

海南自然科学基金创新研究团队项目 (2017CXTD001)
2017年天津大学——海南大学协同创新基金项目 (01003017)
国家自然科学基金项目 (31501497)
海南省自然科学基金项目 (20163053)

LANMEI HUAQINGSU JIEKANG HUAXUEXING GANSUNSHANG JI XIANGGUAN JIZHI YANJIU

蓝莓花青素拮抗化学性肝损伤 及相关机制研究

陈健 刘东莉◎著



中国原子能出版社

海南自然科学基金创新研究团队项目 (2017CXTD001)

2017年天津大学——海南大学协同创新基金项目 (01003017)

国家自然科学基金项目 (31501497)

海南省自然科学基金项目 (20163053)

蓝莓花青素拮抗化学性肝损伤 及相关机制研究

陈健 刘东莉 著



中国原子能出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

蓝莓花青素拮抗化学性肝损伤及相关机制研究 / 陈健、刘东莉著. -- 北京 : 中国原子能出版社, 2017.6
ISBN 978-7-5022-8185-4

I. ①蓝… II. ①陈… ②刘… III. ①浆果类-花青素-拮抗作用-肝损伤-研究 IV. ①R657.3

中国版本图书馆CIP数据核字 (2017) 第145827号

蓝莓花青素拮抗化学性肝损伤及相关机制研究

出版发行 中国原子能出版社 (北京市海淀区卓成路43号 100048)
责任编辑 王 朋
责任印刷 潘玉玲
印 刷 三河市天润建兴印务有限公司
经 销 全国新华书店
开 本 787毫米*1092毫米 1/16
印 张 8.5
字 数 147千字
版 次 2018年1月第 1 版
印 次 2018年1月第1次印刷
标准书号 ISBN 978-7-5022-8185-4
定 价 42.00元

网址: <http://www.aep.com.cn>
发行电话: 010-68452845

E-mail: atomep123@126.com
版权所有 翻印必究

◎ 摘要

蓝莓花青素是蓝莓中天然存在的一类生物活性物质,具有重要的生理功能和开发应用前景。为实现蓝莓花青素的综合利用,本文以东北栽培的蓝莓果为研究对象,在蓝莓花青素分离纯化的基础上,对制备的花青素单体进行了结构鉴定。并通过建立急性小鼠肝损伤模型,探讨了蓝莓花青素对四氯化碳(CCl_4)诱导小鼠的肝损伤的保护和氧化应激的影响,结合其体外清除自由基抗氧化活性和对 CCl_4 诱导的L-02肝细胞损伤的保护,从抗氧化的角度探讨了蓝莓花青素对肝损伤保护作用的主要机制。主要研究结果如下:

(1) 蓝莓果中花青素类物质的最佳提取工艺参数为:0.5%三氟乙酸-甲醇为提取溶剂,料液比为1:15, pH为2.5, 加酶量3%, 酶解温度70℃, 酶解反应时间1h。在此条件下,经HPLC法测定,蓝莓花青素得率为5.65mg/100g。

Amberlite XAD-7 大孔树脂对蓝莓花青素表现出良好的吸附与解吸性能,是分离纯化蓝莓花青素的理想树脂。Amberlite XAD-7 树脂的优化动态吸附条件为:蓝莓花青素液浓度 2.5mg/mL, pH2.5, 进样速率 1.0mL/min; 优化洗脱条件为:甲醇浓度 70%, 洗脱速率 1.0mL/min, 洗脱体积 10BV。在此条件下, Amberlite XAD-7 树脂对蓝莓花青素的动态吸附量达最大值 0.175mg/g, 动态解吸回收率达 82.55%。

通过制备型高效液相色谱制备出三种主要的花青素单体,经过结构鉴定,组分1为锦葵色素-3-半乳糖苷(M3G),纯度为95.49%;组分3为矢车菊素-3-葡萄糖苷(C3G),纯度为98.57%;组分6为矢车菊素-3-芸香苷(C3R),纯度为96.34%。这三种单体占花青素的含量分别为12.76%、60.68%和15.87%。

