

基于 RAW264.7 细胞模型的不同茶类抗炎功能特性

李晓飞, 高雄, 林晓蓉, 张媛媛, 李斌*, 陈忠正*

(华南农业大学食品学院, 广东广州 510642)

摘要:茶叶根据经典加工工艺不同分为红茶、绿茶、青(乌龙)茶、白茶、黄茶、黑茶。为探讨不同加工工艺形成的不同茶类的抗炎功能特性,本研究以云南大叶种绿茶、红茶、普洱黑茶、金观音乌龙茶、福鼎大白白茶、君山银针黄茶为材料。采用硝普钠法和脂多糖诱导 RAW264.7 巨噬细胞为体外炎症模型评价抗炎活性。结果发现,绿茶、白茶及黄茶对一氧化氮(NO)的清除能力较强,半抑制浓度(IC₅₀)值在 99.27~104.83 μg/mL 范围内;在六种茶类中,黄茶对脂多糖诱导 RAW264.7 细胞产生炎症反应的抑制作用最强,其抑制 NO 产生的 IC₅₀ 值为 398.13 μg/mL,在浓度为 500 μg/mL 时,其对肿瘤坏死因子 α(TNF-α)和白介素 6(IL-6)的抑制率分别为 69.25%、87.68%;黄茶可在基因转录和翻译水平上,显著下调 iNOS 基因的转录和翻译。相关性分析表明,茶多酚含量与清除 NO 的 IC₅₀ 值、抑制细胞产生 NO 的 IC₅₀ 值、TNF-α 以及 IL-6 产生量均呈显著负相关。表明六种茶类均具有抗炎活性,黄茶对促炎症因子(NO、TNF-α、IL-6)的抑制效果最佳,可通过下调 iNOS 基因的转录和翻译水平,减少 NO 产生,从而发挥抗炎功效。

关键词:六种类茶, RAW264.7 细胞, 抗炎功效, 炎症介质

Anti-inflammatory activities of six types of tea in LPS-induced RAW264.7 cells

LI Xiao-fei, GAO Xiong, LIN Xiao-rong, ZHANG Yuan-yuan, LI Bin*, CHEN Zhong-zheng*

(College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: According to the classical processing technology, tea can be categorised into six types: green tea, white tea, yellow tea, oolong tea, puer tea, black tea. This study aimed to investigate anti-inflammatory property of six types of tea, including Yunnan Daye (green tea, black tea, and puer tea), Fuding Dabai (white tea), Junshan Yinzen (yellow tea), and Jin Guanyin (oolong tea). Nitric oxide (NO) - scavenging assay and LPS - induced RAW264.7 cells model were used to assess the anti-inflammatory activity of water extract of six types of tea. The results showed that, among six types of tea, green, white, and yellow tea displayed stronger NO-scavenging capacity with IC₅₀ values ranging from 99.27 to 104.83 μg/mL. Compared with other five types of tea, yellow tea exhibited significant anti-inflammatory activity against LPS-induced RAW264.7 cells. The IC₅₀ values of yellow tea for NO-suppressing effect was 398.13 μg/mL, and the inhibition rate for tumor necrosis factor-α (TNF-α) and interleukin-6 (IL-6) reached 69.25% and 87.68%, respectively, at a concentration of 500 μg/mL. Compared with LPS-induced group, treatment with water extract of yellow tea significantly down-regulated the expression of iNOS mRNA and decreased iNOS protein level. Correlation analysis showed that the content of tea polyphenols had a significant negative correlation with the IC₅₀ values of NO-scavenging and NO-suppressing, TNF-α and IL-6 productions. In conclusion, all six types of tea possessed anti-inflammatory property. Among six types of tea, yellow tea exerted the strongest inhibitory effect on production of pro-inflammatory mediators (NO, TNF-α, and IL-6), and could reduce NO production through down-regulating the expression of iNOS both in transcriptional and translational level.

Key words: six types of tea; RAW264.7 cell; anti-inflammatory activity; inflammatory mediators

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2017)19-0067-07

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2017.19.013

在正常人机体内,适当的炎症有助于清除损伤, 促进伤口修复和愈合,但过度的炎症会释放大量的炎

收稿日期: 2017-03-29

作者简介: 李晓飞(1991-),女,硕士研究生,研究方向:食品化学与营养, E-mail: 15622107307@163.com。

* 通讯作者: 陈忠正(1974-),男,博士,副教授,研究方向:食品生物技术, E-mail: zhongzhengch@scau.edu.cn。

李斌(1960-),女,博士,教授,研究方向:食品化学与营养, E-mail: bli@scau.edu.cn。

基金项目:现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-23);广东省科技计划项目(2012A020602040)。

症介质,如一氧化氮(NO)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白介素6(IL-6)等。其中,过量的NO会进一步产生活性氮自由基,攻击DNA、蛋白质等生物大分子,造成细胞和组织损伤;过量的TNF- α 、IL-6等促炎症因子会进一步加剧炎症反应,造成恶性循环。持续的炎症反应严重威胁人体健康,渐进性导致恶性肿瘤、神经退行性疾病等慢性疾病的发生^[1-4]。

茶叶中含有丰富的茶多酚、茶多糖、生物碱、氨基酸等成分^[5],赋予茶叶抗氧化、抗炎症、抗癌、保护神经等功能特性^[6]。我国茶树资源丰富,根据经典制茶工艺,茶叶可分为:绿茶、白茶、黄茶、乌龙茶、红茶、黑茶等六大类,赋予茶叶不同的品质特性。茶叶抗炎活性以绿茶和红茶研究较多^[7-8],也有研究者根据茶叶发酵程度,比较了绿茶(未发酵)、乌龙茶(半发酵)以及红茶(全发酵)的抗炎活性^[9]。但迄今未见同时比较六种不同茶类抗炎功能特性的研究。

