

矢车菊素-3-O-葡萄糖苷及其月桂酸酶法酰化产物对Caco-2细胞胆固醇摄取的作用比较

顾荣荣, 孙汉巨*, 刘淑芸, 何辛洲, 周雨欣, 邓玉龙, 孔令朔, 何述栋

(合肥工业大学食品与生物工程学院, 安徽合肥 230009)

摘要: 为了探讨黑米花青素矢车菊素-3-O-葡萄糖苷(C3G)及其月桂酸酶法酰化产物矢车菊素-3-(6"-月桂酰)葡萄糖(C3G-C12)对Caco-2细胞胆固醇吸收转运的影响及其可能作用机制。该研究通过半制备液相色谱(Semi-HPLC)从黑米花青素中提取C3G,采用液相色谱质谱联用(LC-MS/MS)鉴定该单体。以C3G为原料,用月桂酸和Novozymes 435酶对其进行酶法酰基化。进一步通过Semi-HPLC分离酰化产物,LC-MS/MS和傅里叶红外光谱(FT-IR)验证该单体。建立21 d的Caco-2肠道上皮细胞模型,分别用质量浓度为50、100、150 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ C3G和C3G-C12及20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 胆固醇吸收抑制剂依折麦布开展转运试验,利用高效液相色谱(HPLC)检测细胞胆固醇吸收转运量,并用荧光定量PCR(qPCR)检测NPC1L1 mRNA的表达。结果表明,Caco-2细胞胆固醇转运可被二者呈浓度依赖性抑制。150 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 质量浓度的C3G和C3G-C12可分别使胆固醇吸收下降46.21%和56.36%,引起56.93%和59.76%的NPC1L1 mRNA表达下降。综上所述,C3G-C12较C3G更有效抑制胆固醇吸收,这可能与抑制NPC1L1 mRNA的表达有关。该研究为黑米花青素酶法酰基化修饰及其在调节肠道胆固醇代谢的作用提供了理论基础。

关键词: 矢车菊素-3-O-葡萄糖苷(C3G); 矢车菊素-3-(6"-月桂酰)葡萄糖(C3G-C12); Caco-2细胞; 胆固醇; NPC1L1

文章编号: 1673-9078(2026)06-95-104

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2026.6.0369

Comparison of the Effects of Cyanidin-3-O-glucoside and Its Lauric Acid Enzymatic Acylation Product on Cholesterol Uptake in Caco-2 Cells

GU Yingying, SUN Hanju*, LIU Shuyun, HE Xinzhou, ZHOU Yuxin, DENG Yulong, KONG Lingshuo, HE Shudong

(School of Food and Biological Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China)

Abstract: The effects of the black rice anthocyanidin monomer cyanidin-3-O-glucoside (C3G) and its lauric acid enzymatic acylation product cyanidin-3-(6"-lauroyl) glucose (C3G-C12) on cholesterol absorption and transport in Caco-2 cells and its possible mechanism of action were investigated. In this study, C3G was extracted from black rice anthocyanidins using semi-preparative-high performance liquid chromatography (semi-HPLC), and the monomer was identified using liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS). C3G was used as raw material and enzymatically acylated with lauric acid and Novozymes 435. The acylated products were further separated via semi-HPLC, and the monomer was verified via LC-MS/MS and Fourier transform infrared spectroscopy. A 21-day Caco-2 intestinal epithelial cell model was established. The cells were incubated with 50, 100, and

引文格式:

顾荣荣,孙汉巨,刘淑芸,等.矢车菊素-3-O-葡萄糖苷及其月桂酸酶法酰化产物对Caco-2细胞胆固醇摄取的作用比较[J].现代食品科技,2026,42(6):95-104.

GU Yingying, SUN Hanju, LIU Shuyun, et al. Comparison of the effects of cyanidin-3-O-glucoside and its lauric acid enzymatic acylation product on cholesterol uptake in caco-2 cells [J]. Modern Food Science and Technology, 2026, 42(6): 95-104.

收稿日期: 2025-03-15; 修回日期: 2025-06-03; 接受日期: 2025-06-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(31771974)

作者简介: 顾荣荣(2000-),女,硕士研究生,研究方向:生物化学与分子生物学,E-mail: 1344698353@qq.com

通讯作者: 孙汉巨(1966-),男,博士,教授,研究方向:农产品的综合利用,E-mail: sunhanju@163.com

150 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ C3G and C3G-C12 and 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ cholesterol absorption inhibitor ezetimibe to perform transport experiments. HPLC was used to detect the cellular cholesterol absorption, and fluorescence quantitative polymerase chain reaction was used to detect *NPC1L1* mRNA expression. The results showed that both inhibits cholesterol transport of Caco-2 cells in a concentration-dependent manner. Specifically, 150 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ C3G and C3G-C12 reduced cholesterol absorption by 46.21% and 56.36%, respectively, and *NPC1L1* mRNA expression by 56.93% and 59.76%, respectively. In summary, C3G-C12 more effectively inhibited cholesterol absorption than C3G, which might be related to its inhibition of *NPC1L1* mRNA expression. This study provides a theoretical basis for the enzymatic acylation modification of black rice anthocyanins and their role in regulating intestinal cholesterol metabolism.

Key words: Cyanidin-3-O-glucoside (C3G); cyanidin-3-(6''-lauroyl) glucose (C3G-C12); Caco-2 cells; cholesterol; NPC1L1

胆固醇 (Cholesterol), 是一种类固醇脂质。在肠道内, 胆固醇的吸收转运涉及多步协同过程。首先, 胆固醇与胆盐和磷脂结合形成混合微团, 以提高其溶解度并促进吸收^[1]。随后, 胆固醇通过 Niemann-Pick C1-like 1 (NPC1L1) 转运进入肠上皮细胞^[2]。有研究表明, 依折麦布和他汀类药物的组合可降低急性冠脉综合征后患者的低密度脂蛋白 (LDL) 胆固醇并改善心血管预后。然而, 依折麦布-他汀类药物联合治疗后, 肝酶水平升高的患者数量显著增加。水果和蔬菜中的植物化合物已被证明具有靶向改善健康的作用, 特别是预防血脂异常、糖尿病、高血压和癌症等生理病理状况^[3]。因此, 目前的研究试图从膳食水果、蔬菜和草药中寻找有效的植物化学化合物, 作为更安全、天然的降脂替代品^[4]。

黑水稻是一种特殊的有色水稻品种, 被广泛的种植在以中国为主的亚洲地区^[5]。用黑水稻加工成的黑米, 因其色泽乌黑、营养丰富, 又被称为贡米、皇帝米^[6]。黑米花青素是从黑米的表皮中提取出的天然的多酚类黄酮物质, 其质量分数最高可达 0.8% (具体含量因品种而异)^[7]。花青素具有广泛的生物活性, 包括抗氧化、抗炎、保护心血管健康、调节糖脂代谢、维持肠道菌群平衡和改善视力等^[8]。还可清除体内自由基, 减少氧化应激损伤, 从而延缓衰老, 降低慢性疾病的风险^[9]。同时, 花青素能够调节免疫系统, 抑制炎症因子的释放, 减少炎症反应, 对于肠道炎症等代谢相关疾病具有积极的改善作用^[10,11]。王蕾^[9]研究发现黑米花青素可以降低高脂小鼠血脂水平, 并增加肠道短链脂肪酸的浓度。张曼莉^[12]发现黑米花青素能促进肠道益生菌的生长, 增强肠道屏障健康和整体代谢功能。花青苷是花青素以己糖形式稳定存在的单元, 黑米中所含有的花青苷主要有 5 种, 即: 矢车菊素-3-O-葡萄糖苷 (C3G)、矢车菊素-3,5-二葡萄糖苷、矢车菊素-3-O-芸香糖苷、芍药素-3-O-葡萄糖苷、芍药素-3-O-芸香糖苷。黑米中主要的花青素单体为 C3G, 其质量分数约占花青素总量的 88%^[13]。

