

# 基于斑马鱼模型评价白茶的降糖作用

刘均, 李强, 谭蓉\*

(中华全国供销合作总社杭州茶叶研究院, 浙江省茶资源跨界应用技术重点实验室, 浙江杭州 310016)

**摘要:** 研究以白茶为对象, 采用新型斑马鱼实验技术开展了白茶降糖比较研究。基于非胰岛素依赖型糖尿病 (NIDDM) 斑马鱼研究发现, 50 和 100  $\mu\text{g/mL}$  老白牡丹茶 (AWP) 孵育 24 h 葡萄糖 (GLU) 值水平分别降低了 29.68% 和 20.51%, 孵育 48 h GLU 值分别降低了 42.16% 和 51.54%, 差异均显著 ( $P<0.05$ ); 25、50 和 75  $\mu\text{g/mL}$  白牡丹茶 (WP) 孵育 24 h GLU 值分别降低了 40.18%、52.57% 和 62.11%, 差异均显著 ( $P<0.05$ )。另外, 基于胰岛素依赖型糖尿病 (IDDM) 斑马鱼研究, 20 和 30  $\mu\text{g/mL}$  AWP 孵育 24 h GLU 值分别降低了 24.92% 和 23.66%, 孵育 48 h 分别降低了 54.35% 和 38.38%, 差异均显著 ( $P<0.05$ ); 40  $\mu\text{g/mL}$  WP 孵育 24 h GLU 值降低了 22.58% ( $P<0.05$ ), 20  $\mu\text{g/mL}$  WP 孵育 48 h 降低了 26.51% ( $P<0.05$ ); 30  $\mu\text{g/mL}$  茶多酚 (TP) 孵育 48 h GLU 值降低了 24.53% ( $P<0.05$ )。重要的是, 在同等生药量下, 20  $\mu\text{g/mL}$  WP 和 AWP 对 NIDDM 斑马鱼的降糖效果显著优于 TP; 30  $\mu\text{g/mL}$  AWP 对 IDDM 斑马鱼的降糖效果略优于 TP, 再明显优于 WP。结果表明白茶具有明显的降糖功效, TP 也具有明确的降糖作用, 但白茶的降糖效应并不仅限于依赖 TP, 具体何成分起关键作用尚值得关注和研究。

**关键词:** 斑马鱼; 糖尿病; 白茶; 降糖作用; 耐受性; 茶多酚

文章编号: 1673-9078(2023)03-45-54

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.3.0333

## Hypoglycemic Effects of White Tea Based on the Zebrafish Model

LIU Jun, LI Qiang, TAN Rong\*

(Hangzhou Tea Research Institute, CHINA COOP, Zhejiang Key Laboratory of Transboundary Applied Technology for Tea Resources, Hangzhou 310016, China)

**Abstract:** The hypoglycemic effects of white tea were investigated, using a newly developed non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM) zebrafish model. Treatment of the NIDDM zebra fish with 50 and 100  $\mu\text{g/mL}$  of aged white peony tea (AWP), decreased the level of glucose (GLU) by 29.68% and 20.51%, respectively, after 24 h. After 48 h, the GLU values decreased by 42.16% and 51.54%, respectively, and the differences were significant ( $P<0.05$ ). Moreover, the GLU values in the 25, 50, and 75  $\mu\text{g/mL}$  white peony tea (WP) groups decreased by 40.18%, 52.57%, and 62.11%, respectively, after 24 h of treatment, and the differences were significant ( $P<0.05$ ). The effect of white tea treatment on GLU levels of insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) zebrafish was also investigated. In this model, the GLU values of the 20 and 30  $\mu\text{g/mL}$  AWP treatment groups (24 h) decreased by 24.92% and 23.66%, respectively, and AWP treatment for 48 h decreased GLU by 54.35% and 38.38%, respectively ( $P<0.05$ ). The GLU value of the 40  $\mu\text{g/mL}$  WP-treated group decreased by 22.58% ( $P<0.05$ ) after 24 h, and the corresponding values in the 20  $\mu\text{g/mL}$  WP-treated group, after 48 h of treatment, decreased by 26.51% ( $P<0.05$ ). After incubation with 30  $\mu\text{g/mL}$  tea polyphenols (TP) for 48 h, the GLU value decreased by 24.53% ( $P<0.05$ ). Importantly, the hypoglycemic effects of 20  $\mu\text{g/mL}$  of either WP and AWP on NIDDM zebrafish were significantly better than that of 30  $\mu\text{g/mL}$  of tea phenols (TP). The hypoglycemic effect of 30  $\mu\text{g/mL}$  AWP on IDDM zebrafish was slightly better than that of TP, and significantly better than that of WP. Taken together, these results suggest that both white tea and TP have a significant hypoglycemic effect; however, the hypoglycemic effect of white tea was not limited to TP dependence. The identity of

引文格式:

刘均,李强,谭蓉.基于斑马鱼模型评价白茶的降糖作用[J].现代食品科技,2023,39(3):45-54.

LIU Jun, LI Qiang, TAN Rong. Hypoglycemic effects of white tea based on the zebrafish model [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(3): 45-54.

收稿日期: 2022-03-24

基金项目: 浙江省公益基础研究农业项目 (LGN18C200010)

作者简介: 刘均 (1990-), 男, 硕士, 助理研究员, 研究方向: 茶及代用茶资源开发、应用及功能评价研究, E-mail: hcyluijun888@163.com

通讯作者: 谭蓉 (1982-), 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 茶及代用茶资源综合利用与开发, E-mail: trfish211@126.com

the specific active components in white tea warrant further research.

**Key words:** zebrafish; diabetes; white tea; hypoglycemic effects; tolerance; tea polyphenols

糖尿病是一种世界性疾病,目前尚无有效的治愈措施。但目前经模型动物<sup>[1,2]</sup>和人群<sup>[3]</sup>试验认为,茶可能有降糖保健功效,这对糖尿病群体茶客来说无疑是一种健康福音。众所周知,茶叶中富含茶多酚(Tea Polyphenols, TP)、咖啡碱等主功效成分。TP作为茶叶中主功效成分之一,研究发现TP可以抑制淀粉酶活性<sup>[4]</sup>,另外多酚类大分子物质在肠道微生物的作用下降解产生小分子物质<sup>[5-7]</sup>发挥较强的抗氧化活性和清除自由基作用。表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)是多酚中的一种重要的儿茶素单体,研究发现EGCG具有抑制肠道脂质消化吸收<sup>[8]</sup>、促进脂肪氧化利用<sup>[9]</sup>、抑制糖异生<sup>[10]</sup>、降低胰岛素拮抗<sup>[8,11]</sup>等作用。除多酚类外,如咖啡碱、茶黄素等也具有糖脂代谢调节能力。咖啡碱可以促进机体脂肪消耗、降低脂肪沉积<sup>[12,13]</sup>,茶黄素降低HepG2细胞中脂质沉积、促进脂肪酸氧化等<sup>[14,15]</sup>。

