

以秀丽隐杆线虫为模式生物的蓝莓果酒 抗氧化及抗衰研究

Study on antioxidant and anti-aging analysis of blueberry wine in *C.elegans*

魏 焘 曾 敏 李 珂 王远亮

WEI Tao ZENG Min LI Ke WANG Yuan-liang

(湖南农业大学食品科技学院, 湖南 长沙 410128)

(College of Food Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China)

摘要:为探讨不同组分的蓝莓果酒对秀丽隐杆线虫抗氧化性能与抗细胞凋亡的影响,从而确定蓝莓果酒中主要物质的浓度及食用功能特性。以秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)为模式生物, a 组在蓝莓果酒的酒精度(体积分数)为 14% 的基础上, 通过改变其原花青素(proanthocyanidin, PC)含量设置 6 个喂食组, b 组在蓝莓果酒的原花青素含量为 3 mg/mL 的基础上, 通过改变其酒精度设置 7 个喂食组, 对照组线虫以大肠杆菌 OP50 喂养, 检测各组线虫的抗氧化酶活力以及细胞凋亡情况。结果表明: 蓝莓酒中的原花青素是延缓衰老的有效成分, 低浓度酒精(<10%) 也能延缓衰老, 但是当酒精度(体积分数) 高于 10% 时, 则具有反作用, 原花青素浓度为 3 mg/mL、酒精度(体积分数) 为 10% 的蓝莓果酒对线虫的抗衰老作用最佳。

关键词:秀丽隐杆线虫; 蓝莓; 果酒; 原花青素; 酒精; 抗衰; 生化作用

Abstract: In order to determine the concentration of essential substances and functional properties of blueberry wine, antioxidant activity and anti-apoptosis of blueberry wine were analyzed with *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) by feeding different kinds of blueberry wines. Based on blueberry wine, six feeding groups with different proanthocyanidin (PC) concentration and 14% alcohol were set. In same way, another seven feeding groups with different alcohol concentration and 3 mg/mL PC were also set. And the control group *C. elegans* only fed with *E. coli* OP50. All results were defined by testing the activity of antioxidant enzyme and apoptosis in *C. elegans*. It showed that PC is an anti-aging factor; the aging of *C. elegans* can be delayed at low alcohol concentration (< 10%). However, it can accelerate aging when the alcohol concentration was more

than 10%. The results showed that blueberry wine with PC concentration of 3 mg/mL and alcohol 10% had an optimal anti-aging effect on *C. elegans*.

Keywords: *Caenorhabditis elegans*; blueberry; fruit wine; proanthocyanidin; alcohol; anti-aging; biochemical effect

蓝莓为杜鹃花科越橘属灌木植物, 其具有独特的风味和保护视力、抗氧化、防癌、抗病毒等保健功能^[1], 被誉为“世界水果之王”。蓝莓果酒是以蓝莓为原料, 经特殊发酵工艺酿制成的低浓度酒精饮料。蓝莓果酒因具有低酒度、高营养、益脑健身等优点和独特保健功效而受到越来越多的重视^[2]。目前国内外关于蓝莓的抗氧化性已有相关研究, 如赵慧芳等^[3]研究发现不同溶剂提取物对 DPPH、ABTS 自由基具有良好的清除能力, 且蓝莓提取物和萃取物的抗氧化能力与多酚含量有显著的相关性; Vanessa 等^[4]研究了 3 种蓝莓在两种栽培方式下的抗氧化能力, 发现户外栽培蓝莓的抗氧化能力高于大棚栽培蓝莓, 蓝莓中的酚类物质总量和抗氧化能力不会因栽培过程中缺少灌溉而下降。而关于蓝莓果酒的研究大多是对其发酵工艺的优化和成分分析, 如杨曙方等^[5]发现以冷冻蓝莓为原料, 在一定条件下发酵 7 d, 可获得酒精度(体积分数) 为 12% 左右, 糖度为 6 °Bx 左右的主发酵后的果酒; 刘子菱等^[6]在蓝莓果酒中添加蜂蜜和白糖, 确定了蜂蜜更有利于蓝莓果酒的酿造; Seung-Ho Seo 等^[7]发现添加 2% 的香蕉可作为酵母的营养供给, 解决蓝莓酒发酵迟缓的问题。目前很少有关于整体评价蓝莓果酒抗氧化性的研究, 且未见利用生物模型研究蓝莓果酒抗氧化和抗衰老功能的相关报道。

本研究拟选取国际上公认的在延缓衰老研究领域中具有优势的主要模式生物秀丽隐杆线虫(下文简称线虫)建立生物模型, 以线虫的生化试验指标对蓝莓果酒的抗氧化能力和延缓衰老能力进行整体性评价, 旨在为更科学地评价蓝莓果酒的食用功能特性, 并确定蓝莓果酒中主要物质的浓度。

作者简介:魏焘, 男, 湖南农业大学在读本科生。

通讯作者:王远亮(1977—), 男, 湖南农业大学教授, 博士。

E-mail: 408083310@qq.com

收稿日期:2015-12-25

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

蓝莓果酒:酒精度(体积分数)14%,总糖 115.71 g/L,挥发酸 0.64 g/L,原花青素 3 360.63 $\mu\text{g/mL}$,实验室酿造;

野生型秀丽隐杆线虫(*C. elegans* the Bristol strain N2)、大肠杆菌 OP50 (*Escherichia coli* OP50):东南大学公共卫生学院;