花青素虽然具有良好的生物活性, 但稳定性受 pH 值、温度、光照等因素影响, 制约其生物活性在食品、医药等领域中进一步发挥^[14]。通过花青素分子结构的修饰, 可有效提升其稳定性、溶解性和生物利用度, 从而改善其应用性能^[15]。常见的修饰方法包括: 酶法酰化、糖基化、甲基化、交联、纳米化和酶促修饰。这些策略能够增强花青素的脂溶性、稳定性和抗氧化活性, 提高其生物活性和体内吸收率, 从而拓宽其在食品、保健品和药品领域的应用前景^[16]。

本研究以黑米花青素单体 C3G 为原料, 月桂酸为酰基供体, 以 Novozymes 435 酶为催化剂, 制备 C3G 月桂酸酰化产物 C3G-C12。Caco-2 细胞在培养 21 d 后, 可极化成单层人结肠癌上皮细胞, 类似小肠上皮细胞的形态和功能。该模型被广泛用于研究小肠上皮细胞的转运和代谢机制^[17]。通过该细胞模型, 可观察黑米花青素单体 C3G 及其月桂酸酶法酰化产物 C3G-C12 对 Caco-2 细胞胆固醇转运和胆固醇吸收转运蛋白 NPC1L1 表达的影响, 以了解 C3G-C12 在肠道中的降脂作用及其作用机制。

1 材料与方法

1.1 原料与试剂

黑米花青素粗提物 (矢车菊素-3-O-葡萄糖苷的质量分数 > 35%), 购于天津康友生物有限公司。Novozymes 435 酶 (9 000 PLU/g) 购于上海源叶生物有限公司; 月桂酸、白藜芦醇和依折麦布, 购于上海阿拉丁生化科技有限公司; 人 NPC1L1 引物、逆转录试剂盒、实时荧光定量 PCR 试剂盒、蛋白浓度测定试剂盒, 购于武汉塞维尔生物科技有限公司; Caco-2 (人结直肠腺癌细胞), 购于武汉普诺赛生命科技有限公司。特级胎牛血清 Fetal Bovine Serum (Superfine)、DMEM 高糖培养基、HBSS 溶液, 购于南京生航生物技术有限公司; 双抗 (100x 青霉素-链霉素溶液)、0.25% (质量分数) 胰酶细胞消化液, 购于北京兰杰

柯科技有限公司。碱性磷酸酶试剂盒, 购于南京建成生物科技有限公司; 胆固醇、牛磺胆酸钠、软磷脂、单甘酯硬脂酸、溴化钾、噻唑蓝、荧光黄, 均购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 乙醇、甲醇、乙腈、叔戊醇、庚烷、正辛醇, 购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司。所有试剂均为分析纯。

1.2 主要仪器设备

HD Plus 100D 型半制备型高效液相色谱仪, 利穗科技(苏州)有限公司; E2695 型高效液相色谱仪, 美国 Waters 公司; Agilent 1290 Infinity 型液相色谱-质谱联用仪, 美国安捷伦公司; Nicolet 67 型傅里叶红外光谱仪, 美国 Thermo Nicolet 公司; HH-2 型数显恒温水浴锅, 常州朗月仪器制造有限公司; Infinite 200 Pro 型酶标仪, 瑞士帝肯(Tecan)公司; L8GJ-12 型真空冷冻干燥机, 北京松源华兴科技发展有限公司; ZHWY-200B 型恒温培养振荡器, 上海智城分析仪器制造有限公司; Heracell VIOS 160i 型 CO₂ 培养箱, 美国 Thermo 公司; Millicell ERS-2 型细胞电阻仪, 美国默克密理博公司; RE-52AA 型旋转蒸发仪, 上海亚荣生化仪器厂; CFX Connect 型荧光定量 PCR 仪, 美国 Bio-Rad 公司; ETC811 型 PCR 仪, 北京东胜创新生物科技有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 C3G的提取纯化

使用半制备高效液相色谱法(Semi-HPLC)分离 C3G, 色谱柱为 C18 (25 mm×200 mm, 10 μm, Galak Chromatography Technology Co. Ltd., China)。以 10 mL·min⁻¹ 的流量进行梯度洗脱, 溶剂 A (水: 甲酸=90:10, V/V) 和 B (乙腈: 甲醇: 甲酸: 水=25:25:10:40, V/V/V/V) 组成。梯度洗脱为: 0~8 min, 16%~20% B; 8~11 min, 20%~38% B; 11~26 min, 38%~46% B; 26~27 min, 38%~46% B; 27~34 min, 46%~85% B; 34~40 min, 85%~16% B。黑米花青素用 10% 的甲醇溶解, 质量浓度为 5.0 mg·mL⁻¹, 每次注射量为 1 mL。所有溶液都是用去离子水配制。在 520 nm 下检测波长, 收集最高峰。

1.3.2 C3G的鉴定

C3G 的鉴定采用王蕾等^[18]的方法进行。利用 Agilent 1260 UPLC 系统(美国安捷伦公司)和 LC-ESI-MS/MS 电喷雾串联质谱法(美国安捷伦公司)对花青素及修饰产物进行鉴定, 系统配备 1260 Infinity II 二元泵, 在 520 nm 处检测花青素。二极管阵列检测器设置为 520 nm。C3G 由 Agilent Eclipse Plus C18

(2.1 mm×50 mm, 1.8 μm) 的在室温下以 0.20 mL·min⁻¹ 的流量分离。溶剂 A(水: 甲酸=90:10, V/V) 和 B(乙腈) 组成。梯度洗脱为: 0~5 min, 95%~90% A; 5~10 min, 90% A; 10~17 min, 90%~76% A; 17~27 min, 76%~10% A; 27~30 min, 10% A; 30~35 min, 10%~95% A; 35~40 min, 95% A。

1.3.3 C3G-C12的月桂酸酶法酰化修饰

采用酶促酰化反应制备月桂酸酰化花青素^[19]。方法为: 将 1.5 g C3G 加入 25 mL 圆底烧瓶中, 用 5 mL 叔戊醇溶解, 再加入 11 g 月桂酸、1.0 g 4A 分子筛和 Novozymes 435 脂肪酶(加酶活力为 1 000 PLU)。将反应混合物置于恒温振荡培养箱中, 在 56 °C 及 100 r·min⁻¹ 条件下搅拌反应 48 h, 随后用滤纸过滤除去 4A 分子筛和 Novozymes 435 脂肪酶, 终止反应。将残渣重新溶解于 70 mL 乙腈和庚烷(乙腈: 庚烷=2:5, V/V) 中, 反应多次, 除去过量的月桂酸及其他杂质。将圆底烧瓶放入 55 °C 的恒温水浴中 20 min, 用分液器过滤下层溶液。在 50 °C 和 0.08~0.1 MPa 条件下旋转蒸发除去叔戊醇、乙腈和庚烷。产物经冷冻干燥后保存于 -80 °C。

