

doi:10.6041/j.issn.1000-1298.2020.11.038

具有 α -葡萄糖苷酶抑制活性的益生乳酸菌筛选

曾 珠^{1,2} 陈艳玲^{1,2} 陈尚武³

(1. 西南大学蚕桑纺织与生物质科学学院, 重庆 400715; 2. 农业农村部蚕桑生物学与遗传育种重点实验室, 重庆 400715;
3. 中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

摘要: 利用 α -葡萄糖苷酶抑制剂体外筛选模型, 分析了来源于传统乳制品的10株乳杆菌对猪小肠提取的 α -葡萄糖苷酶的抑制活性; 对这些菌株的基本益生特性, 包括对人工模拟胃肠液的耐受性及对肠上皮细胞的粘附性等进行评价; 最后, 通过Caco-2细胞建立的Transwell模型分析了乳杆菌对人肠道 α -葡萄糖苷酶活性及其基因表达的影响。结果表明, 这10株乳杆菌对猪小肠提取的 α -葡萄糖苷酶均具有不同程度的抑制作用; 乳杆菌的 α -葡萄糖苷酶抑制活性在菌株生长的对数期或稳定期达到高峰, 随后出现下降的趋势; 结合菌株的基本益生特性评价发现, 有3株具有较高抑制活性的乳杆菌能够耐受人工模拟的胃肠液, 并具有较强的黏附肠上皮细胞HT-29的能力; 由Transwell模型发现, 乳杆菌能同时抑制 α -葡萄糖苷酶的活性及基因表达量。研究表明, 筛选出的3株乳杆菌(副干酪乳杆菌L14和Z3-11以及植物乳杆菌NL42)均具有较高的 α -葡萄糖苷酶抑制活性和较好的益生特性, 可作为潜在的辅助降血糖的益生菌株。

关键词: 乳酸菌; α -葡萄糖苷酶; 益生菌; 抑制活性

中图分类号: TS252.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-1298(2020)11-0349-08

OSID:



Screening for Potential Probiotic Lactic Acid Bacteria Strains Based on α -glucosidase Inhibitory Activity

ZENG Zhu^{1,2} CHEN Yanling^{1,2} CHEN Shangwu³

(1. College of Sericulture, Textile and Biomass Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China

2. Key Laboratory of Sericultural Biology and Genetic Breeding, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Chongqing 400715, China

3. College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract: Lactic acid bacteria strains (LAB) are regarded as safe food-grade microorganism and have been used in fermented food production and preservation for a long history. Some of the LAB strains are considered as probiotics and have the potential to regulate diabetes. In order to screen potential hypoglycemic probiotic strains *in vitro*, 10 *Lactobacillus* strains isolated from traditional dairy products were determined for the inhibitory activity against α -glucosidase from porcine intestine. The basic features of probiotics, including gastrointestinal fluid tolerance and cell adhesion, were also investigated. Some strains were selected for further study of their effects on α -glucosidase activity and gene expression level by Transwell model established by Caco-2 cells. The results showed that all the 10 strains showed different degrees of α -glucosidase inhibitory activity, which peaked at the logarithmic or stationary phase of the strains growth, and then decreased. The evaluation of the basic features of probiotics suggested that three strains with higher α -glucosidase inhibitory activity showed tolerance to the simulated gastrointestinal fluid and strong HT-29 cell adhesion. The Caco-2 cells model showed that *Lactobacillus* strains could both inhibit α -glucosidase activity and its mRNA expression. The selected three *Lactobacillus* strains, including *Lactobacillus paracasei* strains L14 and Z3-11, and *Lactobacillus plantarum* strain NL42 displayed high α -glucosidase activity and good probiotic properties and may serve as potential probiotics for the auxiliary management of diabetes.

Key words: lactic acid bacteria; α -glucosidase; probiotics; inhibition activity

收稿日期: 2020-08-23 修回日期: 2020-09-03

基金项目: “十二五”国家科技支撑计划项目(2011AA100903)和中央高校基本科研业务费专项资金项目(SWU118081)

作者简介: 曾珠(1989—),女,讲师,博士,主要从事食品微生物研究, E-mail: zengzhuydx@163.com

通信作者: 陈尚武(1958—),男,教授,博士生导师,主要从事乳品科学与代谢工程研究, E-mail: Swchen@cau.edu.cn

0 引言

II型糖尿病(T2DM)是一种发病机制较复杂的慢性代谢紊乱性疾病,以胰岛素抵抗和胰岛细胞损伤导致的慢性高血糖为主要特征^[1]。传统的糖尿病药物(如双胍类、磺酰脲类、噻唑烷二酮类等)成本高、副作用大,且治标不治本。因此,寻找新型经济安全的糖尿病药物具有重要意义。

α -葡萄糖苷酶抑制剂是20世纪90年代开发的降糖药物,是目前临床治疗T2DM的一线口服药物。 α -葡萄糖苷酶抑制剂主要作用于位于肠系膜刷状缘的 α -葡萄糖苷酶,通过抑制 α -葡萄糖苷酶分解多糖为葡萄糖的作用,从而减缓葡萄糖的吸收速度和降低血糖水平^[2]。常见的 α -葡萄糖苷酶抑制剂主要有阿卡波糖(Acarbose)、伏格列波糖(Voglibose)和米格列醇(Miglitol)^[3]。阿卡波糖最初是从游动放线菌的次级代谢物中分离而来,因此许多 α -葡萄糖苷酶抑制剂的微生物源研究都是从土壤中的放线菌入手^[4],目前,已用于临床治疗的 α -葡萄糖苷酶抑制剂也主要来源于放线菌(井冈霉素产生菌和野尻霉素产生菌)。

