

食品来源甲烯基哌啶醛刺激巨噬细胞产生 AGE 受体及其信号级联反应

吴嘉琪 欧仕益 郭鸿阳 黄才欢 欧隽滢 郑洁

(暨南大学焙烤食品安全粤港联合创新平台, 广东 广州 510632)

摘要: [目的] 甲烯基哌啶醛(FMDP)是氨基酸与甲醛和丙烯醛共同反应产生的新物质,在饼干中的含量为游离丙烯醛和甲醛含量的 40 倍以上。基于它与丙烯醛产生的 FDP-赖氨酸(一种晚期糖基化终末产物,AGE)结构相似,研究从刺激晚期糖基化终末产物受体(RAGE)的角度评估其潜在安全风险。[方法] 将甲醛、丙烯醛分别与丙氨酸、天冬酰胺和苏氨酸反应,制备出 3 种具有 5-甲酰基-3-亚甲基-3,6-二氢吡啶核心结构的化合物,即 FMDP。分离纯化后,采用不同浓度的 FMDP 培养巨噬细胞 RAW264.7,测定 FMDP 处理后 RAW264.7 细胞的细胞毒性、RAGE、蛋白组以及 Keap1-Nrf2 信号通路的表达水平。[结果] 与丙烯醛和甲醛相比,3 种 FMDP 的细胞毒性均显著降低。但与对照相比,FMDP 上调 RAW264.7 细胞中 RAGE 的表达,其中苏氨酸-FMDP 显示出最强的 RAGE 刺激能力;在 300 $\mu\text{g/mL}$ 暴露水平下,RAGE 表达增加了 60%。蛋白质组学分析表明,丙氨酸-FMDP、天冬酰胺-FMDP 和苏氨酸-FMDP 分别存在 69,59,111 个差异蛋白。GO 富集分析表明,FMDP 增加了诱导氧化应激的蛋白质的表达。蛋白质印迹分析显示,FMDP 通过激活 Keap1-Nrf2 信号通路诱导氧化应激。FMDP 提高了 Nrf2 水平,促进了 Keap1 与 Nrf2 的解离,并增加了氧化还原酶(如 NQO1、HO-1 和 GCLC)的表达。[结论] 食品中产生的新物质甲烯基哌啶醛可以刺激 RAGE,诱导氧化应激,需要关注其潜在健康风险。

关键词: 丙烯醛; 甲醛; 氨基酸; 甲烯基哌啶醛; 晚期糖基化终末产物受体; 氧化应激; Keap1-Nrf2 信号通路

5-Formyl-3-methylene-3,6-dihydropyridines formed in foods activate RAGE-dependent signaling cascades in RAW264. 7 cells

Wu Jiaqi Ou Shiyi Guo Hongyang Huang Caihuan Ou Juanying Zheng Jie

(Guangdong-Hong Kong Joint Innovation Platform for the Safety of Bakery Products, Jinan University, Guangzhou, Guangdong 510632, China)

Abstract: [Objective] 5-Formyl-3-methylene-3,6-dihydropyridine (FMDP) is a novel compound derived from the reaction of amino acids with formaldehyde (FA) and acrolein (ACR), and its content in biscuits has been reported to be more than 40 times higher than that of free acrolein and formaldehyde. Given the structural similarity to FDP-lysine, an advanced glycation end product (AGE) derived from acrolein, this study aims to evaluate the potential safety risk of FMDPs by assessing their ability to stimulate the receptor for advanced glycation end products (RAGE). [Methods] Three FMDP compounds, each possessing a 5-formyl-3-methylene-3,6-dihydropyridine core structure, are synthesized by reacting formaldehyde and acrolein with alanine, asparagine, and threonine, respectively. Following purification, RAW264.7 macrophages are cultured with various concentrations of each FMDP compound. Cytotoxicity, RAGE expression, proteomic profiles, and the Keap1-Nrf2 signaling pathway are subsequently evaluated. [Results] All three FMDP compounds exhibit significantly lower

基金项目: 国家自然科学基金(编号:32372242,32472457,32372450);广东省教育厅(编号:2024GCZX011);中山市传统优势产业重大科技专项(编号:2022AJ001)

通信作者: 欧仕益(1963—),男,暨南大学教授,博士。E-mail:tosy@jnu.edu.cn

收稿日期: 2026-04-10 **改回日期:** 2026-07-30

引用格式: 吴嘉琪,欧仕益,郭鸿阳,等. 食品来源甲烯基哌啶醛刺激巨噬细胞产生 AGE 受体及其信号级联反应[J]. 食品与机械, 2026,42(8):8-17.

Citation: Wu Jiaqi, Ou Shiyi, Guo Hongyang, et al. 5-Formyl-3-methylene-3,6-dihydropyridines formed in foods activate RAGE-dependent signaling cascades in RAW264.7 cells[J]. Food & Machinery, 2026, 42(8): 8-17.

cytotoxicity than acrolein and formaldehyde. However, FMDP treatment upregulates RAGE expression in RAW264.7 cells relative to the control group, with threonine-derived FMDP showing the strongest stimulatory effect, increasing RAGE expression by 60% at an exposure concentration of 300 $\mu\text{g/mL}$. Proteomic analysis identifies 69, 59, and 111 differentially expressed proteins in response to alanine-, asparagine-, and threonine-derived FMDP, respectively. Gene Ontology (GO) enrichment analysis indicates that FMDPs increase the expression of proteins associated with oxidative stress. Western blotting assays reveal that FMDPs induce oxidative stress through activation of the Keap1-Nrf2 signaling pathway, as evidenced by elevated Nrf2 levels, enhanced dissociation of Keap1 from Nrf2, and increased expression of oxidoreductases, including NQO1, HO-1, and GCLC. [Conclusion] The food-borne compounds FMDPs can stimulate RAGE and induce oxidative stress, highlighting the need for attention to their potential health risks.

