桑椹花色苷对晚期糖基化末端产物抑制作用及其机制分析

张朝红，柏广玲，李巨秀，樊明涛

（西北农林科技大学食品科学与工程学院，陕西杨凌 712100）

摘要：晚期糖基化末端产物（Advanced Glycation End Products，AGEs）是蛋白质游离氨基与还原糖羰基反应形成的一类复杂物质的总称，是诱发糖尿病等多种慢性病的重要因素之一，而多酚类化合物能够抑制 AGEs 的形成。为了探讨桑椹花色苷对 AGEs 的抑制机制，建立牛血清蛋白（BSA）/葡萄糖（Glucose）生成 AGEs 模拟反应体系，以 0.5%酸性乙醇提取、AB-8 型大孔树脂纯化的桑椹花色苷为抑制剂，测定反应体系中蛋白质羰基、巯基含量变化、羟基自由基（•OH）对 AGEs 形成的影响，利用 SDS-PAGE 凝胶电泳技术分析 BSA 的分子量变化。研究结果表明，随着桑椹花色苷浓度的增加，反应体系中的 AGEs 含量显著降低（P<0.05）。桑椹花色苷可显著抑制·OH 诱导的 AGEs 的形成（P<0.05）。桑椹花色苷通过保护巯基和抑制蛋白质形成羰基而抑制 AGEs 生成；SDS-PAGE 图谱显示，桑椹花色苷可阻断糖基化反应导致的蛋白质交联物的形成。

关键词：桑椹；花色苷；抑制；晚期糖基化末端产物

文章篇号：1673-9078(2014)5-38-43

Inhibitory Effect of Mulberry Fruit Anthocyanins on Advanced Glycation End-product Formation

ZHANG Chao-hong, BAI Guang-ling, LI Ju-xiu, FAN Ming-tao

(College of Food Science and Engineering, Northwest A&F University, Yangling 712100, China)

Abstract: Advanced glycation end product (AGE) is a complex group of compound that formed through Maillard reaction, a nonenzymatic reaction between free amino groups of protein and the carbonyl group of reducing sugar, which is one of the important factors that induce diabetes and other chronic diseases. In this paper, Mulberry anthocyanins were extracted with 0.5% acidic ethanol and purified by AB-8 macroporous resin. To investigate inhibitory effect of Mulberry anthocyanins on the formation of AGEs, BSA/Glucose model systems were carried out. Meanwhile, the effects of protein carbonyl and thiol groups content, hydroxyl radicals (·OH) on AGEs formation were observed to study the inhibition mechanism of mulberry anthocyanins, and the molecular weight change in natvie and glycated-BSA was analyzed by SDS-PAGE gel electrophoresis. The results indicated that AGEs decreased significantly ($P < 0.05$) with the increase of mulberry anthocyanins concentration. Mulberry anthocyanins had a significant ($P < 0.05$) inhibitory effect on the formation of AGEs induced by hydroxyl radicals (·OH), and it could inhibit the generation of AGEs by protecting thiol and capturing reactive carbonyl intermediates. The SDS-PAGE electrophoretogram showed that mulberry anthocyanins could inhibit the formation of protein crosslinking caused by glycosylation reaction.

Key words: mulberry; anthocyanins; inhibitory; advanced glycation end products

晚期糖基化末端产物（Advanced glycation end products，AGEs）主要通过美拉德反应、脂肪氧化反应或多元醇降解途径生成。美拉德反应和脂肪氧化反应是食品加工和贮藏过程中两类最主要的化学反应，在这两类反应中，有可能生成 AGEs。AGEs 是一类结构复杂的系列化合物，化学性质稳定，通过膳食进入消化系统后在细胞内外积累，与流性行慢性病的发生和发展有重要的相关性[1~4]。AGEs 在体内的积累可以改变心血管系统的结构和功能，导致内皮功能紊乱、动脉硬化、心肌舒张异常，降低了低密度脂蛋白浓度，引发心血管疾病。此外，早期肾病、老年痴呆症、白内障、骨骼肌衰老等慢性病与 AGEs 在组织内积累有重要关系[5~7]。

一些化学药物或多酚类化合物可以抑制 AGEs 的

收稿日期：2014-01-06

基金项目：国家自然科学基金资助项目（31101217）；陕西省科技厅科技计划项目(2009K01-17)

