

蓝莓花青素干预对老龄大鼠肝组织抗氧化功能及凋亡相关基因的影响

廖艳艳^{1,2,3}, 王伟毅⁴, 黄晓梅^{1,3}, 孙永彦^{1,2,3}, 李志辉^{1,2,3}, 王亚红^{1,2,3}, 蔡澎^{1,3}

(1. 中国科学院城市环境研究所城市环境与健康重点实验室, 福建厦门 361021) (2. 中国科学院大学, 北京 100049) (3. 厦门市物理环境重点实验室, 福建厦门 361021) (4. 国家海洋局第三海洋研究所, 国家海洋局海洋生物遗传资源重点实验室, 福建厦门 361005)

摘要: 本文研究了蓝莓花青素对老龄大鼠肝组织抗氧化功能及凋亡相关基因的影响。实验以 SD 老龄大鼠为模型, 连续灌胃不同剂量的蓝莓提取物 30 d 后采尾血测定超氧化物歧化酶 (SOD) 活力、丙二醛 (MDA)、还原型谷胱甘肽 (GSH) 和蛋白质羰基含量; 取肝脏, 显微镜下观察肝组织病理形态学变化, 测定肝脏组织中抗氧化和凋亡相关基因表达水平。结果表明, 蓝莓提取物干预后能显著降低老龄大鼠机体 MDA 和蛋白质羰基含量至 7.81 ± 1.55 nmol/mL 和 0.92 ± 0.42 nmol/(mg prot), SOD 活力增加至 134.61 ± 12.27 U/mL; 光镜结果显示蓝莓提取物各组肝脏形态好于老龄对照组。且与老龄对照组比较, 蓝莓提取物组老龄大鼠肝脏组织中抗氧化基因表达水平上调 (*SOD1*、*GPx1*、*CAT* 和 *Gclm*), 凋亡基因表达水平下调 (*Caspase-9* 和 *Apaf1*)。上述结果表明, 蓝莓提取物可改善老龄大鼠机体氧化应激状态, 且具有较好的保肝作用, 其机制可能与增强抗氧化能力和抑制肝细胞凋亡有关。

关键词: 蓝莓提取物; 肝脏; 抗氧化; 凋亡基因

文章编号: 1673-9078(2019)03-1-6

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.3.001

Effect of Blueberry Extract on Hepatic Oxidative Stress and Apoptotic Activities in Aged Rats

LIAO Yan-yan^{1,2,3}, WANG Wei-yi⁴, HUANG Xiao mei^{1,3}, SUN Yong-yan^{1,2,3}, LI Zhi-hui^{1,2,3}, WANG Ya-hong^{1,2,3}, CAI Peng^{1,3}

(1. Key Lab of Urban Environment and Health, Institute of Urban Environment, Chinese Academy of Sciences, Xiamen 361021, China) (2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China) (3. Xiamen Key Laboratory of Physical Environment, Institute of Urban Environment, Chinese Academy of Sciences, Xiamen 361021, China) (4. Key Laboratory of Marine Genetic Resources, Third Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Xiamen 361005, China)

Abstract: To explore the effect of blueberry extract on hepatic oxidative stress and apoptotic effects in aged rats, superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), glutathione (GSH) and protein carbonyl levels in serum of aged rats were determined after treatment with different dose blueberry extract for 30 days. Liver sections were examined by optical microscopy. In addition, the expression of antioxidant gene and apoptosis gene were detected by RT-PCR in liver tissue. The results showed that, MDA and protein carbonyl levels in the high dosage with blueberry extract were significantly reduced to 7.81 ± 1.55 nmol/mL and 0.92 ± 0.42 nmol/(mg prot), and SOD level of blueberry extract supplemented groups was significantly increased to 134.61 ± 12.27 U/mL. The liver sections showed that the blueberry extract could keep the hepatocytes better in morphology. Moreover, the expression of antioxidant genes were significantly up-regulated (*SOD1*, *GPx1*, *CAT* and *Gclm*) and apoptosis genes were down regulated (*Caspase-9* and *Apaf1*) in blueberry extract treatment groups. The results suggest that blueberry extract could relieve oxidative stress of aged rats and has a good hepatic-protective and anti-aging effect. Its mechanism may be related to promote antioxidant capacity and repress hepatocyte apoptosis.

