

两种 α -糖苷酶抑制剂体外筛选模型的改良与比较

文丽霞^{1,2}, 吴正钧^{1*}, 郭本恒^{1,2}

¹光明乳业股份有限公司 乳业生物技术国家重点实验室, 上海 200436; ²上海海洋大学食品学院, 上海 201306

摘要: α -糖苷酶抑制剂可以控制餐后血糖浓度波动, 从而达到预防和治疗糖尿病的作用。本文对两种 α -糖苷酶抑制剂体外筛选模型进行了改进。结果表明, 以阿卡波糖作阳性对照, 两种模型均适用于以脱脂乳为生长介质的产 α -糖苷酶抑制剂的乳酸菌的筛选。选取 12 株特定乳酸菌分别用两种模型测其发酵脱脂乳上清对 α -糖苷酶的抑制活性, 两种模型筛选结果一致, 但测得的抑制活性呈现一定的差异。当加入到脱脂乳中的阿卡波糖浓度较低时, 以麦芽糖为底物的酶-抑制剂模型测得的 α -糖苷酶抑制活性高于以 4-硝基酚- α -D-吡喃葡萄糖苷 (PNPG) 为底物的酶-抑制剂模型。

关键词: α -糖苷酶抑制剂; 阿卡波糖; 4-硝基酚- α -D-吡喃葡萄糖苷; 麦芽糖; 乳酸菌

中图分类号: R284. 2

文献标识码: A

DOI: 10. 16333/j. 1001-6880. 2015. 04. 024

Modification and Comparison of Two *in vitro* Assay Methods for Screening α -Glucosidase Inhibitors Produced by Lactic Acid Bacteria

WEN Li-xia^{1,2}, WU Zheng-jun^{1*}, GUO Ben-heng^{1,2}

¹State Key Laboratory of Dairy Biotechnology, Bright Dairy & Foods Co., Ltd., Shanghai 200436, China;

²College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: α -Glucosidase inhibitors are therapeutic agents for reducing postprandial hyperglycemia, which are widely applied in clinics for prevention and management of type II diabetes mellitus. In this study, two *in vitro* assay methods were modified to adopt the screening α -glycosidase inhibitors (α -GI) produced in reconstituted skimmed milk by lactic acid bacteria, enrolling acarbose as a positive control. Both of the modified *in vitro* assay methods were proved to be suitable for screening α -GI produced by lactic acid bacteria, with the half inhibitory concentration (IC_{50}) for acarbose of 0. 6056 mg/mL obtained by PNPG method and 0. 3843 mg/mL by maltose α -glucosidase method respectively. The inhibitory effects of 12 selected lactic acid bacteria strains were consistent between the PNPG and the maltose α -glucosidase method, although the inhibitory rates measured by the latter method were slightly higher. When in low concentration, the inhibitory rates of acarbose in reconstituted skimmed milk obtained by maltose α -glucosidase (invertase) method were higher than those by PNPG method.

Key words: α -glucosidase inhibitor; acarbose; *p*-nitrophenol- α -glucopyranoside; maltose; lactic acid bacteria

糖尿病成为与癌症、心脑血管疾病并列的三大致死性疾病。目前治疗糖尿病的口服药物主要有五类:磺酰脲类、格列奈类、双胍类、噻唑烷二酮类和 α -糖苷酶抑制剂 (α -GI), 此外还有胰岛素和胰岛素类似物^[1]。目前, 在临床上应用的 α -糖苷酶抑制剂类降血糖药物主要有阿卡波糖、伏格列波糖、米格列醇^[2]。阿卡波糖, 商品名拜糖平, 是德国于 1977 年从游动放线菌的次级代谢产物中分离提取得到的一

