

# 茶叶提取物对小肠 Caco-2 细胞糖吸收的抑制作用

倪德江<sup>1</sup> 陈玉琼<sup>1</sup> 余志<sup>1</sup> 彼得 R. 埃利斯<sup>2</sup> 克里斯托弗 P. 科尔佩<sup>2</sup>

1. 华中农业大学园艺林学学院/园艺植物生物学教育部重点实验室, 武汉 430070;

2. School of Biomedical and Health Sciences, King's College London, London SE1 9NH, United Kingdom

**摘要** 利用水提法制备绿茶、乌龙茶、红茶、青砖茶和普洱茶提取物, 研究 5 种提取物对体外小肠 Caco-2 细胞吸收葡萄糖的抑制效果。结果表明: 在相同质量浓度 (0.5 mg/mL) 条件下, 5 种茶叶提取物均能抑制 Caco-2 细胞吸收葡萄糖的活性, 抑制能力大小依次为绿茶>乌龙茶>红茶>青砖茶>普洱茶; 与对照相比, 绿茶、乌龙茶、红茶和青砖茶提取物极显著抑制葡萄糖的吸收, 但普洱茶提取物的抑制效果并未达到显著水平 ( $P>0.05$ )。茶叶提取物抑制小肠 Caco-2 细胞吸收葡萄糖的能力可能与加工过程中儿茶素的转化有关。

**关键词** 茶叶提取物; Caco-2 细胞; 葡萄糖吸收; 儿茶素; 糖尿病

**中图分类号** R 285 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2013)01-0116-04

茶叶的降血糖效果已被许多实验证实, 以儿茶素为主的多酚类被认为是主要的降血糖活性成分<sup>[1-3]</sup>。已有研究<sup>[4-10]</sup>表明, 茶叶能通过抑制小肠淀粉水解酶的活性、抑制葡萄糖的吸收与运输、抑制肝脏葡萄糖的形成、增加胰岛素敏感性, 以及调节与葡萄糖平衡相关的细胞内信号传递通道等途径来调节糖代谢。Koh 等<sup>[5]</sup>的研究表明, 绿茶、乌龙茶和红茶能显著抑制人体唾液  $\alpha$ -淀粉酶、哺乳动物  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的活性, 其中红茶的效果最好。Waltner-law 等<sup>[9]</sup>利用体外模型揭示出表没食子儿茶素没食子酸酯 (EGCG) 能降低大鼠肝细胞瘤中糖的形成, 有类似胰岛素的活性, 能增加胰岛素受体和受体底物酪氨酸磷酸化的作用。

近年来, 通过抑制小肠糖的吸收与运输以控制餐后血糖水平已被认为是预防与治疗糖尿病最为有效的途径<sup>[11-13]</sup>。淀粉水解形成的葡萄糖一般通过小肠顶膜跨上皮运输系统的协同转运蛋白 (SGLT1) 而被吸收, 然后由葡萄糖转运子 (GLUT2) 转运跨越基底外侧膜进入血液系统。Kreydiyyeh 等<sup>[14]</sup>曾经报道茶叶水提取物能抑制大鼠小肠葡萄糖的吸收。Shimizu 等<sup>[7]</sup>利用兔小肠 BBMVs 评价了表没食子儿茶素没食子酸酯 (EGCG)、表儿茶素没食子酸酯 (ECG)、儿茶素 (C)、没食子酸儿茶素 (EC)、表没食子酸儿茶素 (EGC) 对 Caco-2 细胞吸收葡萄糖的影

响, 初步结果表明, ECG 以竞争性的方式抑制 SGLT1。然而进一步的研究报道较少。鉴于此, 笔者利用人体腺癌 Caco-2 细胞模型, 分析绿茶、乌龙茶、红茶、青砖茶和普洱茶提取物对小肠葡萄糖吸收的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

三级炒青绿茶, 湖北省宣恩县五台昌臣茶叶有限公司; 铁观音, 武汉敬和茶叶有限公司; 工夫红茶, 云南凤庆陈缘茶厂; 青砖茶、普洱茶, 武汉易生生物工程公司。Caco-2 细胞 (TC7 clone-human adenocarcinoma), 由伦敦国王学院营养学系 Paul Sharp 博士提供; DMEM 培养基、非必需氨基酸, Invitrogen Ltd., UK; 胎牛血清, PAA Laboratories GmbH, Austria; 青霉素/链霉素, Hyclone Laboratories Inc; 支原体抗生素 Plasmocin, Corporate Headquarters, USA; 同位素吸收液, Biodegradable Scintillation Solution, Atlanta, Georgia, USA; <sup>14</sup>C-D-葡萄糖, Perkin Elmer, Boston, USA; 其他试剂均为分析纯。