(2) 蓝莓花青素具有一定的抗氧化活性,在DPPH自由基清除实验和 β -胡萝卜素/亚油酸自氧化体系中,相同浓度下,其作用效果优于抗坏血酸。蓝莓花青素分离的三种单体总抗氧能力表现为 $\text{C3G} > \text{C3R} > \text{M3G}$,且半抑制浓度(IC_{50} 值)表明,矢车菊素-3-葡萄糖苷(C3G)清除过氧烷基及DPPH自由基的能力最强($P < 0.05$),从而进一步说明其为蓝莓花青素中有效的抗

氧化活性成分之一。

(3) 小鼠摄入蓝莓花青素后的低(0.5g/kgbw)、中(1.0g/kgbw)、高(2.0g/kgbw)剂量组经CCl₄诱导的急性肝损伤小鼠的肝酶活性较模型组显著降低($P<0.05$),血清和肝脏中丙二醛(MDA)的生成量显著减少($P<0.05$),超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性明显增强($P<0.05$),肝脏组织的总抗氧化能力(T-AOC)显著提高($P<0.05$);由CCl₄引起的肝脏组织气球样变、脂肪变性、炎症浸润等病理学损伤,喂食蓝莓花青素后,均可得到明显改善。

(4) 通过建立CCl₄对人胚胎肝细胞株L-02的损伤模型,结果表明:CCl₄诱导L-02肝细胞损伤的最适损伤浓度为20mmol/L,损伤时间为6h。经CCl₄损伤后模型组细胞存活率仅为45.68%,上清液肝酶活性显著升高($P<0.05$),脂质过氧化产物MDA含量显著增加($P<0.05$)。蓝莓花青素可一定程度地改善L-02肝细胞损伤,能明显提高肝细胞的存活率,减少肝酶的释放,存在明显剂量效应关系($P<0.05$)。蓝莓花青素中的三种主要成分单体的抗肝损伤体外细胞试验结果表明,C3G对提高细胞存活率和细胞抗氧化水平作用最好,且与其它两种单体间存在显著性差异($P<0.05$)。最终证明了蓝莓花青素中有效的抗肝损伤活性单体为矢车菊素-3-葡萄糖苷(C3G)。

细胞克隆形成抑制实验、细胞周期DNA含量分析法及AnnexinV-FITC/PI双染色检测法的结果表明,矢车菊素-3-葡萄糖苷保护L-02正常肝细胞的形式是减少细胞的坏死。免疫印迹法检测调控细胞凋亡中的关键蛋白Caspase-3的含量变化进一步说明,矢车菊素-3-葡萄糖苷抑制L-02细胞因损伤而坏死的机理为Caspase依赖型,而细胞损伤可能是通过线粒体相关途径实现的坏死过程。

按照优选的微乳处方和蓝莓花青素的分离工艺,制备花青素微乳。并对其质量评价和体外抗氧化活性分析。所得的花青素微乳外观暗红色、澄清透明、性质稳定;透射电子显微镜下观察为球状液滴,且粒径在1~100nm之间,符合微乳的要求。用染色法证明其为W/O型微乳,用旋转粘度计测得其粘度为39.8687mpa/s,用电导率仪测得其电导率为37.62 μ s·cm⁻¹。花青素微乳在清除DPPH自由基、ABTS自由基和超氧阴离子方面,微乳包埋后花青素的IC₅₀分别为27.1、23.4和18.5mg/L。

关键词: 蓝莓花青素; 成分鉴定; CCl₄肝损伤; 抗氧化; L-02人胚胎正常肝细胞株; 微乳

本书由海南大学食品学院陈健、刘东莉撰写,本书的出版受海南自然科学基金创新研究团队项目(2017CXTD001),2017年天津大学—海南大

学协同创新基金项目(01003017),国家自然科学基金项目(31501497),海南省自然科学基金项目(20163053)等支持与资助。陈健负责撰写本书第1、5、6章;刘东莉负责撰写第2、3、4、7章,并且负责整理全书摘要、缩短词表以及参考文献。本书是在北京林业大学生物学院孙爱东教授的悉心指导下完成的,我们以崇敬的心情感谢孙爱东教授。

