

# 白番茄提取物组合物抗糖化及抗小鼠衰老作用评价

刘会平<sup>1</sup>, 刘弘基<sup>2</sup>, 李少飞<sup>1</sup>, 陈晓<sup>2</sup>, 蒋亮<sup>1</sup>, 冯东亮<sup>2</sup>, 罗振铎<sup>2</sup>, 罗洁玲<sup>2</sup>, 廖文镇<sup>2\*</sup>

(1. 时代生物科技(深圳)有限公司, 广东深圳 518115)

(2. 南方医科大学公共卫生学院营养与食品卫生学系, 广东广州 510515)

**摘要:** 该研究通过建立体外抗糖化模型、抗氧化模型及小鼠衰老模型, 评价白番茄组合物抗糖化、抗氧化及抗小鼠衰老的效果。实验结果表明, 在质量浓度为 0.2 mg/mL 时, 组合物对果糖胺、活性羰基化合物和荧光性晚期糖基化终末产物抑制率分别为 44.39%、19.22% 和 69.28%, 组合物抗糖基化效果优于氨基胍。组合物对  $O_2^{\cdot-}$ 、羟基和  $ABTS^+$  自由基均有显著的清除作用, 组合物的清除自由基能力:  $ABTS^+ \cdot > \cdot OH > O_2^{\cdot-}$ 。细胞实验表明, 组合物可显著减轻丙酮醛的细胞毒性, 提高 HepG2 细胞活力 ( $P < 0.05$ )。在小鼠衰老模型中, 组合物可改善 D-半乳糖诱导的肝损伤并显著恢复肝脏总超氧化物歧化酶水平 ( $P < 0.05$ )。由此可知, 这款含白番茄提取物组合物具有较好的抗糖基化、抗氧化能力和抗衰老能力, 将在功能食品、保健品行业有较好的应用前景。

**关键词:** 晚期糖基化终末产物; 白番茄提取物; 抗糖化; 抗衰老

文章编号: 1673-9078(2024)11-87-96

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.11.1206

## Anti-glycation Effects of Lumenato Extract Complex and Its Anti-aging Effects in Mice

LIU Huiping<sup>1</sup>, LIU Hongji<sup>2</sup>, LI Shaofei<sup>1</sup>, CHEN Xiao<sup>2</sup>, JIANG Liang<sup>1</sup>, FENG Dongliang<sup>2</sup>, LUO Zhenhua<sup>2</sup>, LUO Jiuling<sup>2</sup>, LIAO Wenzhen<sup>2\*</sup>

(1. Times Biotechnology (Shenzhen) Co. Ltd., Shenzhen 518115, China) (2. Department of Nutrition and Food Hygiene, School of Public Health, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

**Abstract:** The anti-glycation, antioxidant, and anti-aging effects of Lumenato extract complex were examined by establishing *in vitro* anti-glycation and antioxidant models and an *in vivo* model of aging in mice, respectively. The results revealed that the application of the extract complex at a concentration of 0.2 mg/mL resulted in inhibition rates of 44.39%, 19.22%, and 69.28% were for fructosamine, active carbonyl compounds, and fluorescent advanced glycation end-products, respectively. Furthermore, the anti-glycation effects of the complex were found to be superior to those of aminoguanidine, and the complex exhibited significant scavenging effects on  $O_2^{\cdot-}$ , OH, and  $ABTS^+$  (in the order  $ABTS^+ \cdot > \cdot OH > O_2^{\cdot-}$ ). In addition, cell experiments revealed that the complex can significantly reduce the cytotoxicity of methylglyoxal and enhance the viability of HepG2 cells ( $P < 0.05$ ). In the mouse aging model, the complex alleviated the liver injury induced by D-galactose, as well as restored liver total superoxide dismutase levels ( $P < 0.05$ ). These findings thus provide evidence indicating that with

引文格式:

刘会平, 刘弘基, 李少飞, 等. 白番茄提取物组合物抗糖化及抗小鼠衰老作用评价[J]. 现代食品科技, 2024, 40(11): 87-96.

LIU Huiping, LIU Hongji, LI Shaofei, et al. Anti-glycation effects of lumenato extract complex and its anti-aging effects in mice [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(11): 87-96.

收稿日期: 2023-10-10

作者简介: 刘会平 (1978-), 男, 硕士, 高级工程师, 研究方向: 天然植物活性产物、海洋活性多肽, E-mail: 546033730@qq.com

通讯作者: 廖文镇 (1983-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 营养活性物质的开发与活性研究, E-mail: wenzhenliao@163.com

respect to its anti-glycation, antioxidant, and anti-aging properties, Lumenato extract complex has promising application potential in the functional food and health product industries.

**Key words:** advanced glycation end-product; Lumenato extract; anti-glycation; anti-aging

糖基化是指蛋白质、氨基酸、脂类等生物大分子的游离氨基和还原糖（葡萄糖、果糖等）的羰基经过缩合、重排、裂解及氧化修饰等一系列非酶促反应<sup>[1,2]</sup>。晚期糖基化终末产物（Advanced Glycation end Products, AGEs）则是这一系列反应后形成的一类稳定的、不可逆的结构多样共价聚合物的总称。糖基化会导致蛋白质结构的改变，引起蛋白质功能障碍并更能抵抗降解，进而影响机体组织和器官的正常功能，加速机体衰老的过程<sup>[3,4]</sup>。目前的研究表明糖基化与糖尿病、动脉粥样硬化以及青光眼等多种慢性退化性疾病密切相关<sup>[5-7]</sup>。抗糖基化和抗衰老是一个长期的过程，长期服用化工合成的抗糖剂将对机体健康带来挑战，因此利用天然产物来对抗糖基化和衰老逐渐受到广泛关注<sup>[8,9]</sup>。

近年来，随着消费者对绿色健康产品的需求的增加，植物提取物在食品领域受到广泛的关注<sup>[1,10]</sup>。植物提取物成分包含多酚、酸、黄酮以及生物碱等多种成分。这些成分表现出多种生物活性，对人体的健康有着不可忽视的作用。植物提取物往往含有数十种甚至是数百上千种不同丰度的活性成分，因此过去对植物提取物功能的开发往往致力于降低复杂性、获得“单一”活性成分。然而，与单一活性成分相比，植物提取物物种的多种成分之间具有协同作用，并且这种作用可以通过与其它植物提取物成分混合得到加强<sup>[11,12]</sup>。蔓越莓汁提取物与蓝莓、葡萄籽和牛至提取物协同混合果汁能显著提高蔓越莓汁提取物的抗幽门螺旋杆菌活性<sup>[12]</sup>。

白番茄（Lumenato）是原产自南美洲的番茄品种，富含多种番茄红素以及类胡萝卜素等生物活性成分。已有研究表明，补充含番茄提取物的膳食补充剂有助于抗衰老、降低慢性疾病风险<sup>[13-15]</sup>。然而对白番茄提取物尤其是其与其他植物提取物的协同抗糖化作用研究较少。

