

## · 综 述 ·

## 黑果越桔的化学成分和药理活性研究进展

顾关云<sup>1,2</sup>, 蒋 昱<sup>1</sup>

(1. 复旦大学上海医学院, 上海 200032; 2. 如新(中国)日用保健品公司, 上海 201203)

**摘 要:** 黑果越桔 *Vaccinium myrtillus* 系杜鹃花科植物, 欧洲称 bilberry, 北美称 wild blueberry, 是很多国家应用广泛的植物药。因其具有很高的营养价值, 自古以来就食用, 约 16 世纪开始药用。从黑果越桔的果实和叶中提取很多活性成分, 主要为花青苷及其苷元花青素, 苷元包括飞燕草素、矢车菊素、矮牵牛素、芍药素、锦葵素等。黑果越桔及其提取物具有抗氧化、抗肿瘤、细胞保护、抗菌、抗糖尿病、防治心血管疾病等生物活性与药理作用。概述了 2000 年以来国外对黑果越桔化学成分、生物活性和药理作用的最新研究进展。

**关键词:** 黑果越桔; 花青素; 花青苷; 抗肿瘤; 细胞保护; 防治心血管疾病

**中图分类号:** R282.71

**文献编号:** A

**文献标识码:** 1674 - 5515(2010)06 - 0401 - 10

### A review on chemical constituents and pharmacological activity in berry of *Vaccinium myrtillus*

GU Guan-yun<sup>1,2</sup>, JIANG Yu<sup>1</sup>

(1. Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai 200032, China;

2. Nuskin (China) Daily-Use &amp; Health Products Co., Ltd., Shanghai 201203, China)

**Abstract:** *Vaccinium myrtillus* berry is a member of plants in Ericaceae family, and a widely used herb in many countries. It is also known as bilberry in European and wild blueberry in northern America. It has been used as food for centuries with its high nutritive value. Since the 16th century, it has been used as medicine for treating bladder stones, biliary disorders, scurvy, coughs, lung tuberculosis, and others. Several active constituents have been isolated from the berries and leaves, including anthocyanins (anthocyanoside flavonoids) and anthocyanidin. The major anthocyanidin aglycones are delphinidin, cyanidin, petunidin, peonidin, and malvidin. *V. myrtillus* berry and its extracts have multiple pharmacological actions. The extracts containing anthocyanosides have been shown to possess strong antioxidant, antitumor, cyto-protective, antimicrobial, antidiabetic properties as well as cardiovascular disease prevention. This article reviews the chemical constituents, bioactivity, and pharmacology of *V. myrtillus* berry since 2000.

**Key words:** the berry of *Vaccinium myrtillus* L.; anthocyanidin; anthocyanin; antitumor; cytoprotection; cardiovascular disease prevention

黑果越桔系杜鹃花科 Ericaceae 植物黑果越桔 *Vaccinium myrtillus* L. 的浆果, 果实球形, 成熟时呈蓝黑色, 欧洲称 bilberry, 北美称 wild blueberry。该植物属于落叶灌木, 植株矮小, 分布于欧洲、北亚和北美, 中国产新疆、内蒙等省区; 其浆果酸甜适口、营养丰富, 自古食用, 16 世纪始作抗菌收敛、抗糖尿病等药用。黑果越桔富含黄酮类化合物, 其中大部分为花青素类 (anthocyanidins) 及其苷类

(anthocyanins), 具有很强的抗氧化和清除自由基活性, 还含果胶、酚酸、三萜酸、氨基酸、维生素和无机元素。黑果越桔具有抗氧化、抗肿瘤、细胞保护等广泛的药理作用, 也是花青素工业的重要原材料。其果汁制品能恢复视力疲劳、解除精神困倦, 是欧美人喜欢的日常天然饮料。黑果越桔被誉为世界上第三代水果, 被国际粮农组织列为人类五大健康食品之一, 并被 2000 年版《美国药典》和 2007

年版《欧洲药典》等收录。目前,黑果越桔及其提取物的保护视力、心脑血管系列保健产品已开发上市,具有很好的市场前景。

## 1 化学成分

### 1.1 花青苷类

黑果越桔的活性成分主要为花青苷,其苷元为花青素,主要有飞燕草素、矢车菊素、矮牵牛素、芍药素、锦葵素等。

#### 1.1.1 定性与定量分析

Zhang 等<sup>[1]</sup>用带有 MS 检测器的 HPLC 仪分析黑果越桔提取物中花青苷及其苷元,鉴定了 11 种花青苷。HPLC 测定显示,黑果越桔花青苷经酸水解后,转化为 5 个主要的苷元,即飞燕草素(delphinidin)、矢车菊素(cyanidin)、矮牵牛素(petunidin)、芍药素(peonidin)和锦葵素(malvidin),每一种苷元能得到完全分离,用外标法准确地定量。还对不同的提取、水解条件和 HPLC 的优缺点进行了探讨。Ichiyangi 等<sup>[2]</sup>建立 HPLC 等度洗脱法分析黑果越桔中的 15 种花青苷,用含 0.5%三氟乙酸(TFA)的 20%甲醇水溶液作流动相,以 2 mL/min 体积流量完成分离,主要花青苷飞燕草素-3-O- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷的检测限为 0.3 pmol。据溶剂峰洗脱定位,重现性峰面积为 0.19%~3.85%,规范化相对迁移率为 0.64%~0.77%。每种花青苷的相对洗脱体积与它们相应的花青苷结构相关。根据洗脱时间从分离图谱能够预测未知花青苷的结构。因此本法可适用于来自各种生物资源的花青苷的研究。继之用毛细管区带电泳(CZE)迁移率,完全鉴定了黑果越桔 15 种花青苷,由 NMR、MS 确定结构,标绘相对分子质量和游离酚基数的图谱,初步测定了结合糖的类型和苷元的结构<sup>[3]</sup>。Du 等<sup>[4]</sup>用制备性高速反相色谱(HSCCC)法,以甲基叔丁基醚-正丁醇-乙腈-水-三氟乙酸(1:4:1:5:0.01)作溶剂系统,自黑果越桔粗提物中分得 2 种新的花青素二糖苷:飞燕草素-3-O-接骨木二糖苷和矢车菊素-3-O-接骨木二糖苷。

一些国家药典和文献中有多种分析方法用于黑果越桔提取物及其制剂的标准化。可是这些方法不允许检出游离花青素。Cassinese 等<sup>[5]</sup>用带有紫外检测的新的 LC 法,证实黑果越桔提取物和产品中存在花青苷和花青素并对两者进行定性和定量。此法显示出良好的重现性和高度专属性,适合鉴定用于

工业的可信植物原料并评价提取物成分。采用该方法评价市售的 40 个典型的黑果越桔制剂(属于 24 个不同的商标)的质量,结果显示标示量与实测结果有明显的差异。

#### 1.1.2 花青苷类的差异及影响因素

Burdulis 等<sup>[6]</sup>分析在不同地区和时间采集的黑果越桔浆果总花青苷的量及组分的差异。用分光光度法定量分析冷冻果实总花青素,结果发现立陶宛产黑果越桔样品中总花青素的量最高(0.264%~0.399%),俄罗斯和瑞典产样品中的也较多。用 HPLC 鉴定不同黑果越桔材料花青苷的种类,经酸水解后测定花青素。结果显示,全部分析样品中的花青素组分没有地域差异;样品中的矢车菊素的量最高,平均为 0.053  $\mu$ g/mL,矢车菊素较飞燕草素和矮牵牛素的量高约 2.5 倍,锦葵素和芍药素的量最低。