由于我们水平有限和时间紧促,在撰写过程中可能存在一些错误和缺点,希望大家批评指正。

陈健、刘东莉

2017年7月

目 录

摘 要	1
1. 引言	1
1.1 肝损伤的机制	1
1.1.1 肝细胞损伤的化学机制	1
1.1.2 肝细胞损伤的免疫学机制	2
1.2 化学性肝损伤模型	3
1.2.1 CCl ₄ 肝损伤模型	4
1.2.2 酒精性肝损伤模型	4
1.3 蓝莓活性成分及其在防治 CCl ₄ 肝损伤中潜在的作用	4
1.3.1 蓝莓及其花青素	4
1.3.2 花青素的主要成分及性质	5
1.3.3 花青素抗氧化活性功能研究进展	7
1.4 研究目的、意义及内容	8
1.4.1 研究的目的及意义	8
1.4.2 研究内容	8
1.4.3 创新之处	9
1.4.4 技术路线	10
2. 蓝莓中花青素类物质的分离纯化研究	11
2.1 材料与方法	11
2.1.1 材料与试剂	11
2.1.2 实验仪器	12
2.1.3 实验方法	12
2.2 结果与分析	15
2.2.1 HPLC 法测定纤维素酶提取的蓝莓花青素含量	15
2.2.2 树脂的筛选	18
2.2.3 AmberliteXAD-7 大孔树脂的静态性能研究	19

2.2.4 XAD-7 大孔树脂的动态性能研究	22
2.2.5 蓝莓花青素单体的结构分析	24
2.3 小结	32
3. 蓝莓花青素体外清除自由基活性研究	33
3.1 材料与方法	33
3.1.1 材料与试剂	33
3.1.2 实验仪器	34
3.1.3 实验方法	34
3.2 结果与分析	35
3.2.1 总抗氧化能力	35
3.2.2 DPPH 自由基清除能力	36
3.2.3 β -胡萝卜素 / 亚油酸自氧化体系的抑制作用	37
3.3 讨论	38
3.3.1 蓝莓花青素体外抗氧化作用	39
3.3.2 三种花青素单体抗氧化差异	39
3.4 小结	40
4. 蓝莓花青素对 CCl_4 诱导小鼠肝损伤的保护研究	41
4.1 材料和方法	41
4.1.1 材料与试剂	41
4.1.2 实验仪器	42
4.1.3 动物与分组	42
4.1.4 动物饲养及处理	42
4.1.5 检测指标及方法	43
4.1.6 数据处理和统计分析	44
4.2 结果与分析	45
4.2.1 肝脏指数、脾脏指数、胸腺指数的检测	45
4.2.2 蓝莓花青素对小鼠血清氧化应激水平的影响	45
4.2.3 蓝莓花青素对小鼠肝组织形态学变化的影响	46
4.2.4 蓝莓花青素对小鼠肝组织氧化应激水平的影响	48
4.3 讨论	48
4.3.1 蓝莓花青素对小鼠血清肝酶水平和肝组织病理形态学 的影响	49
4.3.2 蓝莓花青素对小鼠氧化应激水平的影响	49

4.4 小结	50
5. 蓝莓花青素对 CCl_4 损伤 L-02 肝细胞的保护研究	51
5.1 材料与方法	51
5.1.1 材料与试剂	51
5.1.2 实验仪器	52
5.2 试验方法	53
5.2.1 主要试剂的配制	53
5.2.2 细胞传代培养	56
5.2.3 细胞的冻存与复苏	56
5.2.4 细胞的增殖抑制实验	56
5.2.5 细胞凋亡的检测方法	58
5.2.6 SDS-PAGE 与 Westernblotting	60
5.2.7 数据处理和统计分析	62
5.3 结果与分析	63
5.3.1 CCl_4 作用不同浓度、时间对细胞 L-02 存活率的影响	63
5.3.2 蓝莓花青素对 CCl_4 损伤 L-02 细胞的保护及氧化应激 影响	63
5.3.3 花青素单体对 CCl_4 损伤 L-02 细胞的保护及氧化应激 影响	64
5.3.4 三种单体对肝损伤细胞的保护和抗氧化作用比较	68
5.3.5 矢车菊素 -3- 葡萄糖苷对 CCl_4 损伤 L-02 细胞克隆形成的 影响	71
5.3.6 PI 单染色检测亚二倍体百分率及细胞周期改变	72
5.3.7 AnnexinV-FITC/PI 双染色检测细胞凋亡	74
5.3.8 矢车菊素 -3- 葡萄糖苷对 L-02 细胞中 Caspase-3 蛋白含量 的影响	76
5.4 讨论	77
5.4.1 肝细胞 CCl_4 损伤模型的建立	77
5.4.2 蓝莓花青素对肝细胞存活率的提高作用	77
5.4.3 蓝莓花青素对肝细胞抗氧化防御系统的影响	78
5.4.4 矢车菊素 -3- 葡萄糖苷抑制正常细胞因损伤而坏死的 机理研究	80
5.5 小结	82