乳酸菌被公认是安全的食品级微生物,广泛应用于发酵食品生产和食品保藏方面,已经有非常悠久的历史^[5-6]。乳酸菌中的某些菌株被认为是益生菌,对人体具有多种益生功能^[7-11],常见的有乳酸杆菌、双歧杆菌和芽孢杆菌等。由于乳酸菌的天然、安全和益生特性,近年来已成为防治糖尿病的研究热点^[12-16]。关于乳酸菌防治糖尿病的研究大多是直接通过动物实验进行验证,具体的调节机理并不清楚,同时也没有初步筛选具有潜在降血糖功能的乳酸菌的方法。抑制 α -葡萄糖苷酶的活性是调控糖尿病的主要方法之一,乳酸菌具有的调节血糖的功能有可能通过这种机制发挥作用,因此体外具有 α -葡萄糖苷酶抑制活性的乳酸菌将是潜在的辅助抗糖尿病的益生菌株。益生菌对宿主发挥有益作用的前提是能够通过胃肠道的一系列物理和化学障碍到达肠道,并在肠道中定植。因此,一株良好的益生菌必须对模拟的人胃肠道条件具有耐受性,同时要具有较强的黏附肠道上皮细胞的能力。

本文基于对 α -葡萄糖苷酶的抑制能力和乳酸菌的基本益生特性,包括对人工模拟胃肠液的耐受性和粘附性的考查,筛选具有潜在降血糖作用的益生菌,以期开发功能益生菌提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

胃蛋白酶、4-硝基酚- α -D-吡喃葡萄糖苷、

Transwell insert 小室、碱性磷酸酶试剂盒,美国Sigma公司;Tris(氨基丁三醇)、胰蛋白酶,美国Amresco公司;DMEM(Dulbecco's modified eagle's medium)高糖培养基、0.25%胰酶(含0.02% EDTA(乙二胺四乙酸))、双抗(青、链霉素),美国Gibco公司;胎牛血清,杭州四季青公司;细胞培养瓶、96孔酶标板,美国Corning公司;SYBR Green 荧光定量试剂盒,北京Tiangen公司。

TP-2102型电子天平,美国DENVER仪器公司;FA2004B型分析天平,上海越平科学仪器有限公司;90-2型恒温磁力搅拌器,上海振荣科学仪器有限公司;UB-7型pH计,美国DENVER仪器公司;YX-280D手提式压力蒸汽灭菌器,合肥华泰医疗设备有限公司;酶标仪,美国Thermo Electron公司;SCIENTZ-IIID型超声破碎仪,宁波新芝生物科技公司;MCO-15AC型二氧化碳培养箱,日本三洋电机株式会社;倒置生物显微镜,北京奥特伟业光学仪器有限公司;LightCycler 96型实时荧光定量PCR(聚合酶链式反应)仪,罗氏诊断产品上海有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 猪小肠 α -葡萄糖苷酶的提取

新鲜的猪小肠粘膜用磷酸盐缓冲液(PBS, pH值6.8)冲洗干净,然后用载玻片刮取小肠粘膜加入等体积的PBS(pH值6.8)进行低温研磨。研磨充分的混合液在4℃下12 000 r/min离心20 min,收集上清液冻存于-80℃,使用时用PBS(pH值6.8)稀释10倍使用。

1.2.2 乳酸菌分泌上清的制备

本实验采用的乳酸菌为实验室前期分离保存的乳酸菌菌株,其中鼠李糖乳杆菌 *Lactobacillus rhamnosus* GG(LGG)作为参考菌株。将菌株活化后,12 000 r/min 室温(20℃)下离心15 min, PBS(pH值6.8)洗涤3遍。然后用PBS(pH值6.8)将菌体浓度调整为 5×10^{10} CFU/mL, 37℃ 孵育6 h(预实验表明在6 h时 α -葡萄糖苷酶抑制活性最高),孵育完成后进行离心(12 000 r/min, 15 min),取上清液冻存于-80℃待用。

1.2.3 乳酸菌 α -葡萄糖苷酶抑制活性的测定

参照文献[13]测定 α -葡萄糖苷酶抑制活性,反应体系为100 μ L。首先将25 μ L的底物4-硝基酚- α -D-吡喃葡萄糖苷(PNPG, 10 mmol/L)和25 μ L的样品混匀后37℃孵育10 min,然后加入50 μ L α -葡萄糖苷酶混匀后于37℃反应30 min。随后迅速加入100 μ L Na_2CO_3 (0.1 mol/L)终止反应,用酶标仪测定405 nm处的吸光度。每组实验设置3个平行。

其中,样品的吸光度用样品空白对照(体系中用 50 μL PBS(pH 值 6.8)代替 α -葡萄糖苷酶)的吸光度进行校准。阴性对照(体系中无抑制 α -葡萄糖苷酶的样品)用 25 μL PBS(pH 值 6.8)代替样品,阴性空白对照(体系中无 α -葡萄糖苷酶活性)用 25 μL PBS(pH 值 6.8)代替样品,50 μL PBS(pH 值 6.8)代替 α -葡萄糖苷酶。 α -葡萄糖苷酶抑制率计算公式为

$$M = \left(1 - \frac{A - B}{C - D}\right) \times 100\%$$

式中 A——样品在 405 nm 处的吸光度
B——样品空白对照在 405 nm 处的吸光度
C——阴性对照在 405 nm 处的吸光度
D——阴性空白对照在 405 nm 处的吸光度