因此，本研究开发一种白番茄提取物与多种植物提取物复配的抗糖、抗衰老组合物。使用牛血清白蛋白（BSA）-还原糖模型评价组合物的抗糖基化指标，并通过胞外抗氧化实验评价组合物的抗氧化能力。选用 HepG2 细胞作为模型，检测组合物对

丙酮醛诱导的毒性减弱作用。此外，评价组合物对 D-半乳糖诱导的昆明小鼠衰老保护作用。本研究以期开发新型抗糖化、抗衰老组合物提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物与主要试剂

4 周龄昆明种 SPF 雄性小鼠，生产许可：SCXK（粤）2022-0002，以及 SPF 级维持饲料均购买于广东省医学实验动物中心。实验按照广东省医学实验动物中心实验动物福利伦理要求进行（伦理编号：D202311-8）。

高糖 DMEM 培养基、胎牛血清（FBS）、磷酸缓冲盐溶液（PBS），美国 Gibco 公司；BSA，杭州弗德生物科技有限公司；二甲基亚砜（DMSO）、氯化硝基四氮唑蓝（NBT）、甲酸钠、丙酮醛（MGO）、D-半乳糖，上海麦克林生化科技有限公司；proclin 300，上海源叶生化科技有限公司；MTT、水杨酸、FeSO<sub>4</sub>、邻苯三酚、过硫酸钾，上海阿拉丁生化科技有限公司；Girard-T、氨基胍（AG），天津希恩斯生化科技有限公司；ABTS，上海吉至生化科技有限公司；本实验所用分析纯试剂购于天津大茂化学试剂厂。

### 1.2 仪器与设备

VORTEX-GENIE2 可调速旋涡混匀器，美国 Scientific industries；HH-S6 水浴锅，江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司；CP214 电子天平、ST5000/F pH 计，美国 Ohaus 公司；Epoch2 微孔板分光光度计，美国 Agilent 公司；Spark 多功能微孔板检测仪，奥地利 Tecan 公司；3111 细胞培养箱，美国 Thermo Scientific；ZHJH-C1209C 超净工作台，上海智域分析仪器制造有限公司；BX53 荧光显微镜，日本 Olympus；AE2000 倒置显微镜，厦门麦克奥迪有限公司；Centrifuge 5425 离心机，德国 Eppendorf 公司。

### 1.3 细胞株

人肝癌细胞 HepG2，感谢南方医科大学食品安全与健康中心赠与。

## 1.4 实验方法

### 1.4.1 抗糖化、抗衰老组合物的制备

组合物配方：白番茄提取物 30 mg、橄榄提取物 150 mg、余甘子提取物 200 mg、红葡萄提取物 35 mg、葡萄籽提取物 40 mg、维生素 C 200 mg、酵母抽提物 15 mg。将各成分按照比例混合，使用蒸馏水配制成实验所需的质量浓度。

### 1.4.2 抗糖化功能评价

#### 1.4.2.1 BSA-果糖模型的制备

根据 BSA-果糖模型评估组合物的抗糖化效果<sup>[16,17]</sup>，将 2 mL 果糖溶液（300 mg/mL）与 2 mL 不同质量浓度的组合物溶液（0.01、0.05、0.1、0.2、0.3、0.5、0.8 mg/mL）混合，加入 2 mL 30 mg/mL BSA 溶液，以上反应物均用 50 mmol/L pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液（含有 0.02% proclin 300）溶解，用一定质量浓度的（0.1、1.5 mg/mL）AG 溶液代替组合物溶液作为阳性对照组，用磷酸盐缓冲液代替组合物溶液作为空白组，并用磷酸盐缓冲液代替果糖溶液作为 BSA、组合物溶液共孵育组，每个质量浓度平行重复 3 次，将各样品于 50 ℃ 水浴锅中孵育 24 h 后，流水冷却。

#### 1.4.2.2 蛋白质非酶糖基化阶段性产物测定

果糖胺含量测定：参照 Joglekar 等<sup>[18]</sup>的方法，测定组合物对 BSA-果糖模型体系中生成的果糖胺含量的影响。将 0.2 mL 不同质量浓度组合物（或 AG）处理的糖基化蛋白质样品和 0.8 mL NBT 试剂（0.3 mmol/L）加入到 2 mL 碳酸盐缓冲液（100 mmol/L，pH 值为 10.1）中，在室温下反应 30 min 后，用酶标仪在 530 nm 处测定 OD 值。果糖胺抑制率（%）计算公式如下：

$$R_1 = \frac{F_0 - F_1}{F_0} \times 100\% \quad (1)$$

式中：

$R_1$ ——果糖胺抑制率，%；

$F_0$ ——组合物（或 AG）不存在时样本的 OD 值；

$F_1$ ——组合物（或 AG）存在时样本的 OD 值。

活性二羰基化合物含量测定：参照 Zeng 等<sup>[9]</sup>的方法测定组合物对 BSA-果糖模型体系中活性二羰基化合物生成含量的影响。简而言之，将 0.2 mL 不同质量浓度组合物（或 AG）处理的糖基化蛋白质样品与 0.2 mL Girard-T 溶液（500 mmol/L）和 1.7 mL 甲酸钠缓冲液（500 mmol/L，pH 值为 2.9）混匀并在室温下孵育 1 h。使用酶标仪测定样品在 294 nm 处

的吸光度。活性二羰基化合物抑制率（%）参照公式（1）计算。

荧光性 AGEs 含量测定：取 200  $\mu$ L 的不同质量浓度组合物（或 AG）处理的糖基化蛋白质样品加入到黑色 96 孔板中，使用 Spark 多功能微孔板检测仪以激发波长 370 nm 测定样品在发射波长 440 nm 处的荧光强度。AGEs 抑制率（%）参照公式（1）计算。

### 1.4.3 抗氧化指标

#### 1.4.3.1 $O_2^{\cdot-}$ 清除率

$O_2^{\cdot-}$ 清除率实验参照 Li<sup>[19]</sup>的方法进行。使用蒸馏水将组合物和维生素 C 配制成质量浓度为 0.2、0.5、1、2、3、5 mg/mL 的样品溶液和对照品溶液。取 0.1 mL 不同质量浓度的样品溶液或对照样品加入 5 mL 离心管中，加入 2.8 mL Tris-HCl 缓冲液（0.05 mol/L，pH 值为 7.4），最后再加入 0.1 mL 使用 1 mmol/L HCl 配制的 60 mmol/L 邻苯三酚，混匀。在室温下反应 5 min 后，使用 Epoch2 微孔板分光光度计检测 325 nm 处的吸光度  $A_1$ 。以相同体积的蒸馏水替代受试样品，在相同操作条件下测定吸光度  $A_0$ 。计算抑制率，每个质量浓度设置三个平行实验，计算平均值。 $O_2^{\cdot-}$ 清除率：

