

两歧双歧杆菌 F-35 对 Caco-2 细胞中 α -葡萄糖苷酶活及葡萄糖转运的影响

陈佩¹, 党辉^{1,2,*}, 张秋香³, 刘小鸣³, 赵建新¹, 陈永泉³, 张灏^{3,*}, 陈卫¹

(1.江南大学食品科学与技术国家重点实验室, 江苏无锡 214122;

2.陕西师范大学食品工程与营养科学学院, 陕西西安 710062;

3.江南大学食品学院, 江苏无锡 214122)

摘要:本文以 Caco-2 细胞建立的 Transwell 模型研究了两歧双歧杆菌 F-35 的发酵上清和细胞内容物对葡萄糖转运和 α -葡萄糖苷酶活性的影响及其对 α -葡萄糖苷酶(S-I)、钠-葡萄糖共转运体-1(SGLT-1)、葡萄糖转运蛋白-2(GLUT-2)基因表达的影响。结果表明,两歧双歧杆菌 F-35 的发酵上清和细胞内容物对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制率分别为 13.3% 和 21.0%, 对葡萄糖的转运抑制率分别为 15.0% 和 29.7%; 使 S-I 基因表达水平分别下调 3.3 倍和 3.7 倍, SGLT-1 基因表达水平分别下调 3.5 倍和 1.6 倍, GLUT-2 的基因表达水平分别下调 4.4 倍和 1.3 倍, 与对照组相比均有显著性差异。研究表明,两歧双歧杆菌 F-35 可通过对 α -葡萄糖苷酶活性和葡萄糖转运的抑制及对 S-I、SGLT-1 和 GLUT-2 mRNA 表达量的抑制, 来延缓餐后碳水化合物水解和影响葡萄糖吸收, 具有潜在的降血糖作用。

关键词:两歧双歧杆菌 F-35, Caco-2 细胞, α -葡萄糖苷酶, 钠-葡萄糖共转运体-1, 葡萄糖转运蛋白-2

Effect of *Bifidobacterium bifidum* F-35 on α -glucosidase enzyme activity and the transportation of glucose

CHEN Pei¹, DANG Hui^{1,2,*}, ZHANG Qiu-xiang³, LIU Xiao-ming³, ZHAO Jian-xin¹,

CHEN Yong-quan³, ZHANG Hao^{3,*}, CHEN Wei¹

(1.State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;

2.College of Food Engineering and Nutritional Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China;

3.School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: In this paper, the supernatant and cell free extract of *Bifidobacterium bifidum* F-35 inhibited the α -glucosidase activity and the glucose transporter by Caco-2 cells and mRNA expressions of α -glucosidase (S-I), sodium-glucose cotransporter 1 (SGLT-1), glucose transporter protein 2 (GLUT-2) in real-time fluorescence quantitative PCR were studied. The results showed that the α -glucosidase inhibition rate of supernatant and cell free extract was 13.3% and 21.0%, glucose transporter inhibition rate was 15.0% and 29.7%, respectively. S-I gene expression levels was reduced by 3.3 times and 3.7 times by the supernatant and cell free extract of *Bifidobacterium bifidum* F-35. The SGLT-1 gene expression levels was reduced by 3.5 times and 1.6 times. The level of gene expression of glucose transporter protein GLUT-2 was reduced by 4.4 times and 1.3 times respectively in real-time fluorescence quantitative PCR. There was a significant difference compared with the control group. *Bifidobacterium bifidum* F-35 should delay postprandial carbohydrate hydrolysis and inhibit the glucose absorption by inhibiting α -glucosidase activity and reducing the S-I, SGLT-1, GLUT-2 mRNA expression levels. *Bifidobacterium bifidum* F-35 had the potential effect of reducing blood glucose. Further research is needed to evaluate the antidiabetic effect *in vivo*.