1.2.4 乳酸菌在人工模拟胃肠液中的存活率

方法参照文献[13]。首先是模拟胃肠液的配置。模拟胃液(Gj)的配置方法:将胃蛋白酶用 pH 值 2.5 的 PBS 溶解,使其终质量浓度为 3 g/L。模拟十二指肠液(Dj)的配置方法:将胆盐和胰蛋白酶用 pH 值 5.0 的 PBS 溶解,使其终质量浓度分别为 3 g/L 和 1 g/L。模拟肠液(Ij)的配置方法:将胰蛋白酶用 pH 值 8.0 的 PBS 溶解,使其终质量浓度为 1 g/L。所有配好的胃肠液经过 0.22 μm 的滤膜过滤。将活化第 2 代的乳酸菌于 MRS 培养基中 37 $^{\circ}\text{C}$ 静止培养 18 h,离心收集菌体并用 PBS(pH 值 7.4)洗涤 2 遍,重悬于同样体积的模拟 Gj(pH 值 2.5)中,37 $^{\circ}\text{C}$ 静止培养 3 h,然后取出 1 mL 菌液置于 9 mL 的模拟 Dj(pH 值 5.0)中,37 $^{\circ}\text{C}$ 静止培养 2 h。最后从模拟 Dj 中取出 1 mL 菌液置于模拟 Ij(pH 值 8.0)中 37 $^{\circ}\text{C}$ 静止培养 8 h。分别于 0、2、3、8 h 取样进行梯度稀释,于 MRS 固体培养基中 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h 计数。乳酸菌在人工模拟胃肠液中存活率计算公式为

$$N = \frac{\lg a}{\lg b} \times 100\%$$

式中 a——在模拟胃肠液中孵育特定时间后的活菌数
b——每次孵育前乳酸菌总的活菌数

1.2.5 乳酸菌对 HT-29 细胞的黏附性分析

黏附方法参照文献[13]。HT-29 细胞(15~20 代)用 DMEM 培养基(含有体积分数 10% 胎牛血清和 1% 双抗)于 37 $^{\circ}\text{C}$ 含有 5% CO_2 的培养箱中进行培养。待细胞增殖至 90% 融合时,用 0.25% 的胰酶消化后传代。

对于黏附实验,将胰酶消化后的细胞按照 10^5 个/孔接种于 24 孔板中,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h,然后

用 PBS(pH 值 7.4)洗涤 2 遍。与此同时,将静置培养 12 h 的乳酸菌 6 000 r/min 常温离心 5 min,并用 PBS(pH 值 7.4)洗涤 2 遍,重悬于不含血清和双抗的 DMEM 培养基中,调整其菌体浓度为 10^9 CFU/mL,然后取 1 mL 菌悬液加入准备好的 HT-29 细胞中,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 细胞培养箱中孵育 2 h。孵育完成后,用 PBS(pH 值 7.4)洗涤细胞 6 遍去掉未黏附的乳酸菌。单层细胞用甲醇固定后进行革兰氏染色。每个样品随机选 20 个视野计算细胞和乳酸菌数,以平均每个细胞上黏附的乳酸菌数目来评价乳酸菌对肠上皮细胞的黏附能力。

1.2.6 乳酸菌在不同生长阶段的 α -葡萄糖苷酶抑制活性

将菌株活化 2 代后按体积分数 1% 接种到 300 mL MRS 培养基中,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中静置培养。每隔 2 h 测菌株的 600 nm 处吸光度及 pH 值,并取出 10 mL 菌悬液 12 000 r/min 常温离心 15 min,收集菌体,PBS(pH 值 6.8)洗涤 3 遍,重悬于 200 μL PBS(pH 值 6.8)中,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 继续培养 6 h。培养后进行离心,取上清液冻存于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 用于测定 α -葡萄糖苷酶抑制活性。

1.2.7 Transwell 细胞模型的建立及评估

Caco-2 细胞(10~20 代)培养在含 10% 胎牛血清、1% 双抗和 1% 非必需氨基酸的 DMEM 培养基中。当细胞贴壁融合率约为 80% 时,用 0.25% 的胰酶消化细胞以后,按照密度 10^5 个/ cm^2 接种于 6 孔板的 Transwell 小室中(膜孔径 0.4 μm ,直径 24 mm,底面积 4.67 cm^2)。肠腔侧加入 1 mL 细胞悬液,基底侧加入 3 mL 细胞培养基,第 1~7 天隔天换液,从第 8 天开始每天换液,直到细胞形成单层致密的细胞膜。

Transwell 细胞模型的评估:检测细胞的跨膜电阻值,待跨膜电阻达到最大,用试剂盒检测细胞的碱性磷酸酶(AKP)极性,肠腔测得的 AKP 活性应显著高于基底侧^[17]。

1.2.8 乳酸菌对 Caco-2 细胞中 α -葡萄糖苷酶的影响

将已培养好的 Transwell 小室用 PBS 洗涤 3 次,去除葡萄糖。加入 800 μL 含 20 mmol/L 的麦芽糖作为底物,并加入乳酸杆菌的上清 200 μL (共 1 mL)到小室的上层,下层加入 3 mL PBS,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 2 h,从上层取 10 μL 溶液到微孔板中检测葡萄糖含量,以此计算对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制率,并用试剂盒提取 Caco-2 的总 RNA,反转录成 cDNA,然后进行实时荧光定量 PCR。用 Primer Premier 5 软件设计引物, α -葡萄糖苷酶基因扩增引物

为:上游引物 5' CGACGGAGAAGCAGTGAAG 3'; 下游引物 5' GGGTTGGTCTCTTGTGAACATTC 3'。 β -actin (β 肌动蛋白) 内参引物:上游引物 5' TGACGTGGACATCCGCAAAG3'; 下游引物 5' CTGGAAGGTGGACAGCGAGG3'。采用 $\Delta\Delta C_T$ 法计算基因的表达量^[18],每个样品设定 3 个平行。

1.3 数据处理

所有实验进行 3 次重复,结果由平均值 \pm 标准差表示,用 SPSS 20 软件分析数据,成对比较采用 Student's *T* 检验进行分析,多组比较采用 One-Way ANOVA 中 Duncan's 多重检验来分析, $P < 0.05$ 表示有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 菌株