Keywords: acrolein; formaldehyde; amino acid; 5-formyl-3-methylene-3,6-dihydropyridine; receptor for advanced glycation end products; oxidative stress; Keap1-Nrf2 signaling pathway

甲醛是 A 类致癌物,丙烯醛是高毒物质,两者广泛存在于食品、环境(气溶胶)、包装材料中^[1-2]。在食品加工过程中,它们还可转化为其他有毒化合物,如杂环胺^[3]。此外,甲醛和丙烯醛在活性氧形成、脂质过氧化和 DNA 损伤等方面表现出协同效应,产生更强的毒性效应^[4]。因此,采用有效措施减少甲醛和丙烯醛的暴露水平具有重要意义。

先前的研究表明,氨基酸对有害醛类,如甲醛^[5]、丙烯醛^[6]和其他活泼羰基化合物(RCS)^[7-8]具有消除能力。RCS 共存于食品中,2 种以上的 RCS 可同时与氨基酸反应,产生结构完全不同于与单一醛类反应形成的化合物^[8-10]。更需引起关注的是:氨基酸与两种 RCS 的反应效率高于与单一 RCS 的反应,在食品中形成的产物含量更高。Hu 等^[8]发现,甘氨酸对单一丙酮醛的清除能力较低,但添加甲醛后,对丙酮醛的消除效率增加 4 倍多,且产生由甲醛和丙酮醛共同反应的产物甲基咪唑盐。甲醛、丙烯醛与氨基酸反应则产生甲基烯吡啶醛(FMDP)^[9]。在饼干中检测到高达 4 450 $\mu\text{g/kg}$ 的咪唑盐和 880 $\mu\text{g/kg}$ 的丝氨酸-FMDP,其含量为饼干中游离甲醛或丙烯醛的 40 倍以上^[9-10]。这些研究表明,食品在热加工过程中形成的甲醛和丙烯醛大部分转化为新产物,如咪唑盐、甲基咪唑盐类和 FMDP 等。然而,这些新发现的化合物在食品中是否存在安全风险仍未知。

天冬酰胺是小麦和马铃薯面粉中游离氨基酸含量最高的氨基酸^[11]。丙氨酸广泛应用于食品添加剂、药品、保健品和表面活性剂等,可同步抑制曲霉中多种有害物形成^[12-13];苏氨酸是一种侧链含有羟基的氨基酸,其形成的 FMDP 在胃、肠细胞中表现较高细胞毒性^[9]。因此,研究选择天冬酰胺、丙氨酸和苏氨酸制备 FMDP。

由于 FMDP 的结构与 FDP-赖氨酸(丙烯醛产生的典型 AGE)相似,研究主要关注 FMDP 与晚期糖基化终末产物受体(RAGE)的结合及其随后的级联反应,包括氧化应激、Keap1-Nrf2-ARE 信号通路的激活以及氧化还原酶(如 NQO1、HO-1 和 GCLC)的表达。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

羧甲基赖氨酸(CML):99%,上海源叶生物科技有限公司;

甲醛(37%水溶液)、丙烯醛(95%水溶液)、L-丙氨酸、L-天冬酰胺、L-苏氨酸:分析纯,北京百灵威科技有限公司;

氘代水:美国 Cambridge Isotope Laboratories 公司;

流动相溶剂:色谱纯,德国默克公司;

巨噬细胞 RAW264.7 专用培养基、RAW264.7 细胞:武汉普诺赛生命科技有限公司;

BCA 试剂盒、一抗、二抗:上海碧云天生物技术有限公司;

Western Blot 化学发光试剂盒:美国 Thermo Scientific 公司;

高效液相色谱:LC-20AT 型,日本岛津公司;

高分辨质谱仪:X500R QTOF 型,美国 SCIEX 公司;

核磁共振仪:600 MHz Avance III 型,瑞士布鲁克公司;

三重四极杆高效液相色谱—串联质谱仪:HPLC-MS/MS 8045 型,日本岛津公司;

高效液相色谱(HPLC):Easy nLC 1200 型,美国赛默飞公司;

酶标仪:EPOCH2 型,美国 Bio-Tek 公司;

真空冷冻干燥机:Scientz-10N 型,宁波新芝生物科技有限公司;

高速离心机:HC-2061 型,安徽中佳科学仪器有限公司;

CO₂细胞培养箱:HF151UV 型,力康生物医疗科技有限公司;

电泳仪:PowerPac™ Basic 型,美国 Bio-Rad 公司;

化学发光成像仪:ChemiDoc™ Touch 型,美国 Bio-Rad 公司;

快速染色脱色仪:eStain® L1 型,南京金斯瑞生物科技股份有限公司;

超高分辨液质联用仪:Orbitrap Exploris 480 型,美国 Thermo Fisher Scientific 公司。

1.2 FMDP 的制备、分离纯化和结构表征

按 Ou 等^[9]的方法,分别将丙氨酸(Ala)、天冬酰胺(Asn)和苏氨酸(Thr)与丙烯醛、甲醛一起反应,产物采用反相硅胶层析柱(ODS 填料)分离纯化,HPLC 鉴定目标产物纯度。取纯度>98%的馏分,旋转蒸发去除溶剂,冷冻干燥(预冻温度为-50℃;升华干燥阶段真空度为5 Pa)获得固体样品。

采用三重四极杆高效液相色谱—串联质谱仪(HPLC-MS/MS)、高分辨质谱仪(HRMS)和核磁共振仪(NMR)对互作产物 Asn-FMDP 进行结构表征。取适量冻干样品溶于去离子水中,经 0.22 μm 有机微孔滤膜过滤,采用 HPLC-MS/MS 确定互作产物的相对分子质量碎片离子信息;采用 HRMS(离子源为电喷雾离子源,扫描范围 m/z 50~1 000)获得精确相对分子质量和分子式。

NMR 分析:取 20 mg 冻干后样品溶解于 500 μL 氘代水中,在室温条件下测定目标物质的氢谱¹H、碳谱¹³C、DEPT-135 谱、H-H COSY、HSQC 和 HMBC 谱,进一步确定产物的化学结构。

1.3 分子对接

用 Chemdraw 画出 3 种甲烯基嘧啶醛和 FDP-Lys 的三维分子结构,进行电荷调整,构象采样后得到小分子的 pdbqt 文件;RAGE 的 V 结构域来自 RCSB 蛋白质数据库(www.rcsb.org/pdb),对其去除水分子和无关杂原子后,进行加氢、计算电荷等处理,输出蛋白质 pdbqt 文件。将 FMDP、FDP-Lys 等小分子信息与蛋白质文件 pdbqt 导入软件,使用 AutoDock 4.2 软件进行分子对接试验,选择结合亲和力最强的对接结果进行分析,并将对接结果导入 Pymol 进行可视化处理。