### 1.2 试验方法

1) 茶叶提取物的制备。茶样经过粉碎后过孔径 350  $\mu\text{m}$  筛, 然后按照茶水质量比 1:20, 用沸蒸馏

收稿日期: 2011-12-14

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31270732)

倪德江, 博士, 教授。研究方向: 茶叶功能化学。E-mail: nidj@mail.hzau.edu.cn

水浸提 2 次, 第 1 次浸提 20 min, 第 2 次浸提 10 min, 合并滤液后过滤, 于 55 °C 下减压浓缩, 最后冷冻干燥。

2) 细胞培养。Caco-2 细胞(43~47 代)接种于 24 孔的培养板(Costar, UK; Buckinghamshire, UK), 接种密度  $4 \times 10^4$  个/cm<sup>2</sup>, 置于 37 °C 且含 5% 的 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。DMEM 培养液含 10% 胎牛血清、1% 非必需氨基酸、1% 青霉素/链霉素双抗液、1% L-谷氨酸、0.25 mg 支原体抗生素 Plasmocin。细胞培养时间 16~20 d。

3) 试验处理。当细胞生长至单分子层时, 从培养箱中取出细胞在室温下放置 15~30 min, 然后用 KBSS 缓冲液(pH 7.2~7.4, 137 mmol/L NaCl, 4.7 mmol/L KCl, 1.2 mmol/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mmol/L MgSO<sub>4</sub>, 10 mmol/L HEPES) 洗 3 次。

① 孵育试验。在 Caco-2 细胞中加入绿茶提取物(用 KBSS 缓冲液溶解, 5 mg/mL), 在室温下混合孵育 0、5、10、15、20 min, 然后加入 <sup>14</sup>C-D-葡萄糖吸收液(用含 0.50 mg/mL 绿茶提取物的 KBSS 缓冲液配制成 1.0 mmol/L D-葡萄糖, 含 <sup>14</sup>C-D-葡萄糖)吸收 2 min。对照(control)为不含茶叶提取物的 <sup>14</sup>C-D-葡萄糖吸收液, 吸收时间 2 min。

② 不同茶叶提取物试验。在 Caco-2 细胞中分别加入绿茶、乌龙茶、红茶和青砖茶、普洱茶提取物(用 KBSS 缓冲液溶解, 0.50 mg/mL), 在室温下混合孵育 10 min, 然后加入 <sup>14</sup>C-D-葡萄糖吸收液(同上)吸收 2 min。

上述吸收反应 2 min 后, 将反应液吸出, 用冰冷的 PBS 缓冲液洗 3 次, 然后加入 0.5 mL 200

mmol/L NaOH, 置于 37 °C 恒温箱中溶解 1 h。吸取 0.4 mL 溶解液于含有 2.5 mL 同位素吸收液的小瓶中, 充分平衡后进行同位素活度测定(LS 6500 Multi-Purpose Scintillation Counter, USA), 同时用考马斯亮蓝方法测定蛋白质含量(Protein Quantification Kit-Rapid, Sigma-Aldrich Chemical Reagent Co., Ltd., UK)。

### 1.3 统计分析

所有数据采用统计学软件(SAS Institute, NC)进行分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 孵育时间对糖吸收的影响

在进行细胞糖吸收试验前, 先将试验物溶解于 KBSS 缓冲液, 然后与细胞孵育一定时间。孵育时间对糖吸收的影响结果见图 1-A。与对照(2 139 pmol/min)相比, 孵育时间 0、5、10、15、20 min 各处理 Caco-2 细胞对糖的吸收差异极显著( $P < 0.01$ ); 与 0 min 处理相比, 5、10、15、20 min 各处理差异极显著( $P < 0.01$ ); 但孵育时间超过 5 min 后各处理间差异不显著( $P > 0.05$ )。由此说明, 在进行茶叶提取物试验时, 孵育时间以 5~10 min 为宜。

