

蓝莓多酚对油酸诱导 HepG2 细胞脂肪累积的干预作用

吕业春¹, 刘翼翔¹, 吴 薇², 周 峰¹, 籍保平^{1,*}, 苏春元¹

(1. 中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083; 2. 中国农业大学工学院, 北京 100083)

摘 要: 目的: 通过建立体外肝细胞脂肪累积模型评价蓝莓多酚清除肝细胞脂肪累积的能力及揭示蓝莓对脂肪肝的潜在预防作用。方法: 用 70% 乙醇超声提取蓝莓果浆 30min, 经 XAD-7 大孔树脂纯化得到蓝莓多酚; 采用福林-肖卡法和 pH 示差法测定鲜果中总酚及花色苷含量; 用油酸(oleic acid, OA)诱导 HepG2 细胞脂肪累积并建立模型; 分别从噻唑兰染色吸光度(MTT 值)、甘油三酯(TG)值、细胞内脂滴形态三个方面评价蓝莓多酚的作用。结果: 蓝莓中多酚及花色苷含量分别为(573.9 ± 6.9)、(156.1 ± 9.1)mg/100g。蓝莓多酚能显著降低 1.0mmol/L OA 诱导的肝细胞脂肪累积, 其中 100 μg/mL 蓝莓多酚对 TG 的清除率达到 40%。结论: 蓝莓富含多酚类物质, 对脂肪肝有良好的预防效果, 是开发相关保健食品的重要资源。

关键词: 蓝莓; 多酚; HepG2 细胞; 脂肪累积

Preventive Effect of Blueberry Polyphenols on Oleic Acid-induced Fat Accumulation in HepG2 Cells

LÜ Ye-chun¹, LIU Yi-xiang¹, WU Wei², ZHOU Feng¹, JI Bao-ping^{1,*}, SU Chun-yuan¹

(1. College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China;

2. College of Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract : Objective: To evaluate the potential preventive function of blueberry polyphenols on fatty liver in the model of hepatic fat accumulation *in vitro*. Methods: After being pulped, blueberries were extracted with 70% aqueous alcohol solution for 30 min under the assistance of ultrasonic. The polyphenol compounds extracted were purified by XAD-7 macroporous resin adsorption. The contents of total polyphenols and anthocyanins in wild Chinese blueberries were detected by Folin-Ciocalteu's method and pH differential methods, respectively. Oleic acid at different concentrations (0.5—1.5 mmol/L) was used to induce fat accumulation in HepG2 cells for establishing steatosis model *in vitro*. MTT value, total triglyceride (TG) and intracellular lipid droplet morphology were used to evaluate the effect of blueberry polyphenols on HepG2 steatosis. Results: The contents of total polyphenols and anthocyanins in blueberries were (573.9 ± 6.9) mg/100 g and (156.1 ± 9.1) mg/100 g, respectively. Blueberry polyphenols showed a significant inhibitory effect against TG accumulation in HepG2 cells induced by 1.0 mmol/L OA, and the clearance rate of TG reached 40% at the concentration of 100 μg/mL. Conclusion: Wild Chinese blueberries are rich in polyphenols and reveals a potential preventive effect on fatty liver. These results will provide valuable references for the development of hepato-protective foods containing blueberries.

Key words: blueberry; polyphenols; HepG2 cells; steatosis

中图分类号: R282.71

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)17-0308-05

近年来, 由于人们饮食结构的不合理, 过度的糖脂摄入导致了肝脏脂肪代谢功能的紊乱, 使非酒精性脂肪肝(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)在人群中的发病率逐渐升高。调查显示, NAFLD 已成为欧美发

达国家的第一大慢性肝病, 其中, 发病率在美国达到了 33%, 在日本达到了 29%; 并且, 随着肥胖和糖尿病患者的增多, NAFLD 的患病率在未来 10 年将会显著增高^[1-2]。目前, 还没有治疗 NAFLD 的特效药, 临床