收稿日期: 2018-11-27

基金项目: 国家电网公司科技项目 (GY71-16-008); 厦门市科技计划项目 (3502Z20172028)

作者简介: 廖艳艳 (1985-), 女, 博士, 助理研究员, 研究方向: 环境科学

通讯作者: 蔡澎 (1961-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 环境科学

Key words: Blueberry extract; liver tissue; antioxidation; apoptosis genes

一般情况下,生命是离不开自由基活动的,人体内的自由基在正常情况下是处于不断产生与清除的动态平衡之中。但当身体处于免疫力低下或者衰老时,自由基产生过多或清除过慢,超过一定的量,生命的正常秩序就会被破坏,疾病可能就会随之而来^[1]。大量研究已经证实,清除体内多余的自由基主要靠内源性抗氧化系统,包括超氧化物歧化酶(Superoxide Dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(Glutathione peroxidase, GSH-Px)、过氧化氢酶(Catalase, CAT)等^[2]。此外,外源性抗氧化剂也能帮助清除机体自由基,在保护机体免受氧化损伤中起重要作用。如何利用天然物质通过食疗保健清除自由基、延缓衰老、提高人类生存质量一直备受关注。

蓝莓花青素是目前国际上公认的清除人体内自由基最有效的天然抗氧化剂之一,具有非常强的体内活性。与其它抗氧化剂不同,花青素有跨越血脑屏障的能力,可以直接保护大脑中枢神经系统^[3]。有研究表明,酰化花色甙(芍药色素-3-咖啡酸槐糖甙-5-葡萄糖甙)给大鼠灌胃后,发现其机体抗氧化能力显著增强^[4]。给D-半乳糖致衰老的小鼠灌胃蓝莓后,发现蓝莓能改善小鼠的学习记忆能力,提高体内SOD活性,增强其对自由基的清除能力,抑制脂质过氧化作用^[5]。但目前国内外对蓝莓花青素对老龄大鼠肝脏的抗氧化作用及其分子机制缺乏深入的研究。本研究以野生矮丛蓝莓提取物作为受试物灌胃于老龄大鼠,检测老龄大鼠体重和肝脏湿重,血清中SOD活力、丙二醛(Malondialdehyde, MDA)、还原型谷胱甘肽(Glutathione, GSH)、蛋白质羰基含量及肝脏组织中抗氧化相关基因表达水平的变化来评价蓝莓提取物对老龄大鼠肝组织抗氧化功能的影响,为蓝莓花青素抗氧化机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

1.1.1 试剂

蓝莓提取物,大兴安岭林格贝有机食品有限责任公司;超氧化物歧化酶(SOD)活力、丙二醛(MDA)、还原型谷胱甘肽(GSH)、蛋白质羰基含量测定试剂盒,南京建成生物工程研究所;Trizol, Invitrogen公司;PrimeScript™ RT Master Mix (Perfect Real Time)和TB Green™ Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus)试剂盒, TAKARA公司;甲醛、无水乙醇,国药集团化

学试剂有限公司;苏木素伊红(HE)染色试剂盒,北京索莱宝科技有限公司;PCR扩增引物,上海生工生物工程股份有限公司。

1.1.2 仪器

分析天平(T-114型),美国Denver公司;高通量组织研磨仪(SCIENTZ-192型),宁波新芝生物科技股份有限公司;低温高速离心机(5810R型),德国Eppendorf公司;紫外可见分光光度计(Evolution 201型),美国赛默飞世尔公司;恒温水浴锅(DKB-8A型),上海精宏公司;普通PCR仪(TC9610-230V型),美国Labnet公司;RT-PCR(LightCycler480型),瑞士罗氏公司;倒置显微镜(CKX31型),日本Olympus公司;包埋机(EG1150型),德国Leica公司;切片机(RM2245型),德国Leica公司。