1.3.4 C3G-C12的鉴定

C3G-C12 的鉴定与 C3G 方法一致。采用 Agilent 1260 UPLC 系统(美国安捷伦公司)和 LC-ESI-MS/MS 电喷雾串联质谱法(美国安捷伦公司)对 C3G 月桂酸酶法酰化产物的组成和结构进行鉴定, 系统配备 1260 Infinity II 二元泵, 在 520 nm 处检测花青素。利用 Agilent Eclipse Plus C18 色谱柱(2.1 mm×50 mm)分离, 流量为 0.2 mL·min⁻¹, 流动相为 A (水: 甲酸=90:10, V/V) 和 B (乙腈)。梯度洗脱程序为: 0~5 min, 95%~90% A; 5~10 min, 90% A; 10~17 min, 90%~76% A; 17~27 min, 76%~10% A; 27~30 min, 10% A; 30~35 min, 10%~95% A; 35~40 min, 95% A。在 Agilent 6430 三重四极杆液质联用系统中进行质量分析, 扫描间隔为 200 至 1 000 m/z。温度为 310 °C, N₂ 流速为 11.0 psi。毛细管电压为 4 kV, 干气流速为 5 L·min⁻¹。

1.3.5 C3G和C3G-C12的傅里叶红外光谱分析

在傅里叶变换红外分光光度计(FT-IR)上检测 C3G 和 C3G-C12 的红外光谱。溴化钾(KBr)于 200 °C 下干燥 24 h。样品和溴化钾(KBr)在快速红外干燥器中以 10:1 (mg·g⁻¹) 的比例一起研磨, 压制成片, 在 500~4 000 cm⁻¹ 的光谱范围分析。

1.3.6 去脂血清和胆固醇微胶溶液的配制

去脂血清制备, 20 g 触变凝胶粉加入到 1 L 胎

牛血清（FBS）中，4℃搅拌过夜，形成的混合物在15 000 r·min⁻¹，4℃离心1 h，收集上清液经0.20 μm滤膜过滤后备用^[20]。胆固醇微胶溶液配置：根据文献采用溶剂诱导法进行配制^[21]。称取卵磷脂（0.6 mmol·L⁻¹）溶于甲醇溶液，超声后N₂干燥；再加入单硬脂酸甘油酯（2 mmol·L⁻¹）、牛磺胆酸钠（2 mmol·L⁻¹）和胆固醇（1 mmol·L⁻¹），加入乙醇超声溶解，N₂干燥。最后溶解在pH值为7.4的HBSS溶液中。0.22 μm微孔滤膜过滤除菌，储存备用。

1.3.7 21 d Caco-2肠道上皮细胞造模

Caco-2细胞接种于24孔Transwell培养板中，用含有体积分数为20%胎牛血清、1%双抗和1%非必需氨基酸的DMEM培养基培养，于37℃和体积分数为5%CO₂培养箱中培养21 d后，细胞可形成紧密的单层，使用电阻仪每3 d测定其电阻。测定前将电极置于φ=70%的乙醇溶液中，浸泡15 min，电极晾干后用HBSS清洗。将Tanswell板AP侧和BL侧的培养基吸去，采用HBSS清洗细胞层1~2遍。随后向AP侧加入0.4 mL培养基，BL侧加入0.6 mL培养基。电阻值测定时，将电极短端垂直插入培养小室AP侧，不要触碰到AP侧细胞膜，长端浸入培养小室BL侧。待读数稳定后，按公式（1）记录并计算电阻值。

R=(R₁-R₀)×0.33 (1)

式中：

- R——Caco-2模型的跨膜电阻值，Ω·cm²；
- R₁——试验组跨膜电阻，Ω；
- R₀——空白组电阻，Ω；
- 0.33——24孔Transwell板培养小室的膜面积，cm²。

1.3.8 Caco-2细胞碱性磷酸酶活力比监测

在Caco-2细胞单层生长至第5、10、14、17及21天，在AP侧与BL侧分别取培养液，使用试剂碱性磷酸酶试剂盒检测细胞活力比。绘制碱性磷酸酶标准曲线，计算不同时期AP与BL侧碱性磷酸酶活力比。

1.3.9 细胞荧光黄渗透率检测

Caco-2细胞膜培养21 d后使用预加热至37℃的HBSS洗涤3次，然后再放入培养箱中稳定30 min。在AP侧加入由HBSS配制的质量浓度为0.4 mg·mL⁻¹的荧光黄，在BL侧加入2.5 mL HBSS缓冲液，置于培养箱中培养120 min。每0.5 h从BL侧取500 μL作为待测样品进行后续测定，并用HBSS补充BL侧取样室溶液。在492 nm下检测吸光度。按照公式（2）计算渗透率以评价模型的通透性。

P= (dQ / (dt×A×C₀)) (2)

- 式中：
- P——Caco-2细胞表观渗透系数 Papp，cm·s⁻¹；
 - dQ/dt——单位时间内荧光黄的转运量，μg·s⁻¹；
 - A——膜的表面积，cm²；
 - C₀——AP侧中荧光黄的初始质量浓度，μg·mL⁻¹。

1.3.10 细胞毒性实验

Caco-2以每毫升2×10⁵个细胞接种于96孔板中，在相对湿度为95%和CO₂体积分数为5%的恒温细胞培养箱中培养。使用MTT法测定C3G、C3G-C12、依折麦布及胆固醇微胶束溶液对Caco-2细胞的毒性。孵育24 h后，将C3G、C3G-C12、依折麦布及胆固醇微胶束溶液预溶解在DMEM培养基中。孵育24 h后，丢弃培养溶液，并将含有质量浓度为5 mg·mL⁻¹的MTT溶解在培养基中，吸取120 μL加入到孔板中。四小时后在490 nm处的测量吸光度值。

1.3.11 C3G、C3G-C12和依折麦布对胆固醇转运的影响实验

Caco-2细胞在Transwell培养板上形成紧密、完整单细胞层后，加入HBSS缓冲液清洗2次，每次20 min。吸干各孔缓冲液，按实验分组一侧加入低、中、高浓度的C3G和胆固醇微胶束以及低、中、高浓度的C3G-C12和胆固醇微胶束溶液、阳性对照组依折麦布和胆固醇微胶束、以及空白对照组。另一侧加入HBSS缓冲液。研究胆固醇从AP→BL侧转运时，AP侧加入0.5 mL上述分组溶液，BL侧加入1.5 mL HBSS缓冲液。然后将Transwell培养板放37℃恒温摇床上孵育，转速50 r·min⁻¹。分别在30、60、90及120 min从B或A面取样50 μL，然后补充相同体积HBSS缓冲液，样本-80℃保存待测。