Savikin 等<sup>[7]</sup>对塞尔维亚栽培和野生越桔属几种植物新鲜浆果的分析表明,以黑果越桔的总花青苷的量最高(0.61 $\pm$ 0.03)%。加工和贮藏过程可引起花青苷的量降低。Latti 等<sup>[8]</sup>研究芬兰南北纬度相距约 1 000 km 黑果越桔花青苷的变化。以优化的 RP-HPLC-DAD 法对 20 个种群 179 单株浆果进行分析,结果总花青苷的平均量为 28.78 mg/g(干质量),花青苷的量在种群之内、种群之间有较大范围的变化,提示浆果生药品质具有差异性。芬兰南部地区浆果总花青苷的量显著低于中部和北部地区;在花青苷组成比例上,北方浆果中飞燕草苷占优势,而南方的则矢车菊苷占优势,东部的一些植株例外,有的花青苷的量非常低,这是首次系统研究野生黑果越桔在花青苷量和分布上存在高度差异性。Akerstrom 等<sup>[9]</sup>研究采集时间和氮肥对瑞典北部 Svartberget 林区黑果越桔中花青苷量的影响。从 2005—2007 年对黑果越桔分别进行不施、低施和高施  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  处理,每年 3 次以 HPLC 检测花青素的量。2005—2007 年总花青素平均量分别为 9.0、6.2、22.7 mg/g(干质量),表明各年份花青素明显受采收日期的影响,且与温度总和呈线性关系。氮肥对总花青素水平无显著影响,而气候波动因素则明显影响花青素的生物合成。

Burdulis 等<sup>[10]</sup>研究分布于立陶宛境内的黑果越桔浆果营养期发育过程中成分的动态变化表明,在果实充分成熟期末的生药样品中含有最丰富的花青苷。于 Krikstoniai 森林和 Prienai 松林采集的样品中花青素的量分别为 1.78%、2.13%,而于 Balkaso-

dis 森林和 Ryliskes 森林采集的样品中花青素的量分别为 1.14%、0.99%。黑果越桔生药中花青素的量有显著变化,如飞燕草素的变化可相差 28.40%,故黑果越桔生药品质亟待标准化。

### 1.1.3 干燥温度对提取物中花青苷稳定性的影响

Yue 等<sup>[11]</sup>研究不同加热温度和时间对黑果越桔提取物脱水干燥过程中 10 种花青苷稳定性的影响。结果表明,由飞燕草素、矢车菊素、矮牵牛素、芍药素、锦葵素与不同结合糖衍生的 10 种花青苷发生降解,加热温度分别在 80、100、125 °C,符合一级反应动力学。虽在相同的加热温度花青苷降解速率常数无明显的差异,但当加热温度升至 125 °C 时该常数差异则剧烈增加,所有花青苷的半衰期均小于 8 min,降解速率常数服从阿累尼乌斯方程。与阿拉伯糖成苷的花青苷较与半乳糖成苷或葡萄糖成苷的花青苷有较低的活化能倾向。加热时花青苷结合的糖被裂解,产生相应的花青素或苷元。当加热至 100 °C 持续 30 min 时,约有 30%花青苷降解;在 125 °C 时,花青素的增加持续 10 min,其后花青素的降解速率超过产生速率。与不加热提取物比较,提取物加热至 80 °C 持续 30 min、100 °C 持续 10 或 20 min、125 °C 持续 10 min,具有较高的 DPPH 自由基清除能力。

### 1.2 白藜芦醇

Lyons 等<sup>[12]</sup>用 HPLC-MS 或 MS 对越桔属几种植物浆果进行测定时,发现黑果越桔含有反式-白藜芦醇(*trans-resveratrol*),波兰样品中的量最高,为  $(71.0 \pm 15.0)$  pmol/g。烘培加热对白藜芦醇有明显的影响,于 190 °C 烘培 18 min,17%~46%的白藜芦醇被降解。Rimando 等<sup>[13]</sup>也从黑果越桔及其同属多种植物分离到白藜芦醇,质量浓度在 7~5 884 ng/g(干质量)。

### 1.3 木葡聚糖

在迄今为止分离的植物复合聚糖中,黑果越桔木葡聚糖有最复杂的结构。Hilz 等<sup>[14]</sup>用酶降解等方法分得的黑果越桔木葡聚糖由超过 20 个不同结构单元的多聚体组成,是 XXXG-型的,但也存在一些 XXG-型寡聚体。结构中包含半乳糖-木糖(L)和岩藻糖-半乳糖-木糖(F)侧链,这 2 个侧链的半乳糖单位可被乙酰化;另有  $\beta$ -木糖- $\alpha$ -木糖(U)侧链。这些侧链存在于 XUXG、XLUG、XUFG 3 个结构单元中及 XUG、XUUG、XLUG、XXUG 4 个新的单元中。

## 1.4 其他

Jensen 等<sup>[15]</sup>应用反相 HPLC 法对越桔属几种植物果汁的亲水性部位进行分析,检测到奎尼酸、苹果酸、莽草酸、枸橼酸等亲水性羧酸,质量分数在 0.35%~0.75%。还首次发现黑果越桔果汁中存在环烯醚萜苷,经 MS、NMR 等方法鉴定为水晶兰苷(monotropein)。Hokkanen 等<sup>[16]</sup>用 LC-TOF-MS 和 LC-MS-MS 等方法对黑果越桔叶甲醇提取物进行鉴定,发现 35 个酸性化合物,包括黄烷-3-醇类、原花青素类、黄酮醇类以及它们的糖苷类。Jaakola 等<sup>[17]</sup>介绍一种简单、有效的方法,可自黑果越桔果实中分离得到优质的 RNA。

## 2 黑果越桔的品种、生长期等对化学成分的影响

Jaakola 等<sup>[18]</sup>研究野生型和色突变型黑果越桔浆果发育与花青苷、原花青素、黄酮醇累积相关的黄酮类生物合成基因的表达。用聚合酶链反应、测序、标记等技术,从黑果越桔分离到黄酮途径的苯丙氨酸解氨酶、查耳酮合成酶、黄烷酮 3-羟基酶、二氢黄酮醇 4-还原酶、花青素合成酶 5 个基因 cDNA 片段。这些同源探针用于黑果越桔黄酮途径基因表达的测定。当黑果越桔浆果成熟时,花青苷累积与黄酮途径基因表达之间相关:浆果发育早期,主要的黄酮是矢车菊素和槲皮素;而随成熟度的提高,黄酮的量迅速降低;在浆果发育晚期,花青苷大幅增加,成为浆果中的主要黄酮类化合物。在色突变型黑果越桔中黄酮途径基因的表达减少。研究还表明,太阳辐射对黑果越桔叶黄酮类化合物生物合成有一定影响,进一步证明黄酮类化合物和羟基桂皮酸在植物受强阳光辐射下的保护作用,还探讨了不同黄酮类化合物对暴露于太阳引起的应激的防御作用<sup>[19]</sup>。