白茶属于微发酵茶。目前的研究揭示白茶可能具有较优的降糖功效,但其研究主要是基于主功效成分研究<sup>[16,17]</sup>。众所周知,茶叶是一种功能成分复合体,功效组分之间存在协同或拮抗作用,因而科学评估茶叶的健康功效需研究全茶水浸出物摄入情况下的健康效应。在民间,白茶素有“一年茶、三年药、七年宝”的说法,其功效早在《本草纲目》中就有记载。但是,目前关于白茶和老白茶功效的比较研究还比较鲜见。另外,多酚类物质是茶叶中含量丰富的主功效成分之一,研究显示多酚类物质具有降糖作用,但白茶的降糖功效是否直接依赖于多酚类物质还值得关注和研究。斑马鱼是一种脊椎模式生物,与人类基因具有高度相似性,已成为生命科学研究的新宠。利用斑马鱼构建的人类疾病模型,如构建糖尿病<sup>[18]</sup>、高血脂<sup>[19]</sup>、高尿酸症<sup>[20]</sup>、失眠<sup>[21]</sup>等生物模型开展靶向药物筛选和毒理安全评价。目前,在糖尿病建模方面,采用的造模方式与大小鼠糖尿病造模方式相近,方法如下:腹腔注射特定剂量的四氧嘧啶或链脲佐菌素<sup>[22]</sup>溶液;四氧嘧啶溶液与葡萄糖溶液联用诱导建模<sup>[23]</sup>;采用过度饲喂法建立胰岛素抵抗型糖尿病<sup>[24]</sup>。基于团队前期研究,以斑马鱼幼鱼为对象,采用葡萄糖(GLU)单独与四氧嘧啶联用成功构建了基于非胰岛素依赖型糖尿病(Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus, NIDDM)和胰岛素依赖型糖尿病(Insulin-Dependent Diabetes Mellitus, IDDM)斑马鱼模型<sup>[25]</sup>,因此本文采用自建的糖尿病斑马鱼模型为

基础,开展了白茶全水浸出物的降糖效应评估,为科学茶饮、茶叶健康知识普及,以及为茶健康功效评价提供新的策略与视野。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 主要仪器及试剂

(1)主要仪器:水浴锅,上海精宏实验设备有限公司;Multiskan SkyHigh酶标仪,赛默飞世尔科技(中国)有限公司;MY-20手持式高速匀浆机,上海净信实业发展有限公司;全自动智能型生化(霉菌)培养箱,天津市宏诺仪器有限公司;AL-204精密电子天平,梅特勒-托利多国际贸易(上海)有限公司;3K1S离心机,德国sigma离心机公司;GLU检测试剂盒(GLU氧化酶法),南京建成生物工程研究所。

(2)储备液制备:白茶包括白牡丹茶(产于2021年,White Peony Tea,WP)、老白牡丹茶(Old Aged White Peony Tea,AWP,产于2008年,室温避光保存),由国家茶叶质量监督检验中心友情提供:50 mg/mL白茶(以生药量计)储备液,称取5 g白茶于烧杯中,在80 °C恒温水浴锅中浸提3次,每次浸提30 min,合并滤液并定容至100 mL,保存于4 °C冷藏备用。按照GB/T 8313-2018规定<sup>[26]</sup>的检测方法对储备液中多酚总量进行测定,其中50 mg/mL WP和AWP(以生药量计)储备液中多酚总浓度分别为3.05 mg/mL和4.05 mg/mL。实验评价用剂量浓度按照储备液(以生药量计)剂量浓度换算并采用纯水稀释制备,下同。

TP(为实验室自制,浙江省茶资源跨界应用重点实验室):50 mg/mL TP(以生药量计)储备液,称取5 g TP用蒸馏水溶解定容至100 mL,保存于4 °C冷藏备用。按照GB/T 8313-2018规定<sup>[26]</sup>的检测方法检测,茶多酚纯度为83.70%,含33.45% EGCG、7.73% ECG、3.55% EGC、2.80% EC和0.88%咖啡碱。另,50 mg/mL TP(以生药量计)储备液中多酚浓度为32.60 mg/mL。

GLU(国药集团化学试剂有限公司):220 mg/mL GLU储备液,称取44 g GLU于烧杯中,用蒸馏水溶解定容至200 mL,冷藏备用。

四氧嘧啶(CAS号:2244-11-3,纯度≥98.0%),合肥博美生物科技有限责任公司:1 mmol/L四氧嘧啶储备液,称量0.014 4 g四氧嘧啶于烧杯中,加入蒸馏水搅拌溶解并定容至100 mL,冷藏备用。

### 1.1.2 实验动物

斑马鱼(3月龄, AB型), 上海费曦生物科技有限公司。斑马鱼胚胎的繁殖以自然交配方式进行。每个产卵盒中按1:1放入公鱼和母鱼, 放入28.5℃恒温培养箱中。光周期设置为: 14h光照与10h黑暗, 于第二天上午收集胚胎, 去除死卵和粪便, 清洗后换孵育水(60 μg/mL海盐水), 置于28.5℃恒温培养箱中恒温孵育, 隔24h换液一次, 并去掉卵膜和死卵。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 AWP降糖效应研究

#### (1) AWP药物耐受性分析研究

将5 dpf野生型AB系斑马鱼随机分为8组, 每组3个重复, 每个重复15条, 分别给予22 mg/mL GLU与0、50、100、150、200、250、300、350 μg/mL AWP溶液联合孵育, 分别记为T0~T350, 每个重复加药物5 mL孵育24 h, 结束后记录每个重复斑马鱼死亡数量, 并计算每组死亡率, 优选剂量开展下一步试验。

#### (2) AWP降糖效应评估

根据斑马鱼对AWP的耐受性分析结果开展降糖作用评价。

①基于NIDDM斑马鱼的降糖效应评估: 基于前期研究<sup>[25]</sup>, 将5 dpf野生型AB系斑马鱼随机分为7组, 每组3个重复, 每个重复30条, 分别给予0 mg/mL GLU、22 mg/mL GLU与0、50、100、150、200、250 μg/mL AWP溶液联合孵育, 分别记为NC1、NC2、T-50 AWP、T-100 AWP、T-150 AWP、T-200 AWP、T-250 AWP, 每个重复加药物10 mL, 培养至48 h(隔24 h换液一次), 记录死亡数量, 试验结束时取样用于测定GLU含量。

②基于IDDM斑马鱼的降糖效应评估: 基于前期研究<sup>[25]</sup>, 以5 dpf野生型AB系斑马鱼为对象, 采用22 mg/mL GLU与0.02 mmol/L四氧嘧啶联合孵育24 h建立诱导糖尿病模型, 而后将糖尿病斑马鱼随机分为4组, 每组3个重复, 每个重复30条, 分别给予22 mg/mL GLU与0、10、20、30 μg/mL AWP联合孵育48 h, 分别记为MC、DT-10 AWP、DT-20 AWP、DT-30 AWP。同步设置正常组采用0和22 mg/mL GLU孵育72 h(隔24 h换液一次)作为NC1和NC2对照组。试验结束时取样用于测定GLU含量。

### 1.2.2 WP降糖效应研究

#### (1) WP药物耐受性分析研究

将发育正常5 dpf野生型AB系斑马鱼随机分为12组, 每组3个重复, 每个重复15条, 分别给予22 mg/mL GLU与0、25、50、100、200、400、800、

1 000、2 000、4 000、8 000、10 000 μg/mL WP溶液联合孵育, 每个重复加药物5 mL孵育24 h, 结束后记录斑马鱼死亡数量, 并计算每组死亡率, 优选剂量开展下一步试验。