1.2 实验动物与分组

10月龄清洁级雄性SD老龄大鼠40只,由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供。由于花青素是蓝莓提取物中最主要的功能性成分,根据文献报道,每天服用50~1200 mg花青素具有抗氧化作用^[6-8],因此参考有关文献中的实验剂量,本文将花青素成人日服用剂量定为0.60 g/60 kg·BW,即0.01 g/kg·BW。实验设三个剂量组和一个对照组,以人体推荐量的5倍(大鼠)为其中的一个剂量组,另设两个剂量组,分别为推荐量的10倍和30倍:低剂量组:0.05 g/kg·BW、中剂量组:0.10 g/kg·BW、高剂量组:0.30 g/kg·BW。老龄大鼠于试验前在动物房环境中适应并喂食正常饲料5 d,然后采尾血测定老龄鼠血清中丙二醛(MDA)的含量。根据其含量将老龄鼠随机分为3个剂量组,即0.05、0.10、0.30 g/kg·BW和1个老龄对照组。连续给予蓝莓提取物30 d,灌胃量为10 mL/kg·BW。正常对照组灌胃安慰剂(蒸馏水)10 mL/kg·BW。实验结束时采血并分离血清,测定超氧化物歧化酶(SOD)活力、MDA、还原型谷胱甘肽(GSH)和蛋白质羰基含量。颈椎脱臼处死实验动物,取肝组织,液氮冷冻,制作组织切片进行观察并测定抗氧化相关基因表达水平。

1.3 方法

1.3.1 花青素含量的测定

首先将氯化飞燕草色素和蓝莓提取物用2%盐酸-乙醇配成溶液,然后采用紫外分光光度法^[9],以氯化飞燕草色素为标品做标准曲线测定蓝莓提取物中花青素的含量。蓝莓提取物中花青素的含量以飞燕草素的

质量分数 w_3 计, 数值以%表示, 按以下公式计算:

$$w_3 = \frac{(A + 0.0018) \times f}{848 \times m_2} \times 100\%$$

式中: A 为样品溶液在吸收波长 540 nm 下的吸光度; f 为稀释倍数; m_2 为样品质量, 单位为克 (g)。

以对照品溶液浓度($\mu\text{g/mL}$)为横坐标, 吸光度 Y 为纵坐标。绘制标准曲线, 线性回归方程 $Y=0.0848X-0.0018$, $R^2=0.9999$ 。表明花青素在 1.2 $\mu\text{g/mL}$ ~6 $\mu\text{g/mL}$ 的范围内呈良好的线性关系。用紫外分光光度计在 540 nm 波长处测定蓝莓提取物溶液吸光度为 0.284, 经测算花青素含量为 27.76%。

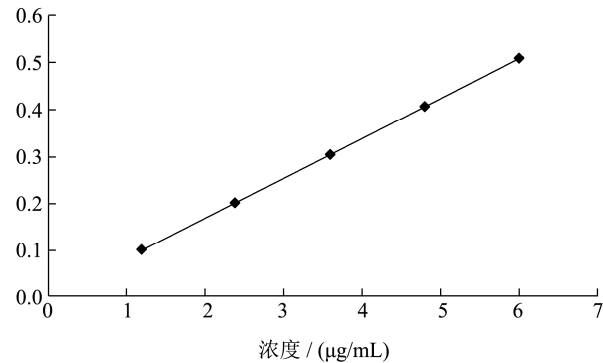


图 1 氯化飞燕草色素标准曲线

Fig.1 The standard curve of the Delphinidin chloride

1.3.2 生化指标的测定

MDA 含量采用硫代巴比妥酸法测定; SOD 活力采用黄嘌呤氧化酶法测定; GSH 含量采用四氧嘧啶法测定; 蛋白质羰基含量采用 2,4-二硝基苯肼法测定; 检测步骤均按照试剂盒说明书操作。

1.3.3 病理组织学检查

收取大鼠肝组织, 称重后投入 10%甲醛中固定, 石蜡包埋后进行切片, 苏木精-伊红染色法 (hematoxylin-eosin staining, HE), 脱水、透明, 封片, 显微镜下观察。

1.3.4 实时定量荧光 PCR (Quantitative Real-time PCR, qRT-PCR)