## 3 生物活性与药理作用

### 3.1 抗氧化

Faria 等<sup>[20]</sup>对黑果越桔提取物(A)及花青苷衍生的 2 个提取物(B 和 C)中的多酚、黄酮、花青苷及其衍生色素进行了测定。A 含 15 种花青苷,B 主要由花青苷-丙酮酸加合物组成,C 主要由乙烯基吡喃花青苷-儿茶素(vinylpyranoanthocyanin-catechins)组成。这些提取物能抑制脂质体膜系统由 2,2'-偶氮双(2-异丁基脒)二盐酸盐诱导的脂质

过氧化作用。Rahman 等<sup>[21]</sup>检测黑果越桔中 15 种纯花青苷及花葵素-3-*O*- $\beta$ -*D*-吡喃葡萄糖苷、4'-*O*-甲基飞燕草素-3-*O*- $\beta$ -*D*-吡喃葡萄糖苷的抗氧化活性,以研究这些抗氧化剂的构效关系及混合物中各种成分之间的协同作用。结果显示,苷元结构和糖基部分对超氧化物自由基( $O_2^{\cdot-}$ )和过氧亚硝酸阴离子( $ONOO^-$ )的清除活性均有影响,糖基部分作用较苷元结构弱。苷元对  $O_2^{\cdot-}$  活性强度依次为:飞燕草素>矮牵牛素>锦葵素 $\cong$ 矢车菊素>(+) -儿茶素>芍药素>花葵素;对  $ONOO^-$  的活性强度依次为:飞燕草素>矢车菊素 $\cong$ 矮牵牛素>锦葵素 $\cong$ (+) -儿茶素>芍药素>花葵素。这就证实 4'-OH 的甲基化明显减弱花青苷的抗氧化活性,混合物中各花青苷类成分对清除自由基具协同作用。

Viljanen 等<sup>[22]</sup>研究几种植物浆果的酚类化合物对乳清蛋白-脂质体系统的抗氧化作用,结果表明黑果越桔可剂量相关地提供最好的抗氧化活性。Ichiyangi 等<sup>[23]</sup>用毛细管区带电泳同时比较研究了黑果越桔 12 种主要花青苷对 NO 和  $ONOO^-$  的相对反应性。在无氧条件下,花青苷对 NO 和  $ONOO^-$  的反应性稍弱于对照用抗氧化剂 (+) -儿茶素,苷元结构或糖的类型对反应性有明显影响。Girelli 等<sup>[24]</sup>用固定化酪氨酸酶生物反应器(AMP-CPG)测定黑果越桔果汁、浸剂、果酱和药物中抗氧化能力指数及总酚量。该方法显示更好的专属性和快速等特点,基本不受有机酸、糖类等干扰性化合物的影响,并与广泛应用的 FC 和 TEAC 两法之间有良好的线性关系。Myhrstad 等<sup>[25]</sup>的研究表明,黑果越桔提取物经由亲电子应答元件(electrophile response element)介导的反式激活,诱导解毒和防御基因表达,提高细胞的抗氧化水平。

### 3.2 抗癌与细胞毒活性

体外实验显示,在 10 种可食用浆果的醇提取物中,黑果越桔抑制人白血病 HL60 细胞、人结肠癌 HCT116 细胞的活性最强,能诱导 HL60 细胞凋亡小体和核小体 DNA 断裂,但诱导 HCT116 细胞凋亡的比例远低于 HL60 且未见 DNA 断裂。在试验的提取物中,黑果越桔含有包括花青苷在内的酚类化合物最多,并显示最强的 DPPH 自由基清除活性。精制飞燕草素和锦葵素也能诱导 HL60 细胞凋亡。Katsube 等<sup>[26]</sup>研究表明,黑果越桔提取物、飞燕草素或锦葵素为苷元的花青苷,经由诱导细胞凋亡途径抑制 HL60 细胞的生长,仅精制的飞燕草素

及其苷能抑制 HCT116 细胞的生长。另有研究表明越桔提取物可通过诱导 HeLa 细胞凋亡而抑制其增殖<sup>[27]</sup>。

鉴于受体酪氨酸激酶(RTKs)在致肿瘤发生中起重要作用,Teller 等<sup>[28]</sup>检测了黑果越桔和葡萄 2 种富含花青苷的提取物对 RTKs(EGFR、ErbB2、ErbB3、VEGFR-2、VEGFR-3)的抑制能力。结果 2 种提取物质量浓度 $\leq 12.9 \mu\text{g/mL}$ 时,降低各个 RTK 重组体激酶的活性;质量浓度 $\leq 3.49 \mu\text{g/mL}$ 时,优先抑制 VEGFR-2 和 EGFR;质量浓度 $\geq 50 \mu\text{g/mL}$ 能完全消除 VEGFR-3 的磷酸化作用。2 个提取物能抑制 RTKs 配体诱导的人阴道癌或猪主动脉内皮细胞的自磷酸化作用,且优先抑制 ErbB3 和 VEGFR-3。这些结果表明,富含花青苷的黑果越桔和葡萄提取物能抑制 RTKs,并具低的特异性,在完整细胞试验中对 RTKs 的抑制功效排序为 VEGFR-3>VEGFR-2>ErbB3>EGFR>ErbB2,提示花青苷对 RTKs 的抑制可用作化学预防实验和临床干预研究中的生物标志。

Nguyen 等<sup>[29]</sup>研究黑果越桔提取物诱导人乳腺癌 MCF-7 细胞凋亡的能力和影响微管装配、组构的抗增殖作用。观察到黑果越桔提取物可质量浓度相关地抑制 MCF-7 细胞增殖,IC<sub>50</sub> 为 0.3~0.4 mg/mL,这与诱导凋亡细胞死亡相一致。在此质量浓度,未选择性抑制有丝分裂和其他细胞的细胞周期,对微管或肌动蛋白细胞骨架产生也无任何作用。但黑果越桔在 0.5~0.9 mg/mL 能增加 G<sub>2</sub>/M 期细胞,破坏细胞微管、点状微管蛋白聚合形成;而在 0.3~0.4 mg/mL 未见抑制微管聚合作用,但于较高质量浓度(0.5~1 mg/mL)可明显抑制(约 30%)微管聚合作用。

Lala 等<sup>[30]</sup>用结肠致癌剂氧化偶氮甲烷(azoxy-mathane)处理雄性大鼠,研究富含花青苷的黑果越桔提取物(ARE)对结肠癌多种生物标志的化学保护活性。生物标志包括结肠畸变隐窝灶(ACF)、结肠细胞增殖、尿氧化 DNA 损伤水平以及环氧合酶(COX)基因表达等。给大鼠 ig 基础饲料或补充 ARE 共 14 周。结果显示,与对照组比较,ARE 组大鼠 ACF、大 ACF 数均减少( $P<0.05$ ),结肠细胞增殖减少,COX-2 mRNA 基因表达降低;大鼠粪便中花青苷的量升高,粪便质量、含水量增加,胆酸明显减少,尿 8-羟基鸟苷水平无变化。表明 ARE 对结肠癌发生具保护作用 and 多重性作用机制。Cooke

