论文分类号： 2

学校代码： 10708

学　　号： 1008034

陕西科技大学
SHAANXI UNIVERSITY OF SCIENCE & TECHNOLOGY

硕士学位论文

Thesis for Master's Degree

花青素对镉诱导肝脏损伤的保护作用及机制研究

王 静

指导教师姓名：马养民 教授，龚频 博士

学 科　名 称：有机化学

论文提交日期：2013 年 6 月

论文答辩日期：2013 年 5 月

学位授予单位：陕西科技大学

答辩委员会主席：刘树兴

评阅人：宋宏新 毛跟年 杨秀芳

中国知网 https://www.cnki.net

原创性声明及关于学位论文使用授权的声明

原 创 性 声 明

本人郑重声明：所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究所取得的成果。除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的科研成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本人完全意识到本声明的法律责任由本人承担。

论文作者签名：王静　　日　期：2013 年 5 月

关于学位论文使用授权的声明

本人完全了解陕西科技大学有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留或向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅和借阅；本人授权陕西科技大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或其他复制手段保存论文和汇编本学位论文。同时授权中国科学技术信息研究所将本学位论文收录到《中国学位论文全文数据库》，并通过网络向社会公众提供信息服务。

（保密论文在解密后应遵守此规定）

论文作者签名：王静　导师签名：[illegible]　日　期：2013 年 5 月

中国知网　https://www.cnki.net

陕西科技大学

申请 理学硕士 学位论文

花青素对镉诱导肝脏损伤的保护作用及机制研究

学科门类：理学

一级学科：化学

培养单位：化学与化工学院

硕士生：王 静

导 师：马养民 教授

2013 年 5 月

中国知网 https://www.cnki.net

PROTECTIVE EFFECT AND MECHANISM OF ANTHOCYANIDIN ON THE CADMIUM-INDUCED HEPATOTOXICITY IN RATS

A Thesis Submitted to

Shaanxi University of Science and Technology

in Partial Fulfillment of the Requirement for the Degree of

Master of Science

By **Jing Wang**

Supervisor: Prof. **Yangmin Ma**

May 2013

中国知网 https://www.cnki.net

花青素对镉诱导肝脏损伤的保护作用及机制研究

摘 要

镉（Cadmium, Cd），是一种常见的环境污染物。由于其生物半衰期长，代谢缓慢，因此毒性极强；能够引起多种组织和器官的损伤，并诱发畸形导致基因突变。其中，以肝脏损伤的镉中毒备受关注。已有研究认为，镉的肝脏毒性与自由基的积累和氧化压力（oxidative stress, OS）的产生有关，因此寻找高效、安全的抗氧化物成为肝脏解毒的主要方向。鉴于花青素（Anthocyanidin）是一类具有超强自由基清除能力的天然抗氧化物，并且在蓝莓（blue berry）中储量丰富，故本文通过实验，研究蓝莓花青素（Ay）对小鼠镉损伤肝脏的保护作用及其作用机制。

体外实验中，通过分光光度法讨论 Ay 对•OH 和 DPPH 的清除能力并评价 Ay 与金属 Cd^{2+}的螯合作用。体内实验中，首先构建 Ay 保护的镉诱导小鼠肝脏损伤模型。其次，测量体重增长、肝脏重量及肝脏系数等指标来评价 Cd 对小鼠生长的影响和 Ay 的保护作用；使用原子吸收分光光度计分析肝脏组织中 Cd 和 Zn 的含量；肝脏组织匀浆后，对肝细胞抗氧化酶的活力水平及细胞氧化程度进行检测；同时采用 H&E 染色、石蜡切片进行组织病理学分析。最后，为进一步讨论镉的遗传毒性，采用琼脂糖凝胶电泳法对肝细胞 DNA 的损伤进行定性分析，二苯胺法对 DNA 的损伤进行定量分析。

结果表明：Ay 具有良好的体外自由基清除能力，同时还具有螯合金属 Cd^{2+}的作用。饲养期镉损伤小鼠生长缓慢，肝脏出现明显病变。然而花青素的摄入能明显抑制 Cd^{2+}在肝脏中的蓄积，还原肝细胞功能，促进镉损伤小鼠健康生长；提高超氧化物歧化酶（superoxide dismutase, SOD）和过氧化氢酶（catalase, CAT）的活力水平，削弱镉诱导的氧化压力。通过抑制丙二醛（madondialdehyde, MDA）、蛋白羰基化物（protein carbonyl, PCO）和一氧化氮（nitric oxide, NO）的积累，阻止 DNA 分子片段化。组织病理学还表明，Ay 能防止镉引起的肝细胞皱缩、核质外流和炎症浸润等。另外，花青素的保护作用与实验中的喂饲浓度呈依赖关系，其保护机理如下：i) 清除自

中国知网 https://www.cnki.net

由基、提高机体的抗氧化能力；ii) 抑制 NO 等炎症因子的产生；iii) 螯合金属 Cd^{2+}，抑制肝脏中镉的蓄积，缓解损伤。

关键字：花青素，镉，肝脏损伤，自由基，氧化应激

中国知网 https://www.cnki.net

PROTECTIVE EFFECT AND MECHANISM OF ANTHOCYANIDIN ON THE CADMIUM-INDUCED HEPATOTOXICITY IN RATS

ABSTRACT

Cadmium (Cd) is a common environmental pollutant and it has severe biotoxicity due to the long half biological period and slow biological metabolism. Cd that circulates with blood is capable of causing organ damages and inducing genetic mutation. Liver is reported to be an easy target organ where Cd accumulates. The liver damage induced by Cd is associated with its capability of overproduction of free radicals and generation oxidative stress. Hence, antioxidants with high efficiency and safety may exert liver detoxification against Cd injuries. Anthocyanidins (Ay) is a kind of widespread natural plant pigments, showing a super radical scavenging capacity. For most species, blueberry is so far found to rich in Ay and serves as the priority source for Ay. The present study aims to investigate the protective effect and mechanism of Ay extracted from blueberry on the cadmium-induced hepatotoxicity in mice.

In vitro experiments, the scavenge capability of Ay to hydroxyl radical (•OH) and DPPH are studied via spectrophotometry and the chelation ability of Cd^{2+} against Ay are evaluated. In vivo experiments, we developed a model to evaluate the counter effect of Cd-induced damage and the protective effect of Ay on mice by measuring the weight of body and liver as well as liver coefficient. Besides, the content of Cd and Zn in liver cells are examined by atomic absorption spectrophotometer. The antioxidant levels as well as the degree of cell oxidation in liver were examined correspondingly; H&E dyeing and paraffin sections were also utilized for histopathological analysis. To quantitatively analysis Cd genotoxicity, the damaged DNA was further measured via the methods of agarose gel electrophoresis and diphenylamine.

中国知网 https://www.cnki.net

The present results showed that Ay extracted from blueberries has an excellent radical scavenging capacity dependent upon its experimental dose and the chelation between Cd and Ay which is in accordance with the in vitro observation. The mice feed by Cd poorly grow and their livers show obvious damage. It is observed that in the mice fed by Ay and Cd, however, the accumulation of Cd in liver is inhibited and liver cell functions are restored, contributing to mice growth. Moreover, Ay can significantly improve the vitality of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT), leading to the reduction of oxidative stress. The concentration of madondialdehyde (MDA), protein carbonyl (PCO) and nitric oxide (NO) in liver is lowered and therefore the fragmentation of DNA and apoptosis are suppressed. In addition, histopathology shows that Ay can prevent liver cell shrinkage, nucleoplasm outflows and inflammatory infiltration induced by Cd. Ay shows a dose-dependent manner against the Cd-induced liver damage in tests. In conclusion, the mechanisms of Ay to protect cadmium-induced hepatotoxicity in mice may involve in i) the scavenging of free radicals and improvement of antioxidant abilities; ii) inhibition of NO release and other inflammatory cytokines; iii) chelation of Cd^{2+} to reduce cadmium accumulation in liver cells.

KEY WORDS：Anthocyanidins, Cadmium, Liver injury, Free radicals, Oxidative stress

中国知网 https://www.cnki.net

主要缩略词表

缩写	英文名称	中文名称
ANOVA	one-way analysis of variance	单向方差分析法
BHT	butylated hydroxytoluene	2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚
BSA	albumin from bovine serum	牛血清白蛋白
CAT	catalase	过氧化氢酶
DNPH	2,4-dinitrophenylhydrazine	2,4-二硝基苯肼
DPPH	1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical	1,1-二苯基-2-苦基苯肼
DTNB	5,5’-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)	5,5’-二硫代双,2-硝基苯甲酸
EDTA	edetate disodium	乙二胺四乙酸二钠
GSH	reduced glutathione	还原型谷胱甘肽
H&E	hematoxylinand eosin	苏木精曙红染色法
LPO	lipid peroxidation	脂质过氧化反应产物
MDA	madondialdehyde	丙二醛
OS	oxidative stress	氧化压力
PCO	protein carbonyl	蛋白质羰基化产物
ROS	reactive oxygen species	活性氧自由基
SDS	sodium dodecyl sulfate	十二烷基硫酸钠
SOD	superoxide dismutase	超氧阴离子歧化酶
TBA	thiobarbituric acid	硫代巴比妥酸
TCA	trichloroacetic acid	三氯乙酸
Vc	vitamin C	抗坏血酸

中国知网 https://www.cnki.net

目 录

摘 要 ..... Ⅰ
ABSTRACT ..... Ⅲ
主要缩略词表 ..... Ⅴ
1 文献综述 3
1.1 肝脏研究 3
1.1.1 肝脏的结构与功能 3
1.1.2 肝脏损伤的原因 3
1.1.3 重金属镉对肝脏的影响 4
1.2 花青素简介 8
1.2.1 花青素的结构 8
1.2.2 花青素的生理功效 9
1.3 蓝莓简介 15
1.3.1 蓝莓植物资源 15
1.3.2 蓝莓果实组成 15
1.3.3 蓝莓的开发利用 16
1.4 研究的目的及意义 17
2 蓝莓花青素的提取、分离及体外抗氧化研究 18
2.1 材料与方法 18
2.1.1 主要实验材料 18
2.1.2 实验仪器 18
2.2 实验方法 19
2.2.1 蓝莓花青素的提取、分离 19
2.2.2 花青素提取物对 DPPH 自由基的清除实验 19
2.2.3 花青素提取物对羟自由基的清除实验 20
2.2.4 花青素提取物与金属 Cd^{2+}的螯合实验 20
2.3 实验结果 21
2.3.1 花青素提取物对 DPPH 自由基的清除实验 21
2.3.2 花青素提取物对羟自由基的清除实验 22
2.3.3 花青素提取物与金属 Cd^{2+}的螯合实验 22
2.4 小结 23
3 体内实验 24

中国知网 https://www.cnki.net

3.1 实验材料 24
3.1.1 实验试剂 24
3.1.2 实验仪器 27
3.2 实验方法 27
3.2.1 实验动物与分组 27
3.2.2 模型建立 27
3.2.3 小鼠生活观察 28
3.2.4 体重变化及脏器系数 28
3.2.5 肝脏组织中 Cd^{2+}含量检测 28
3.2.6 肝脏组织中 Zn^{2+}含量检测 29
3.2.7 蛋白质含量的测定 29
3.2.8 谷胱甘肽含量测定 30
3.2.9 样品 SOD 含量测定 31
3.2.10 样品 CAT 含量测定 31
3.2.11 一氧化氮含量测定 32
3.2.12 PCO 含量测定 33
3.2.13 MDA 含量测定 33
3.2.14 组织形态学观察 33
3.2.15 DNA 损伤检测 34
3.2.16 统计学分析 35
3.3 实验结果 35
3.3.1 小鼠生活观察 35
3.3.2 小鼠生长情况 35
3.3.3 小鼠肝脏系数 36
3.3.4 肝脏中 Cd^{2+}、Zn^{2+}含量 37
3.3.5 GSH 含量测定 40
3.3.6 样品 SOD 含量测定 40
3.3.7 样品 CAT 含量测定 41
3.3.8 一氧化氮含量测定 42
3.3.9 PCO 含量测定 42
3.3.10 MDA 含量测定 43
3.3.11 组织形态学观察 44
3.3.12 DNA 损伤检测 44

中国知网 https://www.cnki.net

3.4 小结 46
4 讨论 48
4.1 花青素可以清除自由基、提高机体抗氧化能力 48
4.2 花青素可以抑制 NO 等炎症因子的释放 49
4.3 花青素可以螯合 Cd^{2+}，促进镉排出 50
5 结论 51
5.1 结论 51
5.2 创新点 51
致 谢 52
参考文献 53
攻读学位期间发表的学术论文目录 62
原创性声明及关于学位论文使用授权的声明 63

中国知网 https://www.cnki.net

引言

进入 20 世纪，由于工业的蓬勃发展，使包括土壤、大气、洋流在内的生态系统受到越来越多的污染。上世纪，曾在世界范围内掀起轩然大波的“八大公害”中有两起与重金属污染有关，一件是 1954 年日本熊本县水俣市的汞污染，另一件是日本 60 年代富山县因镉污染而导致的“骨痛病”。从此，重金属污染逐渐进入人们的视野，成为受到世界广泛重视的社会问题。

近年来，由于我国人口增长导致城市急剧扩张，使原本相对隔离的工业生产通过废气、废水、废渣直接渗入到居民的正常生活中，且愈演愈烈，重金属污染已经成为危害我国居民生存与健康的一大社会问题。数年间几十起的重金属污染一次又一次地给人们敲响环境污染的警钟，然而污染所带来的危害更叫人怵目惊心。从 2005 年到 2011 年，先后在广东韶关、湖南株洲和岳阳新墙、贵州独山、陕西东岭、浙江台州等地发生了多起重金属污染事件。

屡见不鲜的污染事件不仅直接造成社会巨额的经济损失，对环境的长期污染更是令人担忧，而对我国居民健康所造成的不可逆转的危害更是发人深省。2011 年，“十二五”规划对包括镉在内的 5 种主要重金属污染及防治作出具体要求。

镉（Cadmium, Cd）不是人体的必需元素，可以通过消化系统和呼吸系统进入人体。镉的生物半衰期长，代谢缓慢，容易造成多种组织和器官的受累，其中，肝脏和肾脏可以蓄积体内 60%以上的镉。长期的镉中毒可以导致骨骼变形，造成神经系统的紊乱，生殖缺陷和致癌等。

肝脏作为生物体内最大的解毒器官，在生命活动中发挥着重要的生理功能。研究表明，镉一旦进入血液循环，会迅速与金属硫蛋白（metallothionein, MT）结合，并排出体外以降低镉毒性。肝脏可以合成大量的 MT，因此不可避免地参与镉的代谢，当大量积蓄的镉超过肝脏的解毒负荷时，就会导致肝脏受损。研究发现，镉可以通过多种途径引起细胞受损，导致肝脏损伤，主要的损伤机理与机体 OS 的产生有关。镉能够攻击生物膜系统，改变生物膜的流动性和稳定性，并造成脂质过氧化（lipid peroxidation, LPO），诱导活性氧自由基（reactive oxygen species, ROS）的生成；镉还可以置换酶中的金属离子，改变抗氧化酶的结构，使酶类失活，进而破坏机体氧化-抗氧化平衡，引起自由基的过量积蓄，造成肝细胞坏死，进一步加重肝脏损伤等。因此，人们对能够抑制氧化反应，缓解重金属毒性，并且保护肝脏生理功能的天然药物的需求应运而生。

中国知网 https://www.cnki.net

花青素（Anthocyanidin）作为水溶性的植物色素，是已知自然界中抗氧化性能力最强的物质，存在于花瓣、水果、蔬菜等大量植物细胞的液泡中，其绚丽多彩的颜色与花青素密不可分。花青素属类黄酮结构，具有多种生理功效，包括养颜美容，减脂降压，保护心脑血管，提高免疫，抑制突变，消炎杀菌等等。其中，抗氧化和自由基清除备受瞩目，大约是 Vc 的 20 倍，V_E 的 50 倍，并且安全、无毒，被广泛应用在食品、医药、化妆品等行业。因此，寻找富含花青素的天然植物资源作为研究对象成为该一领域的重要突破。

蓝莓（blue berry）是杜鹃花科（*Ericaceae*）越橘属（*Vaccinium.spp*）植物，是世界上独有的蓝色浆果，富含多种无机金属离子、蛋白质、糖类、维生素和花青素等；其中，尤以花青素著称。蓝莓中含有常见花青素的 6 种，见图 1-2，也是迄今花青素含量最高的植物，尤以野生品种为著，据统计每 100 g 蓝莓鲜果中含有 0.33~3.38 g，具有极高的经济价值和科研价值。

综上所述，理论上根据花青素超强的抗氧化功能对镉诱导损伤的小鼠肝脏进行保护研究成为可能，另外本实验也是首次采用提取自蓝莓的花青素进行实验研究，为花青素的开发和蓝莓食品的深加工给予一定借鉴。

中国知网 https://www.cnki.net

1 文献综述

1.1 肝脏研究

1.1.1 肝脏的结构与功能

肝脏是生物体内最重要的实质器官，位于腹腔腔内，约呈楔形。成年人体，肝脏约占体重的 2.0%~2.5%，然而新生婴儿的肝脏器官能够占到体重的 5.0%左右。

肝脏在生物体的新陈代谢中担负着多项生理功能。作为消化器官，肝脏参与包括蛋白质、糖类、脂肪三大营养物质等的合成、转化和代谢，为生命体的生存和发展提供基本保障。肝脏还能够分泌胆汁，并且通过胆管运输储存在胆囊中，帮助脂类物质的消化和吸收，促进生物转化异物的肠道排泄等。另外，肝脏还是重要的解毒器官，不论是人体自身新陈代谢的有毒产物还是摄取自环境的毒素、药物等，都在肝脏处进行代谢、解毒。肝脏也是体内重要的免疫器官，含有大量的吞噬细胞，可以通过吞噬、隔离、分解等众多方法对内生和进入体内的各种有害抗原予以清除。

此外，肝脏还具有造血功能，特别是对处于胚胎时期的新生儿具有重要的生理作用，成年后由于药物的刺激或者疾病的影响，肝脏的造血功能还会再次恢复；肝脏还能够调节血液容量，调节人体电解质平衡等[1]。

1.1.2 肝脏损伤的原因

肝脏是人体最大的腺体器官，也是新陈代谢活动最旺盛的地方。研究表明，大量病毒、化学药物、缺血导致的缺氧以及免疫等有害因素都可以造成肝实质细胞或枯否细胞（kupffer cell）、星状细胞（stellate cell）、血管内皮细胞（endothelial cell）在内的三种肝脏非实质性细胞的损伤[2]。然而损伤能够产生各种细胞因子，引起炎症、纤维化等，最终诱发肝脏疾病。

造成肝脏损伤的原因很多，主要可以归结为以下三类[1-6]。

（1）病毒性肝炎（viral hepatitis）

人类对病毒性肝炎的记载很早，早在公元前 4 世纪时，古希腊著名哲学家希波克拉底就著书提到流行性黄疸，然而直到上世纪 40 年代，人们在对肝脏组织取活检时才逐渐认识到流行性黄疸是由肝脏的炎症所引起。病毒性肝炎能够引起肝脏病变、坏死，具有很强的传染性。目前认为，能够引起肝炎的病毒，分为甲型、乙型、丙型、丁型和戊型等，然而临床诊断出的己型和庚型病毒性肝炎成为研究的热点。

中国知网 https://www.cnki.net

（2）酒精性肝病（alcoholic liver disease）

自古以来，酒文化就是中国璀璨文化的一个重要组成部分。目前，由于我国百姓生活方式的逐渐改变和生活水平的稳步提高，酗酒和不良的饮酒习惯已经造成酒精性肝病的高频发生，酒精对人们健康的影响和酗酒造成的社会问题也备受关注。研究认为，长期、大量饮用含乙醇的饮品能够诱发酒精性脂肪肝，酒精性肝炎和酒精性肝硬化等肝损伤。

酒精性脂肪肝是酒精性肝病中损伤较早、也是较轻的，与微小管功能的损伤和脂肪酸的过量积蓄有关。脂肪肝能够影响肝细胞的代谢功能，造成细胞坏死并引发炎症，其作用机理与免疫干扰，引起肠源性内毒素血症，以及对枯否细胞的激活有关。酒精性肝炎可以促使胶原纤维的形成，导致肝脏纤维化，继而形成肝硬化。

（3）药物性肝病（drug induced liver disease）

药物进入人体，主要在肝脏处进行转化和代谢，由于近年来医药市场管理制度的松懈，导致临床滥用药品事件的发生，因此药物导致的肝脏损伤也较为常见。主要的致病机理与肝脏细胞亚显微结构的损伤，干扰细胞代谢功能，加重原有潜在疾病有关。另外，有些药物能够促使血液产生凝固，使肝脏中的部分细胞缺氧；或者某些药物自身在人体内代谢所衍生的物质可以与肝脏细胞上的特异性蛋白质相结合，诱导抗体产生，引发机体过敏等现象。

愈来愈多的研究已经证实，造成肝脏损伤的因素多种多样，并且各种因素之间相互联系，又彼此影响。除以上三种主要因素之外，还有许多因素可以导致肝脏损伤，比如自身免疫的缺陷、环境污染、细菌入侵，继发性的肝病等，也是造成肝脏致病的重要原因[2,7-9]。