所选用的 10 株乳酸菌(表 1)均分离于传统发酵食品,包括新鲜牛乳、奶酪(奶疙瘩)和泡菜。这 10 株菌中,有 5 株属于副干酪乳杆菌属,2 株属于植物乳杆菌属,3 株属于发酵乳杆菌属。乳酸菌中研究最广泛的益生菌鼠李糖乳杆菌 LGG 作为参考菌株。

表 1 乳酸菌菌株及来源

Tab.1 Lactic acid bacteria strains and their sources

菌株中文名	菌株编号	菌株描述	来源
鼠李糖乳杆菌	LGG	参考菌株	ATCC53103
副干酪乳杆菌	L14	分离于新鲜牛乳	文献[19]
副干酪乳杆菌	C	分离于新鲜牛乳	文献[19]
副干酪乳杆菌	SW2	分离于新鲜牛乳	文献[19]
副干酪乳杆菌	NL41	分离于奶酪(奶疙瘩)	文献[19]
副干酪乳杆菌	Z3-11	分离于新鲜牛乳	文献[19]
植物乳杆菌	PC41	分离于泡菜	文献[13]
植物乳杆菌	NL42	分离于奶酪(奶疙瘩)	文献[19]
发酵乳杆菌	NL31	分离于奶酪(奶疙瘩)	文献[19]
发酵乳杆菌	CA14	分离于奶酪(奶疙瘩)	文献[19]
发酵乳杆菌	Z2-91	分离于奶酪(奶疙瘩)	文献[19]

2.2 乳酸菌对猪小肠提取的 α -葡萄糖苷酶的抑制活性

所有选用菌株的分泌上清均具有 α -葡萄糖苷酶抑制活性,抑制率在 6% ~ 31% 不等,其中副干酪乳杆菌 L14 的抑制活性最高,为 31%,其次是副干酪乳杆菌 Z3-11(28%)、植物乳杆菌 NL42(27%) 和发酵乳杆菌 Z2-91(27%),这 4 株菌的抑制率与参考菌株鼠李糖乳杆菌 LGG(28%) 相比无显著性差异。已有部分研究报道乳酸菌的发酵上清具有 α -葡萄糖苷酶抑制活性^[13,20],与本研究结果保持一致。

α -葡萄糖苷酶抑制活性很大程度上受到 α -葡

萄糖苷酶来源的影响,最常见的来源是哺乳动物和微生物酵母^[21-23]。例如,酸奶对来源于哺乳动物的 α -葡萄糖苷酶不具有抑制活性但却能抑制来源于酵母的 α -葡萄糖苷酶^[22];合成的阿卡波糖对来源于酵母的 α -葡萄糖苷酶几乎没有抑制活性,但对来源于哺乳动物的 α -葡萄糖苷酶具有很强的抑制活性。这些抑制活性的差别可能归因于不同来源的酶结构不同所导致的抑制剂的结合位点不同^[22,24]。因此,本研究中,为了探究与人类健康密切相关的乳酸菌的 α -葡萄糖苷酶抑制活性,选取的是来源于哺乳动物的 α -葡萄糖苷酶。

2.3 乳酸菌对人工模拟胃肠液的耐受能力

益生菌发挥对人体的有益作用的前提是必须活着通过人体胃肠道环境。因此,进一步研究所选用菌株对人工模拟胃肠液的耐受性。首先,胃液的极低 pH 值(2.5 ~ 3.5)是阻止细菌进入人体肠道的天然屏障,而食物一般需要在胃中停留 2 ~ 4 h 进行消化^[25]。由表 2 可知,LGG、Z3-11 和 CA14 具有较强的抵抗低 pH 值的能力,在 pH 值 2.5 的模拟胃液中存活率超过 80%,但是 4 株菌株(C、SW2、NL31 和 Z2-91)在模拟胃液中的存活率很低,在同样稀释度的情况下未检测到活菌,说明乳酸菌对人工模拟胃肠液的耐受性具有菌株差异性。有研究表明菌株的耐酸能力依赖于其 H^+ -ATP 酶的活性^[26],所以本文中不同菌株的耐酸能力不同可能与它们的 H^+ -ATP 酶的活性有关。

表 2 乳酸菌在人工模拟胃肠液中的存活率

Tab.2 Tolerance of lactic acid bacteria strains to simulated gastrointestinal conditions %

菌株名称	模拟胃液	模拟十二指肠液	模拟肠液
LGG	83.5 \pm 0.2	ND	ND
L14	70.4 \pm 0.3	65.0 \pm 0.8	68.6 \pm 0.1
C	ND	ND	ND
SW2	ND	ND	ND
NL41	75.2 \pm 0.3	60.1 \pm 0.2	72.5 \pm 0.1
Z3-11	81.3 \pm 0.9	27.3 \pm 0.1	98.5 \pm 0.4
PC41	70.4 \pm 0.3	84.9 \pm 0.8	68.6 \pm 0.1
NL42	76.0 \pm 0.2	60.7 \pm 0.4	76.8 \pm 0.7
NL31	ND	ND	ND
CA14	86.1 \pm 1.7	ND	ND
Z2-91	ND	ND	ND

注:ND 表示在相同的稀释度下未检测到活菌。

在模拟十二指肠液中,PC41 具有最高的存活率,为 84.9%。其次是 L14、NL41 和 NL42,存活率超过 60%。胆盐可通过破坏细胞膜的完整性对活细胞造成巨大的损害^[27],因此对十二指肠液耐受性高可能是因为菌株对胆盐耐受能力好^[27-28]。

在模拟肠液中培养 8 h 后, 菌株的存活率得以提高, Z3-11 的存活率最高, 为 98.5%。在模拟肠液中菌株存活率增加可能是因为肠液的 pH 值升高和排除了胆盐的胁迫。