Key words: *Bifidobacterium bifidum* F-35; Caco-2 cells; S-I; SGLT-1; GLUT-2

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2013)17-0177-05

近年来,糖尿病在全世界广泛流行,已成为继肿

瘤、心血管疾病之后第三位严重危害人类健康的慢性疾病。据国际糖尿病联盟(IDF)公布的资料以及推算,2006年全球糖尿病患者人数为2.46亿,在随后的20年内患者人数将高达3.8亿^[1]。我国糖尿病患者病率在过去20年中上升了4倍,2007年全国糖尿病患者人数为3980万,仅次于印度成为全球糖尿病患者人数第二大国^[2]。因此,急需通过有效措施来预防

收稿日期: 2013-03-22 * 通讯联系人, + 并列第一作者

作者简介: 陈佩(1983-), 女, 博士研究生, 研究方向: 食品生物技术。

党辉(1977-), 男, 博士研究生, 讲师, 研究方向: 食品生物技术。

基金项目: “十二五”国家 863 计划(2011AA100901)。

和治疗糖尿病。糖尿病主要分为 I 型糖尿病和 II 型糖尿病, I 型糖尿病多发生于青少年,因胰岛素分泌缺乏,依赖外源性胰岛素补充以维持生命。II 型糖尿病患者约占 90% 以上,因胰岛素抵抗或胰岛素分泌不足,患者常年伴有高血糖^[3]。降低餐后血糖,对预防 II 型糖尿病及其并发症具有非常重要的意义。 α -葡萄糖苷酶抑制剂是一类以延缓肠道碳水化合物吸收而达到治疗糖尿病的口服降糖药物,通过竞争性抑制位于小肠的各种 α -葡萄糖苷酶,使碳水化合物分解为葡萄糖的速度减慢,从而减缓肠道内葡萄糖的吸收,降低餐后高血糖^[4]。研究发现某些植物或者谷物的提取物具有抑制 α -葡萄糖苷酶活性的作用^[5-10]。Ramchandran 等^[11]指出乳酸菌在体外具有抑制 α -葡萄糖苷酶活性的作用,但并未提及乳酸菌是否对 α -葡萄糖苷酶的表达及葡萄糖的转运有抑制作用。有研究报道碳水化合物的消化与吸收过程中与此相关的酶及转运载体主要有 α -葡萄糖苷酶(sucrase-isomaltase, S-I),与葡萄糖吸收相关的钠葡萄糖共转运载体-1(sodium glucose cotransporters 1, SGLT-1)和葡萄糖协助扩散转运载体 2(facilitative glucose transporters 2, GLUT-2),只要阻断其中任一环节都能延缓单糖的吸收和降低餐后血糖水平^[12]。Caco-2 细胞(human colon carcinoma celllines)来源于人的结肠腺癌细胞,在 Transwell 小室中,Caco-2 细胞可以形成致密的单细胞层组织,分化出与小肠细胞类似的细胞绒毛面(apical,相当于肠腔一侧)和基底面(basolateral,相当于肠内壁一侧),并可以分化出各种酶类,包括 α -葡萄糖苷酶。Caco-2 细胞构建的 Transwell 模型已被广泛应用于生化、毒理及营养素的摄取和转运研究等方面^[13]。两歧双歧杆菌 F-35 是由本实验室从婴儿粪便中分离所得菌株,本文主要研究了两歧双歧杆菌 F-35 的发酵上清及细胞内容物在 Caco-2 细胞模型中对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制作用,及其对 S-I mRNA 水平以及葡萄糖吸收相关的 SGLT-1 和 GLUT-2 的 mRNA 水平表达的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

两歧双歧杆菌 F-35 由本实验室分离自婴儿粪便,菌种来源于江南大学食品生物与技术中心的菌株保藏库;人结肠腺癌细胞系 Caco-2 细胞株 中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心;MRS(De Mann, Rogosa, and Sharpe)培养基 参照文献^[13]略有改进:蛋白胨 10g,牛肉膏 10g,酵母膏 5g,乙酸钠 5g,葡萄糖 20g,磷酸氢二钾 2g,柠檬酸氢二铵 2g,七水硫酸镁 0.1g,一水硫酸锰 0.05g,吐温-80 1mL, L-半胱氨酸盐酸盐 0.5g,蒸馏水 1L,调节 pH 为 6.2~6.4;PBS 的配制 0.80% 氯化钠,0.02% 氯化钾,0.02% 磷酸二氢钾,0.22% 磷酸氢二钠,调节 pH 为 7.2~7.4;DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)高糖培养基、0.25% 胰酶(含 0.02% EDTA)、胎牛血清、L-谷氨酰胺和非必需氨基酸 美国 Gibico;双抗(青、链霉素) 美国 HyClone;细胞培养瓶和 12 孔 Transwell 小室 美国 Corning;荧光素黄钠和碱性磷酸酶试剂盒