为系统比较六大经典加工茶类的抗炎功能特性,本研究以云南大叶种绿茶、红茶、普洱黑茶、金观音乌龙茶、福鼎大白白茶、君山银针黄茶为材料,沸水浸提、冻干后,测定和比较冻干茶粉中茶多酚、咖啡碱等化学组成,采用硝普化钠法评价NO清除能力,以脂多糖(LPS)诱导小鼠巨噬细胞RAW264.7体外炎症细胞模型评价抗炎活性;以研究发现抗炎活性最强的黄茶为代表,采用实时荧光定量PCR和蛋白质印迹技术分析其对一氧化氮合成酶(iNOS)基因mRNA转录水平和蛋白质表达水平的影响,初步探讨其抗炎机制,为系统比较不同茶类的功能特性提供初步的理论研究基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

福建福鼎大白白茶、湖南君山银针黄茶 由北京云开雅集茶文化交流中心提供;金观音乌龙茶 由广东怀集高山青农产品有限公司提供;云南大叶种绿茶、红茶 由广东省华海糖业发展有限公司提供;云南大叶种普洱黑茶 由广东省茶叶进出口公司提供。小鼠巨噬细胞RAW264.7 购于美国模式培养物集存库(ATCC);色谱纯甲酸(96%)、四甲基偶氮唑蓝(MTT)、脂多糖(LPS)、氨基苯磺胺、N-1-萘基乙二胺二盐酸盐 美国Sigma公司;无酚红DMEM培养基、胰蛋白酶、胎牛血清、青霉素和链霉素、杜氏磷酸盐缓冲液(DPBS)、GlutaMAX 美国Life公司;细胞总蛋白抽提试剂盒 上海碧云天生物技术研究所;二喹啉甲酸(BCA)蛋白浓度测定试剂盒、封闭液、化学发光试剂盒 美国Thermo公司;辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔抗体、诱导型一氧化氮合成酶(iNOS)兔抗小鼠抗体、 β -actin兔抗小鼠抗体 美国Cell Signaling Technology公司;咖啡碱(99.9%)、Trizol提取试剂盒、4S Red Plus核酸染色剂、琼脂糖、第一链cDNA合成试剂盒 上海生工生物有限公司;聚偏氟乙烯(PVDF)膜 德国Merk Millipore公司;色谱纯甲醇 韩国Honeywell Burdick & Jackson公司;福林酚试剂(2 mol/L) 北京普博欣生物科技有限公司;所有实验用水均为Milli-Q超纯

水(电阻率 $\geq 18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$)。

Centrifuge 5804R 冷冻离心机 德国Eppendorf A G公司;ALPHA1-2 LD plus 真空冷冻干燥机 德国Christ公司;Milli-Q Integral 3 超纯水系统 德国Merk Millipore公司;UV-2102C 紫外可见分光光度计 上海尤尼科有限公司;Spectra Max Plus 酶标仪 美国Molecular Devices公司;HERAcell 150i CO₂ 培养箱 美国Thermo公司;Ckx41 显微镜 日本Olympus公司;Agilent 1200 高效液相色谱仪 美国Agilent公司;PCR反应扩增仪、垂直电泳仪、电转槽 美国Bio-Rad公司;OmegaLumG 自动化学发光仪 美国Aplegen公司;Stepone plus 型荧光定量PCR仪 美国ABI公司。

1.2 实验方法

1.2.1 茶叶水提取物冻干粉的制备 茶叶研磨过20~30目筛,按茶水比1:25(w/v)加入沸水,封口,100℃沸水浴浸提45 min,每10 min振摇一次,过滤、冷却后,将滤液置于-40℃快速结冻,转移至冷冻干燥机中冻干成茶粉,-20℃保存备用。冻干茶粉,超纯水溶解后测定化学成分和一氧化氮(NO)自由基清除能力;细胞培养液溶解之进行细胞测定实验。冻干粉得率计算公式如下:

$$\text{冻干粉得率}(\%) = \frac{m_1}{m_0} \times 100 \quad \text{式(1)}$$

式中: m_1 为水提取物冻干粉的质量,g; m_0 为浸提茶汤的茶叶干重,g。

1.2.2 NO自由基清除率测定 参照Tsai等^[10]方法,并进行适当修改。将60 μL 不同浓度的茶叶水提取物(15.63~250 $\mu\text{g}/\text{mL}$)和60 μL 硝普化钠溶液(10 mmol/L,pH7.4磷酸盐缓冲液配制)先后加入96孔板并混匀,日光灯下,25℃光照150 min后,加入120 μL Griess试剂(60 μL A溶液:2%(w/v)氨基苯磺胺溶于4%磷酸水溶液,60 μL B溶液:0.2%(w/v)N-1-萘基乙二胺二盐酸盐溶于水),酶标仪测定542 nm处吸光值。

1.2.3 细胞培养 小鼠巨噬细胞RAW 264.7复苏后,培养于37℃、5%的CO₂培养箱中,每隔2 d继代一次。培养液组成为88%无酚红DMEM培养基、10%FBS、1%青霉素(100 U/mL)和链霉素(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、1% GlutaMAX(4 mmol/L)。

1.2.4 RAW264.7细胞上清液中NO产生量测定 参照Zhang等^[11]方法,接种细胞:RAW264.7细胞按 5×10^5 个/mL的浓度接种于96孔板,每孔200 μL ,于37℃、5%的CO₂培养箱中培养24 h;加入样品:弃去旧培养液,加入100 μL 不同浓度的茶叶水提取物(细胞培养液配制)和100 μL 终浓度为1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的LPS溶液,混匀,继续培养;NO产生量测定:加入样品培养24 h后取出96孔板,每孔转移100 μL 细胞培养上清液到新96孔板,向新96孔板加入100 μL Griess试剂,酶标仪测定542 nm处吸光值;细胞存活率测定:将旧96孔板中剩余培养液弃去,每孔加入100 μL MTT溶液(0.05 mg/mL),于37℃培养箱中培养1 h后,弃去MTT溶液,加入200 μL 二甲基亚砜,置于摇床上(100 r/min)摇匀15 min,酶标仪测定