#### (2) WP降糖效应评估

根据斑马鱼对WP的耐受性分析结果开展降糖作用评价。

①基于NIDDM斑马鱼的降糖效应评估: 将5 dpf野生型AB系斑马鱼随机分为5组, 每组3个重复, 每个重复15条, 分别给予0 mg/mL GLU、22 mg/mL GLU与0、25、50、75 μg/mL WP溶液联合孵育, 分别记为NC、MC、T1-25 WP、T2-50 WP、T3-75 WP, 每个重复加药物5 mL孵育至24 h, 试验结束时取样用于测定GLU含量。

②基于IDDM斑马鱼的降糖效应评估: 按上述相同方案建立糖尿病模型<sup>[25]</sup>, 而后将糖尿病斑马鱼随机分为4组, 每组3个重复, 每个重复30条, 分别给予22 mg/mL GLU与0、10、20、30 μg/mL WP联合孵育48 h, 分别记为MC、T1-10 WP、T2-20 WP、T3-30 WP。同步设置正常组采用0和22 mg/mL GLU孵育72 h(隔24 h换液一次)作为NC1和NC2对照组。试验结束时取样用于测定GLU含量。

### 1.2.3 白茶降糖功能物质基础研究

TP是茶叶中主要的功能活性成分之一, 因而选用探究TP在白茶降糖效应中的作用。

①TP药物耐受性分析研究: 将5 dpf野生型AB系斑马鱼随机分为8组, 每组3个重复, 每个重复15条, 分别给予22 mg/mL GLU与0、50、100、150、200、250、300、350 μg/mL TP溶液联合孵育, 每个重复加药物5 mL孵育24 h, 结束后记录每个重复斑马鱼死亡数量, 并计算每组死亡率, 优选剂量开展下一步试验。

②基于IDDM斑马鱼的降糖效应评估: 按上述相同方案建立糖尿病模型<sup>[25]</sup>, 而后将糖尿病斑马鱼随机分为4组, 每组3个重复, 每个重复30条, 分别给予22 mg/mL GLU与0、10、20、30 μg/mL TP联合孵育48 h, 分别记为MC、DT-10 TP、DT-20 TP、DT-30 TP。同步设置正常组采用0和22 mg/mL GLU孵育72 h(隔24 h换液一次)作为NC1和NC2对照组。试验结束时取样用于测定GLU含量。

### 1.2.4 WP与AWP降糖效应比较研究

综合前期研究结果, 研究同浓度下WP和AWP的降糖效应比较研究。

①基于NIDDM斑马鱼的降糖效应评估: 将5 dpf野生型AB系斑马鱼随机分为5组, 每组3个重复,

每个重复 30 条, 分别给予 0 mg/mL GLU、22 mg/mL GLU 与 0、20 μg/mL AWP、20 μg/mL WP、20 μg/mL TP 溶液联合孵育, 分别记为 NC1、NC2、NT-20 AWP、NT-20 WP、NT-20 TP, 培养至 48 h (隔 24 h 换液一次), 试验结束时取样用于测定 GLU 含量。

②基于 IDDM 斑马鱼的降糖效应评估: 按上述相同方案建立糖尿病模型<sup>[25]</sup>, 而后将糖尿病斑马鱼随机分为 4 组, 每组 3 个重复, 每个重复 30 条, 分别给予 22 mg/mL GLU、22 mg/mL GLU 与 30 μg/mL AWP 或 WP 或 TP 联合孵育 48 h, 分别记为 MC、DT-20 AWP、DT-20 WP、DT-20 TP。同步设置正常组采用 0 和 22 mg/mL GLU 孵育 72 h (隔 24 h 换液一次) 作为 NC1 和 NC2 对照组。试验结束时取样用于测定 GLU 含量。

### 1.3 检测方法

试验结束时, 每个重复取 10 条鱼用于测定 GLU 含量, GLU 含量检测按如下步骤进行: 取 100 μL 磷酸缓冲盐溶液于装鱼的 1.5 mL 离心管中, 采用高速手持式匀浆机匀浆 1 min, 直至鱼体组织裂解充分, 然后于 4 °C 下以 3 500 r/min 离心 10 min, 结束后取上清样 2.5 μL 采用 GLU 检测试剂盒 (GLU 氧化酶法) 测定 GLU 浓度, 其测定程序和方法按照试剂盒说明书规定的步骤进行。

### 1.4 统计分析

所有试验数据经 Excel 2016 初步处理后, 用 Graphpad Prism 6.0 绘图, 并用 SPSS Statistics 17.0 进行单因素方差分析 (One-way ANOVA), 所有数据均以平均值 ± 标准差呈现, 差异显著性采用 Duncan 分析并将进行多重比较,  $P < 0.05$  表示组间差异显著。

## 2 结果与讨论

### 2.1 AWP 降糖作用研究

#### 2.1.1 基于 NIDDM 斑马鱼的老白牡丹茶降糖效应评估分析

斑马鱼对 AWP 的耐受性影响见图 1a。350 μg/mL AWP 孵育 24 h 死亡率为 96.67%, 300 μg/mL 及以上浓度孵育 48 h 死亡率达到 100%。结果表明, 随着 AWP 浓度的上升其对斑马鱼 (幼鱼) 的致死性明显增强, 为科学评价 AWP 的降糖效应, 需要严格控制 AWP 的给药浓度。

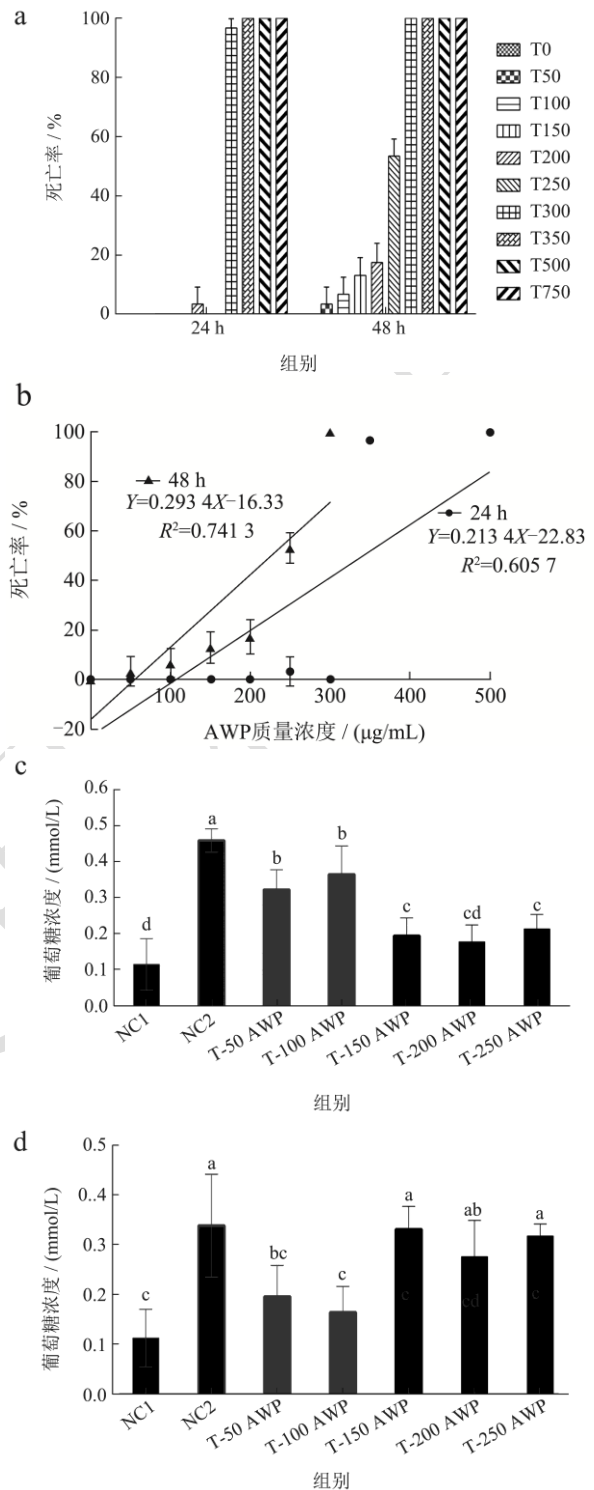


图 1 基于 NIDDM 斑马鱼的老白牡丹茶降糖作用评估

Fig.1 Effects of old aged white peony tea (AWP) on the hypoglycemic effects in zebrafish with NIDDM

