶学荧光法检测胆固醇试剂盒、抗生素 (青、链霉素)、麦芽糖、儿茶素均购自美国 Sigma 公司。其他试剂为国产分析纯试剂。

酶联免疫检测仪 ELK-800 型 (Bio-Tek), 超速离心机 Optima LE-80K (BECKMAN COULTER), Centrifuge5417R (Eppendorf), 超声细胞破碎仪 (Branson Digital Sonifier), TU-1810 紫外可见分光光度计。

1.3 茶水提物的制备

将茶叶粉末置于烧杯中, 加入 10 倍量的水, 超声 20 min 后, 再置于沸水浴中 20 min, 脱脂

过滤, 茶渣再重复提取一次。合并 2 次水提液, 浓缩至干, 备用。

1.4 茶多酚和茶色素的含量测定

茶多酚采用酒石酸亚铁比色法, 茶黄素、茶红素和茶褐素采用系统分析法^[5]。

1.5 体外 α -葡萄糖苷酶抑制活性的测定

取 3 种茶的水提取物适量分别溶于生理盐水, 配成 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的供试茶样溶液。取供试茶样溶液 20 μL , 与 2 μL 20 unit/mL α -葡萄糖苷酶溶液混合, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床中振摇 10 min 后, 加入 20 μL 0.05 mol/L 的麦芽糖溶液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床中继续振摇 10 min。以上反应在 96 孔培养板上完成, 采用葡萄糖氧化酶法 (葡萄糖测定试剂盒测定), 用酶联免疫检测仪在 490 nm 下测定吸光度值 (A 值), 以葡萄糖的生成量, 计算 α -葡萄糖苷酶抑制活性; 以 α -糖苷酶抑制剂阿卡波糖为阳性对照药物, 同时设定空白对照和阴性对照。

$$\text{酶活性抑制率} = \frac{A(\text{阴性对照}) - A(\text{样品})}{A(\text{阴性对照}) - A(\text{空白})} \times 100\%$$

1.6 对巨噬细胞 Raw264.7 泡沫化的抑制作用研究

1.6.1 对巨噬细胞 Raw264.7 增殖的影响 采用噻唑兰 (MTT) 法测定各茶水提物在不同浓度下对巨噬细胞增殖的影响。

1.6.2 对巨噬细胞 Raw264.7 泡沫化的影响

1) 细胞处理: 在六孔板接种细胞, 置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、 $\varphi = 5\%$ CO_2 细胞培养箱中培养, 使细胞完全贴壁。换无血清培养基, 置于培养箱中培养 12 h。加入新鲜的无血清培养液, 再加入不同浓度的各种茶水提物, 模型组加入同体积的 PBS, 培养 2 h。加入刺激因素 ox-LDL 使其终浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 培养 24 h。正常对照组 (空白组) 以同体积的培养基代替 ox-LDL。

2) 细胞内胆固醇及蛋白质含量的测定: 实验结束后, 以 5 000 r/min 离心 10 min, 弃上清收集细胞, PBS 洗涤 2 次。加入 0.1 mL 异丙醇, 超声破碎 3 次, 每次 15 s, 静置 120 min。取 15 μL 样品加入到 135 μL 总胆固醇 (TC) 分析液 (0.1 U/mL 胆固醇氧化酶、1 U/mL 过氧化酶、0.010 U/mL 胆固醇酯酶、 $\varphi = 0.05\%$ Triron X-100、1 mmol/L 胆酸钠、0.6 g/mL p -苯乙醇酸) 中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, 荧光分光光度计检测荧光强度, 激发波长为 325 nm, 发射波长为 410 nm。细胞内蛋白质的测定用 Lowry 法。细胞内的总胆固醇含量用每克细胞蛋白质所含的 TC 含量来表示, 采用单位蛋白质的荧光读数 A 值作为 TC 含量的比较指标。各茶叶提取

物对巨噬细胞泡沫化的抑制率按照如下公式计算

$$\text{抑制率} = \frac{A(\text{模型组}) - A(\text{药物组})}{A(\text{模型组}) - A(\text{空白组})} \times 100\%$$

2 结果与分析

2.1 白叶单枞不同发酵茶中茶多酚和茶色素的含量

如表1所示,茶多酚含量(w)从高到低依次为乌龙茶 > 红茶 > 黑茶;茶黄素和茶红素含量(w)以红茶最高,黑茶最低,它们是红茶茶汤主要的橙黄色色素;茶褐素含量(w)以黑茶最高,约为乌龙茶、红茶中含量的2.5倍,说明黑茶在渥堆中形成大量茶褐素,而其它成分则大量减少,其对黑茶茶汤红褐色品质的形成有着至关重要的作用,是黑茶独特的品质成分。