6. 微乳化提高蓝莓花青素稳定性研究	83
6.1 材料与方法	83
6.1.1 材料与试剂	83
6.1.2 实验仪器	85
6.2 实验方法	86
6.2.1 伪三元相图法制备微乳	86
6.2.2 空白微乳各相的筛选	86
6.2.3 微乳的鉴定	87
6.2.4 微乳理化指标的测定	87
6.2.5 花青素微乳的制备及表征	88
6.2.6 微乳包埋前后花青素的稳定性	88
6.2.7 微乳包埋前后花青素的体外抗氧化活性	88
6.2.8 数据处理	89
6.3 结果与分析	90
6.3.1 空白微乳的制备	90
6.3.2 蓝莓花青素微乳制备及表观形态	97
6.3.3 蓝莓花青素微乳包埋前后的稳定性研究	98
6.3.4 蓝莓花青素微乳包埋前后的抗氧化活性研究	99
6.4 讨论	103
6.5 小结	104
7. 结论与展望	106
7.1 结论	106
7.2 展望	107
参考文献	109

缩短词表

Abbreviation

缩写	英文名称	中文名称
ANOVA	Analysis of variance	方差分析
BA	Blueberry anthocyanins	蓝莓花青素
C3G	Cyanidin-3-glucoside	矢车菊素-3-葡萄糖苷
C3R	Cyanidin-3-rutinoside	矢车菊素-3-芸香苷
M3G	Malvidin-3-galactoside	锦葵色素-3-半乳糖苷
NMR	Nuclear magnetic resonance	核磁共振
MS	Mass spectrometry	质谱
HPLC	High performance liquid chromatography	高效液相色谱法
UV-Vis	Ultraviolet-visible spectroscopy	紫外-可见光谱
DPPH	2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl	二苯基苦酸基联氨
IC ₅₀	Inhibitive concentration	半数抑制浓度
AR	Alkylperoxide radical	过氧烷基
BHA	Butyl hydroxy anisd	丁基羟基茴香醚
BHT	Butyl hydroxy toluen.	二丁基羟基甲苯
PG	Propyl gallate	没食子酸丙酯
ROS	Reactive oxygen species	活性氧簇
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium	含各种氨基酸和葡萄糖的培养基
DMSO	Dimethyl sulfoxide	二甲基亚砷
DNA	Deoxyribonucleic acid	脱氧核糖核酸
MTT	3- (4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide	噻唑蓝

缩写	英文名称	中文名称
PI	Propidium iodide	碘化丙啶
FITC	Fluorescein isothiocyanate	异硫氰酸荧光素
SOD	Super oxide dlsmutase	超氧化物歧化酶
FBS	fetal calf serum	胎牛血清
PBS	Phosphate buffered saline	磷酸盐缓冲液
Trisbase	Trishydroxymethylaminomethane	三羟甲基氨基甲烷
SDS	Sodium dodecyl sulfate	十二烷基磺酸钠
SDS-PAGE	SDS- polyacrylamide gel electrophoresis	SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳
L-02	Human embryonic normal liver cell line	人胚胎正常肝细胞株
Caspase	Cysteine aspartic acid specific protease	半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶
NC	Nitrocellulose	硝酸纤维素
AP	Ammonium persulfate	过硫酸铵
A paf-1	Apoptosis protein activation factor	凋亡蛋白激活因子

1. 引言

1.1 肝损伤的机制

肝细胞损伤是各类型病毒性肝炎，某些化学试剂和药物如乙醇、四氯化碳、半乳糖胺、扑热息痛、抗结核药等所造成的肝脏病理过程中的一部分，是肝纤维化和肝硬化的起始动因（Ikeda et al., 2009; Riedland Shi, 2011）。防止肝细胞损伤，是预防和治疗慢性肝病的重要内容。肝损伤的发生机制非常复杂，总体上可分为化学性肝损伤和免疫性肝损伤两类。