种假性四糖结构的 α -GI^[3], 广泛应用于 II 型糖尿病的防治。

最新的研究结果表明, 部分特定的乳酸菌或其发酵制品有防治糖尿病的作用^[4-7]。如 Hani AL-SALAMI 等^[6]用 *L. acidophilus*、*B. lactis* 和 *L. rhamnosus* 组成的复合益生菌喂给糖尿病小鼠, 发现其体内的血糖浓度降低了两倍多。S. I. Yun 等^[8]研究了 *L. gasseri* BNR17 对 II 型糖尿病小鼠血糖浓度和体重的影响, 结果表明, *L. gasseri* BNR17 能够有效地降低 II 型糖尿病小鼠的血糖浓度, 且对糖尿病“三多一少”的症状有明显改善作用, 其中, 喂给 *L. gasseri* BNR17 10^{10} CFU/(d · kg) 的 II 型糖尿病小鼠体内的

收稿日期: 2014-02-28 接受日期: 2014-06-11

基金项目: 国家“十二五”科技支撑计划 (2013BAD18B01); “863”计划 (2011AA100901)

* 通讯作者 E-mail: wuzhengjun@brightdairy.com

HbA1c 值降低, HbA1c 是长期调控血糖平衡的重要因子, 反映血红蛋白周围葡萄糖的多少。Hariom Yadav 等^[9]通过实验证明由 *L. acidophilus* 和 *L. casei* 制备的发酵乳能够显著地减缓高果糖引发的葡萄糖耐受不良、高血糖症、高胰岛素血症、血脂异常症以及氧化应激反应。

α -糖苷酶抑制剂筛选模型有酶-抑制剂筛选模型、高血糖动物筛选模型、微孔板筛选模型以及固定化酶筛选模型等^[10]。本试验对两种 α -糖苷酶抑制剂体外筛选模型进行改进, 并以磷酸盐缓冲液、无菌脱脂乳配制阿卡波糖作为阳性对照验证模型, 以确定两种改良后的 α -糖苷酶抑制剂筛选模型是否适用于乳酸菌发酵液中 α -GI 的筛选。试验中选取 12 株特定乳酸菌, 利用两种改良后的 α -糖苷酶抑制剂体外筛选模型测试其产生 α -GI 的作用, 并对测试结果进行比较, 还对两种筛选模型测得的脱脂乳中所含低浓度阿卡波糖的 α -GI 的作用加以对比分析, 以期筛选产 α -GI 的乳酸菌提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种

L. reuteri BD02764, *Lactococcus lactis* LN, *L. acidophilus* NCFM, *Leuconostoc mesenteroides* BD1710 (CGMCC6432), *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LB340, *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* TA40, *S. salivarius* subsp. *thermophilus* TA45, *L. casei* LC2W (CGMCC 0828), *L. rhamnosus* KF-7 (CGMCC 6430), *L. rhamnosus* Y-37, *L. brevis* 22-22 (CGMCC 5223), *L. casei* ATCC334。

1.1.2 培养基

MRS 固体培养基 (Merck, 德国)、M17 固体培养基 (Merck, 德国)、M17 + 5% 蔗糖培养基、10% (w/w) 脱脂乳。

1.1.3 试剂

葡萄糖测定试剂盒-氧化酶法 (Glucose Oxidase Method, GOD) E1010, 北京普利莱基因技术有限公司; 4-硝基酚- α -D-吡喃葡萄糖苷, 美国 Sigma 公司; 麦芽糖 ($\geq 99.5\%$), 中国医药 (集团) 上海化学试剂公司; 酿酒酵母 α -糖苷酶, 美国 Sigma 公司; 阿卡波糖, 美国 Sigma 公司; 脱脂乳粉, 新西兰乳品 (中国) 有限公司; NaOH 等均为分析纯, 中国医药 (集团) 上海化学试剂公司。

1.1.4 仪器

Stratos 离心机, sorvall 公司; PB-10 型 pH 计, Sartorius 公司; Spectra Max M5 多功能酶标仪, 美国 Molecular Devices 公司。