550 nm 处吸光值。NO 产生百分比和细胞存活率的计算公式如下:

$$\text{NO 百分比}(\%) = \frac{A_{\text{样品+LPS}} - A_{\text{样品}}}{A_{\text{LPS}} - A_{\text{空白}}} \times 100 \quad \text{式(2)}$$

$$\text{细胞存活率}(\%) = \frac{A_{\text{样品+LPS}}}{A_{\text{LPS}}} \times 100 \quad \text{式(3)}$$

式中: $A_{\text{样品+LPS}}$ 为样品和 LPS 共处理组吸光值; $A_{\text{样品}}$ 为样品单独处理组吸光值; A_{LPS} 为 LPS 单独处理组吸光值; $A_{\text{空白}}$ 为正常培养组吸光值。NO 百分比(%) 是相对于 LPS 单独处理组, 即将 LPS 单独处理组的 NO 产生量当作 100%; 细胞存活率(%) 是相对于 LPS 单独处理组, 即将 LPS 单独处理组的细胞存活率当作 100%。

1.2.5 TNF- α 和 IL-6 含量测定 接种细胞: 同 1.2.5, 样品处理组分别加入 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 茶叶水提取物和终浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 LPS 溶液, 混匀。空白组只加细胞培养液, 对照组只加 LPS 溶液。继续培养 24 h 后, 将 96 孔板 1000 \times g 离心 20 min, 吸取细胞培养上清液, 稀释适当倍数, 按照试剂盒说明书检测上清液中 RAW264.7 细胞分泌的 TNF- α 和 IL-6 含量。

1.2.6 茶叶水提取物冻干粉主要化学成分测定 采用福林酚比色法测定茶多酚含量^[12]; 茚三酮比色法测定游离氨基酸含量^[12]; 硫酸-萘酚比色法测定可溶性糖含量^[13]; 高效液相色谱(HPLC)法测定咖啡碱含量^[14], 测得的化学成分含量均换算成占冻干茶粉的百分比。

1.2.7 实时荧光定量 PCR 检测 iNOS mRNA 转录水平 参照王佐等^[15]的方法, 并进行适当修改。接种细胞: RAW264.7 细胞按 5×10^5 个/mL 的浓度接种于直径 70 mm 培养皿中, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% 的 CO_2 培养箱中培养 24 h; 加入样品: 弃去旧培养液, 加入不同浓度的黄茶水提取物和终浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 LPS 溶液, 混匀, 继续培养 24 h; 总 RNA 提取: 弃去旧培养液, 用 Trizol 提取试剂盒提取细胞总 RNA, UV-2102C 紫外可见分光光度计测定提取 RNA 的 A_{260} 及 A_{280} 值; 逆转录反应: 按试剂盒说明, 在 PCR 管中加入 RNA 800 ng 和随机引物 p(dN)6(0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) 1 μL , 用不含 RNA 酶的超纯水定容至 13 μL ; 70 $^{\circ}\text{C}$ 温浴 5 min, 冰浴 10 s, 短暂离心后加入 $5 \times$ 反应缓冲液 4 μL 、dNTP 混合液(10 mmol/L) 2 μL 、RNA 酶抑制剂(20 U/ μL) 1 μL 、AMV 反转录酶(10 U/ μL) 2 μL ; 37 $^{\circ}\text{C}$ 温浴 5 min, 42 $^{\circ}\text{C}$ 温浴 60 min, 70 $^{\circ}\text{C}$ 温浴 10 min 后终止反应, 将上述溶液 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存; 荧光定量 PCR 检测: 对 iNOS、 β -actin 基因(引物序列见表 1) 表达进行定量分析, PCR 反应体系为 $2 \times$ SybrGreen qPCR Master Mix 10 μL 、Template(cDNA) 7.2 μL 、10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的 FP 和 RP 各 0.4 μL , 加超纯水定容至 20 μL ; PCR 反应条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min, 随后 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 7 s, 57 $^{\circ}\text{C}$ 退火延伸 10 s, 共 40 个循环。

1.2.8 蛋白质印迹法检测蛋白表达量 参照王佐等^[15]的方法, 并进行适当修改。接种细胞和加入样品实验步骤同 1.2.7; 细胞总蛋白提取: 取出培养皿弃去培养基, DPBS 洗 3 遍, 刮下细胞并离心收集, 加入适量细胞裂解液(含 1 mmol/L 苯甲基磺酰氟), 冰上

表 1 目的基因和内参基因 PCR 引物序列

Table 1 The PCR primer sequence of target genes and reference gene		
基因名称	序列名称	碱基序列
iNOS	FP	5'-CCTCACGCCTGGGTCTTGT-3'
	RP	5'-TGAGAACAGCACAAGGGGTTT-3'
β -actin	FP	5'-CCACCATGTATCCACAGGCATT-3'
	RP	5'-CAGCTCAGTAACAGTCCGCC-3'

裂解 30 min 后, 14000 \times g 离心 15 min, 上清即为抽提到的细胞总蛋白; 蛋白浓度定量: 将 BCA 试剂 A 与 B 按 50:1 的比例混合, 配成 BCA 工作液; 取 25 μL 适当稀释的样品到 96 孔板中, 每孔加入 200 μL BCA 工作液, 混匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, 酶标仪测定 562 nm 处吸光值, 根据牛血清白蛋白标准曲线计算蛋白浓度; 检测目的蛋白表达: 将抽提蛋白与上样缓冲液按 4:1 的体积比混合, 沸水浴 10 min, 冷却后按等蛋白量(40 μg) 进行 SDS-PAGE 电泳(电压 80 V 电泳 40 min 后换电压 110 V 电泳 150 min), 电泳结束后, 将凝胶中的蛋白转印至 PVDF 膜上, 用 TBST 溶液洗膜 6 次(每次 5 min), 将 PVDF 膜置于封闭液中室温封闭 1 h 后进行一抗(1:1000)孵育(4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜); 洗膜后加入 TBST 溶液稀释的辣根过氧化物酶标记的二抗(1:2000), 室温孵育 1.5 h, 洗膜后进行 ECL 显影, 用化学发光仪扫描并记录结果。