注: a 和 b 表示在老白牡丹茶浓度与斑马鱼致死率之间的量效关系, c 和 d 分别表示干预 24 h 和 48 h 时老白牡丹茶的降糖效应。图中上标不同的小写字母表示具有显著差异 ( $P < 0.05$ ), 下同。

图 1c 和 1d 分别表示 AWP 干预 24 h 和 48 h 的降糖结果。图 1c 显示, 相比 NC1 组, NC2 组斑马鱼 GLU 水平增加了 2.98 倍 ( $P<0.05$ ), 表明以 22 mg/mL GLU 溶液诱导可以有效造成斑马鱼糖代谢异常。相比 NC2 组, 干预 24 h 后 T-50 AWP、T-100 AWP、T-150 AWP、T-200 AWP 和 T-250 AWP 组斑马鱼 GLU 水平分别降低了 29.68%、20.51%、57.61%、61.30% 和 53.54%, 差异均显著 ( $P<0.05$ ); 干预 48 h 后分别降低了 42.16% ( $P<0.05$ )、51.54% ( $P<0.05$ )、2.22% ( $P>0.05$ )、18.41% ( $P>0.05$ ) 和 6.13% ( $P>0.05$ ) (图 1d)。结果表明, 在观测剂量浓度范围内 AWP 具有明显的降糖效应, 且降糖效应与作用时间和作用浓度有关, 但并非剂量浓度和作用时间越长越好, 由于斑马鱼幼鱼对药物敏感, 当浓度过高作用时间过长时对斑马鱼的致死效应在增强, 尤其是 250  $\mu\text{g/mL}$  AWP 干预 48 h 时死亡率超过了 50% (图 1a)。

因此, 为进一步科学评价 AWP 的降糖效应, 需要再优化 AWP 给药浓度。经回归分析发现, 孵育 24 h 和 48 h 时死亡率 (%) 与 AWP 浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ ) 的回归方程分别为:

$$Y=0.213 4x-22.83 (R^2=0.605 7) \quad (1)$$

$$Y=0.293 4x-16.33 (R^2=0.741 3) \quad (2)$$

经计算  $LC_{50}$  分别为: 341.28、226.07  $\mu\text{g/mL}$ , 若按照 10%~25%  $LC_{50}$  推荐为给药剂量, 分别为 34.13~85.32、22.61~56.52  $\mu\text{g/mL}$ 。

### 2.1.2 基于 IDDM 斑马鱼的 AWP 降糖效应的评估分析

基于 IDDM 斑马鱼的 AWP 降糖结果见图 2。图 2a 显示, 与 MC1 组相比, AWP 孵育 24 h 后, 20 和 30  $\mu\text{g/mL}$  AWP 可以显著降低斑马鱼 GLU 值 ( $P<0.05$ ), 下调幅度分别为 24.92% 和 23.66% (图 2a); 孵育 48 h 后, 10、20 和 30  $\mu\text{g/mL}$  AWP 可以显著降低斑马鱼 GLU 值 ( $P<0.05$ ), 下调幅度分别为 52.15%、54.35% 和 38.38% (图 2b)。

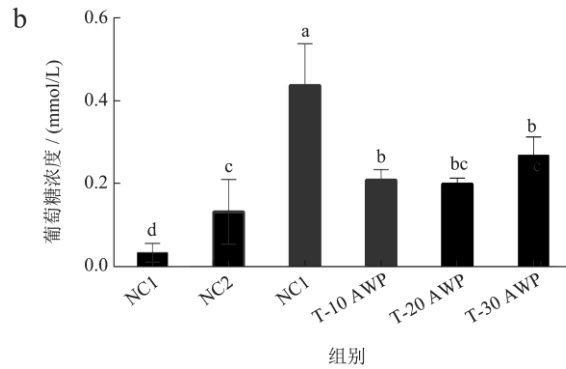
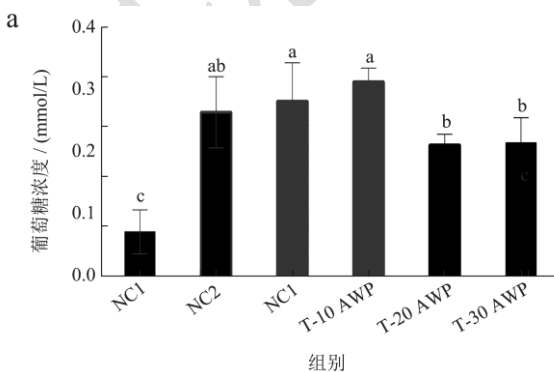


图 2 基于 IDDM 斑马鱼的老白牡丹茶降糖作用评估

### Fig.2 Effects of old aged white peony tea (AWP) on the hypoglycemic effects in zebrafish with IDDM

注: a 和 b 分别表示孵育 24 h 和 48 h 时老白牡丹茶的降糖效应。

## 2.2 WP 降糖作用研究

### 2.2.1 基于 NIDDM 斑马鱼的 WP 降糖效应评估分析

基于 NIDDM 斑马鱼的 WP 降糖结果见图 3。图 3a 显示, 死亡率 (%) 与 WP 浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ ) 的回归方程为:  $Y=0.027 80x+10.31 (R^2=0.782 0)$  (3)

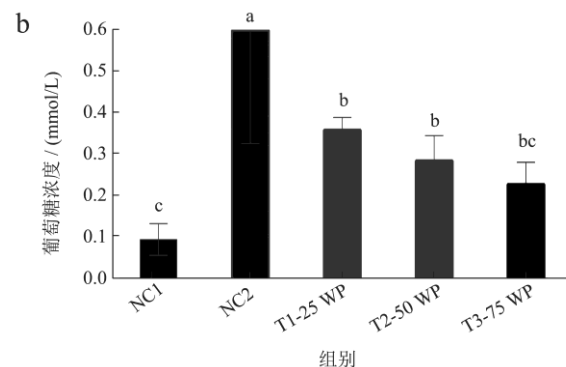
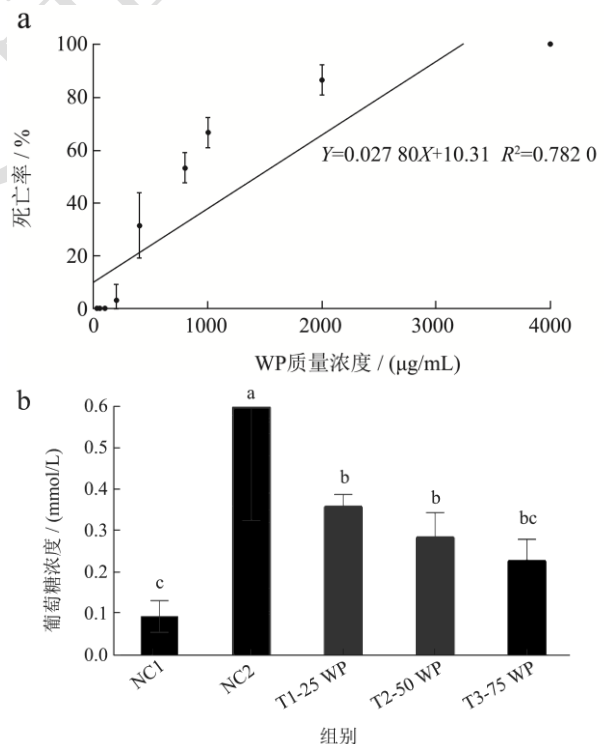