由图 1-A 可知, 直接在吸收液中加入茶叶提取物, 同样显著影响细胞对糖的吸收。为了进一步分析茶叶提取物对糖吸收的动态变化, 考察了不同时间下茶叶提取物对糖吸收的影响, 结果见图 1-B。无论加入茶叶提取物与否, 细胞对葡萄糖的吸收趋势非常相似, 即在 2~5 min 缓慢增加, 5 min 后急剧增加。加入茶叶提取物后显著降低了细胞对糖的吸收。

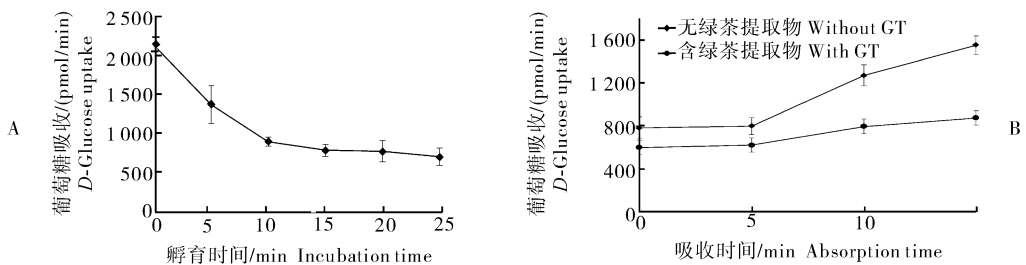


图 1 孵育(A)和吸收(B)时间对小肠 Caco-2 细胞吸收糖的影响( $n=4$ )

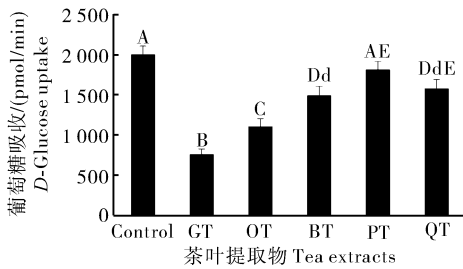
Fig. 1 Effect of pre-incubation(A) time and absorption(B) time on <sup>14</sup>C-D-glucose uptake in Caco-2 cells

### 2.2 茶叶提取物对糖吸收的影响

由图 2 可知, 5 种茶叶提取物均有抑制 Caco-2 细胞吸收葡萄糖的活性, 抑制能力大小依次为绿

茶>乌龙茶>红茶>青砖茶>普洱茶。统计分析表明, 与对照相比, 除普洱茶提取物( $P > 0.05$ )外, 其他提取物差异极显著( $P < 0.01$ )。从茶类间的比较可

知,绿茶、乌龙茶、红茶处理间差异极显著,青砖茶与红茶相比差异不显著,与绿茶、乌龙茶差异极显著,与普洱茶相比差异显著( $P < 0.05$ )。



GT:绿茶水提取物 Green tea extract; OT:乌龙茶水提取物 Oolong tea extract; BT:红茶水提取物 Black tea extract; PT:普洱茶水提取物 Pu-erh tea extract; QT:青砖茶水提取物 Qingzhan tea extract; 结果表示为平均值±标准差(6次重复) Results are expressed as means±SD( $n=6$ ); 相同字母表示在 0.01 或 0.05 水平差异不显著 The same letter indicates results are not significantly different at 0.01 level (capital) or 0.05 level (small letter) according to *t* test.

图 2 茶叶提取物对糖吸收的影响

Fig. 2 Effect of tea extracts on  $^{14}\text{C}$ -D-glucose uptake in Caco-2 cells