1.1.1 肝细胞损伤的化学机制

一些化学毒物（ CCl_4 和乙醇等）和药物常常导致肝细胞损伤，临床上可见肝功能异常，严重时可发生肝功能衰竭。在正常情况下，肝脏主要通过细胞色素P450酶系的氧化还原作用和一些基团（如葡萄糖醛酸、硫酸酯、甲基、巯基、甘氨酸、谷氨酸等的结合作用来代谢这些化学毒物和药物，从而达到解毒的目的。当机体摄入的化学毒物和药物的剂量过大或遗传性代谢障碍时，则产生大量的亲电子基、自由基等活性代谢物，直接攻击内质网膜上的磷脂分子，引起膜脂质过氧化，改变膜的结构和功能而导致肝细胞损伤（Son et al., 2009; Astadi et al., 2009; Faria et al., 2011）。肝细胞化学损伤的机制有以下几种：

1.1.1.1 质膜的损害

肝细胞受损最基本的表现是质膜的损伤，质膜失去完整性，细胞骨架崩解，当细胞质膜失去完整性时，有小泡形成，破裂，细胞内容物倾出，导致细胞死亡。各类肝损伤引起质膜损害的机制不一。D-GalN与肝细胞内尿苷二磷酸（UDP）结合，形成UDP-半乳糖胺复合物，使尿苷三磷酸（UTP）耗竭，尿苷类化合物环化不进行，致使RNA和蛋白质合成受阻，质膜结构蛋白质合成减少，膜出现损伤。 CCl_4 则可通过早期溶膜作用直接破坏膜的结构导致质膜受损，细胞膜透性增加。各种化学性肝损伤中产生的自由基如 $\text{CCl}_3\cdot$ 、活性氧等能与细胞膜上不饱和脂肪酸起作用发生脂质过氧化

作用从而破坏膜的完整性（卢林耿等,2009；Gonzalez et al.,2005）。

1.1.1.2 氧自由基的损害

氧自由基（Oxygen free radicals,OFR）是指氧分子的活性代谢产物，其具有不配对电子的离子、分子或集团。自由基性质都很活泼，具有很强的氧化能力，有的还有还原能力。自由基的重要特点是连锁反应，加入少量引发剂，反应即可以启动；加入少量清除剂，反应可以受到抑制。生理情况下，OFR不断产生，也不断清除，不出现细胞损伤；在病理情况下，产生与清除失去平衡，导致体内OFR产生过多或清除不足，过度激活的OFR可与细胞膜上不饱和脂肪酸起作用，发生脂质过氧化作用。脂质过氧化的主要降解产物是脂质过氧化物丙二醛（MDA），MDA能进入膜磷脂的水相，使细胞膜变硬，膜流动性降低，通透性增加，从而导致膜的功能损伤或丧失，使肝细胞肿胀、坏死（Ha and Lee,2010；Kang et al.,2010）。王威等（2011）研究还发现肝损伤程度越重，血清中的MDA含量则越高。

机体存在着正常的自由基清除系统及抗氧化能力，内源性自由基清除系统包括酶系和非酶系两类，酶系包括超氧化物歧化酶（SOD），过氧化氢酶（CAT）和谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-Px）等；非酶系包括维生素C、E、A，微量元素硒（Se），还原型谷胱甘肽等含巯基化合物。这些酶类及低分子化合物对OFR和脂质过氧化物的形成有阻止作用，保护机体免受或减轻自由基损伤。在一些病理情况下体内抗氧化酶系不足或因自由基产生过多而引起抗氧化酶系的耗竭，氧化物和抗氧化物的动态失衡导致氧化应激，可引起含巯基蛋白破坏、细胞内钙稳态紊乱、DNA损伤及诱发细胞凋亡（Anna et al.,2003；Sharma and Katiyar,2006；Chen et al.,2012）。

在肝病中，自由基起着非常重要的作用。从肝细胞与动物模型的存活率、病理变化、脂质过氧化的变化、降低ALT的作用等方面来看，与自由基密切相关的维生素E和微量元素Zn以及外源性抗氧化剂的补充，在防治肝损伤方面起着重要作用（Kim et al.,2009；Maldonado-Celis et al.,2009）。