1.4 FMDP 在 RAW264.7 细胞中细胞毒性的测定

将 RAW264.7 细胞(3 000 个细胞/孔)接种于 96 孔板中,在 37℃ 细胞培养箱中培养。细胞完全贴壁后,用 100 μL 不同浓度的 FMDP、甲醛和丙烯醛处理:FMDP(20~360 μmol/L)、甲醛(20~180 μmol/L)、丙烯醛(3~70 μmol/L)以及甲醛和丙烯醛的组合(每种醛浓度范围为 5~45 μmol/L)。采用等体积、不含任何供试物质的完全培养基(含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素—链霉素双抗的专用培养基)作对照,重复 3 次。培养 24 h 后,用 PBS 洗涤细胞以去除残留的 FMDP 或醛类。每孔加入 MTT 培养基(5 mg/mL)后,在 37℃ 下孵育 4 h;去除 MTT 培养基,立即加入 150 μL DMSO 以溶解甲臢晶体。使用酶标仪在

570 nm 处测量吸光度。细胞活力计算为处理组在 570 nm 处的吸光度与对照组吸光度的比值。使用 GraphPad Prism 8 软件测定和分析 IC₅₀ 值。

1.5 Western Blot 测定 RAGE 和 Keap1/Nrf2 通路的目标蛋白

将细胞(2×10^5 个/孔)接种于 6 孔板中,用 40 μmol/L 的甲醛、丙烯醛及 FMDP 处理 48 h。使用 RIPA 裂解缓冲液裂解细胞,BCA 蛋白质检测试剂盒测定总蛋白含量^[14]。将蛋白质样品(50 μg)在 10% SDS-PAGE 凝胶上电泳分离,并转移到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上。在室温下用 5% 脱脂牛奶封闭 2~3 h,将膜与一抗在 4℃ 下孵育过夜。回收一抗,用 TBST 缓冲液洗涤 3 次,按照抗体说明书加入适量二抗稀释液,孵育 1 h,再用 TBST 缓冲液洗涤 3 次。将条带置于暗箱中,滴加显影液显影。采用化学发光成像仪分析印迹,使用 ImageJ 软件分析条带灰度,并按照课题组先前描述的方法归一化至 GAPDH 或 β -actin^[14-15]。

1.6 蛋白质组学分析

将 RAW264.7 细胞(2×10^5 个/孔)接种于 6 孔板中,置于 37℃ 细胞培养箱中培养。细胞完全贴壁后,用 60 μmol/L 的 FMDP 处理 24 h。收获细胞,用 SDS 蛋白裂解缓冲液裂解以提取细胞蛋白。根据蛋白浓度,向每个蛋白样品中加入适量上样缓冲液,混合,95℃ 加热 5 min。25 000×g 离心 5 min,取 10 μL 上清液在 12% SDS 聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳。电泳结束后,在快速染色脱色仪中对凝胶进行染色和脱色 10 min,扫描凝胶图像。

用胰蛋白酶($m_{\text{蛋白酶}}:m_{\text{蛋白}}=1:20$)消化蛋白质,使用 TMT 标记试剂盒对蛋白样品进行标记,4℃ 下脱盐过夜,然后真空冷冻干燥(预冻温度为-50℃;升华干燥阶段真空度为 5 Pa)。随后,使用 HPLC 分离肽段。肽段使用超高分辨液质联用仪的纳升电喷雾离子源进行离子化,然后在 DDA(数据依赖采集)模式下检测。

仪器主要分析参数设置:离子源电压 1.9 kV;一级质谱扫描范围 m/z 350~1 600;分辨率 60 000;二级质谱起始 m/z 100;分辨率 15 000;采用“Turbo TMT”扫描模式;二级碎裂的母离子筛选条件为电荷 2+ 到 7+,峰强度超过 2×10^4 的强度排在前 30 的母离子。离子碎裂模式为 HCD,碎片离子在 Orbitrap 中进行检测。动态排除时间设定为 30 s。AGC 设置:一级 300%,二级 Standart。

1.7 生物信息学分析

原始质谱数据经过相应工具转换成“mgf”格式文件后,用蛋白质鉴定软件 Mascot 比对 NCBI 数据库搜索鉴定。采用质控分析来判断数据是否合格。数据合格后经过一定的筛选阈值,得到最终可信的蛋白质鉴定结果。随后使用 IQuant 软件进行 TMT 定量分析,从定量结果中

筛选出具有显著差异的蛋白。IQuant的工作流程包括以下步骤:蛋白质过滤、报告基团标签纯度校正、定量值归一化、缺失值补全、蛋白定量值计算、统计检验分析、最终结果展示。

根据重复试验的情况,定量重复性分析可判断定量数据质量是否达到标准。最后通过显著差异蛋白和作为背景参考的全体鉴定蛋白比较,利用超几何检验出显著富集的条目,来进行GO、Pathway功能注释和差异蛋白的GO、Pathway富集分析。

1.8 统计分析

对每个测试的结果进行统计学检验。使用方差分析(ANOVA)评估各组间和水平之间差异的显著性。随后进行Tukey检验,以鉴定与其他组存在显著差异的组($P < 0.05$)。所有数据以平均值±标准差(SD)表示,所有处理重复3次。使用ORIGIN LAB 8.5进行统计分析。

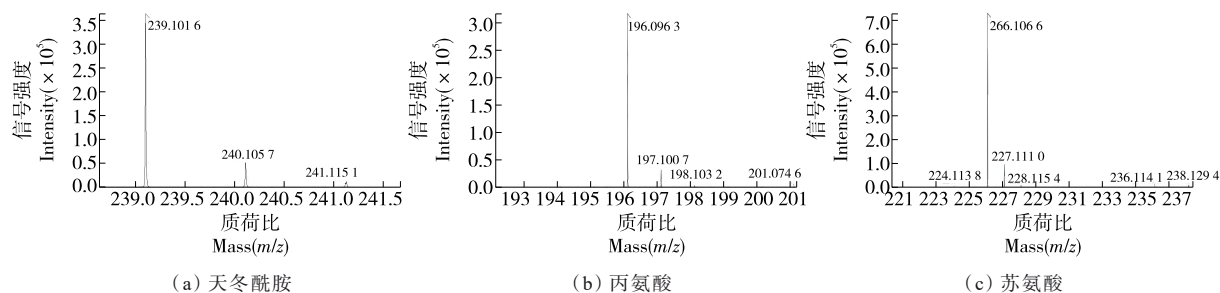


图1 天冬酰胺、丙氨酸和苏氨酸的FMDP产物的高分辨质谱图

Figure 1 High-resolution mass (HRMS) spectra of the purified FMDP products generated from asparagine, alanine, and threonine