### 3 讨论

儿茶素是茶叶中主要的糖吸收抑制剂。研究<sup>[15-16]</sup>表明,茶叶中儿茶素、黄酮醇、黄酮、花青素、酚酸和多糖具有降血糖活性。这些活性成分在抑制小肠 Caco-2 细胞吸收葡萄糖方面可能起着不同的作用。尽管茶叶中的粗多糖在干物质中含量为 1%~3%,但我们前期研究绿茶粗多糖的试验表明,此类物质对小肠 Caco-2 细胞吸收葡萄糖并无显著抑制效果。我们也分析了花青素和天竺葵色素对小肠 Caco-2 细胞吸收葡萄糖的活性,虽然这 2 种色素对葡萄糖吸收有一定抑制活性,但差异并不显著。槲皮素、杨梅素等黄酮醇物质已被证实对小肠 Caco-2 细胞吸收葡萄糖具有显著的抑制效果<sup>[11-12]</sup>,但它们在茶叶中分别仅占 0.2%~0.4%、0.07%~0.2%,而且在水中的溶解性较低。茶叶中还含有 0.5%~1.4%的没食子酸、0.3%的绿原酸以及 0.1%的咖啡酸。Welsch 等<sup>[17]</sup>研究表明绿原酸和咖啡酸能抑制  $\text{Na}^+$  依赖的大鼠刷状缘膜葡萄糖吸收。茶叶中的儿茶素含量丰富,占干物质的 12%~24%。Shimizu 等<sup>[7]</sup>和 Kobayshi 等<sup>[8]</sup>的研究表明,儿茶素对小肠糖吸收有显著的抑制活性。Shimizu 等<sup>[7]</sup>的研究同时揭示出茶红素并无糖抑制活性。我们的研究表明,

茶黄素对小肠糖吸收有显著的抑制活性,但效果较儿茶素混合物要差(另文报道)。

茶类间引起糖吸收差异的原因可能与加工工艺有关。绿茶、乌龙茶、红茶分别属于不发酵、半发酵和全发酵茶,而黑茶属于后发酵茶。由于绿茶加工的杀青工序钝化了酶活性,多酚类得以最大限度地保留,儿茶素含量最高。红茶加工过程中显著的化学变化是以儿茶素氧化为主,形成茶黄素、茶红素和茶褐素等产物,儿茶素含量较低。而乌龙茶加工过程中儿茶素轻微氧化,含量介于绿茶和红茶之间。青砖茶和普洱茶属于黑茶类,渥堆发酵的湿热作用以及微生物作用促进了多酚类的深度氧化,氧化产物复杂。通过液相色谱分析,试验所用的绿茶、乌龙茶和红茶提取物中儿茶素含量分别为 21.92%、14.39%、2.24%;进一步的分析表明,3 类茶叶提取物对小肠 Caco-2 细胞糖吸收的抑制效果与儿茶素含量呈显著的正相关( $r_{\text{IC50-catechin}} = -0.997$ ,另文报道)。至于普洱茶提取物对小肠 Caco-2 细胞糖吸收抑制效果差的原因可能与多酚的深度氧化有关。

有关茶叶提取物抑制小肠糖吸收的机理研究较少。一般而言,小肠 Caco-2 细胞能表达糖转运子,如 SGLT1、GLUT1、GLUT2、GLUT3,其中 SGLT1 和 GLUT2 被认为是糖吸收与跨膜运输的主要转运子<sup>[18]</sup>。其他酚类物质如槲皮素、根皮素抑制小肠糖吸收的研究很深入,而且进入临床应用。目前,有关茶叶活性成分抑制小肠糖吸收机理的研究较少。Shimizu 等<sup>[7]</sup>的初步研究显示 ECG 可能以竞争性的方式抑制 SGLT1。今后有必要从抑制转运子的种类及其基因表达等方面进行深入研究。

### 参 考 文 献

- [1] VINSON J A, ZHANG J. Black and green teas equally inhibit diabetic cataracts in a streptozotocin-induced rat model of diabetes[J]. J Agric Food Chem, 2005, 53: 3710-3713.
- [2] HOSODA K, WANG M F, LIAO M L, et al. Antihyperglycemic effect of oolong tea in type 2 diabetes[J]. Diabetes Care, 2003, 26: 1714-1718.
- [3] 陈勋, 贾尚智, 闵彩云. 茶叶的抗癌作用研究进展[J]. 湖北农业科学, 2011, 50(2): 221-225.
- [4] HARA Y, HONDA M. The inhibition of alpha-amylase by tea polyphenols[J]. Agric Biol Chem, 1990, 54 (8): 1939-1945.
- [5] KOH L W, WONG L L, LOO Y Y, et al. Evaluation of different teas against starch digestibility by mammalian glycosidases[J]. J Agric Food Chem, 2010, 58: 148-154.
- [6] LIU J, WANG M Z, PENG S L, et al. Effect of green tea cate-