美国 Sigma;葡萄糖测定试剂盒(GOD 法) 无锡正格科贸有限公司;引物均由上海桑尼生物科技有限公司合成。

5415R 冷冻离心机 Eppendorf,德国;CO₂ 细胞培养箱 HERA Cell 150,Thermo Electron Corporation,美国;倒置显微镜 CX41-12C02,Olympus,日本;扫描电镜 S-4800 Hitachi,日本;超声破碎仪 VCX500,SONICS & MATERIALS,INC,美国;荧光分光光度计 F-7000,日本日立。

1.2 实验方法

1.2.1 菌株上清和细胞内容物的制备 从固体 MRS 平板上挑取两歧双歧杆菌 F-35 单菌落于液体 MRS 中 37℃ 静置培养 18h 后,4℃ 下以 6000r/min 离心 10min,分别收集上清及菌体,培养上清以 0.22 μ m 滤膜过滤得到实验用菌株发酵上清;菌体用 PBS 离心洗涤 2 次后,再重悬于 PBS 中超声破碎。超声破碎条件设置为:功率 45%,工作 3s 停 8s 共 15min。将超声后的液体以 12000r/min 离心 20min 取上清,经 0.22 μ m 滤膜过滤得到实验用细胞内容物。

1.2.2 Caco-2 细胞培养 Caco-2 细胞生长在含有 20% 胎牛血清,1% 非必需氨基酸,1% L-谷氨酰胺和 1% 双抗的高糖 DMEM 培养液中,37℃,5% CO₂ 的培养箱中进行培养,隔天更换一次培养液,待细胞贴壁融合率达 80% 左右时,用含 0.02% EDTA 的 0.25% 胰酶消化细胞,按 1:3 传代。取对数生长期细胞进行实验。

1.2.3 Transwell 细胞模型的建立及评估 用于构建 Transwell 细胞模型的 Caco-2 细胞为 22~40 代之间。将细胞按照密度 2×10^5 cell/mL 接种于 12 孔 Transwell 小室上(膜孔径 0.4 μ m 生长面积 1.12cm²),转运槽肠腔侧(上室,AP 侧)加入调好密度的细胞悬液 500 μ L,基底侧(下室,BL 侧)加入 1.5mL 细胞培养液,每天换液,待细胞长至 21d 时备用。

Transwell 细胞模型的评估:扫描电镜验证细胞是否形成致密的单层;荧光素钠检测细胞的通透性,其在 Caco-2 细胞单层中表观渗透系数(Papp)值应低于 0.5×10^{-6} cm/s;用试剂盒检测细胞的碱性磷酸酶 AKP 极性,肠腔侧碱性磷酸酶活性应显著高于基底侧酶活^[14-15]。

1.2.4 两歧双歧杆菌 F-35 对 α -葡萄糖苷酶活及葡萄糖转运的抑制作用 用 PBS 冲洗已培养 21d 的 Transwell 小室上下面 3 次(上加 0.25mL,下加 0.6mL),去除葡萄糖。加入 475 μ L 含 20mmol/L 的麦芽糖(过滤除菌)作为底物,并加入两歧双歧杆菌 F-35 的上清或细胞内容物 25 μ L(共 0.5mL)一起到粘膜层,1.5mL PBS 加入到下层,板子在 37℃ 培养 2h,上下层各取 100 μ L 溶液到微孔板中检测葡萄糖含量,以此分别计算对酶活性的抑制率和葡萄糖转运率的抑制作用。