表 1 实验分组情况
Table 1 Experimental grouping

组别	培养物
L-C3G	培养基 +50 μg·mL ⁻¹ C3G+ 胆固醇微胶束
M-C3G	培养基 +100 μg·mL ⁻¹ C3G+ 胆固醇微胶束
H-C3G	培养基 +150 μg·mL ⁻¹ C3G+ 胆固醇微胶束
L-C3G-C12	培养基 +50 μg·mL ⁻¹ C3G-C12+ 胆固醇微胶束
M-C3G-C12	培养基 +100 μg·mL ⁻¹ C3G-C12+ 胆固醇微胶束
H-C3G-C12	培养基 +150 μg·mL ⁻¹ C3G-C12+ 胆固醇微胶束
阳性对照组	培养基 +20 μmol·L ⁻¹ 依折麦布 + 胆固醇微胶束
正常组	培养基 + 胆固醇微胶束

1.3.12 胆固醇转运量检测

胆固醇含量的检测采用高效液相色谱，测定Caco-2细胞渗透液中的胆固醇的含量。色谱条件：色

谱柱 Poroshell 120EC-C18 (2.7 μm , 2.1 mm $\times$ 50 mm)。流动相: 甲醇 (体积分数为 100%)。流量为 0.3 mL $\cdot$ min⁻¹, 检测波长为 205 nm, 柱温为 38 $^{\circ}\text{C}$, 进样量为 10 μL 。在已选定的高效液相色谱条件下, 将配好的标准溶液系列进行测试, 以胆固醇浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线。分别配制不同浓度的胆固醇标准溶液, 质量浓度分别为 0.08、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 及 0.6 mg $\cdot$ mL⁻¹, 通过 HPLC 测定其峰面积, 根据胆固醇浓度与峰面积的关系计算胆固醇含量。 $y=75.668\ 73x+86.572\ 74$, $R^2=0.994$ 为胆固醇的标准曲线。

1.3.13 实时荧光定量检测肠道胆固醇转运蛋白 NPC1L1 mRNA 的表达

将 Caco-2 细胞以每孔 1.8×10^5 个细胞的细胞密度接种在 5 cm 细胞培养皿上, 然后在 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 48 h。48 h 后更换去脂血清培养基, 按表 1 的分组加入相应的溶液培养 24 h。24 h 后收集细胞, 使用 TRIzol 试剂从细胞中提取 RNA, 在逆转录系统转化为 cDNA, 检测 NPC1L1 mRNA 的表达。特异性引物序列从数据库中查找。根据制造商的说明, 在实时荧光定量 PCR 检测系统中进行 PCR。所有样品一式三份进行。NPC1L1 上游引物序列为 5'-GGACTCGTACCTGCTTGACTATTTC-3', 下游引物序列为 5'-TGTGGCATACTGGATCTTCTGG-3'。使用 GAPDH 作为内标进行归一化, 使用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 计算 NPC1L1 的相对表达量。

1.3.14 数据处理与分析

采用 SPSS 13.0 软件包, 数据以平均值 $\pm$ SD 表示, 并进行统计分析。使用 Origin 2021 绘制图片。使用 Turkey 检验统计学分析方法, 检验水平设为 $P<0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 C3G 的鉴定

使用半制备高效液相色谱 (semi-preparative HPLC) 对黑米花青素粗提物进行分离纯化, 以获得主要的花青素单体——矢车菊素-3-O-葡萄糖苷 (C3G)。如图 1a 所示, 在色谱图中保留时间为 16.24 min 的峰为主峰, 表明该成分为主要的花青素单体。随后, 采用分析型 HPLC 对所收集组分进行成分鉴定与含量测定。结果显示, 纯化产物的保留时间为 16.24 min, 与标准品的保留时间 (16.27 min) 高度一致, 初步判定该产物为 C3G。进一步通过峰面积积分法, 计算得到其质量纯度 $\geq 96\%$ 。采用 LC-MS 对其进行分析, 进一步确认提取物的结构组成, 结果如图 1b 所示。其中, 在一级质谱 (MS) 中检测到 m/z 449.09 的主要离子峰, 为该化合物的相对分子质量, 符合矢车菊素-3-O-

葡萄糖苷 (Cyanidin-3-O-glucoside, C3G) 的分子特征。进一步在二级质谱 (MS^2) 碎裂谱中, 出现了 m/z 287.07 的高丰度特征离子, 该离子为 C3G 在失去一个葡萄糖基后的碎片, 代表的是矢车菊素, 这一结果进一步验证了分离得到的单体为 C3G。

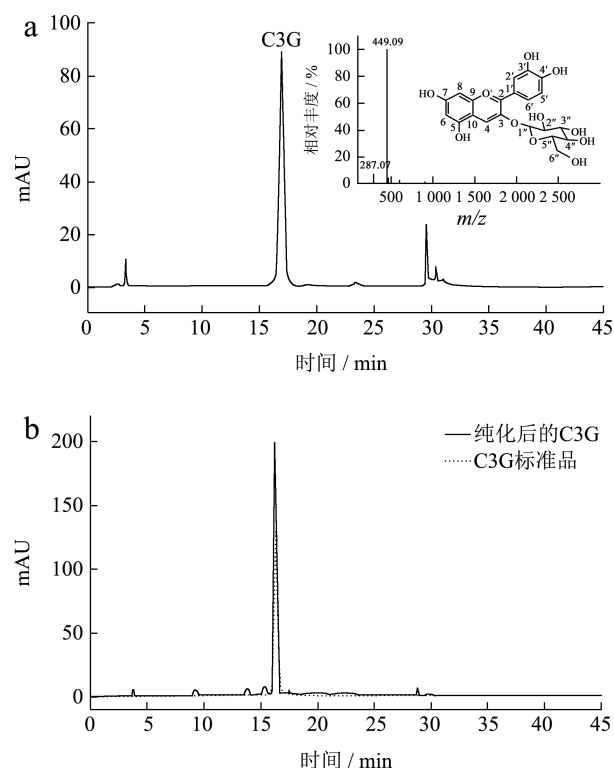


图 1 黑米提取物的液相色谱及纯化后 C3G 的液质图谱

Fig.1 Liquid chromatogram of black rice extract and LC-MS spectrum of purified C3G

注: (a) 黑米提取物的 HPLC 和 C3G 的 LC-MS 图谱, (b) 纯化后的黑米提取物和 C3G 标准的 HPLC。

2.2 C3G-C12 的 LC-MS 鉴定

采用 LC-MS 对 C3G 月桂酸酶法酰化产物 C3G-C12 进行结构鉴定, 结果如图 2 所示。与 C3G 相比, C3G-C12 在液相色谱中的保留时间明显延长, 表明月桂酸的酰化修饰成功提高了 C3G-C12 的脂溶性。进一步对其二级质谱 (MS/MS) 图谱进行分析发现, C3G-C12 与 C3G 一样显示出相同的特征碎片离子峰 m/z 287, 对应于矢车菊素 (Cyanidin) 的母核结构。同时, C3G-C12 的相对分子量为 631, 是一个月桂酸分子量 (200) 与一个 C3G 分子量 (449) 之和减去一个水的分子量 (18)。该结果表明, 在酶法酯化反应中, 月桂酸并未作用于矢车菊素的苯环结构, 而是选择性地连接在了葡萄糖苷的第 6 位羟基上, 最终生成了结构明确的单酰基化产物。初步分析该产物为矢车菊素-3-O-(6"-月桂酰)-葡萄糖苷 (C3G-C12)。