$$R_2 = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100\% \quad (2)$$

式中：

$R_2$ —— $O_2^{\cdot-}$ 清除率，%；

$A_0$ ——组合物（或 AG）不存在时样本的 OD 值；

$A_1$ ——组合物（或 AG）存在时样本的 OD 值。

#### 1.4.3.2 羟基自由基清除率

羟基自由基清除率实验参照陈燕萌<sup>[10]</sup>方法进行适当修改。分别移取 1.0 mL 不同质量浓度的组合物或维生素 C 溶液到 10 mL 离心管内，依次移入 1.0 mL 9 mmol/L  $FeSO_4$  溶液、9 mmol/L 的水杨酸-乙醇溶液及 8.8 mmol/L 过氧化氢溶液，在室温下反应 20 min，在波长为 510 nm 处测定得吸光值为  $A_1$ ；以相同体积的蒸馏水替代 8.8 mmol/L 过氧化氢溶液，在相同操作条件下测定吸光度  $A_2$ ；以相同体积的蒸馏水受试溶液，在相同操作条件下测定吸光度  $A_0$ 。计算羟基自由基清除率，三次平行试验，然后取平均值。清除率（%）按照公式（2）计算。羟基自由基清除率：

$$R_3 = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100\% \quad (3)$$



式中:

$R_3$ ——羟基自由基清除率, %;

$A_0$ ——组合物(或 AG)不存在时样本的 OD 值;

$A_1$ ——组合物(或 AG)存在时样本的 OD 值;

$A_2$ ——8.8 mmol/L 过氧化氢溶液不存在时样本的 OD 值。

#### 1.4.3.3 ABTS<sup>+</sup>自由基清除率

参照陈燕萌<sup>[10]</sup>方法适当修改。取 1 mL 组合物溶液或维生素 C 对照液于离心管中, 立即加入 4.0 mL ABTS<sup>+</sup> 自由基溶液, 混匀后在黑暗中反应 6 min, 在波长为 734 nm 处测定其吸光值为  $A_1$ , 用相同体积的蒸馏水代替 ABTS<sup>+</sup> 自由基工作液, 用同种的方法测定吸光值为  $A_2$ 。再以相同体积的蒸馏水代替受试样液测定吸光值为  $A_0$ 。按下列的公式计算 ABTS<sup>+</sup> 自由基清除率, 三次平行试验, 然后取平均值。ABTS 自由基清除率:

$$R_4 = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100\% \quad (4)$$

式中:

$R_4$ ——ABTS<sup>+</sup> 自由基清除率, %;

$A_0$ ——组合物(或 AG)不存在时样本的 OD 值;

$A_1$ ——组合物(或 AG)存在时样本的 OD 值;

$A_2$ ——ABTS<sup>+</sup> 自由基工作液不存在时样本的 OD 值。

#### 1.4.4 HepG2 细胞实验

##### 1.4.4.1 细胞培养

将 HepG2 细胞接种于含有 10% FBS, 1% 双抗(100 U/mL 青霉素, 0.1 g/L 硫酸链霉素)的 DMEM 培养基中, 细胞培养箱条件为 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, 饱和湿度, 在细胞培养箱培养 24 h 后换液 1 次, 待细胞接种 70%~80% 密度时用 0.25% 胰酶消化传代, 细胞传代至第 4 代, 取对数生长期细胞进行实验。

##### 1.4.4.2 细胞增殖活性检测(MTT)

采用 MTT 法检测细胞增殖活性。取对数生长期细胞, 用 0.25% 胰酶消化, 细胞计数, 制成每毫升  $2 \times 10^4$  个单细胞悬液, 接种于 96 孔细胞培养板中, 每孔加入单细胞悬液 200  $\mu$ L, 并在 96 孔板培养至对数生长期时进行下一步实验。

设置试验组, 每组至少 3 个平行复孔。用样品干预后, 在细胞培养箱中培养 24 h, 小心弃去上清, 每孔加入 200  $\mu$ L 0.5 g/L MTT 溶液, 在 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 4 h, 小心吸去 MTT 溶液, 加入 150  $\mu$ L DMSO, 在 37 °C 振荡 10 min, 在 570 nm 处测定吸光值, 计算细胞活性。

$$C = \frac{A_S - A_B}{A_C - A_B} \times 100\% \quad (5)$$

式中:

$C$ ——细胞活性, %;

$A_B$ ——未接种细胞孔的吸光度;

$A_S$ ——经药物处理细胞后孔的吸光度;

$A_C$ ——未经药物处理细胞孔的吸光度。

#### 1.4.4.3 含白番茄提取物的组合物对 MGO 毒性减弱作用

应用 MTT 检测细胞活力。HepG2 细胞胰酶消化后调整细胞悬液密度为每毫升  $2 \times 10^4$  个, 接种至 96 孔板中, 在培养箱中培养细胞达到对数生长期。小心弃去旧培养液, 用含不同质量浓度组合物和 3 mmol/L MGO 培养液孵育 24 h。随后弃去旧培养基, 每孔加入 200  $\mu$ L 0.5 g/L MTT 溶液, 在 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 4 h, 小心吸去 MTT 溶液, 加入 150  $\mu$ L DMSO, 在 37 °C 振荡 10 min, 在 570 nm 处测定吸光值, 计算细胞活性。

#### 1.4.5 含白番茄提取物的组合物对小鼠衰老的影响

昆明鼠, 雄性, 4 周龄, 在 22~25 °C, 相对适度 55%~70%, 12 h 开灯和关灯循环实验室适应性喂养一周后开展正式实验。30 只大鼠随机分为 3 个组, 每组 10 只: 正常组(NG)、模型组(MG)、组合物干预组(100 mg/kg, FG)。NG 组, 每天灌胃蒸馏水, 腹腔注射同体积生理盐水。MG 组每天灌胃蒸馏水, 腹腔注射 D- 半乳糖(300 mg/kg)<sup>[20]</sup>。FG 组每天灌胃含白番茄提取物的组合物, 腹腔注射 D- 半乳糖。所有小鼠饲养标准动物饲料, 自由摄食饮水。实验期间称量小鼠体质量。第 43 天实验结束, 将所有动物麻醉后处死, 收集小鼠肝脏组织进行病理检测及总超氧化物歧化酶(T-SOD)含量测定。

#### 1.4.6 数据分析

应用 IBM SPSS 20.0 对数据进行分析, 显著性差异水平设置为 0.05 ( $P < 0.05$ , 有显著性差异)。

## 2 结果与讨论

### 2.1 含白番茄提取物的组合物对果糖胺形成的影响

糖基化反应由一系列复杂的反应组成, 在糖基化的早期阶段, 还原糖与蛋白质的游离氨基反应形成 Amadori 产物, 而果糖胺是 Amadori 代表性产物<sup>[21]</sup>。因此, 首先考察组合物对 BSA- 果糖模型中果糖胺形成的影响。结果如图 1 所示, 组合物对果糖胺的抑制率明显优于 AG, AG 在 1.5 mg/mL 时的

