

文章编号: 1673 1689(2010)03-0354-05

茶多糖降血糖机制的体外研究

王黎明¹, 夏文水²

(1. 无锡商业职业技术学院, 江苏 无锡 214153; 2. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 通过体外测定不同纯度的茶多糖对羟基自由基和超氧阴离子自由基的清除效果、茶多糖对关键糖代谢酶活性的影响以及茶多糖促进葡萄糖往 3T3-L1 脂肪细胞转运的能力来研究茶多糖降血糖机制。结果表明纯度高的茶多糖对羟基自由基和氧自由基的清除能力非常低, 而纯度低的茶多糖却对这两种自由基有明显的清除效果, 对 α -葡萄糖苷酶(葡萄糖淀粉酶、蔗糖酶和麦芽糖酶)活性的抑制作用也非常低, 且抑制率与茶多糖的浓度没有明显的相关性, 对葡萄糖往外周细胞 3T3-L1 细胞的转运作用也不明显, 但可显著增强葡萄糖激酶和己糖激酶的活性。

关键词: 茶多糖; 降血糖; 葡萄糖激酶; 己糖激酶; 机制

中图分类号: TS 2

文献标识码: A

Research on the Mechanism of Tea Polysaccharide Reducing Blood Glucose in Vitro

WANG Li ming¹, XIA Wen shui²

(1. Wuxi Institute of Commerce, Wuxi 214153, China; 2. School of Food Science Technology, Jiangnan University Wuxi J 214122, China)

Abstract: The target of this manuscript is to elucidate the mechanism of TPS reducing blood glucose, for this, the scavenging effect of 89% and 51% tea polysaccharides (TPS) on hydroxyl radical, superoxide radical key carbohydrate metabolic enzymes activities, and the glucose transportation to 3T3-L1 were careful investigated in vitro Results showed that the abilities of scavenging hydroxyl radical and superoxide radical of TPS with lower purity was obvious, while, that with higher purity was not obvious. The effect on α -glucosidase activities and transportation of glucose to 3T3-L1 cell were also no obvious. However, TPS significantly enhanced the activities of hexokinase(HK) and glucokinase (GK).

Key words: tea polysaccharides, reducing blood glucose, hexokinase, glucokinase, mechanism

经整体动物水平模型证实, 茶多糖(Tea polysaccharides, TPS) 确有明显的降血糖效果, 但对其

降血糖机理有多种推测, 吴建芬等^[1] 认为茶多糖是通过清除体内自由基, 保护胰岛 β 细胞免受自由基

收稿日期: 2009-05-11

基金项目: 国家 863 计划项目(2007AA100401)。

作者简介: 王黎明(1975-), 女, 安徽无为, 工学博士, 讲师, 主要从事茶学与食品科学的研究。

* 通信作者: 夏文水(1958-), 男, 江苏高淳人, 教授, 博士生导师, 主要从事食品科学与技术及水产品加工研究。

Email: xia w s@jiangnan.edu.cn

损害而降低血糖的; 潘见^[2]等也从绿茶中分离出具有抗氧化活性的茶多糖组分。全吉淑等^[3]研究结果表明茶多糖显示较强的 α -葡萄糖苷酶抑制活性, 并能降低兔小肠刷状缘囊泡的葡萄糖转运能力, 延缓糖类在肠道中的消化和吸收。何学斌等^[4]也认为茶多糖的降血糖机制可能与其抑制 α -淀粉酶活性, 从而延缓碳水化合物在小肠的吸收有关。李步青等^[5]报导茶多糖在降低四氧嘧啶高血糖小鼠血糖浓度的同时使肝糖原大量增加, 并认为茶多糖对糖代谢的影响与胰岛素类似。

综合以上文献资料, 从 3 个方面研究茶多糖的降血糖途径: 1) 测定不同纯度的茶多糖对羟基自由基和超氧阴离子自由基的清除效果; 2) 茶多糖对关键糖代谢酶活性的影响; 3) 茶多糖是否具有促进葡萄糖往 3T3-L1 脂肪细胞转运的能力。为茶多糖生理功能的揭示提供理论依据, 同时也为茶多糖的实际应用提供一定的参考。