1.1.1.3 肝细胞钙超载

细胞的许多重要生理代谢活动都与胞内 Ca^{2+} 浓度有关，且钙稳态对细胞的生存极为重要。细胞毒性物质如 CCl_4 、疏水性胆盐等,可直接损伤肝细胞膜,使 Ca^{2+} 跨膜内流增加（Osanai et al.,2011；Gorettaa et al.,2008）。

1.1.2 肝细胞损伤的免疫学机制

免疫反应在病毒导致的肝损伤和自身免疫性肝炎的发病机制中起着重要的作用。

1.1.2.1 细胞因子

细胞因子是机体防御系统的主要部分,但产生过多亦可损伤肝细胞。 $\text{TNF-}\alpha$ 主要由激活的单核巨噬细胞(Kupffer细胞)产生,可诱导OFR的产生及脂质过氧化反应、诱导NO产生、促进肝细胞凋亡等途径引起肝细胞损伤(Anna et al.,2003; Almeida et al.,2007)。

1.1.2.2 一氧化氮

低浓度的一氧化氮(Nitric oxide,NO)对机体维持正常的生理功能有重要作用。但是在病理状态下,产生大量的NO,NO可与线粒体呼吸链的酶类或DNA合成酶结合,使其亚硝酸化而抑制能量的生成及DNA的合成;从而导致DNA的断裂和突变;NO本身还可与OFR结合,生成毒性很强的过氧化亚硝酸盐阴离子,诱导巯基氧化和脂质过氧化作用。此外,NO能抑制肝细胞蛋白质的合成,破坏线粒体的结构,抑制核糖核苷酸还原酶的活性,破坏DNA双螺旋结构,诱导肝细胞凋亡与坏死(Annanaryju et al.,2007; Hu,et al.,2010; Chen et al.,2011)。

1.1.2.3 肝细胞凋亡

细胞凋亡(Apoptosis)是细胞自主的生理性死亡,常发生于生理环境,在维持肝脏正常代谢中有重要的作用,可避免由于肝细胞死亡引发的炎症反应。细胞凋亡是一种级联反应,在凋亡的级联反应中,一类重要的物质就是天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶(Caspase)。细胞凋亡除了维持正常生理平衡外,还参与许多疾病的病理过程,如病毒性疾病、自身免疫性疾病、组织变性等。D-Ga1N、 CCl_4 、酒精、缺氧等所致各类肝损伤中往往同时伴有肝细胞凋亡。如乙醇可直接损害肝细胞膜,影响其结构和功能,还可通过其代谢产物乙醛与细胞内大分子物质结合,诱导细胞凋亡(Kim et al.,2009; Maldonado-Celis et al.,2009; Lam et al.,2010)。

1.2 化学性肝损伤模型

目前,国内外所应用的急性肝损伤动物模型主要是生物性、免疫性和化学性等方法。生物学方法对实验条件要求高且费用昂贵,故限制了其应用,仅用于病原体及其致病机理的高层次研究。免疫性肝损伤中最为常见的是刀豆蛋白A所致肝损伤以及卡介苗和脂多糖肝损伤模型(Osanai et al.,2011; Tang et al.,2012)。而化学方法中四氯化碳(CCl_4)、酒精及D-氨基半乳糖胺(D-Ga1N)是许多国内外学者倡导的肝损伤动物模型的诱导

剂。应用 CCl_4 及酒精复制化学性肝损伤动物模型条件要求较低,技术易于掌握,可靠性强,重复性好(孙怡等,2009; Yan et al.,2010)。

1.2.1 CCl_4 肝损伤模型

CCl_4 是常用的化学性肝损伤诱导剂,通过细胞色素P450起作用,在肝细胞内形成活性的三氯甲基基团($\text{CCl}_3\cdot$),在有氧条件下进一步形成高度活性的三氯甲基过氧化自由基($\text{CCl}_3\text{O}_2\cdot$),诱发脂质过氧化,从而损害肝细胞的细胞膜,使内源性转氨酶释放到细胞外,导致血清中的转氨酶活性显著升高,并导致细胞因子和氧自由基的释放;同时,激活Kupffer细胞及中性粒细胞,影响肝细胞的DNA合成和分裂,引起急性肝损伤(Hsu et al.,2006; Hu et al.,2003; Sang et al.,2006)。该模型是体内检测药物抗氧化作用的一种常用方法。