1.2.5 两歧双歧杆菌 F-35 对 Caco-2 细胞中的 S-I, SGLT-1, GLUT-2 基因表达量的影响 将两歧双歧杆菌 F-35 的上清及细胞内容物按 5% 加入到已培养 21d 的 Caco-2 单层细胞中与其共培养 2h 后,用试剂

表1 荧光定量 PCR 的寡核苷酸序列
Table 1 Oligonucleotide primers used to amplify RNA transcripts

引物名称	正向引物(5'→3')	反向引物(5'→3')
β-actin(205bp)	TGACGTGGACATCCGCAAAG	CTGGAAGGTGGACAGCGAGG
S-I(189bp)	CGACGGAGAAGCAGTGGAAG	GGGTTGTTCTCTTGTGAACATTC
SGLT-1(138bp)	AATCTCAATGTCTGGCTACCAC	GCCAAGATAAGGACGTTACCAC
GLUT-2(158bp)	TTGCTCCAACCGCTCTCAG	AAGGATGGCTCGCACACC

盒提取 Caco-2 的总 RNA 并反转录合成 cDNA,后进行荧光定量 PCR,并选用 β-肌动蛋白(β-actin)作为内参基因。进行荧光定量 PCR 所用引物序列如表 1 所示。

PCR 反应条件为:95℃,15min;95℃,10s,64℃,20s,72℃,30s,40 个循环;72℃,5min;95℃,15s,60℃,15s,95℃,15s。以 2^{-ΔΔCT} 法计算乳酸菌对 Caco-2 细胞中的 S-I, SGLT-1, GLUT-2 基因表达量的影响^[16]。

1.2.6 统计分析 数据统计采用 SPSS 16.0 进行 one-way ANOVA, Duncan's 多重检验 (p < 0.05, p < 0.01) 数值以均值 ± 标准差表示。

2 结果与讨论

2.1 Transwell 细胞模型的评估

Caco-2 细胞在 Transwell 微孔滤膜上生长 21d 后,用扫描电镜验证细胞是否形成致密的单层,结果见图 1。

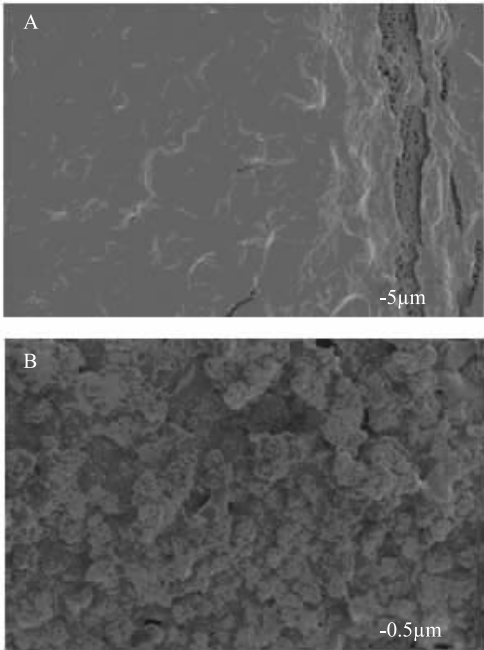


图1 生长在微孔滤膜上 21d 时的 Caco-2 细胞单层扫描电镜图
Fig.1 The scanning electron micrographs of the microporous membranes of Caco-2 cells after 21days

注:A:扫描电镜放大倍数 1000 ×;
B:扫描电镜放大倍数 10000 ×

扫描电镜显示 Caco-2 细胞在 Transwell 小室的聚碳酸酯膜上生长 21d 后形成了致密的单层(图 1A),细胞表面形成良好的刷装缘以及细胞间形成紧

密连接,从而形成紧密的细胞(图 1B)。

第 21d 时,Transwell 小室的 Papp 为 0.007 × 10⁻⁶cm²/s,远远小于 0.5 × 10⁻⁶cm²/s。进一步证明了细胞已形成良好的紧密连接单层。帕丽达·阿不力孜等^[14]建立的 Caco-2 细胞模型中 Papp 为 0.445 × 10⁻⁶cm²/s,较本研究的通透性大,可能与细胞的接种密度有关。