1 材料与设备

1.1 实验材料

TPS1-1(纯度 89%) 和 TPS2(纯度 51%) 制备方法: 茶多糖水提取液经真空冷冻干燥, 得茶叶粗多糖(Tea Polysaccharides, TPS), 粗多糖水溶液经 Sevag 法脱蛋白后用聚酰胺动态脱色, 收集到 TPS1 和 TPS2 2 个组分, 相对分子质量均约为 10 000。TPS1 用 Sephadex G50 进一步脱色, 得到 TPS1-1。

1.2 试剂

NADP⁺, 半乳糖醛酸, ATP, 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶, 胰岛素, 1-甲基-3-异丁基黄嘌呤, 地塞米松, 17 种氨基酸标样, 考马斯亮蓝 G-250, 乙酰氨基葡萄糖, Sigma 公司产品; 葡萄糖氧化酶测试盒, DMEM 培养基, MTT, HEPES 粉, L-谷氨酰胺, 葡萄糖, 小牛血清, 二甲基亚砷均为上海华美生物公司产品; 3T3-L1 细胞, 美国 ATCC 公司产品; 其它试剂为国产试剂。

2 实验方法

2.1 TPS 清除自由基的能力

2.1.1 清除超氧阴离子自由基能力 见参考文献[6]。

2.1.2 清除羟基自由基能力 见参考文献[7]。

2.2 TPS 对小肠葡萄糖苷酶活性的影响

2.2.1 小肠 α -葡萄糖苷酶冻干粉的制备 见参考文献[8]。

2.2.2 TPS 对小肠葡萄糖淀粉酶活性的影响 见

参考文献[9]。

2.2.3 TPS 对小肠蔗糖酶、麦芽糖酶活性的影响 见参考文献[3]。

2.3 TPS 对肝脏葡萄糖激酶和己糖激酶活性的影响

2.3.1 肝脏粗酶液的制备 见参考文献[10]。

2.3.2 肝脏葡萄糖激酶和己糖激酶活性测定 见参考文献[11]。

2.4 TPS 对葡萄糖消耗能力的影响

2.4.1 培养液配制 HANKS 液: 按表 1 进行配制。药品溶解后, 将 pH 值调到 7.2~7.4, 分装, 高压灭菌, 直径 0.2 μ m 膜过滤。

表 1 HANKS 液配制方法

Tab. 1 Composition of HANKS solution

药品	用量/ g	药品	用量
NaCl	80	NaHCO ₃	3.5 g
KCl	4	葡萄糖	10.0 g
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	1.34	苯酚红	适量
NaH ₂ PO ₄	0.6	双蒸水	10 000 mL

DMEM 培养液: Hanks 液 1 L 中, 加入 3.7 g NaHCO₃和 1 000 mL 双蒸水, 将 pH 调到 7.2~7.4, 直径 0.2 μ m 滤膜过滤后备用。

HEPES 液: 30 g HEPES 粉溶于 80 mL HANKS 液中, 青霉素和链霉素各 100 万单位分别用适量 HANKS 液溶解, 合并 3 种溶液, 并用 HANKS 液补充到 100 mL。

L-谷氨酰胺母液: 730 mg L-谷氨酰胺溶于 50 mL Hanks 液中, 用直径 0.2 μ m 的膜过滤后备用。

地塞米松母液: 地塞米松磷酸钠注射液每支为 1 mL, 内含地塞米松磷酸钠 5 mg, 取 1 mL, 加入 97 mL 无菌 HANKS 液。

诱导分化培养液: 11.1 mg 1-甲基-3-异丁基黄嘌呤, 溶于 80 mL DMEM 培养液中, 用 0.2 μ m 滤膜过滤后加 10 mL 小牛血清、1 mL HEPES 母液、1 mL 谷氨酰胺母液、1 mL 双抗、1 mL 地塞米松母液和 2.5 单位的胰岛素, 用 DMEM 培养液补足到 100 mL。此诱导分化液含 1-甲基-3-异丁基黄嘌呤 0.5 mmol/L、地塞米松 1 μ mol/L 和胰岛素 5 μ g/mL。

2.4.2 T3-L1 细胞的培养及诱导分化 将 3T3-L1 细胞接种于培养瓶中, 用含体积分数 10% 小牛血清的高糖 DMEM 培养液培养, 待细胞长满瓶壁后, 换用诱导分化培养液培养 48 h, 再换用含 1 μ g/mL 的胰岛素培养液培养 48 h, 再换用含质量分数 10% 小牛血清的高糖 DMEM 培养液培养继续培