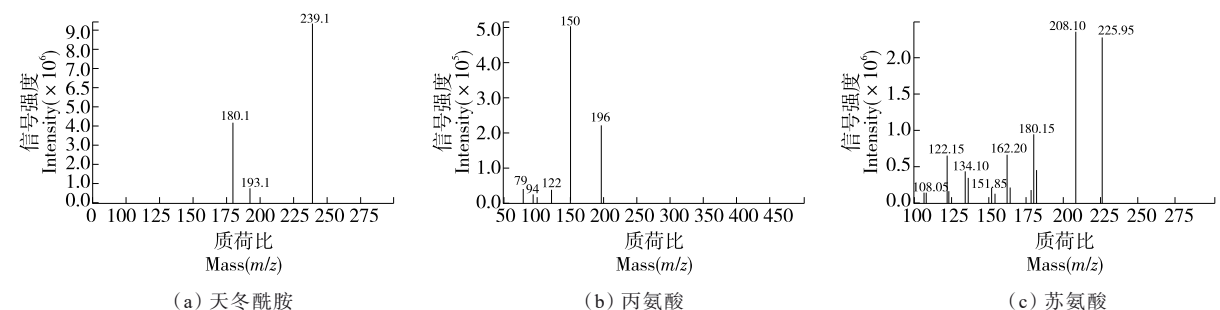


图2 天冬酰胺、丙氨酸和苏氨酸的FMDP产物的二级质谱图

Figure 2 Secondary mass spectra of the purified FMDP products generated from asparagine, alanine, and threonine

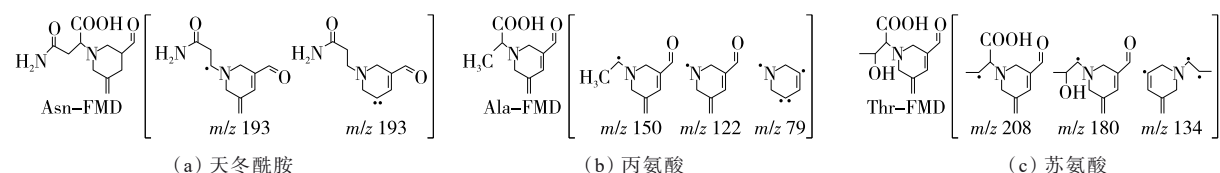


图3 天冬酰胺、丙氨酸和苏氨酸的FMDP产物的质谱峰—碎片结构对应图

Figure 3 MS/MS fragment assignment spectra of the purified FMDP products derived from asparagine, alanine, and threonine

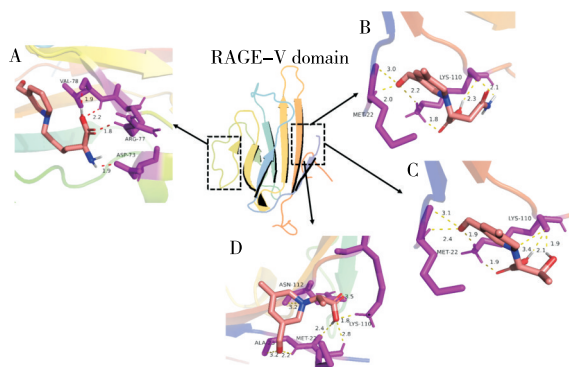
2 结果与分析

2.1 氨基酸与丙烯醛、甲醛反应产物的结构特征

使用HRMS、HPLC-MS/MS和NMR对纯化产物(纯度>98%)的结构进行表征,结果如图1~图6所示。天冬酰胺、丙氨酸和苏氨酸与甲醛和丙烯醛生成的互作产物具有5-甲酰基-3-亚甲基-3,6-二氢吡啶(FMDP)的核心结构。其核心结构与丙烯醛衍生的晚期糖基化终末产物—— N^{ϵ} -(3-甲酰基-3,4-脱氢吡啶基)赖氨酸(FDP-赖氨酸)相似,主要差异是六元环上多了一个甲基基(图3)。

2.2 FMDP与RAGE相互作用的分子对接模拟分析

FDP-赖氨酸是丙烯醛修饰蛋白质产生的一种晚期糖基化或脂质氧化终末产物(AGE/ALE),它可以与存在于人体各种细胞中的RAGE结合^[16]。AGE/ALE能激活NF- κ B等信号通路,促进炎症因子的释放,加剧细胞损伤和炎症,进一步促进动脉粥样硬化斑块的形成和肿瘤发



A. FDP-赖氨酸 B. Asn-FMDP C. Thr-FMDP D. Ala-FMDP

图7 分子模拟对接预测 FDP-赖氨酸、Asn-FMDP、Thr-FMDP和 Ala-FMDP与 RAGE 蛋白 V 结构域结合情况

Figure 7 Molecular docking simulation of the binding of FDP-Lysine, Asn-FMDP, Thr-FMDP, and Ala-FMDP to the V domain of RAGE protein

著大于静电相互作用。

2.3 FMDP对RAW264.7细胞毒性和RAGE表达的影响

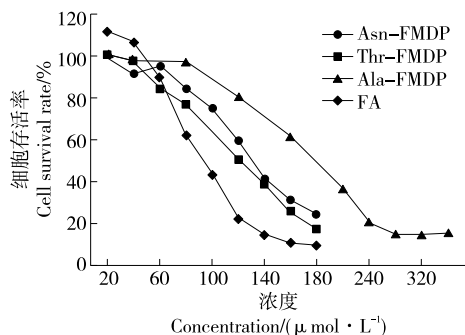
如图8所示,FMDP的形成显著降低了丙烯醛和甲醛在RAW264.7细胞中的细胞毒性。FMDP中的氨基酸种类也影响FMDP的细胞毒性:Ala-FMDP的细胞毒性($IC_{50}=179.5 \mu\text{mol/L}$)最低,其次是 Asn-FMDP ($IC_{50}=$

$131.3 \mu\text{mol/L}$)和 Thr-FMDP ($IC_{50}=117.6 \mu\text{mol/L}$)。Thr-FMDP的 IC_{50} 比 Ala-FMDP 低 34.5%,但比甲醛高 26%,比丙烯醛高 20 倍以上(图8)。