1.3 数据分析

采用 SAS 9.2 进行差异显著性分析; 采用 ABI 7500 system SDS Software 1.4 进行荧光定量 PCR 数据处理, 以 β -actin 为内参基因, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算基因转录的相对变化; 采用 FluorChem 进行蛋白质条带光密度值积分, 以 β -actin 为内参蛋白做相对定量分析。实验结果均以平均值 \pm 标准偏差表示($n=3$)。

2 结果与分析

2.1 不同茶类水提取物对 NO 自由基的清除作用分析

由图 1 可知, 六个不同种类茶在 15.63 ~ 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内, 随着水提取物浓度增大, 其对 NO 的清除效果逐渐增强。这与 Tsai 等研究绿茶与几种药用植物对 NO 清除作用的实验结果相类似^[10]。经拟合可以计算得 NO 清除率 IC_{50} 值(半数抑制浓度), 其值越低, NO 清除效果越好。由表 2 可知, 不同茶类对 NO 的清除作用存在一定差异, 绿茶、白茶、黄茶对 NO 的清除作用最强, IC_{50} 值在 99.27~104.83 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内, 三者无显著性差异($p > 0.05$), 其次是乌龙茶(120.06 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、黑茶(176.04 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、红茶(214.68 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。结果表明, 不同加工工艺生成的茶类, 随着茶叶发酵程度加深, NO 自由基的清除能力降低。大量研究表明, 茶多酚是茶叶中清除自由基的有效成分^[16], 在加工过程中, 六种茶类发酵程度的差异, 使其茶多酚含量发生变化, 进而影响 NO 自由基清除作用。

2.2 不同茶类水提取物对 NO 产生的影响

由图 2 可知, 在 62.5~1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度范围内,

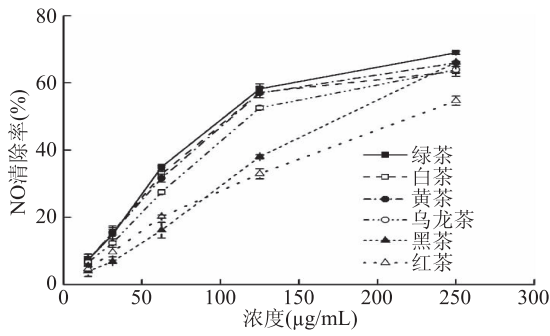


图1 六种茶类水提取物冻干粉对 NO 清除率的影响
Fig.1 NO-scavenging effect of water extract of six types of tea

六种茶类水提取物处理 RAW264.7 细胞 24 h 后,细胞存活率均在 90% 以上。在此基础上,进一步测定六个不同种类茶水提取物对 NO 产生量的影响,与空白组相比,LPS 单独处理 RAW264.7 巨噬细胞 24 h 后,细胞上清液中 NO 产生量显著增加 ($p < 0.05$),六个不同种类茶水提取物与 LPS 共培养可显著抑制 NO 的产生,随着处理浓度增加,NO 产生量逐渐降低,呈剂量依赖关系。经拟合计算得 NO 抑制率 IC_{50}

表2 六种茶类水提取物 NO 清除率和 NO 抑制率的 IC_{50} 值
Table 2 The IC_{50} values of water extract of six types of tea for NO-scavenging and NO-suppressing effect

样品	NO 清除率 IC_{50} 值 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	NO 抑制率 IC_{50} 值 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
绿茶	99.27 \pm 2.65 ^d	557.59 \pm 42.29 ^e
白茶	102.99 \pm 3.99 ^d	584.46 \pm 14.98 ^e
黄茶	104.83 \pm 1.91 ^d	398.13 \pm 28.28 ^d
乌龙茶	120.06 \pm 0.84 ^e	570.50 \pm 16.98 ^e
黑茶	176.04 \pm 3.72 ^b	671.52 \pm 23.74 ^b
红茶	214.68 \pm 9.49 ^a	951.27 \pm 23.41 ^a

注:不同茶类上标示无相同字母表示差异显著 ($p < 0.05$)。

值,如表 2 所示,黄茶 (398.13 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 对 NO 产生的抑制作用最强,绿茶、白茶、乌龙茶次之, IC_{50} 值在 557.59~584.46 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内,三者无显著性差异 ($p > 0.05$),红茶 (951.27 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 最弱。Tsai 等对药用植物和香料研究发现,抑制 LPS 诱导 RAW264.7 细胞产生 NO 受三个方面的综合影响:阻断 iNOS 蛋白表达;抑制 iNOS 酶活性;清除 NO 自由基^[10,17]。本研究从表 2 可知,黄茶与绿茶、白茶清除 NO 自由基的