2.4 乳酸菌对肠上皮细胞的黏附能力

乳酸菌黏附肠上皮细胞的能力是长期以来用于筛选益生菌的一个非常重要的指标, 因为乳酸菌只有黏附于宿主的肠上皮细胞才能够促进其长期定植, 发挥免疫功能以及抑制腐败菌的生长^[29-30]。HT-29 为人结直肠腺癌细胞, 是体外检测微生物黏附性常用的一种细胞系。除 Z3-11、CA14 和 Z2-91 外, 所有被检测菌株黏附肠上皮细胞 HT-29 的能力均显著高于参考菌株 LGG。PC41 具有非常强的黏附肠上皮细胞的能力, 每个细胞黏附的菌数约为 148, 其次是 SW2、NL42 和 L14, 每个细胞黏附的菌数分别为 80、49 和 37。细菌对肠上皮细胞的黏附能力通常是由细菌表面的成分所介导, 包括黏附蛋白、胞外多糖、脂磷壁酸、S 层蛋白以及胞外的一些附属物(如菌毛和鞭毛等)^[31]。例如, 研究发现细胞表面的黏附蛋白 SpaCBA、MBF、MabA 和 SpaFED 是介导益生菌 *L. rhamnosus* GG 参与黏附肠上皮细胞的主要因子^[32-35]。胞外多糖和 2 个黏附蛋白 N506_1778、N506_1709 是参与益生菌 *L. gasserii* DSM 14869 黏附阴道上皮细胞的主要因子^[36]。本研究中黏附能力较强的菌株 PC41、SW2、NL42 和 L14 没有菌毛或鞭毛, 因此, 可能是它们表面的一些黏附因子(如胞外多糖、黏附蛋白)参与对上皮细胞的黏附。下一步可通过对它们进行基因组测序及生物信息学分析深入探讨黏附的分子机理。

结合这 10 株乳酸菌对猪小肠提取的 α -葡萄糖苷酶的抑制能力、人工模拟胃肠液的耐受性及对肠上皮细胞的粘附性, 菌株 L14、Z3-11 和 NL42 的

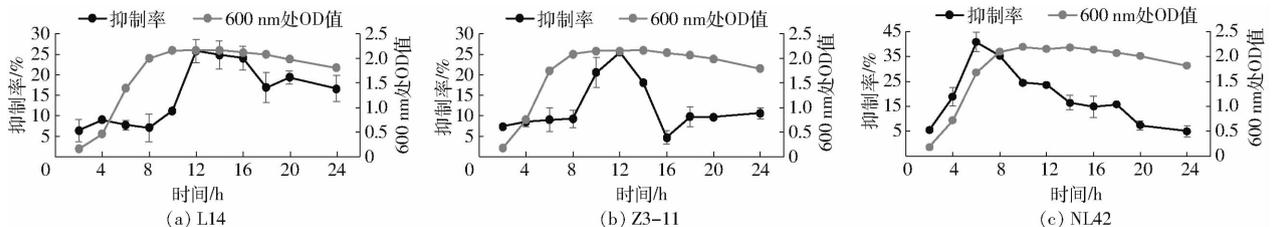


图 1 乳酸菌在不同生长阶段的 α -葡萄糖苷酶抑制活性

Fig. 1 α -glucosidase inhibition during growth of *Lactobacillus* strains

2.6 乳酸菌对 Caco-2 细胞中 α -葡萄糖苷酶的抑制作用

Caco-2 细胞为人的结直肠腺癌细胞, 在 Transwell 小室中, 经过标准条件培养能分化出与人体内小肠上皮细胞类似的结构, 包括基底层(相当

α -葡萄糖苷酶抑制活性较为突出, 且更有可能活着通过肠道并在肠道中定植, 可作为潜在的辅助调节糖尿病的益生菌株, 因此选择这 3 株菌作进一步的研究。

2.5 乳酸菌在不同生长阶段的 α -葡萄糖苷酶抑制活性

以 α -葡萄糖苷酶抑制活性较高且具有较好的益生特性的 3 株菌(副干酪乳杆菌 L14 和 Z3-11 及植物乳杆菌 NL42)为例来研究乳酸菌在不同生长阶段分泌上清的 α -葡萄糖苷酶抑制率。图 1 是 L14、Z3-11 和 NL42 在生长过程中的 600 nm 处 OD 值和 α -葡萄糖苷酶抑制率的变化。菌株 L14 的对数生长期是 2 ~ 10 h, 600 nm 处 OD 值由 0.2 升到 2.2, 其分泌上清的 α -葡萄糖苷酶抑制率随着时间的变化呈现先上升后下降的趋势, 在稳定期(12 h 时)达到最大, 在接下来的 12 h, 细胞 600 nm 处 OD 值略有降低, α -葡萄糖苷酶抑制率逐渐降低。菌株 Z3-11 和 NL42 的生长模式及 α -葡萄糖苷酶抑制率的变化趋势与 L14 几乎相同, 其分泌上清的 α -葡萄糖苷酶抑制率也呈现先上升后下降的趋势, 在稳定期(12 h 时)或对数末期(6 h 时)达到最大。乳酸菌分泌上清的 α -葡萄糖苷酶抑制率呈现先上升后下降的趋势, 可能是因为在前期菌体浓度较低导致具有抑制 α -葡萄糖苷酶活性的功能成分浓度也较低; 随着菌株的生长, 菌体浓度逐渐升高, 其分泌的功能活性成分浓度也增加, 因此 α -葡萄糖苷酶抑制活性也逐渐增加; 随着培养时间的进一步延长, 微生物细胞逐渐老化并出现自溶现象, 因此具有 α -葡萄糖苷酶抑制活性的成分可能会被菌体裂解产生的酶破坏, 加上乳酸菌本身代谢产酸, 导致生长后期培养液的 pH 值极低, 而功能活性成分可能在极低 pH 值中不稳定, 因此出现抑制活性下降的趋势。