1.2 方法

1.2.1 α -糖苷酶抑制剂筛选模型的改进

1.2.1.1 以 PNPG 为底物的酶-抑制剂筛选模型

将 Chapdelaine P、Tremblay RR^[11] 等使用的以 PNPG 为底物的 α -糖苷酶抑制剂体外筛选模型加以改良, 步骤如下: 取 100 μ L 待测样品于 1.5 mL EP 管, 加入 50 μ L α -糖苷酶 (100 mU/mL), 混匀, 37 $^{\circ}$ C 温育 15 min, 然后加入 80 μ L PNPG (2 mmol/L), 混匀, 37 $^{\circ}$ C 反应 15 min, 最后加入 80 μ L 0.2 mol/L Na_2CO_3 终止反应, 离心 2 min (4 $^{\circ}$ C、10,000 rpm), 取 200 μ L 上清于 96 孔微孔板, 在 405 nm 波长下用 Spectra Max M5 多功能酶标仪测定吸光度。平行实验 3 次, 取平均值。代入以下公式计算 α -糖苷酶抑制率。

$$\text{抑制率}(\%) = \left[\frac{(\text{OD}_{\text{阴性对照组}} - \text{OD}_{\text{阴性空白组}})}{(\text{OD}_{\text{样品组}} - \text{OD}_{\text{样品空白组}})} \right] \div \left[\frac{(\text{OD}_{\text{阴性对照组}} - \text{OD}_{\text{阴性空白组}})}{(\text{OD}_{\text{阴性对照组}} - \text{OD}_{\text{阴性空白组}})} \right] \times 100\%$$

注: 阴性对照组为 0.1 mol/L、pH = 6.8 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 替代待测样品; 阴性空白组为 PBS 替代阴性对照组中的 α -糖苷酶; 样品空白组为 PBS 替代样品组中的 α -糖苷酶。

1.2.1.2 以麦芽糖为底物的酶-抑制剂筛选模型

结合微孔板法, 将范文娅^[12] 等以麦芽糖为底物的 α -糖苷酶抑制剂体外筛选模型方法略加改动。取 PBS 100 μ L 于 1.5 mL EP 管, 加入 100 μ L α -糖苷酶 (10 U/mL), 然后加入待测样品 250 μ L, 最后加入麦芽糖 50 μ L (10 mmol/L), 混匀, 37 $^{\circ}$ C 温育 30 min, 沸水浴 5 min 终止反应, 离心 2 min (4 $^{\circ}$ C、10,000 rpm), 得上清液待测。

取 195 μ L 葡萄糖测定工作液于 96 孔微孔板, 于 37 $^{\circ}$ C 保温 15 min, 然后吸取 5 μ L 反应上清液加入工作液中, 混匀, 37 $^{\circ}$ C 反应 20 min 后, 在 550 nm 波长下用 Spectra Max M5 多功能酶标仪测定吸光度。按照 1.2.1.1 中抑制率公式计算 α -糖苷酶抑制率。平行实验重复 3 次, 取平均值。

1.2.2 筛选模型的验证

1.2.2.1 阿卡波糖在 PBS 体系中对 α -糖苷酶的抑制作用

将阿卡波糖用 PBS 配制为 5.00 mg/mL。用

PBS 依次稀释至 2.00、1.00、0.80、0.60、0.40、0.20、0.10、0.01 mg/mL。应用两种筛选模型,测定不同浓度阿卡波糖对 α -糖苷酶的抑制活性。

1.2.2.2 阿卡波糖在脱脂乳中对 α -糖苷酶的抑制作用

将阿卡波糖用 10% (w/w) 无菌脱脂乳配制为 2.0 mg/mL。用脱脂乳依次稀释至:1.0、0.5、0.25、0.125 mg/mL。用 1 mol/L 乳酸调 pH 至 4.5,室温静置 30 min,离心 10 min(4 °C、9000 rpm)。取上清液,用 1 mol/L NaOH 调 pH 值至 6.8,离心取上清待测。应用两种筛选模型,测定不同浓度阿卡波糖对 α -糖苷酶的抑制活性。