等<sup>[31]</sup>研究黑果越桔花青苷混合物 mirtoselect 或矢车菊素-3-葡糖苷 (C3-G) 对 Apc (Min) 小鼠肠腺瘤形成 (人遗传性家族性腺瘤样息肉病模型) 的作用。结果显示, 与对照组比较, 给小鼠喂饲含 C3-G 或 mirtoselect 0.03%、0.1%、0.3%的饲料 12 周, 以剂量相关方式减少腺瘤负荷 (数), 高剂量 C3-G 和 mirtoselect 使腺瘤数分别减少 45% ( $P < 0.001$ )、30% ( $P < 0.05$ )。在血浆检测限内, 肠黏膜和尿可检测水平内均测得花青素。总花青苷 (以 C3-G 和 mirtoselect 计) 的水平在小鼠肠黏膜中分别为 43 ng/g、8.1  $\mu\text{g/g}$ , 在尿中分别为 7.2、12.3  $\mu\text{g/mL}$ , 表明黑果越桔花青苷有开发成人结肠直肠癌化学预防剂的潜力。

Thomasset 等<sup>[32]</sup>对富含花青苷的黑果越桔标准提取物 mirtocyan 进行了化学预防直肠癌的导向研究。25 例结肠直肠癌患者在行原发性肿瘤或肝转移切除术前, 每天口服 mirtocyan 1.4、2.8、5.6 g (含 0.5~2.0 g 花青苷), 共 7 d, 在血浆、结肠直肠组织和尿中检测到 mirtocyan 花青苷及甲基葡糖苷酸代谢物, 血和尿中花青苷水平与剂量相关, 服用高剂量提取物后在肿瘤组织中检测到花青苷 179 ng/g。免疫组化检测显示, mirtocyan 使全部患者肿瘤组织增殖较干预前下降 7%, 低剂量时可引起小而明显的循环胰岛素样生长因子 (IGF)-1 水平的减少。

广谱化疗剂 5-氟尿嘧啶 (5-Fu) 的毒性, 影响了其化疗效果和患者死亡率, 因此限制了其临床应用。Choi 等<sup>[33]</sup>研究商用富含花青苷的黑果越桔提取物 (AREB) 对 5-Fu 诱导的骨髓毒性的作用及体外对化疗的增敏作用。给 C57BL/6 小鼠单次量注射 5-Fu 200 mg/kg, 能诱发严重的外围红细胞、血小板、白细胞、脾脏和骨髓细胞减少; 与单用 5-Fu 处理组比较, ig AREB 500 mg/kg 共 10 d, 使外周血红细胞、嗜中性粒细胞和单核细胞数分别增加 1.2、9、6 倍, 也明显缓解 5-Fu 所致脾和骨髓细胞的减少。在体外实验中, 用 AREB 50、100  $\mu\text{g/mL}$  处理, 不干扰且能增加 5-Fu 的化疗效果。以上结果提示 AREB 对 5-Fu 诱导的骨髓毒性具潜在保护活性, 并增强 5-Fu 的疗效。

### 3.3 视力保护

Milbury 等<sup>[34]</sup>检测黑果越桔提取物能否调节培养的人视网膜色素上皮细胞-19 (ARPE-19) 中氧化应激防御酶血红素加氧酶 (HO)-1 和谷胱甘肽 S-

转移酶-pi (GST-pi) 的翻译或翻译后的水平。结果 ARPE-19 细胞与黑果越桔花青苷和非花青苷提取物孵育, 可减少由  $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导的胞内自由基的增加, 处理 4 h 后分别上调 HO-1 和 GST-pi 蛋白 2.8、2.5 倍, 分别上调 HO-1 和 GST-pi mRNA 5.5、7.1 倍, 且与剂量相关。黑果越桔花青苷和非花青苷提取物对 HO-1 和 GST-pi mRNA 的上调具相似作用。黑果越桔提取物上调 ARPE-19 细胞中 HO-1 和 GST-pi, 提示其通过抗氧化应答元件刺激信号转导途径而影响基因的调控。Song 等<sup>[35]</sup>研究不同浓度的黑果越桔提取物对培养的人角膜缘上皮细胞 (HCLEC) 的活力、细胞周期以及透明质酸和糖胺聚糖 (GAG) 表达的影响。结果表明, 黑果越桔提取物在相当于矢车菊素-3-*O*-葡糖苷  $1 \times 10^{-6} \sim 0.1$  mmol/L 无细胞毒活性, 浓度为 0.001、0.01、0.1 mmol/L 且与 HCLEC 孵育 48 h 后, 能增加细胞的活力, 经 0.1 mmol/L 处理后,  $\text{G}_0/\text{G}_1$  期细胞大量减少, S 和  $\text{G}_2/\text{M}$  期细胞显著增加。在用黑果越桔提取物  $1 \times 10^{-4}$ 、0.1 mmol/L 孵育 48 h 后, GAG 表达明显增加, 但未观察到透明质酸明显改变。结果提示黑果越桔提取物可有利于 HCLEC 的生理学更新和内环境的稳定。

Matsunaga 等<sup>[36]</sup>检测黑果越桔花青苷及其主要成分矢车菊素、飞燕草素、锦葵素在体外、体内对视网膜损害、视网膜神经节细胞 (RGC-5) 的保护作用。结果显示, 黑果越桔及 3 个花青素均对过氧亚硝酸供体 SIN-1 诱导的 RGC-5 细胞内自由基激活具明显抑制活性, 也能剂量相关地抑制小鼠前脑匀浆上清部分脂质过氧化。给小鼠玻璃体内注射黑果越桔提取物对由 *N*-甲基-*D*-天冬氨酸 (NMDA) 诱导的视网膜形态学损害和神经节细胞层 TUNEL 阳性细胞增加具显著抑制作用, 表明黑果越桔提取物及其花青素对视网膜疾病体内外模型显示神经保护作用。脂多糖 (LPS) 产生的内毒素可诱导葡萄膜炎 (EIU), Yao 等<sup>[37]</sup>向 BALB/C 小鼠足垫注射 LPS 100 mg 24 h 后, 全眼匀浆中 NO 水平显著升高。若在注射 LPS 前给小鼠 ig 50、100、200 mg/kg 黑果越桔提取物 (含 42.04%花青苷) 5 d, 可显著降低 NO、丙二醛 (MDA) 水平, 增加氧自由基吸收容量 (ORAC)、GSH 和维生素 C 水平, 增强总 SOD 和谷胱甘肽过氧化物酶 (GPx) 活性, 增加铜-锌 SOD (Cu-Zn SOD)、锰 SOD (Mn SOD)、GPx mRNA 表达。总之, 黑果越桔提取物对 EIU 起

保护作用且与剂量相关,证实黑果越桔对眼保健起有益作用。

### 3.4 抗炎

在 RAW264 细胞中,通过微点阵表达黑果越桔的靶基因图谱,进一步鉴定了靶基因分属于“防御、炎症应答、细胞因子激活和受体激活”等功能,其中一些已被 RT-PCR 研究证实。DNA 微点阵图谱为黑果越桔的抗炎作用提供了分子学基础<sup>[38]</sup>。