- chins on the postprandial glycemic response to starches differing in amylose content[J]. *J Agric Food Chem*, 2011, 59: 4582-4588.
- [7] SHIMIZU M, KOBAYASHI Y, SUZUKI M, et al. Regulation of intestinal glucose transport by tea catechins[J]. *BioFactor*, 2000, 13(14): 61-65.
- [8] KOBAYASHI Y, SUZUKI M, SATSU H, et al. Green tea polyphenols inhibit the sodium dependent glucose transporter of intestinal epithelial cells by a competitive mechanism[J]. *J Agric Food Chem*, 2000, 48: 5618-5623.
- [9] WALTNER-LAW M E, WANG X L, LAW B K, et al. Epigallocatechin gallate, a constituent of green tea, represses hepatic glucose production[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277: 34933-34940.
- [10] ANDERSON R A, POLANSKY M M. Tea enhances insulin activity[J]. *J Agric Food Chem*, 2002, 50: 7182-7186.
- [11] KWON O, ECK P, CHEN S L, et al. Inhibition of the intestinal glucose transporter GLUT2 by flavonoids[J]. *The FASEB Journal*, 2007, 21: 366-377.
- [12] JOHNSON K, SHARP P, CLIFFORD M, et al. Dietary polyphenols decrease glucose uptake by human intestinal Caco-2 cells[J]. *FEBS Letters*, 2005, 579: 1653-1657.
- [13] 张俭, 曾军英, 唐铭, 等. 多穗柯不同液相提取物对糖尿病小鼠 MDA/CAT 活性的影响[J]. *湖北农业科学*, 2012, 51(2): 354-357.
- [14] KREYDIYYEH S I, ABDEL-HASAN B E, CHURUKIAN Z M. Tea extract inhibits intestinal absorption of glucose and sodium in rats[J]. *Comp Biochem Physiol*, 1994, 108(3): 359-365.
- [15] BRYANS J A, JUDD P A, ELLIS P R. The effect of consuming instant black tea on postprandial plasma glucose and insulin concentrations in healthy humans[J]. *Journal of the American College of Nutrition*, 2007, 26: 471-477.
- [16] CHEN H, WANG Z, QU Z, et al. Physicochemical characterization and antioxidant activity of a polysaccharide isolated from oolong tea[J]. *European Food Research and Technology*, 2009, 229: 629-635.
- [17] WELSCH C A, LACHANCE P A, WASSERMAN B P. Dietary phenolic compounds: inhibition of Na<sup>+</sup>-dependent D-glucose uptake in rat intestinal brush border membrane vesicles[J]. *J Nutr*, 1989, 119: 1698-1704.
- [18] MAHRAOUI L, RODOLOSSE A, BARBAT A, et al. Presence and differential expression of SGLT1, GLUT1, GLUT2, GLUT3 and GLUT5 hexose-transporter mRNAs in Caco-2 cell clones in relation to cell growth and glucose consumption[J]. *Biochemical Journal*, 1994, 298: 629-633.

## Inhibition of tea extracts on glucose uptake by polarized intestinal Caco-2 cells

NI De-jiang<sup>1</sup> CHEN Yu-qiong<sup>1</sup> YU Zhi<sup>1</sup> Peter R. Ellis<sup>2</sup> Christopher P. Corpe<sup>2</sup>

1. *College of Horticulture and Forestry Sciences/Key Laboratory of Horticultural Plant Biology, Ministry of Education, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;*

2. *Biopolymers, School of Biomedical and Health Sciences, King's College London, SE1 9NH London, United Kingdom*

**Abstract** The green tea extract (GT), oolong tea extract (OT), black tea extract (BT), Qingzhan tea extract (QT) and Pu-erh tea extract (PT) were prepared by using water and the effect of them on intestinal glucose uptake was investigated using polarized Caco-2 intestinal cells. The extracts (0.5 mg/mL) inhibited glucose uptake into the intestinal Caco-2 cells under sodium-dependent conditions in the order: GT>OT>BT>QT>PT. Compared with control, GT, OT, BT and QT inhibited significantly glucose-uptake ( $P<0.01$ ), except for PT ( $P>0.05$ ). Catechin may be the predominant inhibitor in tea and its conversion during manufacturing could affect the glucose-uptake inhibitory activity.

**Key words** tea extract; Caco-2 cell; glucose transport; catechin; diabetes