表1 白叶单枞不同发酵茶茶多酚和茶色素的含量

Table 1 Contents of tea polyphenols, theaflavins, thearubigins and theabrownines in different fermented tea products prepared from *Camellia sinensis* var. *baiye dancong*

	乌龙茶	红茶	黑茶
w (茶多酚)/%	36.13	21.83	12.33
w (茶黄素)/%	0.28	0.48	0.21
w (茶红素)/%	7.58	9.03	3.47
w (茶褐素)/%	5.48	5.57	13.77

2.2 白叶单枞不同发酵茶对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性

由图1可见,3种不同发酵茶对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性从强到弱依次为红茶 > 黑茶 > 乌龙茶,预示较深度的发酵过程或微生物后发酵过程有利于具有 α -葡萄糖苷酶抑制活性物质的生成。各个药物组与空白对照组相比达到极显著差异水平($P < 0.01$),且3种茶的组间差异也达到极显著差异水平($P < 0.01$)。

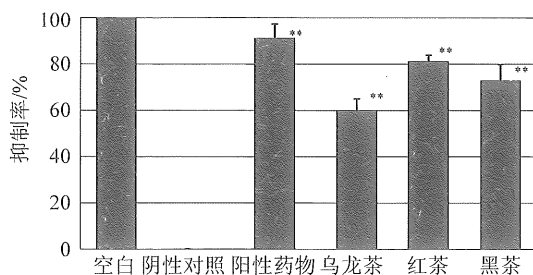


图1 不同发酵茶对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性($\bar{x} \pm s, n=6$),与对照相比** $P < 0.01$

Fig. 1 Inhibitory activities of different fermented tea products towards α -glucosidase

2.3 白叶单枞不同发酵茶对Raw264.7巨噬细胞泡沫化的抑制作用

2.3.1 不同发酵茶水提物对巨噬细胞的细胞毒性由表2可见,随着茶水提物质量浓度的升高,细胞的存活率降低,3种茶水提物质量浓度在低于100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时对细胞无明显毒性,细胞存活率较高。因此选用茶水提物质量浓度为50和100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 来进行后续对巨噬系Raw264.7细胞泡沫化抑制活性的比较研究。

表2 不同发酵茶对Raw264.7细胞的细胞毒性¹⁾

Table 2 Cytotoxic activities of different fermented tea products on Raw264.7 cells

ρ (茶水提物)/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	细胞存活率/%		
	乌龙茶	红茶	黑茶
10	117.38 \pm 5.71	99.31 \pm 20.93	95.56 \pm 6.18
50	90.43 \pm 9.23	96.99 \pm 23.33	86.16 \pm 1.67
100	81.72 \pm 6.53	94.57 \pm 16.37	89.69 \pm 17.94
250	63.01 \pm 2.29	80.89 \pm 5.08	43.00 \pm 5.74
500		-	45.53 \pm 8.54

1) $\bar{x} \pm s, n=6$

2.3.2 不同发酵茶水提物对Raw264.7巨噬细胞泡沫化的抑制活性由图2可见,3种不同发酵茶水提物对Raw264.7巨噬细胞泡沫化都表现出一定程度的抑制作用。在水提物质量浓度为50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,3种茶的抑制活性无明显差别,抑制率在35%~37%之间,红茶组和黑茶组与对照组相比达到显著差异水平($P < 0.05$),3种茶叶组间并无显著差异($P > 0.05$);而当水提物质量浓度提高为100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,黑茶表现出最强的抑制活性,其抑制率达到73.29%,红茶和乌龙茶对Raw264.7巨噬细胞泡沫化的抑制率分别为62.31%和51.93%,3种茶叶组均与对照组相比达到显著差异水平($P < 0.05$),且其组间差异也达到显著差异水平($P < 0.05$)。

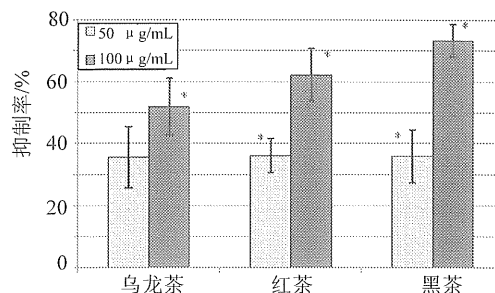


图2 不同发酵茶对Raw264.7巨噬细胞泡沫化抑制作用的比较($\bar{x} \pm s, n=3$),与对照相比* $P < 0.05$

Fig. 2 Comparison of inhibitory activities of different fermented tea products on transformation of macrophage-to-foam cells