肝脏组织总 RNA 的提取依照 Trizol 试剂盒说明方法操作, 取 RNA 在 Takara 逆转录反应体系中逆转录成 cDNA, 然后以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。引物序列如表 1 所示, RT-PCR 反应条件为: 预变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s; 扩增 95 $^{\circ}\text{C}$ 、5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s; 共进行 40 个循环。采用相对定量方法分析各样品的 Ct 值, 以 GAPDH 为内参基因, 根据公式 $\Delta\Delta\text{Ct}=(\text{实验组目的基因 Ct}-\text{实验组内参基因 Ct})-(\text{对照组目的基因 Ct}-\text{对照组内参基因 Ct})$ 算出 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$, 用 Tukey 检验方法进行统计学处理。各基因的 qRT-PCR 引物序列见表 1。

表 1 qRT-PCR 引物序列

Table 1 The primer sequences of qRT-PCR

Gene	Primer sequences (5' to 3')	GenBank accession number	Product/bp
SOD1	Forward: CCACTGCAGGACCTCATTTTAAT	NM_017050.1	76
	Reverse: TCTCCAACATGCCTCTCTTCATC		
GPx1	Forward: CATCAGGAGAATGGCAAGAA	NM_030826.4	106
	Reverse: TCACCTCGCACTTCTCAAAC		
CAT	Forward: CCCGAGTCCAGGCTCTTCT	NM_012520.2	75
	Reverse: CGGCCTGTACGTAGGTGTGA		
Gclm	Forward: TGTGTGATGCCACCAGATTT	NM_017305.2	189
	Reverse: GCTTTTCACGATGACCGAGT		
Caspase-9	Forward: CGGTGGACATTGGTTCTG	NM_031632.1	124
	Reverse: ACGTTGTTGATGATGAGG		
Apaf1	Forward: TGCTCTGCCTTCTCGC	NM_023979.1	138
	Reverse: GTGGGTAGCCGTTTCCT		
GAPDH	Forward: CCCAGACCCCAATAACAACA	NM_017008.4	80
	Reverse: GAGGGTGCAGCGAACTTTAT		

1.4 统计分析

采用 SPSS 16.0 统计分析软件进行方差分析, 实验数值以 $\text{mean}\pm\text{SD}$ 表示, 组间比较采用 One-way ANOVA 分析 (两两比较采用 Tukey 检验), $p<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 蓝莓提取物对老龄大鼠体重和肝脏湿重的影响

由表 2 可见, 实验期间老龄大鼠体重有所变化, 但实验前后或各实验组之间体重变化无显著性差别, 表明蓝莓提取物对老龄大鼠体重无明显影响。低剂量

组大鼠喂食蓝莓提取物后, 肝脏湿重升高至 24.13 ± 3.43 g, 明显高于老龄对照组 ($p < 0.05$)。各组老龄大鼠对灌胃蓝莓提取物没有异常反应, 进食量如常。

表 2 蓝莓提取物对老龄大鼠体重及肝脏湿重的影响

Table 2 Effects of blueberry extract on the body and liver wet weight of aged rats (n=10, $\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(g/kg·BW)	初重/g	末重/g	肝脏湿重/g
对照组	0	569.83±28.72	681.54±61.03	20.70±2.27
低剂量组	0.05	552.51±31.14	709.02±54.32	24.13±3.43*
中剂量组	0.10	564.56±28.63	646.15±43.53	20.94±1.92
高剂量组	0.30	567.52±31.98	695.95±33.87	23.15±1.87

注: *表示与对照组比较, $p < 0.05$ 。下表同。

表 3 蓝莓提取物对老龄大鼠血清中 MDA、GSH、蛋白质羰基含量和 SOD 活性的影响

Table 3 Effects of blueberry extract on the MDA, GSH, protein carbonyl and SOD levels in serum of aged rats