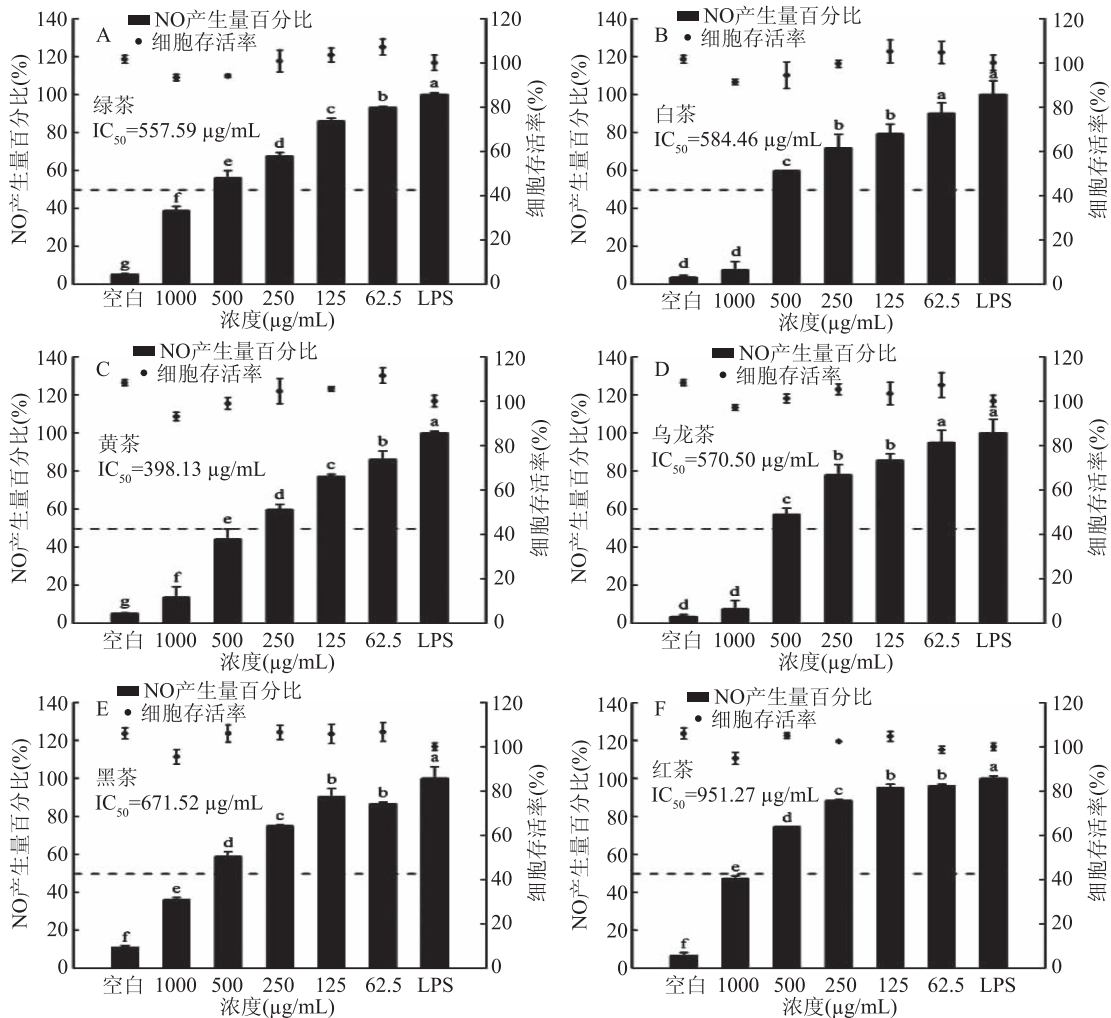


图2 六种茶类水提取物对 LPS 诱导 RAW264.7 巨噬细胞 NO 产生量和细胞存活率的影响
Fig.2 Effects of water extract of six types of tea on NO production and cell viability in LPS-induced RAW264.7 cells
注:无相同字母表示差异显著 ($p < 0.05$),图 3 同。

作用无显著差异,但抑制 NO 产生的作用显著强于二者($p < 0.05$),其可能在阻断 iNOS 蛋白表达或抑制 iNOS 酶活性方面作用更强。

2.3 不同茶类水提取物对 TNF- α 和 IL-6 释放的影响

炎症的病理过程除与 NO 相关外,巨噬细胞会产生促炎症因子 TNF- α 和 IL-6,引起 T 淋巴细胞的增殖和激活,进一步扩大炎症级联反应,造成组织损伤^[18]。因此, TNF- α 和 IL-6 的释放也是炎症发生的重要标志。从图 3 可知,与空白组相比, LPS 单独处理 RAW264.7 细胞后,细胞上清液中 TNF- α 和 IL-6 产生量显著增加($p < 0.05$)。与 LPS 单独处理组相比,六种茶类水提取物在 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度时,均能显著抑制 IL-6 释放,而对于 TNF- α ,绿茶、白茶、黄茶、乌龙茶可显著抑制 TNF- α 释放,黑茶和红茶则无抑制作用。其中黄茶对 TNF- α 和 IL-6 的抑制效果最强,抑制率分别为 69.25%、87.68%。

2.4 不同茶类水提取物冻干粉主要化学组成及相关性分析

本研究绿茶、白茶、黄茶、乌龙茶、黑茶、红茶水提取物冻干粉得率(占茶叶干重百分比)依次为 40.8%、39.5%、37.1%、33.6%、29.6%、32.8%,茶多酚、游离氨基酸、可溶性糖及咖啡碱含量测定结果如表 3 所示。

从表 3 可知,本研究六种茶类水提取物的主要理化成分含量存在差异,但均以茶多酚含量最高(19.65%~35.03%),不同茶类茶多酚含量大小依次是:绿茶>黄茶>白茶>乌龙茶>黑茶>红茶,这既与品种的遗传基础有关,也与不同茶类加工过程中多酚类等物质的氧化、水解等生化变化相关。赵洋等^[19]连续两年分析 22 个茶树品种的生化成分,结果发现茶多酚含量品种间差异显著。周瑞等^[20]研究发现,茶多酚含量随着茶叶发酵程度的加深而减少,主要是由于茶叶在发酵过程中多酚类物质发生氧化。

表 3 六种茶类水提取物冻干粉中主要化学成分的含量(%)

Table 3 The percentage of main chemical components in freeze-dried powder of water extract of six types of tea(%)