于肠内壁一侧)和细胞绒毛层(相当于肠腔一侧), 并且可以合成各种酶类, 如 α -葡萄糖苷酶。该细胞模型目前已广泛用于研究生化、毒理及药物吸收和跨膜转运。上文发现乳酸菌的分泌上清对猪小肠提取的 α -葡萄糖苷酶具有抑制活性, 因此需进一步研

究乳酸菌是否对来源于人肠道的 Caco-2 细胞系的 α -葡萄糖苷酶活性也具有抑制作用,同时研究乳酸菌对 α -葡萄糖苷酶基因表达量的影响。

2.6.1 Transwell 细胞模型建立

将 Caco-2 细胞接种到 6 孔板的 Transwell 小室中,培养至细胞形成单层致密的细胞膜。在细胞培养的过程中,分别检测细胞跨膜电阻及碱性磷酸酶 (AKP) 的极性。

如图 2 所示,在培养期间,细胞的跨膜电阻 (TEER 值) 逐渐增加,从第 18 天开始已达到最大且基本保持稳定。TEER 值是反映细胞单层完整性的重要指标,其与细胞紧密连接的程度有直接关系,随着培养时间的增加,细胞的紧密连接逐渐完善,因此 TEER 值也逐渐增加,TEER 值越大,表明细胞单层越致密越完整^[37]。本研究中培养 18 d 后细胞 TEER 值达到稳定,说明 Caco-2 细胞已形成了完整的单层细胞膜。

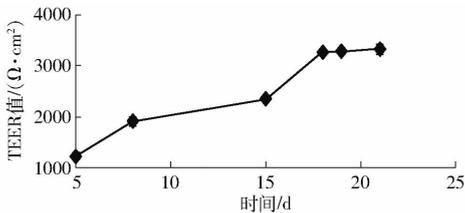


图2 Caco-2 细胞培养期间细胞跨膜电阻 TEER 值的变化曲线

Fig.2 TEER values of Caco-2 cell monolayer during process of growth

AKP 极性检测结果见图 3,在培养过程中,基底侧 AKP 活性几乎无变化,肠腔侧 AKP 活性则逐渐增加,在第 21 天时,细胞单层肠腔侧的 AKP 活性显著高于基底侧,约高出 2.34 倍,表明细胞单层已经形成了极性,标志酶 AKP 已大部分集中在刷状缘侧。

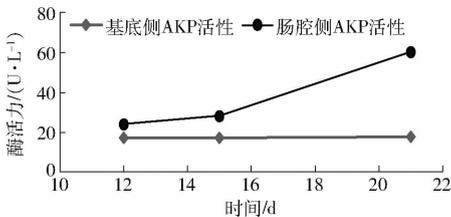


图3 Caco-2 单层细胞肠腔侧 (AP) 和基底侧 (BL) 的碱性磷酸酶活性 ($n=3$)

Fig.3 Alkaline phosphatase activity of Caco-2 monolayer sides of AP and BL ($n=3$)

综合跨膜电阻值和碱性磷酸酶 AKP 活性, Caco-2 细胞在 Transwell 小室中培养 21 d 时已生长和分化成类似于肠上皮细胞的单层细胞,并且具有上皮细胞的极化特征。

2.6.2 乳杆菌对 Caco-2 细胞中 α -葡萄糖苷酶的影响

乳杆菌 L14、Z3-11 和 NL42 的分泌上清对 Caco-2 细胞中 α -葡萄糖苷酶的酶活性均具有抑制作用,其中 L14 的抑制率最高,为 28%,显著高于 Z3-11 (22%) 和 NL42 (19%),菌株 Z3-11 和 NL42 的抑制率没有显著性差异。3 株菌均可显著抑制 Caco-2 细胞中 α -葡萄糖苷酶的 mRNA 表达量,抑制率分别为 58%、21% 和 38%,表明乳酸菌对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用是通过抑制 α -葡萄糖苷酶的活性及酶的表达量发挥双重作用,从而有效减缓碳水化合物的分解速度,减少单糖的生成。文献^[38]报道两歧双歧杆菌 F-35 对 Caco-2 细胞中 α -葡萄糖苷酶的活性及 mRNA 表达水平都具有抑制作用,本研究结果与其保持一致。

大部分的 α -葡萄糖苷酶抑制剂是糖类或糖的衍生物,通过竞争性抑制 α -葡萄糖苷酶的活性,降低多糖分解成葡萄糖的速率,使糖的吸收相应减缓,起到降低血糖的作用。也有少部分非糖类化合物被报道对 α -葡萄糖苷酶活性具有抑制作用,如文献^[39]报道非糖类化合物如磺胺类药物可通过疏水作用直接结合在酶的活性位点上进而发挥抑制作用,另外文献^[23,40]发现乳蛋白或鸡蛋蛋白水解产生的多肽也具有较强的 α -葡萄糖苷酶抑制活性。关于乳酸菌的 α -葡萄糖苷酶抑制活性成分的研究,目前还没有明确的结果,文献^[41]报道用产胞外多糖的菌株发酵的酸奶具有更强的 α -葡萄糖苷酶抑制活性,推测这种抑制活性可能是由菌株产生的胞外多糖引起的,但是没有进一步纯化出胞外多糖进行验证,因此有关乳酸菌上清液中酶抑制剂的活性成分、抑制机理及影响因素,尚需进一步的研究。