Karlsen 等<sup>[39]</sup>研究黑果越桔果汁对至少升高一个心血管疾病危险因素者的血清或血浆中炎症和抗氧化状态生物标记物的作用。在随机、对照试验中,31 名参试者服用黑果越桔果汁或水,共服用 4 周。结果食用黑果越桔汁者血浆中由 INF- $\gamma$  诱导的 C-反应蛋白(CRP)、白介素(IL)-6、IL-15 和单核因子水平明显降低,令人意外的是肿瘤核因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )水平升高,CRP、IL-6、IL-15、TNF- $\alpha$  均系转录因子 NF- $\kappa$ B 的靶基因,是炎症应答的决定性因素。黑果越桔果汁组参试者血浆中槲皮素和对香豆酸增加,而临床参数、氧化应激或抗氧化剂状态无明显差别。在黑果越桔多酚类化合物对 LPS 诱导的单核细胞系 NF- $\kappa$ B 激活的作用实验中,观察到槲皮素、表儿茶素和白藜芦醇均抑制 NF- $\kappa$ B 的激活。上述结果提示黑果越桔多酚类化合物可调节炎症病程,为预防和治疗炎症疾患提供了依据。

### 3.5 保护角质形成细胞

紫外线是诱导皮肤病和皮肤癌的环境因子。紫外线 A(UVA)辐射能击伤皮肤细胞,产生活性氧物质(ROS)并诱发许多不良的生物学效应。Svobodova 等<sup>[40]</sup>用角质形成细胞 HaCaT 评价黑果越桔提取物(花青苷质量分数 25%)对 UVA 潜在的预防作用。HaCaT 细胞用黑果越桔提取物预处理 1 h 或 4 h,能减轻 UVA 所致的损害,明显降低 UVA 刺激的 ROS 形成,也能预防或减少 UVA 所致细胞膜脂质过氧化和细胞内 GSH 损耗。UVB 辐射能引起氧化应激性炎症和 DNA 的损害,研究黑果越桔酚类提取部位 5~50 mg/L 对 UVB 诱导的 HaCaT 细胞损害模型的保护作用。结果显示,该提取部位(尤其在 10、25 mg/L)有效降低由 UVB(100、200 mJ/cm<sup>2</sup>)所致 DNA 断裂程度,减弱 caspase-3 和-9 激活、DNA 梯度,明显减少活性氧和氮物质(RONS)发生,部分减少 IL-6 表达,提示黑果越桔酚类提取部位能抑制 UVB 所致 HaCaT 细胞损害<sup>[41]</sup>。

### 3.6 抑制血管紧张素转化酶活性

Persson 等<sup>[42]</sup>研究黑果越桔对人内皮细胞血管紧张素转化酶(ACE)的抑制作用,以阐明其对循环系统的药理学应答。将人脐静脉内皮细胞(HEC)分别与黑果越桔提取物、没提林氯化物(myrtillin chloride,一种越桔果实或叶浸提物)以及分离的矢车菊素、飞燕草素、锦葵素共同孵育,结果在 10 min 后,黑果越桔提取物产生明显的、剂量相关的 ACE 活性的抑制作用,没提林氯化物也有明显的抑制作用,而 3 个单体花青素无抑制作用,表明黑果越桔对 ACE 的抑制作用似取决于特异性花青苷混合物。黑果越桔可能对心血管疾病具潜在的预防和保护功效。

### 3.7 神经保护

神经递质多巴胺(DA)及其神经毒代谢物 6-羟基多巴胺均可被氧化生成过氧化氢和其他 ROS。ROS 促进氧化应激与多巴胺能神经退行性病变,即帕金森病密切相关。在神经细胞中,氧化应激可增加异常的细胞色素 C 释放和线粒体蛋白进入胞浆中,引起程序性细胞凋亡,也能发生亚-致凋亡阀开启,并在 DA 代谢物存在的情况下发生更严重的损害。线粒体膜完整性的丢失,加速细胞色素 C 的释放,其释放的水平表示线粒体机能障碍的程度。利用细胞色素 C 升高的 6-羟基多巴胺测定膳食抗氧化剂的活性,结果黑果越桔、富含花青苷的同属植物制剂及精制花青苷中,黑果越桔制剂抗氧化活性最强,总花青苷的 IC<sub>50</sub> 为 7  $\mu$ mol/L,此活性较其他制剂或精制花青苷高 1.5~4 倍。而维生素 C 的浓度即使高 4 倍也无明显的抗氧化作用。黑果越桔制剂的抗氧化活性强度与花青苷的量和总矢车菊素有关,而与槲皮素或杨梅树皮素无关<sup>[43]</sup>。

### 3.8 抗菌

Burdulis 等<sup>[44]</sup>的研究表明,黑果越桔提取物对 8 个革兰阴性菌和革兰阳性菌株显示抗菌活性,其中最敏感的菌株是弗氏柠檬酸杆菌 *Citrobacter freundii* ATCC8090 和粪肠球菌 *Enterococcus faecalis* ATCC29212。Puupponen-Pimia 等<sup>[45]</sup>研究 9 个细胞壁降解酶对黑果越桔抗菌和抗氧化活性的影响,以人病原体肠鼠沙门氏菌 *Salmonella enterica* sv. Typhimurium 和金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 作试验菌株。结果经降解酶处理可从细胞壁基质中释放酚类化合物,明显地增加黑果越桔浆果汁液、压榨饼和浆果泥的抗微生物活性,抗沙门氏

菌的作用较强于抗葡萄球菌。用果胶酶制剂 Pectinex Ultra SP-L、Pectinex 3XL、Pectinex BE XXL 处理黑果越桔浆果泥对沙门氏菌最有效，而用 Pectinex Smash、Pectinex BE3-L、Bio-pectinase CCM 处理对葡萄球菌显示最强的抗菌活性。酶处理使黑果越桔抗氧化活性平均增加 30%，以 Pectinex Smash XXL 酶处理的黑果越桔浆果花青苷的量增加最多，抗氧化活性增强最高。

### 3.9 药物动力学

研究显示胃是花青苷吸收位点。Talavera 等<sup>[46]</sup>研究大鼠空肠、回肠原位 *ig* 花青苷的吸收情况。用精制花青苷 (9.2 nmol/min)、黑莓 (9.0 nmol/min) 或黑果越桔 (45.2 nmol/min) 花青苷生理缓冲液 *ig* 45 min，花青苷经小肠的吸收率因化学结构的不同而不同，锦葵素-3-葡糖苷的吸收率为 10.7%，矢车菊素-3-葡糖苷的为 22.4%。在尿、主动脉和肠系膜静脉血中检测到原型矢车菊素-3-葡糖苷、甲基化或葡糖苷酸化衍生物。胆汁分析显示，矢车菊苷及其甲基化物芍药素-3-葡糖苷和芍药素葡糖苷酸在胆汁中迅速出现，表明花青苷在小肠迅速和有效吸收，进而以原型、甲基化或葡糖苷酸化代谢物由胆汁和尿排泄。He 等<sup>[47]</sup>给大鼠喂饲黑果越桔（每千克相当于 3.85 g 矢车菊素-3-半乳糖苷）14 周，以 HPLC 检测到大鼠血样中低于 2  $\mu\text{mol/L}$  的花青苷和相对较高的、可预测的代谢物水平；尿中黑果越桔原型花青苷和甲基化衍生物的总浓度在 17.4 nmol/L。花青苷糖基化的类型和数量明显影响大鼠对花青苷的吸收，在血浆和尿中酰基化花青苷的检出提示这些花青苷衍生物的生物利用度。