收稿日期: 2011-03-05

基金项目: 国家“863”计划项目(2007AA100404)

作者简介: 吕业春(1988—), 女, 硕士研究生, 主要从事功能食品研究。E-mail: azure2520@yahoo.cn

* 通信作者: 籍保平(1958—), 男, 教授, 硕士, 主要从事功能食品研究。E-mail: jbp@cau.edu.cn

上主要从改善与其相关的代谢综合征等方向来进行治疗^[3],毒副作用大、疗程较长、耗资巨大,一般患者难以负担。此外,药物服用不当还会损害肝脏,使肝脏脂肪沉积加剧,进一步恶化病情^[4]。中医认为,“上工治未病”。因此,通过饮食调节,从NAFLD的早期阶段(即肝细胞中开始出现脂肪变性的阶段)介入预防是目前预防脂肪肝病的重要环节和研究内容。研究证明,游离脂肪酸是产生脂毒性的重要介质,既可以产生潜在的细胞毒性也能引发脂质的过量累积。并且,NAFLD患者的肝组织中游离脂肪酸含量与疾病的严重性成正相关^[5]。因此,脂肪酸诱导的HepG-2细胞脂肪累积模型与脂肪肝的病理学特征具有很大的相似性^[6]。

植物多酚是经苯丙烷类代谢和类黄酮代谢途径产生的一大类次生代谢产物,包括酚酸、花色苷类、黄酮类、黄酮醇类、黄烷酮类、异黄酮类、原花青素等物质^[7]。研究报道,葡萄酒中的多酚类物质可以显著降低动脉硬化的发病率^[8];黑米花色苷提取物能显著降低小鼠的血脂水平及减少组织中脂肪和胆固醇沉积^[9];富含花色苷的紫玉米和樱桃可以改善高脂诱导的小鼠肥胖^[10-11]。这些结果显示,多酚类物质对防治脂肪累积具有潜在的功 效。

蓝莓营养成分丰富,含有丰富的多酚类物质,被联合国粮农组织(food and agriculture organization, FAO)确定为人类五大健康食品之一^[12]。本实验分析了野生蓝莓的主要化学成分,采用乙醇提取蓝莓中酚类物质,利用油酸诱导的HepG2细胞脂肪累积模型评价蓝莓多酚对脂肪肝的预防作用,以为其防治脂肪肝的发生、发展及开发功能食品提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

蓝莓 东北大兴安岭区科技局(-20℃避光保存);人肝癌细胞系(HepG2) 中国协和医科大学细胞中心。

DMEM培养基、胎牛血清(FBS) 美国Gibco公司;噻唑兰(MTT) 美国Amresco公司;油酸(OA)、二甲基亚砜(DMSO)、胰蛋白酶 美国Sigma公司;TG试剂盒 南京建成生物工程研究所;蛋白测定(BCA)试剂盒、青链霉素混合液、RIPA细胞裂解液 碧云天生物技术研究所;油红O 中国上海生工生物工程技术有限公司;其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

Spectramax 2e全自动酶标仪 美国MD公司;ST-III型光照度计 上海光电研究所;MCO-15AC培养箱 日本Sanyo公司;TDL-40B台式离心机 上海安亭科学仪器厂;LGJ-18型冷冻干燥机 军事医学科学院实验仪器厂;XDOS-1B倒置显微镜 重庆光电有限公司;RE-52旋转蒸发仪 上海亚荣生化仪器厂;SW-CJ-2FD双人单

面净化工作台 苏州净化设备有限公司;XAD-7大孔树脂 美国Sigma公司。

1.3 方法

1.3.1 蓝莓成分分析及多酚的制备

蓝莓鲜果于室温解冻,以1:30的料液比加入70%乙醇,摇匀;50℃超声波辅助提取30min;3600r/min离心15min,取上清液,45℃浓缩,将浓缩液上XAD-7大孔树脂,除去糖分和蛋白等物质,得到纯化的蓝莓多酚。