组别	剂量/(g/kg·BW)	MDA/(nmol/mL)	GSH/(mg GSH/L)	蛋白质羰基/[nmol/(mg prot)]	SOD 活力/(U/mL)
对照组	0	9.77±1.87	29.81±4.80	1.25±0.29	112.64±20.47
低剂量组	0.05	9.87±1.81	29.49±4.84	1.30±0.29	113.78±14.95
中剂量组	0.10	8.74±1.31	30.02±6.00	1.05±0.26	124.42±12.54
高剂量组	0.30	7.81±1.55*	32.85±4.05	0.92±0.42*	134.61±12.27*

2.2 蓝莓提取物对老龄大鼠 MDA、GSH、蛋白质羰基含量和 SOD 活力的影响

花青素具有极强的抗氧化活性和自由基清除功能, 是一种良好的自由基清除剂和脂质过氧化抑制剂。双盲随机安慰剂对照试验表明, 持续 2 周给 61~75 岁的老年受试者每天服用 119 mg 花青素可以明显降低缺血再灌注损伤诱导的血浆中 F2-异前列腺素浓度, 同时也降低了尿液中氧化核酸的分泌 (如 8-羟基脱氧鸟苷、8-羟基鸟苷), 这些数据表明花青素可以提高老年人体内抗氧化能力^[6]。有研究表明, 用矢车菊素-3-葡萄糖苷进行大鼠饲喂实验, 表明此花色苷可以降低血清蛋白和脂质体的过氧化作用, 并且对重灌注诱发的局部贫血肝脏的氧化性损伤具有保护作用^[10]。MDA 是细胞膜不饱和脂肪酸氧化最典型的终产物, 其含量可间接估计自由基产生量和膜脂质过氧化程度^[11]。由表 3 可见, 蓝莓提取物高剂量组的 MDA 含量降低至 7.81 ± 1.55 nmol/mL ($p < 0.05$), 与对照组相比有显著性降低, 说明蓝莓提取物在体内具有改善脂质过氧化的作用。蛋白质羰基形成是蛋白质分子被自由基氧化修饰的一个重要标记, 且随着年龄的增长而增加^[12]。本研究中高剂量组老龄小鼠肝组织蛋白质羰基含量降低至 0.92 ± 0.42 nmol/(mg prot), 约是对照组的 0.7 倍 ($p < 0.05$), 提示机体蛋白质被氧化损伤的情况得到明显改善。SOD 是一种清除超氧阴离子自由基的金属酶, 其含量是反应机体抗氧化能力的重要指标^[13]。本

研究中, 高剂量组老龄大鼠 SOD 活性有明显上升, 由对照组 112.64 ± 20.47 U/mL 增加至 134.61 ± 12.27 U/mL ($p < 0.05$)。提示蓝莓提取物可改善老龄鼠肝组织的氧化应激状态。蓝莓提取物低、中、高剂量组 GSH 含量则差异无显著性 ($p > 0.05$)。