作者简介：张朝红（1973-），男，博士生，主要从事食品化学方向的研究

通讯作者：樊明涛（1963-），男，博士，教授，主要从事食品生物技术与食品安全研究

形成，减轻对人体健康的危害。AGEs 抑制剂可分为三类：抗氧化剂、活性二羰基化合物捕获剂和交联物分解剂[9]。目前，最为广泛应用的 AGEs 抑制剂是氨基胍。氨基胍是一种合成的联氨化合物，长期使用会造成药物依赖性，造成肝中毒[8]，所以开发天然安全的 AGEs 抑制剂成为重要的发展趋势。已有的研究结果表明，具有抗氧化活性的多酚类和黄酮类化合物对 AGEs 有较好的抑制作用 [10]。葡萄、草莓、蓝莓、黑莓等果实中含有丰富的花色苷和多酚化合物，经研究发现，这些果实的甲醇提取物通过清除丙酮醛等活性羰基化合物而起到抑制 AGEs 作用[11]。

桑椹又称桑果（Morus），是多年生木本植物桑树的成熟果穗，其果实中富含花色苷。其中矢车菊素-3-葡萄糖苷（cyaniding-3-glucoside）、矢车菊素-3-芸香糖苷（Cyanidin-3-rutinoside）、飞燕草-3-芸香糖苷（Delphindin-3-rutinoside）等是桑椹中的主要花色苷，具有较强的抗氧化活性，可以降低高血脂小鼠中血清和肝脏中甘油三酰酯、总胆固醇含量[12~13]。Wu et al 研究报道在高脂 C57BL/6 小鼠模型中，饲喂纯化的桑椹花色苷可控制小鼠体重[14]。然而，有关桑椹花色苷对 AGEs 的抑制作用研究报道较少。本文通过建立牛血清蛋白（BSA）/葡萄糖（Glucose）美拉德模拟反应体系，评价桑椹花色苷对 AGEs 的抑制作用，并进一步分析对蛋白质羰基、巯基、分子交联及羟基自由基诱导 AGEs 形成的影响，以期对桑椹花色苷抗 AGEs 机制及在食品中的应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料及试剂

桑椹：2011 年 5 月采自陕西周至果桑种植示范园，新鲜桑椹用保鲜袋包装后贮藏于-40 ℃冰箱内，使用时室温解冻。

#SM0661 蛋白 maker，Fermentas 公司；叠氮化钠，牛血清白蛋白（BSA），D-葡萄糖，5, 5'二硫代双(2-硝基苯甲酸)（DTNB），氨基胍均购自 Sigma 公司；三羟甲基氨基甲烷（Tris），丙烯酰胺（Acr），N, N'-甲叉双丙烯酰胺（Bis），十二烷基硫酸钠（SDS），N, N, N', N'-四甲基乙二胺（TEMED），过硫酸铵（AP），2-巯基乙醇，溴酚蓝，均购自 Amresco 公司；AB-8 型大孔树脂，购自南开大学；其他试剂均为分析纯。

1.2 主要仪器设备

EB-280-12 天平，日本岛津公司（Shimadzu）；SPX-150 生化培养箱，上海悦丰仪器仪表有限公司；SW-CJ-1F超净工作台，苏净集团苏州安泰空气技术有限公司；HC-3018R高速冷冻离心机，安徽中科中佳科学仪器有限公司；424 UV1101 紫外可见分光光度计，日本岛津公司（Shimadzu）；F-4500 FL荧光光谱仪，日本岛津公司（Shimadzu）；RE-201D旋转蒸发仪，巩义予华仪器有限责任公司；LAC-5080S高压灭菌锅，上海博讯仪器仪表有限公司；DYCZ-24E电泳仪，北京六一仪器厂；HH-6 水浴锅，国华电器有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 桑椹花色苷的提取

准确称取一定量解冻后的桑椹于研钵中研磨，按料液比 1:15（*m/V*）加入 70%酸性乙醇溶液（含 0.5% HCl），65 ℃下浸提 2 h，过滤后将上清液减压浓缩，得到桑椹花色苷粗提物。采用静态吸附法使 AB-8 大孔吸附树脂吸附花色苷至饱和（37 ℃恒温摇床 24 h），再用 70%酒精溶液解吸（37 ℃恒温摇床 12 h），收集解吸液减压蒸发后即为待用样品，其花色苷的含量采用下列方法测定。