1.3.1.1 总酚含量测定

采用福林-肖卡法,参照Singleton等^[13]的方法。

1.3.1.2 花色苷含量的测定

取蓝莓提取液1.0mL,分别用pH1.0盐酸-氯化钾缓冲溶液和pH4.5三醋酸钠-醋酸钠缓冲溶液定容至10mL,4℃放置2h后于波长520nm处测吸光度,得到 ΔA 。

总花色苷含量(total anthocyanins content, T_{Ac})按式(1)计算(结果以矢车菊-3-葡萄糖苷(cy-3-glu)计)。

$$T_{Ac}/(\text{mg}/100\text{g}) = \frac{\Delta A \times M \times 10 \times 100 \times V}{\varepsilon \times 100 \times m} \times n \quad (1)$$

式中: $\Delta A = [A(\text{pH}1.0) - A(\text{pH}4.5)]$; V 为提取液总体积/mL; n 为稀释倍数; M 为cy-3-glu的相对分子质量(449.2); ε 为cy-3-glu的摩尔消光系数,其值为29600/(L/(mol·cm)); m 为样品质量/g。

1.3.1.3 其他指标的测定方法

可滴定酸含量、可溶性固形物含量以及pH值的测定参照徐国能^[14]的方法。

1.3.2 细胞培养

HepG2细胞用含10%胎牛血清的DMEM培养基培养。当细胞达80%~90%密度时传代,一般2d传1次,每次1传3,细胞生长稳定良好即可使用。取对数生长期细胞接种于96孔培养板进行实验。

1.3.3 MTT测定

细胞消化,计数,按 8×10^4 个/mL细胞密度接种于96孔板,24h后加样,继续培养24h,弃上清液,加入MTT终质量浓度为0.5mg/mL的无血清培养液200 μ L,37℃继续培养,4h后终止培养,弃上清液,加150 μ L DMSO,置摇床低速振荡5min,全自动酶标仪于波长570nm处测吸光度。

$$\text{细胞存活率}/\% = A_{\text{样品}570\text{nm}}/A_{\text{对照}570\text{nm}} \times 100 \quad (2)$$

式中: $A_{\text{样品}570\text{nm}}$ 为样品吸光度; $A_{\text{对照}570\text{nm}}$ 为正常对照的吸光度。

1.3.4 TG和蛋白含量的检测

将细胞接种于24孔板中,培养24h后,加样培养24h,去除培养液,用PBS小心洗两遍,加入RIPA裂

解液,充分裂解后,3000r/min离心3~5min,取上清液,用TG试剂盒测定TG含量、蛋白浓度测定试剂盒测定总蛋白含量,结果以nmol/mg pro表示。

1.3.5 油红O染色观察细胞内脂滴形态

细胞接种于24孔培养板内,培养24h后,小心用PBS洗2次;75%酒精固定15min;PBS洗2次;60%异丙醇媒染1~2min;油红O工作液(油红O溶于异丙醇配成0.5%油红O贮备液,以6:4的比例将贮备液与蒸馏水混匀后过滤2次,至液体澄清为止,即得油红O工作液)染色30min;蒸馏水洗两次;光镜观察。

1.3.6 建模方法

将HepG2以 8×10^4 个/mL细胞密度接种于96孔培养板中,在37℃、5% CO₂培养箱中孵育24h后,弃去培养基,设置空白对照组(BC)和模型组(MC)。BC组加含BSA的不完全培养基,MC组的油酸(OA、BSA物质的量比为1:4)浓度为0.5、0.75、1.0、1.5mmol/L,每组设6复孔,分别测定其MTT值、TG值、蛋白值,观察油红O染色脂滴形态。

1.3.7 蓝莓多酚干预实验

干预实验分为BC组、MC组、加药组,各组5个平行,加药组的浓度依据MTT实验结果,选择无细胞毒性的浓度作为干预浓度,除BC组外,各组孵育液含油酸1.0mmol/L。24h后测定细胞内TG值、蛋白值,观察油红O染色脂滴形态。