表 2 不同生长时间段Caco-2细胞跨膜电阻 ($\Omega \cdot \text{cm}^2$)
Table 2 Transmembrane resistance of Caco-2 cells in different growth periods ($\Omega \cdot \text{cm}^2$)

组别	3 d	6 d	9 d	12 d	15 d	18 d	21 d
空白孔	55.28 ± 0.23 ^f	58.36 ± 0.21 ^h	58.31 ± 0.25 ^h	59.60 ± 0.28 ^h	57.54 ± 0.64 ⁱ	59.80 ± 0.10 ⁱ	63.26 ± 0.26 ^g
第 1 孔	76.36 ± 0.76 ^c	193.57 ± 0.74 ^c	242.77 ± 0.23 ^f	305.85 ± 0.10 ^g	396.36 ± 0.64 ^g	458.80 ± 0.34 ^g	548.59 ± 0.20 ^c
第 2 孔	77.67 ± 0.30 ^b	200.99 ± 0.96 ^c	244.45 ± 0.35 ^e	355.04 ± 0.52 ^b	398.51 ± 0.10 ^f	461.64 ± 0.59 ^f	548.40 ± 0.08 ^{cd}
第 3 孔	76.41 ± 0.25 ^c	208.89 ± 0.01 ^b	257.15 ± 0.36 ^c	325.14 ± 0.81 ^f	394.57 ± 0.30 ^h	452.77 ± 0.46 ^h	547.57 ± 0.51 ^d
第 4 孔	74.24 ± 0.49 ^d	201.98 ± 0.02 ^c	235.99 ± 0.01 ^g	351.90 ± 0.16 ^c	419.87 ± 0.98 ^d	466.71 ± 0.11 ^e	526.52 ± 0.25 ^f
第 5 孔	68.05 ± 0.05 ^c	183.91 ± 0.14 ^g	256.30 ± 0.57 ^c	346.87 ± 0.52 ^e	437.84 ± 0.49 ^b	496.22 ± 0.62 ^b	542.03 ± 0.07 ^c
第 6 孔	68.37 ± 0.08 ^c	197.33 ± 0.49 ^d	249.65 ± 0.64 ^d	349.07 ± 0.36 ^d	428.40 ± 0.07 ^c	490.92 ± 0.40 ^d	564.22 ± 0.16 ^a
第 7 孔	78.66 ± 0.30 ^a	215.03 ± 0.19 ^a	267.23 ± 0.32 ^b	324.74 ± 0.49 ^f	408.57 ± 0.16 ^e	494.47 ± 0.14 ^c	561.41 ± 0.04 ^b
第 8 孔	75.51 ± 0.09 ^c	191.71 ± 0.43 ^f	270.17 ± 0.24 ^a	369.87 ± 0.14 ^a	449.50 ± 0.03 ^a	517.78 ± 0.20 ^a	548.40 ± 0.59 ^{cd}

注：同列右肩不同的小写字母表示具有显著差异 ($P < 0.05$)。下表同。

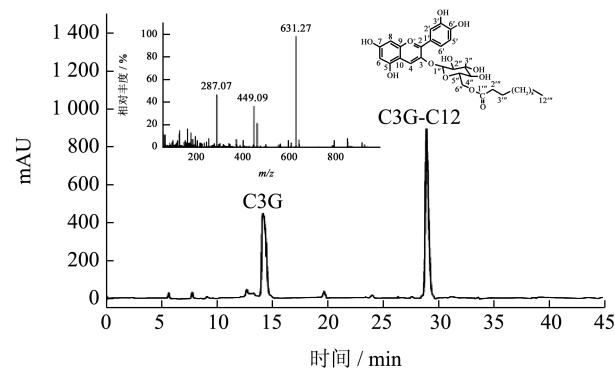


图 2 C3G 及其月桂酸酶法酰化产物 C3G-C12 的 LC-MS/MS 图谱

Fig.2 LC-MS/MS spectrum of C3G and its laurate enzymatic acylation product C3G-C12

2.3 傅里叶红外光谱 (FT-IR) 鉴定C3G-C12

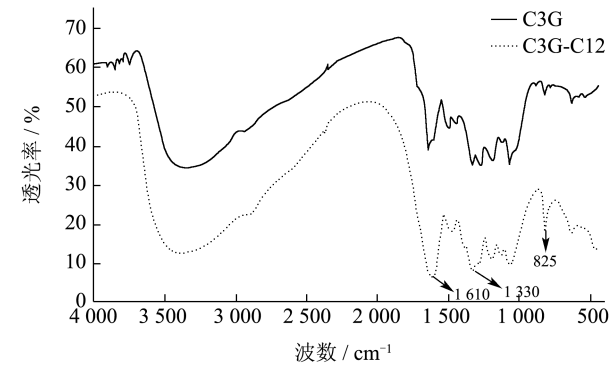


图 3 C3G 和 C3G-C12 的傅里叶红外光谱图

Fig.3 Fourier infrared spectra of C3G and C3G-C12

为了进一步验证 C3G-C12 中的酯基是否成功修饰,使用傅里叶红外光谱 (FT-IR) 对产物进行结构表征。结果如图 3 所示, C3G-C12 在 1 610 和 1 330 cm^{-1} 处均表现出明显的特征吸收峰。对于 C3G-C12, 1 610 cm^{-1} 处的宽带是由于 C=O 键的拉伸振动造成的, 是典型的酯

类官能团吸收峰位置。在 1 330 cm^{-1} 处, 一般为 C=O 键面内弯曲振动形成的强烈吸收带, 为酯基的特征吸收峰, 进一步表明产物中引入了酯基结构。825 cm^{-1} 处的特征吸收峰一般认为是芳香环 C-H 面外弯曲振动, 表明芳香环结构未被破坏^[22]。结果证实, 月桂酸通过与 C3G 葡萄糖苷 6''-OH 位置发生酰化反应, 形成了结构位置明确的酰化产物^[19,23], 即矢车菊素-3-O-(6''-月桂酰)-葡萄糖苷 (C3G-C12)。

2.4 21 d Caco-2肠道细胞跨上皮电阻监测

Caco-2 细胞肠道细胞跨上皮电阻变化结果如表 2 所示。随着培养时间的延长, Caco-2 细胞跨上皮电阻 (TEER) 值呈现出先缓慢上升, 再快速增长, 最终趋于稳定的变化趋势。在细胞培养前期 (0~6 d), TEER 值较低 (约 68~215 $\Omega \cdot \text{cm}^2$), 说明细胞正处于贴壁和增殖阶段, 尚未形成完整的屏障结构。在培养前中期 (9~12 d), TEER 值迅速上升 (约 236~370 $\Omega \cdot \text{cm}^2$), 表明细胞间紧密连接逐渐建立, 屏障功能增强。15 d 以后, TEER 值进一步升高至 400 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ 以上, 细胞屏障趋于成熟。到 21 d, TEER 值稳定在 500 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ 以上, 表明 Caco-2 细胞已形成完整的单层屏障, 具备良好的屏障功能^[24]。