抑制率仅为 15.15%。而组合物在 0.05 mg/mL 时对果糖胺的抑制率达到 22.20%，在 0.2 mg/mL 达到最大值为 44.39%。然而，当组合物质量浓度大于 0.3 mg/mL 时，对果糖胺的抑制率降低。这表明组合物在这些质量浓度下抑制果糖胺形成的协同作用减弱<sup>[22,23]</sup>。Adisakwattana 等<sup>[22]</sup>研究表明，在实验浓度范围内没食子酸与抗坏血酸组合物对果糖胺的抑制率未表现出显著的协同作用。Peng 等<sup>[23]</sup>研究发现橙皮素与铜离子复合物在高于 109.50  $\mu\text{g/mL}$  时对果糖胺的抑制率下降。黄酮类化合物（如柚皮素、芦丁等）是番茄食品中抑制非酶糖基化反应的重要活性成分之一<sup>[8,24]</sup>。Zhou 等<sup>[25]</sup>研究发现，在 BSA-葡萄糖模型中，芦丁对果糖胺的抑制作用具有剂量依赖关系，芦丁浓度在 0.25 mmol/L 时，对果糖胺抑制率为 12.29%，在 1 mmol/L 时抑制率为 28.23%，对果糖胺的抑制率趋于稳定。文献结果与本研究结果相似，说明含白番茄提取物的组合物对果糖胺具有明显的抑制作用并具有一定的剂量依赖性。

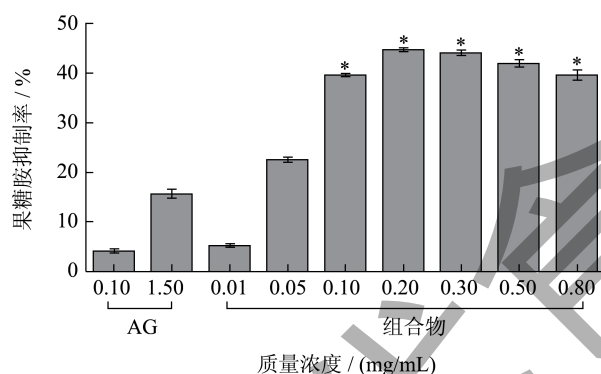


图 1 含白番茄提取物的组合物对果糖胺的抑制活性

Fig.1 The inhibitory activity of the Lumenato extract complex on fructosamine ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

注：\* 代表与 AG 1.5 mg/mL 相比，差异具有统计学意义； $P < 0.05$ 。

## 2.2 含白番茄提取物的组合物对活性二羰基化合物形成的影响

含白番茄提取物的组合物对活性二羰基化合物结果如图 2 所示。组合物对活性二羰基化合物的抑制率明显优于 AG，AG 在 0.1 mg/mL 和 1.5 mg/mL 时的抑制率分别为 6.68% 和 14.25%。而组合物质量浓度从 0.01 mg/mL 升到 0.2 mg/mL 时，对活性二羰基化合物的抑制率从 6.30% 到 19.22%，然而当其质量浓度大于 0.1 mg/mL 时，对活性二羰基化合物的抑制率提升不明显。相较于对果糖胺的抑制率，组合物对活性二羰基化合物生成的抑制并不显著，这

可能与活性二羰基化合物具有比还原糖更高的反应性有关<sup>[26]</sup>。Zeng 等<sup>[9]</sup>的研究表明，高良姜素对活性二羰基化合物生成的抑制率优于相同浓度的 AG，且抑制能力随高良姜浓度的增加而增加。与文献报道的结果相似，本实验的组合物对活性二羰基化合物的抑制率远优于 AG 并呈一定的剂量相关关系，说明组合物对活性二羰基化合物具有较强的抑制能力。

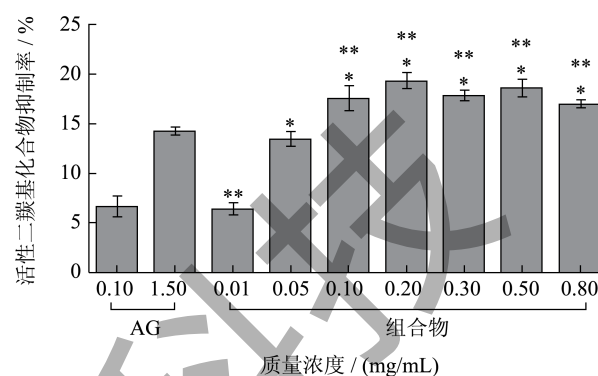


图 2 含白番茄提取物的组合物对活性二羰基化合物的抑制活性

Fig.2 The inhibitory activity of the Lumenato extract complex on dicarbonyls ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

注：\* 为与 AG 0.1 mg/mL 相比，差异具有统计学意义；\*\* 代表与 AG 1.5 mg/mL 相比，差异具有统计学意义； $P < 0.05$ 。

## 2.3 含白番茄提取物的组合物对荧光性 AGEs 形成的影响

AGEs 可在各种器官中积累，并与多种代谢性疾病相关，因此，减少 AGEs 的摄入和产生对疾病的预防有重要意义。如图 3 所示，组合物对 AGEs 抑制率随着质量浓度的增加而提高，呈现出正相关。AG 在质量浓度为 1.5 mg/mL 时对荧光性 AGEs 抑制率为 65.94%，而组合物对荧光性 AGEs 具有良好的抑制率，且远优于 AGEs 抑制剂 AG。在 0.05 mg/mL 的质量浓度下，对 AGEs 的抑制率达 47.13%，并在 0.3 mg/mL 的质量浓度下对 AGEs 的抑制率达到最大值，为 69.28%。同样的，Błaszczak 等<sup>[27]</sup>研究发现，在 BSA-葡萄糖模型中，不同品种的番茄提取物都以剂量依赖性方式抑制 AGEs 的形成 ( $IC_{50}$ : 7.20~27.00 mg/mL)。此外，Lavelli 等<sup>[28]</sup>研究表明，向食品番茄泥中添加葡萄皮纤维可显著增强番茄泥对 AGEs 抑制作用。本实验制备的组合物表现出比番茄提取物更好的抗 AGEs 活性，说明组合物中有更多的活性成分在非酶糖基化反应中修饰氨基或羧基。从实验结果表明，组合物对晚期阶段的抑制能力强于早期和中期，由此可

以推断组合物主要阻断 BSA 的交联,以防止在最后阶段形成 AGEs<sup>[9]</sup>。

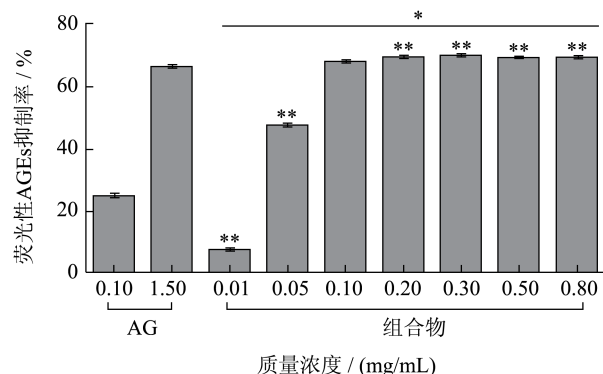


图3 含白番茄提取物的组合物对荧光性 AGEs 的抑制活性

Fig.3 The inhibitory activity of the Lumenato extract complex on AGEs ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