1.3.2 桑椹花色苷含量的测定

参照(杨兆艳 2007)方法，采用 pH 示差法测定桑椹醇提物中总花色苷含量。

1.3.3 牛血清蛋白-葡萄糖（BSA/Glucose）体外晚期糖基化反应模拟体系的建立

模拟体系的组成为：牛血清蛋白（10 mg/mL）和葡萄糖（300 mmol/L）的磷酸缓冲液（0.2 mol/L，pH 7.4，含 0.2%叠氮化钠防止微生物生长），在模拟体系中加入桑椹花色苷终浓度为 10、20、40、60、80、100 μg/mL 作为实验组，未添加花色苷的为空白对照组，以添加同浓度的氨基胍为阳性对照组。将各反应液用微孔滤膜（0.45 μm）过滤后无菌条件下分装试管中（5 mL），置 37 ℃下恒温反应 4 周。根据 AGEs 荧光特性，采用荧光分光光法测定 AGEs 的荧光强度，测定条件为激发波长 370 nm，发射波长 440 nm，分别测定反应体系在 37 ℃下培养 7、14、21、28 d 的荧光强度，以荧光强度 AU 表示 AGEs 含量。按下列公式计算桑椹花色苷对 AGEs 形成的抑制率。

$$抑制率\ (\%) = 100 \times \frac{F_0 - F_1}{F_0}$$

式中，F_0 为空白对照组的荧光强度，F_1 代表实验组的荧光强度。

1.3.4 桑椹花色苷对·OH 诱导生成 AGEs 的作用

反应体系为：将终浓度为 0.4 mmol/L $FeCl_2$、1 mmol/L H_2O_2 及 5 mg/mL BSA 和 150 mmol/L 葡萄糖

溶液加入 50 mmol/L 磷酸缓冲液（pH 7.4，含 0.2%叠氮化钠）中，再加入终浓度分别为 10、20、40、60 μg/mL 的桑椹花色苷，微孔滤膜（0.45 μm）过滤后无菌条件下分装于试管中（5 mL），恒温 37 ℃下反应 1 周，以 5 mg/mL BSA，150 mmol/L 葡萄糖的体系作为对照。在激发波长 370 nm，狭缝 5 nm，发射波长 440 nm，狭缝 5 nm 条件下，用荧光分光光谱仪测定反应液的荧光强度，以荧光强度 AU 表示 AGEs 含量。

1.3.5 蛋白质羰基（Protein Carbonylation，PCO）含量的测定

采用 2, 4-二硝基苯肼比色法测定蛋白质羰基含量[8]，结果以 nmol/mg 蛋白质表示。具体步骤为：取反应 21 d 的样品 100 μL，加入 1 mL 10 mmol/L 的 2, 4-二硝基苯肼(DNPH)溶液(以 2 mol/L 盐酸溶液配制)，混匀后在常温下黑暗处静置反应 1 h（每隔 10 min 用涡旋混匀器混匀一次）；加入 1 mL 三氯乙酸（20%，*m/V*）混合，再以 10000 r/min 离心 10 min，倒掉上层溶液，沉淀加入乙醇-乙酸乙酯的混合液 2 mL（1:1，*V/V*），涡旋振荡后以 12000 r/min 离心 10 min，倒掉上层溶液，沉淀（蛋白质）按照上述方法溶解离心，重复三次。沉淀最后用 2 mL 盐酸胍（6 mol/L，pH 2.3）溶解，涡旋振荡后 37 ℃水浴 15 min，用紫外可见分光光度计在 370 nm 下测定吸光值，记为 A（盐酸胍调零）。PCO 的含量按照下面公式计算。

$$PCO(nmol/mgpro) = A/\varepsilon \times \text{稀释倍数}$$

（ε=2.2×10^4 cm^{-1}M^{-1}）

1.3.6 蛋白质巯基的测定

参照 Ellman 方法测定蛋白质巯基含量[15]，取 2.5 mL 0.1 mol/L 的磷酸缓冲液（pH 8.0，含 0.1 mol/L 的 EDTA）和 50 μL Ellman 试剂，加入 250 μL 各浓度标准液（1.5、1.25、1.0、0.75、0.5、0.25、0 mmol/L 的 L-半胱氨酸）或反应 21 d 后的样品溶液，室温黑暗处静置 15 min，测定 412 nm 处的吸光值。以 L-半胱氨酸为标准制作工作曲线，计算样品中巯基含量。