2.5 21 d肠道上皮细胞碱性磷酸酶活力监测

Caco-2 细胞在培养过程中碱性磷酸酶活力变化如表 3 所示。碱性磷酸酶 (ALP) 是 Caco-2 细胞刷状缘分化的重要标志物, 其在 Caco-2 小肠上皮细胞模型顶端 (AP) 和基底侧 (BL) 分泌的比值 (AP/BL) 反映了细胞极化程度^[25]。第 5 天, AP/BL 仅为 1.21, 为细胞分化初期, 极化较弱。第 10 天, AP/BL 上升至 2.75, 说明细胞极化显著增强。在培养中后期 (14~17 d), ALP 活力比进一步升高, 从 2.88 升至 3.01, 逐渐趋于稳定, 表明细胞的分化基本完成。第 21 天, ALP 活力比达到 3.33,

Caco-2 刷状缘发育成熟，细胞极化完全。ALP 活力比与细胞跨上皮电阻变化趋势一致。21 d ALP 活力比达到最高，说明细胞刷状缘功能成熟，可用于转运研究。

表 3 不同生长时间段Caco-2细胞单层两侧碱性磷酸酶活力比
Table 3 Activity ratio of alkaline phosphatase on both sides of Caco-2 cell monolayer in different growth periods

时间/d	碱性磷酸酶活力比/(AP/BL)
5	1.21 ± 0.02 ^c
10	2.75 ± 0.0 ¹ d
14	2.88 ± 0.04 ^c
17	3.01 ± 0.0 ⁵ b
21	3.33 ± 0.01 ^a

2.6 Caco-2细胞荧光黄渗透率检测

Caco-2 细胞的荧光黄渗透率结果如表 4 所示。荧光黄是一种亲水性小分子，无法主动转运，仅通过细胞间隙的被动扩散穿过 Caco-2 细胞单层，可检测 Caco-2 细胞单层完整性和通透性^[26]。Caco-2 细胞屏障完整时，荧光黄的渗透率极低 ($Papp < 1.0 \times 10^{-7} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$)。若荧光黄的 $Papp$ 值超过该范围，说明细胞间连接松散或屏障功能下降。如表 4 所示， $Papp$ 值随时间延长而增加，并且符合荧光黄被动扩散的规律。各组经过 120 min 的转运试验后，荧光黄的渗透性最大值低于通透试验规定的 $5.0 \times 10^{-7} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ ，说明 Caco-2 细胞屏障功能较完整，可以进行下一步试验^[27]。

表 4 不同转运时间Caco-2细胞的渗透率
Table 4 Permeability of Caco-2 cells at different transport times

组别	Papp/(1×10 ⁻⁷ cm·s ⁻¹)			
	30 min	60 min	90 min	120 min
1	1.04 ± 0.01 ^c	1.35 ± 0.17 ^{bc}	1.76 ± 0.16 ^{bcd}	2.16 ± 0.21 ^a
2	1.07 ± 0.03 ^c	1.44 ± 0.16 ^{abc}	1.76 ± 0.09 ^{bcd}	2.00 ± 0.02 ^a
3	1.37 ± 0.12 ^b	1.39 ± 0.01 ^{bc}	1.82 ± 0.06 ^{bc}	1.94 ± 0.08 ^a
4	1.02 ± 0.02 ^c	1.36 ± 0.01 ^{bc}	1.59 ± 0.08 ^{cd}	1.99 ± 0.14 ^a
5	1.03 ± 0.01 ^c	1.10 ± 0.10 ^c	1.37 ± 0.19 ^d	2.00 ± 0.16 ^a
6	1.07 ± 0.01 ^c	1.12 ± 0.14 ^c	1.75 ± 0.18 ^{bcd}	2.06 ± 0.16 ^a
7	1.68 ± 0.06 ^a	1.83 ± 0.21 ^a	2.12 ± 0.15 ^{ab}	2.10 ± 0.12 ^a
8	1.47 ± 0.01 ^b	1.60 ± 0.17 ^{ab}	2.31 ± 0.19 ^a	2.18 ± 0.19 ^a

2.7 细胞毒性实验

2.7.1 不同质量浓度的C3G和C3G-C12对Caco-2细胞活力的影响

细胞活性高说明 Caco-2 细胞存活率高、代谢正常，适合作为肠道上皮模型进行试验。活性下降可能意味着细胞受损，凋亡或受到影响^[28]。C3G 和 C3G-C12 对 Caco-2 细胞活力的影响结果如图 4 所示。细胞活力随

着 C3G 质量浓度的增加呈上升趋势，在 150 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的质量浓度，细胞活力达到最高值 (117.08%)，表明 C3G 在这一质量浓度下对细胞具有较好的促进作用。超过 150 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 后，细胞活力随着质量浓度的增加而下降。因此，C3G 在低质量浓度时表现出促进细胞活力的作用。质量浓度过高可能会出现抑制效应，导致细胞活力下降。与 C3G 不同的是，Caco-2 细胞活力随着 C3G-C12 质量浓度的增加，呈现出逐渐下降的趋势，显示出较为明显的抑制作用。当 C3G-C12 的质量浓度为 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时，细胞活力接近 100%。当质量浓度为 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时对细胞活力表现出显著的抑制作用 ($P < 0.05$)，随着质量浓度的继续升高 (150 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 及以上)，细胞活力进一步受到抑制。该结果表明高质量浓度的 C3G-C12 可能对 Caco-2 具有细胞毒性或抑制作用。因此，选取 50、100 和 150 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的质量浓度作为二者在后续胆固醇转运试验中的添加质量浓度。

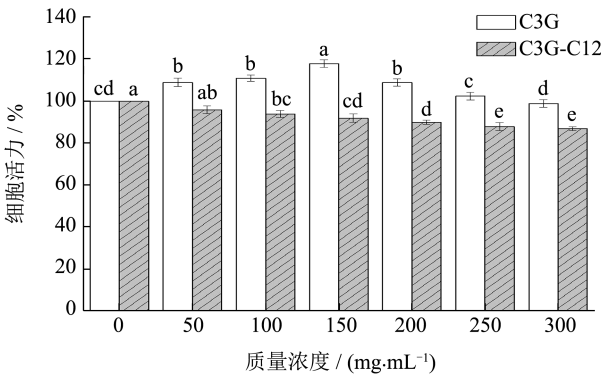


图 4 不同质量浓度的 C3G 和 C3G-C12 对 Caco-2 细胞活力的影响

Fig.4 Effects of different C3G concentrations on Caco-2 cell viability

注：不同的小写字母表示具有显著差异 ($P < 0.05$)。下图同。

2.7.2 不同浓度胆固醇微胶束对Caco-2细胞活力的影响

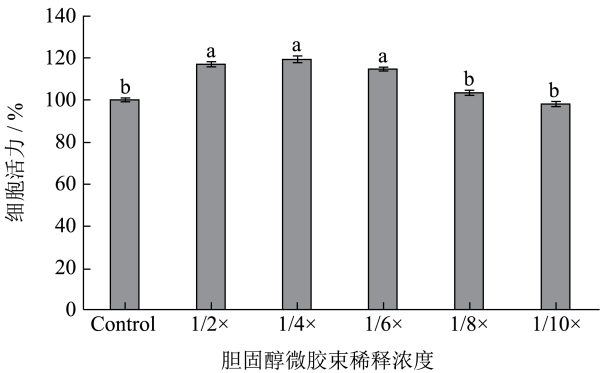


图 5 不同浓度胆固醇微胶束对 Caco-2 细胞活力的影响
Fig.5 Effects of different cholesterol micelle concentrations on Caco-2 cell viability