1.3.8 统计分析

采用Origin 8.0统计软件对数据进行处理,实验结果以平均值±标准误差($\bar{x} \pm s$)表示,采用ANOVA-One Way检验, $P < 0.05$ 具有显著性差异, $P < 0.01$ 具有极显著性差异。

2 结果与分析

2.1 蓝莓多酚成分分析

表1 蓝莓多酚成分分析

Table 1 Major chemical compounds in blueberries

总酚含量/(mg GAE/100g) (以鲜质量计)	花色苷含量/(mg/100g) (以鲜质量计)	可滴定酸(柠檬酸, g/100g)	可溶性固形物/%Brix	pH
573.9 ± 6.9	156.1 ± 9.1	1.43 ± 0.08	9.2	2.4

注: GAE.没食子酸(gallic acid)。

如表1所示,大兴安岭野生蓝莓的总酚含量为(573.9 ± 6.9)mg/100g(以没食子酸计),总花色苷含量为(156.1 ± 9.1)mg/100g,占总酚的27.2%。该实验结果与Liu等^[15]报道的结果一致。将蓝莓多酚提取物于紫外-可见波长范围内进行扫描(图1),发现蓝莓多酚提取物除在

波长520nm(花色苷)处有特征吸收值外,在波长330nm和280nm处也有吸收峰,说明有酚酸的存在。

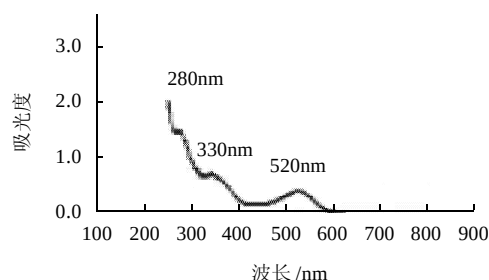


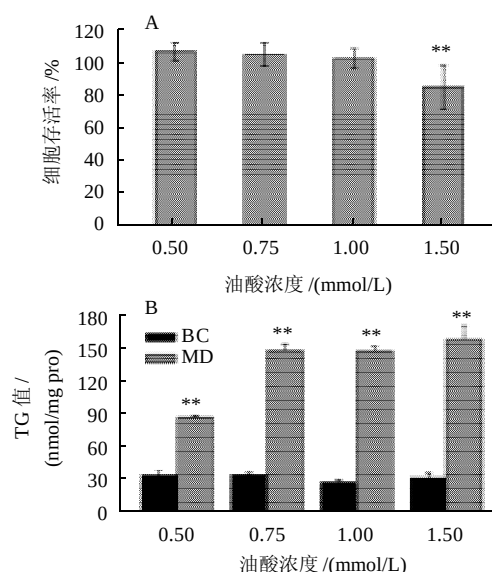
图1 蓝莓多酚提取物紫外-可见光谱图

Fig.1 UV-visible spectrum of blueberry polyphenol extract obtained in this study

2.2 肝细胞脂肪累积模型的建立

2.2.1 油酸对肝细胞细胞毒和TG累积的影响

研究表明,链长为C₁₂~C₁₈的长链脂肪酸能使肝细胞形成明显的脂滴,进而引起肝细胞脂肪变性^[16]。油酸是引起肝细胞TG累积的最主要脂肪酸^[17],因此,本研究选用油酸诱导HepG2细胞产生脂肪累积,通过测定细胞内TG含量的变化及油红O染色观察建立模型。