1.3.7 桑椹花色苷对牛血清蛋白 SDS-PAGE 图谱的影响

参照 Wang（2012）的方法进行[16]。BSA（10 mg/mL）与葡萄糖（300 mmol/L）混合于 0.2 mol/L 的磷酸缓冲液中（pH 7.4）中，以不加葡萄糖的 BSA 溶液为参照，以 BSA/Glucose 为空白对照，以加入 20 μg/mL 的氨基胍为阳性对照，添加 100 μg/mL、80 μg/mL、60 μg/mL、40 μg/mL 的桑椹花色苷为试验组，微孔滤膜（0.45 μm）过滤后无菌条件下分装于试管中（5 mL），恒温 37 ℃下反应 21 d 后进行 SDS-PAGE 分析。基本参数：分离胶浓度 11%，浓缩胶浓度 3%。上样缓冲液：10%甘油，2% SDS，60 mmol/L pH6.8 Tris-HCl，20% β-巯基乙醇，0.01%溴酚蓝；上样量为 6 μL；电压：浓缩胶 40 V，分离胶 20 V，8 h；染色剂：考马斯亮蓝 R250 染液（0.05%）；图像分析：清洗后的凝胶采集图像后用 Quatity One 软件分析电泳条带。

1.4 数据分析方法

所有数据用三次重复测定结果的平均值和标准差表示（$\bar{x} \pm SD$）。显著性（$p<0.05$）分析采用 DPS v7.05 软件进行，多重比较分析采用 Duncan 新复极差法。

2 结果与讨论

2.1 BSA/Glucose 模拟反应体系中桑椹花色苷对 AGEs 的抑制作用

美拉德反应可分为三个阶段，首先是氨基与羰基发生反应形成 Schiff 碱，紧接着不稳定的 Schiff 碱逐渐发生 Amadori 重排，形成 Amadori 产物，Amadori 产物又经过脱水、重排反应产生活性羰基化合物，如乙二醛、3-脱氧丙酮醛等，最后羰基化合物与蛋白质的氨基聚合形成 AGEs[16]。用 BSA/Glucose 模拟反应体系可较好地评价美拉德反应全过程及其 AGEs 的形成。桑椹花色苷抑制 BSA/Glucose 模拟反应体系中 AGEs 形成的作用见表 1。桑椹花色苷和氨基胍对 AGEs 形成的抑制率结果见图 1。

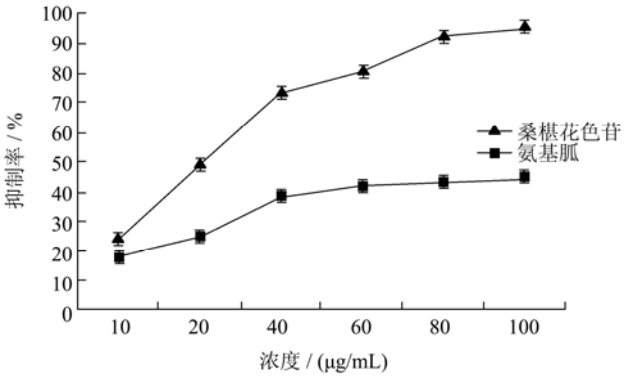


图 1 桑椹花色苷和氨基胍对 AGEs 抑制率的比较（7d）

Fig.1 Inhibitory effect of Mulberry ancyanians and aminoguanidine on AGE formation in the BSA/Glucose system

从表 1 中可看出，空白对照组随着反应时间的延长，反应液荧光强度呈现先增加后降低的趋势，且在不同反应天数间均有显著性差异（$P<0.05$）。反应至 14 d，荧光强度均显著性增加（$P<0.05$），说明具有荧光性的晚期糖基化产物在这段时间内不断积累；反应 21 d 后荧光强度开始显著降低（$P<0.05$），而反应液的

颜色持续加深，这是因为具有荧光性的产物逐渐转化为无荧光性的褐色物质如类黑素。添加了浓度为10~100 μg/mL 的桑椹花色苷后，荧光强度均显著性降低（P<0.05），可见桑椹花色苷对 AGEs 具有较强的抑制作用，浓度越高抑制作用越强。对于不同反应天数来说，添加不同浓度桑椹花色苷反应 7 d 和 14 d 后荧光强度均有显著性差异（P<0.05）；反应 21 d 和 28 d 后，添加 10 μg/mL~80 μg/mL 桑椹花色苷的反应液有显著性差异（P<0.05），而 80 μg/mL 与 100 μg/mL 无显著性差异（P>0.05）；反应 35 d 后，10 μg/mL~60 μg/mL 桑椹花色苷的反应液有显著性差异（P<0.05），而 60 μg/mL~100 μg/mL 无显著性差异（P>0.05）。Ardestani 等人报道狭叶香科（*Teucrium polium*）的乙酸乙酯提取物对BSA/Glucose和BSA/Ribose模拟体系中产生的荧光强度具有较好的抑制作用，并呈浓度-剂量依赖关系，本研究结果与此一致[8]。