1.1.3 重金属镉对肝脏的影响

镉，是常见的环境污染物，具有很强的生物毒性；主要通过消化道的吸收进入人体[10]。进入人体的镉，可以通过血液循环分散到各个组织或者器官。肝脏具有特殊的生理功能，是人体最大，也是最重要的解毒器官，机体吸收的镉有超过 50%都富集在肝脏，因此镉在肝脏中的代谢不可避免的对肝细胞造成损伤，影响肝脏功能，并且已得到体内外实验的广泛证实。

早在 1982 年，Dudley 等[11]给大鼠静脉注射 $CdCl_2$，10 h 后解剖发现大鼠肝脏浑浊肿胀，出现细胞核增大等明显坏死症状；后来，Bagchi 等[12]也实验证实，给雌性 Sprague-Dawley（SD）大鼠口服 $CdCl_2$（44 mg/kg weight）48 h，就可以分别导致大鼠肝脏线粒体和微粒体的 LPO 增加 4 倍和 4.2 倍，使肝脏中 GSH 的含量迅速降低 65%。然而在口服 $CdCl_2$ 48 h 和 72 h 后分别对大鼠尿液

中国知网 https://www.cnki.net

进行检测，结果发现 MDA，甲醛（formaldehyde, FA），乙醛（acetaldehyde, ACT）以及丙酮（acetone, ACON）的含量从排泄量的 2.2 倍增加到 3.6 倍，且 DNA 单链的断裂在 48 小时后也增加了 1.7 倍。实验表明，镉通过促进 ROS 的生成，诱导 LPO 的出现，使得尿液中尿脂代谢产物增加，造成肝脏细胞、细胞膜以及 DNA 的损伤等。相似地，金慧英等[13]也在 SD 大鼠急性肝脏镉中毒实验中发现：镉促使机体 H_2O_2 水平的激增，加速肝脏细胞、枯否细胞的碎裂和溶解等，造成肝细胞的损伤；并且抑制 SOD，CAT 和 GSH 等抗氧化酶活力。

（1）元素镉及其特性

镉（Cadmium, Cd），是一种带有灰蓝色金属光泽的白色金属。镉的相对原子质量为 112.41，密度为 8.64 g/cm^3，熔点 331.03 ℃，沸点 767 ℃[14]。镉质地柔软，具有很好的延展性，因此广泛用于冶金、电镀、染料、电池、军工、农药、电子、机械制造等工农业生产。金属镉不溶于水，但能溶于酸，而绝大多数镉盐都能溶于水，其中以 $CdCl_2$ 的溶解度最大，生物毒性最高。

（2）镉污染来源

自然状态下，Cd 常与 O、S、Cl 等元素形成化合物而存在于地壳中。研究认为，新生婴儿体内不含金属镉。然而，随着年龄的增加，镉伴随身体的生长逐渐在体内产生蓄积。其中，对生物的生存和健康产生巨大影响的金属镉主要来源于工业和农业生产。镉可以通过呼吸系统和消化系统进入人和动物体内，尤以消化系统的摄入为主。大气中镉的平均浓度为 0.001 μg/m^3，城市则可以达到 0.03 μg/m^3，然而每支香烟的主流烟中约有 0.1~0.2 μg 的镉，旁流烟中仍然含有 0.43~7.2 μg[15,16]，所以二手烟对不吸烟的人群而言，也是镉污染的重要来源。

对于大多数人，膳食才是镉摄入的主要来源。当使用镉污染的水源灌溉农田时，富集在土壤中的镉会首先随根毛的吸收作用迁入植物的根、茎、叶，乃至果实当中，进而被草食性的牲畜食用，最后转移至人体，产生蓄积，造成机体损伤。研究发现，许多常见植物对土壤中的镉都具有优先吸收的能力，比如水稻、苋菜、烟草、向日葵和蕨类植物等；而水生生物中，牡蛎具有最强的蓄镉能力[17,18]。

（3）镉的代谢与毒性

镉在生物体内的吸收较差，大部分摄入的镉随粪便和尿液排出。动物实验表明：呼吸系统对镉的吸收率为 10%~40%，而消化系统仅有 3%~8%。镉一旦进入体内被吸收后，排出过程非常缓慢。尸检结果推断：镉在人体各组织器官的生物半衰期从 16 年到 38 年长短不等[19,20]，通过血液循环积蓄在肌肉、肾脏、

中国知网 https://www.cnki.net

肝脏、心脏、睾丸、胰腺、骨骼及血液等众多组织器官，其中肝脏和肾脏是人体镉积蓄的主要靶向器官。

由于镉的代谢缓慢、生物半衰期长，当吸入或者食入过量镉时，可以造成缺铁性贫血、骨质疏松、肝肾功能衰竭、心血管障碍、神经发育滞缓及生殖缺陷等。另外，镉还能够造成多种组织器官的畸形和癌变。早在 1987 年，国际抗癌联盟（IARC）就将 Cd 认定为ⅡA 级致癌物，1993 年又做修改，定为ⅠA 级致癌物[21]。

目前，研究认为镉能够与 MT 结合成相对稳定的复合物 Cd-MT，因而暂时缓解了镉对机体的毒性作用。然而慢性镉损伤中，Cd-MT 复合物经由血液循化可以在肾小管处重新吸收，通过胞饮作用进入肾小管细胞溶酶体，降解后分离，Cd^{2+}被再次释放，发挥毒性。同时镉能够攻击生物膜系统，诱发脂质过氧化，破坏膜的稳定性与通透性，并且与受体蛋白质结合造成 Ca^{2+}的内流，影响细胞功能，产生大量自由基。镉还能通过与巯基结合或者置换酶活性中心的金属离子[22]，破坏酶结构，造成抗氧化酶的失活或抗氧化系统的失衡。另外，镉还能诱导 NO 的生成，促使各种炎症因子的释放，加重氧化损伤等；而镉的遗传毒性[23]与 DNA 的损伤，诱导细胞凋亡有关。

（4）镉肝毒性机制

a 镉能够诱导自由基积累，产生氧化损伤

自由基（free radicals）含有不配对的电子，是一类离子、分子、原子或者原子团的总称，通常在有机生命体中以游离态的形式存在[24]；它参与有机生命的免疫，调节细胞信号的转导和细胞生长等，是生理代谢的活性物质。然而自然状态下，自由基的产生和清除处在一种动态平衡中[25]，因此不会诱发机体氧化，产生损伤。但是，吸烟、酗酒、辐射和不良的饮食习惯可以诱发机体过量产生自由基，当自由基的生成超过机体的清除能力时，就会对组织细胞进行攻击，造成生物大分子的变性，诱发疾病，加速衰老等。

许多研究都表明，镉肝毒性与氧化损伤具有密切联系。多不饱和脂肪酸（polyunsaturated fatty acid, PUFA）是生物膜的主要成分，镉首先攻击细胞膜，造成肝细胞膜 LPO 的出现，并产生大量 ROS，引起细胞损伤[26]；进而攻击线粒体膜，对细胞呼吸作用产生干扰，并协同 Fe^{2+}、Cu^{2+}产生氧化自由基，又加重了肝细胞的损伤。然而随着肝脏细胞膜通透性和流动性的改变，导致 Ca^{2+}，Fe^{2+}等内流增加，又加速了非酶促反应，生成大量自由基，如此反复，最终引起细胞坏死[27,28]。当过量自由基得不到及时清除，而又超过机体抗氧化系统的负荷时，能再次抑制抗氧化酶活性，降低抗氧化水平，导致 OS 的出现，进一

中国知网 https://www.cnki.net

步加剧肝脏损伤。然而在慢性镉中毒时[29]，机体氧化损伤的程度与未结合 MT 的 Cd^{2+}浓度、微量元素平衡紊乱等有关。

b 镉与巯基结合，抑制酶类活性

体内的镉，主要与生物分子结合，形成金属复合物或金属螯合物。GSH 是一种含有巯基的三肽，是机体细胞内最重要的抗氧化物质，其含量的高低也是机体总抗氧化水平的标志之一。GSH 普遍存在于哺乳动物细胞中，尤以肝脏含量最高[30]。然而镉对巯基具有特别强的亲和力，因此镉的毒性就是通过与巯基结合，削弱机体总抗氧化能力来表现。

另一方面，生物体内含有大量抗氧化酶[31]，其中许多都含有金属离子，并且依靠金属离子发挥生物作用，比如 SOD、CAT、GSH-Px 等等。镉中毒时，Cd 能够结合或取代酶中的金属离子，形成复合物，改变酶的空间构型，使酶丧失活性。例如，Cd 就可以和 GSH-Px 中的 Se 形成 Cd-Se 复合物，使其失活。

c 镉能够占据钙离子通道，导致肝细胞钙离子超载

Cd^{2+}与 Ca^{2+}性质十分相似，离子半径分别为 0.099 nm 和 0.097 nm，两者在生物代谢途径中相互作用、相互影响。

Ca^{2+}是生物体生存所必需的金属元素，对生命体的新陈代谢具有重要的作用[32]；通过形成钙调素调节平滑肌细胞收缩、调节神经递质的释放、参与第二信使等功能。研究表明[33]，钙离子还与多种疾病的发生有关，包括癫痫、高血压、糖尿病、骨质疏松等。

生物体内，钙离子主要以游离和结合两种动态平衡的方式存在。其中，起重要作用的是细胞外游离的钙离子。正常情况下，肝细胞内的 Ca^{2+}可以维持很低水平，为胞外浓度的 1/10000，这种钙离子的浓度差可以形成跨膜梯度，是肝细胞内外信息传递的基础，对维持肝细胞的生理功能起重要作用[32-34]。然而 Cd^{2+}能够与细胞膜上有特异性功能的蛋白质相结合，占据钙离子通道[16]，以抑制 Ca^{2+}-ATP 酶，增加 Ca^{2+}向细胞内的流动，加剧了细胞内 Ca^{2+}浓度的升高；另一方面，Cd^{2+}能够替代 Ca^{2+}与钙调蛋白（calmodulin ,CaM）结合，激活钙调蛋白依赖型激酶以及与 Ca^{2+}相关的酶类，从而干扰信息传递，产生毒性[21, 35-38]。

d 镉诱导一氧化氮的生成，影响肝细胞功能

一氧化氮（nitric oxide, NO），是一种无机小分子化合物，由一氧化氮合酶（nitric oxide synthase, NOs）催化 L-精氨酸分解而成，肝脏细胞和肝脏巨噬细胞均可以合成 NO[39]。内源性 NO 具有多种生理功能，在舒张血管、调节血压，参与免疫反应和神经调节等方面发挥重要作用。

研究表明 NO 在免疫性肝脏损伤中具有双重作用[40]。当 NO 处于中等或者

中国知网 https://www.cnki.net

较低浓度时，可以舒张肝脏微血管，调节血流阻力；通过抑制中性粒细胞的黏附和聚集，影响炎症因子释放所造成的肝脏损伤；另外，NO 还可以提高热休克蛋白 70 的表达，通过巯基修饰作用诱导凋亡酶（caspase）的失活，对肝细胞凋亡具有抑制作用。然而当肝病发生时，肝实质细胞在内毒素的刺激下 NO 合成增多。大量 NO 可以抑制三羧酸循环中酶的活性，不仅对生物能量代谢产生影响，还可以与 O_2^-反应生成 $ONOO^-$（过氧化硝酸阴离子），对肝细胞产生更强的毒性；另外，高浓度的 NO 还可以诱导 DNA 损伤，促进细胞 P_{53} 的表达，加速凋亡。

e 镉造成 DNA 氧化损伤，具有遗传毒性

DNA 通过指导蛋白质的合成，将部分遗传性状从亲代传递给子代进行表达。然而 DNA 分子双链的断裂，碱基对的缺失和移位都可以造成遗传信息的表达出错，诱发突变[41]。已经证实，镉具有遗传毒理作用。镉造成的 DNA 损伤是细胞突变、致畸以及肿瘤发生的关键，主要表现在 DNA 单链的损伤、DNA 和蛋白质的交联以及对 DNA 修复的抑制作用等[42-43]。

镉造成 DNA 的断裂损伤与自由基的过量积累有关。DNA 在自由基的攻击下能够打破脱氧核糖 C3’与 C4’， C4’与 C5’之间的化学键，或者与磷酸之间的氢键，形成单链的断裂；然而，镉对 DNA 修复的抑制作用，与抑制内源性和外源性 DNA 的修复作用来降低基因的稳定性，导致突变，诱发肿瘤有关。镉还可以刺激 c-fos, c-jun, c-myc 等原癌基因的表达，上调有丝分裂信号的转导，干扰细胞表面受体之间的信号传递，诱导细胞凋亡等[44]。Habeebu 等[45]研究证实 Cd 能够促进细胞坏死、提高细胞凋亡和有丝分裂指数，并且与时间和剂量呈依赖关系。

另外，DNA 单链断裂后可以形成 8-羟基脱氧鸟苷（8-OHdG）[46]，该物质能够引起嘌呤与嘧啶的颠换，导致碱基在 DNA 复制时发生错配，引起突变。因此 8-OHdG 也被普遍认为是致癌作用中氧化应激的标记物，并且 DNA 断裂程度以及 8-OHdG 的含量都与金属镉浓度呈正向依赖关系。潘洪志等[47]研究发现，慢性 Wistar 大鼠镉中毒时大鼠肝细胞中 8-OHdG 含量显著增加，引起 DNA 的氧化损伤。

1.2 花青素简介

1.2.1 花青素的结构

花青素(Anthocyanidin)，又名花色素，是一种纯天然、水溶性的植物色素，分布于陆生植物的花瓣、果皮和根茎细胞的液泡中，是植物着色的主要物质，

中国知网 https://www.cnki.net

可以呈现出从红至蓝的不同颜色。据统计，全世界有 27 个科，73 个属植物含有花青素[48]，尤以蓝莓种类最多，含量最高。

花青素属 2-苯基苯并吡喃阳离子结构的衍生物，能溶解在 H_2O、甲醇、乙醇等极性溶剂中。虽然结构与黄酮相似，但化学性质却与黄酮不尽相同。由于花青素结构中存在多个羟基及环氧正离子，容易受到光照、温度、酸碱、酶和金属离子等影响[49]。因此自然界中，游离态的花青素并不多见，常以花青苷的结构存在。通常，花青素母核在 3,5,7 位结合一个或多个糖元形成花青苷，由于糖元种类、数目、位置的不同，也因此丰富了天然存在的花青素类化合物。

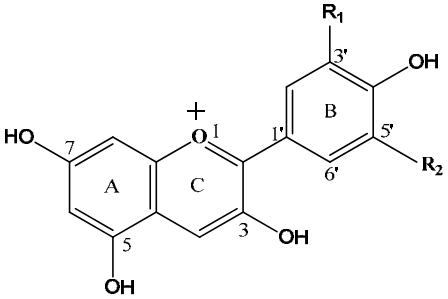


图 1-1 花青素母核结构

Fig 1-1 The structure of anthocyanidins

迄今为止，人类发现的天然花青素共有 20 种[50]，其中 6 种较为常见（见表 1-1），主要存在于植物中。

表 1-1 常见的 6 种花青素结构

Tab 1-1 The six structures of common anthocyanidins

花青素	英文名称	颜色	取代基团	
			R_1	R_2
矢车菊花青素	Cyanidin	橙-红	OH	H
飞燕草花青素	Delphinidin	蓝-红	OH	OH
芍药花青素	Peonidin	橙-红	OCH_3	H
矮牵牛花青素	Petunidin	蓝-红	OCH_3	OH
锦葵花青素	Malvinidin	蓝-红	OCH_3	OCH_3
天竺葵花青素	Pelargonidin	橙色	H	H

1.2.2 花青素的生理功效

近年来，由于富含花青素植物的深入研究，以及花青素提取、分离工艺的改进，使得花青素在清除自由基、抗氧化、抗癌、保护视力和预防心脑血管疾病等生物活性方面的研究更加深刻、具体。

花青素属于小分子化合物，易吸收[51]；可以通过消化道进入血液，并且能

中国知网 https://www.cnki.net

够穿越血脑屏障迅速到达靶体组织，发挥生物功效。另外，FAO/WHO 食品添加剂委员会认为：花青素为无毒或毒性甚微的化合物，因此被广泛用于食品加工、医药卫生及美颜化妆等领域。

研究表明[52]：花青素独特的生理功能与其结构特点有关，主要与羟基的数目、羟基的位置，羟基甲基化的程度以及结合糖元的种类有关。

（1）清除自由基、抗氧化作用

疾病的发生，多数与体内自由基的过量产生和积蓄有关。在花青素类化合物中，邻位酚羟基极易发生氧化反应，从而生成醌类物质。因此，含有酚结构的物质对 ROS 具有很强的扑捉能力，能够抑制组织氧化[53]；另外，酚羟基还可以提供质子，达到清除自由基、阻断链式反应的目的；花青素还可以和金属离子螯合生成花青素-金属-Vc 复合物，防止 Vc 过氧化，再生 Vc，从而再生 V_E，起到抗氧化的作用。研究表明，花青素清除自由基、抗氧化是其众多生理功能的重要基础，并且已经得到体内体外实验的证明。

早在 1997 年，Wang 等[54]在研究 14 种花青素苷元及其衍生物的抗氧化活性时就发现，矢车菊素-3-*O*-葡萄糖苷在测试物中具有最强的氧自由基吸收能力（oxygen radical absorbance capacity, ORAC），大约是生育酚的 3.5 倍。虽然天竺葵花青素的 ORAC 最低，但仍然堪比生育酚。同时认为，花青素抗氧化性的差异与其糖基和羟基结构有关。张名位等[55]发现，黑米皮提取物在体外对 ROS、•OH 以及 DPPH 存在良好的清除作用，并且认为花色苷就是黑米提取物抗氧化、清除自由基的活性成分。

Kano 等[56]研究表明，提取自紫甘薯块茎中的花青素对 DPPH 具有较强的清除活性，其清除能力比紫甘蓝、葡萄皮、接骨木和紫玉米中的花青素都强，其中主要的 8 种花青素成分甚至比抗坏血酸的活性还要强。同时，小鼠体内实验也得到相同结果，并且能够抑制四氯化碳诱导的转氨酶活性的升高。其中，矢车菊花青素-3-*O*-5-*O*-*β*-D-吡喃葡萄糖苷和芍药花青素-3-*O*-5-*O*-*β*-D-吡喃葡萄糖苷还能保护低密度脂蛋白（low-density lipoprotein, LDL）的氧化，具有较强的抗氧化活性。相似的实验结果也在卢立真等[57]的研究中得到。用紫甘薯花青素提取物喂饲 12 月龄的小鼠 30 天，检测血清发现：花青素提取物明显能够抑制生物氧化，延缓小鼠自然衰老。Valentová 等[58]发现，含 25%花青素的越橘提取物能够抑制细胞乳酸脱氢酶的流失和脂质过氧化的发生，并且认为提取物对大鼠原代肝细胞的保护作用与花青素的抗氧化性有关。

（2）减脂降压

肥胖的发生就是脂肪组织过度生长的过程，与机体能量代谢平衡的失调有

中国知网 https://www.cnki.net

关，是一种长期积累的慢性疾病[59]。近年来，社会发展带来的交通便利，人们生活水平的提高以及工作压力的剧增，导致饮食结构的改变和户外运动的骤减，使肥胖变得越来越普遍。超重人群逐年攀升，尤其在青少年人群当中，肥胖已经成为一种显而易见的“富贵病”，由肥胖所带来的高血压、高血脂、冠心病、糖尿病等一系列诱发疾病也无疑受到人们的广泛关注。

秦媛媛[60]研究提出，花色苷可以减少大鼠原代脂肪细胞中脂肪的积聚。该作用机理与花青素能够调节脂肪细胞的腺苷酸激活蛋白激酶（AMP-activated protein kinase, AMPK）信号通路，减少脂肪细胞体积，促进脂肪酸氧化有关。胡艳等[61]研究表明：黑米花色苷提取物能够抑制血脂中甘油三酯的升高、白色脂肪组织生长以及肝脏脂肪的堆积；明显抑制高脂诱导下大鼠体重的增加等。Jurgoński 等[62]发现含有 0.2%的野生黑樱桃提取物就可以抑制高果糖膳食和单次链脲霉素注射中麦芽糖酶和蔗糖酶的活性，同时提高小肠粘膜乳糖酶活性。同时，在肝脏、肾脏和肺组织检测中，观察到明显的胆固醇和血糖降低行为。夏敏等[63]研究发现，C-3-G（矢车菊花青素-3-葡萄糖苷）和 P-3-G（芍药花青素-3-葡萄糖苷）能够抑制 rCD40L 诱导的人脐静脉内皮细胞基质金属蛋白酶（matrix metalloproteinases, MMP-1），MMP-2 和 MMP-9 的蛋白表达及其活性水平。肯定了花青素对增加动脉粥样斑块的稳定性具有重要意义。

（3）舒张血管、预防心脑血管疾病

心血管疾病已经成为困扰人类健康的主要疾病之一。研究表明，其发病机理十分复杂[64]，包括基因、饮食、生活方式、抽烟、肥胖等等。然而长期的紧张、高血压以及过多的血脂胆醇所诱发的动脉硬化，成为心脑血管疾病的主要原因。动脉硬化可以造成血管壁弹性下降，血流速度减缓，形成阻塞等。