1.2.3 采用三氯乙酸(TCA)除蛋白对 PNPG 法的影响

参照 L. Ramchandran、N. P. Shah^[13]采用 TCA 沉淀乳酸菌发酵液中蛋白的方法:10% 无菌脱脂乳、MilliQ 水与 0.75 mol/L TCA 按照 5:1:10 的比例混匀,离心 30 min(4 °C、4,754 rpm),取上清液,上清液进行 0.45 μ m 膜过滤,得滤液。

取滤液配制 2.0 mg/mL 阿卡波糖溶液。将其梯度稀释至:1.0、0.5、0.25、0.125 mg/mL。采用以 PNPG 为底物的酶-抑制剂模型,测定不同浓度阿卡波糖对 α -糖苷酶的抑制活性。

1.2.4 两种模型应用于产 α -GI 的乳酸菌的筛选结果对比

菌种活化后,接种于 6 mL 无菌脱脂乳中,待凝乳后,接种于 100 mL 无菌脱脂乳中,接种量为 6%,分别于 24、48、96 h 取 5 mL 发酵脱脂乳,于沸水浴煮沸 5 min,冷却离心(4 °C、9,000 rpm,10 min),用 1 mol/L NaOH 调 pH 值至 6.8,再离心取上清,分别用两种模型测其对 α -糖苷酶的抑制率。

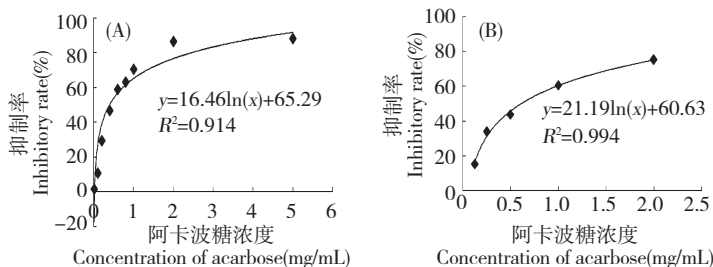


图 1 在 PBS 体系中 (A) 和脱脂乳中 (B) 采用 PNPG 法测定的阿卡波糖对 α -糖苷酶的抑制作用

Fig. 1 Inhibitory effects of different concentrations of acarbose in PBS (A) and in reconstituted skimmed milk (B) to α -glucosidase measured by PNPG method

1.2.5 两种模型测得低浓度阿卡波糖对 α -糖苷酶的抑制活性对比

用 10% (w/w) 无菌脱脂乳配制 0.2 mg/mL 阿卡波糖溶液。将其梯度稀释至:0.1、0.05、0.025、0.0125 mg/mL。参照 1.2.2.2 用乳酸与 NaOH 调 pH 值,离心取上清待测。应用两种 α -糖苷酶抑制剂筛选模型,测定无菌脱脂乳中所含低浓度阿卡波糖对 α -糖苷酶的抑制活性。

2 结果与讨论

2.1 两种改良后的体外筛选模型测定的阿卡波糖对 α -糖苷酶的抑制作用

2.1.1 PNPG 法

以 PBS 配制不同浓度的阿卡波糖,应用以 PNPG 为底物的酶-抑制剂体外筛选模型,测定不同浓度阿卡波糖对 α -糖苷酶的抑制活性,见图 1(A),根据拟合的底物-抑制率方程,推算出阿卡波糖在 PBS 体系中的 $IC_{50} = 0.3950$ mg/mL,王佳佳^[14]在试验中所用的以 PNPG 为底物的酶-抑制剂筛选模型得到的阿卡波糖 $IC_{50} = 0.4167$ mg/mL。

为了模拟乳酸菌发酵液样品,试验中用无菌脱脂乳配制不同浓度的阿卡波糖,然后用 1 mol/L 乳酸调 pH 值至 4.5,离心 10 min(4 °C、9,000 rpm)后取上清液,再用 1 mol/L NaOH 调 pH 值至 6.8,离心取上清,测定其对 α -糖苷酶的抑制活性。在用乳酸调酸去蛋白、再调 pH 的过程中,溶液体积变化极小,所以对阿卡波糖的浓度影响甚微。应用以 PNPG 为底物的酶-抑制剂体外筛选模型,测定不同浓度阿卡波糖对 α -糖苷酶的抑制活性,见图 1(B),根据拟合的底物-抑制率方程,推算出阿卡波糖在脱脂乳体系中的 $IC_{50} = 0.6056$ mg/mL。