表 1 桑椹花色苷对 BSA-Glu 模拟反应体系中 AGEs 的抑制作用（$\bar{x} \pm SD$）

Table 1 Effect of Mulberry ancyanians on fluorescent AGEs formation in the BSA/Glucose model system ($\bar{x} \pm SD$)

时间	荧光强度（AU）						
/d	0 μg/mL	10 μg/mL	20 μg/mL	40 μg/mL	60 μg/mL	80 μg/mL	100 μg/mL
7	488.55±3.14^{e,A}	370.68±7.14^{c,B}	245.90±3.77^{b,C}	127.09±9.31^{a,D}	92.44±1.39^{a,E}	34.09±3.41^{a,F}	20.39±1.22^{a,G}
14	817.23±7.43^{a,A}	512.08±0.59^{a,B}	269.44±3.66^{a,C}	131.37±3.99^{a,D}	97.89±2.74^{a,E}	35.97±0.41^{a,F}	19.18±1.20^{a,G}
21	787.22±2.32^{b,A}	463.23±15.01^{b,B}	244.27±13.69^{bc,C}	129.26±7.38^{a,D}	97.39±4.31^{a,E}	34.11±0.63^{a,F}	18.40±2.28^{a,F}
28	651.48±14.59^{c,A}	384.04±7.90^{c,B}	235.60±0.61^{bc,C}	128.83±4.42^{a,D}	93.51±7.85^{a,E}	32.67±1.15^{a,F}	20.52±0.84^{a,F}
35	635.78±1.60^{d,A}	344.77±54.87^{c,B}	220.86±23.92^{a,C}	126.54±29.24^{a,D}	48.95±1.67^{b,E}	33.84±1.97^{a,E}	19.07±1.12^{a,E}

注：A、B、C、D、E、F：相同行的显著性比较，即不同花色苷浓度对 AGEs 抑制的影响，相同大写字母表示 P>0.05，不同大写字母表示 P<0.05；a、b、c、d、e、f、g：相同列中数值的显著性比较，即不同反应时间对 AGEs 抑制的影响，相同字母表示 P>0.05，不同字母表示 P<0.05。

由图 1 结果可知，随着桑椹花色苷和氨基胍浓度的增加，AGEs 抑制率呈不断上升趋势，而且花色苷浓度与抑制率的线性关系更好，而氨基胍较早就出现了平台现象。比较两者的抑制效果，在相同浓度下，花色苷的抑制率总是大于氨基胍对 AGEs 的抑制率均；在浓度为 20 μg/mL 时，桑椹花色苷的抑制率达 24.1%，AG 的抑制率为 18.1%；当浓度达 100 μg/mL 时，花色苷的抑制率达 95.8%，而氨基胍的抑制率仅为 44.8%，这充分说明，桑椹花色苷具有非常强的抑制 AGEs 的作用。Ito 等人研究发现从石榴皮中提取得到的没食子鞣质聚合物对 AGEs 的抑制作用也强于氨基胍[18]。

2.2 桑椹花色苷对·OH 诱导生成的 AGEs 的抑制作用

葡萄糖氧化或者 Amadori 中间产物在氧化降解过程中产生的活性氧往往会加速糖基化反应的进程，促使 AGEs 的形成[17]。本试验在 BSA/Glucose 模拟体系内加入 Fe^{2+}和 H_2O_2，建立 Feton 反应产生羟基自由基（·OH），探讨桑椹花色苷对·OH 诱导 AGEs 形成的抑制作用，结果见图 2 所示。

由图 2 可知，同 BSA/Glucose 模拟体系相比较，加入 Fe^{2+}和 H_2O_2 后反应液荧光强度显著增加（由 346.53±2.91 增加至 551.38±9.95，P<0.05），说明·OH 可以促进 AGEs 的形成。添加浓度为 10~60 μg/mL 的桑椹花色苷，荧光强度随着花色苷浓度增加不断减小，各浓度间均存在显著性差异（P<0.05），且呈现浓度-剂量依赖效应，其抑制机制可能是桑椹花色苷清除了体系中羟基自由基或螯合了金属离子，减低了羟基自由基的产生，从而抑制了 AGEs 的形成。