碱性磷酸酶 AKP 极性检测结果见图 2。培养到 21d 的细胞单层其肠腔侧的碱性磷酸酶活性显著高于基底侧酶活性,约高出 5 倍之多,说明该标志酶已经大部分集中在刷装缘一侧,细胞单层已经形成了极性。查龙应等^[15]建立的 Caco-2 细胞模型中肠腔侧碱性磷酸酶活性约为基底侧酶活的 10 倍之多,其 AKP 极性高于本研究,推测可能与细胞状态及活性有关。

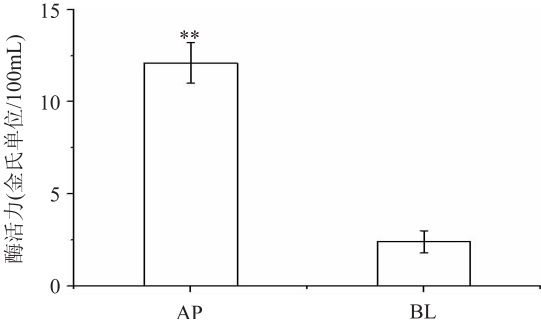


图2 第 21d 时 Caco-2 细胞单层肠腔侧 AP 和基底侧 BL 的碱性磷酸酶活性 (n = 12)
Fig.2 The alkaline phosphatase activity of Caco-2 monolayer sides of AP and BL after 21 days (n = 12)

注: ** 表示差异极显著, p < 0.01。

综上所述,Caco-2 细胞在 Transwell 小室中培养 21d 后,即可生长、分化形成紧密连接的类似于肠上皮单层细胞,并且可形成刷状微绒毛的上皮细胞极化特征。

2.2 两歧双歧杆菌 F-35 对 Caco-2 细胞中 α-葡萄糖苷酶的抑制作用

如图 3 所示,两歧双歧杆菌 F-35 的发酵上清和细胞内容物都对 α-葡萄糖苷酶活性有抑制作用,抑制率分别为 13.3% 和 21.0%,细胞内容物的抑制率高于上清抑制率。Lata^[17] 等人研究报道,乳酸菌的发酵产物对 α-葡萄糖苷酶的具有抑制作用,推测可能是其产生的多糖类物质起作用。

2.3 两歧双歧杆菌 F-35 对 Caco-2 细胞中葡萄糖转运的抑制作用

如图 4 所示,两歧双歧杆菌 F-35 的细胞内容物

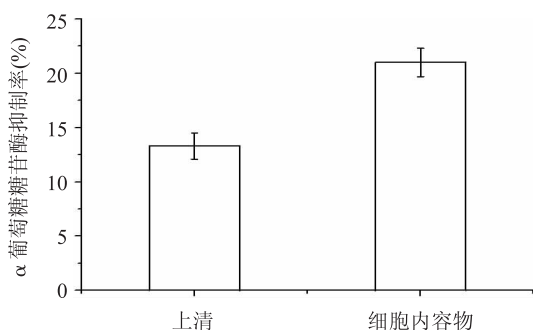


图3 两歧双歧杆菌 F-35 上清和细胞内容物对 α-葡萄糖苷酶的抑制率

Fig.3 α-Glucosidase inhibitory activities of the supernatant and cell free extract of *B.bifidum* F-35

对葡萄糖转运的抑制率为 29.7%, 高于两歧双歧杆菌 F-35 上清对葡萄糖转运的抑制率 15.0%。推测可能是抑制葡萄糖转运的因子在胞内的浓度高于胞外,或在胞外有干扰抑制葡萄糖转运的因子作用的因子存在。

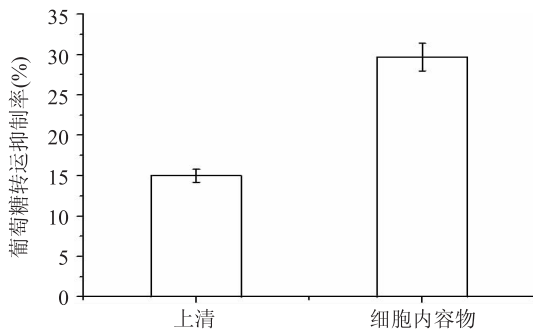


图4 两歧双歧杆菌 F-35 上清和细胞内容物对葡萄糖转运的抑制率

Fig.4 Glucose absorption inhibitory activities of the supernatant and cell free extract of *B.bifidum* F-35