大量摄取花青素可以增加血管松弛度，促进血液循化，抑制氧化压力造成的 LDL 的氧化以及血小板的聚集，减少因动脉粥样硬化所引起的疾病。Kang 等[65]在研究神经细胞的损伤中发现，1%的 HCl-MeOH 桑葚果提取物对暴露在 H_2O_2 的 PC12 细胞具有保护作用。进一步采用大脑中动脉闭塞（middle cerebral artery occlusion, MCAO）损伤模型，结果发现：矢车菊-3-*O*-*β*-D-吡喃葡萄糖苷能够减小大脑梗塞体积，通过抑制多形核白细胞（polymorphounclear leukocytr, PMN）浸入脑缺血局部组织而起到神经保护的作用。

Chen 等[66]用桑葚提取物进行实验性动脉粥样硬化研究，与对照组（1.3%胆固醇、3%猪油喂饲）相比，连续喂饲 0.5%或者 1%的桑葚提取物 10 周，可以使新西兰白兔大动脉粥样硬化明显降低 42~63%，与此同时组织病理学也表明粥样硬化病变明显减少。实验证实桑葚提取物能够降低血浆中胆固醇和甘油

中国知网 https://www.cnki.net

三酯的水平，该结果与花青素抑制动脉壁 LDL 的氧化有关，表明摄取桑葚提取物可以降低罹患动脉粥样硬化和冠心病的机率。

（4）提高眼部机能，增强视力

花青素对视力的保健功能很早就被人们认识，据说二战期间，英国皇家飞行员就通过食用花青素来减轻视疲劳、改善夜行视力。花青素通过血液循化可以穿越血-房水屏障以及血-视网膜屏障[67]，并迅速与含色素的眼组织结合；保护眼睛微血管，促进眼底血液循环，增强毛细血管的柔韧性，促进视紫质朴（visualpurple）的再生，提高视觉敏感度等。Nakaishi 等[68]研究发现，黑加仑花青素可以提高受试者眼睛对黑暗的适应能力，抑制 VDT（video display terminal）工作诱导的暂时性屈光改变和主观视觉疲劳症等。刘春民等[69]对 326 名近视青少年进行研究，结果发现：花青素治疗组眼部症状明显改善，轻度近视及早期近视青少年裸眼对数远视力平均提高 2~3 行。

体外研究还发现[70]，花青素能够刺激内皮细胞产生 NO；抑制内皮素-1 诱导的牛睫状体平滑肌细胞收缩；调节视杆细胞 cGMP-PDE 的活化；降低视黄醇的氧化过程等。

（5）抑菌抗炎

细菌，是一类广泛分布并且与人类生存息息相关的微生物。随着花青素生理活性的深入研究，有文献报道称花青素在抑制细菌生长、抗炎方面具有显著作用。吴冬青等[71]研究发现：金色补血草花青素对枯草杆菌、金黄色葡萄球菌和大肠杆菌具有一定的抑制作用。同时认为，抑制效果随花青素浓度的增大而增强，且相同浓度下，提取物对枯草杆菌较敏感。王关林等[72]也有相似发现：甘薯花青素对 *S.aureus*（金黄色葡萄球菌）、*P.aeruginos*（铜绿假单胞菌）以及 *E.coli*（大肠杆菌）3 种致病菌具有不同程度的抑制作用。另外，抑制作用的强弱与花青素浓度相关。其可能的作用机理是通过甘薯花青素与细胞中蛋白质或酶类相结合，导致其变性失活，进而抑制对数生长期细胞分裂，最终导致细胞死亡。

Anthony 等[73]研究发现，蓝莓提取物对十二指肠梨形鞭毛虫（*Giardia duodenalis*）滋养子（trophozoite）有抑制作用，能够改变小粒隐形孢子虫（*Cryptosporidium parvum*）的形态。Chatterjee 等[74]研究发现树莓、草莓、蔓越橘、接骨木、蓝莓、覆盆子和 6 种浆果的混合物都可以抑制幽门螺旋杆菌（*Helicobacter pylori*）的生长，并且提高幽门螺旋杆菌对克拉霉素的敏感性，其中 6 种浆果混合物的影响最大。

何颖辉等[75]研究发现：樱桃花青素能够减轻大鼠滑膜增生，减少炎症细胞

中国知网 https://www.cnki.net

浸润，抑制炎症细胞因子 PGE2 和 TNF-α（tumour necrosis factor-α，肿瘤坏死因子），从而减轻佐剂性关节炎的损伤。在 Wang 等[76]研究中，花青素和酚类化合物对 LPS/IFN-γ-诱导下 RAW 264.7 细胞 NO 的生成具有较强的抑制作用，且抑制效果与花青素和总酚类化合物含量有关。因此食用富含花青素的莓类果实对 NO 所诱发的心血管疾病和慢性炎症具有抑制作用。

（6）抑制突变、对抗肿瘤

自然界原本就存在多种致突变和诱癌因子，包括物理辐射，化学药品，霉菌、细菌等多种生物因素。当人类长期接触这些物质时，就会促使体内的原癌基因被激活，从而产生表达，并引发畸形、肿瘤和遗传性缺陷等疾病。

花青素能够通过阻断肿瘤细胞分裂，干扰细胞信号级联，激活免疫调节响应，诱导 TNF-α 的产生，抑制肿瘤细胞生长及肿瘤血管的形成，并最终诱导细胞凋亡等一系列途径抑制基因突变、抵御癌症。

Yoshimoto 等[77]研究发现，紫甘薯花青素提取物对杂环胺类的致突变性具有很好的抑制作用。特别是矢车菊花青素-3-（6,6’-咖啡酰阿魏酰槐糖苷）-5-葡萄糖苷（YGM-3）和芍药花青素-3-（6,6’-咖啡酰阿魏酰槐糖苷）-5-葡萄糖苷（YGM-6）具有很强的抗突变作用。

高爱霞[78]发现，当花青素的实验浓度在 25~200 μg/mL 的范围内时，对 NCI-H460（大细胞型肺癌细胞）的细胞增殖有抑制作用。花青素可以促使细胞滞留在 G_0/G_1 期，诱导细胞凋亡，并且抑制效果与剂量和时间呈依赖关系。Yi 等[79]发现，蓝莓花青素对 HT-29 和 Caco-2（人结肠癌细胞）增殖有较强的抑制作用。结果表明：花青素能够诱导 DNA 分子片段化，并最终诱导细胞凋亡。Shih 等[80]发现，所采用的 5 种花青素和 4 种花色苷中，锦葵花青素对 AGS（人胃腺癌细胞）细胞增殖具有最好的抑制作用；并且抑制效果与作用时间和作用剂量有关。研究表明：锦葵花青素可阻滞 AGS 细胞于 G_0/G_1 期，增加亚 G_1 期 AGS 细胞的积累，还可以诱导凋亡小体的形成，激活细胞凋亡蛋白酶-3（caspase 3），促进聚腺苷二磷酸核糖聚合酶（poly ADP-Ribose polymerase, PARP）的水解，诱导 p38 激活酶的表达等。

Reddivari 等[81]研究了四个品种的马铃薯植株花青素提取物对人前列腺癌细胞 LNCaP（雄激素依赖型）和 PC3（雄激素独立型）的抑制作用。结果表明，马铃薯提取物可以诱导两株细胞凋亡，凋亡路径与 MAPK 和 JNK 的激活有关。该实验也首次提出：马铃薯提取物可以激活 caspase，从而促使癌细胞的凋亡。Chang 等[82]用富含花青素的黑米提取物进行体内外的抗乳腺癌实验，结果表明：黑米提取物能降低 MCF-7，MDA-MB-231 和 MDA-MB-453 细胞系的生活力；

中国知网 https://www.cnki.net

通过激活级联反应，裂解 PARP，线粒体膜电位的去极化，以及释放细胞色素 C 来诱导 MDA-MB-453 细胞系的凋亡等。体内实验通过喂食荷 MDA-MB-453 细胞系的 BALB/c 裸鼠发现，黑米花青素提取物（100 mg/kg/day）是通过抑制血管生成因子 MMP-9, MMP-2 和肿瘤组织 u-PA 的表达来抑制肿瘤细胞的生长和肿瘤血管的形成，从而抑制人乳腺癌细胞的生长。

（7）肝脏保护

肝脏是生物体内最重要的器官之一，承载着多种生理功能，包括消化、分泌、排泄和生物转化等，随着肝病研究的深入，医疗技术的提高和药物开发的需要使得花青素作用于肝脏的研究也日渐增多。

Obi 等[83]在 1998 年，就朱瑾花瓣的花青素-乙醇提取物对 CCl_4 造成的白鼠肝脏损伤进行研究。实验所示 :花青素能够抑制白鼠血浆中谷丙转氨酶（alanine amino transferase, ALT）和谷草转氨酶（aspartate aminotransferase, AST）的升高，对 CCl_4 造成的肝脏损伤具有一定的保护作用。张晓丽等[84]也进行了相似的实验。研究发现：烟 73 葡萄花青素能够抑制 CCl_4 对小鼠造成的氧化损伤，降低血浆中 ALT、AST 及肝脏指数的异常升高；提高肝糖原水平、脾脏及胸腺指数等，具有明显的保护作用。Wang 等[85]在锦葵属花色苷对正丁基过氧化物（t-BHP）诱导的大鼠肝毒性研究中发现，该花色苷能够明显降低血清中肝酶水平，减轻 t-BHP 对大鼠肝脏的损伤。

研究发现，花青素在酒精性肝损伤中也具有明显的保护作用。2011 年，吉林大学的王玮琳[86]对小鼠急性酒精肝损伤进行过详细研究。研究证实，提取自蓝莓的花青素对该损伤具有一定的保护作用，可以通过抑制 LPO，减少肝脏细胞中的脂肪堆积，对肝脏组织的病理损伤起保护作用。

除此之外，花青素对另一类肝脏损伤也具有良好的保护作用。比如 Tsudad 等[87]在实验中，第一次给 Wistar 鼠喂饲矢车菊-3-*O*-*β*-D-葡萄糖苷。结果表明 C3G 能够抑制缺血再灌注（ischemia-reperfusion, I/R）造成的肝脏损伤，并且认为 C3G 是一种潜在的抗氧化剂，能够缓解氧化压力带来的损伤，可能是因为 C3G 或者其代谢物在血液和组织中起到了类似 GSH 和 Vc 的作用。

在 Bishayee 等[88]构建的二乙基亚硝胺所致的小鼠肝癌模型中，首次揭示了黑醋栗花青素对小鼠肝脏癌变具有保护作用。实验中喂食黑醋栗的小鼠肝脏在肿瘤前期出现结节的频率，结节的总数量、多样性、大小和体积都与喂食剂量存在依赖关系。研究表明：黑醋栗花青素可以调节细胞凋亡前信号因子，可能通过转录过程中 Bax 的上调和 Bcl-2 的下调来实现。

（8）其他作用

中国知网 https://www.cnki.net

根据文献报道，花青素还具有其它多种生理功能，包括美容养颜、促进毛发生长[89]；抗衰老、提高记忆力[90,91]；抗辐射；抑制尿路感染；抑制肠道病原菌生长[92]；治疗胃溃疡和调节免疫系统[93]等。

1.3 蓝莓简介

1.3.1 蓝莓植物资源

蓝莓（blue berry），又称越桔，红豆果、蓝浆果，是杜鹃花科（*Ericaceae*）越橘属（*Vaccinium.spp*）植物，多年生灌木或乔木，是一种世界范围内具有极高经济价值的植物。蓝莓原产于美国的佛罗里达州，资源庞大，仅越橘属植物就约有 400 余种。据文献记载，蓝莓果树最早的人工栽培始于 1897 年左右。经过 100 余年的人工繁育，目前，蓝莓的主要栽培品种包括高灌蓝莓（*V.corymbosum*）、矮灌蓝莓（*V.angustifolium*）以及杂交品种半高灌蓝莓等[94,95]。

我国蓝莓的栽种始于 20 世纪 90 年代初期，主要引进美国和日本的植物资源，虽然培育历史不过 20 余年，但现在已经发展到 100 多个品种，遍及我国长江南北。截止 2010 年[96]，我国蓝莓的种植面积约为 700 hm^2。主要分布在我国东北的长白山、大小兴安岭和长江流域等地区。蓝莓果实细腻滑润、营养美味，生物价值极高。因此，蓝莓植株逐渐成为我国又一新的经济物种，具有广阔的市场潜力和经济价值。

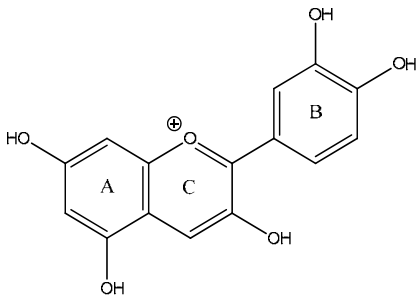
1.3.2 蓝莓果实组成

蓝莓果实呈球状或椭球状，每粒重 2~5 g，呈深蓝色或绛紫色，果皮披覆白色果粉。蓝莓果实酸甜可口、清香扑鼻，果肉细腻、种子细小，富含多种营养成分。新鲜的蓝莓果实包括丰富的碳水化合物、蛋白质、果胶、花青素、维生素和钙、镁、磷、铁、钾等多种微量元素，具有极好的生物功能，被称为是水果中的极品。

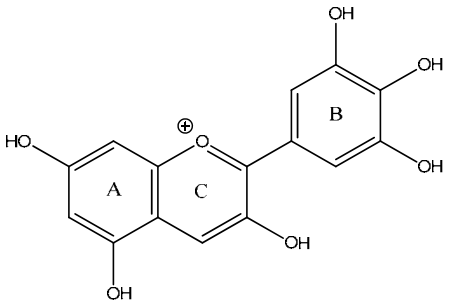
分析统计，蓝莓果实不仅花青素含量超高而且种类繁多。野生种含量占有绝对优势，约为 0.33~3.38 g /100 g 鲜重，然而栽培品种也能达到 0.07~0.15 g /100 g 鲜重[94,97]。

蓝莓果实含有 6 种花青素，主要集中在果实的表皮位置[98]。具体包括矢车菊花青素、飞燕草花青素、锦葵花青素、天竺葵花青素、芍药花青素和矮牵牛花青素（结构如图 1-2 所示）。

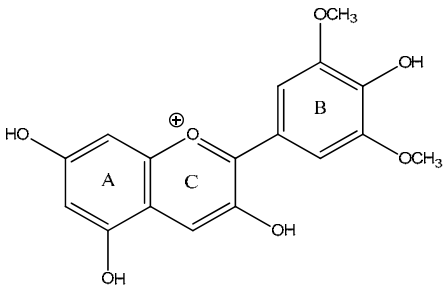
中国知网 https://www.cnki.net



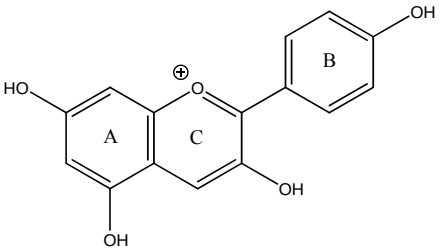
（a）矢车菊花青素



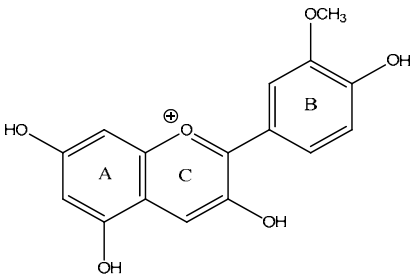
（b）飞燕草花青素



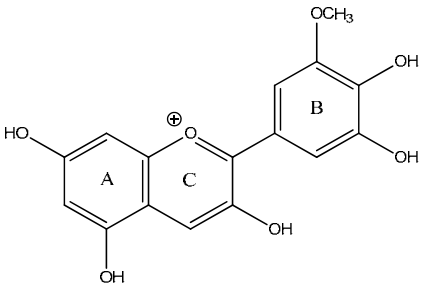
（c）锦葵花青素



（d）天竺葵花青素



（e）芍药花青素



（f）矮牵牛花青素

图 1-2 蓝莓花青素结构

Fig 1-2 The structure of anthocyanidins from blueberries

虽然生长地的差异、以及不同品种间蓝莓果实在花青素的含量和种类组成上略有差别，但是，并不能撼动蓝莓花青素巨大的经济及科研双重价值。尤其是蓝莓作为迄今为止，已知花青素含量最高的植物，得天独厚的自然优势使蓝莓花青素成为研究的热点。

1.3.3 蓝莓的开发利用

蓝莓果实成熟后，娇弱柔软，不易储存，常用以加工成品出售。欧美国家对蓝莓的研究较早，现在已逐步发展成系。美国、日本、法国以及北欧国家不仅将其用于果酱、果汁、糕点以及果醋等食品加工；还研制出蓝莓胶囊、颗粒等保健药品，用于美容养颜，促进血液循环，改善视力和提高记忆力等；蓝莓富含的花青素更成为天然、优质化妆品的着色物质。

中国知网 https://www.cnki.net

蓝莓独特的风味和多重生理功效使得蓝莓成为商业经济竞相追逐的宠儿。如今，蓝莓栽培及其加工产业已经风靡世界，各种蓝莓产品琳琅满目，应有尽有，已经成为人们日常餐桌和健康生活中不可缺少的一部分。

1.4 研究的目的及意义

肝脏的保护研究、肝病机理的探讨和保肝药物的开发一直都是国内外研究的重点。由于近年来我国环境恶性开发所造成的生态污染使肝脏成为最先受累的器官，特别是镉污染所造成的中毒事件频频发生，一时间，有关肝脏重金属解毒的研究成为新的热点。

本实验拟利用提取自蓝莓的花青素对镉损伤的小鼠肝脏进行保护研究，讨论花青素对镉损伤肝脏的保护作用和保护机制，为新型保肝药物的开发和重金属中毒的临床研究提供理论依据，为花青素特效功能的进一步应用提供参考，也开拓了蓝莓等富含花青素蔬果在食品深加工方面的发展思路。

中国知网 https://www.cnki.net

2 蓝莓花青素的提取、分离及体外抗氧化研究

2.1 材料与方法

2.1.1 主要实验材料

表 2-1 实验所用试剂、规格及生产厂家

Tab 2-1 Names, specification and manufacturers of reagents in experiments

名称	规格	生产厂家
DPPH	生化试剂	上海亿欣生物科技有限公司
BHT	高纯	Wolsen
无水乙醇	分析纯	天津市河东区红岩试剂厂
抗坏血酸	分析纯	西安化学试剂厂
水杨酸	分析纯	天津市河东区红岩试剂厂
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	分析纯	天津市河东区红岩试剂厂
30%过氧化氢	分析纯	天津市河东区红岩试剂厂
氯化镉	分析纯	天津市福晨化学试剂厂
邻菲罗啉	分析纯	天津市巴斯夫化工有限公司
曙红	分析纯	天津市博迪化工有限公司

2.1.2 实验仪器

表 2-2 实验所用仪器

Tab 2-2 The instruments in experiments

名称	规格	生产厂家
循环水式多用真空泵	SHB-B 95	陕西太康生物科技有限公司
数控超声波清洗器	KQ2200DE	昆山市超声仪器有限公司
旋转薄膜蒸发仪	R201L	上海申生科技有限公司
电热鼓风干燥箱	101-1 型	上海一恒科学仪器有限公司
可见分光光度计	7230G	上海精密科学仪器有限公司
精密 pH 计	pH S-3C 型	上海雷磁仪器公司
酶标仪	MK3 型	热电（上海）仪器有限公司
恒温水浴锅	R201L	上海申生科技有限公司
电子天平	BS2202S	赛多利斯科学仪器有限公司

中国知网 https://www.cnki.net

2.2 实验方法

2.2.1 蓝莓花青素的提取、分离

根据本课题组积累的研究成果，按照超声波辅助-乙醇提取法对 2 kg 蓝莓进行花青素提取。提取条件如表 2-3 所示。

表 2-3 蓝莓花青素的超声波辅助-乙醇提取方法

Tab 2-3 Method of ultrasound-associated ethanol extraction on blueberry anthocyanidins

提取条件				
料液比	提取次数（次）	乙醇体积分数（%）	浸提时间（min）	提取温度（℃）
1:20	1	60%	40	30

用 D101 树脂对提取得到的蓝莓浸膏进行分离、纯化，以体积分数 35%的乙醇洗脱，旋转薄膜蒸发仪挥发溶剂后，低温冷冻机干燥得到纯化的花青素粉末。纯化后的花青素分别用 pH =1.0 的 0.025 mol/L 氯化钾缓冲溶液和 pH = 4.5 的 0.4 mol/L 乙酸钠缓冲溶液溶解并稀释。紫外-可见分光光度计分别测量其在 525 nm 和 700 nm 下的吸光值，pH 示差法测定提取物花青素含量[99]。公式如下所示：

$$A = (A_{525nm} - A_{700nm})_{pH1.0} - (A_{525nm} - A_{700nm})_{pH4.5} \quad (2\text{-}1)$$

$$\text{花青素含量（\%，w/w)}=[A / (\varepsilon \times \mathrm{L}) \times \mathrm{M} \times \mathrm{DF} \times V] / m \quad (2\text{-}2)$$