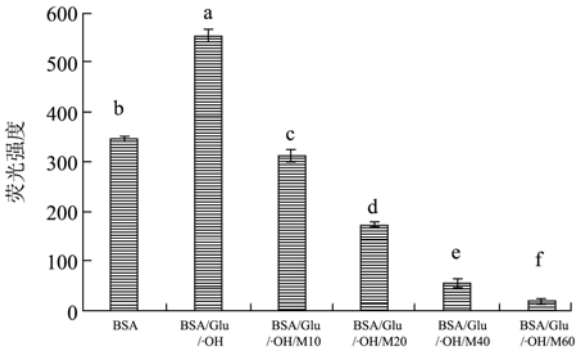


图 2 桑椹花色苷抑制羟基自由基诱导 AGEs 的形成

Fig.2 Inhibitory effect of Mulberry ancyanians on AGE formation induced with hydroxyl radicals

注：图中 AG 表示氨基胍，M 表示桑椹花色苷，下同。

2.3 桑椹花色苷对蛋白质羰基形成（PCO）的影响

在糖基化反应过程中，蛋白质羰基的形成是蛋白质分子结构变化的表现之一，其含量高低反映了蛋白

质被糖基化的程度。图3为桑椹花色苷对BSA/Glucose模拟反应体系在反应过程中对蛋白质羰基的影响。

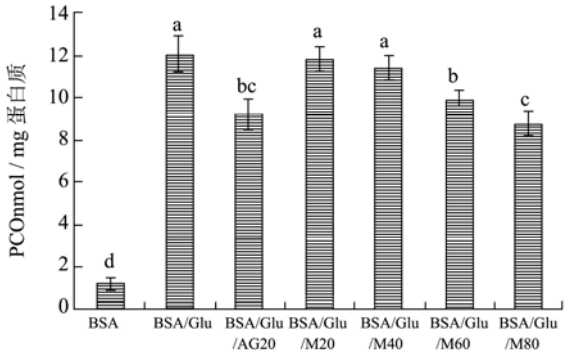


图3 桑椹花色苷在牛血清蛋白-葡萄糖模拟体系中对蛋白质羰基的影响

Fig.3 The effect of Mulberry ancyanians on PCO formation in BSA/Glucose model system

如图3所示，BSA/Glucose反应体系中的PCO含量显著高于BSA组（P<0.05），说明在葡萄糖存在条件下，发生糖基化反应的可能性大大增加，促使形成PCO。加入浓度为20 μg/mL的氨基胍后，PCO含量显著降低（P<0.05），表明氨基胍具有较好防止蛋白质被糖基化的作用。从图中还可以看出，添加浓度分别为20~80 μg/mL的桑椹花色苷，PCO含量不断降低，但20和40 μg/mL桑椹花色苷与BSA/Glucose反应体系无显著性差异（P>0.05），而与氨基胍间有显著性差异（P<0.05），当桑椹花色苷浓度达60 μg/mL、80 μg/mL时，与氨基胍相比无显著性差异（P>0.05）。狭叶香科（*Teucrium polium*）的乙酸乙酯提取物在10~100 μg/mL范围内，对PCO的形成有较强的抑制作用，具有浓度-剂量依赖关系[8]，本试验研究结果表明桑椹花色苷对PCO抑制也有浓度-剂量关系，说明桑椹花色苷具有抗蛋白质氧化的作用。

2.4 桑椹花色苷对蛋白质巯基的影响

蛋白质氧化是引起衰老以及各种生理疾病的重要原因[18]，而蛋白质巯基含量的减少是蛋白质氧化的重要标志。为了进一步探究花色苷抑制AGEs的机理，采用Ellman方法测定了反应21 d后的样品中蛋白质巯基的变化情况，结果见图4。

从图4中可以看出，相比于仅添加BSA组，BSA/Glucose模拟体系中巯基含量显著降低（P<0.05），下降了32.9%；添加10 μg/mL的氨基胍，蛋白质巯基含量显著增加，但低于BSA组（P<0.05）。添加10 μg/mL的桑椹花色苷，蛋白质巯基含量有较大程度增加，显著高于BSA/Glucose组和氨基胍组（P<0.05），表明桑椹花色苷抑制了巯基的氧化，可能的机制具有抗氧化活性的多酚或类黄酮类化合物抑制活性氧的产生好和清除自由基从而防止蛋白质的巯基被氧化[8]。