养, 每 48 h 换培养液一次, 待 90 % 以上 3T3-L1 细胞呈现脂肪细胞表型时, 可用于葡萄糖消耗实验。

2 4 3 葡萄糖消耗能力的测定 采用 3T3-L1 细胞葡萄糖消耗法 参考文献[12]

2 4 4 葡萄糖质量浓度的测定 葡萄糖氧化酶法^[13]测定各孔中葡萄糖的质量浓度。

2 4 5 统计处理 SAS 软件进行统计分析。

3 结果与讨论

3 1 TPS 清除自由基能力

TPS1-1 和 TPS2 体外清除自由基实验结果见图 1 和图 2。

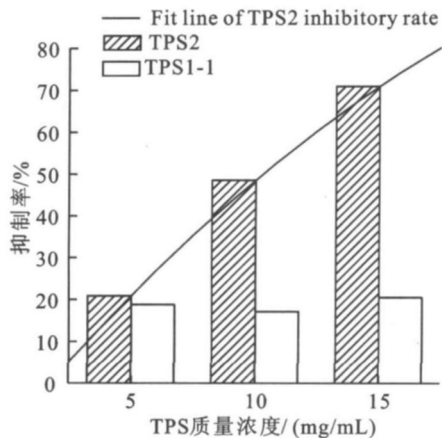


图 1 茶多糖清除超氧阴离子自由基效果

Fig. 1 Scavenging effect of TPS on superoxide radical

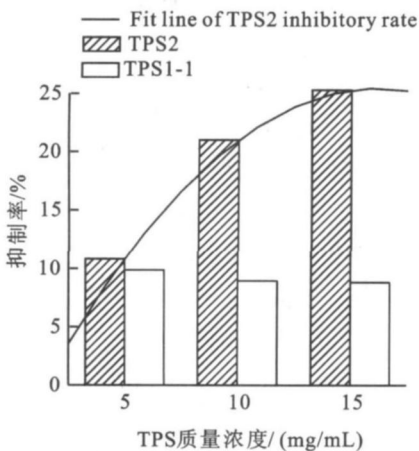


图 2 茶多糖清除羟基自由基效果

Fig. 2 Scavenging effect of TPS on hydroxyl radical

从图中可以看出, TPS2 表现出很强的清除超氧阴离子自由基和羟基自由基能力, 由拟合曲线可以得出其清除超氧阴离子自由基的半抑制浓度 IC₅₀ 为 10.3 mg/mL, 但对羟基自由基的最大抑制率约为 25 %, 而 TPS1-1 的清除超氧阴离子自由基和羟

基自由基的能力却较差。

正常情况下, 样品越纯, 清除自由基效果应越好, 实验出现了相反的结果。分析有关抗氧化剂的资料发现, 抗氧化活性与抗氧化剂结构有关, 特别是活泼的酚羟基结构, 如黄酮类和单宁类化合物邻位酚羟基的存在可使其中一个羟基作为氢供体与环境中自由基结合, 终止自由基引发的链反应, 同时自身氧化形成羰基, 另一羟基则形成分子内氢键, 使氧化后的物质更稳定^[14]。多糖分子虽然也含有大量羟基, 但可能这些羟基是不活泼的, 难以作为氢的供体与自由基结合终止自由基引发的链反应, 因而 TPS1-1 没有显示出明显的抗氧化能力, TPS2 的清除自由基能力来自其中的多酚类杂质。当然, 也有可能有些相对分子质量较小的多糖分子组分也有自由基清除作用, 但在 TPS1-1 纯化过程中, 这些组分未被收集, 使 TPS1-1 表现出较低的清除超氧阴离子自由基和羟基自由基的能力, 而 TPS2 表现出较强的清除自由基作用。