式2-2中：

A—吸光值；

ε—矢车菊花青素-3-O-葡萄糖苷的消光系数（26900 $\mathrm{L \cdot cm^{-1} \cdot mol^{-1}}$）；

L—光程（cm）；

M—矢车菊花青素-3-葡萄糖苷的分子量（449.2 g/mol）；

DF—稀释因子；

V—稀释终体积（L）；

m—产品重量（g）。

2.2.2 花青素提取物对 DPPH 自由基的清除实验

准确称取 DPPH 粉末，取少量无水乙醇溶解后，稀释定容至 50 mL，配制成 0.025 mg/mL 的乙醇溶液，4 ℃冷藏，避光保存。配制不同浓度的花青素乙醇溶液，取 Vc，BHT 作阳性对照。取 0.1 mL 样品乙醇溶液，加 0.2 mL DPPH 的乙醇溶液，于 517 nm 下测量，实验 3 次求均值。绘制 DPPH 自由基清除率随抗氧化剂浓度变化曲线[100]。清除率计算公式如下所示：

中国知网 https://www.cnki.net

$$清除率（\%）=\left[1-\frac{A_i-A_j}{A_c}\right]\times 100 \quad (2\text{-}3)$$

式 2-3 中，A_c 表示空白体系吸收值，A_i 表示样品溶液与 DPPH 反应 20 min 时的吸收值，A_j 表示样品溶液与乙醇反应 20 min 时的吸收值。

2.2.3 花青素提取物对羟自由基的清除实验

本实验按照 Fenton 反应法，首先利用 H_2O_2 与 Fe^{2+}发生均裂反应产生•OH，当加入水杨酸后，水杨酸可以捕捉•OH 并产生有色物质，该物质在 510 nm 下有最大吸收。配制不同梯度的花青素溶液，取 1 mL 10 mmol/L 的 $FeSO_4$，1 mL 10 mmol/L 的水杨酸-乙醇溶液，不同浓度的蓝莓花青素 1 mL，最后加入 1 mL 8.8 mmol/L 的 H_2O_2 溶液启动反应。反应体系于 37 ℃下反应 30 min，510 nm 测定吸收值，蒸馏水做参比，以相同浓度梯度的 Vc 作阳性对照。该实验考虑到花青素自身在 510 nm 处有强烈吸收，故以 1 mL 10 mmol/L 的 $FeSO_4$，1 mL 10 mmol/L 的水杨酸-乙醇以及 1 mL 不同浓度的蓝莓花青素溶液和 1 mL 的蒸馏水反应体系作为花青素的本底值。实验反复 3 次，求平均值，绘制清除率随羟自由基清除剂浓度变化曲线[101,102]。清除率计算公式如下所示：

$$清除率（\%）=\left[A_0-(A_1-A_2)\right]/A_0\times 100 \quad (2\text{-}4)$$

式 2-4 中，A_0 表示参比溶液吸光值，A_1 表示加入花青素溶液后的吸光值，A_2 表示不加 H_2O_2 的花青素溶液吸光值。

2.2.4 花青素提取物与金属 Cd^{2+}的螯合实验

本实验按照李咏梅等[103]方法进行，稍有改动。实验于反应体系中依次加入 0.6 mL pH 5.0 的 HAc-NaAc 缓冲液，1 mL 含有 Cd^{2+}的不同浓度花青素提取物溶液，1.2 mL 1 mmol/L 的邻菲罗啉溶液，1.2 mL 5 mmol/L 的曙红 Y 溶液，均匀振荡，试剂空白做参比，室温下反应 2 min 后，于 568 nm 下测量吸收值，实验反复 3 次，取平均值，绘制螯合率随蓝莓花青素提取物浓度变化曲线。螯合率计算公式如下所示：

$$螯合率（\%）=(1-A_1/A_0)\times 100 \quad (2\text{-}5)$$

式 2-5 中，A_1 表示含有 Cd^{2+}的花青素样品液吸收值，A_0 表示花青素空白样吸收值。

中国知网 https://www.cnki.net

2.3 实验结果

2.3.1 花青素提取物对 DPPH 自由基的清除实验

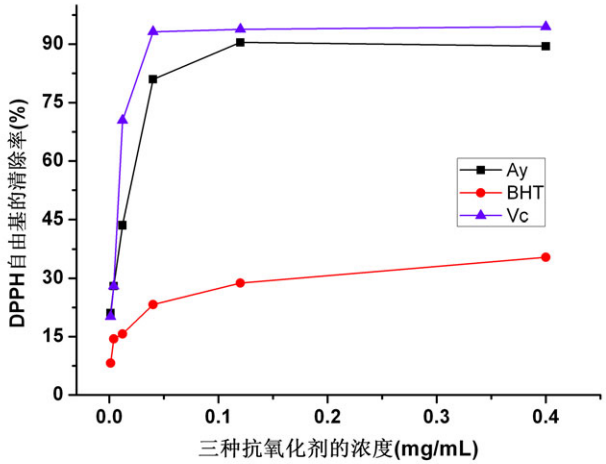


图 2-1 三种抗氧化剂对 DPPH•自由基的清除作用

Fig 2-1 The scavenging effect of three antioxidants to DPPH•

DPPH 作为一种稳定的有机自由基，其乙醇溶液显现紫色。因此，该乙醇溶液颜色的深浅可以间接反映 DPPH 浓度的大小。从图 2-1 看出，实验中蓝莓花青素提取物、Vc 及 BHT 对 DPPH 自由基都具有较好的清除作用，且清除作用与抗氧化剂的浓度有关，浓度越高，清除作用越强。实验所采用的三种抗氧化剂中，Vc 的清除作用最强，当浓度为 0.04 mg/mL 时，清除率可高达 93.9%，而此时 Ay 的清除率也可达 90.5%，而 BHT 的清除率仅为 28.8%。

根据 2-6, 2-7, 2-8 式计算得到，Vc 的半数抑制浓度（half maximal inhibitory concentration, IC_{50}）为 7.069 μg/mL，Ay 的 IC_{50} 为 13.901 μg/mL，而 BHT 的 IC_{50} 为 755.686 μg/mL。三者中，Vc 的抗氧化性最强，BHT 的抗氧化性最弱，大约是花青素提取物的 1/55。

花青素提取物拟合曲线方程：

$$y = -0.76044 \times \exp(-x / 0.0235) + 0.92089,\ R^2 = 0.99024 \quad (2\text{-}6)$$

Vc 拟合曲线方程：

$$y = -0.87881 \times \exp(-x / 0.01046) + 0.94708,\ R^2 = 0.98291 \quad (2\text{-}7)$$

BHT 拟合曲线方程：

$$y = -0.46265 \times \exp(-x / 0.51976) + 0.6081,\ R^2 = 0.90036 \quad (2\text{-}8)$$

中国知网 https://www.cnki.net

2.3.2 花青素提取物对羟自由基的清除实验

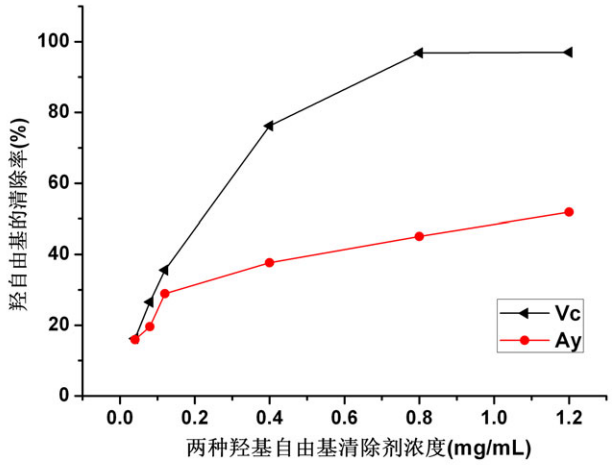


图 2-2 两种抗氧化剂对羟自由基的清除作用

Fig 2-2 Scavenging effect of the two antioxidants to hydroxyl radicals

•OH 是 ROS 中最活泼的一种自由基，能快速与生物大分子发生反应，破坏 DNA 结构，因此毒性也最大[25]。图 2-2 表明：花青素提取物和 Vc 对•OH 都具有清除作用，且清除效果与实验中抗氧化剂的浓度有关，浓度越高，效果越明显。当浓度为 0.8 mg/mL 时，Vc 对羟自由基的清除率可达 96.8%，而此时花青素对羟自由基的清除率为 45.1%，清除能力不如 Vc 明显。

2.3.3 花青素提取物与金属 Cd^{2+}的螯合实验

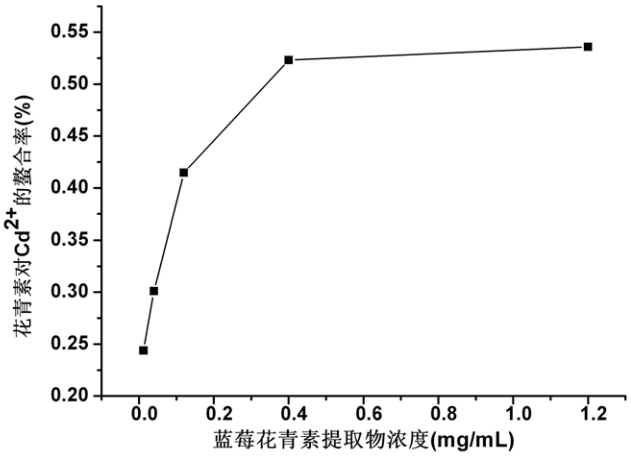


图 2-3 花青素提取物与 Cd^{2+}的螯合作用

Fig 2-3 Chelation between Ay extractions and Cd^{2+}

正如图 2-3 所示，花青素提取物对 Cd^{2+}具有一定的螯合作用，并且随着实验中花青素提取物浓度的增加，螯合作用逐渐增强，对 Cd^{2+}的螯合率也逐渐增

中国知网 https://www.cnki.net

大。当浓度为 0.012~0.4 mg/mL 时，花青素提取物能迅速螯合游离的 Cd^{2+}；然而当浓度大于 0.4 mg/mL 时，花青素对金属 Cd^{2+}的螯合能力并没有随浓度的增大而显著提高，但仍然具有较高的螯合能力。

2.4 小结

通过花青素对 DPPH 和•OH 的体外清除结果看到，本实验提取自蓝莓的花青素具有良好的自由基清除功能，尤其对 DPPH 的清除效果最为显著。当花青素提取物浓度为 0.04 mg/mL 时，对 DPPH 自由基的清除率就可高达 90.5%，与相同条件下 Vc 的清除率相差无几，且花青素的 IC_{50} 仅为 13.901 μg/mL。

在花青素与金属 Cd^{2+}的螯合实验中,明显得到花青素对 Cd^{2+}具有一定的螯合作用，并且螯合作用与花青素的浓度有关。

中国知网 https://www.cnki.net

3 体内实验

3.1 实验材料

3.1.1 实验试剂

表 3-1 实验所用试剂、规格及生产厂家

Tab 3-1 Names, specification and manufacturers of reagents in experiments

试剂名称	纯度	生产厂商
生理盐水	0.9%	西安双鹤制药有限公司
氯化镉	分析纯	天津市福晨化学试剂厂
磷酸氢二钠	分析纯	成都金山化工试剂厂
磷酸二氢钠	分析纯	成都金山化工试剂厂
氢氧化钠	分析纯	天津市百世化工有限公司
乙酸铵	分析纯	天津市百世化工有限公司
柠檬酸钠	分析纯	中国医药上海化学试剂厂
浓硫酸	分析纯	北京化工厂
浓硝酸	分析纯	天津市河东区红岩试剂厂
浓盐酸	分析纯	北京化工厂
磷酸	分析纯	北京化工厂
钼酸铵	分析纯	北京化工厂
柠檬酸	分析纯	北京化工厂
冰醋酸	分析纯	天津市河东区红岩试剂厂
苯酚	分析纯	天津市滨海科迪化学试剂有限公司
乙醛	分析纯	上海山浦化工有限公司
氯仿	分析纯	天津市河东区红岩试剂厂
异戊醇	分析纯	天津市河东区红岩试剂厂
正丁醇	分析纯	天津市北辰区方正化学试剂厂
无水乙醇	分析纯	天津市河东区红岩试剂厂
乙醇	分析纯	天津市天力化学试剂厂
乙酸乙酯	分析纯	天津市河东区红岩试剂厂
水杨酸	分析纯	天津市河东区红岩试剂厂
对氨基苯磺酸	分析纯	中国医药上海化学试剂厂
TCA	分析纯	上海山浦化工有限公司

中国知网 https://www.cnki.net

30%过氧化氢	分析纯	天津市富宇精细化工有限公司
N-(1-萘基)-乙二胺	分析纯	天津市科密欧化学试剂厂
邻菲罗啉	分析纯	天津市巴斯夫化工有限公司
曙红	分析纯	天津市博迪化工有限公司
抗坏血酸	分析纯	西安化学试剂厂
还原型谷胱甘肽	高纯	瑞士阿达玛斯公司
TBA	超纯	Alfa Aesar
盐酸胍	超纯	Wolsen
BHT	超纯	Wolsen
肝素钠	高纯	Wolsen
苏木精	高纯	Wolsen
琼脂糖凝胶	超纯	Biowest
溴化乙啶	高纯	生工生物工程（上海）有限公司
蛋白酶 K	超纯	Sigma
40%甲醛溶液	生化试剂	生工生物工程（上海）有限公司
考马斯亮蓝 G-250	超纯	Wolsen
DTNB	超纯	Alfa Aesar
DNPH	超纯	Alfa Aesar
BSA	分析纯	中国医药上海化学试剂厂
$FeSO_4·7H_2O$	分析纯	天津市河东区红岩试剂厂
$ZnSO_4·7H_2O$	分析纯	天津市河东区红岩试剂厂
$KAl(SO_4)_2·12H_2O$	分析纯	天津市河东区红岩试剂厂
EDTA	分析纯	天津市巴斯夫化工有限公司
NaCl	分析纯	天津市河东区红岩试剂厂
SDS	分析纯	天津市福晨化学试剂厂
Rnase A	超纯	Sigma
Tris-Base	超纯	Sigma
Triton X-100	超纯	Sigma
6×Loading Buffer	生化试剂	宝生物工程（大连）有限公司
100bp DNA Ladder Maker	生化试剂	宝生物工程（大连）有限公司

部分溶液的[104]配制方法。

考马斯亮蓝 G-250 溶液：

（1）称取 100 mg 的考马斯亮蓝 G-250 染料，将其溶解于 50 mL 95%的乙

中国知网 https://www.cnki.net

醇，加入 120 mL 85%的磷酸溶解；

（2）稀释定容至 1 L，磁力搅拌器搅拌 30 min，抽滤，避光保存。

Griess 试剂的配制：

（1）Part1 为 0.1% 的 N-(1-萘基)-乙二胺水溶液；

（2）Part2 以 5%的磷酸溶液配制成 1%的对氨基苯磺酸，置于 4 ℃冷藏保存。

Griess 试剂现用现配，使用时，将 Part1 和 Part2 以 1:1（v:v）的比列混合均匀，12 h 内使用完毕。

TBA-TCA-BHT-HCl 溶液：

（1）将 0.375 g TBA，15 g TCA，0.02 g BHT 溶解于 100 mL 蒸馏水中，冷藏保存；

（2）使用前加入浓盐酸，使混合溶液中 HCl 浓度为 0.25 mol/L。

埃利希氏苏木精染液：

（1）将准确称取的 1 g 苏木精，溶解在约 15 mL 的无水乙醇中，再滴入 5 mL HAc 充分溶解，边溶边搅拌；

（2）倒入 50 mL 甘油，一边搅动，一边加入剩余的 35 mL 无水乙醇，该溶液为溶液Ⅰ；

（3）称取 5 g $KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$，在研钵中充分研碎，溶于 50 mL 热水；

（4）将温热的钾钒溶液逐滴加入溶液Ⅰ中，边加边搅动；

（5）混合后，盛装溶液的瓶口用夹脱脂棉的纱布塞住，置于暗处，保持通风，4~6 周内定期摇动以促进成熟，成熟的苏木精染液为暗红色。

50×TAE 缓冲液：

（1）准确称取 Tris 242 g，$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ 37.2 g 于烧杯中；

（2）加入约 800 mL 去离子水溶解后，加入 57.1 mL 冰乙酸，再充分溶解；

（3）用 NaOH 调节 pH 至 8.3，定容 1 L，室温保存。

本实验使用时，母液稀释为 1×TAE 即可。

TE 缓冲液：

（1）配制 10 mmol/L 的 Tris-HCl 溶液，含有 1 mmol/L 的 EDTA；

（2）调节 pH 为 8.0；

（3）使用前加入 Rnase A，配制成含 50 μg/mL Rnase A 的 TE 缓冲液，冷藏保存。

低张缓冲液：

（1）配制 10 mmol/L 的 Tris 溶液，含有 1 mmol/L 的 EDTA；

中国知网 https://www.cnki.net

（2）加入 Triton X-100，配制成浓度为 0.2%的溶液；

（3）调节 pH 为 7.5，冷藏保存。

消化液：

（1）配制 10 mmol/L 的 Tris 溶液，含有 100 mmol/L 的 NaCl，25 mmol/L 的 EDTA，0.5%的 SDS，用 HCl 调节 pH 为 8.0，冷藏保存；

（2）使用前加入蛋白酶 K，使其浓度为 0.1 mg/mL。

3.1.2 实验仪器

表 3-2 实验所用仪器

Tab 3-2 Instruments in experiments

仪器名称	型号	生产厂商
精密 pH 计	pH S-3C 型	上海雷磁仪器公司
电子天平	TDL-40B	上海精密科学仪器有限公司
磁力加热搅拌器	78-1	金坛市鸿科仪器厂
马弗炉	SX-4-10	北京科伟永兴仪器
数显恒温水浴锅	HH-2	国华电器有限公司
可见分光光度计	7230G	上海精密科学仪器有限公司
紫外分光光度计	752 型	上海光谱仪器有限公司
塞曼偏振光原子吸收光谱仪	Z-2000	日本 HITACHI 公司
高速离心机	TGL-16C	上海安亭科学仪器厂
高速冷冻离心机	Allegra 64R centrifuge	Beckman Coulter
酶标仪	MK3 型	热电（上海）仪器有限公司
生物显微镜	XSP-2CA	上海光学仪器一厂
电泳仪	DYY-10C 型	北京市六一仪器厂

3.2 实验方法

3.2.1 实验动物与分组

清洁级小白鼠 63 只，昆明种，雄性(♂)，体质量 16~20 g，购于第四军医大学实验动物中心，许可证号：SCXK(军)2007-007。随机分成 7 组，每组 7~9 只。分别为空白对照组、镉损伤组、5 个浓度梯度的花青素保护组，分别标记为 A、B、C、D、E。

3.2.2 模型建立

每日清晨对小鼠称重，按照 20 g 体质量操作标准（腹腔注射量 0.1 mL，喂

中国知网 https://www.cnki.net

饲量 0.5 mL）进行具体计算，用生理盐水配制 $CdCl_2$ 及蓝莓花青素提取物溶液（Ay），于 4 ℃保存在冰箱中备用。具体实验操作如表 3-3 所示：

表 3-3 镉诱导小鼠肝脏损伤模型的建立

Tab 3-3 Model of Cd-induced liver damage on mice

组别	给药方式	
	腹腔注射	胃饲[mg/kg/day]
空白组（Control）	生理盐水	生理盐水
镉损伤组（Cd）	$CdCl_2$	生理盐水
保护组 A	$CdCl_2$	花青素（0.3）
保护组 B	$CdCl_2$	花青素（1）
保护组 C	$CdCl_2$	花青素（3）
保护组 D	$CdCl_2$	花青素（10）
保护组 E	$CdCl_2$	花青素（30）

注：表 3-3 中 $CdCl_2$ 的浓度为 2 mg/kg/day

连续饲养 14 天，第 14 日禁食一天，24 小时后断颈处死，处死前 1 h 腹腔注射 1%的肝素钠。解剖取其肝脏，观察外观形态，称重后用磷酸缓冲液按 1:10 的比例匀浆，-70 ℃冷冻保存。

3.2.3 小鼠生活观察

观察各组小鼠的生长情况，包括小鼠身体外观、食欲大小、排泄物以及反应性等，并及时做记录。

3.2.4 体重变化及脏器系数

记录 14 天里 63 只小鼠体质量变化，按式 3-1 计算各组小鼠日平均增重。

$$\text{各组小鼠日平均增重}=\frac{\text{各组小鼠平均总增重}}{\text{生长天数}}(g/day) \tag{3-1}$$

解剖取新鲜肝脏，在磷酸缓冲液中清洗血迹，待滤纸吸干水分后，天平称重。根据式 3-2 计算脏器系数：

$$\text{脏器系数}=\frac{\text{肝脏鲜重}}{\text{体重}}\times 100\% \tag{3-2}$$

3.2.5 肝脏组织中 Cd^{2+} 含量检测

采用火焰法原子吸收光谱仪检测小鼠肝脏组织中镉离子含量。

（1）Cd^{2+} 标准曲线的绘制

准确称取 $CdCl_2$ 粉末，用 3 mol/L 的硝酸溶解，首先配制成含 Cd^{2+} 为 1 g/L 的储备液。使用时逐级稀释为 50、10、5、1、0.5、0.1、0.01 μg/L 的标准液，

中国知网 https://www.cnki.net

4 ℃冷藏保存。测量时，按照 Cd^{2+}浓度从小到大的顺序依次进样，测定不同浓度下含 Cd^{2+}溶液的吸光值，绘制标准曲线。

（2）待测样品制备

准确称取一组样品的质量，含 7 份新鲜肝脏组织（包括空白样、镉损伤样和 5 个不同浓度的花青素保护样），置于坩埚内，按序号排列在马弗炉中，500 ℃灰化 4~5 小时；自然冷却后，用 8 mL 3 mol/L 的硝酸分三次溶解残留物，过滤不溶于硝酸的杂质，最后将样品组织的硝酸溶液转移集中，于 4 ℃冷藏保存。