图 1(A) 所示,用 PBS 配制的阿卡波糖对于 α -

糖苷酶具有剂量依赖性的抑制作用,图 1(B) 所示,

用无菌脱脂乳配制的不同浓度阿卡波糖溶液对 α -糖苷酶依然具有剂量依赖性的抑制作用,表明通过乳酸调酸去蛋白后的发酵液样品,可以直接用于以 PNPG 为底物的酶-抑制剂体外筛选模型进行产 α -GI 的乳酸菌的筛选。

以 TCA 沉淀蛋白后的无菌脱脂乳配制不同浓度阿卡波糖,应用以 PNPG 为底物的酶-抑制剂体外筛选模型,测得 0、0.125、0.25、0.5、1、2 mg/mL 阿卡波糖对 α -糖苷酶的抑制率分别为 $86.72 \pm 0.34\%$ 、 $87.96 \pm 0.21\%$ 、 $87.89 \pm 0.32\%$ 、 $87.90 \pm 0.27\%$ 、 $87.90 \pm 0.35\%$ 、 $87.29 \pm 0.69\%$,可得出在 TCA 沉淀蛋白后的无菌脱脂乳中阿卡波糖对 α -糖苷酶不具有剂量依赖性抑制作用。因此,在筛选产 α -GI 的乳酸菌时,如果采用 TCA 沉淀的方法去除蛋白可能会产生假阳性。在 Ramchandran L、Shah NP^[13] 试验结果中,供试乳酸菌发酵 3、6 h 后采用

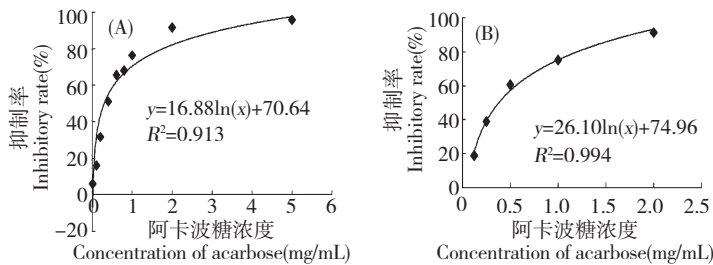


图2 在 PBS 体系中 (A) 和脱脂乳中 (B), 采用麦芽糖法测定的阿卡波糖对 α -糖苷酶的抑制作用

Fig. 2 Inhibitory effects of different concentrations of acarbose in PBS (A) and in reconstituted skimmed milk (B) to α -glucosidase measured by maltose method

图2(A)所示,用 PBS 配制的阿卡波糖对于 α -糖苷酶具有剂量依赖性的抑制作用。图2(B)所示,用无菌脱脂乳配制不同浓度阿卡波糖溶液,应用以麦芽糖为底物的酶-抑制剂体外筛选模型测定抑制率,得出其对于 α -糖苷酶也具有剂量依赖性的抑制作用,表明通过乳酸调酸去蛋白后的发酵液样品,也可以直接用于所改良的以麦芽糖为底物的酶-抑制剂体外筛选模型进行产 α -GI 的乳酸菌的筛选。

2.2 试验菌株在脱脂乳中的生长情况

12 株试验菌株中,乳杆菌采用 MRS 琼脂 37 °C 厌氧培养 48 h,球菌采用 M17 琼脂 30 °C 厌氧培养 48 h, *Leuconostoc mesenteroides* BD1710 采用 M17 + 5% 蔗糖琼脂 30 °C 厌氧培养 48 h 进行活化,从新鲜培养的平板上挑取单一菌落,分别接种于 6 mL 无菌脱脂乳 10% (w/w) 培养基中,37 °C 静置培养 24 h,其中 *Lactococcus lactis* LN 和 *Leuconostoc mesenteroides* BD1710