成分	绿茶	白茶	黄茶	乌龙茶	黑茶	红茶
茶多酚	35.03 \pm 1.24 ^a	33.55 \pm 1.49 ^{ab}	34.50 \pm 1.28 ^{ab}	32.49 \pm 0.69 ^b	23.11 \pm 0.60 ^c	19.65 \pm 0.59 ^d
游离氨基酸	9.68 \pm 1.28 ^b	13.52 \pm 0.36 ^a	8.15 \pm 0.11 ^c	9.06 \pm 0.48 ^{bc}	2.15 \pm 0.23 ^d	12.98 \pm 0.30 ^a
可溶性糖	6.49 \pm 0.30 ^b	5.97 \pm 0.23 ^c	7.42 \pm 0.36 ^a	6.92 \pm 0.02 ^{ab}	7.30 \pm 0.31 ^a	7.36 \pm 0.174 ^a
咖啡碱	6.02 \pm 0.22 ^c	9.66 \pm 0.06 ^b	8.24 \pm 0.21 ^c	7.29 \pm 0.16 ^d	10.82 \pm 0.05 ^a	7.02 \pm 0.14 ^d

注:表中数据表示各化学成分含量占茶叶水提取物冻干粉的百分比(%);同一组上标示无相同字母表示差异显著($p < 0.05$)。

表 4 六种茶类水提取物中主要理化成分含量与 NO 清除率 IC₅₀ 值、NO 抑制率 IC₅₀ 值、TNF- α 及 IL-6 产生量的相关性分析

Table 4 The correlation analysis between main chemical components in tea extract and the IC₅₀ values of

NO-scavenging and NO-suppressing effect, TNF- α and IL-6 production

成分	NO 清除率 IC ₅₀ 值	NO 抑制率 IC ₅₀ 值	TNF- α 产生量	IL-6 产生量
茶多酚	-0.9824 ^{***}	-0.8586 ^{***}	-0.8781 ^{***}	-0.8979 ^{***}
游离氨基酸	-0.1063	0.2594	-0.2987	-0.2614
可溶性糖	0.5838 [*]	0.2283	0.2942	0.4913 [*]
咖啡碱	0.1299	-0.0091	0.0074	0.2121

注: * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ 。

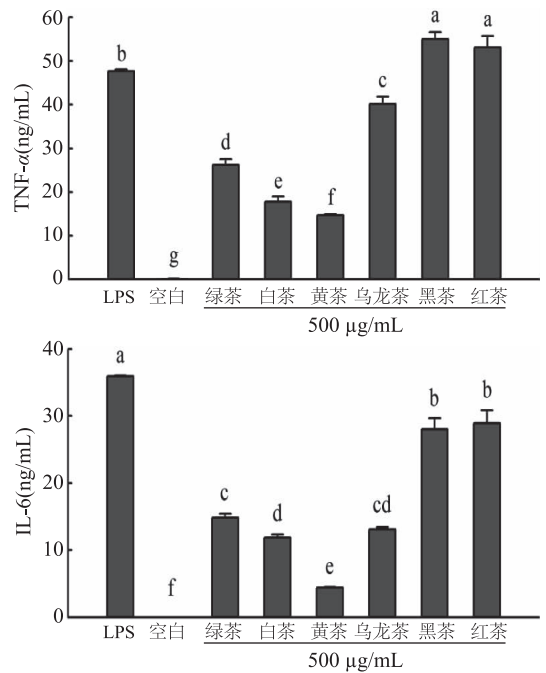


图 3 六种茶类水提取物对 LPS 诱导 RAW264.7 巨噬细胞产生 TNF- α 、IL-6 的影响

Fig.3 Effects of water extract of six types of tea on TNF- α and IL-6 production in LPS-induced RAW 264.7 cells

绿茶属于未发酵茶,乌龙茶属于半发酵茶,白茶和黄茶的发酵程度介于绿茶和乌龙茶之间,黑茶(后发酵)和红茶(全发酵)的发酵程度大于乌龙茶。游离氨基酸以白茶中的含量最高(13.52%),黑茶最低(2.15%)。六种茶类水提取物可溶性糖含量为 5.97%~7.42%,咖啡碱含量为 6.02%~10.82%。在理化组分分析基础上,与六种茶类的抗炎功能活性进行相关性分析。

本研究相关性分析表明,茶多酚含量与清除 NO 的 IC₅₀ 值、抑制细胞产生 NO 的 IC₅₀ 值、TNF- α 以及 IL-6 产生量均呈显著负相关($p < 0.001$),相关系数

分别为-0.9824、-0.8586、-0.8781、-0.8979(表4),表明茶多酚很可能是影响不同茶类发挥抗炎活性的主要功能性成分。Paquay 等研究表明,绿茶和红茶多酚均可有效清除 NO 自由基^[8]。Lin 等研究发现,绿茶、乌龙茶以及红茶抑制 LPS 诱导 RAW264.7 产生 NO 是由于多种酚类物质的相互结合,而不仅仅是儿茶素,指出茶多酚可能是抑制 NO 产生的主要活性成分^[9]。Ho 等研究表明,龙眼花提取物抑制 LPS 诱导 RAW264.7 细胞产生 NO 是由于多酚类、黄酮类、原花青素类等共同作用的结果,而不仅仅是单一的多酚类物质^[21]。另外,研究表明,茶多酚^[22]、咖啡碱^[23]均可在基因转录和翻译水平上,抑制促炎症因子 TNF- α 和 IL-6 的产生,相比于咖啡碱,茶多酚的抑制效果较好^[24]。

2.5 黄茶水提取物对 iNOS 基因转录和翻译表达的影响

从上述实验结果可知,黄茶对 NO 自由基的清除作用与白茶和绿茶无显著差异,而在细胞水平上,相比于其他茶类,黄茶的抗炎效果最强,因此,选取黄茶为代表,进一步对 RAW264.7 细胞中调控 NO 产生的 iNOS 基因表达进行分析,结果如图 4、图 5 所示。