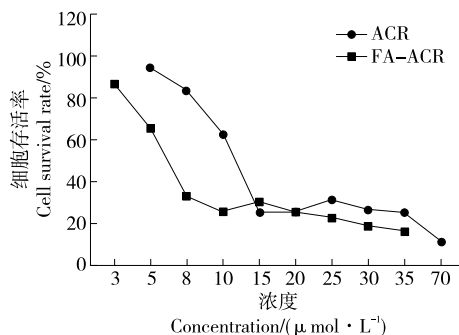
鉴于分子对接结果和细胞毒性试验揭示了该物质的潜在安全风险,研究进一步探讨了FMDP对RAGE蛋白在RAW264.7细胞中表达的影响。结果(图9和图10)表明,3种FMDP对RAGE表达的上调作用,与细胞毒性试验中观察到的细胞活力变化具有一致性。其中,Thr-FMDP表现出最强的RAGE刺激能力且呈剂量依赖性。当其质量浓度达到 $300 \mu\text{g/mL}$ 时,RAGE表达比对照增加了 60%,见图9(b)。

2.4 FMDP对RAW264.7细胞蛋白质组的影响

在RAW264.7细胞中共鉴定出 52 990 个肽段和 6 632 个可信蛋白(每个至少包含一个特异性肽段)。以 $FC>1.5$ 和多重假设检验校正后的错误发现率 <0.05 条件筛选出各比较组的蛋白差异情况如图11所示。与对照组相比,Ala-FMDP处理组有差异蛋白 67 个,上调 51 个,下调 16 个;Asn-FMDP处理组有差异蛋白 59 个,其中上调 48 个,下调 11 个;Thr-FMDP处理组有差异蛋白 111 个,上调 84 个,下调 27 个。由图12可知,3个处理组共有 38 个共同的差异表达蛋白,主要有钼辅因子硫化酶(MOCOS)、全反式视黄醇脱氢酶(ADH7)、血红素加氧酶1



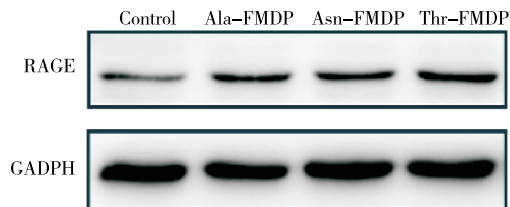
(a) Asn-FMDP、Thr-FMDP、Ala-FMDP 和 FA



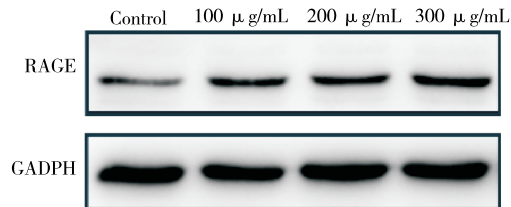
(b) ACR 和 FA-ACR

图8 不同浓度的FMDP、甲醛(FA)、丙烯醛(ACR)以及甲醛/丙烯醛组合(FA-ACR)对RAW264.7细胞活力的影响

Figure 8 Effects of different concentrations of FMDP products, formaldehyde (FA), acrolein (ACR), and the combination of FA and ACR (FA-ACR) on the viability of RAW264.7 cells



(a) Asn-FMDP、Thr-FMDP、Ala-FMDP 和 FA



(b) ACR 和 FA-ACR

图9 3种FMDP和不同Thr-FMDP浓度对RAW264.7细胞中RAGE表达的影响

Figure 9 Effects of three different FMDPs and the concentrations of Thr-FMDP on RAGE expression in RAW264.7 cells

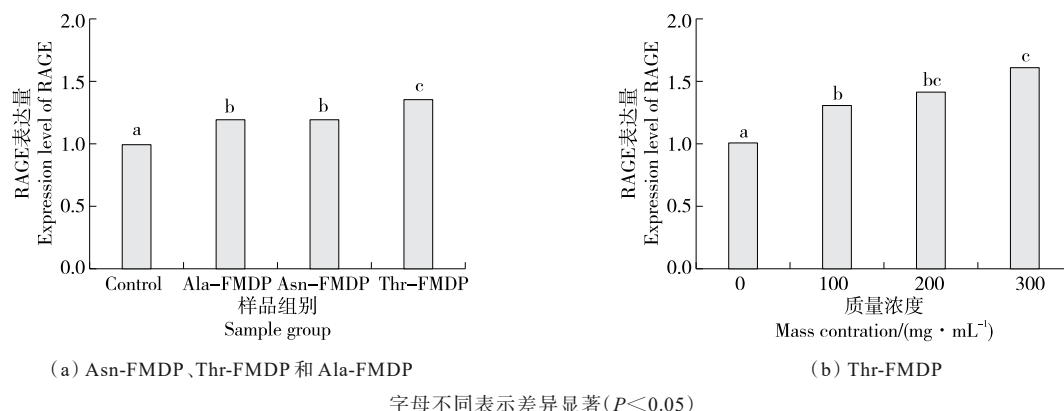


图 10 3 种 FMDP 和不同 Thr-FMDP 浓度对 RAW264.7 细胞中 RAGE 表达的定量分析
Figure 10 Quantitative analysis of three different FMDPs and the concentrations of Thr-FMDP on RAGE expression in RAW264.7 cells

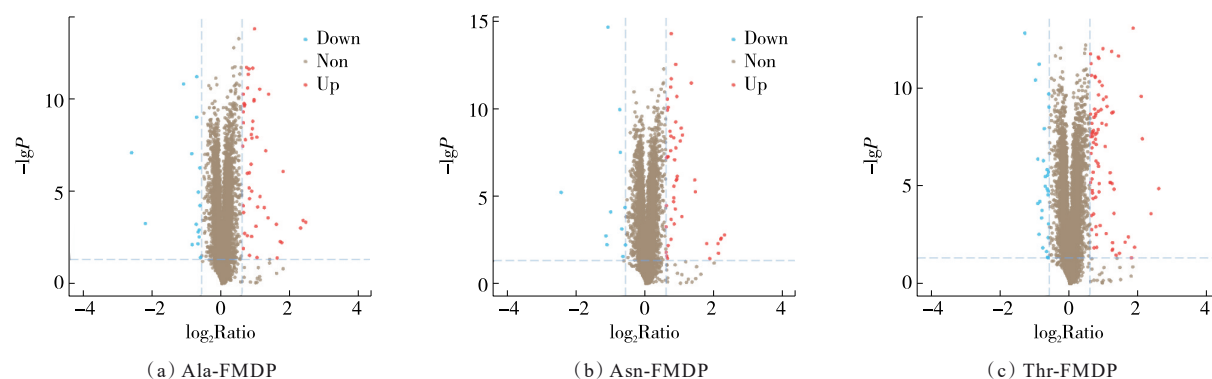


图 11 差异表达蛋白上调/下调的火山图
Figure 11 Volcano plots for the upregulation/downregulation of differentially expressed proteins