2.3 蓝莓提取物对老龄大鼠肝脏组织显微结构的影响

如图 2 所示, 相比较于对照组, 蓝莓提取物处理组的肝索排列更加整齐, 小叶结构清晰, 中央静脉周围多见肝细胞胞核居中, 少见肝细胞胞质空泡化 (红色箭头)。

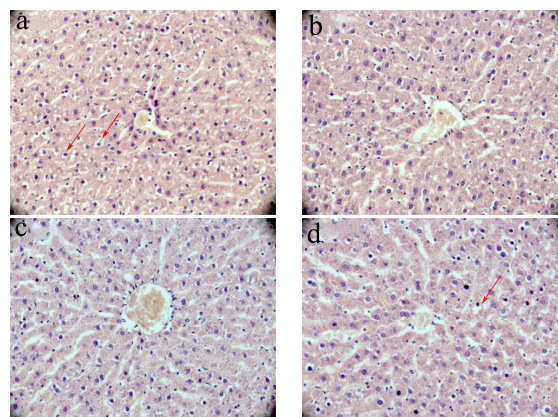


图 2 蓝莓提取物对老龄大鼠肝脏器官的影响

Fig.2 Effects of blueberry extract on the liver organs of aged rats

注: a-对照组; b-低剂量组; c-中剂量组; d-高剂量组。

2.4 蓝莓提取物对老龄大鼠肝脏组织中抗氧化

化基因表达量的影响

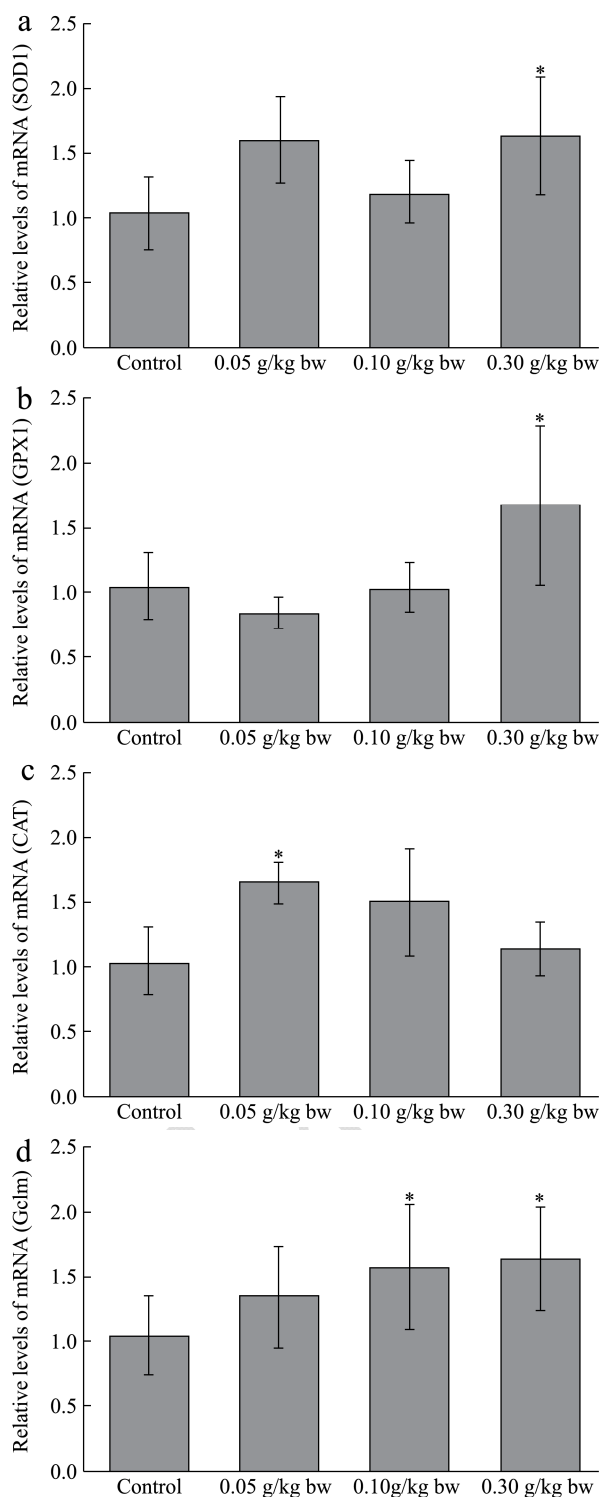


图3 蓝莓提取物对老龄大鼠肝脏组织中抗氧化基因表达水平的影响

Fig.3 Effects of blueberry extract on the expression of antioxidant genes in aged rat's livers