2.4 两歧双歧杆菌 F-35 对 Caco-2 细胞中的 S-I, SGLT-1, GLUT-2 基因表达量的影响

如图 5 所示,两歧双歧杆菌 F-35 的上清可极显著下调 ($p < 0.01$) Caco-2 细胞中 S-I、SGLT-1、GLUT-2 的表达量,其下调量分别为 3.3 倍、3.5 倍和 4.4 倍;其细胞内容物对 Caco-2 细胞中 S-I、SGLT-1、GLUT-2 表达量的下调量分别为 3.7 倍、1.6 倍和 1.3 倍。乳酸菌的上清中含有大量的有机酸,如乳酸,乙酸等,有研究报道乙酸对 Caco-2 细胞的酶活性有抑制作用^[18]。本研究发现两歧双歧杆菌 F-35 对 α-葡萄糖苷酶活性有抑制作用,并且可以抑制酶的表达式,从而有效缓解碳水化合物的分解吸收,从源头减少单糖的生成量。

吴慧平^[12]等研究报道夏枯草提取物通过抑制 Caco-2 细胞 α-葡萄糖苷酶、SGLT-1、GLUT-2、Na⁺-K⁺-ATP 酶 mRNA 表达作用,来延缓对碳水化合物水解和影响葡萄糖吸收,起到降低餐后血糖水平的作用。本文研究表明两歧双歧杆菌 F-35 对 Caco-2 细胞中 α-葡萄糖苷酶、SGLT-1、GLUT-2 的 mRNA 表达量也具有抑制作用,从而推断此乳酸菌具有降低餐后血糖的潜力。

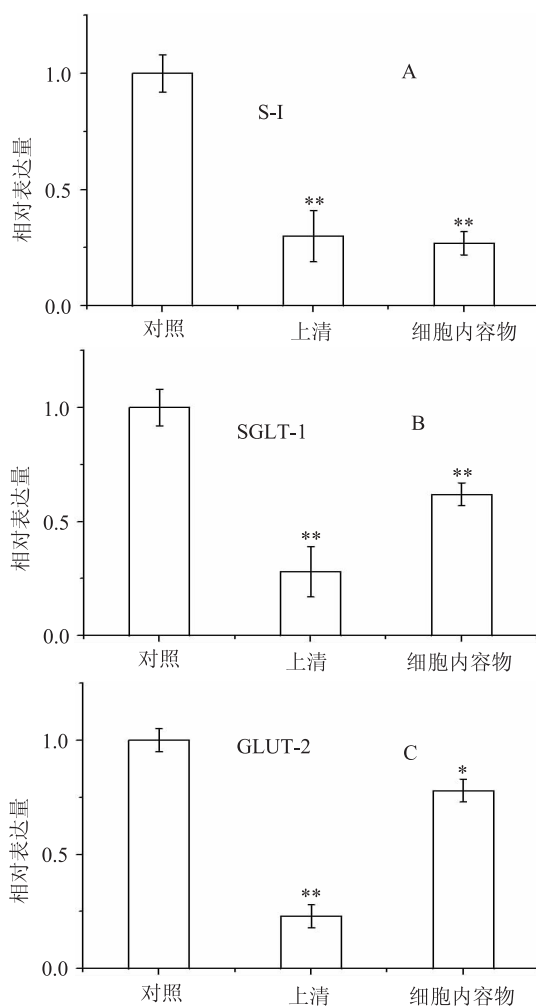


图5 三种基因的相对表达量

Fig.5 Relative expression levels of the three genes

注:A:S-I 在不同处理中的 mRNA 相对表达量;

B:SGLT-1 在不同处理中的 mRNA 相对表达量;

C:GLUT-2 在不同处理中的 mRNA 相对表达量;