图 3 基于 NIDDM 斑马鱼斑马鱼的白牡丹茶降糖作用评估

### Fig.3 Effects of white peony tea (WP) on the hypoglycemic effects in zebrafish with NIDDM

注: a 表示白牡丹茶浓度与斑马鱼致死率之间的量效关系, b 分别表示干预 24 h 时白牡丹茶的降糖效应。

经计算  $LC_{50}$  为  $1\ 427.70\ \mu\text{g/mL}$ , 若按照 10%~25%  $LC_{50}$  的剂量浓度作为评价用剂量, 为  $142.77\sim 356.92\ \mu\text{g/mL}$ 。为开展 AWP 和 WP 降糖作用比较研究下调 WP 评价用剂量浓度, 其降糖结果见图 3b。图 3b 显示, 相比 NC2 组, T1-25 WP、T2-50 WP 和 T3-75 WP 组斑马鱼 GLU 水平分别降低了 40.18%、52.57% 和 62.11%, 差异均显著 ( $P<0.05$ )。

## 2.2.2 基于 IDDM 斑马鱼的 WP 降糖效应评估分析

基于 IDDM 斑马鱼的 WP 降糖结果见图 4。图 4 显示, 20、30 和 40  $\mu\text{g/mL}$  WP 孵育 24 h 后斑马鱼 GLU 值水平降低, 分别下调了 6.12% ( $P>0.05$ )、13.35% ( $P>0.05$ ) 和 22.58% ( $P<0.05$ ); 孵育 48 h 后 GLU 值分别降低了 26.51% ( $P<0.05$ )、22.91% ( $P>0.05$ ) 和 14.42% ( $P>0.05$ )。

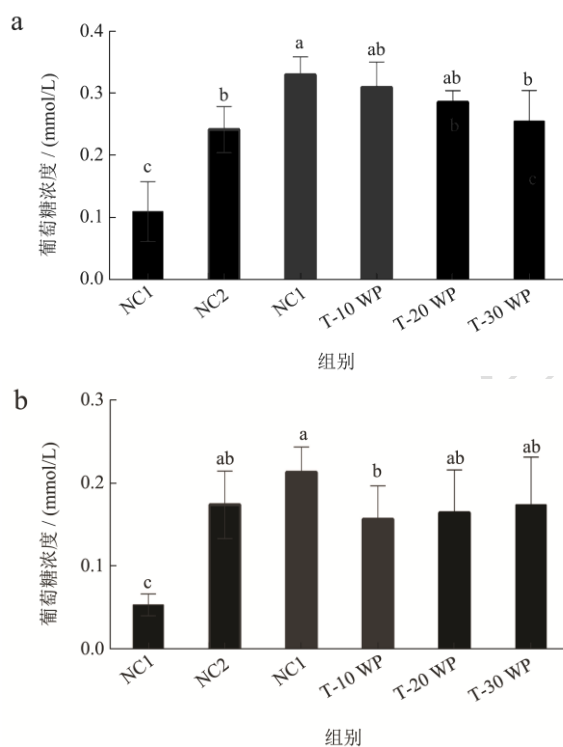


图 4 基于 IDDM 斑马鱼的白牡丹茶降糖作用评估

Fig.4 Effects of white peony tea (WP) on the hypoglycemic effects in zebrafish with IDDM

注: a 和 b 分别表示孵育 24 h 和 48 h 时白牡丹茶的降糖效应。

斑马鱼是一种新型模式生物, 目前已经被广泛用于构建诸如糖尿病、构建糖尿病<sup>[23,24]</sup>、高血脂<sup>[19]</sup>、尿酸血症<sup>[20]</sup>、失眠<sup>[21]</sup>等模型开展药物筛选和功能评价。但由于斑马鱼(幼鱼)自身特殊性, 其对药物敏感且耐受度较低, 因此需要首先开展药物耐受性分析研究。

研究发现, 在 22  $\text{mg/mL}$  GLU 溶液共孵育下, 随着白茶 (AWP 和 WP) 浓度增加对斑马鱼的致死作用增强, 因而开展白茶降糖效应评估需要合理设置评价用剂量浓度范围。

同时, 研究发现, AWP 和 WP 全水浸出物对 NIDDM 和 IDDM 斑马鱼均具有明显的降糖效应, 但其降糖效应与作用时间和作用浓度有关。截止目前, 以白茶全水浸出物为对象并采用斑马鱼模型研究白茶降糖功效的报道还较为鲜见。但结合大小鼠模型来看, 本实验结果与刘犀灵等<sup>[27]</sup>的研究结果相似, 他们通过糖尿病小鼠模型研究发现 1.5  $\text{g/kg BW}$  白毫银针、白牡丹和寿眉水提物灌胃均可以显著降糖小鼠血糖, 且改善小鼠的糖耐量。另外, 汪长钢等<sup>[28]</sup>研究也证实白茶水浸提物可以有效降低肥胖小鼠血糖, 且降糖效果与白茶药物剂量有关。还有, 刘丹奇等<sup>[29]</sup>以茶叶多糖为对象, 研究发现 300  $\text{mg/kg}$  白茶(寿眉)多糖灌胃可以显著降低糖尿病小鼠血糖和改善糖耐量。但他们的文章中均未明确交待白茶原料是新茶还是老白茶, 另结合文献检索看, 目前区分研究白茶和老白茶降糖作用的研究也比较鲜见。综合 NIDDM 和 IDDM 斑马鱼研究发现, AWP 和 WP 的降糖表现还与糖尿病类型有关, 在不同模型下 AWP 和 WP 降糖效果略有差异。在 NIDDM 斑马鱼方面, 治疗 24 h 和 48 h AWP 和 WP 生药量浓度大于等于 20  $\mu\text{g/mL}$  可起到显著降糖作用。在 IDDM 斑马鱼方面, 治疗 24 h 和 48 h AWP 生药量浓度大于等于 30  $\mu\text{g/mL}$ ; 治疗 24 h 和 48 h WP 生药量浓度要分别大于等于 40  $\mu\text{g/mL}$  和 20  $\mu\text{g/mL}$  才能起到显著降糖效应。