（3）样品 Cd^{2+}的测定

按照氯化镉标准液中 Cd^{2+}浓度从小到大的顺序依次自动进样，取得标准曲线。当 R^2>0.99 时，开始进行样品测量。记录数据，重复实验 3 次，求取平均值，绘制不同组小鼠肝脏 Cd^{2+}含量图。

3.2.6 肝脏组织中 Zn^{2+}含量检测

采用火焰法原子吸收光谱仪检测小鼠肝脏组织中锌离子含量。

（1）Zn^{2+}标准曲线的绘制

准确称取 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$，用 3 mol/L 的硝酸溶解成含 Zn^{2+} 为 1 g/L 的储备液，使用前逐级稀释为 10、5、1、0.5、0.1 μg/mL 的标准液，4 ℃冷藏保存。按照含 Zn^{2+}量从小到大的顺序依次进样，对应记录吸光值，绘制标准曲线。

（2）待测样品制备

准确称取一组样品的质量，含 7 份新鲜肝脏组织（包括空白样、镉损伤样和 5 个不同浓度的花青素保护样），置于坩埚内，按序号排列在马弗炉中，500 ℃灰化 4~5 小时；自然冷却后，用 8 mL 3 mol/L 的硝酸分三次溶解样品残渣，过滤，最后将样品组织的硝酸溶液转移集中，于 4 ℃冷藏保存。

（3）样品 Zn^{2+}的测定

按照硫酸锌标准液中 Zn^{2+}浓度从小到大的顺序依次自动进样，取得标准曲线。当 R^2>0.98 时，开始进行样品测量。记录数据，实验重复 3 次，取平均值，绘制小鼠肝脏 Zn^{2+}含量图。

3.2.7 蛋白质含量的测定

（1）考马斯亮蓝 G-250 标准曲线的制作

采用考马斯亮蓝 G-250 法测蛋白质含量。该实验方法[104]是基于考马斯亮蓝 G-250 染料与蛋白质之间的特异性结合并显色有关。使用前首先测定其标准曲线。准确称取 BSA，加蒸馏水溶解，制成 1 mg/mL 的 BSA 溶液。具体方法如表 3-4。

反应 5 min 后，于 595 nm 下进行测量，绘制标准曲线。

中国知网 https://www.cnki.net

表 3-4 考马斯亮蓝 G-250 标准曲线的制作

Tab 3-4 Standard curve of the Coomassie brilliant blue G-250 solution

试剂	加入体积（μL）						
BSA	0	20	40	60	80	100	120
磷酸缓冲液	200	180	160	140	120	100	80
考马斯亮蓝 G-250	4800	4800	4800	4800	4800	4800	4800

（2）样品蛋白质含量测定

取 20 μL 肝脏组织匀浆, 加入 4800 μL 考马斯亮蓝 G-250, 最后加入 180 μL 磷酸缓冲液定容，室温反应 5 min，595 nm 测量。根据标准曲线求得样品溶液中蛋白质含量。

3.2.8 谷胱甘肽含量测定

（1）GSH 标准曲线的绘制

准确称取 1 mg 的 GSH 标准品，双蒸水溶解，配制成 1 mg/mL 的标准液。具体方法[104]如 3-5 表所示：

表 3-5 GSH 标准曲线的制作

Tab 3-5 Standard curve of the GSH solution

试剂	加入体积						
GSH（μL）	0	20	40	60	80	100	120
双蒸水（μL）	200	180	160	140	120	100	80
0.1 mol/L 磷酸缓冲液	4300	4300	4300	4300	4300	4300	4300
DTNB，即 5,5’-二硫代双-(2-硝基)苯甲酸	500	500	500	500	500	500	500

按照上表加入药品，反应 5 min，于 412 nm 测量吸收值，绘制标准曲线。求出 GSH 含量随浓度变化的线性方程。

（2）样品 GSH 含量测定

准确称量新鲜组织，加入 10% TCA 沉淀蛋白质，以 1:5（w:v）的比例处理样品，使组织细胞充分破碎，释放出 GSH。3000 g 离心 15 min 后将上清液转移至一新离心管。取 0.1 mL 样品，加入 4.4 mL 0.1 mol/L 磷酸缓冲液，与 0.5 mL 的 DTNB 在室温下反应 5 min, 412 nm 下测量吸收值。为防止样品氧化，保证数据的可靠性，实验需在 24 h 内完成。根据线性方程求出样品中 GSH 含量。

中国知网 https://www.cnki.net

3.2.9 样品 SOD 含量测定

本实验使用联苯三酚自养化法[104]测定肝脏组织中 SOD 含量。碱性条件下，联苯三酚会自发氧化成橘红色物质，并同时生成 $O_2^{\cdot-}$ 自由基。肝脏细胞中的 SOD 可以将其催化分解生成 H_2O_2 和 O_2，从而抑制联苯三酚的自养化，且反应程度随体系颜色深浅变化。反应用紫外分光光度计测量吸收值。

配制 50 mmol/L 的联苯三酚，溶于 10 mmol/L 的 HCL 溶液，调节联苯三酚的使用量，使其自发养化速率约为 0.07 OD/min。取 20 μL 肝脏组织匀浆，加入 3 mL pH 8.2 的磷酸缓冲液及 50 mmol/L 的邻苯三酚，立即于 325 nm 下测定反应体系的吸收值，且每隔 30 s 记录一次，反应 3 min。肝脏样品 SOD 的比活力按下式 3-3，3-4 计算。

$$\text{样品SOD比活力}=\frac{\text{单位体积活力}}{C_{pr}}\quad(\text{U/mg蛋白}) \tag{3-3}$$

$$\text{单位体积活力}=\frac{0.07-\frac{1}{3}(A_t-A_0)}{0.07\times 0.02}(\text{U/mL}) \tag{3-4}$$

式 3-3，3-4 中：

A_t—3 min 时样品溶液的吸光值

A_0—0 时刻样品溶液的吸光值

C_{pr}—样品蛋白质含量（mg/mL）

3.2.10 样品 CAT 含量测定

本实验采用钼酸铵比色法[104]测定组织中 CAT 含量。CAT 是用来催化分解体系中的过氧化氢，能使过氧化氢分解为 H_2O 和 O_2，而残留的过氧化氢能够和钼酸铵反应生成黄色复合物，所以组织中 CAT 的含量和活性可以用可见分光光度计进行定量。用磷酸缓冲液配制 H_2O_2，调节使其在 240 nm 下的吸光值在 0.72~0.75 之间，避光、冷藏保存，留作底物液使用。

具体测量方法如表 3-6 所示：

表 3-6 钼酸铵测 CAT 活性方法

Tab 3-6 Method of measuring CAT activity by Ammonium Molybdate

试剂	空白组	加酶组	非酶组
	加入体积（mL）		
pH 7.4 磷酸缓冲液	2.2	1.8	2.0
组织样品溶液	—	0.2	—

中国知网 https://www.cnki.net

	25 ℃时恒温保持 3 min		
H_2O_2 底物液	—	0.2	0.2
	涡旋振荡 3 s，混合均匀后，25 ℃逐次反应 60 s		
H_2SO_4（0.5 mol/L）	1.0	1.0	1.0
钼酸铵（1%）	1.0	1.0	1.0
柠檬酸（6%）	1.0	1.0	1.0

反应终止后，4000 g 离心 3 min，于 360 nm 下测量吸收值。样品溶液 CAT 活力以式 3-5 计算

$$样品CAT活力=\frac{(A_{非酶组}-A_{加酶组})\times 1000}{0.2\times C_{pr}}(U/g蛋白) \quad (3\text{-}5)$$

式 3-5 中：

$A_{非酶组}$—非酶组样品溶液的吸光值

$A_{加酶组}$—加酶组样品溶液的吸光值

C_{pr}—样品蛋白质含量（mg/mL）

3.2.11 一氧化氮含量测定

（1）一氧化氮标准曲线的制备

本实验采用 Griess 试剂法[104]测定组织中一氧化氮含量，该法基于溶液中 NO_2^-可与对氨基苯磺酸发生重氮化，继而与 N-(1-萘基)-乙二胺偶联生成紫红色物质，该物质在 550 nm 下存在最大吸收值，且吸收值与 NO_2^-的含量或 NO 的生成呈正比，因此可以通过测量吸收值反映组织中氮氧化物的含量。配制 1 mmol/L 的 $NaNO_2$ 标准溶液，使用时将其逐级稀释成 5、10、25、50、100、160、200 和 250 μmol/L 的工作液，具体操作方法如下表所示：

表 3-7 NO^{2-}标准曲线的制备

Tab 3-7 Standard curve of the NO^{2-} solution

试剂加入量（mL）	$NaNO_2$ 工作液浓度（μmol/L）								
	0	5	10	25	50	100	160	200	250
$NaNO_2$ 工作液	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Griess 试剂	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
	室温反应 10 min， 550 nm 测量								

（2）样品一氧化氮含量的测定

移取 0.1 mL 肝脏组织匀浆，加入 1 mL 现配的 Griess 试剂，室温反应 10 min，于 550 nm 下测量吸收值。根据线性方程求得样品中一氧化氮含量。

中国知网 https://www.cnki.net

3.2.12 PCO 含量测定

本实验采用 DNPH（2,4-二硝基苯肼）比色法[104]进行测量。生物体内的自由基可以攻击蛋白质侧链上的氨基形成羰基，该化合物可以特异性地与 DNPH 反应，根据光谱吸收值反映蛋白质羰基化程度。移取 0.1 mL 肝脏组织匀浆，加入 0.5 mL 的 DNPH 进行反应，暗处放置，每隔 15 min 振荡一次。反应 1 h 后，加入 1 mL 30%的 TCA 溶液沉淀蛋白，4000 g 离心 10 min 后弃去上层清液；用 1 mL 乙醇：乙酸乙酯（v:v）混合液洗涤沉淀，反复三次，离心，将沉淀完全溶解于 1 mL 6 mol/L 的盐酸胍溶液，360 nm 下测量吸收值。根据式 3-6 计算样品中 PCO 含量。

$$样品PCO含量=\frac{(A_{PCO}\times 2)/\varepsilon}{0.1\times C_{pr}}\times 10^{6}(nmol/mg蛋白) \tag{3-6}$$

式 3-6 中：

A_{PCO}—样品溶液的吸光值

ε—蛋白质羰基化物的摩尔消光系数 2.2×10^{4}（$L\cdot cm^{-1}\cdot mol^{-1}$）

C_{pr}—样品蛋白质含量（mg/mL）

3.2.13 MDA 含量测定

采用 TBA 比色法[104]测定肝脏组织中 LPO 程度，其降解产物 MDA 可以与 TBA 反应缩合成粉红色物质，该物质在 532 nm 下有最大吸收值。因此，根据粉红色物质可以定量地反映出 MDA 的生成量，进而间接反映肝脏组织的脂质过氧化程度。取 0.3 mL 肝脏组织匀浆，加入 TCA-TBA-HCL 溶液 1.0 mL，静置 10 min 后，沸水浴反应 30 min，流水彻底冷却，再加入 5 mL 正丁醇萃取氧化产物 MDA，4000 g 离心 10 min 取上清液于 532 nm 下测量吸收值。

$$样品MDA含量=\frac{(A_{MDA}\times 5)/\varepsilon}{0.3\times C_{pr}}\times 10^{6}(nmol/mg蛋白) \tag{3-7}$$

式 3-7 中：

A_{MDA}—样品溶液的吸光值

ε —脂质过氧化物摩尔消光系数 1.56×10^{5}（$L\cdot cm^{-1}\cdot mol^{-1}$）

C_{pr}—样品蛋白质含量（mg/mL）

3.2.14 组织形态学观察

（1）制备石蜡切片[105]

a 取新鲜肝脏组织经福尔马林浸泡，待组织变硬，充分固定后取出，切成 5 mm×5 mm 的小块，于自来水下流动冲洗 18~24 h；

中国知网 https://www.cnki.net

b 依次经过 30%，50%，70%，90%至 100%的乙醇溶液逐级脱水；

c 组织经过 1:1（v:v）的乙醇-二甲苯溶液过渡至 100%的二甲苯中透明；

d 将完全透明的组织块浸没于 1:1（v:v）的二甲苯-石蜡中进行透入，再经过 100%的石蜡完全透蜡，最后将完全透蜡的组织块包埋在石蜡中，冷却固定，修块；

e 修整整齐的石蜡块上机切片，厚度为 5 μm；

f 最后，将切好的石蜡条带平贴于载玻片上固定。

（2）H&E 染色

制好的石蜡切片首先经二甲苯脱蜡，1:1（v:v）的二甲苯-乙醇溶液过渡，然后由高浓度到低浓度的乙醇逐级复水；进入埃利希氏苏木精染色 20 min，自来水流动冲洗切片表面的浮色；于氨水中返蓝，400×显微镜下观察肝细胞核，直至染出清晰的细胞核结构；遂进入曙红染色，制作良好的切片应该颜色鲜艳，核质清晰、分明。

3.2.15 DNA 损伤检测

（1）DNA 断裂的定性分析

采用琼脂糖凝胶电泳法[104]，当动物细胞 DNA 受损后，可以形成 200 bp 不同倍数的 DNA 片段。由于 DNA 分子带负电，所以在外加电场的作用下，不同分子量的 DNA 片段通过迁移向正极泳动，可以在琼脂糖凝胶上形成不同程度的阶梯状条带，从而达到分离和定性的目的。

具体操作步骤如下所示：

a 4000 g 离心 0.1 mL 的肝脏匀浆，收集细胞沉淀，悬浮于 0.2 mL 消化液，孵育 12~18 h，维持温度 50 ℃；

b 向样品中加入等体积的 25:24:1(v:v:v)的苯酚-氯仿-异戊醇混合液进行抽提；

c 11000 g 离心 10 min，萃取上清，加入 0.5 体积的 7.5 mol/L 的乙酸铵和 2 体积的无水乙醇；

d -70 ℃放置 1 h，12000 g 离心 15 min 后，再次弃去上层清液；

e 将 DNA 沉淀悬浮于含 50 μg/mL RNase 的 TE 缓冲液中；

f 配制 1.8%的琼脂糖凝胶，电泳后染色拍照。

（2）DNA 断裂的定量分析

本实验利用二苯胺与小鼠肝脏 DNA 的显色反应[104]分别对断裂以及完整核酸进行定量分析。当双链 DNA 分子损伤后，极易断裂，形成分子量大小不同的片段，断裂成碎片的 DNA 分子可以在低张缓冲液中游离出来，通过高速离心与完整的染色质分开。具体的实验步骤如下所示：

中国知网 https://www.cnki.net

a 把 0.1 mL 的肝脏细胞匀浆置于 0.4 mL 的低张缓冲液中，进行裂解；
b 裂解液经 13000 g×10 min 离心，可以将断裂的 DNA 与完整 DNA 进行分离；
c 上清液得到断裂 DNA，而沉淀得到完整 DNA，分别悬浮在 12.5%的三氯乙酸中，4 ℃冷藏过夜；
d 两部分 DNA 分别用 0.4 mL 10%的高氯酸水解，90 ℃放置 10 min；
e 加入 0.4 mL 4%的二苯胺溶液，20 μL 1.6 mg/mL 的乙醛水溶液，30 ℃过夜，于 595 nm 下测量吸光值。

DNA 断裂百分比的计算公式如下：

$$\text{DNA断裂的百分比}=\frac{A_{\text{断裂}}}{A_{\text{断裂}}+A_{\text{完整}}}\times 100\% \tag{3-8}$$

式 3-8 中：

$A_{\text{断裂}}$—上清液（即断裂 DNA）的吸光值

$A_{\text{完整}}$—沉淀部分（即完整 DNA）的吸光值

3.2.16 统计学分析

本实验所有数据都表示为“ $x\pm s$ ”。平均值用单向方差分析法 (one-way analysis of variance, ANOVA) 和相应的学生 *t*-检验进行统计学分析。

3.3 实验结果

3.3.1 小鼠生活观察

观察各实验组小鼠生长情况，发现空白组小鼠食欲旺盛，生长迅速，排泄物呈黑色规则米粒状；毛皮光亮、柔顺，腿部肌肉有力、富有弹性；眼睛明亮有神，反应敏捷。

镉损伤组小鼠嗜睡厌食，生长缓慢，排泄物稀少，呈灰色、灰褐色米粒或不规则形状；毛皮暗哑泛黄；行动缓慢、反应迟钝。

给予不同浓度的花青素保护组，小鼠进食正常，排泄良好，毛皮柔顺，眼睛灵活有神，反应机敏。

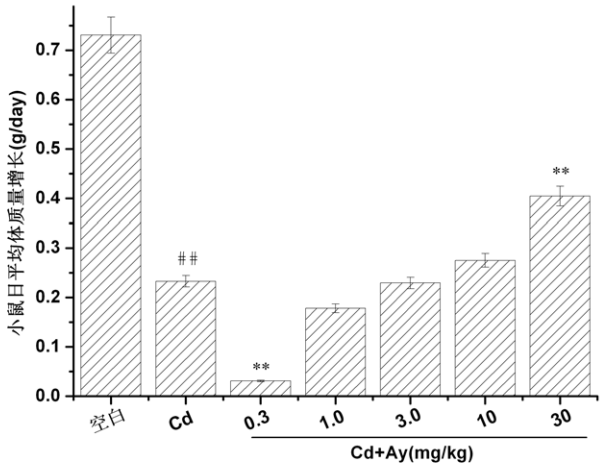
观察结果说明：重金属镉的摄入，对小鼠的食欲、生长、神经发育以及正常的生理活动造成严重影响，而通过喂饲蓝莓花青素提取物，小鼠的生长、生活情况得以明显改善。

3.3.2 小鼠生长情况

通过式 3-1 计算，绘制空白组、镉损伤组和 5 个不同剂量花青素保护组小鼠的日平均体质量增长图，如图 3-1 所示。从图中看出，染镉小鼠日平均生长缓慢，显著低于空白组。说明镉能够干扰小鼠生理代谢，抑制食欲，对生长期

中国知网 https://www.cnki.net

小鼠的正常生长造成严重影响；然而喂饲花青素能够明显改善镉所造成的生长缓慢，促进小鼠进食、健康生长，并且实验中花青素的浓度越大，促进作用越明显。



注：##表示与空白组相比，$p<0.01$，**表示与 Cd 损伤组相比，$p<0.01$

图 3-1 不同实验组小鼠生长情况

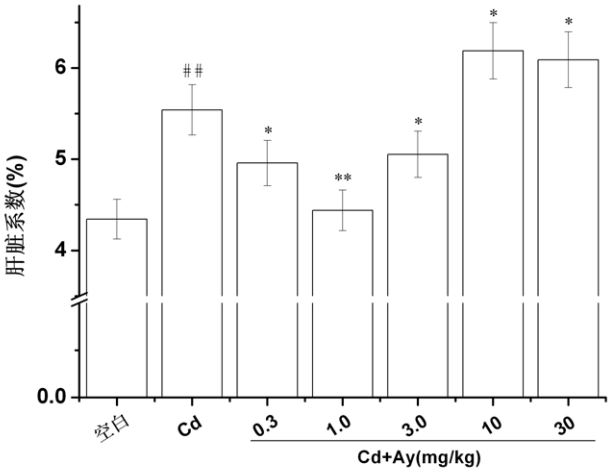
Fig 3-1 Growth states of rats in different testing groups

3.3.3 小鼠肝脏系数

解剖取出小鼠肝脏，用磷酸缓冲液清洗血迹，称量，观察各组小鼠肝脏形态。空白组小鼠肝脏健康，颜色红润，肝脏边缘尖锐，肝叶清晰分明；损伤组肝脏严重肿胀，肉眼观察混浊发白，肝脏边缘呈厚钝状，肝叶之间粘连、不能区分，严重者出现血块、白斑、硬化等弥漫性病变。经由花青素保护的小鼠肝脏颜色健康，肝叶清晰分明，边缘尖锐，未见白斑、硬化等病变的出现。

通过式 3-2 计算，绘制出空白组、镉损伤组和 5 个不同剂量花青素保护组的小鼠肝脏系数柱形图，如图 3-2 所示。图中，染镉后小鼠肝脏系数增大，显著高于空白组，表明肝脏肿胀、发炎，与显微镜下形态学观察得到的结果一致。低浓度下，花青素保护的小鼠肝系数明显减小，说明 Ay 可以缓解肝脏肿胀，抑制镉的炎症损伤；然而随着花青素浓度的升高，肝脏系数反而增大，这可能与花青素抑制脂肪细胞生长、促进脂肪代谢有关。