TCA 沉淀蛋白的方式,得出所有供试乳酸菌的 α -糖苷酶抑制率均为 65% ~ 85%,有可能是采用 TCA 处理所引起。

2.1.2 以麦芽糖为底物的酶-抑制剂筛选模型

以 PBS 配制不同浓度的阿卡波糖,以麦芽糖为底物的酶-抑制剂体外筛选模型,测定不同浓度阿卡波糖对 α -糖苷酶的抑制活性,见图 2(A),根据拟合的底物-抑制率方程,推算出阿卡波糖在 PBS 体系中的 $IC_{50} = 0.2944$ mg/mL。

以无菌脱脂乳配制的不同浓度阿卡波糖浓度为横坐标,抑制率为纵坐标,应用建立的以麦芽糖为底物的酶-抑制剂体外筛选模型,测定不同浓度阿卡波糖对 α -糖苷酶的抑制活性,见图 2(B),根据拟合的底物-抑制率方程,推算出阿卡波糖在脱脂乳体系中的 $IC_{50} = 0.3843$ mg/mL。

于 30 °C 静置培养 24 h,观察凝乳情况。见表 1。

由表 1 可以看出,12 株供试乳酸菌 24 h 内凝乳状况存在明显的差异性,其中 *L. reuteri* BD02764、*Lactococcus lactis* LN、*Leuconostoc mesenteroides* BD1710、*L. brevis* 22-22 未凝乳,表明这 4 株菌在 10% (w/w) 脱脂乳中不能发酵乳糖产酸或者不适宜其生长,而其余 8 株乳酸菌 24 h 内凝乳良好,说明这 8 株乳酸菌能够发酵乳糖等产生乳酸,随着乳酸的积累,pH 降低,使得脱脂乳中酪蛋白凝固,从而产生凝乳现象。

2.3 两种模型应用于产 α -GI 的乳酸菌的筛选结果对比

将 8 株凝乳菌株接种于 100 mL 无菌脱脂乳中,接种量为 6%,分别于 24、48、96 h 取 5 mL 发酵脱脂乳,于沸水浴煮沸 5 min,冷却离心 (4 °C, 9,000 rpm, 15 min),用 1 mol/L NaOH 调 pH 值至 6.8,再

表 1 12 株供试乳酸菌发酵 24h 凝乳情况

Table 1 Curdling activity of 12 tested strains fermented for 24 hours

试验菌株 Tested strains	培养温度(°C) Incubation temperature	凝乳状态 Curding activity
<i>L. reuteri</i> BD02764	37	-
<i>Lactococcus lactis</i> LN	30	-
<i>L. acidophilus</i> NCFM	37	+
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> BD1710(CGMCC6432)	30	-
<i>L. bulgaricus</i> LB340	37	+
<i>S. thermophilus</i> TA40	37	+
<i>S. thermophilus</i> TA45	37	+
<i>L. casei</i> LC2W(CGMCC 0828)	37	+
<i>L. casei</i> ATCC334	37	+
<i>L. rhamnosus</i> KF-7(CGMCC 6430)	37	+
<i>L. rhamnosus</i> Y-37	37	+
<i>L. brevis</i> 22-22(CGMCC 5223)	37	-

注:“+”表明 24 h 凝乳;“-”表明 24 h 内未凝乳。

Note:“+” indicates curdling in 24 hours;“-” indicates not curdling in 24 hours.