如图5所示,当胆固醇微胶束稀释2和4倍后,与母液相比,细胞活力分别增加了16.99%和19.51%。随着稀释倍数的增加(6、8和10倍),细胞活力逐渐稍微下降。因此,胆固醇微胶束在较低的稀释倍数(4倍)浓度下对细胞具有促进作用,可能是通过促进细胞膜功能等生理过程提高了细胞活力。

2.7.3 不同依折麦布浓度对Caco-2细胞活力的影响

依折麦布的浓度对Caco-2细胞活力的影响如图6所示,随着依折麦布浓度的提高,细胞活力呈现线性下降的趋势。在低浓度($20\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 及以下)时,依折麦布对细胞活力的影响较小,细胞活力接近100%,无明显的抑制作用。当浓度达到 $30\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,细胞活力下降至92.29%,显示显著抑制效应($P<0.05$)。 $50\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 以上的浓度对Caco-2细胞抑制作用更强,细胞活力仅为87.58%。而在 $80\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,细胞活力进一步降至82.11%。因此依折麦布在较低浓度($20\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)下对细胞活力影响较小,不会对细胞造成明显的损害。

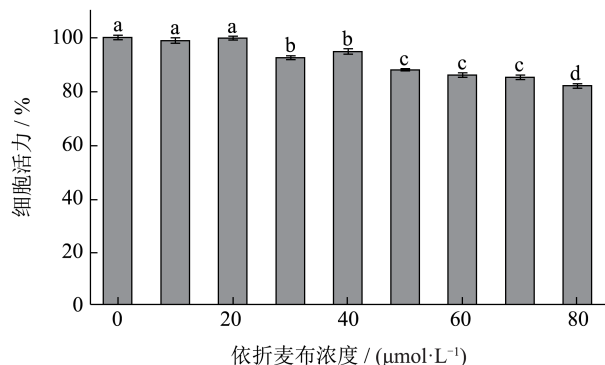


图6 不同浓度依折麦布对Caco-2细胞活力的影响

Fig.6 Effects of different cholesterol micelle concentrations on Caco-2 cell viability

2.8 C3G和C3G-C12对胆固醇吸收转运的影响

C3G和C3G-C12对胆固醇吸收转运的影响如图7所示,高脂组(HFD)相比,在30 min后,50、100及 $150\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 质量浓度的C3G-C12组胆固醇转运量分别下降了6.80%、6.63%和7.81%,较同浓度下的C3G组分别下调1.53%、0.39%和0.87%。120 min后,50、100及 $150\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 质量浓度的C3G-C12胆固醇转运量分别下降了11.74%、11.79%和11.87%,较同浓度下的C3G组分别下调7.31%、2.98%和1.59%。转运试验结果表明, $150\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ C3G-C12的胆固醇转运下调能力是同质量浓度下C3G的1.15倍。C3G-C12由于月桂酸修饰提高了其脂溶性,可能更有效地与细胞膜相互作用,从而表现出较稳定的胆固醇转运调节作用^[29]。依折麦布组的胆固醇转运抑制作用更为

显著,表现为胆固醇转运量15.88%的下降。结果表明, $150\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 质量浓度的C3G-C12抑制胆固醇转运的能力为 $20\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 依折麦布的0.75倍,该质量浓度下的C3G-C12可作为潜在的胆固醇吸收抑制剂。

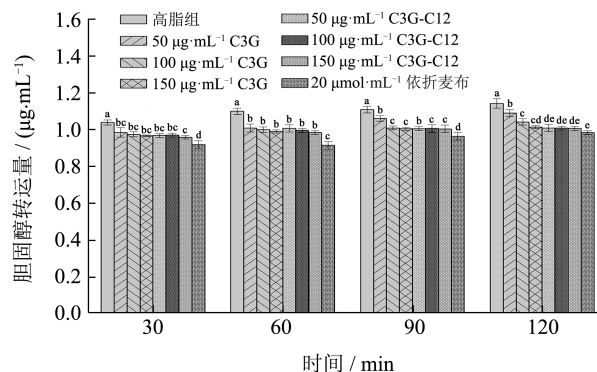


图7 不同时间段各组胆固醇的转运量

Fig.7 Cholesterol transfer volume of each group at different time

2.9 q-PCR检测各组NPC1L1 mRNA的表达

Caco-2细胞NPC1L1 mRNA的表达的影响如图8所示。 $50\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 质量浓度的C3G-C12的NPC1L1表达量相较于HFD下降了43.94%,表明NPC1L1的表达受到了显著的抑制作用($P<0.05$),减少胆固醇的吸收。 $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 质量浓度的C3G-C12的抑制效果则进一步加强,与HFD相比表达下降了51.10%。 $150\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 质量浓度的C3G-C12则引起了59.76%的NPC1L1表达下降。低、中及高浓度下,C3G-C12抑制NPC1L1表达的能力分别比同质量浓度下的C3G高出26.87%、7.16%和2.83%。因此,C3G-C12具有较强的抑制肠道胆固醇转运的能力。C3G-C12可能由于其更好的脂溶性,增强了对NPC1L1的调控能力。 $20\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 依折麦布(Ezetimibe)的处理组NPC1L1表达量最低,符合其作为胆固醇吸收抑制剂的功能。 $150\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 质量浓度的C3G-C12的NPC1L1表达量为是C3G的0.95倍,为依折麦布的1.31倍,抑制作用最接近药物水平。