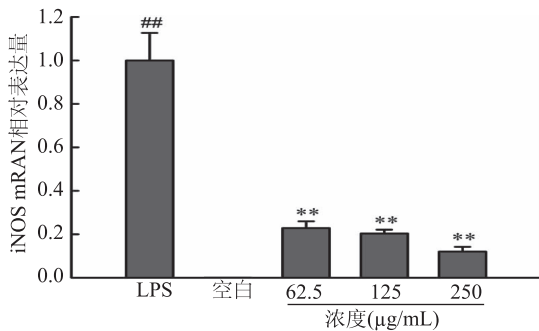


图4 黄茶水提取物对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞表达 iNOS mRNA 的影响

Fig.4 Effect of water extract of yellow tea a on iNOS mRNA expression in LPS-induced RAW264.7 cells

注:### ($p < 0.01$)表示与空白组差异显著;

** ($p < 0.01$)表示与 LPS 诱导组差异显著。

由图 4、图 5 可知,相比于空白组,LPS 单独诱导 RAW264.7 细胞后,细胞内 iNOS mRNA 和 iNOS 蛋白表达量极显著上调($p < 0.01$)。在 62.5、125、250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度范围内,黄茶水提取物处理组 iNOS mRNA 相对表达量分别为 LPS 诱导组的 21%、19%、11%,即黄茶水提取物处理极显著下调 iNOS mRNA 表达($p < 0.01$);黄茶水提取物处理组 iNOS 蛋白相对表达量分别为 LPS 诱导组的 73%、48%、32%,即黄茶水提取物处理显著降低 iNOS 蛋白表达水平($p < 0.05$)。核转录因子 kappaB (NF- κB)是细胞中重要的转录调节因子,在炎症病理过程,NF- κB 信号途径的激活会诱导产生促炎症因子,如 NO、TNF- α 、IL-6 等,促炎症因子又会进一步活化 NF- κB ,导致恶性循环,从而加剧炎症反应,因此,大量抗炎药物以 NF- κB 为作用靶点^[23,25]。研究表明,茶叶中咖啡碱^[23]、茶多酚^[24]均可通过抑制 NF- κB 信号途径的激活,下调

RAW264.7 细胞内 iNOS mRNA 和 iNOS 蛋白表达。以上结果表明,黄茶可通过下调 RAW264.7 巨噬细胞中 iNOS mRNA 转录水平,从而抑制 iNOS 蛋白表达,可能主要是黄茶中茶多酚与咖啡碱共同作用的结果。

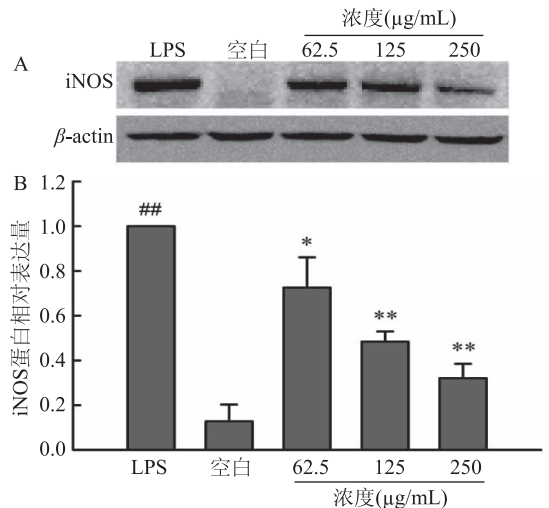


图5 黄茶水提取物对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞表达 iNOS 蛋白的影响

Fig.5 Effect of water extract of yellow tea a on iNOS protein expression in LPS-induced RAW264.7 cells

注:## ($p < 0.01$)表示与空白组差异显著;

* ($p < 0.05$)和 ** ($p < 0.01$)表示与 LPS 诱导组差异显著。

3 结论

由于品种及制茶工艺不同,六种茶类的化学成分存在差异,但均可有效清除 NO 自由基,其中绿茶、白茶、黄茶对 NO 的清除能力较强,IC₅₀ 值在 99.27~104.83 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内,三者无显著性差异,其次是乌龙茶、黑茶、红茶。

相比于其他茶类,黄茶对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞产生 NO、TNF- α 以及 IL-6 的抑制作用最强,NO 抑制率 IC₅₀ 值为 398.13 $\mu\text{g}/\text{mL}$,处理浓度为 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,黄茶对 TNF- α 和 IL-6 的抑制率分别为 69.25%、87.68%。

相关性分析结果表明,茶多酚含量与 NO 自由基清除率 IC₅₀ 值、NO 产生抑制率 IC₅₀ 值、TNF- α 以及 IL-6 产生量呈显著负相关性($p < 0.001$),表明茶多酚很可能是影响不同茶类发挥抗炎活性的主要成分。

在 LPS 诱导 RAW264.7 细胞模型中,黄茶可在转录和翻译水平通过下调 iNOS 基因的表达,从而抑制 NO 的产生。

参考文献

- [1] Hussain S P, Harris C C. Inflammation and cancer: An ancient link with novel potentials [J]. International Journal of Cancer, 2007, 121(11): 2373-2380.
- [2] Nathan, C. Points of control in inflammation [J]. Nature, 2002, 420(6917): 846-852.
- [3] Patel U, Rajasingh S, Samanta S, et al. Macrophage polarization in response to epigenetic modifiers during infection