3 2 TPS 对小肠 α-葡萄糖苷酶的抑制作用

α-葡萄糖苷酶是使饮食中不易吸收的碳水化合物分解成小肠易吸收的单糖, 包括蔗糖酶、葡萄糖淀粉酶, 麦芽糖酶和糊精酶。α-葡萄糖苷酶抑制剂既和糖苷酶底物结构相似, 又能与糖苷酶活性中心形成专一的共价结合, 竞争性抑制小肠上段 α-葡萄糖苷酶, 阻断碳水化合物在小肠上段分解成单糖, 未分解的碳水化合物到达小肠下段, 使该段 α-葡萄糖苷酶活性增加, 将碳水化合物分解成单糖并吸收入血液, 使血糖平稳地维持在一定水平^[15]。表 2 显示茶多糖对葡萄糖淀粉酶、蔗糖酶和麦芽糖酶活性的抑制率都非常低, 且抑制率与茶多糖的浓度没有明显的相关性。全吉淑等^[2]曾报道茶多糖显示较强的 α-葡萄糖苷酶抑制活性, 并能降低兔小肠刷状缘囊泡的葡萄糖转运能力, 延缓糖类在肠道中的消化和吸收。结果表明了茶多糖对小鼠小肠黏膜 α-葡萄糖苷酶活性的抑制作用非常低。

表 2 茶多糖对 α-葡萄糖苷酶的抑制作用

Tab. 2 Effects of TPS on the α-glucosidase activity

TPS 质量浓度 (mg/mL)	抑制率 (%)		
	麦芽糖酶	蔗糖酶	葡萄糖淀粉酶
5.9	0	0	4.92
12.6	0.88	0.91	5.93
18.4	7.08	2.04	5.72
24.3	2.65	2.83	4.96

3 3 茶多糖对葡萄糖往 3T3 细胞的转运作用

3T3-L1 细胞一种常用的成纤维细胞, 在胰岛素、

地塞米松、和 1-甲基-3-异丁基黄嘌呤等作用下, 具有转变为脂肪细胞的能力, 通过体外研究药物对脂肪细胞糖代谢的影响来反映药物的降血糖效果^[16-17]。3T3-L1 细胞葡萄糖消耗模型是治疗糖尿病药物筛选的常用模型。

3T3-L1 脂肪细胞在含有茶多糖的培养液中培养数天后, 检测细胞外葡萄糖浓度的变化, 发现 0.1 mg/mL 茶多糖能促进葡萄糖往细胞内运输, 细胞外葡萄糖消耗增加 125%, 但培养液中含 1.0 和 10 mg/mL 茶多糖, 细胞外葡萄糖浓度不仅没有下降, 反而较对照组有所增加。其机理有待进一步确定。

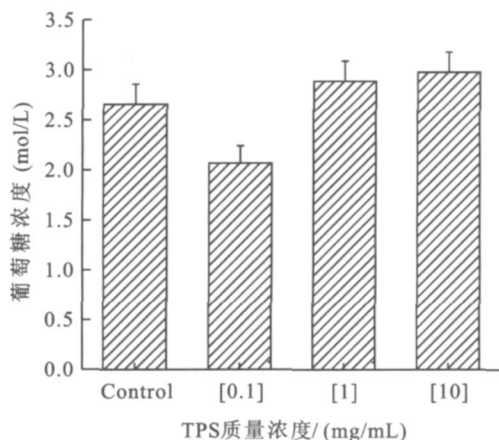


图3 茶多糖对葡萄糖往 3T3-L1 细胞的转运作用

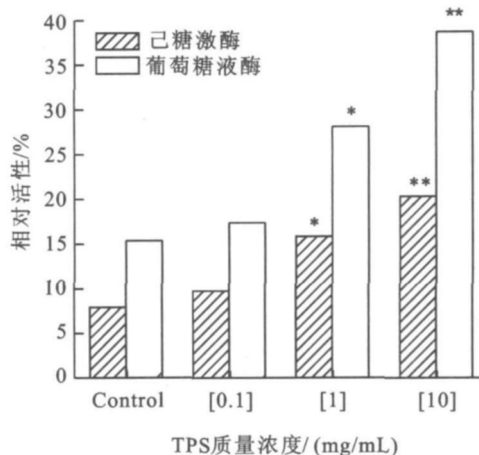
Fig.3 Effect of TPS on 3T3-L1 cell glucose transportation