中国知网 https://www.cnki.net



注：##表示与空白组相比，$p<0.01$，*表示与 Cd 损伤组相比，$p<0.05$

**表示与 Cd 损伤组相比，$p<0.01$

图 3-2 不同实验组小鼠肝脏系数

Fig 3-2 Liver coefficient of rats in different testing groups

3.3.4 肝脏中 Cd^{2+}、Zn^{2+}含量

（1）Cd^{2+}溶液标准曲线的绘制

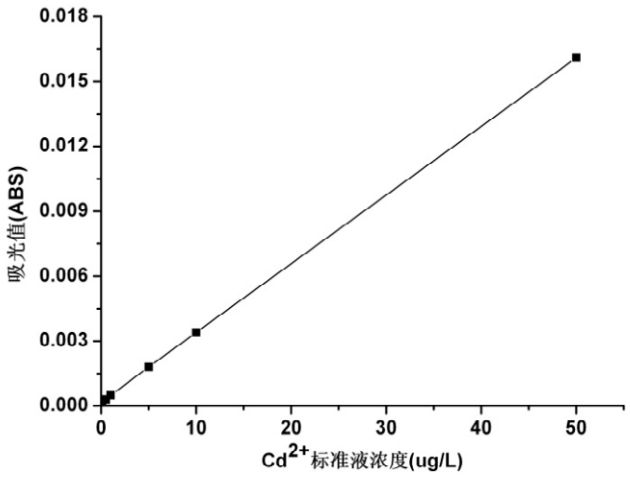


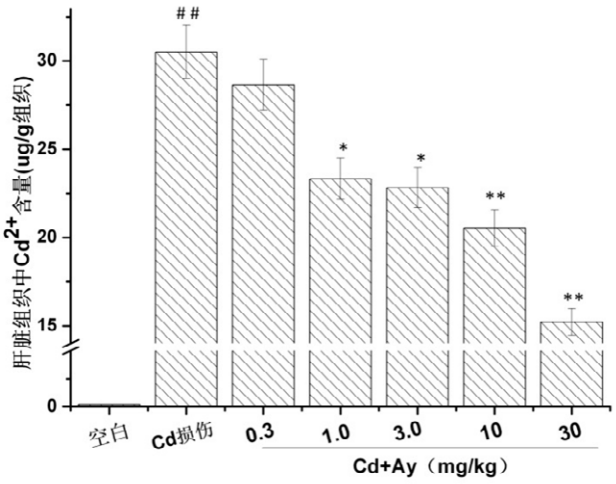
图 3-3 Cd^{2+}溶液标准曲线

Fig 3-3 Standard curve of the Cd^{2+} solution

按照 Cd^{2+}标准溶液浓度从小到大的顺序依次进样，测定不同浓度下 Cd^{2+}标准溶液的吸光值，绘制吸光值随 Cd^{2+}标准溶液浓度变化曲线图 3-3，计算得到 $R^2>0.99$。测量空白组、损伤组和 5 个不同剂量的花青素保护组小鼠肝脏中 Cd^{2+}的含量，实验重复 3 次，取平均值。

（2）肝组织中 Cd^{2+}含量

中国知网 https://www.cnki.net



注：##表示与空白组相比，p<0.01，*表示与 Cd 损伤组相比，p<0.05，

**表示与 Cd 损伤组相比，p<0.01。

图 3-4 不同实验组肝脏组织 Cd^{2+}含量

Fig 3-4 The Cd^{2+} concentration of liver in different testing groups

根据标准曲线计算得到不同组小鼠肝脏组织中 Cd^{2+}的含量,如图 3-4 所示。从图中看出，镉在小鼠肝脏中代谢缓慢，不易排出，产生明显的蓄积现象；与空白组相比，损伤小鼠每单位肝组织中 Cd^{2+}含量约为空白组的 733 倍；然而 5 组喂饲不同浓度 Ay 的小鼠，每单位肝脏组织中 Cd^{2+}含量都出现不同程度的降低，并且随 Ay 浓度的增大，镉含量降低越显著。当 Ay 的喂饲浓度为 30 mg/kg/day 时，单位肝组织中 Cd^{2+}含量比损伤小鼠减少了大约 50%。可见蓝莓中的花青素能够抑制镉在肝脏处的蓄积，加速镉排出肝细胞，从而减少游离 Cd^{2+}对机体的损伤。

（3）Zn^{2+}溶液标准曲线的绘制

按照 Zn^{2+}标准溶液浓度从小到大的顺序依次进样，采集吸收值，绘制标准变化曲线，计算得到 R^2>0.98（图 3-5）。测量空白组、损伤组和 5 个不同剂量的花青素保护组小鼠肝脏中 Zn^{2+}含量，实验重复 3 次，取平均值。

中国知网 https://www.cnki.net

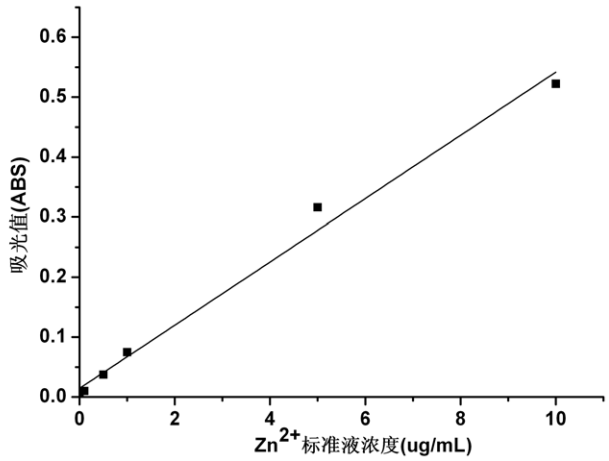
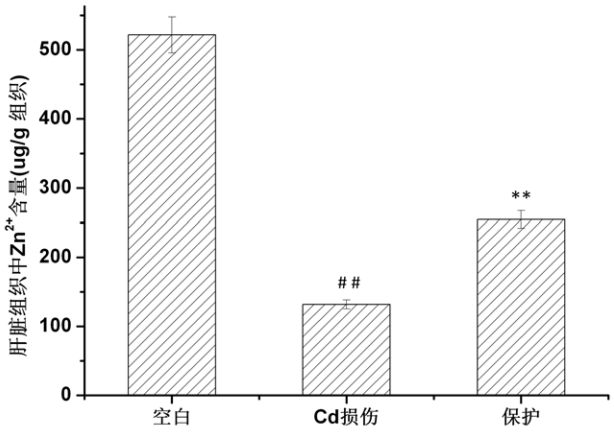


图 3-5 Zn^{2+}溶液标准曲线

Fig 3-5 Standard curve of the Zn^{2+} solution

（4）肝脏中 Zn^{2+}含量

根据标准曲线计算，得到空白组、损伤组和花青素保护组小鼠肝组织中 Zn^{2+}的含量，绘制柱形图 3-6。结果表明：染镉后小鼠肝组织中 Zn^{2+}含量明显降低，仅为空白组的 25%；然而喂饲 Ay，Zn^{2+}含量明显回升，约为损伤组的 2 倍。Cd 侵入生物体后，能够置换并替代出机体内的 Zn，促进体内锌离子的代谢，从而降低肝脏组织中锌离子的含量；然而实验表明，花青素的摄入能够明显抑制 Cd 对 Zn 的影响。



注：##表示与空白组相比，$p<0.01$，**表示与 Cd 损伤组相比，$p<0.01$。

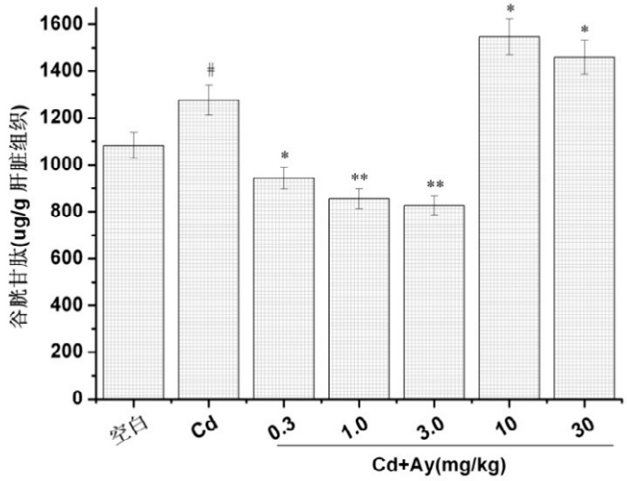
图 3-6 镉损伤对肝细胞 Zn^{2+}含量的影响以及花青素对肝脏的保护作用

Fig 3-6 The influence of Cd on Zn^{2+} concentration in liver tissue and protection of Ay

中国知网 https://www.cnki.net

3.3.5 GSH 含量测定

GSH 是由谷氨酸、甘氨酸、半胱氨酸共同组成的三肽物质，它作为体内抗氧化防御系统的重要物质，是实验中抗氧化体系检测的一项主要指标。从图 3-7 看出，注射 $CdCl_2$ 的小鼠与空白组相比，体内谷胱甘肽含量迅速升高，说明镉中毒能够打破机体自身的氧化-抗氧化平衡，并激发氧化应激的出现，促进了 GSH 抗氧化防御的形成。然而联合喂饲不同浓度花青素的小鼠，在低浓度下，花青素能明显抑制肝脏内 GSH 含量的激增，并且充当了部分抗氧化角色，从而削弱体内镉中毒所造成的氧化应激；当花青素浓度大于 10 mg/kg/day 时，体内 GSH 含量再次增加，这可能与花青素能够促进 GSH 的合成，提高机体综合抗氧化能力有关。



注：#表示与空白组相比，$p<0.05$，*表示与 Cd 损伤组相比，$p<0.05$，

**表示与 Cd 损伤组相比，$p<0.01$。

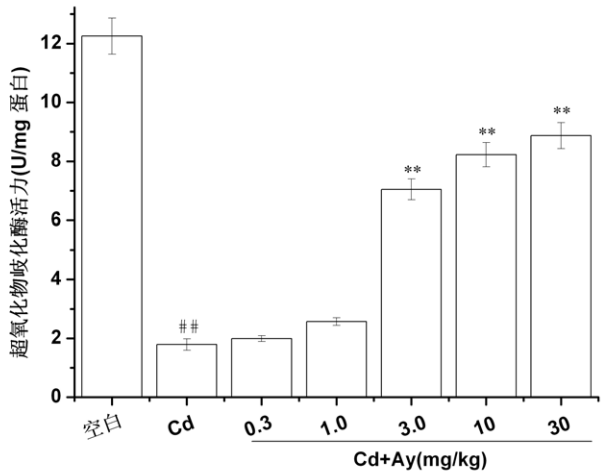
图 3-7 不同实验组肝脏中 GSH 含量

Fig 3-7 Liver GSH concentration in different testing groups

3.3.6 样品 SOD 含量测定

SOD，主要用于清除有机体过量生成的 $O_2^{\cdot -}$，是一种起抗氧化效果的自由基清除剂。如图 3-8 所示：注射 $CdCl_2$ 的损伤组小鼠，SOD 含量与空白组相比，下降了 85.4%，而喂饲花青素能显著促进 SOD 含量回升，且浓度越高，回升越明显。实验说明镉中毒能够产生大量的超氧阴离子自由基，造成肝脏中 SOD 的急剧消耗，而花青素能够抑制该过程，并且与浓度呈正向依赖关系。

中国知网 https://www.cnki.net

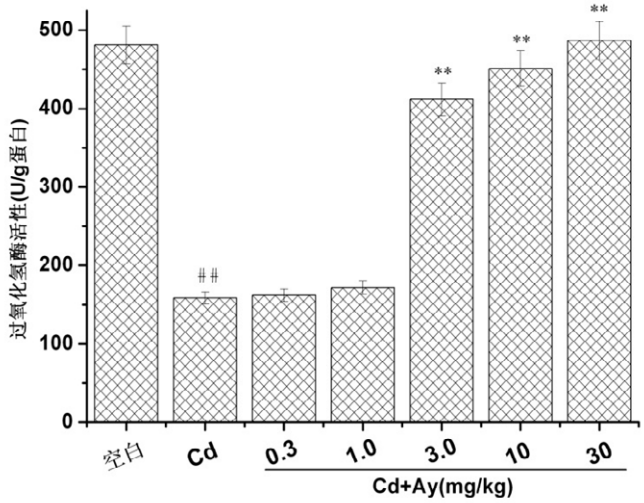


注：##表示与空白组相比，p<0.01，**表示与 Cd 损伤组相比，p<0.01

图 3-8 不同实验组超氧化物歧化酶（SOD）含量

Fig 3-8 Liver SOD concentration in different testing groups

3.3.7 样品 CAT 含量测定



注：##表示与空白组相比，p<0.01，**表示与 Cd 损伤组相比，p<0.01。

图 3-9 不同实验组过氧化氢酶（CAT）含量

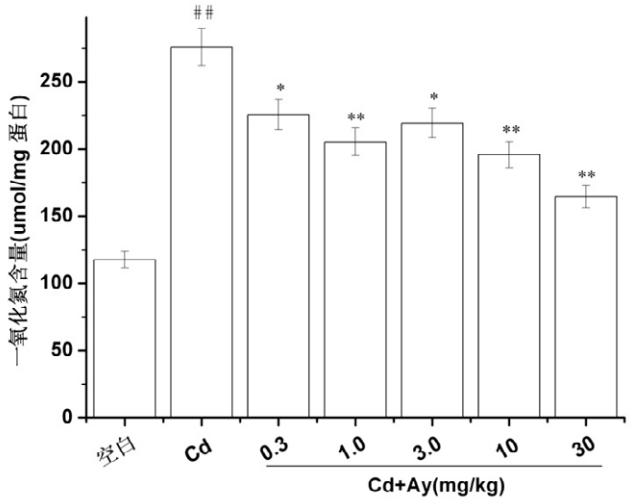
Fig 3-9 Liver CAT concentration in different testing groups

过氧化氢酶 CAT 主要用于催化分解机体内产生的 H_2O_2，使其分解成没有毒害的 H_2O 来减轻氧化反应所造成的细胞损伤。图 3-9 中，镉损伤小鼠肝脏 CAT 含量显著降低；当喂饲花青素的浓度大于 3 mg/kg/day 时，CAT 含量迅速回升，并且随花青素浓度的升高，CAT 含量逐渐增大。当 Ay 为 30 mg/kg/day 时，E 保护组小鼠肝细胞的 CAT 活力显著提高，几乎恢复接近于空白值。

中国知网 https://www.cnki.net

3.3.8 一氧化氮含量测定

与空白组相比，镉损伤小鼠肝脏 NO 的含量明显升高；然而观察喂饲花青素的 5 组保护组，小鼠肝脏内 NO 的含量逐渐降低，并且与 Ay 的喂饲浓度相关（图 3-10）。说明花青素可以抑制镉诱导下 NO 的激增，削弱高浓度 NO 对肝细胞的损伤，降低由 NO 诱发炎症的机率，进而对染镉造成的肝脏损伤起保护作用。



注：##表示与空白组相比，p<0.01，*表示与 Cd 损伤组相比，p<0.05，

**表示与 Cd 损伤组相比，p<0.01。

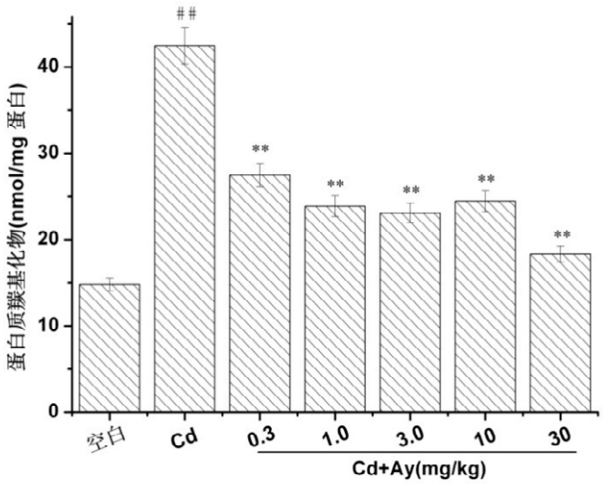
图 3-10 不同实验组一氧化氮（NO）含量

Fig 3-10 The NO concentration of liver in different testing groups

3.3.9 PCO 含量测定

图 3-11 可以看出，镉损伤小鼠肝脏 PCO 含量显著升高，约为空白组的 2.9 倍；然而受花青素保护的小鼠，肝脏 PCO 含量逐渐降低，表明蛋白质分子受自由基的攻击程度被削弱，损伤减轻，且该保护效果与花青素的喂饲浓度正向相关。其中，当 Ay 的浓度为 30 mg/kg/day 时，蛋白质分子受到的保护效果最好，PCO 含量大约下降了 56.9%。

中国知网 https://www.cnki.net

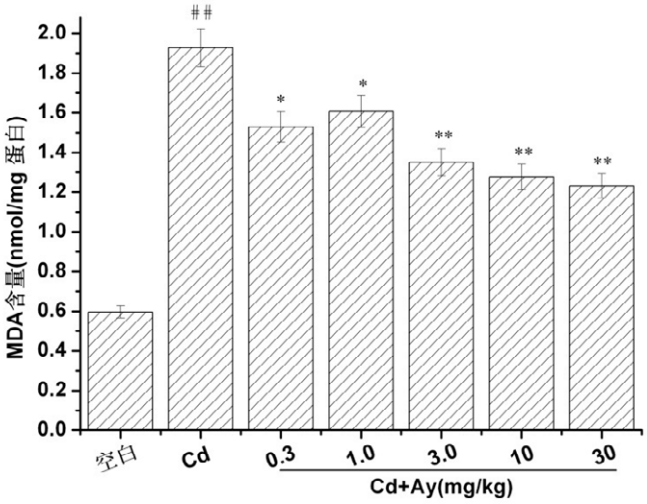


注：##表示与空白组相比，$p<0.01$，**表示与 Cd 损伤组相比，$p<0.01$。

图 3-11 不同实验组蛋白质羰基化物（PCO）含量

Fig 3-11 The PCO concentration of liver in different testing groups

3.3.10 MDA 含量测定



注：##表示与空白组相比，$p<0.01$，*表示与 Cd 损伤组相比，$p<0.05$，

**表示与 Cd 损伤组相比，$p<0.01$。

图 3-12 不同实验组丙二醛（MDA）含量

Fig 3-12 The MDA concentration of liver in different testing groups

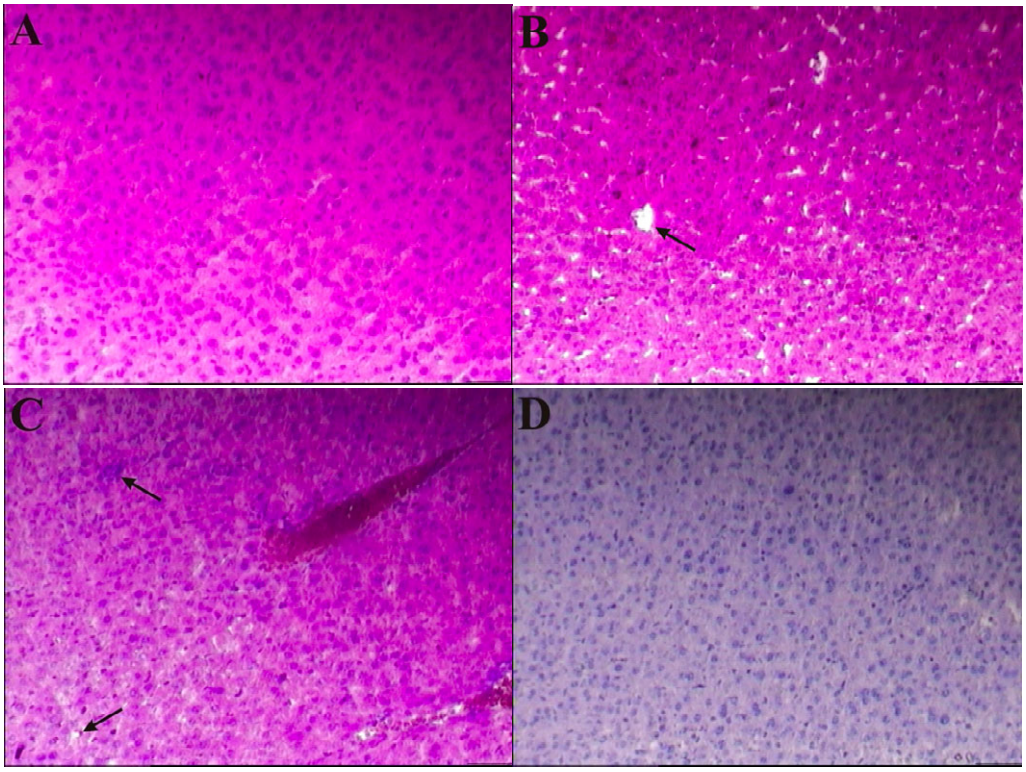
实验中各组小鼠肝细胞的脂质过氧化程度如图 3-12。图中，染镉小鼠肝细胞脂质大分子严重受损，其氧化产物 MDA 的含量与空白组相较显著升高，约为空白值的 3.2 倍；然而花青素的摄入，抑制了 LPO 的激增，并且随着喂饲浓

中国知网 https://www.cnki.net

度的增大，保护组小鼠 MDA 含量逐渐降低。表明花青素能够抑制镉诱导的脂质大分子损伤，减少 MDA 的生成，并且其保护作用随浓度的升高而增强。

3.3.11 组织形态学观察

图 3-13 中，A 为空白组小鼠肝脏细胞石蜡切片，可以看到，正常肝组织细胞完整、核质均匀；B、C 为镉损伤后的肝细胞，明显看到细胞皱缩，形成空隙；细胞膜破裂、导致核质外流；局部有细胞核固缩、炎症浸润以及空泡的出现；D 为花青素保护的小鼠肝细胞石蜡切片，观察看到，细胞完整、均匀，没有明显的细胞皱缩、炎症浸润等损伤现象，说明花青素提取物对于镉诱导损伤的小鼠肝脏具有一定的保护作用。