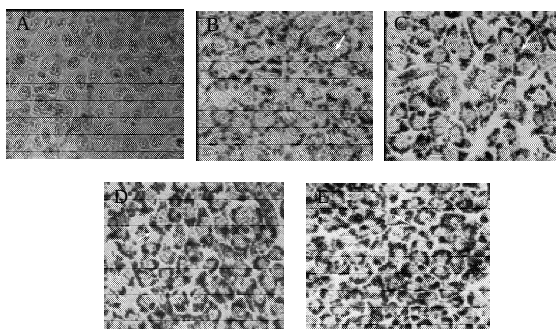
A. 油酸浓度对HepG2细胞存活率的影响; B. 油酸浓度对HepG2细胞TG累积的影响。A图中细胞存活率按空白对照组存活100%计, B图中的空白对照是指每个油酸浓度下相对应的BSA溶液。**,表明与空白对照组相比,有极显著差异($P < 0.01$)。

图2 油酸浓度对HepG2细胞存活率和TG累积的影响

Fig.2 Effect of OA concentration on cell viability and TG accumulation in HepG2 cells

由图2可知,1.0mmol/L以下油酸浓度对HepG2细胞存活率没有显著影响。当油酸浓度达到1.5mmol/L时,细胞存活率显著下降,细胞开始出现死亡。另外,

在油酸诱导的情况下, HepG2 细胞中 TG 含量较空白对照组均有显著性升高($P < 0.01$), 与油酸浓度呈剂量依赖关系。1.0mmol/L 油酸组 TG 含量已达到较高水平, 与 1.5mmol/L 浓度油酸组无显著差异。



A. 空白对照组; B. 0.5mmol/L 油酸; C. 0.75mmol/L 油酸; D. 1.0mmol/L 油酸; E. 1.5mmol/L 油酸。

图3 HepG2 细胞油红 O 染色

Fig.3 Oil red O staining of HepG2 cells with

2.2.2 油红 O 染色观察

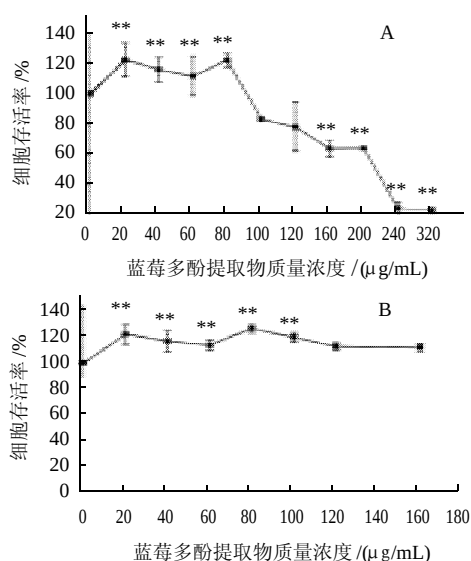
如图3所示, 空白对照组中 HepG2 细胞呈近卵球形生长, 边缘清晰, 胞浆丰富, 细胞边缘未见红色油滴沉积。0.5mmol/L 油酸处理组中, 细胞内可见明显的红色脂滴环绕于胞核周围。随着油酸浓度的增高, 胞内红色脂滴数量逐渐增多; 1.0mmol/L 油酸处理中, 可观察到细胞内出现大量脂滴, 部分脂滴融合变大, 细胞轮廓较清晰; 而 1.5mmol/L 油酸组的细胞, 不仅脂滴大量累积, 且细胞边缘模糊, 脂滴呈典型的印戒样, 细胞开始出现死亡。由此可以得出, 1.0mmol/L 的 OA 与 HepG2 细胞共同孵育培养 24h 后, HepG2 细胞没有明显的增殖和损伤, 细胞内含有大量脂滴, TG 的累积量达到较高水平, 表明建模成功。