- and inflammation [J]. Drug Discovery Today, 2017, 22 (1): 186-193.
- [4] Liu X, Fang L, Guo T B, et al. Drug targets in the cytokine universe for autoimmune disease [J]. Trends in Immunology, 2013, 34(3): 120-128.
- [5] 宛晓春. 茶叶生物化学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2003: 9-39.
- [6] Yang, C S, Hong J. Prevention of chronic diseases by tea: Possible mechanisms and human relevance[J]. Annual Review of Nutrition, 2013, 33(1): 161-181.
- [7] Chatterjee P, Chandra S, Dey P, et al. Evaluation of anti-inflammatory effects of green tea and black tea: A comparative *in vitro* study[J]. Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research, 2012, 3(2): 136-138.
- [8] Paquay J B G, Haenen G R M M, Stender G, et al. Protection against nitric oxide toxicity by tea[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000, 48(11): 5768-5772.
- [9] Lin C, Lu M, Chen S, et al. Heavy fermentation impacts NO-suppressing activity of tea in LPS-activated RAW 264.7 macrophages[J]. Food Chemistry, 2006, 98(3): 483-489.
- [10] Tsai P, Tsai T, Yu C, et al. Comparison of NO-scavenging and NO-suppressing activities of different herbal teas with those of green tea[J]. Food Chemistry, 2007, 103(1): 181-187.
- [11] Zhang G, Li B, Lee C, et al. Cysteine and glutathione mixed-disulfide conjugates of thiosulfates: Chemical synthesis and biological activities [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58(3): 1564-1571.
- [12] 林晓蓉. 天然茶汤纳米聚集体形成机理与功能特性研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2014.
- [13] 钟萝. 茶叶品质理化分析[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1989: 499.
- [14] Lin X R, Chen Z Z, Zhang Y Y, et al. Comparative characterization of green tea and black tea cream; Physicochemical and phytochemical nature [J]. Food Chemistry, 2015, 173 (15): 432-440.
- [15] 王佐, 王璐, 陈忠正, 等. 冬凌草甲素诱导小鼠肝癌细胞醌还原酶活性及其机理研究[J]. 食品科学, 2017(7): 193-200.
- [16] Namal Senanayake S P J. Green tea extract: Chemistry, antioxidant properties and food applications—A review[J]. Journal of Functional Foods, 2013, 5(4): 1529-1541.
- [17] Tsai T H, Tsai P J, Ho S C. Antioxidant and anti-inflammatory activities of several commonly used spices [J]. Journal of Food Science, 2005, 70(1): 93-97.
- [18] Pan M, Lai C, Ho C. Anti-inflammatory activity of natural dietary flavonoids[J]. Food & Function, 2010, 1(1): 15-31.
- [19] 赵洋, 杨培迪, 刘振, 等. 22个茶树品种春梢生化成分分析[J]. 茶叶通讯, 2016(3): 19-22.
- [20] 周端, 刘淑敏, 黄惠华. 发酵程度不同的茶浸提液抗氧化能力比较及茶多酚细胞抗氧化活性研究[J]. 食品科技, 2014(9): 216-222.
- [21] Ho S, Hwang L S, Shen Y, et al. Suppressive effect of a proanthocyanidin-rich extract from Longan (*Dimocarpus longan* Lour.) flowers on nitric oxide production in LPS-stimulated macrophage cells[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55(26): 10664-10670.
- [22] Yang F, Villiers W J S, McClain C J, et al. Green tea polyphenols block endotoxin-induced tumor necrosis factor-production and lethality in a murine model [J]. The Journal of Nutrition, 1998, 128(12): 2334-2340.
- [23] Hwang J, Kim K, Ryu S, et al. Caffeine prevents LPS-induced inflammatory responses in RAW264.7 cells and zebrafish [J]. Chemico-Biological Interactions, 2016, 248: 1-7.
- [24] Lin Y, Lin J. (-)-Epigallocatechin-3-gallate blocks the induction of nitric oxide synthase by down-regulating lipopolysaccharide-induced activity of transcription factor nuclear factor- κ B[J]. Molecular Pharmacology, 1997, 52(3): 465.
- [25] Karin M, Yamamoto Y, Wang Q M. The IKK NF- κ B system: A treasure trove for drug development [J]. Nature Reviews Drug Discovery, 2004, 3(1): 17-26.

(上接第 66 页)

- 测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [9] 中华人民共和国卫生部. GB/T5009.6-2003 食品中脂肪的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2003.
- [10] 中华人民共和国卫生部. GB/T5009.88-2008 食品中膳食纤维的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- [11] 中华人民共和国卫生部. GB/T5009.90-2003 食品中矿物质元素的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2003.
- [12] 中国国家标准化管理委员会. GB/T 5009.159-2003 食品中还原型抗坏血酸的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2003.
- [13] 中国国家标准化管理委员会. GB/T5009.82-2003 食品中维生素 A 和维生素 E 的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2003.
- [14] 白鸿. 保健食品功效成分检测方法[M]. 中国中医药出版社, 2011, 5: 73-85.
- [15] 贾瑞博, 赵慧, 刘凯丽, 等. 树舌灵芝总三萜提取工艺优化及其抗氧化作用研究[J]. 应用化工, 2016(6): 1030-1035.
- [16] 中华人民共和国卫生部. GB5009.4-2010 食品中灰分的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [17] 中国国家标准化管理委员会. GB/T5009.124-2003 食品中氨基酸的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2003.
- [18] 中国国家标准化管理委员会. GB/T 22223-2008 食品中脂肪酸的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- [19] 邵佳, 郁建平, 胡美忠. 草珊瑚水溶性粗多糖提取及抗氧化性能研究[J]. 食品科学, 2007, 28(11): 283-286.
- [20] Shimada K, Fujikawa K, Yahara K, et al. Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cycloextrin emulsion [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 1992, 40(6): 945-948.
- [21] 朱丽蓉, 吴萍萍, 杨大伟, 等. 杜仲雄花茶多糖的响应面优化提取及其抗氧化活性评价[J]. 食品工业科技, 2015, 36(3): 199-203.
- [22] 苏东林, 李高阳, 何建新, 等. 温州蜜柑皮中氨基酸及脂肪酸的组成分析研究[J]. 食品工业科技, 2012, 48(2): 100-102.