## 2.3 茶多酚降糖效应分析研究

基于 IDDM 斑马鱼的 TP 降糖效应结果见图 5。图 5a 显示, 死亡率 (%) 与 TP 浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ ) 的回归方程为:

$$Y=0.272\ 9x+4.381\ (R^2=0.819\ 9) \quad (4)$$

经计算  $LC_{50}$  为:  $167.16\ \mu\text{g/mL}$ , 如果按照 10%~25%  $LC_{50}$  的剂量浓度作为评价用剂量范围, 为  $16.72\sim 41.79\ \mu\text{g/mL}$ 。从图 5b 可以看出, 相比 MC1 组, 治疗 24 h 后, 20 和 30  $\mu\text{g/mL}$  TP 孵育组斑马鱼 GLU 值分别下调了 10.34% ( $P>0.05$ ) 和 8.24% ( $P>0.05$ ); 治疗 48 h 后, 10、20 和 30  $\mu\text{g/mL}$  TP 孵育组斑马鱼 GLU 值分别下调了 19.46% ( $P>0.05$ )、10.12% ( $P>0.05$ ) 和 24.53% ( $P<0.05$ )。

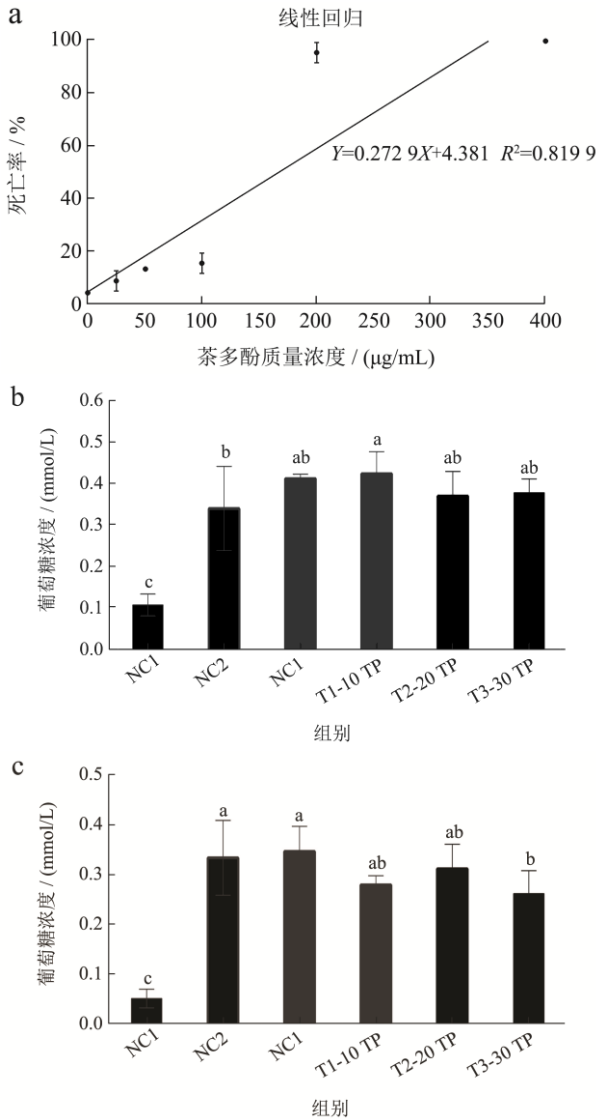


图5 基于 IDDM 斑马鱼的茶多酚 (TP) 降糖作用评估

**Fig.5 Effects of the aqueous extract of tea polyphenols (TP) on the hypoglycemic effects in zebrafish with IDDM**

注: a 表示茶多酚浓度与斑马鱼致死率之间的量效关系,

b 和 c 分别表示孵育 24 h 和 48 h 时茶多酚的降糖效应。

结果表明,与 AWP 和 WP 相同,斑马鱼对 TP 也具有明显的高浓度不耐受性,但研究也表明在安全剂量范围内 TP 具有明显的降糖效应,且降糖效果与其浓度和作用时间有关。从作用时间和作用浓度来看,孵育 24 h 和 48 h TP 生药量浓度均要大于等于 30 μg/mL 可以显著降低 IDDM 斑马鱼 GLU 值水平。若仅从孵育液中总多酚含量水平看,多酚含量至少要大于等于 19.56 μg/mL 水平才能起到显著降糖作用。TP 是一类含有多羟基酚类化合物的统称,主要包括儿茶素类、黄酮类、黄酮醇类和酚酸类等,其中以儿茶素类物质为主,占多酚含量的 60% 到 80%。儿茶素又可分离纯化为不同单体,其中以 EGCG 占比最高。多酚类成分的降糖活性作用主要有以下途径:EGCG 可以通过抑

制胰脂肪酶和淀粉酶活性<sup>[8,30]</sup>,下调钠依赖的 GLU 共转运蛋白 1 的表达减少 GLU 吸收<sup>[31]</sup>,刺激胰岛素合成促进 GLU 体内消耗利用<sup>[32]</sup>等途径调节糖代谢,还可以通过保护胰岛细胞<sup>[33]</sup>,减轻胰岛素信号封锁增强 GLU 利用<sup>[5]</sup>,抑制肠道内糖脂的吸收<sup>[8]</sup>,促进骨骼肌 GLU 转运体 4 的表达<sup>[34]</sup>增强糖代谢稳定。TP 也可以通过促进 HDL-C 的表达<sup>[35]</sup>,促进粪便脂质排泄<sup>[36]</sup>,影响肠内脂质乳化、消化和胶束溶解<sup>[37]</sup>减少脂质吸收等改善糖脂代谢平衡。一直以来,多酚类物质被认为有降糖潜力,斑马鱼试验也证实多酚确有降糖功效,这也与细胞试验和大小鼠动物试验结果相一致。

## 2.4 WP 和 AWP 降糖效应比较研究

### 2.4.1 基于 NIDDM 斑马鱼的降糖效应评估比较

从图 6 中可以看出,干预 24 h 后,20 μg/mL AWP 和 WP 处理组斑马鱼 GLU 值分别下调了 32.98% ( $P<0.05$ ) 和 34.79% ( $P<0.05$ );治疗 48 h 后斑马鱼 GLU 值分别下调了 39.29% ( $P<0.05$ ) 和 42.48% ( $P<0.05$ )。结果发现在此生药量浓度下 TP 降糖效果较差,这也与上述研究结果基本一致。

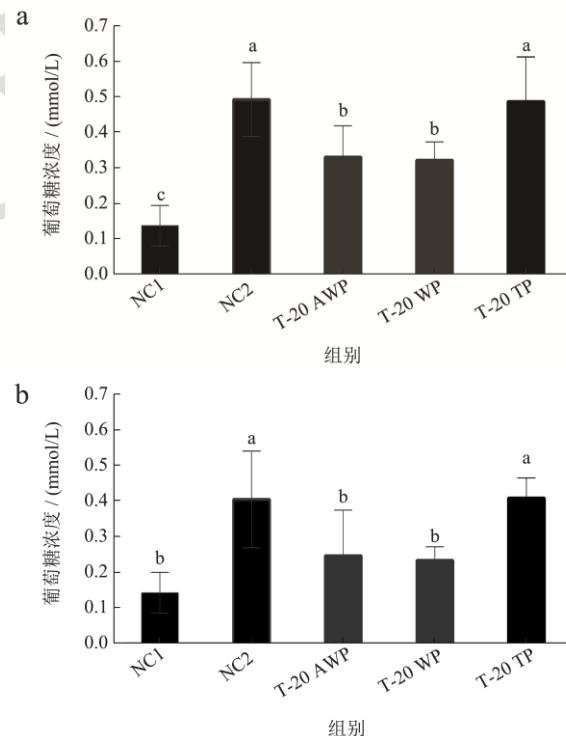


图6 基于 NIDDM 斑马鱼的老白牡丹茶与白牡丹茶降糖作用比较

**Fig.6 Comparison of hypoglycemic effects of old aged white peony tea (AWP) and white peony tea (WP) in zebrafish with NIDDM**