3 结束语

本文将分离于传统乳制品的 10 株乳杆菌进行了 α -葡萄糖苷酶抑制活性的测定,并研究了乳酸菌的基本益生特性,包括耐酸、耐胆盐和对肠上皮细胞的黏附性。结果表明,这 10 株菌对猪小肠提取的 α -葡萄糖苷酶均具有抑制作用,结合乳酸菌的基本益生特性,最终筛选出了 3 株具有较高 α -葡萄糖苷酶抑制活性和优良益生特性的菌株,分别是副干酪乳杆菌 L14、Z3-11 和植物乳杆菌 NL42;这 3 株菌在 Caco-2 细胞建立的 Transwell 模型中也能对 α -葡萄糖苷酶发挥抑制活性。本文筛选出的 3 株乳杆菌可作为潜在的辅助降血糖的益生菌株,为功能益生菌的开发奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] IMAMURA K, TSUYAMA Y, HIRATA T. Identification and characterization of a novel fermented substance produced by edible *Aspergillus oryzae* AO-1 that inhibits DPP-IV activity [J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2011, 111(1): 37-40.
- [2] GLUCOTROL X. Oral agents in the management of type 2 diabetes mellitus [J]. *American Family Physician*, 2001, 63(9): 1747-1756.
- [3] 顾觉奋, 陈紫娟. α -葡萄糖苷酶抑制剂的研究及应用 [J]. *药学进展*, 2009, 33(2): 62-67.
GU Juefen, CHEN Zijuan. The studies and applications of α -glucosidase inhibitors [J]. *Progress in Pharmaceutical Sciences*, 2009, 33(2): 62-67. (in Chinese)
- [4] 陈一鸣. α -糖苷酶抑制剂产生菌的筛选、分类鉴定及其发酵培养基的优化 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2009.
CHEN Yiming. Screening, taxonomy and culture medium optimization for producing α -glucosidase inhibitors by *Streptomyces* spp. [D]. Shenyang: Shenyang Pharmaceutical University, 2009. (in Chinese)
- [5] BERMUDEZ-HUMARAN L G, AUBRY C, MOTTA J P, et al. Engineering lactococci and lactobacilli for human health [J]. *Current Opinion Microbiology*, 2013, 16(3): 278-283.
- [6] 高振鹏, 宋杨, 张美娜, 等. 益生菌发酵苹果汁过程中总酚酸变化与动力学研究 [J/OL]. *农业机械学报*, 2019, 50(11): 350-356.
GAO Zhenpeng, SONG Yang, ZHANG Meina, et al. Changes and kinetics of total phenolic acids of apple juice fermented by probiotics [J/OL]. *Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery*, 2019, 50(11): 350-356. http://www.j-csam.org/jcsam/ch/reader/view_abstract.aspx?flag=1&file_no=20191139&flag=1. DOI:10.6041/j.issn.1000-1298.2019.11.039. (in Chinese)
- [7] CASTRO-MEJIA J L, O'FERRALL S, KRYCH L, et al. Restitution of gut microbiota in Ugandan children administered with probiotics (*Lactobacillus rhamnosus* GG and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12) during treatment for severe acute malnutrition [J]. *Gut Microbes*, 2020, 11(4): 855-867.
- [8] SHONYELA S M, WANG G, YANG W T, et al. New progress regarding the use of lactic acid bacteria as live delivery vectors, treatment of diseases and induction of immune responses in different host species focusing on *Lactobacillus* species [J]. *World Journal of Vaccines*, 2017, 7(4): 43-75.
- [9] ZENG Z, YUAN Q P, YU R, et al. Ameliorative effects of probiotic *Lactobacillus paracasei* NI41 on insulin sensitivity, oxidative stress, and beta-cell function in a type 2 diabetes mellitus rat model [J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2019, 63(22): 1900457.
- [10] 文鹏程, 隋馨瑶, 孙二娜, 等. 航天诱变高产酸副干酪乳杆菌 A-4-2 性质与酶活性研究 [J/OL]. *农业机械学报*, 2019, 50(1): 346-353.
WEN Pengcheng, SUI Xinyao, SUN Erna, et al. Characteristics and enzyme activity of *Lactobacillus paracasei* A-4-2 produced by space mutation [J/OL]. *Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery*, 2019, 50(1): 346-353. http://www.j-csam.org/jcsam/ch/reader/view_abstract.aspx?file_no=20190139&flag=1. DOI:10.6041/j.issn.1000-1298.2019.01.039. (in Chinese)
- [11] 王瑶, 李琪, 李平兰. 植物乳杆菌 LPL-1 产细菌素发酵培养基优化 [J/OL]. *农业机械学报*, 2018, 49(9): 311-317.
WANG Yao, LI Qi, LI Pinglan. Optimization of fermentation medium of *Lactobacillus plantarum* LPL-1 for plantaricin LPL-1 production by response surface methodology [J/OL]. *Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery*, 2018, 49(9): 311-317. http://www.j-csam.org/jcsam/ch/reader/view_abstract.aspx?file_no=20180936&flag=1. DOI:10.6041/j.issn.1000-1298.2018.09.036. (in Chinese)
- [12] PANWAR H, CALDERWOOD D, GRANT I R, et al. *Lactobacillus* strains isolated from infant faeces possess potent inhibitory activity against intestinal alpha- and beta-glucosidases suggesting anti-diabetic potential [J]. *European Journal of Nutrition*, 2014, 53(7): 1465-1474.
- [13] ZENG Z, LUO J Y, ZUO F L, et al. Screening for potential novel probiotic *Lactobacillus* strains based on high dipeptidyl peptidase IV and α -glucosidase inhibitory activity [J]. *Journal of Functional Foods*, 2016, 20: 486-495.
- [14] PANWAR H, RASHMI H M, BATISH V K, et al. Probiotics as potential biotherapeutics in the management of type 2 diabetes-prospects and perspectives [J]. *Diabetes-Metabolism Research and Reviews*, 2013, 29(2): 103-112.
- [15] MIYOSHI M, OGAWA A, HIGURASHI S, et al. Anti-obesity effect of *Lactobacillus gasseri* SBT2055 accompanied by inhibition of pro-inflammatory gene expression in the visceral adipose tissue in diet-induced obese mice [J]. *European Journal of Nutrition*, 2014, 53(2): 599-606.
- [16] ZHANG Y, WANG L F, ZHANG J C, et al. Probiotic *Lactobacillus casei* Zhang ameliorates high-fructose-induced impaired glucose tolerance in hyperinsulinemia rats [J]. *European Journal of Nutrition*, 2014, 53(1): 221-232.
- [17] 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.
ZHA Longying, LUO Haiji, DENG Hong, et al. Establishment and assessment of Caco-2 cell *in vitro* absorption model [J]. *Journal of Southern Medical University*, 2009, 29(3): 326-328. (in Chinese)
- [18] SCHMITTGEN T D, LIVAK K J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C_T method [J]. *Nature Protocols*, 2008, 3(6): 1101-1108.
- [19] ZUO F L, FENG X J, CHEN L L, et al. Identification and partial characterization of lactic acid bacteria isolated from traditional dairy products produced by herders in the western Tianshan Mountains of China [J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2014, 59(5): 549-555.
- [20] CHEN P, ZHANG Q X, DANG H, et al. Screening for potential new probiotic based on probiotic properties and α -glucosidase inhibitory activity [J]. *Food Control*, 2014, 35(1): 65-72.
- [21] MATSUI T, YOSHIMOTO C, OSAJIMA K, et al. *In vitro* survey of α -glucosidase inhibitory food components [J]. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 1996, 60(12): 2019-2022.
- [22] OKI T, MATSUI T, OSAJIMA Y. Inhibitory effect of α -glucosidase inhibitors varies according to its origin [J]. *Journal of*