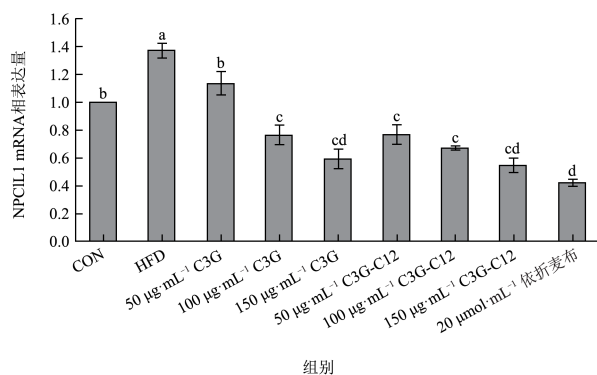


图8 各组Caco-2细胞NPC1L1 mRNA的表达

Fig.8 Expression of NPC1L1 mRNA in Caco-2 cells of each group

3 结论

本研究通过半制备液相色谱从黑米花青素提取物中制备矢车菊素-3-O-葡萄糖苷(C3G)单体,并用月桂酸和Novozymes 435 酶法酰化C3G,制备C3G的酰化产物矢车菊素-3-(6"-月桂酰)葡萄糖(C3G-C12)。通过Semi-HPLC分离纯化后,通过LC-MS/MS和FTIR鉴定该修饰产物单体。建立21 d Caco-2 肠道上皮细胞模型,通过细胞电阻值、荧光黄渗透率和碱性磷酸酶活性指标评估细胞屏障功能和生理状态的完善。根据细胞毒性试验结果,分别用50、100及150 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 质量浓度的C3G和C3G-C12及20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 依折麦布孵育并开展胆固醇转运试验,利用高效液相色谱检测细胞胆固醇吸收转运量。结果表明,与C3G单体相比,C3G-C12具有更强的抑制胆固醇转运能力。与HFD组相比,150 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 质量浓度的C3G-C12下调了11.87%的胆固醇吸收。且该质量浓度下,C3G-C12的胆固醇转运下调能力为C3G的1.15倍,依折麦布的0.75倍。实时荧光定量PCR结果表明,C3G-C12下调了胆固醇吸收转运蛋白NPC1L1 mRNA的表达水平,其中150 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 质量浓度的C3G-C12组的NPC1L1 mRNA表达量较HFD下降59.76%。在此质量浓度下,C3G-C12组的NPC1L1表达量为是C3G的0.95倍,依折麦布的1.31倍,表现出较强的抑制作用。综上所述,C3G-C12由于月桂酸修饰提高了单体C3G的脂溶性,不仅增强了对胆固醇转运的抑制作用,还能更稳定地调控NPC1L1的表达。C3G-C12在高剂量下的抑制作用与依折麦布相接近,表明其具有胆固醇吸收抑制剂的生物价值。

参考文献

- [1] XIAO J, DONG L W, LIU S, et al. Bile acids-mediated intracellular cholesterol transport promotes intestinal cholesterol absorption and NPC1L1 recycling [J]. *Nature Communications*, 2023, 14(1): 6469.
- [2] LIU H, HUANG L, PEI X. Effects of sorghum rice and black rice on genes associated with cholesterol metabolism in hypercholesterolemic mice liver and intestine [J]. *Food Science & Nutrition*, 2021, 9(1): 217-229.
- [3] THILAVECH T, ADISAKWATTANA S. Cyanidin-3-rutinoside acts as a natural inhibitor of intestinal lipid digestion and absorption [J]. *Bmc Complementary and Alternative Medicine*, 2019, 19(1): 242.
- [4] CHRISPIN J, MARTIN S S, HASAN R K, et al. Landmark lipid-lowering trials in the primary prevention of cardiovascular disease [J]. *Clinical Cardiology*, 2013, 36(9): 516-523.
- [5] 吕秋洁,甘钊生,车桂珍,等.黑米花青素生物活性研究进展[J].*食品安全导刊*,2024,22:94-96.
- [6] RAHIM M A, UMAR M, HABIB A, et al. Photochemistry, functional properties, food applications, and health prospective of black rice [J]. *Journal of Chemistry*, 2022, 2022(1): 2755084.
- [7] 石娟.黑米中花青素的提取、纯化及其体内抗氧化活性研究[D].合肥:合肥工业大学,2012.
- [8] LEONARSKI E, KUASNEI M, CESCO K, et al. Black rice and its by-products: Anthocyanin-rich extracts and their biological potential [J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2024, 64(25): 9261-9279.
- [9] 王蕾.黑米花青素对高脂膳食小鼠脂代谢紊乱的调节作用及肠道菌群的影响[D].合肥:合肥工业大学,2023.
- [10] ZHAO M, HUANG C, MAO Q, et al. How anthocyanin biosynthesis affects nutritional value and anti-inflammatory effect of black rice [J]. *Journal of Cereal Science*, 2021, 101: 103295.
- [11] SUN M, LI D, HUA M, et al. Black bean husk and black rice anthocyanin extracts modulated gut microbiota and serum metabolites for improvement in Type 2 diabetic rats [J]. *Food & Function*, 2022, 13(13): 7377-7391.
- [12] 张曼莉.黑米花青素对益生菌和有害菌的体外活性研究及其分子修饰[D].合肥:合肥工业大学,2015.
- [13] TAI L, HUANG S, ZHAO Z, et al. Chemical composition analysis and antioxidant activity of black rice pigment [J]. *Chemical Biology & Drug Design*, 2021, 97(3): 711-720.
- [14] LEONARSKI E, CESCO K, DE OLIVEIRA D, et al. A review on enzymatic acylation as a promising opportunity to stabilizing anthocyanins [J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2023, 63(24): 6777-6796.
- [15] CAI J, ZENG F, ZHENG S, et al. Preparation of lipid-soluble bilberry anthocyanins through acylation with cinnamic acids and their antioxidation activities [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(28): 7467-7473.
- [16] WU Y, GAO Y, LI C. Preparation and characterization of smart indicator films based on gellan gum/modified black rice anthocyanin/curcumin for improving the stability of natural anthocyanins [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023, 253: 127436.
- [17] KIM B, BAE M, PARK Y K, et al. Blackcurrant anthocyanins stimulated cholesterol transport via post-transcriptional induction of LDL receptor in Caco-2 cells [J]. *European Journal of Nutrition*, 2018, 57(1): 405-415.
- [18] 王蕾,孙汉巨,刘淑芸,等.黑米花青素对食源性肥胖小鼠脂代谢紊乱及肠道菌群的影响[J].*现代食品科技*,2023,39(12):1-10.
- [19] YANG X, SUN H, TU L, et al. Kinetics of enzymatic synthesis of cyanidin-3-glucoside lauryl ester and its physicochemical property and proliferative effect on intestinal probiotics [J]. *Biology*, 2020, 9(8): 205.
- [20] 刘振豪.番茄红素通过PPAR γ -LXR α -NPC1L1信号通路抑制Caco-2细胞胆固醇吸收[D].广州:南方医科大学,2021.
- [21] CHAMNANSILPA N, AKSORNCHU P, ADISAKWATTANA S, et al. Anthocyanin-rich fraction from thai berries interferes with the key steps of lipid digestion and cholesterol absorption [J]. *Heliyon*, 2020, 6(11): e05408.

[22] SINANOGLU V J, ZOUMPOULAKIS P, FOTAKIS C, et al. On the characterization and correlation of compositional, antioxidant and colour profile of common and balsamic vinegars [J]. *Antioxidants*, 2018, 7(10): 139.

[23] 金缘,张左勇,刘淑芸,等.黑米矢车菊素-3-O-葡萄糖苷及其月桂酸酰化物对小鼠肠道免疫功能的影响[J].*食品安全质量检测学报*,2021,12(14):5742-5750.

[24] 雷艳青,李焕德.Caco-2细胞培养、细胞单层模型建立的研究[J].*临床合理用药杂志*,2018,11(20):161-162.

[25] 余自成,高瑜,田薇薇,等.肠道转运Caco-2细胞单层模型的建立及验证评价[J].*中国临床药理学杂志*,2012,21(4):218-221.

[26] 刘雅琪,周娜,冯蒙蒙,等.负载黑米花色苷的纳米颗粒对Caco-2细胞损伤的保护作用[J].*食品科学*,2025, 46(3):102-109.

[27] 吕晓君,曹易丹,何开勇.Caco-2细胞体外吸收模型的建立及验证[J].*医药导报*,2018,37(11):1311-1315.

[28] JEONG Y E, SHEA K, FORD K A. Unraveling Caco-2 cells through functional and transcriptomic assessments [J]. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2025, 156: 105771.

[29] BEHRENDT I, BECKER K, STEINGASS C B, et al. Acylated anthocyanins from black carrots and their related phenolic acids diminish priming and activation of the NLRP3 inflammasome in THP-1 monocytes [J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2024, 68(22): 2400356.