(HMOX1)、醌氧化还原酶(SQOR)、胱氨酸/谷氨酸转运蛋白(SLC7A11)、谷氨酸-半胱氨酸连接酶调节亚基(GCLM)、醌氧化还原酶-1(NQO1)和硫氧还蛋白-1(SRXN1)等。

2.5 差异表达蛋白的 GO 富集分析

GO 富集为 3 个类别:生物过程、分子功能和细胞组

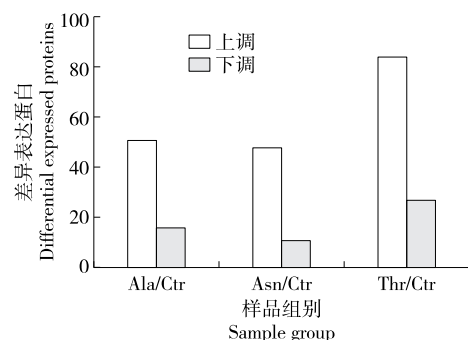


图 12 差异表达蛋白上调/下调的定量分析
Figure 12 Quantitative analysis of the upregulation/downregulation of differentially expressed proteins

分^[18]。对生物过程进行 GO 条目富集分析发现:3 种 FMDP 均涉及到对氧化应激的反应、血红素分解代谢过程、类视黄醇的代谢过程,结果如图 13(a)~图 13(c)所示。Ala-FMDP 主要涉及:类视黄醇代谢过程、对氧化应激的反应、对营养的反应、红细胞稳态、前列腺素代谢过程、血红素分解代谢过程、肽抗原的抗原加工与呈递、铁离子稳态和对革兰氏阴性菌的防御反应。Asn-FMDP 主要涉及:类视黄醇代谢过程、对氧化应激的反应、细胞对营养的反应、前列腺素代谢过程、血红素分解代谢过程、视黄醇代谢过程、肽抗原的抗原加工与呈递、对细菌的应答和有机物质反应。Thr-FMDP 主要涉及:细胞氧化解毒、类视黄醇代谢过程、内肽酶活性的负调节、通过质膜细胞黏附分子进行嗜嗜性细胞间黏附、对有机环化物的响应、血红素分解代谢过程、视黄醇代谢过程、神经元凋亡的负调控。

对分子功能进行 GO 条目富集分析发现:3 种 FMDP 处理后显著差异蛋白均与氧化还原酶活性及脂质代谢相关酶有关,结果如图 13(d)~图 13(f)所示。Ala-FMDP 主要涉及:氧化还原酶活性、糖醇:NADP+1-氧化还原酶活

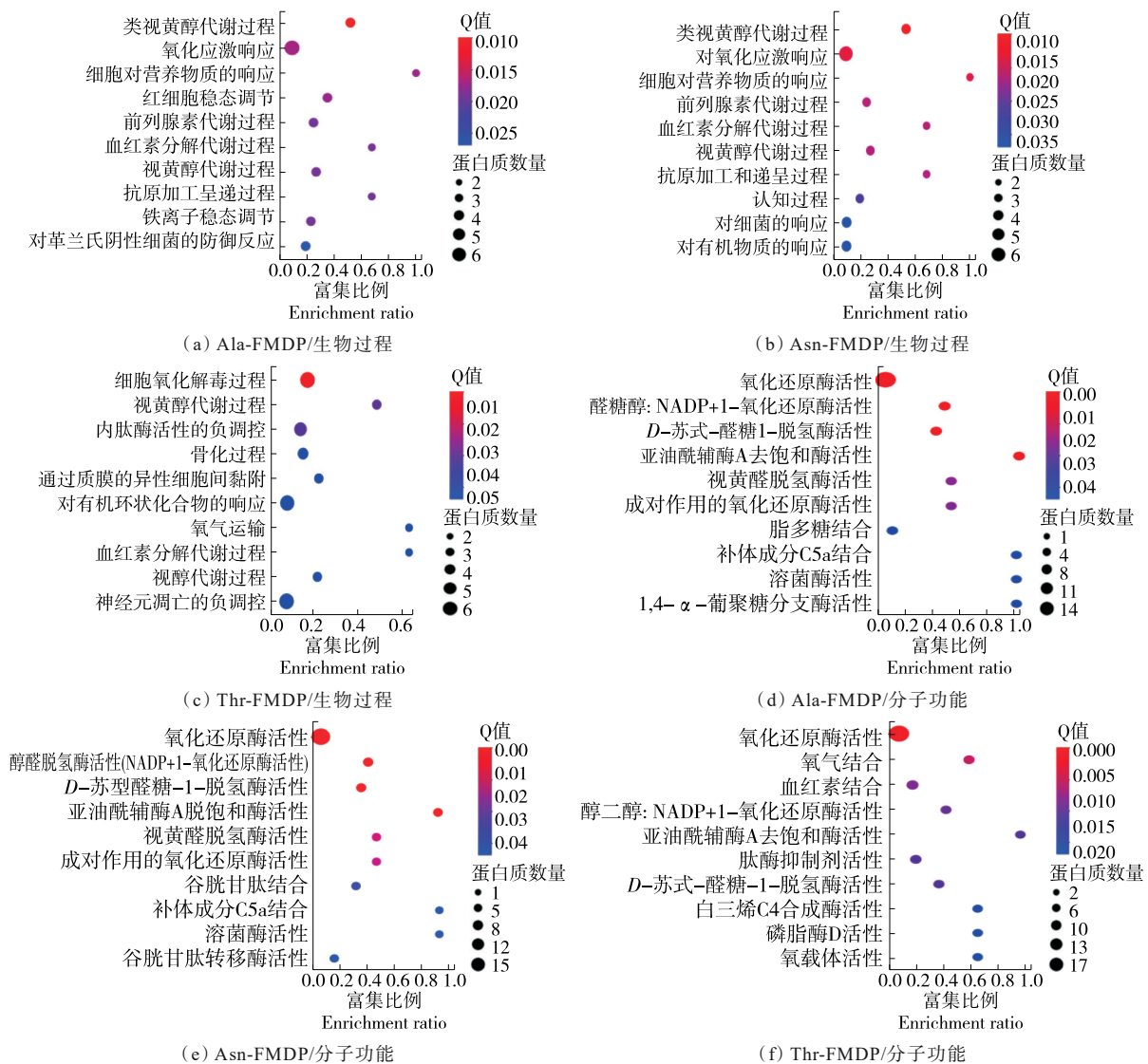


图 13 3 种 FMDP 处理后 RAW264.7 细胞差异表达蛋白的 GO 富集分析

Figure 13 GO enrichment analysis of differentially expressed proteins in RAW264.7 cells after exposure to three FMDPs