Agriculture and Food Chemistry, 1999, 47(2): 550 – 553.

- [23] LACROIX I M E, LI-CHAN E C Y. Inhibition of dipeptidyl peptidase (DPP)-IV and α -glucosidase activities by pepsin-treated whey proteins [J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2013, 61(31): 7500 – 7506.
- [24] KIM S H, JO S H, KWON Y I, et al. Effects of onion (*Allium cepa* L.) extract administration on intestinal α -glucosidase activities and spikes in postprandial blood glucose levels in SD rats model [J]. International Journal of Molecular Science, 2011, 12(6): 3757 – 3769.
- [25] HUANG Y, ADAMS M C. *In vitro* assessment of the upper gastrointestinal tolerance of potential probiotic dairy propionibacteria [J]. International Journal of Food Microbiology, 2004, 91(3): 253 – 260.
- [26] MATSUMOTO M, OHISHI H, BENNO Y. H⁺-ATPase activity in *Bifidobacterium* with special reference to acid tolerance [J]. International Journal of Food Microbiology, 2004, 93(1): 109 – 113.
- [27] LEVERRIER P, DIMOVA D, PICHEREAU V, et al. Susceptibility and adaptive response to bile salts in *Propionibacterium freudenreichii*: physiological and proteomic analysis [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(7): 3809 – 3818.
- [28] LIONG M T, SHAH N P. Bile salt deconjugation ability, bile salt hydrolase activity and cholesterolco-precipitation ability of lactobacilli strains [J]. International Dairy Journal, 2005, 15(4): 391 – 398.
- [29] ARGYRI A A, ZOUPOPOULOU G, KARATZAS K A, et al. Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by *in vitro* tests [J]. Food Microbiology, 2013, 33(2): 282 – 291.
- [30] COLLADO M C, ISOLAURI E, SALMINEN S, et al. The impact of probiotic on gut health [J]. Current Drug Metabolism, 2009, 10(1): 68 – 78.
- [31] JUGE N. Microbial adhesins to gastrointestinal mucus [J]. Trends in Microbiology, 2012, 20(1): 30 – 39.
- [32] KANKAINEN M, PAULIN L, TYNKKYNEN S, et al. Comparative genomic analysis of *Lactobacillus rhamnosus* GG reveals pili containing a human-mucus binding protein [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009, 106(40): 17193 – 17198.
- [33] LEBEER S, CLAES I, TYTGAT H L, et al. Functional analysis of *Lactobacillus rhamnosus* GG pili in relation to adhesion and immunomodulatory interactions with intestinal epithelial cells [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(1): 185 – 193.
- [34] VELEZ M P, PETROVA M I, LEBEER S, et al. Characterization of MabA, a modulator of *Lactobacillus rhamnosus* GG adhesion and biofilm formation [J]. FEMS Immunology and Medical Microbiology, 2010, 59(3): 386 – 398.
- [35] VON OSSONWSKI I, SATOKARI R, REUNANEN J, et al. Functional characterization of a mucus-specific LPXTG surface adhesin from probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(13): 4465 – 4472.
- [36] ZENG Z, ZUO F L, MARCOTTE H. Putative adhesion factors in vaginal *Lactobacillus gasseri* DSM 14869: functional characterization [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2019, 85(19): e00800 – 19.
- [37] INA H, EVA G E R, PER A. Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers [J]. Nature Protocol, 2007, 2(9): 2111 – 2119.
- [38] 陈佩, 党辉, 张秋香, 等. 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 [J]. 食品工业科技, 2013, 34(17): 177 – 180.
- CHEN Pei, DANG Hui, ZHANG Qiuxiang, et al. Effect of *Bifidobacterium bifidum* F-35 on α -glucosidase enzyme activity and the transportation of glucose [J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(17): 177 – 180. (in Chinese)
- [39] BHARATHAM K, BHARATHAM N, PARK K H, et al. Binding mode analyses and pharmacophore model development for sulfonamide chalcone derivatives, a new class of alpha-glucosidase inhibitors [J]. Journal of Molecular Graphics & Modelling, 2008, 26(8): 1202 – 1212.
- [40] YU Z, YIN Y, ZHAO W, et al. Novel peptides derived from egg white protein inhibiting alpha-glucosidase [J]. Food Chemistry, 2011, 129(4): 1376 – 1382.
- [41] RAMCHANDRAN L, SHAH N P. 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(6): 583 – 600.