肝脏作为食物、药物甚至毒素的主要代谢器官，

含有丰富的综合功能抗氧化酶和代谢酶。随着年龄增加，肝脏中内源性抗氧化物减少，氧化应激的标志物在增多，即处于氧化应激状态时，过多的自由基就会相互作用并损伤生命大分子物质及各种细胞，导致肝脏功能发生障碍^[14,15]。内源性抗氧化系统主要抗氧化酶组成，其中重要成员包含 SOD、CAT 和 GSH-Px 等。SOD 是金属酶，根据金属辅基的不同分为：*Cu,Zn-SOD* (*SOD1*) 基因、*Mn-SOD* (*SOD2*) 基因、*Fe-SOD* 基因、*Ni-SOD* 基因、*Fe,Zn-SOD* 基因和 *Mn,Fe-SOD* 基因。SOD 通过金属酶的活性部位中金属辅基快速将超氧阴离子自由基 ($O_2^{\cdot-}$) 氧化还原，生成 H_2O_2 达到清除 $O_2^{\cdot-}$ 的目的。体内的 H_2O_2 再由 CAT 和 GSH-Px 作用生成水^[16]。GPx-1 是 GSH-Px 家族中分布最广泛的酶，阻断 ROS 对机体的进一步损伤。GSH 在清除体内产生的自由基中发挥重要作用，谷氨酰半胱氨酸连接酶 (Glutamatecysteine ligase, GCL) 是 GSH 生物合成的限速酶，其催化亚基 (GCLC) 和调节亚基 (GCLM) 是重要的抗氧化蛋白酶^[17]。如图 3 所示，蓝莓提取物高剂量处理组的 *SOD1* 和 *GPx1* mRNA 表达水平是对照组的 1.63 倍和 1.67 倍 (均 $p < 0.05$)；蓝莓提取物的低剂量处理组 CAT mRNA 表达水平高于对照组 1.65 倍 ($p < 0.05$)；蓝莓提取物的中、高剂量组 *Gclm* 的表达水平显著升高，分别为对照组的 1.58 倍和 1.64 倍 (均 $p < 0.05$)。本研究结果表明，蓝莓提取物能够通过提高肝脏组织中抗氧化相关基因的表达来减轻氧化应激状态，有助于提高老年个体的抗氧化能力。

2.5 蓝莓提取物对老龄大鼠肝脏组织中凋亡

基因表达量的影响

氧化应激产生的氧自由基可以通过脂质过氧化、蛋白质及酶变性和 DNA 损伤等途径导致细胞死亡或凋亡^[18]。半胱氨酸蛋白酶 (Caspase) 家族蛋白在细胞凋亡启动和执行过程中发挥至关重要的作用，其中 Caspase-9 是线粒体介导的内源性凋亡途径的启动子，处于 Caspases 级联反应的顶端^[19]。在机体受到外界凋亡刺激信号诱导后，Caspase-9 酶原发生切割加工，同时细胞色素 C 从线粒体释放出来与凋亡因子 1 (Apoptosis protease-activating factor-1, Apaf1) 形成多聚体，诱导 Apaf1 的构象发生改变，再与 Caspase-9 结合形成凋亡复合物既凋亡体 (Apoptosome)。活化后 Caspase-9 可以直接活化 Caspase-3，进而活化下游的效应性蛋白酶 Caspase-2、Caspase-2、Caspase-8 等成员，引发 Caspases 级联反应，诱导细胞凋亡^[20]。相

关实验研究发现,黑果枸杞原花青素可以下调 D-半乳糖联合紫外线(UV)辐射损伤小鼠皮肤组织中 Caspase-9、Caspase-3 水平,进而阻止细胞凋亡的发生^[21]。实时荧光定量 PCR 检测老龄大鼠肝脏组织中凋亡相关基因 Caspase-9 和 Apaf1 的表达。结果如图 4 所示:与对照组老龄大鼠相比,蓝莓提取物中剂量和高剂量处理组肝脏组织中 Caspase-9 相对表达量均显著降低,分别为对照组的 0.44 倍和 0.21 倍,差别有统计学意义 ($p<0.01$);蓝莓提取物中剂量和高剂量处理组 Apaf1 mRNA 表达水平是对照组的 0.55 倍和 0.43 倍 ($p<0.01$)。结果表明蓝莓提取物对衰老的肝脏组织有一定的保护作用,而这种保护作用与蓝莓提取物中的花青素是天然强效的抗氧化剂有关,通过降低机体氧化应激水平,从而抑制 Caspase 上游信号下传。