* 表示与对照组相比差异显著, $p < 0.05$;

** 表示与对照组相比差异极显著, $p < 0.01$ 。

3 结论

本研究表明两歧双歧杆菌 F-35 对 Caco-2 细胞中 α-葡萄糖苷酶活及 S-I、SGLT-1 和 GLUT-2 的 mRNA 表达量都具有抑制作用,从而具有延缓餐后碳水化合物的分解和降低餐后血糖的潜力,可进一步研究两歧双歧杆菌 F-35 在体内的降糖作用。

参考文献

- [1] Jain S, Saraf S. Type 2 diabetes mellitus—Its global prevalence and therapeutic strategies [J]. Diabetes and Metabolic Syndrome, 2010(4): 48-56.
- [2] 蒋厚龙. 健康必读浅谈糖尿病的起因及预防措施[J]. 健康必读, 2012, 11(9): 525.
- [3] Zimmet P, Alberti K, Shaw J. Global and societal implications of the diabetes epidemic [J]. Nature, 2001, 414: 782-787.
- [4] Tolleller M. α-glucosidase inhibitors in diabetes: efficacy in NIDDM subjects [J]. European Journal of Clinical Investigation, 2001, 31(1): 1-10.

(下转第 184 页)

溶性多糖改性 BC 对其纤维素结晶影响不大。而 1,3-丁二醇改性后 BC 膜 XRD 图谱峰的比例减弱至几乎消失,显示 BC 膜结晶度降低。

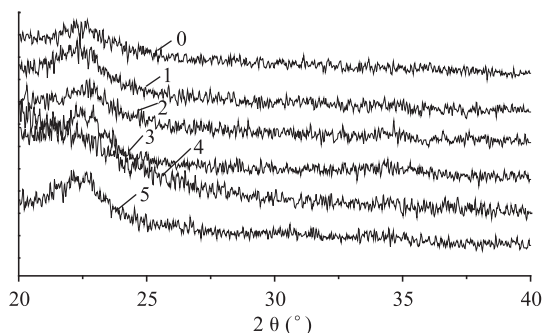


图9 改性前后细菌纤维素膜 X-射线衍射光谱图

Fig.9 XRD of the bacterial cellulose before and after being modified

注:0-对照 BC,1-培养基中添加 1.5% CMCNa 发酵改性 BC,
2-培养基中添加 1.0% CMSCNa 发酵改性 BC,
3-经 1,3-丁二醇浸渍改性 BC,
4-培养基中添加 0.5% AS 发酵改性 BC,
5-经 N,N-二甲基甲酰胺浸渍改性 BC。

3 结论

通过培养基中添加水溶性多糖发酵生产 BC 及利用多羟基化合物浸渍 BC 能够对 BC 进行改性,所得改性 BC 膜的持水性、复水性、孔隙率和透湿性等材料学特性均比改性前优良。培养基中添加 1.5% AS 所得改性 BC 膜持水率比改性前提高了 2%;培养基中加入 0.5% AS 所得改性 BC 膜再溶胀能力比改性前提高了 30.3%;N,N-二甲基甲酰胺浸渍改性所

得 BC 膜比改性前提高了 31.4%;培养基中加入 1.5% CMCNa 所得改性 BC 膜孔隙率比改性前提高了 5 倍;培养基中加入 1.0% CMSCNa 所得改性 BC 膜水蒸气透过率比改性前提高了 1 倍;发酵改性作用对细菌纤维素的结晶度影响不大。该研究为制备高性能复合 BC 材料、拓宽 BC 的应用奠定了基础。