注: \* 为与 AG 0.1 mg/mL 相比,差异具有统计学意义;  
\*\* 代表与 AG 1.5 mg/mL 相比,差异具有统计学意义;  $P < 0.05$ 。

## 2.4 自由基清除率

活性氧 (ROS), 包括超氧阴离子自由基 ( $O_2^{\cdot-}$ )、过氧化氢 ( $H_2O_2$ )、羟基自由基 ( $OH^{\cdot}$ ) 等, 正常量的 ROS 维持机体的生理功能<sup>[29]</sup>, 然而过量的 ROS 会间接或直接造成细胞损伤, 与糖尿病、心血管疾病等疾病有关<sup>[29,30]</sup>。ROS 和糖基化之间存在复杂的联系。研究表明, 游离的或与蛋白质结合的葡萄糖、果糖等醛类化合物可发生自氧化反应, 产生促进 AGEs 形成的自由基和其他活性中间体<sup>[31]</sup>。在糖基化早期阶段, 还原糖与氨基酸或蛋白质结合形成不稳定的希夫碱化合物和自由基 (如  $O_2^{\cdot-}$ 、 $OH^{\cdot}$ ), 而自由基会促进 Amadori 产物 (果糖胺等) 的生成, 这一阶段的反应是可逆的<sup>[2,31]</sup>。到糖基化中期, 希夫碱化合物和 Amadori 产物会在自由基的催化下形成多种活性羰基化合物, 进而加速 AGEs 的形成<sup>[31]</sup>。此外, AGEs 也能催化自由基的产生<sup>[32]</sup>。因此, 清除  $O_2^{\cdot-}$ 、 $OH^{\cdot}$  等自由基, 以减轻氧化应激, 减少 Amadori 产物或活性羰基化合物的产生是重要的抗糖基化策略<sup>[2,9]</sup>。因此, 本研究对白番茄组合物的自由基清除能力进行评价。从图 4 可知, 含白番茄提取物的组合物和 Vc 对  $O_2^{\cdot-}$  清除率随着质量浓度的增加而增加。组合物在 1 mg/mL 开始, 对  $O_2^{\cdot-}$  有较强的清除能力 (59.94%), 但低于相同质量浓度的 Vc (69.68%), 在 2 mg/mL 时对超氧阴离子自由基的清除率达到最大值为 66.06%。赵娟娟等<sup>[33]</sup>研究结果表明, 番茄红素对  $O_2^{\cdot-}$  清除率具有剂量

依赖关系, 并且当质量浓度高于 0.5 mg/mL 时, 质量浓度的改变对清除率的影响较小。此外, Liu 等<sup>[34]</sup>对六种不同产地的余甘子提取物的抗氧化性能进行评价, 结果发现, 六种余甘子提取物对  $O_2^{\cdot-}$  有较强的清除能力, 并且清除能力与质量浓度呈一定的正相关性, 均能具有较强的  $O_2^{\cdot-}$  清除能力, 并与质量浓度呈一定的正相关性, 表明组合物可以有效地清除  $O_2^{\cdot-}$ 。

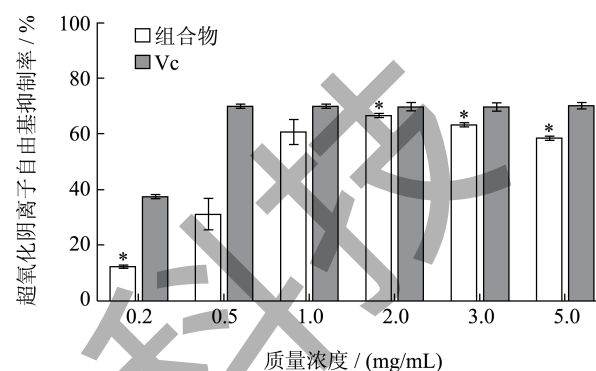


图4 含白番茄提取物的组合物  $O_2^{\cdot-}$  清除能力

Fig.4 The scavenging rate of the Lumenato extract complex on  $O_2^{\cdot-}$  ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

注: \* 代表与 0.2 mg/mL 的 Vc 相比, 具有显著性差异;  $P < 0.05$ 。

如图 5 所示, 含白番茄提取物的组合物对羟基自由基和 ABTS<sup>+</sup> 自由基有较强的清除能力, 清除率随着质量浓度的增加而增加。对于羟基自由基, 组合物在较低质量浓度时清除率弱于 Vc, 在 1 mg/mL 时的清除能力达到 93.11% (\* 代表与 0.1 mg/mL 的 Vc 相比, 具有显著性差异;  $P < 0.05$ )。对于 ABTS<sup>+</sup> 自由基, 组合物在 1 mg/L 时清除率为 11.71% 与相同质量浓度的 Vc 清除率相近 (10.36%), 随着质量浓度的增大, 组合物对 ABTS<sup>+</sup> 自由基抑制率的增速低于 Vc。在 50 mg/L 时组合物对 ABTS 的清除率为 80.25%, 而 Vc 的清除率为 99.83%。赵娟娟<sup>[33]</sup>研究发现, 番茄红素对  $OH^{\cdot}$  自由基清除率呈现一定的剂量依赖关系。Li 等<sup>[35]</sup>研究表明, 番茄多糖对 ABTS<sup>+</sup> 自由基抑制率具有一定的剂量依赖关系。此外, Li 等<sup>[36]</sup>研究结果表明, 余甘子多糖对  $O_2^{\cdot-}$  和  $OH^{\cdot}$  自由基有较好的清除能力, 并且与质量浓度呈一定的正相关性。组合物对  $O_2^{\cdot-}$  和  $OH^{\cdot}$  具有较好的清除能力并且清除能力具有质量浓度依赖关系。综上所述, 本实验制备的组合物对  $O_2^{\cdot-}$ 、 $OH^{\cdot}$  和 ABTS<sup>+</sup> 自由基均表现较好的清除能力。