注: a 和 b 分别表示干预 24 h 和 48 h 时老白牡丹茶与白牡丹茶的降糖效应。

## 2.4.2 基于 IDDM 斑马鱼的降糖效应评估比较

图 7 显示, 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  AWP、WP 和 TP (以生药量计) 孵育 24 h 后斑马鱼 GLU 值分别降低了 26.73% ( $P<0.05$ )、14.41% ( $P<0.05$ ) 和 26.43% ( $P<0.05$ ); 孵育 48 h 后斑马鱼 GLU 值分别降低了 38.76% ( $P<0.05$ )、23.14% ( $P<0.05$ ) 和 27.12% ( $P<0.05$ )。

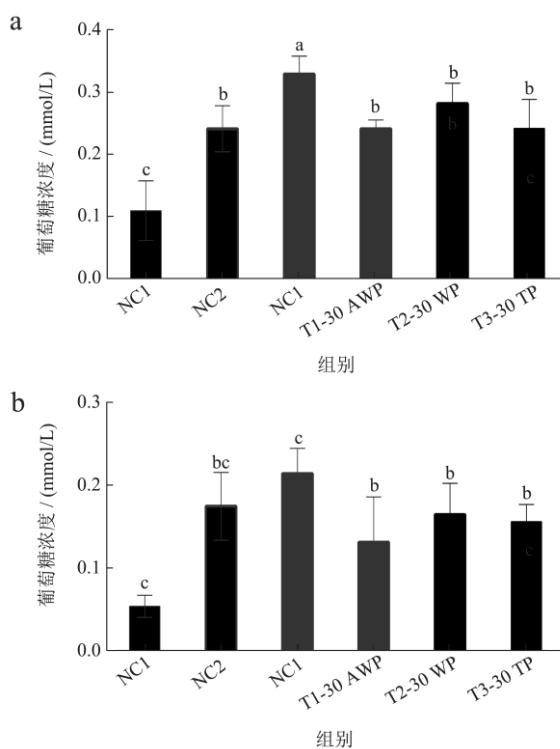


图 7 基于 IDDM 斑马鱼的老白牡丹茶与白牡丹茶降糖作用比较

Fig.7 Comparison of hypoglycemic effects of old aged white peony tea (AWP) and white peony tea (WP) in zebrafish with IDDM

注: a 和 b 分别表示孵育 24 h 和 48 h 时老白牡丹茶与白牡丹茶的降糖效应。

研究发现, 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  AWP 和 WP 对 NIDDM 斑马鱼具有明显的降糖效应, 两者再显著优于 TP, 与 2.3 部分结果一致; 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  AWP、WP 和 TP 对 IDDM 斑马鱼均具有明显降糖效应, 其中 AWP 降糖效应略强, 与前述试验结果基本一致。另外, 在同等生药量下, 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  AWP 对 IDDM 斑马鱼的降糖效果略优于 TP, 再明显优于 WP。多酚类活性物质作为茶叶中占比高的主功能成分之一, 推测其在辅助降糖上可能有至关重要的作用。但是, 结果与预期并不一致, 在 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  同等生药量下 TP 的辅助降糖效应是明显弱于 AWP 的, 但又略强于 WP。从多酚水平上看, 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  AWP、WP 和 TP 孵育液中多酚的有效浓度分别为 2.43、1.83 和 19.56  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。因而, 结果表明多酚浓度水平并不决定辅助降糖效应的强弱, 反而多酚浓度低的 AWP 孵育液降糖效应最强 (图 6 和图 7)。

因此, 从多酚浓度水平研究并判定 AWP 和 WP 的辅助降糖效应机制并不成功, AWP 的降糖效应更强, 可能受茶叶中其它活性成分单独或与多酚联合发挥重要作用。AWP 的辅助降糖效应相对较优于 WP, 可能是因为白茶在持久存放过程中茶叶中的功能成分或发生氧化、聚合等反应进而影响 AWP 的辅助降糖效应, 但其具体成分为何尚需进一步开展研究。众所周知, 茶叶是一种多功能成分复合体, 每一种功能成分都具有某类生物学活性, 因而仅从单一的某种或某类成分评价茶叶的健康效应是不全面的。研究茶叶功效应以茶水浸出物为对象, 包括采用类似泡茶法制备茶水样本, 在茶叶水浸出物全摄入下才能切实评估人饮茶后的健康效应。结果显示白茶中或存在除多酚外的其它功能成分具有降糖效应, 或单独或与多酚协同发挥重要糖代谢调节作用, 具有较大的开发价值。当然, 目前的研究也发现譬如咖啡碱<sup>[12,13]</sup>、茶黄素<sup>[14,15]</sup>等也具有明确的糖脂调节效应, 但是否就是咖啡碱和茶黄素这些已经报道的功能成分在起关键作用, 还需开展进一步研究。因此, 下一步需要充分利用斑马鱼技术的快捷和低成本技术优势开展基于斑马鱼的白茶降糖物质基础研究, 进而深度揭示白茶“一年茶、三年药、七年宝”的可能内在作用机制, 为茶叶健康和科学品饮提供基础理论和基础数据支撑。

## 3 结论

斑马鱼对高浓度 AWP、WP 和 TP 具有不耐受性, 在 22 mg/mL GLU 溶液共孵育 24 h 时死亡率 (%) 与 AWP 浓度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 以生药量计) 的回归方程分别为:  $Y=0.213 4x-22.83$  ( $R^2=0.605 7$ )、 $Y=0.278 0x+10.31$  ( $R^2=0.782 0$ ) 和  $Y=0.272 9x+4.381$  ( $R^2=0.819 9$ ), 经计算  $LC_{50}$  分别为: 341.28、1427.70 和 167.16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 若按照 10%~25%  $LC_{50}$  推荐为给药剂量, 分别为 34.13~85.32、142.77~356.92 和 16.72~41.79  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 为科学评估白茶降糖效应需将药物剂量控制在合理范围内。同时, 结果表明 50~250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  AWP 和 25~75  $\mu\text{g}/\text{mL}$  WP 对 NIDDM 斑马鱼具有明显的降糖效应; 10~30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  AWP、20~40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  WP 和 20~30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  TP 对 IDDM 斑马鱼具有明显的降糖效应, 且降糖效应与其作用浓度和作用时间有关。基于斑马鱼评价, 白茶与老白茶均具有降糖作用, 但老白茶相对更优。对比研究各孵育液中总多酚含量 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 与降糖效应 (%) 关系发现, 白茶的降糖效应与多酚水平有关, 但并不仅限于依赖多酚, 白茶中尚存在除多酚外的功能成分单独或者与多酚协同起重要作用, 因而下一步需要充分利用斑马鱼技术开展基于斑马鱼的白茶降糖物质基