3.4 TPS 对己糖激酶(HK)、葡萄糖激酶(GK)的作用

动物体中至少存在 4 种专一性及活性不同的己糖激酶同功酶, 其中 3 种己糖激酶存在于肌肉、脑及脂肪组织中, 与底物亲和力较高, 且特异性较低, 能催化多种己糖(包括葡萄糖、果糖和半乳糖)的磷酸化, 活性受细胞内 6-磷酸葡萄糖(G-6P)的反馈抑制, 无机磷可解除 G-6P 对己糖激酶的抑制作用。另外一种同功酶仅存在于肝、胰岛 β 细胞中, 只对葡萄糖起作用, 与底物的亲和力较低(K_m 值较大), 活性却不受产物 G-6P 的抑制, 称为葡萄糖激酶(GCK)。由于 GCK 与葡萄糖的亲和力低, 它能在葡萄糖处于生理浓度时(4~5 mmol/L), 改变肝脏和胰岛组织的葡萄糖磷酸化速度。在胰岛细胞内, GCK 能识别葡萄糖, 并通过糖代谢的调节, 影响 β 细胞胰岛素的合成和分泌, 所以也将 GCK 称为葡萄糖感受器, 肝脏中的 GCK 活性则受体液胰岛素水平的影响, 当胰岛素水平升高时, 肝脏 GCK 活性增强, 通过加快糖代谢使血糖降低。如果葡萄糖激酶活性下降或生成减少, 糖利用将降低, 糖原

合成也会受阻, 同时使胰岛 β 细胞对血糖的敏感性降低和胰岛素分泌减少, 从而导致肝脏胰岛素抵抗和 II 型糖尿病的发生。

李步青等^[4]报道茶多糖在降低小鼠血糖的同时肝糖原含量也增加。由于葡萄糖激酶活性高低影响胰岛素对血糖的敏感性, 茶多糖降低血糖是否是因为增强了葡萄糖激酶活性, 从而修复了受损的胰岛素功能或是加快了肝糖合成速度。体外测定茶多糖对葡萄糖激酶活性的影响的结果表明, 茶多糖确实可增强葡萄糖激酶和己糖激酶的活性(见图4)。当茶多糖溶液质量浓度为 1 mg/mL 时, 即显著增强葡萄糖激酶和己糖激酶的活性, 相对活性分别提高 82.97% 和 99.57%; 质量浓度为 10 mg/mL 时, 达到了极显著水平, 活性分别提高 152.09% 和 156.10%。因此, 茶多糖可能是通过调节己糖激酶和葡萄糖激酶活性而降血糖的。



* 表示 $P < 0.05$, ** 表示 $P < 0.01$; [0.1]、[1]、[10] 分别表示 TPS 的质量浓度为 0.1, 1, 10 mg/mL

图4 茶多糖对己糖激酶、葡萄糖激酶的作用

Fig.4 Effect of TPS on the HK and GK activities

4 结 语

纯度高的茶多糖对自由基的清除能力非常低, 而纯度低的茶多糖对自由基有明显的清除作用。茶多糖对 α -葡萄糖苷酶(葡萄糖淀粉酶、蔗糖酶和麦芽糖酶)活性的抑制作用非常低, 且抑制率与茶多糖的浓度没有明显的相关性。茶多糖对葡萄糖往外周细胞 3T3-L1 细胞的转运作用也不明显, 但可显著增强葡萄糖激酶和己糖激酶的活性。

参考文献(References):