2.3 蓝莓多酚对 OA 诱导的 HepG2 细胞脂肪沉积的干预作用

2.3.1 蓝莓多酚细胞毒理学评价

高浓度的多酚类物质具有一定的细胞毒性, 因此本实验通过 MTT 检测蓝莓多酚对细胞存活率的影响, 选取无细胞毒的样品浓度进行干预细胞脂肪累积的活性评价。

如图4A所示, 蓝莓多酚在低于 80 $\mu\text{g/mL}$ 时, 能显著促进细胞增殖; 当质量浓度达到 160 $\mu\text{g/mL}$ 时, 开始出现细胞毒性。为了进一步评价蓝莓多酚对模型组细胞存活率的影响, 选取 0~160 $\mu\text{g/mL}$ 的范围进行 MTT 评价, 如图4B所示, 在 100 $\mu\text{g/mL}$ 之前蓝莓多酚能显著促进细胞增殖, 120 $\mu\text{g/mL}$ 以后, 蓝莓多酚对细胞存活率没有显著性影响。综合考虑, 采用 100 $\mu\text{g/mL}$ 的多酚作为干预 HepG2 细胞脂肪累积的上限质量浓度。



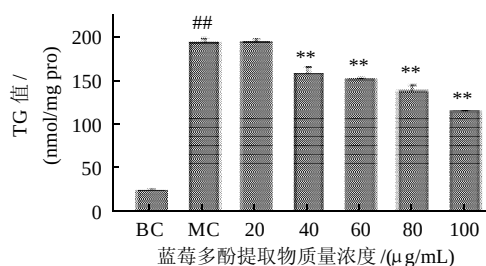
A. 蓝莓多酚对未加油酸的 HepG2 细胞存活率的影响; B. 蓝莓多酚对模型组 HepG2 细胞存活率的影响。B 组的细胞存活率是以加入 1mmol/L 油酸诱导的 HepG2 细胞为空白对照组。**, 表明与空白对照组(蓝莓多酚提取物质量浓度为 0 的组)相比, 有极显著差异($P < 0.01$)。

图4 蓝莓多酚对 HepG2 细胞存活率的影响

Fig.4 Effect of blueberry polyphenols on viability of HepG2 cells

2.3.2 蓝莓多酚对 HepG2 细胞 TG 累积的抑制作用评价

蓝莓多酚在低质量浓度时能促进细胞增殖, 对细胞有一定的保护作用, 而在高质量浓度时对细胞又有一定的毒害作用, 实验选取了对细胞没有毒害作用的蓝莓多酚质量浓度范围, 同时为了排除在低质量浓度时细胞数目的影响, 将所得的 TG 值除以细胞的蛋白值。



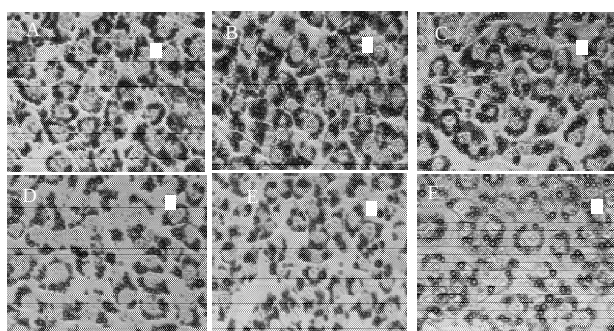
#. 与 BC 组相比, 有显著性差异($P < 0.05$); ##. 与 BC 组相比, 有极显著性差异($P < 0.01$); *. 与 MC 组相比, 有显著性差异($P < 0.05$); **. 与 MC 组相比, 有极显著性差异($P < 0.01$)。

图5 蓝莓多酚对 HepG2 细胞内 TG 值的影响

Fig.5 Effect of blueberry polyphenols on TG synthesis in HepG2 cells

由图5可知, 随着蓝莓多酚质量浓度的增加, HepG2 细胞内 TG 值呈现逐渐下降的趋势。当蓝莓多酚的质量浓度达到 100 $\mu\text{g/mL}$ 时, 细胞内 TG 值下降了 40%, 在统计学上有极显著差异。

通过光学显微镜进一步进行形态学观察(图6), 结果显示, 随着蓝莓多酚质量浓度的增加, HepG2 细胞内红色脂滴含量呈现减少的趋势, 且脂滴变小, 颜色变浅。综上所述, 蓝莓多酚可有效降低 HepG2 细胞 TG 含量, 对脂肪肝具有一定的防治作用。