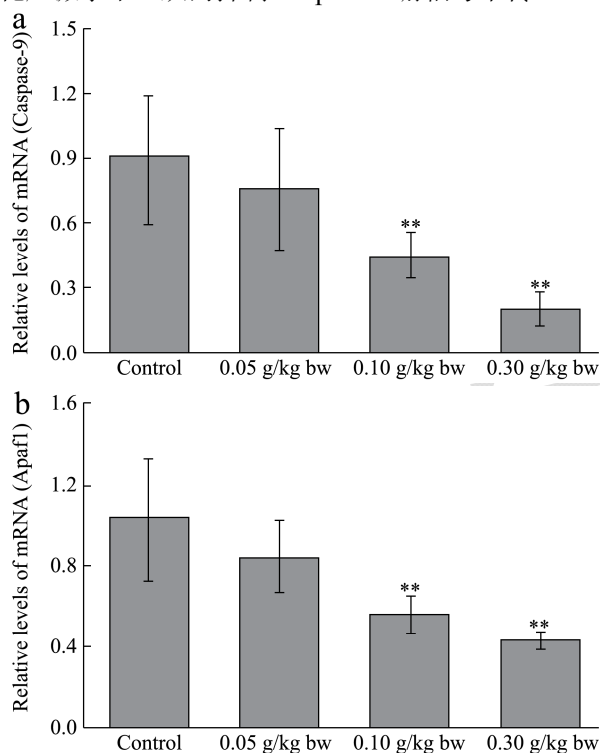


图4 蓝莓提取物对老龄大鼠肝脏组织中凋亡基因表达水平的影响

Fig.4 Effects of blueberry extract on the expression of apoptosis genes in aged rat's livers

3 结论

综上所述,本实验证实蓝莓提取物具有良好的抗氧化效果,对衰老模型大鼠具有一定肝脏保护作用,其作用机制可能与其提高体内抗氧化能力,减少机体活性氧物质的蓄积,抑制凋亡基因的过度表达有一定的关系。本研究为蓝莓提取物缓解老龄大鼠机体氧化应激状态及细胞凋亡提供理论依据,为蓝莓提取物的

开发和应用提供新的市场及药用价值。

参考文献

- [1] Ashok B T, Ali R. The aging paradox: Free radical theory of aging [J]. Experimental Gerontology, 1999, 34: 293-303
- [2] Reddi A R, Culotta V C. SOD1 integrates signals from oxygen and glucose to repress respiration [J]. Cell, 2013, 152: 224-235
- [3] Andres-Lacueva C, Shukitt-Hale B, Galli R L, et al. Anthocyanins in aged blueberry-fed rats are found centrally and may enhance memory [J]. Nutritional Neuroscience, 2005, 8: 111-120
- [4] 杨旸,文利新.花青素的生理活性及作用[J].湖南农业科学,2011,20:27-28
YANG Yang, WEN Li-xin. The study of physiological activities and functions of anthocyanins [J]. Hunan Agricultural Sciences, 2011, 20: 27-28
- [5] 赵君操.蓝莓对 D-半乳糖模型小鼠学习记忆及抗氧化的研究[J].河南医学研究,2010,19:401-403
ZHAO Jun-cai. The study on memory and antioxidant ion of blueberry to D-galactose model of mouse [J]. Henan Medical Research, 2010, 19: 401-403
- [6] Traustadóttir T, Davies S S, Stock A A, et al. Tart cherry juice decreases oxidative stress in healthy older men and women [J]. The Journal of Nutrition, 2009, 139: 1896-1900
- [7] Matsumoto H, Takenami E, Iwasaki-Kurashige K, et al. Effects of blackcurrant anthocyanin intake on peripheral muscle circulation during typing work in humans [J]. European Journal of Applied Physiology, 2005, 94: 36-45
- [8] Kay C D, Holub B J. The effect of wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) consumption on postprandial serum antioxidant status in human subjects [J]. British Journal of Nutrition, 2002, 88: 389-397
- [9] Zu X Y, Zhang Z Y, Zhang X W, et al. Anthocyanins extracted from Chinese blueberry (*Vaccinium uliginosum* L.) and its anticancer effects on DLD-1 and COLO205 cells [J]. National Medical Journal of China, 2010, 123: 2714-2719
- [10] Bridle P, Timberlake C. Anthocyanins as natural food colours-selected aspects [J]. Food Chemistry, 1997, 58: 103-109
- [11] Gawel S, Wardas M, Niedworok E, et al. Malondialdehyde (MDA) as a lipid peroxidation marker [J]. Wiad Lek, 2004, 57: 453-455

(下转第 233 页)