注：A—对照组；

B、C—损伤组小鼠肝脏；D—花青素保护组小鼠肝脏，⟶标注细胞损伤处。

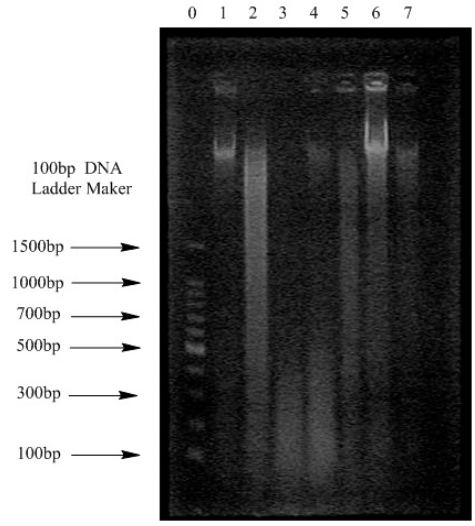
图 3-13 肝脏细胞石蜡切片（H&E，×100 倍）

Fig 3-13 Paraffin section of liver tissue (H&E，×100)

3.3.12 DNA 损伤检测

（1）DNA 断裂的定性分析

中国知网 https://www.cnki.net



注：0 为 100bp DNA Ladder Maker，1 为空白组，2 为 Cd 损伤组，

3—7 为花青素浓度依次增大的保护组。

图 3-14 不同实验组 DNA 琼脂糖凝胶电泳，

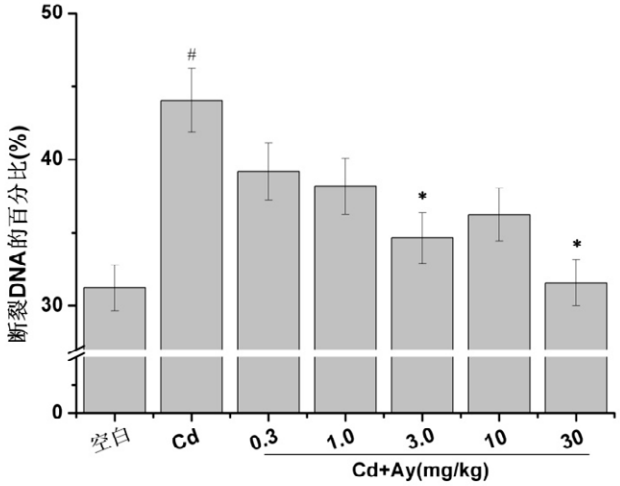
Fig 3-14 Comparison of DNA agarose gel electrophoresis in testing groups

将提取得到的不同组 DNA 在 1.8%的琼脂糖凝胶上进行电泳分离，电流 50 mA，电泳 40 min。从图 3-14 看到，100 bp DNA Ladder Maker 分离良好，呈现明暗不同的 11 条条带，分子量从大到小依次为 1500 bp、1000 bp、900 bp、800 bp、700 bp、600 bp、500 bp、400 bp、300 bp、200 bp 及 100 bp。2 号孔为镉损伤小鼠肝脏细胞 DNA 提取液电泳后的条带，明显呈现出凋亡、断裂 DNA 分子所特有的 Ladder 条带 ;而联合喂饲花青素的保护组小鼠 DNA 经过电泳分离，断裂程度明显减弱，并且与花青素的喂饲浓度有关。当花青素浓度为 30 mg/kg/day 时，几乎未见 DNA 损伤形成的 Ladder 条带，实验表明花青素对镉诱导的 DNA 断裂损伤具有一定的抑制作用。

（2）DNA 断裂的定量分析

根据式 3-8 计算得到断裂 DNA 的百分比，绘图 3-15。镉损伤组小鼠 DNA 断裂比例明显升高，显著高于空白组，喂饲花青素后，DNA 断裂程度得到明显抑制，并且随花青素浓度的增大，断裂程度依次减弱。

中国知网 https://www.cnki.net



注：#表示与空白组相比，$p<0.05$，*表示与 Cd 损伤组相比，$p<0.05$。

图 3-14 不同实验组 DNA 断裂化程度

Fig 3-14 The DNA fragmentation of liver cells in different testing groups

3.4 小结

根据对镉诱导小鼠肝脏损伤模型的研究发现，注射 $CdCl_2$ 的小鼠，精神萎靡，食欲下降，活动明显减少，已经严重影响小鼠正常生长。解剖发现，小鼠肝脏肿大，颜色变浅，肝叶之间粘连、边缘钝厚，严重者甚至出现血泡、白斑、空泡等灶状病变坏死。进一步分析表明 Cd 能够在肝脏中积蓄，并且置换出体内的 Zn。锌[106]，是生物体生长代谢的必需元素，参与多项生理功能，对生物体的生存发展具有不可估量的作用。然而，镉中毒可以造成肝脏锌元素含量显著降低，影响肝脏正常功能。实验表明：花青素能够加速肝脏中镉的排出，抑制 Cd 在肝脏中的蓄积，因此缓解镉中毒对肝脏功能的影响，并且该作用与花青素喂饲浓度呈正向依赖关系。

镉能够破坏小鼠体内氧化-抗氧化酶平衡，抑制 SOD 和 CAT 的活性，导致包括 $O_2^{\cdot-}$ 和 H_2O_2 在内的大量自由基积累，诱发 OS 的出现，造成机体氧化损伤。然而花青素的摄入能明显提高抗氧化酶活性，抑制镉诱发的氧化损伤，并且抑制作用随 Ay 浓度的增大而增强。

LPO，指发生在 PUFA 上的自由基反应。该反应涉及许多病症的发生和发展，例如癌症、关节炎、神经退行和衰老等等。实验表明：镉可以诱发机体 LPO 的出现，一方面其大量生成的代谢产物 MDA，对肝脏细胞的形态和功能产生影响；另一方面还可以促进自由基攻击蛋白质侧链，发生 PCO，使蛋白质变性，造成生物大分子的损伤。组织病理学检测发现，Cd 对肝脏的损伤还与

中国知网 https://www.cnki.net

炎症反应有关，Cd^{2+}能造成肝细胞皱缩，染色质外流和核碎裂，诱导炎症因子的产生，出现炎症现象。其中，炎症浸润、细胞坏死、组织空泡的出现还可能与机体 NO 的过量生成有关。DNA 检测发现，镉诱导下 DNA 片段化程度增加，出现明显的凋亡特征，并加速了细胞坏死。然而，花青素能够显著抑制 Cd 诱导下肝细胞组织 LPO 和 PCO 的发生，抑制 DNA 分子的断裂，对包括蛋白质、脂质和核酸的生物大分子具有明显的保护作用，且实验中喂饲的 Ay 浓度越高，保护作用越强。

中国知网 https://www.cnki.net

4 讨论

镉是重要的环境污染物，也是致癌物质，可以引起多种组织器官的损伤，并且与基因突变和肿瘤的发生有密切关系。镉（Cd），普遍存在于环境中，由于其半衰期长，代谢速度缓慢，积蓄能力强等特点，在生物代谢中首先对肝脏造成损伤。

本实验通过给雄性健康的昆明小鼠腹腔注射 $CdCl_2$（2 mg/kg/day），连续两周，旨在建立镉诱导的小鼠肝脏损伤模型。同时，喂饲小鼠不同浓度的蓝莓花青素提取物（Ay），观察喂饲 Ay 的镉损伤小鼠的生长情况，讨论 Cd 对小鼠肝脏结构和功能的影响，并研究 Ay 对损伤小鼠的保护作用及保护机制。

4.1 花青素可以清除自由基、提高机体抗氧化能力

哺乳动物体内存在两类抗氧化系统[107]：一类是酶促反应防御系统，主要包括谷胱甘肽、CAT、SOD 等。另一类非酶促系统，比方说维生素中的 V_A、Vc、V_E，含有巯基的一类物质，辅酶 Q 和 Zn、Se、Fe、Cu 等微量的金属元素。它们对 ROO·，H_2O_2，$O_2^{\cdot-}$等一系列 ROS 自由基具有较强的清除作用，可以有效地终止自由基的链式反应。

当细胞内自由基得不到及时清除，过量的自由基产生积累就可以造成体内氧化-抗氧化系统的失衡，诱发氧化应激的出现。当长期处在氧化压力之下，抗氧化酶就会耗竭或者失活，导致自由基攻击肝脏细胞，进一步造成质膜的损伤，影响包括线粒体在内的细胞器功能，引起呼吸障碍，又再次诱发自由基的生成，使机体的抗氧化能力骤减。

Zn 是生物体生存、健康的必需元素，在人体中的含量仅次于 Fe。截止于 1983 年，已知有超过 200 种酶的生理活性与锌相关，它们共同保障着人体的生存和发展，其中 SOD 就是一种常见的富 Zn 酶。实验中，原子吸收分光光度法分析镉损伤小鼠肝脏，结果表明受损肝脏组织中 Zn 含量明显降低，仅为空白组的 25.1%。由于 Cd^{2+}与 Zn^{2+}之间的拮抗关系[106,108]，导致 Zn^{2+}的缺失，引起以 SOD 为首的一类抗氧化酶的构象破坏，导致酶失活。李红等[109]研究发现，补锌对镉损伤的 Wistar 大鼠肝脏具有保护作用。补锌后染镉能明显抑制肝脏组织出现 LPO，降低 MDA 的含量，提高 SOD 活性等。

体内实验表明，给小鼠按体重（2 mg/kg/day）连续注射 $CdCl_2$ 两周，明显导致抗氧化酶 SOD 和 CAT 的大量耗尽，促使自由基的过量积累，反过来又抑

中国知网 https://www.cnki.net

制了细胞抗氧化酶的活性，降低了机体对抗氧化损伤的能力。本实验用提取自蓝莓的花青素对镉损伤的小鼠肝脏进行保护研究，结果发现 Ay 能显著提高抗氧化酶 SOD 和 CAT 的活力，促进 $O_2^{\cdot -}$和 H_2O_2 等自由基的猝灭，提高机体抗氧化水平，并且与摄入的 Ay 浓度相关，浓度越高，效果越好。当 Ay 给予量大于 3 mg/kg/day 时，机体的抗氧化能力与镉损伤组相比，显著增强（p<0.01），然而当 Ay 给予量达到 30 mg/kg/day 时，损伤小鼠体内 CAT 活力迅速恢复，几乎与空白值无异。另外，抗氧化酶活力的恢复与 Ay 能够抑制 Cd^{2+}对 Zn^{2+}的替换有关。实验中 Ay 保护组 Zn^{2+}含量明显回升，说明 Ay 还可以通过抑制镉锌之间的拮抗作用来保护富锌酶的活性，继而维持机体的抗氧化能力。

镉还能通过刺激 LPO，攻击蛋白质、糖类和核酸等体内大分子造成肝细胞的氧化损伤，启动机体氧化应激。金慧英等[110]发现，大鼠急性 $CdCl_2$ 中毒时，肝脏 MDA 含量大于对照组（p<0.05）；并且 3 h 时，H_2O_2 的阳性沉积最为显著。本实验中，Cd 损伤组小鼠肝细胞 LPO，PCO 程度显著增加（p<0.01），经 1.8%的琼脂糖凝胶电泳后，损伤的 DNA 分子明显出现特征性的凋亡条带，断裂程度显著，片段化约为空白值的 1.5 倍。然而喂饲花青素，肝脏 LPO、PCO 以及 DNA 的损伤程度明显减弱，并且与 Ay 浓度的升高呈依赖关系。当 Ay 为 30 mg/kg/day 时，花青素对小鼠肝脏的保护效果最显著，其中蛋白质羰基化物含量约为 18.3 nmol/mg 蛋白，比损伤组降低了 57%，明显抑制了肝细胞的损伤，缓解了镉对肝脏造成的氧化压力。

本课题阐释了 Ay 在体内外，都具有良好的自由基清除能力，认为镉诱导自由基的生成和过量积累，以及氧化应激的出现和机体抗氧化能力的殆尽是肝脏损伤的重要原因，而喂饲 Ay 对镉损伤的小鼠肝脏具有保护作用，该作用与花青素超强的自由基清除能力，迅速提高机体的抗氧化水平密切相关。

4.2 花青素可以抑制 NO 等炎症因子的释放

导致肝脏病变的原因极其复杂，现阶段的研究可概括为化学性以及免疫性损伤两类。化学性损伤主要与肝细胞色素 P-450 及反应的中间代谢产物有关，包括线粒体的损伤、抗氧化体系的崩解、肝细胞 Ca^{2+}的超载和自由基的蓄积等。免疫损伤主要与炎症因子的激活、NO 的积累和肝细胞的凋亡等引起的损伤有关。

连续注射 $CdCl_2$ 解剖发现，小鼠肝脏浑浊肿大，颜色黯淡，肝叶之间粘连不清，边缘钝厚。显微镜下观察，肝细胞胞浆凝聚，出现灶状坏死，细胞皱缩破裂，肝细胞核聚集，肝小叶结构破坏，出现明显的炎症浸润和空泡等。特别

中国知网 https://www.cnki.net

是炎症介质 NO 的骤增，约为空白值的 2.4 倍。Misra 等[111]认为，NO 能够加重 Cd 对人体的毒性，主要在于 NO 能够释放出与 MT 结合的 Cd。现在认为，NO 是 NOs 以精氨酸为底物，经过还原型辅酶Ⅱ（NADPH）、黄素单核苷酸（flavin mononucleotide，FMN）、四氢生物喋呤（tetrahydrobiopterin）及钙调蛋白（calmodulin）等因子辅助生成。NO 性质活泼，对肝脏具有很强的毒性，可以对线粒体的呼吸作用产生抑制，阻碍能量的生成等[112,113]。另外，肝脏细胞蛋白质的合成也能受到 NO 的抑制，持续暴露在高水平 NO 中的细胞会产生损伤。

实验证实，喂饲 Ay 可以显著抑制肝脏细胞 NO 的持续升高，当 Ay 的喂饲浓度为 0.3~30 mg/kg/day 时，NO 的抑制率从 18.3%~40.6%不等；表明抑制作用随 Ay 浓度的升高而增强。花青素可以通过抑制 NO 的含量，缓解 NO 参与的炎症反应对肝细胞的损伤，进而对镉损伤的小鼠肝脏起保护作用，并且得到组织病理学的证实。

许多研究发现[114]，富含花青素的浆果提取物能够显著抑制 MCP-1、NF-κB 以及炎症标记物 IL-8 的表达，降低血管瘤的生成等。Zdarilová 等[115]发现，含有花青素 77%的蓝锭果（*Lonicera caerulea* L.）提取物对脂多糖（lipopolysaccharide, LPS）诱导的氧化损伤和人牙龈成纤维细胞炎症具有抑制作用。其抑制途径包括上调 IL-1β（interleukin-1β，白细胞介素-1β），IL-6（interleukin-6, 白细胞介素-6）和 TNF-α, 以及抑制 COX-2（cyclooxygenase-2, 环氧合酶-2）的表达等。研究认为，抑制作用与蓝靛果提取物的抗氧化性和抗炎作用有关，对治疗牙周炎在内的炎症疾病具有重要意义。

4.3 花青素可以螯合 Cd^{2+}，促进镉排出

镉极大的生物毒性与其极缓慢的生物代谢密不可分。实验中，对小鼠肝脏组织镉离子含量分析表明：Cd 在以质量为单位的肝脏组织中积蓄量为空白值的 733 倍，能够影响 Zn 在肝脏中的代谢，破坏抗氧化酶系统。当喂饲花青素做保护剂时，小鼠单位肝脏组织中 Cd^{2+}的积蓄量随 Ay 浓度的增大而逐渐减小，当 Ay 喂饲浓度为 30 mg/kg/day 时，与镉损伤组相比，单位肝脏组织中 Cd^{2+}含量大约减少 50%。说明 Ay 能够抑制 Cd 积蓄，加速肝脏中镉的排出，缓解氧化压力的出现，还原肝细胞功能，对镉引起的肝脏中毒起保护作用。

另外，体外研究发现，Ay 对游离的 Cd^{2+}具有良好的螯合能力，并且螯合作用与 Ay 的浓度呈正向依赖关系，在一定实验范围内 Ay 浓度越高，螯合能力越显著。说明花青素可以通过螯合游离的 Cd^{2+}，以迅速降低镉毒性而起到保护作用。

中国知网 https://www.cnki.net

5 结论

5.1 结论

（1）本研究实验用花青素取自于蓝莓。结果证明：该提取物能够明显抑制镉对肝脏造成的损伤，保肝效果显著，并且保护能力与实验中小鼠喂饲浓度有关，相对浓度越高，保护能力越强。

（2）花青素对肝脏镉中毒的保护作用主要通过以下途径：

a 清除自由基、提高机体的抗氧化能力；

b 抑制一氧化氮等炎症因子的释放，阻止炎症反应的发生；

c 通过螯合镉离子，减少金属镉在肝脏中的蓄积。

实验发现，上述 3 种作用机制中，清除自由基、削弱镉中毒所诱导的氧化压力和螯合金属镉，抑制肝脏中镉的蓄积这两种途径在蓝莓花青素保肝作用中最为突出，起主导作用，并且与喂饲浓度的高低呈显著地依赖关系。然而，蓝莓花青素通过对炎症因子的抑制，进而缓解炎症所造成的肝细胞损伤也是其保肝功效的重要辅助部分。

5.2 创新点

（1）本研究利用镉诱导的小鼠肝脏损伤模型，评价蓝莓花青素对中毒肝脏的保护作用和保护效果，并同时对其机制进行探讨。

（2）提出花青素对镉中毒肝脏的保护作用与花青素螯合金属镉离子，并抑制肝脏镉蓄积有关。

中国知网 https://www.cnki.net

致 谢

时光荏苒，岁月如梭，三年的研究生生活在此时此刻的字里行间中落下帷幕。执笔回望，一幕幕清晰、逼真，酸、甜、苦、辣交织着过往的记忆在脑海中翻涌，激动地心情无以言表。看着渐已成型的毕业论文，禁不住想要感谢许多人，感谢那些一路走来曾经帮助过的人。

首先要感谢的就是我的指导老师马养民教授和龚频博士。从当初选定课题，进行开题报告，再到后来的具体实验操作以及撰写毕业论文，马老师都最大程度地给予我多方面的帮助和指导。马老师深厚的专业知识，严谨的治学态度以及精益求精的工作作风，都深深的影响着我，成为我学习的榜样和终生追求的目标。在整个实验过程中，龚老师始终秉承着言传身教的行为准则，那种平易近人、温文尔雅的人格魅力更使我毕生难忘。

另外，本次实验和论文的顺利完成，也离不开化学与化工学院杨秀芳老师、生命科学与工程学院宋宏新老师、资源与环境学院吕庆强老师所提供的帮助，在此，我也要向他们表示衷心的感谢！

还要感谢那些曾经指导并帮助过我的所有老师和同学，那些实验室里的师兄弟姐妹，是你们，鼓励我勇敢的面对每一次挫折；是你们，冲淡苦涩的学习，让我品尝到甘甜，这些灿烂的记忆，会是我一生相伴左右的财富。

感谢含辛茹苦养育我成人的双亲，没有你们的理解和支持，没有你们的鼓励和援助，我的学位论文无法如此顺利地完成，是你们的爱让我成长，让我坚定不移地前进。

最后，感谢国家林业公益性行业科研专项（200904004）、陕西省科学技术研究发展计划项目（2009K02-02）对本研究的资助，为研究的完成提供实验平台和技术保障。

中国知网 https://www.cnki.net

参考文献

[1] 韩硬海，李树桐. 临床肝脏病学[M]. 济南：山东科学技术出版社，2004：1-10，211-371.

[2] 姚光弼. 肝脏损伤的机制[J]. 中华消化杂志，1998，18(4)：235-238.

[3] 徐鑫，屈彩芹. 药物性肝损伤机制[J]. 医学综述，2008，14(5)：747-749.

[4] D. Bac, W. Pruimboom, P. Mulder, et al. High interleukin-6 production within the peritoneal cavity in decompensated cirrhosis and malignancy-related ascites [J]. Liver, 1995, 15(5): 265-270.

[5] M. Date, K. Matsuzaki, M. Matsushita, et al. Differential regulation of activin A for hepatocyte growth and fibronectin synthesis in rat liver injury [J]. Journal of hepatology, 2000, 32(2): 251-260.

[6] J. Eskdale, G. Gallagher, C. L. Verweij, et al. Interleukin 10 secretion in relation to human IL-10 locus haplotypes [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1998, 95(16): 9465-9470.

[7] 刘平，宋东眷. 药物性肝损伤的发病机理[J]. 肝脏，2001，1：40-40.

[8] 路雪雅. 乙醇诱导肝脏损伤的自由基机理[J]. 新消化病学杂志, 1997, 5(3)：200-202.

[9] 彭景华，胡义扬. 姜黄素抗肝损伤研究进展[J]. 国外医学：消化系疾病分册，2005，25(6)：373-375.

[10] F. M. El-Demerdash, M. I. Yousef, F. S. Kedwany, et al. Cadmium-induced changes in lipid peroxidation, blood hematology, biochemical parameters and semen quality of male rats: protective role of vitamin E and β-carotene [J]. Food and Chemical Toxicology, 2004, 42(10): 1563-1571.

[11] R. E. Dudley, D. J. Svoboda, C. Klaassen. Acute exposure to cadmium causes severe liver injury in rats [J]. Toxicology and applied pharmacology, 1982, 65(2): 302-315.