参考文献

- [1] 卢松华.茶水发酵法制备细菌纤维素及其相关性能研究[J].临床医学,2011,31(11):102-104.
- [2] 朱会霞.PVA 对生物合成细菌纤维素膜拉伸性能的影响[J].高校化学工程学报,2011,25(5):822-825.
- [3] Shoda M, Sugano Y. Recent advances in bacterial cellulose production[J]. Biotechnol Bioprocess Eng, 2005, 10(1):1-8.
- [4] Putra A, Kakugo A, Furukawa H, et al. Tubular bacterial cellulose gel with oriented fibrils on the curved surface [J]. Polymer, 2008, 49(7):1885-1891.
- [5] 贾原媛,汤卫华,李飞,等.细菌纤维素生物医学材料的性能改进[J].天津科技大学学报,2009,24(6):17-19.
- [6] 张雯,齐香君.细菌纤维素生产菌株菌体细胞收集方法的研究[J].食品工业科技,2006,27(9):57-58.
- [7] 潘颖.细菌纤维素的制备及改性研究[D].青岛:青岛大学,2007.
- [8] Putra A, Kakugo A, Furukawa H, et al. Tubular bacterial cellulose gel with oriented fibrils on the curved surface [J]. Polymer, 2008, 49:1885-1891.
- [9] Chao Y, Ishida Tsugano Y, Shoda M. Bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* in a 50-1 internal-loop airlift reactor[J]. Biotechnology Bioeng, 2000, 68:345-352.
- [10] 1994, 24(3):31-35.
- [11] [5] Hansawasdi C, Kawabata J. α -Glucosidase inhibitory effect of mulberry (*Morus alba*) leaves on Caco-2 [J]. Fitoterapia, 2006, 77:568-573.
- [12] [6] Anurakkun N, Bhandari M, Hong G, et al. α -Glucosidase inhibitor from Chinese aloes [J]. Fitoterapia, 2008, 79:456-457.
- [13] [7] Toda M, Kawabata J, Kasai T. α -Glucosidase inhibitors from clove (*Syzygium aromaticum*) [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2000, 64(2):294-298.
- [14] [8] Anurakkun N, Bhandari M, Kawabata J. α -Glucosidase inhibitors from Devil tree (*Alstonia scholaris*) [J]. Food Chemistry, 2007, 103:1319-1323.
- [15] [9] Hansawasdi C, Kawabata J, Kasai T. Hibiscus acid as an inhibitor of starch digestion in the Caco-2 cell model system [J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2001, 65(9):2087-2089.
- [16] [10] Zhang J-F, Zheng Y-G, Shen Y-C. Inhibitory effect of valenamine on the enzymatic activity of honeybee α -glucosidase [J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2007, 87:73-77.
- [17] [11] Ramchandran L, Shah N. Proteolytic profiles and angiotensin-I converting enzyme and α -glucosidase inhibitory activities of selected lactic acid bacteria [J]. Journal of Food Science, 2008, 73(2):75-81.
- [18] [12] 吴慧平,哈团柱,郜明.夏枯草提取物对 Caco-2 细胞 α -葡萄糖苷酶、SGLT-1、GLUT-2、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶 mRNA 表达的影响[J].中国生化药物杂志,2010,31(6):373-377.
- [19] [13] De J, Rogosa M, Sharpe M. A medium for the cultivation of lactobacilli [J]. J Appl Bacterio, 1960, 23(1):130-135.
- [20] [14] 帕丽达·阿不力孜,丛媛媛,米仁沙·牙库甫,等. Caco-2 细胞体外吸收模型的建立及评估[J].亚太传统医药,2011,7(4):6-8.
- [21] [15] 查龙应,罗海吉,邓红,等. Caco-2 细胞体外吸收模型的建立及评估[J].南方医科大学学报,2009,29(3):326-328.
- [22] [16] Murthi P, Doherty V, Said J, et al. Homeobox Gene HLX1 Expression Is Decreased in Idiopathic Human Fetal Growth Restriction [J]. The American Journal of Pathology, 2006, 168(2):511-518.
- [23] [17] Ramchandran L, Shah N. Effect of exopolysaccharides and inulin on the proteolytic angiotensin-I-converting enzyme- and α -glucosidase-inhibitory activities as well as on textural and rheological properties of low-fat yogurt during refrigerated storage [J]. Dairy Science and Technology, 2009, 89:583-600.
- [24] [18] Ogawa N, Satsu H, Watanabe H, et al. Acetic acid suppresses the increase in disaccharidase activity that occurs during culture of Caco-2 cells [J]. The Journal of Nutrition, 2000, 130(3):507-513.