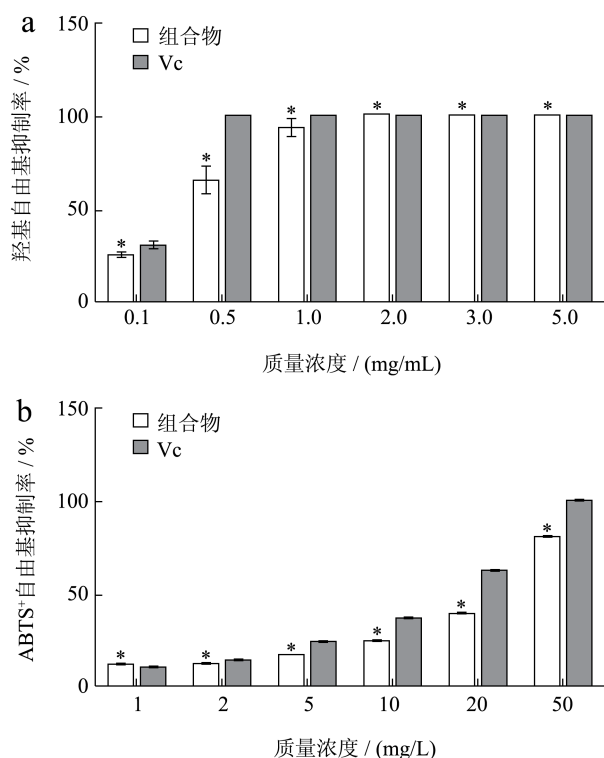


图5 含白番茄提取物的组合物羟基自由基 (a) 和  $\text{ABTS}^{\cdot+}$  自由基 (b) 清除能力

Fig.5 The scavenging rate of the Lumenato extract complex on  $\cdot\text{OH}$  (a) and  $\text{ABTS}^{\cdot+}$  (b) ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

注: \* 代表与 1 mg/L 的 Vc 相比, 具有显著性差异,  $P < 0.05$ 。

## 2.5 含白番茄提取物的组合物对MGO毒性减弱作用

MGO 是一种具有高度反应性的二羰基化合物, 是最有效的糖基化剂之一, 其很容易与蛋白质和 DNA 反应, 形成 AGEs<sup>[37]</sup>。如图 6 所示在实验质量浓度内, 含白番茄提取物的组合物能显著提高 HepG2 细胞活力。因此, 本研究检测实验质量浓度范围内含白番茄提取物的组合物是否能减轻 MGO 诱导的细胞毒性。如图 7 所示, 组合物和 3 mmol/L 的丙酮醛共培养 HepG2 细胞 24 h 后, 与模型组 (67.21%) 相比, 白番茄提取物组合物可显著减轻丙酮醛的细胞毒性, 在 150 mg/L 时, 细胞活力为 91.54%, 在 300 mg/L 时为 100.19%。Navarro 等<sup>[38]</sup>研究表明, 橄榄叶提取物可减弱 MGO 诱导的肝细胞羰基应激模型中蛋白质羰基化和肝细胞系中 AGEs 的形成。此外, Chen 等<sup>[39]</sup>研究表明, 余甘子提取物具有改善 MGO 诱导的 3T3-L1 细胞炎症、葡萄糖摄取和脂质积累的效果。表明含白番茄提取物的组合物对 MGO 引起的细胞毒性具有明显改善作用。

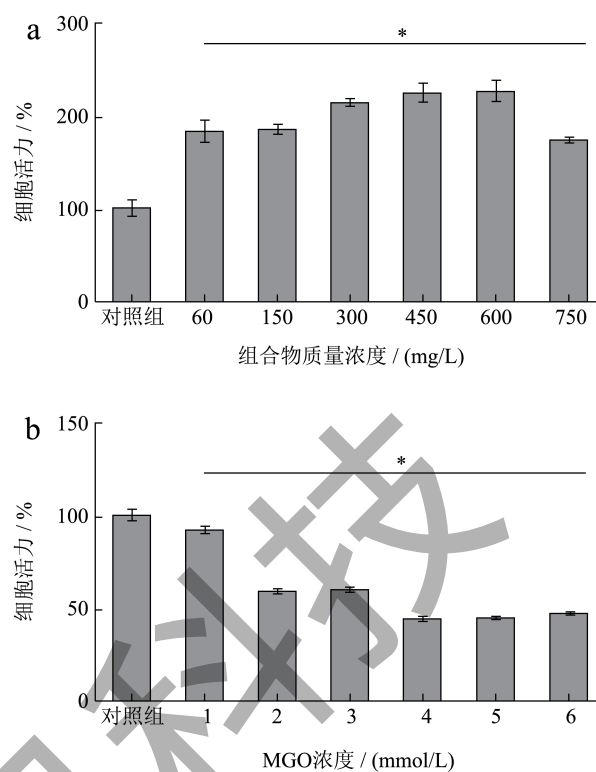


图6 含白番茄提取物的组合物和 MGO 对 HepG2 细胞活力的影响

Fig.6 Effect of the Lumenato extract complex and MGO on HepG2 cell viability ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )

注: \* 代表对照组相比, 具有显著性差异,  $P < 0.05$ 。

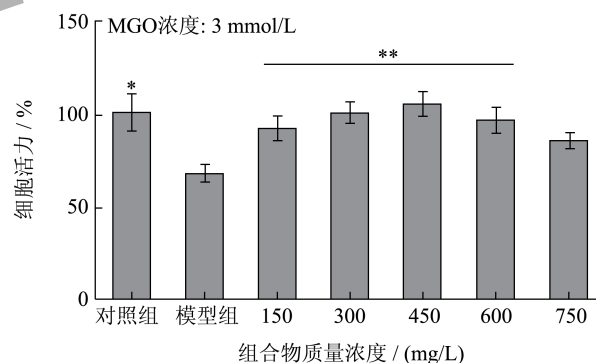


图7 含白番茄提取物的组合物减轻 MGO 诱导的细胞毒性作用  
Fig.7 The Lumenato extract complex reduces MGO induced cytotoxicity ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )

注: \* 代表模型组与对照组相比, 具有显著性差异,  $P < 0.05$  ;

\*\* 代表与模型组相比, 具有显著性差异,  $P < 0.05$ 。

## 2.6 对小鼠衰老的影响

实验初期各组小鼠行为活跃, 毛色正常, 进食量大, 反抗能力强, 难以抓取, 随着实验进行, 模型组小鼠与正常组小鼠相比, 活动量减少, 体质量增长变缓。而 FG 组小鼠活力恢复, 活动量逐渐增

加, 体质量增长恢复正常。体质量结果如图 8 所示。肝脏病理切片如图 9 所示, 正常组小鼠肝脏肝索排列较为整齐, 肝细胞围绕中央静脉呈放射状排列且细胞形态正常, 未见明显变性坏死, 肝窦结构正常, 未见明显病理改变。模型组小鼠肝脏肝索排列较为紊乱, 出现肝细胞变性, 可见较明显的边缘光滑的圆形脂滴, 并且肝细胞染色不均匀, 细胞胞质的嗜碱性增强。与模型组相比, FG 组肝组织肝细胞形态正常, 肝窦结构正常, 病理改变减轻。由图 10 可知, D- 半乳糖干预导致小鼠肝组织中 T-SOD 含量降低 (28.18 U/mg prot), 而组合物恢复了小鼠肝组织中 T-SOD 水平 (42.01 U/mg prot) (\* 代表与模型组相比, 具有显著性差异,  $P<0.05$ )。Wang 等<sup>[40]</sup>的研究表明, 番茄红素可通过下调衰老相关基因, 增加抗氧化酶 SOD 和谷胱甘肽的活性, 减弱 D- 半乳糖诱导的小鼠认知功能障碍, 表明含白番茄提取物的组合物对 D- 半乳糖诱导的小鼠衰老有一定的保护作用。