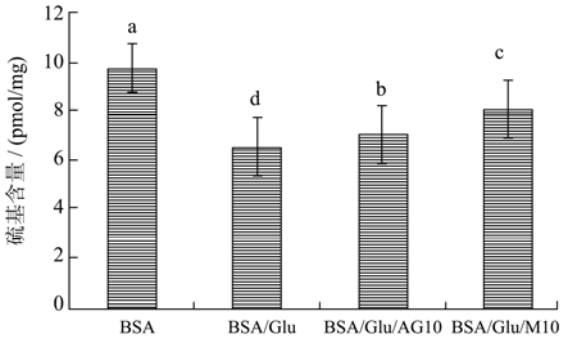


图4 桑椹花色苷对蛋白质巯基的影响

Fig.4 The effect of Mulberry ancyanians on protein thiol groups in BSA/Glucose model system

2.5 牛血清蛋白SDS-PAGE图谱分析

AGEs是一类高分子的复杂化合物，会进一步交联蛋白质形成分子量更大的聚合物。本研究采用SDS-PAGE法分析在BSA/Glucose模拟反应体系中反应21 d后，不同浓度的桑椹花色苷对蛋白质交联的影响，结果见图5所示。

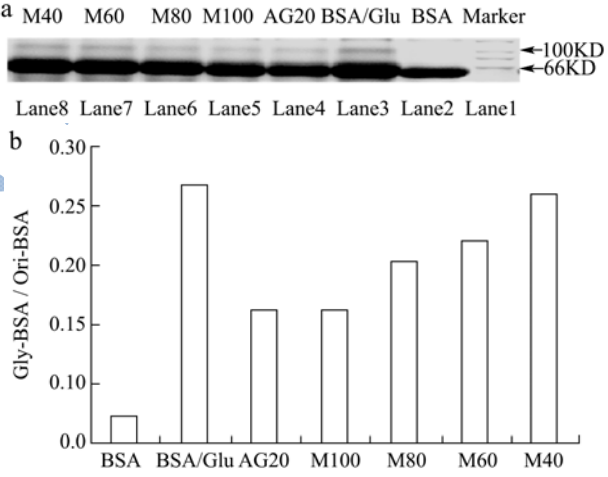


图5 桑椹花色苷对BSA/GLu模拟反应模型中牛血清蛋白交联的影响

Fig.5 SDS-PAGE profile of glycated protein in BSA/Glucose model system

注：Lane 1-Marker; lane 2-BSA; lane 3-BSA/GLucose; lane 4-BSA/GLucose/AG (20 μg/mL); lane 5-BSA/GLucose/M (100 μg/mL); lane 6-BSA/GLucose/ M (80 g/mL); lane 7-BSA/GLucose/ M (60 μg/mL); lane 8-BSA/GLucose/ M (40 μg/mL); 图中没有标示lane 1~lane 8。

由SDS-PAGE凝胶电泳图谱可知（图5a），相比较未发生糖基化反应的BSA（分子量为66 KD），糖基化的BSA分子量约100 KD，有明显的增加，说明

在 AGEs 形成过程中发生了牛血清蛋白与葡萄糖的交联作用，使得蛋白质分子量变大。加入 20 μg/mL 的氨基胍和桑椹花色苷后，观察到 100 KD 的条带变浅，可见氨基胍和桑椹花色苷都可以抑制 BSA 的交联。为了进一步分析抑制剂对糖基化反应及蛋白质交联的抑制作用，采用 Quatity One 图像分析软件，计算了糖基化 BSA 与未糖基化 BSA 的比例（Gly-BSA/ Ori-BSA，图 5b）。

如图 5b 所示，BSA/Glucose 反应体系中，Gly-BSA/Ori-BSA 明显高于添加了桑椹花色苷或氨基胍反应体系，表明两者对蛋白质交联均有一定得抑制作用，且随着桑椹花色苷浓度增加，抑制效果也增加，有一定的浓度剂量依赖效应。低浓度的桑椹花色苷对蛋白质交联抑制作用不及氨基胍，桑椹花色苷浓度达到 100 μg/mL 时，与 20 μg/mL 的氨基胍抑制效果相近。Ye 等人发现 BSA/Ribose 模型中，BSA 和核糖（Ribose）在 37 ℃下反应 7 d 后可形成 94 KD 的交联物，而发酵大麦和土豆生产蒸馏酒产生的副产物中可以抑制这种交联物的形成[20]。

3 结论

在试验范围内，桑椹花色苷在 BSA/Glu 模拟反应体系中对荧光性 AGEs 具有较强的抑制作用，且效果优于氨基胍，浓度为 100 μg/mL 的桑椹花色苷和氨基胍，AGEs 抑制率分别为 95.8%和 44.8%。桑椹花色苷抑制 AGEs 形成的机制可能是桑椹花色苷可以保护蛋白质巯基、抑制蛋白羰基化、减少蛋白质交联及清除·OH 等活性自由基来阻断 AGEs 的形成。