础研究, 进而深度揭示白茶“一年茶、三年药、七年宝”的可能内在作用机制。

### 参考文献

- [1] Zhang H H, Liu J, Lv Y J, et al. Changes in the intestinal microbiota of type 2 diabetes mice in response to dietary supplementation with instant tea or matcha [J]. Canadian Journal of Diabetes, 2020, 44: 44-52.
- [2] Liu J, Lv Y J, Pan J X, et al. Effects of tea polyphenols and EGCG on glucose metabolism and intestinal flora in diabetic mice fed a cornstarch-based functional diet [J]. Food Science and Technology, 2022, 42: e50821.
- [3] Nagao T, Hase T, Tokimitsu I. A green tea extract high in catechins reduces body fat and cardiovascular risks in humans [J]. Obesity, 2007, 15(6): 1473-1483.
- [4] Hara Y, Honda M. The inhibition of  $\alpha$ -amylase by tea polyphenols [J]. Agricultural Biological Chemistry, 1990, 54(8): 1939-1945.
- [5] Barthelmebs L, Divies C, Cavin J F. Knockout of the p-coumarate decarboxylase gene from *Lactobacillus plantarum* reveals the existence of two, other inducible enzymatic activities involved, in phenolic acid metabolism [J]. Applied & Environmental Microbiology, 2000, 66(8): 3368-3375.
- [6] Osawa R, Kuroiso K, Goto S, et al. Isolation of tannin-degrading *Lactobacilli* from humans and fermented foods [J]. Applied & Environmental Microbiology, 2000, 66(7): 3093-3097.
- [7] Vaquero I, Ángela Marcobal, Muñoz R. Tannase activity by lactic acid bacteria isolated from grape must and wine [J]. International Journal of Food Microbiology, 2004, 96(2): 199-204.
- [8] Nakai M, Fukui Y, Asami S, et al. Inhibitory effects of oolong tea polyphenols on pancreatic lipase *in vitro* [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(11): 4593-4598.
- [9] Sae-Tan S, Grove K A, Kennett M J, et al. (-)-Epigallocatechin-3-gallate increases the expression of genes related to fat oxidation in the skeletal muscle of high fat-fed mice [J]. Food & Function, 2011, 2: 111.
- [10] Collins Q F, Liu H Y, Pi J, et al. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG), a green tea polyphenol, suppresses hepatic gluconeogenesis through 5'-AMP-activated protein kinase [J]. Journal of Biological Chemistry, 2007, 282(41): 30143.
- [11] Lin C L, Lin J K. Epigallocatechin gallate (EGCG) attenuates high glucose-induced insulin signaling blockade in human hepG2 hepatoma cells [J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2008, 52(8): 930-939.
- [12] 王文君. 红茶和绿茶多酚与猪胰腺  $\alpha$ -淀粉酶相互作用的酶催化动力学和荧光猝灭研究[D]. 福州: 福建医科大学, 2009.
- [13] Carlos Ruiz-Moreno C, Gutiérrez-Hellín J, Amaro-Gahete F J, et al. Caffeine increases whole-body fat oxidation during 1 h of cycling at fatmax [J]. European Journal of Nutrition, 2021, 60: 2077-2085.
- [14] Seydoux J. Green tea and thermogenesis: interactions between catechin-polyphenols, caffeine and sympathetic activity [J]. International Journal of Obesity & Related Metabolic Disorders, 2000, 24(2): 252.
- [15] Lin L, Huang H C, Lin J K. Theaflavins attenuate hepatic lipid accumulation through activating AMPK in human HepG2 cells [J]. Journal of Lipid Research, 2007, 48(11): 2334-2343.
- [16] 倪德江, 谢笔钧, 宋春和. 不同茶类多糖对实验型糖尿病小鼠治疗作用的比较研究[J]. 茶叶科学, 2002, 22(2): 160-163.
- [17] 刘犀灵, 任发政, 雷新根, 等. 白茶对糖尿病模型小鼠降血糖作用的研究[J]. 中国食物与营养, 2018, 24(4): 56-61.
- [18] 刘均, 李强, 谭蓉. 基于斑马鱼生物模型评价青钱柳的降糖作用[J]. 现代食品科技, 2022, 38(5): 1-7, 164.
- [19] Zhou J, Xu Y Q, Guo S Y, et al. Rapid analysis of hypolipidemic drugs in a live zebrafish assay [J]. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, 2014, 72: 47-52.
- [20] Zhang Y, Li Q, Wang F, et al. A zebrafish (*Danio rerio*) model for high-throughput screening food and drugs with uric acid-lowering activity [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2018, 508(2): 494-498.
- [21] 何东方, 张丽军, 刘梅颜. 药物处理对失眠症斑马鱼睡眠的影响以及相关作用机制[J]. 中国循证心血管医学杂志, 2017, 3(31): 75-79, 83.
- [22] Intine R V, Olsen A S, Sarras M P. A zebrafish model of diabetes mellitus and metabolic memory [J]. Journal of Visualized Experiments, 2013, 72: e50232.
- [23] Shin E, Hong B N, Kang T H. An optimal establishment of an acute hyperglycemia zebrafish model [J]. African Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2012, 6(42): 2922-2928.
- [24] Zang L, Shimada Y, Nishimura N. Development of a novel zebrafish model for type 2 diabetes mellitus [J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 1-11.
- [25] 刘均, 李强, 谭蓉. 采用斑马鱼生物模型对桑叶和绞股蓝叶水提取物降糖作用的比较研究[J]. 中国茶叶加工, 2021, 4: 74-82.

- [26] GB/T 8313-2018,茶叶中茶多酚和儿茶素类含量的检测方法[S].
- [27] 刘犀灵,任发政,雷新根,等.白茶对糖尿病模型小鼠降血糖作用的研究[J].中国食物与营养,2018,24(4):56-61.
- [28] 汪长钢,于佳弘,潘妍.绿茶,白茶水提物对肥胖小鼠血糖,血脂的干预作用及肠道微生物的影响[J].中国食品添加剂, 2022,33(1):113-122.
- [29] 刘丹奇,任发政,李景明,等.几种茶多糖降血糖活性的研究[J].茶叶科学,2019,39(6):652-660.
- [30] Zhang H, Jiang Y, Pan J, et al. Effect of tea products on the *in vitro* enzymatic digestibility of starch [J]. Food Chemistry, 2018, 243: 345-350.
- [31] Hossain S J, Kato H, Aoshima H, et al. Polyphenol-induced inhibition of the response of Na(+)/glucose cotransporter expressed in xenopus oocytes [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50(18): 5215-5219.
- [32] Yuskavage J K. Epigallocatechin gallate in the regulation of insulin secretion 2008 (Doctoral dissertation, Virginia Polytechnic Institute and State University) [C]. <http://hdl.handle.net/10919/32761> (2008).
- [33] Song E K, Hur H, Han M K. Epigallocatechin gallate prevents autoimmune diabetes induced by multiple low doses of streptozotocin in mice [J]. Archives of Pharmacal Research, 2003, 26(7): 559-563.
- [34] Ueda M, Nishiumi S H, Fukuda I, et al. Epigallocatechin gallate promotes glut4 translocation in skeletal muscle [J]. Biochemical & Biophysical Research Communications, 2008, 377(1): 286-290.
- [35] Bin G E, Xie M L, Gu Z L, et al. Therapeutic effect of epigallocatechin gallate on hyperlipidemic fatty liver in rats [J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2009, 25(4): 510-514.
- [36] Hsu T F, Kusumoto A, Abe K, et al. Polyphenol-enriched oolong tea increases fecal lipid excretion [J]. European Journal of Clinical Nutrition, 2006, 60(11): 1330-1336.
- [37] Koo S I, Noh S K. Green tea as inhibitor of the intestinal absorption of lipids: potential mechanism for its lipid-lowering effect [J]. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2007, 18(3): 179-183.