性、D-苏醛糖 1-脱氢酶活性、亚油酰辅酶 A 去饱和酶活性、视网膜脱氢酶活性、脂多糖结合、补体成分 C5a 结合、溶菌酶活性和 1,4- α -葡聚糖分支酶活性。Asn-FMDP 主要涉及:氧化还原酶活性、糖醇:NADP+1-氧化还原酶活性、D-苏醛糖 1-脱氢酶活性、视网膜脱氢酶活性、谷胱甘肽结合、补体成分 C5a 结合、溶菌酶活性、谷胱甘肽转移酶活性。Thr-FMDP 主要涉及:氧化还原酶活性、血红素结合、糖醇:NADP+1-氧化还原酶活性、D-苏醛糖 1-脱氢酶活性、亚油酰辅酶 A 去饱和酶活性、肽酶抑制活性、白三烯-C4 合酶活性、磷脂酶 D 活性、载氧体活性。

2.6 FMDP 对 Keap1/Nrf2 信号通路的影响

Keap1/Nrf2 通路是经典的抗氧化通路。当该通路暴露于氧化应激时,转录因子 Nrf2 与靶基因中的抗氧化反应元件(AREs)结合,增加其表达水平,激活体内的抗氧化

酶^[19]。基于 3 种 FMDP 处理组中大多数差异表达蛋白具有氧化还原酶活性的发现,采用蛋白质印迹技术探索 FMDP 是否通过 Keap1/Nrf2 信号通路影响细胞的氧化应激。如图 14 所示,与空白组和常见 AGE-羧甲基赖氨酸(CML)相比,3 种 FMDP 均增加了 Nrf2 的表达水平,即 FMDP 促进了 Keap1 和 Nrf2 的解离,从而减少 Nrf2 的泛素化和降解,导致 Nrf2 蛋白水平显著升高,而 Keap1 蛋白水平略有降低。这表明 RAW264.7 细胞暴露于 FMDP 后,Keap1/Nrf2 信号通路被激活。

Keap1/Nrf2 信号通路的激活导致多种下游靶蛋白的表达^[20]。当这些靶蛋白被激活时,它们可以调节体内的氧化还原平衡,从而使其恢复正常状态。Nrf2 的激活可以调节解毒酶、抗氧化剂或代谢酶的水平,并通过调节 GCLC 控制谷胱甘肽^[21]。研究分析了该信号通路下游的

几种氧化还原酶,包括 NQO1、HO-1 和 GCLC。结果(图 15)显示,3 种蛋白在 FMDP 处理组中的表达水平显著

增加,这与蛋白质组学分析中观察到的趋势一致,说明 FMDP 引起细胞氧化应激。

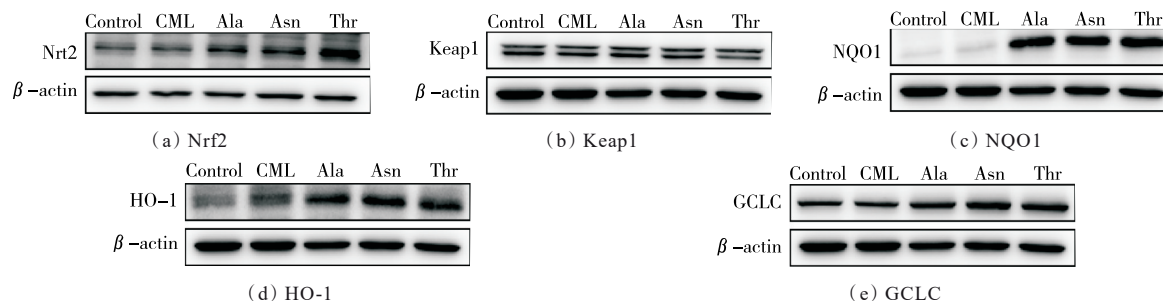


图 14 羧甲基赖氨酸(CML)和不同 FMDP 对巨噬细胞中 Keap1/Nrf2 信号通路和抗氧化蛋白表达的影响

Figure 14 Effects of CML, Ala-, Asn- and Thr-FMDP on Keap1/Nrf2 signaling pathway and antioxidant protein expression in macrophages

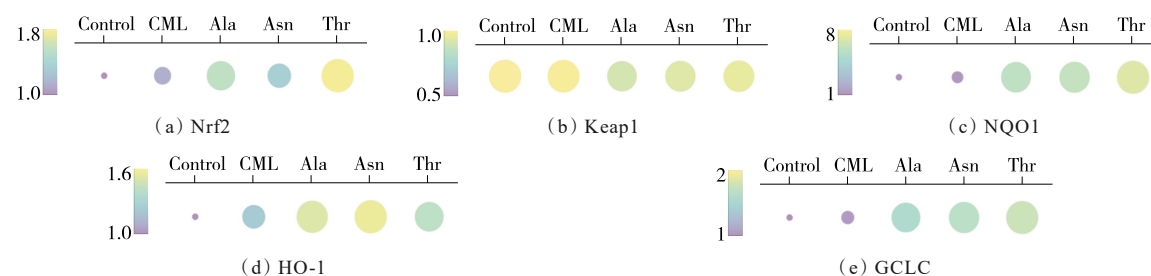


图 15 羧甲基赖氨酸(CML)和不同 FMDP 对巨噬细胞中 Keap1/Nrf2 信号通路和抗氧化蛋白表达的定量分析

Figure 15 Quantitative analysis of CML, Ala-, Asn- and Thr-FMDP on Keap1/Nrf2 signaling pathway and antioxidant protein expression in macrophages