Ichiyanagi 等<sup>[48]</sup>研究黑果越桔提取物 Bilberon 25 中 15 种花青苷在大鼠体内的分布和生物利用率。给大鼠 *ig* 提取物 400 mg/kg（相当于 153.2 mg/kg 花青苷）后 15 min，血中花青苷峰值为 1.2  $\mu\text{mol/L}$ ，各花青苷衰变几乎相同，苷元相同的花青苷血浆水平为半乳糖苷 > 葡糖苷 > 阿糖苷。给大鼠 *iv* 提取物后，血浆中阿糖苷比葡糖苷、半乳糖苷更迅速廓清，糖部分相同的花青苷，血中半廓清时间为飞燕草素 > 矢车菊素 > 矮牵牛素 = 芍药素 > 锦葵素；花青苷的生物利率为 0.61%~1.82%，以矢车菊素和飞燕草素的半乳糖苷最高，矮牵牛素和锦葵素的阿糖苷和半乳糖苷比葡糖苷为高，*iv* 后 4 h 尿和胆汁中花青苷的回收率分别为 30.8%、13.4%，大部分花青苷以 *O*-甲基衍生物分布于肝和肾脏中。Sakakibara

等<sup>[49]</sup>研究花青苷在小鼠体内的分布。给小鼠 *ig* 黑果越桔提取物 100 mg/kg 后，血中出现原型和甲基化花青苷，总花青苷的峰值为 1.18  $\mu\text{mol/L}$ ，于 0~6 h 尿排泄量最高，至 24 h 停止。持续 2 周给小鼠喂饲含 0.5% 黑果越桔提取物的饲料，血中花青苷水平达 0.26 nmol/L，花青苷仅在肝、肾、睾丸和肺中检出，最高水平分别为 605、207、149、116 pmol/g。在血和器官中均以锦葵素-3-葡糖苷和锦葵素-3-半乳糖苷占优势。

Nurmi 等<sup>[50]</sup>对黑果越桔花青苷在人体代谢的研究表明，在服用黑果越桔制剂 48 h 后，尿中检测到的 18 个酚酸增加了 241  $\mu\text{mol}$ ，其中大量的代谢物是高香草酸 (homovanillic acid) 和香草酸，未测得飞燕草苷分裂产物没食子酸，仅有极少量的锦葵苷代谢物丁香酸。

### 3.10 减少血管生成

Matsunaga 等<sup>[51]</sup>研究黑果越桔提取物对血管生成的作用。黑果越桔提取物 0.3~30  $\mu\text{g/mL}$  和基质金属蛋白酶抑制剂 GM6001 0.1~100  $\mu\text{mol/L}$ ，浓度相关地抑制由血管内皮生长因子-A (VEGF-A) 诱导的 HUVECs 的迁移和管状形成。此外，黑果越桔抑制 VEGF-A 诱导的 HUVECs 的增殖，抑制 VEGF-A 诱导的胞外信号调节激酶 1/2 (ERK1/2) 和丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族蛋白激酶 B (AKT) 的磷酸化作用，而对磷脂酶 Cr (PLCr) 无活性。给小鼠玻璃体内注射提取物能抑制氧诱导视网膜病过程中新血管丛的形成。黑果越桔在体外、体内均能抑制血管生成，可能是由于抑制 ERK1/2 和 AKT 的磷酸化作用所致，这表明黑果越桔提取物对血管生成等视网膜疾病是有效的。

Matsunaga 等<sup>[52]</sup>的研究发现：黑果越桔提取物与 HUVECs 和成纤维细胞共同培养，黑果越桔中主要花青苷飞燕草素、矢车菊素、锦葵素在 3~10  $\mu\text{mol/L}$  以浓度相关方式抑制 VEGF-A 诱导的血管形成，各花青素在 0.3~10  $\mu\text{mol/L}$  时浓度相关地清除 DPPH 自由基，表明黑果越桔对血管形成的抑制作用可能依赖于各花青素的抗氧化作用。Ozgurtas 等<sup>[53]</sup>鉴于血管生成是由已存在血管发生新血管的过程并是许多病理状态所必须的，研究黑果越桔体内对鸡尿囊膜血管形成模型的影响。与对照组比较，黑果越桔给药组明显减少血管的生成并与剂量相关。这一结果可能用于人血管形成依赖性疾病的治疗。

### 3.11 保护肝肾

Bao 等<sup>[54]</sup>的实验显示:小鼠经 18 h 限制性应激可诱导严重的肝损伤,血浆谷丙转氨酶 (ALT) 水平从 18.08 U/L 升至 107.68 U/L,同时观察到限制应激小鼠较饥饿小鼠的血浆和肝中 MDA 升高和氧自由基吸收容量 (ORAC) 值降低。给小鼠 ig 黑果越桔提取物 (含 42.04%花青苷) 50、100、200 mg/(kg·d) 共 5 d, 200 mg/kg 组血浆 ALT 水平明显降至 17.23 U/L, 并减轻应激诱导的肝损伤, 增加肝组织中 GSH、维生素 C 水平, 明显降低 MDA 和 NO 水平。提示黑果越桔提取物由清除自由基、抑制脂质过氧化作用对限制应激诱导的肝损伤起重要的保护作用。

溴酸钾是一种用作食品添加剂的氧化剂, 是能引起肾损害的强肾毒剂, 其作用机制可能与产生氧自由基有关。给小鼠单剂量 ip 溴酸钾 200 mg/kg, 可诱发严重的肾损伤, 血清中血尿酸 (BUN) 和肌酐水平升高。给小鼠 ig 50、100、200 mg/kg 黑果越桔提取物, 连续 5 d, 血清 BUN 和肌酐可恢复至正常水平, 同时降低肾 MDA、NO 和黄嘌呤氧化酶 (XOD) 的水平, 改善肾组织中 ORAC。黑果越桔以清除自由基和抑制脂质过氧化的作用, 对溴酸钾诱导的化学性肾损伤起保护作用<sup>[55]</sup>。

### 3.12 预防动脉粥样硬化

研究发现摄食浆果类食品能减少患心血管疾病的危险。Mauray 等<sup>[56]</sup>检测黑果越桔未经处理的富含花青苷的提取物 (BE) 和经酵母发酵的提取物 (FBE), 对载脂蛋白 E-缺陷型小鼠 (apolipoprotein E-deficient mice) 的抗动脉粥样硬化发展的作用。给小鼠喂饲含 0.02% BE 或 FBE 的饲料共 16 周, 于主动脉窦测量动脉粥样硬化斑块区。结果表明, 给小鼠 ig 2 个提取物均能明显抑制斑块的发展, 但不影响氧化应激参数或脂质图谱, 提示抗动脉粥样硬化涉及其他的作用机制。FBE 的作用更好, 证明发酵使其产生了新的生物活性化合物, 对减轻动脉粥样硬化的发展更为有效。

### 3.13 防治糖尿病

Takahawa 等<sup>[57]</sup>研究黑果越桔提取物对 II 型糖尿病小鼠高血糖和胰岛素敏感性的影响, 发现黑果越桔提取物明显降低血糖, 增强胰岛素敏感性, 使 AMP-活化蛋白激酶 (AMPK) 在糖尿病小鼠的白色脂肪组织 (WAT)、骨骼肌和肝脏中被激活, 并伴随 WAT 和骨骼肌葡萄糖转运体 4 上调、肝脏中葡萄糖