参考文献

[1] Luevano-Contreras C, Chapman-Novakofski K. Dietary advanced glycation end products and aging [J]. Nutrients, 2010, 2(12): 1247-1265

[2] Goldberg T, Cai W, Peppa M, et al. Advanced glycoxidation end products in commonly consumed foods [J]. Journal of the American Dietetic Association, 2004, 104(8): 1287-1291

[3] Uribarri J, Woodruff S, Goodman S, et al. Advanced glycation end products in foods and a practical guide to their reduction in the diet [J]. Journal of the American Dietetic Association, 2010, 110(6): 911-916

[4] Yamagishi S, Matsui T, Nakamura K. Possible link of food-derived advanced glycation end products (AGEs) to the development of diabetes [J]. Medical Hypotheses, 2008, 71(6): 876-878

[5] Losso J N, Bawadi H A, Chintalapati M. Inhibition of the formation of advanced glycation end products by thymoquinone [J]. Food Chemistry, 2011, 128(1): 55-61

[6] Krautwald M, Münch G. Advanced glycation end products as biomarkers and gerontotoxins-A basis to explore methylglyoxal-lowering agents for Alzheimer's disease?[J]. Experimental Gerontology, 2010, 45(10): 744-751

[7] 冯建勋,李红艳,田建伟.饮食中晚期糖基化终产物对健康SD大鼠肾脏的影响[J].中国临床康复,2006,10(36):116-119
FENG Jian-xun, LI, Hong-yan, TIAN Jian-wei. Effect of oral advanced glycation end products on kidney of healthy SD rats [J]. Chinese Journal of Clinical Rehabilitation, 2006, 10(36): 116-119

[8] Ardestani A, Yazdanparast R. Inhibitory effects of ethyl acetate extract ofTeucrium polium onin vitro protein glycoxidation [J]. Food and Chemical Toxicology, 2007, 45(12): 2402-2411

[9] Ferchichi L, Derbré S, Mahmood K, et al. Bioguided fractionation and isolation of natural inhibitors of advanced glycation end-products (AGEs) from *Calophyllum flavoramulum* [J]. Phytochemistry, 2012, 78: 98-106

[10] Wu J W, Hsieh C L, Wang H Y, et al. Inhibitory effects of guava (*Psidium guajava*L.) leaf extracts and its active compounds on the glycation process of protein [J]. Food Chemistry, 2009, 113(1): 78-84

[11] Wang W, Yagiz Y, Buran T J, et al. Phytochemicals from berries and grapes inhibited the formation of advanced glycation end-products by scavenging reactive carbonyls [J]. Food Research International, 2011, 44(9): 2666-2673

[12] Wu X, Liang L, Zou Y, et al. Aqueous two-phase extraction, identification and antioxidant activity of anthocyanins from mulberry (Morus atropurpurea Roxb.) [J]. Food Chemistry, 2011, 129(2): 443-453

[13] Yang X, Yang L, Zheng H. Hypolipidemic and antioxidant effects of mulberry (*Morus alba* L.) fruit in hyperlipidaemia rats [J]. Food and Chemical Toxicology, 2010, 48(8): 2374-2379

[14] Wu T, Qi X, Liu Y, et al. Dietary supplementation with purified mulberry (*Morus australis* Poir) anthocyanins suppresses body weight gain in high-fat diet fed C57BL/6 mice [J]. Food Chemistry, 2013, 141: 482-487

[15] Ellman G L. Tissue sulfhydryl groups [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1959, 82(1): 70-77

[16] Wang X, Zhang L S, Dong L L. Inhibitory effect of polysaccharides from pumpkin on advanced glycation end-products formation and aldose reductase activity [J]. Food

Chemistry, 2012, 130(4): 821-825

[17] Yokozawa T, Nakagawa T. Inhibitory effects of Luobuma tea and its components against glucose-mediated protein damage [J]. Food and Chemical Toxicology, 2004, 42(6): 975-981

[18] Ito H, Li P, Koreishi M, et al. Ellagitannin oligomers and a neolignan from pomegranate arils and their inhibitory effects on the formation of advanced glycation end products [J]. Food Chemistry, 2014, 152: 323-330

[19] Stadtman E R, Levine R L. Protein oxidation [J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 2000, 899(1): 191-208

Ye X J, Ng T B, Nagai R. Inhibitory effect of fermentation byproducts on formation of advanced glycation end-products [J]. Food Chemistry, 2010, 121:1039-1045

现代食品科技