A、B、C、D、E、F依次对应质量浓度0、20、40、60、80、100 µg/mL的蓝莓多酚；图中箭头所标示为染成红色的脂滴。

图6 HepG2细胞油红O染色

Fig.6 Oil red O staining of HepG2 cells

3 讨论

研究表明,脂肪肝是由于肝细胞游离脂肪酸的摄入和TG的代谢不平衡所引起的。在细胞水平上建立脂肪肝模型能大大缩短实验周期,为功能成分的评价提供方便快捷的途径。相对于正常肝细胞,肝癌细胞(HepG2)易于培养,细胞特性稳定,并已成功用于脂肪肝细胞模型的建立,在细胞水平上探讨了脂肪肝的病理机制。Vinciguerra等^[18]通过实验证明,HepG2细胞能够代替正常肝细胞用于研究脂肪累积;Feldstein等^[19]用油酸和棕榈酸(物质的量比为2:1)的混和物造成原代肝细胞和HepG2细胞内的脂肪沉积;Yasuyuki等^[20]运用浓度0.1、1.0mmol/L的油酸作用于HepG2细胞24h后,成功造成肝细胞脂肪变性模型,认为葡萄糖转运体-2的基因表达与TG的累积有密切关系。本实验用不同浓度的油酸与HepG2细胞共同孵育24h,结合MTT实验,TG含量测定和细胞内脂滴观察,选择了既对细胞没有明显伤害,同时又能使细胞内脂滴大量累积的油酸浓度(1.0mmol/L)作为诱导肝细胞脂肪变性的适宜浓度。该模型与Yasuyuki等的研究结果一致,类似于临床上肝内游离脂肪酸升高,肝细胞摄取游离脂肪酸增加并用于合成TG,造成肝内脂肪聚积的情况。

研究认为,脂肪肝的发生与肥胖、血脂异常等代谢型综合征密切相关,而且发现腺苷酸活化蛋白激酶与TG的合成及加剧脂肪酸的氧化有一定相关性^[1]。在脂肪肝的预防方面,目前有关多酚类物质对脂肪肝的预防作用的报道较少。秦媛媛等^[9]发现矢车菊素花色苷可以激活HepG2细胞和小鼠原代脂肪细胞中的腺苷酸活化蛋白激酶,从而抑制脂肪酸合成TG,显著减少细胞内的TG水平。此外,Kwon等^[21]发现,大豆花色苷能够抑制高脂诱导的大鼠肥胖,显著降低肝脏和血清中TG的水平,分析其主要机理可能与抑制 α -葡萄糖苷酶的活性及脂肪合成酶的表达密切相关。Kalea等^[22]还发现蓝莓中的多酚类物质能够降低血清中低密度脂蛋白和组织脂质体的氧化应激反应。本实验中蓝莓多酚对肝细胞脂肪累积的干预作用有可能是从这几个方面起作用,具体的机制有待于进一步实验探讨。

4 结论

大兴安岭野生蓝莓鲜果中多酚及总花色苷含量分别为 $(573.9 \pm 6.9)\text{mg}/100\text{g}$ 和 $(156.1 \pm 9.1)\text{mg}/100\text{g}$;1.0mmol/L油酸孵育HepG2细胞24h可成功诱导肝细胞脂肪累积;蓝莓多酚可显著清除细胞内TG的累积,其质量浓度为100 µg/mL时,清除率可以达到40%。因此,在日常生活中应减少油脂的摄入;食用蓝莓鲜果或富含多酚的果蔬对脂肪肝等疾病具有一定的防治作用。

参考文献:

- [1] 池肇春,周长宏,史光军,等.非酒精性脂肪性肝病[M].北京:军事医学科学出版社,2009:1-17.
- [2] FARRELL G C, LARTER C Z. Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis[J]. *Hepatology*, 2006, 43(2): 99-101.
- [3] 张瑜.姜黄素与四氢姜黄素对实验性脂肪肝的干预作用[D].福建:福建医科大学,2008.
- [4] 杨钦河.不同治法方药对脂肪肝肝细胞信号转导调控机制影响的实验研究[D].广州:中山大学,2007.
- [5] NEHRA V, ANGULO P, BUCHMAN A, et al. Nutritional and metabolic considerations in the etiology of nonalcoholic steatohepatitis[J]. *Dig Dis Sci*, 2001, 46: 2347-2352.
- [6] FELDSTEIN A E, WERNEBURG N W, CANBAYET A, et al. Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF- α expression via a lysosomal pathway[J]. *Hepatology*, 2004, 40(1): 185-194.
- [7] PETER C H, HOLLMAN, ILJA C W. Flavonols, flavones and flavanols - nature, occurrence and dietary burden[J]. *J Sci Food Agr*, 2000, 80(7): 1081-1093.
- [8] 唐传核,彭志英.葡萄多酚类化合物及生理功能[J].中外葡萄与葡萄酒,2000(2):12-15.
- [9] 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.
- [10] TSUDA T, SATO S, KOUNO Y, et al. Dietary cyanidin 3-O-beta-D-glucoside-rich purple corn color prevents obesity and ameliorates hyperglycemia in mice[J]. *J Nutr*, 2003, 133: 2125-2130.
- [11] JAYAPRAKASAM B, OLSON L K, SCHUTZKI R E, et al. Amelioration of obesity and glucose intolerance in high-fat-fed C57BL/6 mice by anthocyanins and ursolic acid in Cornelian cherry(*Cornus mas*)[J]. *J Agric Food Chem*, 2006, 54: 243-248.
- [12] 王银娟.蓝莓混汁的研制及渣的干燥[D].无锡:江南大学,2006.
- [13] SINGLETON V L, JOSEPH A, ROSSO J R. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents[J]. *J Sci Food Agric*, 1965, 10: 144-148.
- [14] 徐国能.杨梅品种果汁加工特性研究[D].杭州:浙江大学,2007.
- [15] LIU Yixiang, SONG Xue, HAN Yong, et al. Identification of anthocyanin components of wild chinese blueberries and amelioration of light-induced retinal damage in pigmented rabbit using whole berries[J]. *J Agric Food Chem*, 2011, 59: 356-363.
- [16] FUJIMOTO Y, ONODUKA J, HOMMA K J, et al. Long-chain fatty acids induce lipid droplet formation in a cultured human hepatocyte in a manner dependent of Acyl-CoA synthetase[J]. *Biol Pharm Bull*, 2006, 29(10): 2174-2180.
- [17] VAJTAG, DIVALDA, PUKUS, et al. Fatty degeneration in cultured hepatocytes: a new experimental model[J]. *Virchows Arch*, 1986, 52(1): 177-184.
- [18] VINCIGUERRA M, CARROZZINO F, PEYROU M, et al. Unsaturated fatty acids promote hepatoma proliferation and progression through downregulation of the tumor suppressor PTEN[J]. *J Hepatol*, 2009, 50(6): 1132-1141.
- [19] FELDSTEIN A E, WERNEBURG N W, CANBAYET A, et al. Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF- α expression via a lysosomal pathway[J]. *Hepatology*, 2004, 40(1): 185-194.
- [20] YASUYUKI O, SHINOBU T. Enhanced *GLUT2* gene expression in an oleic acid-induced *in vitro* fatty liver model[J]. *Hepatol Res*, 2002, 23: 138-144.
- [21] KWON S H, AHN I S, KIM S K. Anti-obesity and hypolipidemic effects of black soybean anthocyanins[J]. *J Med Food*, 2007, 10(3): 552-556.
- [22] KALEAA A Z, FOTINI N, CORDOPATISB T P, et al. Wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) consumption affects the composition and structure of glycosaminoglycans in Sprague-Dawley rat aorta[J]. *J Nutri Biochem*, 2006, 17: 109-116.