[12] D. Bagchi, M. Bagchi, E. Hassoun, et al. Cadmium-induced excretion of urinary lipid metabolites, DNA damage, glutathione depletion, and hepatic lipid peroxidation in Sprague-Dawley rats [J]. Biological trace element research, 1996, 52(2): 143-154.

[13] 金慧英，李法卿. 镉中毒肝脏过氧化氢 (H_2O_2) 定位及抗氧化系统的变化.

中国知网 https://www.cnki.net

中国公共卫生，2000，16(1)：15-16.
[14] 魏筱红，魏泽义. 镉的毒性及其危害[J]. 公共卫生与预防医学，2007，18(4)： 44-46.
[15] 谢黎虹，许梓荣. 重金属镉对动物及人类的毒性研究进展[J]. 浙江农业学报，2003，15(6)：376-381.
[16] 王夔. 生命科学中的微量元素[M]. 北京：中国计量出版社，1992.
[17] 金泰廙，孔庆瑚，叶葶葶，等. 镉致人体健康损害的环境流行病学研究[J]. 2002，19(9)：10-16.
[18] 刁书永，张立志，袁慧. 镉中毒机理研究进展[J]. 动物医学进展，2005，26(5)：49-51.
[19] L. Friberg, C. Elinder, T. Kjellstrom, et al. Cadmium and health: A toxicological and epidemiological appraisal Volume 1: Exposure, dose, and metabolism [M]. CRC Press, Boca Raton, Florida, 1985.
[20] L. Friberg, C. Elinder, T. Kjellstrom, et al. Cadmium and health: A toxicological and epidemiological appraisal Volume II: Effects and response [M]. CRC Press, Boca Raton, Florida, 1985.
[21] 刘杰. 镉的毒性和毒理学研究进展[J]. 中华劳动卫生职业病杂志，1998，16(1)：2-4.
[22] 吴娜，蔡光明，何群. 氧化应激与肝脏损伤[J]. 世界华人消化杂志，2008，16(29)：3310-3315.
[23] 达瑞，刘永琦，苏韫，等. 镉遗传毒性的研究进展[J]. 中国优生优育，2011，17(5)：251-253.
[24] 李勇，孔令青，高洪，等. 自由基与疾病研究进展[J]. 动物医学进展，2008，29(4)：85-88.
[25] 李建喜，杨志强，王学智. 活性氧自由基在动物机体内的生物学作用[J]. 动物医学进展，2006，27(10)：33-36.
[26] 曹锡清. 脂质过氧化对细胞与机体的作用[J]. 生物化学与生物物理进展，1986，2(9)：17-20.
[27] E. A. Hassoun, S. J. Stohs. Cadmium-induced production of superoxide anion and nitric oxide, DNA single strand breaks and lactate dehydrogenase leakage in J774A. 1 cell cultures [J]. Toxicology, 1996, 112(3): 219-226.
[28] 陈敏，谢吉民，程晓农，等. 镉对小鼠肝脏的毒作用机理探讨[J]. 江苏大学学报 (医学版)，2002，12(4)：321-323.

中国知网 https://www.cnki.net

[29] F. M. El-Demerdash, M. I. Yousef, F. S. Kedwany, et al. Cadmium-induced changes in lipid peroxidation, blood hematology, biochemical parameters and semen quality of male rats: protective role of vitamin E and β-carotene [J]. Food and Chemical Toxicology, 2004, 42(10): 1563-1571.
[30] 刘振玉. 谷胱甘肽的研究与应用[J]. 生命的化学，1995，15(1)：19-21.
[31] 张明，邬静，邓思君，等. 镉诱导仔猪睾丸支持细胞氧化酶活性降低及 DNA 损伤的研究[J]. 生态环境学报，2010，19(3)：576-579.
[32] 刘湛. 镉对生物膜体系功能的影响[J]. 卫生毒理学杂志，1991，5(4)：269-271.
[33] 刘冬梅. 钙离子的生理作用及与疾病的关系[J]. 卫生职业教育，2004，22(7)：79-79.
[34] 崔婕，薛绍白. 胞内钙的稳态调节[J]. 细胞生物学杂志，1995，17(3)：97-102.
[35] T. K. Baker, H. B. VanVooren, W. C. Smith, et al. Involvement of calcium channels in the sexual dimorphism of cadmium-induced hepatotoxicity [J]. Toxicology letters, 2003, 137(3): 185-192.
[36] A. Kostrzewska, A. Sobieszek. Diverse actions of cadmium on the smooth muscle myosin phosphorylation system [J]. FEBS letters, 1990, 263(2): 381-384.
[37] G. J. Long. Cadmium perturbs calcium homeostasis in rat osteosarcoma (ROS 17/2.8) cells; a possible role for protein kinase C [J]. Toxicology letters, 1997, 91(2): 91-97.
[38] C. Block, S. Freyermuth, D. Beyersmann, et al. Role of cadmium in activating nuclear protein kinase C and the enzyme binding to nuclear protein [J]. Journal of Biological Chemistry, 1992, 267(28): 19824-19828.
[39] 黄颖秋. 一氧化氮与肝病研究进展[J]. 国外医学： 消化系疾病分册，1997，17(2)：79-82.
[40] 张光伟, 范玉颖. 一氧化氮与肝损伤的研究[J]. 解剖科学进展, 2002, 8(1)：75-77.
[41] 原亚萍，朴铁夫. DNA 损伤，修复与突变的研究进展[J]. 吉林农业大学学报，1995，17(3)：91-95.
[42] 余日安，陈学敏. 镉对大鼠肝细胞 DNA 损伤作用的研究[J]. 中国公共卫生学报，1998，17(2)：106-107.
[43] 余日安. 镉与 DNA 损伤，癌基因表达，细胞调亡[J]. 国外医学：卫生学

中国知网 https://www.cnki.net

分册，2000，27(6)：359-363.
[44] 王石. 吸烟相关剂量镉致大鼠肝脏损伤的蛋白质组学研究[D]. 吉林大学，2010.
[45] S. S. M. Habeebu, J. Liu, C. D. Klaassen. Cadmium-induced apoptosis in mouse liver [J]. Toxicology and applied pharmacology, 1998, 149(2): 203-209.
[46] 柯跃斌. DNA 氧化性损伤及生物标记 oh^8dG 的应用[J]. 国外医学分子生物学分册，1993，15(2)：75-78.
[47] 潘洪志，万丽葵，常东，等. 大鼠 DNA 氧化损伤及抗氧化酶活力变化与慢性镉中毒[J]. 中国临床康复，2005，9(15)：108-109.
[48] 李韬，张宏宇，吕玉璋. 花色苷类色素的研究进展[J]. 农业科技与装备，2010，(5)：23-26.
[49] 卢钰，董现义，杜景平，等. 花色苷研究进展[J]. 山东农业大学学报：自然科学版，2004，35(2)：315-320.
[50] J. L. Johnson. Effect of black raspberry extracts on colon cancer cell proliferation [D]. Food Science and Nutrition, The Ohio State University, 2009.
[51] W. Kalt, J.B. Blumberg, J. E. McDonald, et al. Milbury. Identification of anthocyanins in the liver, eye, and brain of blueberry-fed pigs [J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2008, 56(3): 705-712.
[52] F. Galvano, L. La Fauci, G. Lazzarino, et al. Cyanidins: metabolism and biological properties [J]. The Journal of nutritional biochemistry, 2004, 15(1): 2-11.
[53] 高爱红，袁海波，童华荣. 天然食用色素—花青素应用研究进展[J]. 广州食品工业科技，2001，17(3)：75-78.
[54] H. Wang, G. Cao, L. Ronald. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins [J]. Journal of agricultural and food chemistry, 1997, 45(2): 304-309.
[55] 张名位，郭宝江，池建伟，等. 黑米皮提取物的体外抗氧化作用与成分分析[J]. 中国粮油学报，2005，20(6)：49-54.
[56] M. Kano, T. Takayanagi, K. Harada, et al. Antioxidative activity of anthocyanins from purple sweet potato, Ipomoera batatas cultivar Ayamurasaki [J]. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 2005, 69(5): 979-988.
[57] 卢立真，张雨青，马永雷，等. 紫甘薯花青素苷对老龄小鼠的抗氧化作用[J]. 安徽农业科学，2010，(13)：6916-6917.

中国知网 https://www.cnki.net

[58] K. Valentová, J. Ulrichová, L. Cvak, et al. Cytoprotective effect of a bilberry extract against oxidative damage of rat hepatocytes [J]. Food chemistry, 2007, 101(3): 912-917.
[59] 陈春明. 肥胖问题—我国公共卫生的新挑战[J]. 中华流行病学杂志，2002，23(1)：1-2.
[60] 秦媛媛. 花色苷对脂肪细胞脂肪酸代谢的影响及其机制探讨[D]. 广州 :中山大学，2010.
[61] 胡艳，郭红辉，王庆，等. 黑米花色苷提取物对高脂膳食诱导大鼠肥胖形成的影响[J]. 食品科学，2008，29(2)：376-379.
[62] A. Jurgoński, J. Juśkiewicz, Z. Zduńczyk. Ingestion of black chokeberry fruit extract leads to intestinal and systemic changes in a rat model of prediabetes and hyperlipidemia [J]. Plant Foods for Human Nutrition (Formerly Qualitas Plantarum), 2008, 63(4)：176-182.
[63] 夏敏，朱惠莲，唐志红，等. 花青素对人脐静脉内皮细胞基质金属蛋白酶影响[J]. 中国公共卫生，2005，21(6)：666-668.
[64] 钱学贤，戴玉华，孔华宇. 现代心血管病学[M]. 北京：人民军医出版社，1999.
[65] T. H. Kang, J. Y. Hur, H. B. Kim, et al. Neuroprotective effects of the cyanidin-3-O-β-D-glucopyranoside isolated from mulberry fruit against cerebral ischemia [J]. Neuroscience letters, 2006, 391(3): 122-126.
[66] C. C. Chen, L. K. Liu, J. D. Hsu, et al. Mulberry extract inhibits the development of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits [J]. Food chemistry, 2005, 91(4): 601-607.
[67] 贾宁，宋福珍，张颖. 保护视力注重花青素的摄入[C]. 第五届沈阳科学学术年会文集. 科学发展与社会责任（A 卷）. 沈阳 :沈阳市科学技术协会，2008：520-522.
[68] H. Nakaishi, H. Matsumoto, S. Tominaga, et al. Effects of black currant anthocyanoside intake on dark adaptation and VDT work-induced transient refractive alteration in healthy humans [J]. Alternative Medicine Review, 2000, 5(6): 553-562.
[69] 刘春民，王抗美，邹玲. 花青素对近视青少年视疲劳症状及视力的影响[J]. 中国实用眼科杂志，2005，23(6)：607-609.
[70] 陈玮，李帅，荣晓，等. 黑米花青素在大鼠视网膜光化学损伤中的防护作

中国知网 https://www.cnki.net

用研究[J]. 成都医学院学报，2010，5(2)：174-175.
[71] 吴冬青，李彩霞，冯雷，等. 金色补血草花色素抗氧化活性及抑菌作用研究[J]. 中兽医医药杂志，2006，24(5)：22-23.
[72] 王关林，岳静，李洪艳，等. 甘薯花青素的提取及其抑菌效果分析[J]. 中国农业科学，2005，38(11)：2321-2326.
[73] J. P. Anthony, L. Fyfe, D. Stewart, et al. The effect of blueberry extracts on *Giardia duodenalis* viability and spontaneous excystation of *Cryptosporidium parvum* oocysts, *in vitro* [J]. Methods, 2007, 42(4): 339-348.
[74] A. Chatterjee, T. Yasmin, D. Bagchi, et al. Inhibition of Helicobacter pylori in vitro by various berry extracts, with enhanced susceptibility to clarithromycin [J]. Molecular and cellular biochemistry, 2004, 265(1): 19-26.
[75] 何颖辉，周静，王跃生，等. 樱桃花青素苷对佐剂性关节炎大鼠免疫功能和炎症因子的影响[J]. 中草药，2005，36(6)：874-878.
[76] J. Wang, G. Mazza. Inhibitory effects of anthocyanins and other phenolic compounds on nitric oxide production in LPS/IFN-γ-activated RAW 264.7 macrophages [J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2002, 50(4): 850-857.
[77] M. Yoshimoto, S. Okuno, M. Yoshinaga, et al. Antimutagenicity of sweetpotato (*Ipomoea* batatas) roots [J]. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 1999, 63(3): 537-541.
[78] 高爱霞. 花青素对 NCI-H460 细胞的增殖抑制与诱导凋亡作用[J]. 山东医药，2010，(1)：61-62.
[79] W. Yi, J. Fischer, G. Krewer, et al. Phenolic compounds from blueberries can inhibit colon cancer cell proliferation and induce apoptosis [J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2005, 53(18): 7320-7329.
[80] P. H. Shih, C. T. Yeh, G. C. Yen. Effects of anthocyanidin on the inhibition of proliferation and induction of apoptosis in human gastric adenocarcinoma cells [J]. Food and chemical toxicology, 2005, 43(10): 1557-1566.
[81] L. Reddivari, J. Vanamala, S. Chintharlapalli, et al. Anthocyanin fraction from potato extracts is cytotoxic to prostate cancer cells through activation of caspase-dependent and caspase-independent pathways [J]. Carcinogenesis, 2007, 28(10): 2227-2235.
[82] H. Chang, B. Yu, X. P. Yu, et al. Anticancer activities of an anthocyanin-rich extract from black rice against breast cancer cells in vitro and in vivo [J].

中国知网 https://www.cnki.net

Nutrition and cancer, 2010, 62(8): 1128-1136.
[83] F. O. Obi, I. A. Usenu, J. O. Osayande, Prevention of carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in the rat by H. rosasinensis anthocyanin extract administered in ethanol [J]. Toxicology, 1998, 131(2): 93-98.
[84] 张晓丽，刘洪海，梁红兵，等. 花青素对化学诱导小鼠急性肝损伤的预防研究[J]. 医药导报，2009，28(7)：843-846.
[85] C. J. Wang, J. M. Wang, W. L. Lin, et al. Protective effect of Hibiscus anthocyanins against tert-butyl hydroperoxide-induced hepatic toxicity in rats [J]. Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association, 2000, 38(5): 411.
[86] 王玮琳. 蓝莓提取物对酒精性肝损伤干预作用研究[D]. 长春：吉林大学，2011.
[87] T. Tsuda, F. Horio, J. Kitoh, et al. Protective Effects of Dietary Cyanidin 3-O-β-D-Glucoside on Liver Ischemia-Reperfusion Injury in Rats [J]. Archives of biochemistry and biophysics, 1999, 368(2): 361-366.
[88] A. Bishayee, T. Mbimba, R. J. Thoppil, et al. Anthocyanin-rich black currant (*Ribes nigrum* L.) extract affords chemoprevention against diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinogenesis in rats [J]. The Journal of nutritional biochemistry, 2011, 22: 1035-1046.
[89] T. Takahashi, A. Kamimura, A. Shirai, et al. Several selective protein kinase C inhibitors including procyanidins promote hair growth [J]. Skin Pharmacology and Physiology, 2000, 13(3-4): 133-142.
[90] 杨红澎，蒋与刚，庞伟，等. 蓝莓花色苷单体改善老龄小鼠学习记忆的研究[J]. 营养学报，2009，31(6)：583-587.
[91] 王志良，王春波，李松坚，等. 青紫薯色素对自然衰老大鼠体内抗氧化能力的影响[J]. 中国甘薯育种与产业化，2005，284-287.
[92] R. Puupponen-Pimiä, L. Nohynek, S. Hartmann-Schmidlin, et al. Berry phenolics selectively inhibit the growth of intestinal pathogens [J]. Journal of applied microbiology, 2005, 98(4): 991-1000.
[93] 严婷，李世芬，赵岩. 蓝莓对小鼠免疫功能的调节作用[J]. 南京医科大学学报：自然科学版，2009，28(11)：1448-1450.
[94] 胡雅馨，李京，惠伯棣. 蓝莓果实中主要营养及花青素成分的研究[J]. 食品科学，2006，27(10)：600-603.

中国知网 https://www.cnki.net

[95] 徐璐，郑建仙. 欧洲越桔花色苷的研究概况[J]. 中国食品添加剂，2005，4：43-46
[96] 贺强，吴立仁. 蓝莓果实中营养成分的生物学功能[J]. 北方园艺，2011，(24)：222-224.
[97] 孔祥强. 谈蓝莓中花青素的保健功能[J]. 现代农业科技，2009，15：130-131.
[98] E. Kowalczyk, P. Krzesiñski, M. Kura, et al. Anthocyanins in medicine [J]. Polish journal of pharmacology, 2003, 55(5): 699-702.
[99] R. Li, P. Wang, Q. Q. Guo, et al. Anthocyanin composition and content of the *Vaccinium uliginosum* berry [J]. Food Chemistry, 2011, 125(1): 116-120.
[100] 田福. 三种野生浆果花色苷的提取, 纯化及抗氧化活性研究[D]. 黑龙江：东北林业大学，2008.
[101] N. Smirnoff, Q. J. Cumbes. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes [J]. Phytochemistry, 1989, 28(4): 1057-1060.
[102] 陈留勇，孟宪军，贾薇，等. 黄桃水溶性多糖的抗肿瘤作用及清除自由基，提高免疫活性研究[J]. 食品科学，2004，25(2)：167-170.
[103] 李咏梅，王新宇，陈蕾，等. 镉 (Ⅱ)-邻菲啰啉-曙红 Y 缔合体系光度法测定痕量镉[J]. 冶金分析，2011，31(9)：78-80.
[104] 庞战军，周玫，陈瑗. 自由基医学研究方法[M]. 北京：人民卫生出版社，2000.
[105] 郑国锠，谷祝平. 生物显微技术[M]. 北京：高等教育出版社，1993.
[106] 王飞，黄荫薇，黄鸿梯. 锌与人体健康的探讨[J]. 中国社会医学，1994，1：13-15.
[107] 张胜年，刘春芳，李建新，等. 锌、金属硫蛋白、超氧化物歧化酶对镉中毒拮抗作用的比较[J]. 卫生毒理学杂志，1990，4(3)：150-152.
[108] 李建国，王金莉. 微量元素之间的协同与拮抗[J]. 动物营养，2004，7：28-30.
[109] 李红，王克跃，石修权. 锌对镉所致大鼠肝脏脂质过氧化损伤的保护作用研究[J]. 遵义医学院学报，2004，27(4)：322-323.
[110] 金慧英，胡惠民，周雍，等. 急性镉中毒的肝脏损伤机制及金属硫蛋白的保护作用[J]. 中华劳动卫生职业病杂志，1998，16(1)：43-46.
[111] R. R. Misra, J. F. Hochadel, G. T. Smith, et al. Evidence that nitric oxide enhances cadmium toxicity by displacing the metal from metallothionein [J].

中国知网 https://www.cnki.net

Chemical research in toxicology, 1996, 9(1): 326-332.
[112] S. Moncada, E. Higgs. Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide [J]. The FASEB journal, 1995, 9(13): 1319-1330.
[113] I. Kurose, S. Miura, H. Higuchi, et al. Increased nitric oxide synthase activity as a cause of mitochondrial dysfunction in rat hepatocytes: roles for tumor necrosis factor α [J]. Hepatology, 1996, 24(5): 1185-1192.
[114] S. Zafra-Stone, T. Yasmin, M. Bagchi, et al. Berry anthocyanins as novel antioxidants in human health and disease prevention [J]. Molecular nutrition & food research, 2007, 51(6): 675-683.
[115] A. Zdařilová, A. R. Svobodová, K. Chytilová, et al. Polyphenolic fraction of *Lonicera caerulea* L. fruits reduces oxidative stress and inflammatory markers induced by lipopolysaccharide in gingival fibroblasts [J]. Food and Chemical Toxicology, 2010, 48(6): 1555-1561.

中国知网 https://www.cnki.net

攻读学位期间发表的学术论文目录

[1] 王静，马养民，龚频，陈福欣，金赛. 花青素对镉损伤小鼠大脑的保护作用[J]. 江苏农业科学，2012(11)：318-320.

[2] 王静，马养民，逯文静. 蓝莓花青素的纯化及镇痛、抗炎药效学研究[J]. 食品工业科技，2013，34(5)：338-340.

[3] 王静，马养民，龚频. 花青素抗结肠癌研究进展[J]. 食品研究与开发.（出版中）

[4] Pin Gong, Fuxin Chen, Xiaoying Liu, Xing Gong, Jing Wang, Yangmin Ma. Protection Effect of Caffeic Acid Phenethyl Ester on Cadmium-induced mice renal damage [J]. The Journal of Toxicological Sciences, 2012，37(3): 120-125.

[5] 龚频，陈福欣，王静，马养民. 咖啡酸苯乙酯对镉诱导的心脏损伤的保护作用研究[J]. 毒理学杂志，2012，26(3)：49-52.

[6] 龚频，陈福欣，王静，马养民，张文侠. 咖啡酸苯乙酯保护镉介导的小鼠大脑氧化损伤的研究[J]. 时珍国医国药，2012，23(6)：1446-1448.

[7] 陈福欣，龚频，王静，马养民，周安宁. 咖啡酸苯乙酯对肥胖小鼠氧化应激状态调节作用研究[J]. 安徽农业科学，2012，40 (12)：7164-7167.

中国知网 https://www.cnki.net

硕士学位论文

Thesis for Master's Degree

中国知网 https://www.cnki.net