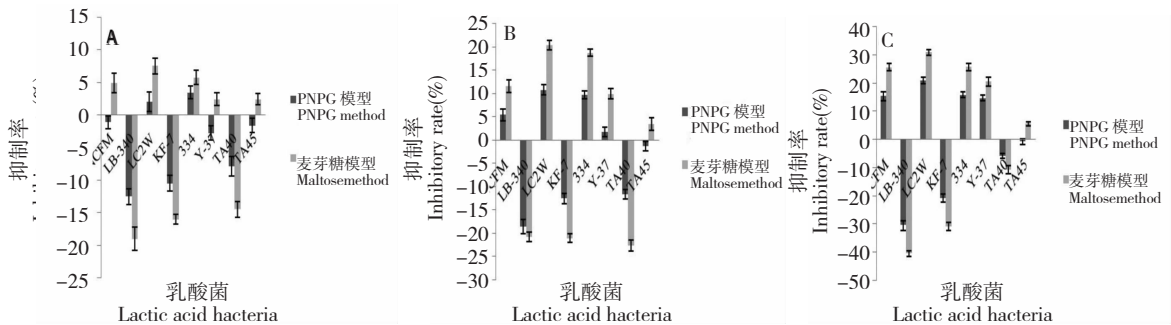


图 3 两种模型测得的 8 株凝乳乳酸菌发酵 24 h(A)、48 h(B)、96 h(C) 的抑制活性

Fig. 3 Inhibitory effects of 8 selected strains grown in reconstituted skimmed milk for 24 h(A), 48 h(B) and 96 h(C) measured by PNPG method and maltose method

离心取上清,分别用两种模型测其对 α -糖苷酶的抑制率。两种模型测得的 8 株凝乳乳酸菌发酵 24、48、96 h 的抑制活性见图 3。

从图 3 可以看到,8 株凝乳乳酸菌中 *L. acidophilus* NCFM、*L. casei* LC2W、*L. casei* ATCC334、*L. rhamnosus* Y-37 产 α -糖苷酶抑制剂,抑制活性呈现菌株差异性,且随着发酵时间的延长,抑制活性有着不同程度的增长趋势,这可能是因为菌株的生长情况的差异性或者产率的差异性引起的。菌株 *L. bulgaricus* LB340、*L. rhamnosus* KF-7、*S. thermophilus* TA40 的 α -糖苷酶抑制率用两种模型测得均为负值,表明在发酵的过程中可能会产生促进对硝基苯酚和葡萄糖生成的物质。比较分析图 3,两种筛选模型筛选

结果基本一致,但从图中也可得出以麦芽糖为底物的酶-抑制剂筛选模型测得的抑制活性与以 PNPG 为底物的酶-抑制剂筛选模型测得的抑制活性具有差异性。

2.4 两种模型测得低浓度阿卡波糖对 α -糖苷酶的抑制活性对比

以阿卡波糖浓度为横坐标,抑制率为纵坐标,应用建立的两种 α -糖苷酶抑制剂体外筛选模型,测定无菌脱脂乳中所含低浓度阿卡波糖对 α -糖苷酶的抑制活性,见图 4。

图 4 可见,无菌脱脂乳配制低浓度阿卡波糖,用两种模型测得的抑制活性具有显著差异性,以麦芽糖为底物的酶-抑制剂筛选模型测得的抑制活性高

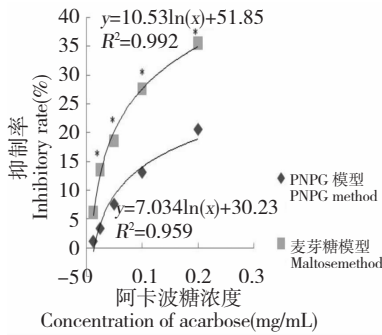


图4 两种模型测得的在无菌脱脂乳中所含低浓度阿卡波糖对 α -糖苷酶的抑制活性(* $P < 0.05$)

Fig. 4 Inhibitory rates of low concentrations of acarbose in reconstituted skimmed milk measured by PNPG method and maltose method (* $P < 0.05$)