3 结论

来源于丙氨酸、天冬酰胺和苏氨酸的 3 种甲烯基哌啶醛在降低细胞毒性的同时,上调了 RAW264.7 细胞中晚期糖基化终末产物受体的表达,其中苏氨酸与甲烯基哌啶醛形成的加合物显示出最强的晚期糖基化终末产物受体刺激能力。蛋白质组学分析显示,甲烯基哌啶醛主要通过调节 Keap1/Nrf2 等相关通路刺激细胞氧化应激:提高了 Nrf2 水平,促进了 Keap1 和 Nrf2 的解离,并增加了氧化还原酶(如 NQO1、HO-1 和 GCLC)的表达。研究结果表明,即使甲醛和丙烯醛被结合到氨基酸中,它们在食品中仍可能存在潜在风险。然而,当前结论主要基于体外巨噬细胞模型,尚缺乏动物体内药代动力学与靶器官毒性数据的支撑,且晚期糖基化终末产物受体上调在氧化应激与炎症应答之间的功能权衡仍有待阐明。未来研究应借助晚期糖基化终末产物受体基因敲除动物及 Keap1 共价修饰探针,系统评估甲烯基哌啶醛在真实膳食暴露场景下的安全阈值及其信号分流机制。

参考文献

- [1] 胡云,邹勇平,周元元,等. 高效液相色谱法测定聚乳酸吸管中甲醛迁移量[J]. 食品与机械, 2024, 40(2): 51-56, 90.

Hu Y, Zou Y P, Zhou Y Y, et al. Migration quality of formaldehyde in the polylactic acid straw detected by HPLC[J]. Food & Machinery, 2024, 40(2): 51-56, 90.

- [2] Jiang K Y, Huang C H, Liu F, et al. Origin and fate of acrolein in foods[J]. Foods, 2022, 11(13): 1 976.
- [3] Li Y X, Ou J Y, Huang C H, et al. Chemistry of formation and elimination of formaldehyde in foods[J]. Trends in Food Science & Technology, 2023, 139: 104134.
- [4] Zhao M T, Liu Z Y, Zha M Y, et al. Investigation of the dose and structure effects of lipid oxidation products aldehydes on the generation of heterocyclic amines: a case study of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4, 5-b] pyridine (PhIP) [J]. Food Chemistry: X, 2025, 25: 102244.
- [5] Kamps J J, Hopkinson R J, Schofield C J, et al. How formaldehyde reacts with amino acids[J]. Communications Chemistry, 2019, 2(1): 126.
- [6] Ou J Y, Zheng J, Huang J Q, et al. Interaction of acrylamide, acrolein, and 5-hydroxymethylfurfural with amino acids and DNA[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68 (18): 5 039-5 048.
- [7] He F Z, Ge Y G, Chen H, et al. Reduction and control technology of harmful dicarbonyl compounds in flounder (Pleuronectiformes) seafood condiment preparation[J]. Foods,

- 2025, 14(10): 1 717.
- [8] Hu J, Jiang K, Huang C, et al. Glycine and serine markedly eliminate methylglyoxal in the presence of formaldehyde *via* the formation of imidazole salts[J]. Food Chemistry, 2022, 369: 130952.
- [9] Ou J Y, Hu J M, Ou S Y. Cytotoxicity of a novel compound produced in foods *via* the reaction of amino acids with acrolein along with formaldehyde[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2022, 70(49): 15 583-15 592.
- [10] Lin J Y, Huang C H, Liu F, et al. Simultaneous scavenging capacity of glycine and serine for formaldehyde along with glyoxal and the cytotoxicity of the interaction product in three cell lines[J]. ACS Food Science & Technology, 2023, 3(4): 781-789.
- [11] Elmore J S, Koutsidis G, Dodson A T, et al. Measurement of acrylamide and its precursors in potato, wheat, and rye model systems[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(4): 1 286-1 293.
- [12] 陆捷, 王国栋, 王瑞明, 等. 丙氨酸制备研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(5): 299-305.
- Lu J, Wang G D, Wang R M, et al. Advances in microbial synthesis of alanine[J]. Food and Fermentation Industries, 2023, 49(5): 299-305.
- [13] 田媛, 罗紫明, 隋凤娇, 等. 氨基酸复配同步抑制曲奇中多种有害物形成及其对感官品质的影响[J]. 食品与发酵工业, 2024, 50(12): 74-83.
- Tian Y, Luo Z M, Sui F J, et al. Simultaneous inhibition of various deleterious substances in cookies by application of an optimized combination of amino acids and its effect on organoleptic quality[J]. Food and Fermentation Industries, 2024, 50(12): 74-83.
- [14] Yin Z, Guo H Y, Jiang K Y, et al. Morin decreases acrolein-induced cell injury in normal human hepatocyte cell line LO2 [J]. Journal of Functional Foods, 2020, 75: 104234.
- [15] Wang Z T, Ou J Y, Liang J Z, et al. Co-exposure to formaldehyde and acrolein generates a new protein adduct activating RAGE[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2025, 73(11): 6 931-6 942.
- [16] Maceroni E, Cimini A, Quintiliani M, et al. Retinal gatekeepers: molecular mechanism and therapeutic role of cysteine and selenocysteine[J]. Biomolecules, 2025, 15(8): 1 203.
- [17] Zhou M Z, Zhang Y Y, Shi L, et al. Activation and modulation of the AGEs-RAGE axis: implications for inflammatory pathologies and therapeutic interventions-a review[J]. Pharmacological Research, 2024, 206: 107282.
- [18] Zhang T, Fu M H, Yang Q, et al. Confirmation of pro-wound healing egg white peptides LVEEY and QVPLW and analysis of their mechanism of action: a proteomic analysis[J]. Food Bioscience, 2025, 63: 105762.
- [19] Wayal V, Hsieh C C. Bioactive dipeptides mitigate high-fat and high-fructose corn syrup diet-induced metabolic-associated fatty liver disease *via* upregulation of Nrf2/HO-1 expressions in C57BL/6J mice[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2023, 168: 115724.
- [20] Wayal V, Wang S D, Hsieh C C. Novel bioactive peptides alleviate Western diet-induced MAFLD in C57BL/6J mice by inhibiting NLRP3 inflammasome activation and pyroptosis *via* TLR4/NF- κ B and Keap1/Nrf2/HO-1 signaling pathways[J]. International Immunopharmacology, 2025, 148: 114177.
- [21] Xiao J L, Liu H Y, Sun C C, et al. Regulation of Keap1-Nrf2 signaling in health and diseases[J]. Molecular Biology Reports, 2024, 51(1): 809.