3 讨 论

乌龙茶的加工通过摇青使叶缘摩擦损伤, 茶叶仅部分“发酵”, 故称为半发酵茶; 红茶由于在加工过程中, 鲜叶充分利用了其内生酶的生物化学作用, 使茶多酚发生一系列的反应, 又称全发酵茶; 黑茶经杀青后再堆闷, 多酚类成分在微生物的作用下发生氧化、聚合, 形成后发酵茶。茶叶中的多酚类成分的含量与其发酵程度负相关, 本论文测得不同发酵茶的茶多酚含量 (w) 乌龙茶 > 红茶 > 黑茶, 而茶褐素在黑茶中的含量远高于乌龙茶和红茶。

3 种茶水提取物对 α -葡萄糖苷酶均有一定的抑制作用, 但发酵程度较高的红茶和黑茶的活性较乌龙茶高, 预示茶色素类成分可能是其抑制活性的物质基础。抑制 α -葡萄糖苷酶活性, 可以有效地抑制食物中碳水化合物的水解和消化, 延缓葡萄糖的吸收, 从而有效地阻止糖尿病患者餐后血糖的升高, α -葡萄糖苷酶抑制剂已成为降糖药物新药研发的一个重要靶标。近年来有研究指出, 有抗氧化作用的物质可以减轻与糖尿病相关的病理损伤, 从而起到防治糖尿病的作用^[6]。因茶叶中含的多酚类物质均具有较强的抗氧化作用, 所以 α -葡萄糖苷酶可能只是茶叶发挥降糖作用的其中一个靶点, 其他的作用靶点还有待进一步研究。

动脉粥样硬化 (AS) 是严重危害人类健康的常见病, 巨噬细胞无限制地摄取氧化脂质进而形成泡沫细胞是其早期病变的重要环节^[7]。因此, 这种巨噬细胞泡沫化被认为是治疗动脉粥样硬化的新靶标^[8]。本论文探讨比较了 3 种不同发酵茶对抑制 Raw264.7 巨噬细胞泡沫化的影响, 发现在质量浓

度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 黑茶水提取物的抑制活性最高, 且与未经 ox-LDL 刺激的正常巨噬细胞的总胆固醇含量较为接近, 预示黑茶中含量最高的茶褐素类成分可能是其抑制巨噬细胞泡沫化的有效成分, 其具体作用机制有待于进一步深入研究。

参考文献:

- [1] 陈裕明, 朱蕙莲, 王身笏, 等. 茶多酚对大鼠血脂及机体脂质过氧化作用的影响 [J]. 中国老年学杂志, 1998, 4(18): 100 - 102.
- [2] 赵秀兰, 宫爱华, 李建华, 等. 茶多酚对家兔实验性动脉粥样硬化的抑制作用 [J]. 中化老年医学杂志, 2003, 8(23): 177 - 180.
- [3] 杜荣增, 任雨笙, 王咏梅, 等. 茶色素对冠心病患者血浆总抗氧化能力和氧化型低密度脂蛋白水平的影响 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2003, 11(4): 369 - 370.
- [4] 金吉淑, 尹学哲, 田中真实. 茶多酚降糖作用机制的研究 [J]. 山东医药, 2006, 46(32): 32 - 33.
- [5] 钟萝. 茶叶品质理化分析 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1989: 11 - 17, 258 - 261, 295 - 297.
- [6] LEE Y A, CHO J U, TANAKA T. Inhibitory activities of proanthocyanidins from persimmon against oxidative stress and digestive enzymes related to diabetes [J]. J Nutr Sci Vitaminol, 2007, 53: 287 - 292.
- [7] TAKAHASHI K, TAKEYA M, SAKASHITA N. Multifunctional roles of macrophages in the development and progression of atherosclerosis in humans and experimental animals [J]. Med Electron Microscopy, 2002, 35(4): 1791.
- [8] CHOUDHURY R P, LEE J M, GREAVES D R. Mechanisms of disease: macrophage-derived foam cells emerging as therapeutic targets in atherosclerosis [J]. Nat Clin Pract Cardiovasc Med, 2005, 2(6): 3091.