于以PNPG为底物的酶-抑制剂筛选模型。

3 结论

本实验改良了两种 α -糖苷酶抑制剂体外筛选模型:以PNPG为底物的酶-抑制剂筛选模型和以麦芽糖为底物的酶-抑制剂筛选模型。并以阿卡波糖作为阳性对照进行模型的验证,验证出用磷酸盐缓冲液和无菌脱脂乳配制的阿卡波糖均对 α -糖苷酶具有剂量依赖性,说明所建立的两种 α -糖苷酶抑制剂体外筛选模型均适用于筛选能够发酵脱脂乳产 α -GI的乳酸菌。实验中选取12株特定乳酸菌,利用改进的两种 α -糖苷酶抑制剂筛选模型筛选出产 α -GI的菌株:*L. acidophilus* NCFM、*L. casei* LC2W、*L. casei* ATCC334、*L. rhamnosus* Y-37,筛选结果基本一致,但两种筛选模型测得的抑制活性具有差异性。无菌脱脂乳配制低浓度阿卡波糖,用两种模型测得的抑制活性具有显著差异性,以麦芽糖为底物的酶-抑制剂筛选模型测得的抑制活性高于以PNPG为底物的酶-抑制剂筛选模型。

参考文献

- McCormick M, Quinn L. Treatment of type 2 diabetes mellitus; pharmacologic intervention. *J Cardiovasc Nurs*, 2002, 16:55-67.
- Wang WD(王卫东), Xu TJ(徐婷娟), Chen WP(徐维平). The meta-analysis about the combination of α -glycosidase enzyme inhibitors and metformin for treating type 2 diabetes. *Chin J Clin Health C*(中国临床保健杂志), 2008, 11:572-573.
- Truscheit E, Frommer W, Junge B, et al. Chemistry and bio-

chemistry of microbial α -glucosidase inhibitors. *Angew Chem Int Ed Engl*, 1981, 20:744-761.

- Naito E, Yoshida Y, Makino K, et al. Beneficial effect of oral administration of *Lactobacillus casei* strain Shirota on insulin resistance in diet-induced obesity mice. *J Appl Microbiol*, 2011, 110:650-657.
- Kenneth L, Patrick B, Alexandria A, et al. Inhibition of type 1 diabetes correlated to a *Lactobacillus johnsonii* N6. 2-mediated Th17 Bias. *J Immunol*, 2011, 186:3538-3546.
- Al-salami H, Butt G, Fawcett JP, et al. Probiotic treatment reduces blood glucose levels and increases systemic absorption of gliclazide in diabetic rats. *Eu J Drug Metab Pharmacokin*, 2008, 33:101-106.
- Deshpande G, Rao S, Patole S. Progress in the field of probiotics; year 2011. *Curr Opin Gastroenterol*, 2011, 27:13-18.
- Yun SI, Park HO, Kang JH. Effect of *Lactobacillus gasseri* BNR17 on blood glucose levels and body weight in a mouse model of type 2 diabetes. *J Appl Microbiol*, 2009, 107:1681-1686.
- Hariom Y, Jain S, Sinha PR. Antidiabetic effect of probiotic dahi containing *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* in high fructose fed rats. *Nutrition*, 2007, 23:62-68.
- Wu CF(吴酬飞), Li Y(李杨), Li YP(李燕萍). Progress on research of screening methods for alpha-glucosidase inhibitors from Chinese medicinal herbs. *Int J Pharma Res*(国际药学研究杂志), 2008, 35:9-12.
- Chapdelaine P, Tremblay RR, Dube JY. p-Nitrophenol- α -glucopyranoside as substrate for measurement of maltase activity in human semen. *J Clin Chem*, 1978, 24:208-211.
- Fan WY(范文娅), Wu ZJ(吴正钧), Ji H(季红), et al. Comparison of alpha-glucosidase inhibitory effect of different *Lactobacillus casei* Strains. *Food Ferment Ind*(食品与发酵工业), 2012, 38(4):29-33.
- Ramchandran L, Shah NP. Proteolytic profiles and angiotensin-I converting enzyme and α -glucosidase inhibitory activities of selected lactic acid bacteria. *Food Microbiol Saf*, 2008, 73(2):75-81.
- Wang JJ(王佳佳), Liu W(刘玮), Zhu J(朱静). Hypoglycemic activity of a polysaccharide from the roots of *Arctium lappa* L. *J Chin Pharm Univ*(中国药科大学学报), 2013, 44:455-459.