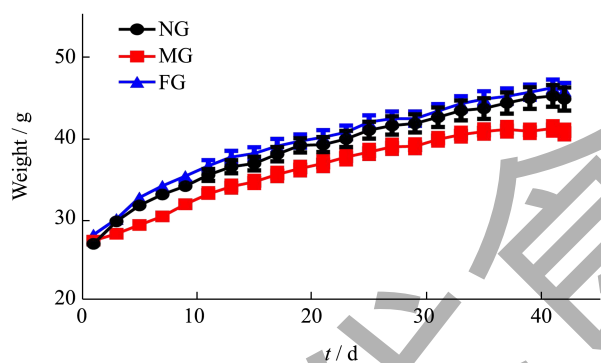


图 8 组合物对衰老模型小鼠体质量的影响

Fig.8 Effect of complex on body weight of mice ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=10$ )

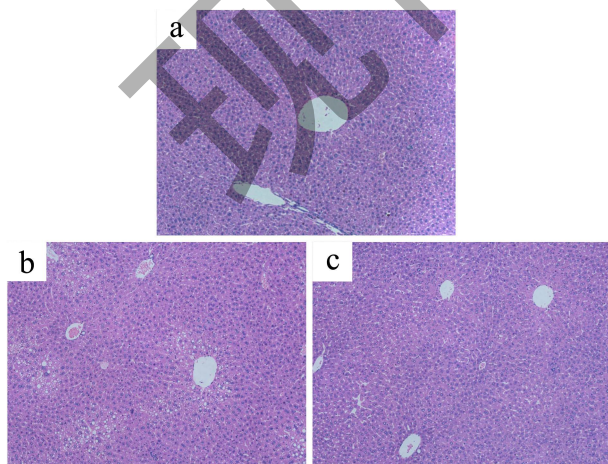


图 9 小鼠肝脏组织病理切片 (100×)

Fig.9 Pathological section of liver tissue (100×)

注: (a) NG; (b) MG; (c) FG。

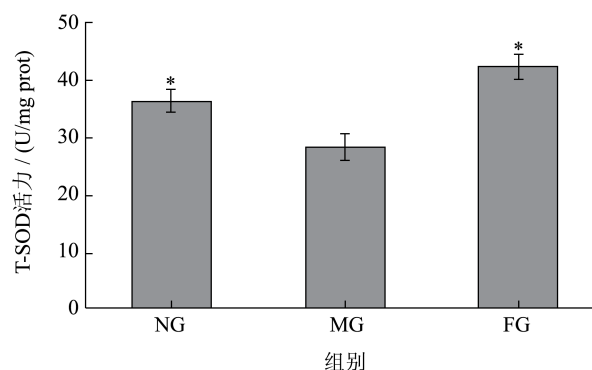


图 10 小鼠肝脏组织中 T-SOD 水平

Fig.10 T-SOD levels in mouse liver tissue ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=10$ )

### 3 结论

本研究采用 BSA- 果糖模型评估含白番茄提取物的组合物对蛋白质非酶糖基化的影响。通过对模型中果糖胺 (前期阶段产物)、活性二羰基化合物 (中期阶段产物) 和荧光性 AGEs (末期阶段产物) 的检测, 系统性评价含白番茄提取物的组合物抗糖基化特性。并通过  $O_2^{\cdot-}$  清除率、ABTS<sup>+</sup> 清除率和羟基自由基清除率评价组合物的抗氧化能力。实验结果表明组合物对果糖胺和荧光性 AGEs 具有较好的抑制作用。从整体上看, 含白番茄提取物的组合物抗糖基化作用存在一定的剂量依赖趋势, 并且与抗糖化药物氨基胍相比组合物具有更好的抗糖化作用。本研究含白番茄提取物的组合物表现出良好的抗氧化能力, 具有剂量依赖关系, 且清除能力接近相同剂量的 Vc。抗氧化化合物通过清除自由基及抑制活性羰基化合物的形成等途径在不同程度上抑制糖基化过程, 因此抗氧化也是抑制蛋白质糖基化的策略之一。因此, 组合物的抗糖基化能力与抗氧化能力具有一定的相关性。

本研究选用 HepG2 细胞为模型, 研究组合物对 MGO 毒性减弱作用。并通过建立小鼠衰老模型评价组合物的抗衰老作用。实验结果表明, 含白番茄提取物的组合物对细胞没有毒性, 并且组合物能明显的减轻 MGO 诱导的细胞死亡 ( $P<0.05$ )。并且动物实验结果, 该组合物对 D- 半乳糖诱导的小鼠衰老引起的肝损伤具有一定的保护作用。