- [1] 吴建芬, 冯磊, 张春飞等. 茶多糖降血糖机制研究[J]. 浙江预防医学, 2003, 15: 10– 13.
WU Jian fen, FENG Lei, ZHANG Chun fei, et al. Study on the hypoglycemic mechanism of tea polysaccharides [J]. **Zhejiang Journal of Preventive Medicine**, 2003, 15: 10– 13. (in Chinese)
- [2] 潘见, 陈彦, 方伟, 等. 具有抗氧化活性茶多糖 TPS II 的分离纯化及其性质研究[J]. 食品科学, 2009, 30(3), 25– 28.
PAN Jian, CHEN Yan, FANG Wei, et al. Study on purification and chemical compositions of tea polysaccharide (TPS II) with antioxidant activity[J]. **Food Science**, 2009, 30(3), 25– 28. (in Chinese)
- [3] 全吉淑, 尹学哲, 吉川和志. 茶多糖降血糖作用机制[J]. 中国公共卫生, 2007, 23(3): 295– 296.
QUAN Ji shu, YING Xue zhe, JICHUAN He zhi. Study on the hypoglycemic mechanism of tea polysaccharides[J]. **China Public Health**, 2007, 23(3): 295– 296. (in Chinese)
- [4] 何学斌, 薛存宽, 魏守蓉. 茶多糖对 α -淀粉酶活性抑制作用及对糖尿病模型大鼠血糖影响研究[J]. 医药导报, 2007, 26(11), 1284– 1286.
HE Xue bin, XUE Chun kuan, WEI Shou rong. Effects of tea polysaccharides on α amylase suppression and blood glucose in diabetic rats[J]. **Medical Herald**, 2007, 26(11), 1284– 1286. (in Chinese)
- [5] 李步青, 张慧玲, 舒庆龄, 等. 中低档绿茶中茶多糖的提取及降血糖作用[J]. 茶叶科学, 1996, 16: 67– 72.
LI Bu qing, ZHANG Hui ling, SHU Qing ling, et al. Studies on the extraction of polysaccharide from middle and lower grade green tea[J]. **Tea Science**, 1996, 16: 67– 72. (in Chinese)
- [6] 邹国林, 桂兴芳, 钟晓波, 等. 一种 SOD 的测活方法—邻苯三酚自氧化法的改进[J]. 生物化学与生物物理进展, 1986, 4: 71– 73.
ZHOU Guo lin, GUI Xing fang, ZHONG Xiao bo, et al. A determination method of SOD—improved pyrogallol autoxidation methods[J]. **Progress in Biochemistry and Biophysics**, 1986, 4: 71– 73. (in Chinese)
- [7] 金鸣, 蔡亚欣, 李金荣, 等. 邻二氮菲 Fe^{2+} 氧化法检测 $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$ 产生的羟自由基[J]. 生物化学与生物物理进展, 1996, 23: 553– 555.
JIN Ming, CAI Ya xin, LI Jin rong, et al. 1, 10-Phenanthroline Fe^{2+} oxidative assay of hydroxyl radical produced by $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$ [J]. **Progress in Biochemistry and Biophysics**, 1996, 23: 553– 555. (in Chinese)
- [8] 川端潤, 葛西隆則. ルコシダーゼ阻害剤[P]. 日本特許: 2000 229874A, 2000-08-22.
- [9] 郑曼新. 复合酶中糖化酶活力的测定[J]. 食品与生物技术学报, 2004, 23: 90– 93.
ZHENG Ma xin. Determination of glucoamylase activity in blending enzyme[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2004, 23: 90– 93. (in Chinese)
- [10] WANG Li ming, XIA Wei shui. Isolation and analysis of a novel acidic polysaccharide with glucokinase stimulation activity from coarse green tea[J]. **Journal of Food Biochemistry**, 2006, 30(2), 187– 202.
- [11] Pilks S J. Glucokinase of rat liver. In *Methods in Enzymology* [M]. New York: Academic Press, 1975. 31– 39.
- [12] 周丽斌, 杨颖, 唐金凤, 等. 小檗碱对脂肪细胞糖代谢的影响[J]. 上海第二医科大学学报, 2002, 22: 412– 414.
ZHOU Li bin, YANG Ying, TANG Jin feng, et al. Effects of berberine on glucose metabolism in adipocyte[J]. **Journal of Shanghai Second Medical University**, 2002, 22: 412– 414. (in Chinese)
- [13] 徐叔云. 药理学实验方法[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002.
- [14] 张红雨. 黄酮类抗氧化剂结构-活性关系的理论解释[J]. 中国科学 B 辑, 1999, 29(1): 91– 96.
ZHANG Hong yu. Theoretical elucidation of structure-activity relationship of flavonoid antioxidants[J]. **Science in China: Series B**, 1999, 29(1): 91– 96. (in Chinese)
- [15] Rodrigo Dalí Agnol, Gilsane Lino von Poser. The use of complex polysaccharides in the management of metabolic diseases: the case of Solanum lycocarpum fruits[J]. **Journal of Ethnopharmacology**, 2000, 71: 337– 341.
- [16] Oller do Nascimento C, Hunter L, Trayhurn, P. Regulation of haptoglobin gene expression in 3T3-L1 adipocytes by cytokines, catecholamines, and PPAR γ [J]. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2004, 313: 702– 708.
- [17] Morenó Aliaga M J, Matsumura F. Effects of 1, 1, 1-trichloro-2, 2-bis(4-chlorophenyl)-ethane (p, p'-DDT) on 3T3-L1 and 3T3-F442A adipocyte differentiation[J]. **Biochemical Pharmacology**, 2002, 63: 997– 1007.

(责任编辑: 杨萌)