1.2.2 酒精性肝损伤模型

急性酒精性肝损伤的机理为机体大量摄入乙醇后,在乙醇脱氢酶的催化下大量脱氢氧化为乙醛和乙酸盐,使三羧酸循环障碍和脂肪酸氧化减弱,甘油三脂合成增加,脂蛋白合成和分泌受阻,周围脂肪动员增加,从而影响脂肪代谢,致使脂肪在肝细胞内沉积;同时乙醇能激活氧分子,产生氧自由基导致肝细胞膜的脂质过氧化,破坏细胞膜脂质结构,及体内还原型谷胱甘肽的耗竭(Hu et al.,1996; Wang et al.,2012; Sun et al.,2008)。

1.3 蓝莓活性成分及其在防治 CCl_4 肝损伤中潜在的作用

1.3.1 蓝莓及其花青素

蓝莓又名笃斯越橘(*Vaccinium uliginosum*),属杜鹃花科(Ericaceae)、越橘属(*Vaccinium*)植物。一般为多年生绿叶或者常绿灌木,能经受非常低的温度,甚至零下50度严寒下都能保存,最初蓝莓是在欧洲东部地区被发现的,属于一种小浆果,它的潜在经济价值和市场价值非常高(Mazza et al.,2002; Tanida et al.,2005)。蓝莓的果肉十分柔嫩、甜中带点略微的酸,所含有的营养成分比如糖酸比、水溶性维生素和维生素A、蛋白质等十分

丰富,甚至还含有在水果中比较少见的营养素金属微量元素如钾、锌、铁、锰等,是一种营养丰富的小浆果。另外科学研究还发现,蓝莓还具有抗氧化、提高眼睛视力、延缓衰老等作用,由此,联合国粮农组织(FAO)把蓝莓划为人类五大健康食品之一(Ayman et al.,2008; Salda et al.,2009; 李丹等,2009; 李亚东等,2002)。随着我国城镇居民生活条件的不断提高,人们对营养性食品的认识和需求逐渐增加,蓝莓的市场前景无限广阔,蓝莓加工业必将成为一个极具经济价值的产业。

虽然最早蓝莓是在欧洲被发现的,但是最开始的人工栽培蓝莓品种是从不到一世纪前的美国开始。目前蓝莓产品在市场上的供给还处于不均衡趋势,归其原因有:一是蓝莓产地少,全球蓝莓主要产地在欧洲、北美洲和南美洲的若干国家,产量因为产地少而提不上去;二是蓝莓鲜食和蓝莓加工产品比例不协调。以中国为例,国内鲜果销售和加工品比例高达6:1,产业体系存在不合理性(方忠祥等,2001; 李连达,2003)。因此从长远看来,应该大力扩展蓝莓深加工产品产业链,调整产业比例,增加蓝莓产业附加值。

1.3.2花青素的主要成分及性质

花青素(anthocyanins)是一种水溶性天然色素,一般存在于植物中,以糖苷形式存在,因此也被称作花色苷。赐予大自然万紫千红的主要因素正是花青素的存在而形成的,花青素存在于植物组织细胞当中,而组织液中的pH值的不同会令花青素改变颜色,当pH低于7时花色苷变为红色,当pH升高到7以上时花色苷会转变为蓝色。植物接受越多的光照后,其细胞内的花青素含量会生成更多。因此光照对花青素的化学性质影响很大,除光照外,温度对它的影响也很大,过高的温度会使花青素降解。在意大利,1879年人们偶然间从生产红葡萄酒的下脚料废渣中提取出了第一种,也是最丰富的一种花青素-葡萄皮红,从此人们对花青素的探索和研究不断深入(Legua et al.,2012; Siddiq et al.,2011)。

迄今,人们已发现自然界中共有22大类花青素,大多数或者说基本上都存在于开花植物(被子植物)的花、果实、茎、叶、根器官的细胞液中。尤其是葡萄皮、越橘、树莓等水果中,花青素的含量极其高,在我们食品当中常见的花青素可分为六类(Moore et al.,2006; Osanai et al.,2011),分别为矢车菊色素(cyanindin,Cy)、天竺葵色素(pelargonidin,Pg)、飞燕草色素(delphinidin,Dp)、芍药色素(peonidin,Pn)、牵牛色素(petunidin,Pt)和锦葵色素(malvidin,Mv)。