综上所述, 含白番茄提取物的组合物具有较好的抗糖基化、抗氧化能力, 且具有一定的抗衰老能力。

### 参考文献

[1] KHAN M, LIU H, WANG J, et al. Inhibitory effect of



- phenolic compounds and plant extracts on the formation of advance glycation end products: A comprehensive review [J]. Food Research International, 2020, 130: 108933.
- [2] YEH W J, HSIA S M, LEE W H, et al. Polyphenols with antiglycation activity and mechanisms of action: A review of recent findings [J]. Journal of Food and Drug Analysis, 2017, 25 (1): 84-92.
- [3] RUNGRATANAWANICH W, QU Y, WANG X, et al. Advanced glycation end products (AGEs) and other adducts in aging-related diseases and alcohol-mediated tissue injury [J]. Experimental & Molecular Medicine, 2021, 53 (2): 168-188.
- [4] OTT C, JACOBS K, HAUCKE E, et al. Role of advanced glycation end products in cellular signaling [J]. Redox Biology, 2014, 2: 411-429.
- [5] PIRILLO A, SVECLA M, CATAPANO A, et al. Impact of protein glycosylation on lipoprotein metabolism and atherosclerosis [J]. Cardiovascular Research, 2020, 117 (4): 1033-1045.
- [6] SHIRAKAMI T, YAMANAKA M, FUJIHARA J, et al. Advanced glycation end product accumulation in subjects with open-angle glaucoma with and without exfoliation [J]. Antioxidants, 2020, 9 (8): 755.
- [7] KHALID M, PETROIANU G, ADEM A. Advanced glycation end products and diabetes mellitus: Mechanisms and perspectives [J]. Biomolecules, 2022, 12 (4): 542.
- [8] SEONG S H, JUNG H A, CHOI J S. Discovery of flazin, an alkaloid isolated from cherry tomato juice, as a novel non-enzymatic protein glycation inhibitor *via in vitro* and *in silico* studies [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69 (12): 3647-3657.
- [9] ZENG L, DING H, HU X, et al. Galangin inhibits  $\alpha$ -glucosidase activity and formation of non-enzymatic glycation products [J]. Food Chemistry, 2019, 271: 70-79.
- [10] 陈燕萌,魏金兰,陈凤,等.假蒟叶多酚提取工艺及其抗氧化活性研究[J].中国食品添加剂,2023,34(2):76-84.
- [11] VAN VUUREN, S, VILJOEN, A. Plant-based antimicrobial studies-methods and approaches to study the interaction between natural products [J]. Planta Medica, 2011, 77 (11): 1168-1182.
- [12] VATTEM D A, LIN Y T, GHAEDIAN R, et al. Cranberry synergies for dietary management of *Helicobacter pylori* infections [J]. Process Biochemistry, 2005, 40 (5): 1583-1592.
- [13] CHEN J, SONG Y, ZHANG L. Lycopene/tomato consumption and the risk of prostate cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective studies [J]. Journal of Nutritional Science and Vitaminology, 2013, 59 (3): 213-223.
- [14] WU H T, CHEN J J. Heart rate variability behavior in young men after short-term carotenoid-containing supplementation [J]. Heliyon, 2023, 9 (3): e14102.
- [15] TARSHISH E, HERMONI K, SHARONI Y, et al. Effect of Lumenato oral supplementation on plasma carotenoid levels and improvement of visual and experiential skin attributes [J]. Journal of Cosmetic Dermatology, 2022, 21 (9): 4042-4052.
- [16] WANG S H, CHANG J C, POKKAEW R, et al. Modified fast procedure for the detection and screening of antiglycative phytochemicals [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59 (13): 6906-6912.
- [17] 吴夏青.儿茶素对糖苷酶和蛋白质非酶糖基化的抑制作用及机制研究[D].南昌:南昌大学,2019.
- [18] JOGLEKAR M M, BAVKAR L N, SISTLA S, et al. Effective inhibition of protein glycation by combinatorial usage of limonene and aminoguanidine through differential and synergistic mechanisms [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 99: 563-569.
- [19] LI X. Improved pyrogallol autoxidation method: a reliable and cheap superoxide-scavenging assay suitable for all antioxidants [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60 (25): 6418-6424.
- [20] 孙凯,蒋伟文.鼠衰老模型的建模方法概述[J].中华老年口腔医学杂志,2017,15(3):181-184.
- [21] MA H, LIU W, FROST L, et al. Glucitol-core containing gallotannins inhibit the formation of advanced glycation end-products mediated by their antioxidant potential [J]. Food & Function, 2016, 7 (5): 2213-2222.
- [22] ADISAKWATTANA S, THILAVECH T, SOMPONG W, et al. Interaction between ascorbic acid and gallic acid in a model of fructose-mediated protein glycation and oxidation [J]. Electronic Journal of Biotechnology, 2017, 27: 32-36.
- [23] PENG X, HU X, LIU K, et al. Exploring inhibitory effect and mechanism of hesperetin-Cu (II) complex against protein glycation [J]. Food Chemistry, 2023, 416: 135801.
- [24] KIHOT, USUI S, HIRANO K, et al. Tomato paste fraction inhibiting the formation of advanced glycation end-products [J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2014, 68 (1): 200-205.
- [25] ZHOU Y, DUAN H, CHEN J, et al. The mechanism of *in vitro* non-enzymatic glycosylation inhibition by Tartary buckwheat's rutin and quercetin [J]. Food Chemistry, 2023, 406: 134956.
- [26] AKHTER F, CHEN D, AKHTER A, et al. Age-dependent accumulation of dicarbonyls and advanced glycation endproducts (AGEs) associates with mitochondrial stress [J]. Free Radical Biology and Medicine, 2021, 164: 429-438.

- [27] BLASZCZAK W, JEŽ M, SZWENGIEL A. Polyphenols and inhibitory effects of crude and purified extracts from tomato varieties on the formation of advanced glycation end products and the activity of angiotensin-converting and acetylcholinesterase enzymes [J]. Food Chemistry, 2020, 314: 126181.
- [28] LAVELLIV, SRI HARSHA P S C, TORRI L, et al. Use of winemaking by-products as an ingredient for tomato puree: The effect of particle size on product quality [J]. Food Chemistry, 2014, 152: 162-168.
- [29] SCIALÒ F, FERNÁNDEZ-AYALA D J, SANZ A. Role of mitochondrial reverse electron transport in ROS signaling: Potential roles in health and disease [J]. Frontiers in Physiology, 2017, 8: 428.
- [30] VOLPE C M, VILLAR-DELFINO P H, DOS ANJOS P M, et al. Cellular death, reactive oxygen species (ROS) and diabetic complications [J]. Cell Death & Disease, 2018, 9 (2): 119.
- [31] WU C H, HUANG S M, LIN J A, et al. Inhibition of advanced glycation endproduct formation by foodstuffs [J]. Food & Function, 2011, 2 (5): 224-234.
- [32] NAGAI R, IKEDA K, HIGASHI T, et al. Hydroxyl radical mediates N-(carboxymethyl)lysine formation from Amadori product [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1997, 234 (1): 167-172.
- [33] 赵娟娟. 番茄红素的抗氧化活性研究[J]. 食品科技, 2010, 35: 62-65.
- [34] LIU X, ZHAO M, WANG J, et al. Antioxidant activity of methanolic extract of emblica fruit (*Phyllanthus emblica* L.) from six regions in China [J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2008, 21 (3): 219-228.
- [35] LI Q, LI J, LI H, et al. Physicochemical properties and functional bioactivities of different bonding state polysaccharides extracted from tomato fruit [J]. Carbohydrate Polymers, 2019, 219: 181-190.
- [36] LI Y, CHEN J, CAO L, et al. Characterization of a novel polysaccharide isolated from *Phyllanthus emblica* L. and analysis of its antioxidant activities [J]. Journal of Food Science and Technology, 2018, 55 (7): 2758-2764.
- [37] ALLAMAN I, BELANGER M, MAGISTRETTI P J. Methylglyoxal, the dark side of glycolysis [J]. Frontiers in Neuroscience, 2015, 9: 23.
- [38] NAVARRO M, MORALES J, RAMOS S. Olive leaf extract concentrated in hydroxytyrosol attenuates protein carbonylation and the formation of advanced glycation end products in a hepatic cell line (HepG2) [J]. Food & Function, 2017, 8 (3): 944-953.
- [39] CHEN H C, TUNG Y T, CHEN S Y, et al. Effect of *Phyllanthus emblica* L. fruit on improving regulation of methylglyoxal-induced insulin resistance in 3T3-L1 cells [J]. Journal of Food Bioactives, 2018, 4: 139-149.
- [40] WANG J, SHEN Y, LI M, et al. Lycopene attenuates D-galactose-induced cognitive decline by enhancing mitochondrial function and improving insulin signaling in the brains of female CD-1 mice [J]. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2023, 118: 109361.