产生和脂质的量被抑制, 同时肝脏乙酰-CoA 羧化酶灭活, PPAR $\alpha$ 、乙酰-CoA 氧化酶、肉碱棕榈酰转移酶-1A 上调。这些变化表明改善了 II 型糖尿病小鼠的高血糖和胰岛素敏感性状况。表明该提取物经由 AMPK 的激活而改善血糖和胰岛素敏感性, 为利用黑果越桔防治糖尿病提供了生物化学基础。

### 3.14 其他

Drozd 等<sup>[58]</sup>研究显示, 黑果越桔果实提取物与抗生素头孢呋辛、头孢哌酮和多西环素合并给药, 对用氢化可的松培养的小鼠胸腺细胞的存活率 (细胞毒试验) 具有正向作用, 使脾细胞数增加形成自然的玫瑰花结 (E-花结试验), 增加小鼠血清凝集滴度 (自动血凝试验)。在细胞毒实验中, 提取物与多西环素合用, 细胞可获得最佳保护; 在 E-花结试验中, 提取物与头孢菌素 (头孢呋辛、头孢哌酮) 合用, 培养物中脾细胞数的增加有结合羊红细胞的能力。在自动血凝试验中, 提取物与多西环素、头孢呋辛合并处理的小鼠血清有最高的凝集滴度。

慢性疲劳综合征 (CFS) 是一种以持久和复发疲劳为特征的疾病, 常伴有机体不同系统的许多症状。尽管 CFS 的病因学仍未阐明, 但多项研究表明氧化应激是致病原因之一, 因此提示可用抗氧化剂治疗 CFS。膳食补充黑果越桔制剂、寡聚原花青苷等均可有效减轻 CFS 症状<sup>[59]</sup>。

## 4 小结

黑果越桔主要成分和有效成分系含量丰富的花青素及其苷类<sup>[60]</sup>。黑果越桔是这些成分重要的资源植物。该植物提取物和分离到的花青苷, 体外具有抗氧化、细胞毒、保护视网膜细胞、抑制血管紧张素转化酶、神经细胞抗氧化应激等生物活性, 体内具有防治结肠直肠癌、抑制血管发生、保护视力、解除化疗骨髓毒性、保护肝肾、防治动脉粥样硬化、提高免疫应答、缓解慢性疲劳综合征等药理作用。因此, 黑果越桔提取物在世界范围内应用广泛, 并且成为畅销的植物药; 2008、2009 年一直入选美国主流市场销售额领先的 20 种草药补充剂, 排行榜上的排名分别占第 17、15 位, 销售额分别为 1 841 200、1 983 723 美元<sup>[61]</sup>。了解和深入挖掘黑果越桔的广泛的生物活性和药理作用将为进一步开发黑果越桔的医药与保健产品打下良好的基础。

### 参考文献

- [1] Zhang Z, Kuo X, Fugal K, *et al.* Comparison of HPLC methods

- for determination of anthocyanins and anthocyanidins in bilberry extracts [J]. *J Agric Food Chem*, 2004, 52 (4): 688-691.
- [2] Ichyanagi T, Hatano Y, Matsugo S, *et al.* Structural dependence of HPLC separation pattern of anthocyanins from bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) [J]. *Chem Pharm Bull*, 2004, 52 (5): 628-630.
- [3] Ichyanagi T, Kashiwada Y, Ikeshiro Y, *et al.* Complete assignment of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) anthocyanins separated by capillary zone electrophoresis [J]. *Chem Pharm Bull*, 2004, 52 (2): 226-229.
- [4] Du Q, Jerz G, Womterhalter P. Isolation of two anthocyanin sambubiosides from bilberry (*Vaccinium myrtillus*) by high-speed counter-current chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2004, 1045 (1/2): 59-63.
- [5] Cassinese C, De Combarieu E, Falzoni M, *et al.* New liquid chromatography method with ultraviolet detection for analysis of anthocyanins and anthocyanidins in *Vaccinium myrtillus* fruit dry extracts and commercial preparations [J]. *J AOAC Int*, 2007, 90 (4): 911-919.
- [6] Burdulis D, Ivanauskas L, Dirse V, *et al.* Study of diversity of anthocyanin composition in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) fruits [J]. *Medicina (Kaunas)*, 2007, 43 (12): 971-977.
- [7] Savikin K, Zdunic G, Jankovic T, *et al.* Phenolic content and radical scavenging capacity of berries and related jams from certificated area in Serbia [J]. *Plant Foods Hum Nutr*, 2009, 64 (3): 212-217.
- [8] Latti A K, Riihinen K R, Kainulainen P S. Analysis of anthocyanin variation in wild populations of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) in Finland [J]. *J Agric Food Chem*, 2008, 56 (1): 190-196.
- [9] Akerstrom A, Forsum A, Rumpunen K, *et al.* Effects of sampling time and nitrogen fertilization on anthocyanidin levels in *Vaccinium myrtillus* fruits [J]. *J Agric Food Chem*, 2009, 57 (8): 3340-3345.
- [10] Burdulis D, Ivanauskas L, Jakstas V, *et al.* Analysis of anthocyanin content in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) fruit crude drugs by high performance liquid chromatography method [J]. *Medicina (Kaunas)*, 2007, 43 (7): 568-574.
- [11] Yue X, Xu Z. Changes of anthocyanins, anthocyanidins, and antioxidant activity in bilberry extract during dry heating [J]. *J Food Sci*, 2008, 73 (6): C 494-499.
- [12] Lyons M M, Yu C, Toma R B, *et al.* Resveratrol in raw and baked blueberries and bilberries [J]. *J Agric Food Chem*, 2003, 51 (20): 5867-5870.
- [13] Rimando A M, Kalt W, Magee J B, *et al.* Resveratrol, pterostilbene, and piceatannol in *Vaccinium* berries [J]. *J Agric Food Chem*, 2004, 52 (15): 4713-4719.
- [14] Hilz H, De Jong L E, Kabel M A, *et al.* Bilberry xyloglucan-novel building blocks containing beta-xylose within a complex structure [J]. *Carbohydr Res*, 2007, 342 (2): 170-181.
- [15] Jensen H D, Krogfelt K A, Comett C, *et al.* Hydrophilic carboxylic acids and iridoid glycosides in the juice of American and European cranberries (*Vaccinium macrocarpon* and *V. oxycoccus*), lingonberries (*V. vitis-idaea*), and blueberries (*V. myrtillus*) [J]. *J Agric Food Chem*, 2002, 50 (23): 6871-6874.
- [16] Hokkanen J, Mattila S, Jaakola L, *et al.* Identification of phenolic compounds from lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.), bilberry (*V. myrtillus* L.), and hybrid bilberry (*Vaccinium × intermedium* Ruthe L.) leaves [J]. *J Agric Food Chem*, 2009, 57 (20): 9437-9447.
- [17] Jaakola L, Pirttila A M, Halonen M, *et al.* Isolation of high quality RNA from bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) fruit [J]. *Mol Biotechnol*, 2001, 19 (2): 201-203.
- [18] Jaakola L, Maatta L, Pirttila A M, *et al.* Expression of genes involved in anthocyanin biosynthesis in relation to anthocyanin, proanthocyanidin, and flavonol levels during bilberry fruit development [J]. *Plant Physiol*, 2002, 130 (2): 729-739.
- [19] Jaakola L, Maatta-Riihinen K, Karenlampi S, *et al.* Activation of flavonoid biosynthesis by solar radiation in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) leaves [J]. *Planta*, 2004, 218 (5): 721-728.
- [20] Faria A, Oliveira J, Neves P, *et al.* Antioxidant properties of prepared blueberry (*Vaccinium myrtillus*) extracts [J]. *J Agric Food Chem*, 2005, 53 (17): 6896-6902.
- [21] Rahman M M, Ichyanagi T, Komiyama T, *et al.* Superoxide radical- and peroxynitrite-scavenging activity of anthocyanins, structure-activity relationship and their synergism [J]. *Free Radic Res*, 2006, 40 (9): 993-1002.
- [22] Viljanen K, Kylli P, Kivikari R, *et al.* Inhibition of protein and lipid oxidation in liposomes by berry phenolics [J]. *J Agric Food Chem*, 2004, 52 (24): 7419-7424.
- [23] Ichyanagi T, Hatano Y, Matsuo S, *et al.* Simultaneous comparison of relative reactivities of twelve major anthocyanins in bilberry towards reactive nitrogen species [J]. *Chem Pharm Bull*, 2004, 52 (11): 1312-1315.

- [24] Girelli A M, Giuliani T, Mattei E, *et al.* Determination of an antioxidant capacity index by immobilized tyrosinase bioreactor [J]. *J Agric Food Chem*, 2009, 57 (12): 5178-5186.
- [25] Myhrstad M C, Carlsen H, Daho L I, *et al.* Bilberry extracts induce gene expression through the electrophile response element [J]. *Nutr Cancer*, 2006, 54 (1): 94-101.
- [26] Katsube N, Iwashita K, Tsushide T, *et al.* Induction of apoptosis in cancer cells by bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and the anthocyanins [J]. *J Agric Food Chem*, 2003, 51 (1): 68-75.
- [27] 唐丽萍, 杨艳梅, 李艳凤, 等. 越橘提取物抑制宫颈瘤 HeLa 细胞增殖及诱导其凋亡的实验研究[J]. *中草药*, 2009, 40 (7): 1120-1122.
- [28] Teller N, Thiele W, Marcgylo T H, *et al.* Suppression of the kinase activity of receptor tyrosine kinases by anthocyanin-rich mixtures extracted from bilberries and grapes [J]. *J Agric Food Chem*, 2009, 57 (8): 3094-3101.
- [29] Nguyen V, Tang J, Oroudjev E, *et al.* Cytotoxic effects of bilberry extract on MCF 7-GFP-tubulin breast cancer cells [J]. *J Med Food*, 2010, 13 (2): 278-285.
- [30] Lala G, Malik M, Zhao C, *et al.* Anthocyanin-rich- extracts inhibit multiple biomarkers of colon cancer in rats [J]. *Nutr Cancer*, 2006, 54 (1): 84-93.
- [31] Cooke D, Schwarz M, Boocock D, *et al.* Effect of cyanidin-3-glucoside and anthocyanin mixture from bilberry on adenoma development in the ApcMin mouse model of intestinal carcinogenesis-relationship with tissue anthocyanin levels [J]. *Int J Cancer*, 2006, 119 (9): 2213-2220.
- [32] Thomasset S, Berry D P, Cai H, *et al.* Pilot study of oral anthocyanins for colorectal cancer chemoprevention [J]. *Cancer Prev Res (Phila Pa)*, 2009, 2 (7): 625-633.
- [33] Choi E H, Ok H E, Yoon Y, *et al.* Protective effect of anthocyanin-rich-extract from bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) against myelotoxicity by 5-fluorouracil [J]. *Biofactors*, 2007, 29 (1): 55-65.
- [34] Milbury P E, Graf B, Curran-Celentano J M, *et al.* Bilberry (*Vaccinium myrtillus*) anthocyanins modulate heme oxygenase-1 and glutathione S-transferase-pi expression in ARPE-19 cells [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2007, 48 (5): 2343-2349.
- [35] Song J, Li Y, Ge Y T, *et al.* Protective effect of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) extracts on cultured human corneal limbal epithelial cell (HCLEC) [J]. *Phytother Res*, 2010, 24 (4): 520-524.
- [36] Matsunaga N, Imai S, Inokuchi Y, *et al.* Bilberry and its main constituents have neuro-protective effects against retinal neuronal damage *in vitro* and *in vivo* [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2009, 53 (7): 869-877.
- [37] Yao N, Lan F, He R R, *et al.* Protective effects of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) extract against endotoxin-induced uveitis in mice [J]. *J Agric Food Chem*, 2010, 58 (8): 4731-4736.
- [38] Chen J, Uto T, Tanigawa S, *et al.* Expression profiling of genes targeted by bilberry (*Vaccinium myrtillus*) in macrophages through DNA microarray [J]. *Nutr Cancer*, 2008, (Suppl 1): 43-50.
- [39] Karlsen A, Paur I, Sakhi A K, *et al.* Bilberry juice modulates plasma concentration of NF-kappa B related inflammatory markers in subjects at increased risk of CVD [J]. *Eur J Nutr*, 2010, 49 (6): 345-355.
- [40] Svobodova A, Rambouskova L, Walterova D, *et al.* Bilberry extract reduce UVA-induced oxidative stress in HaCaT keratinocytes: a pilot study [J]. *Biofactors*, 2008, 33 (4): 249-266.
- [41] Svobodova A, Zdanilova A, Vostalova J. Lonicera caerulea and *Vaccinium myrtillus* fruit polyphenols protect HaCaT keratinocytes against UVB-induced phototoxic stress and DNA damage [J]. *J Dermatol Sci*, 2009, 56 (3): 196-204.
- [42] Persson I A, Persson K, Andersson R G. Effect of *Vaccinium myrtillus* and its polyphenols on angiotensin-converting enzyme activity in human endothelial cells [J]. *J Agric Food Chem*, 2009, 57 (11): 4626-4629.
- [43] Yao Y, Vieira A. Protective activities of *Vaccinium* antioxidants with potential relevance to mitochondrial dysfunction and neurotoxicity [J]. *Neurotoxicology*, 2007, 28 (1): 93-100.
- [44] Burdulis D, Sarkinas A, Jasutiene I, *et al.* Comparative study of anthocyanin composition, antimicrobial and antioxidant activity in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) and blueberry (*V. corymbosum* L.) fruit [J]. *Acta Pol Pharm*, 2009, 66 (4): 399-480.
- [45] Puupponen-pimia R, Nohynek L, Ammann S, *et al.* Enzyme-assisted processing increases antimicrobial and antioxidant activity of bilberry [J]. *J Agric Food Chem*, 2008, 56 (3): 681-688.
- [46] Talavera S, Felgines C, Texier O, *et al.* Anthocyanins are efficiently absorbed from the small intestine in rats [J]. *J Nutr*, 2004, 134 (9): 2275-2279.

(下转第429页)