原花青素标准品(PC 标准品):纯度 $\geq 95\%$,成都曼斯特生物科技有限公司;

食用乙醇:食品级,天津市大茂化学试剂厂;
吖啶橙溶液(AO):分析纯,美国 Sigma 公司;

谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)测试盒:南京建成生物工程研究所;

超氧化物歧化酶(SOD):南京建成生物工程研究所;
过氧化氢酶(CAT)测试盒:南京建成生物工程研究所。

1.1.2 主要仪器设备

电热恒温培养箱: MJX-250B-Z 型,上海博迅实验有限公司;

连续变倍体式显微镜: Motic SMZ-168 型,麦克奥迪实业集团有限公司;

单人单面超净工作台: SW-CJ-1FD 型,苏州净化仪器厂;
超声波细胞粉碎机: BL92-IIDL 型,无锡沃信仪器有限公司;

紫外分光光度计: WFJ 7200 型,尤尼柯(上海)仪器有限公司;

荧光倒置显微镜: Ti-E/U/S 型,日本尼康公司。

1.2 方法

1.2.1 线虫培养 给线虫饲喂 *E. coli* OP50,20 $^{\circ}\text{C}$ 培养^[8],饲喂方法:在 90 mm 的平皿上滴加菌液 100 μL ,用无菌涂布棒将菌液均匀地从中间往外涂抹在 NGM 培养基表面,注意涂抹面积不可过大,一般在离平皿边缘 0.5~1.0 cm,涂布好大肠杆菌 OP50 的 NGM 平板放在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中过夜培养,至培养基上长出白色的菌膜后即可用于培养线虫。

1.2.2 线虫同期化 参照文献^[9]。在无菌条件下,挑取 10~20 条正处于产卵期的线虫雌雄同体成虫放在涂有大肠杆菌 OP50 的新的 NGM 培养基平板上产卵,一般一条产卵期线虫 1 h 可以大约产 8 个卵,2 h 后将全部的线虫挑走。将新板置于 20 $^{\circ}\text{C}$ 无菌生化培养箱中培养 3 d,便得到同期化的线虫约 300~400 条。

1.2.3 线虫体内抗氧化酶水平测定 把线虫挑至涂有 *E. coli* OP50 溶液的 90 mm 平皿中给药:

(1) a 组:以酒精度(体积分数)为 14%、原花青素含量为 1 mg/mL 的蓝莓果酒为配剂基液,通过添加不同质量的原花青素标准品得到原花青素含量分别为 1,2,3,4,5 mg/mL 的蓝莓果酒,并将 14%乙醇水溶液设置为 0 mg/mL 剂量组,用以上各组蓝莓果酒分别喂养秀丽隐杆线虫,喂食量均为 200 μL ,对照组为只含 OP50 的 NGM 平板。

(2) b 组:以酒精度(体积分数)为 0%、原花青素为

3 mg/mL 的蓝莓果酒为配剂基液,通过添加不同体积食用乙醇,配置成酒精度(体积分数)分别为 5%,10%,15%,20%,25%,30%的蓝莓果酒,为确保加入酒精后原花青素含量仍为 3 mg/mL,适度添加原花青素标准品,并将 3 mg/mL 原花青素水溶液设置为 0%剂量组,用以上各组蓝莓果酒分别喂养秀丽隐杆线虫,喂食量均为 200 μL 。

(3) 对照组:只含 OP50 的 NGM 平板。由于纯蓝莓果汁中原花青素浓度为 4 mg/mL 左右,故本试验蓝莓果酒选择的原花青素浓度范围为 0~5 mg/mL。

对照组和每个试验组的线虫数为(100 $\pm$ 2)条,给药 48 h。48 h 后将线虫用清水浸泡两遍(每遍 10 min),目的是排出线虫体内的蓝莓果酒。用 M9 溶液将线虫洗下转入 1.5 mL EP 管内,加石英砂,超声波细胞破碎仪以破碎功率 900 W,破碎总时间 12 s(超声 3 s,间隔 3 s)为超声参数对线虫进行破碎,4 000 r/min 离心 20 min 得组织匀浆。用试剂盒方法测定线虫体内过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)和超氧化物歧化酶(SOD)的活性。

1.2.4 线虫细胞凋亡测定 把线虫挑至涂有 *E. coli* OP50 溶液的 90 mm 平皿中给药(给药设置同 1.2.3)。对照组和每个试验组的线虫数为(20 $\pm$ 2)条,给药 48 h。吸取 200 μL 现配的 AO 溶液(75 $\mu\text{g/mL}$)到给药完毕的平皿上;将 AO 溶液均匀分布于平皿上,平皿盖半开,于黑暗处静置 20 min;移开平皿盖子,让平板处于黑暗中继续染色 1 h;将虫子转移到新的涂有大肠杆菌 OP50 的平板上,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中孵育 1 h 以排除肠道内的 AO 溶液;于提前准备的载玻片上滴 1 滴琼脂糖溶液,盖上盖玻片,注意不要产生气泡,待琼脂糖凝固后小心将盖玻片揭开,即可形成琼脂糖平面;将 10~15 条线虫挑于琼脂糖上,滴加 10 μL 叠氮钠溶液麻醉线虫,盖上盖玻片;用荧光倒置显微镜观察线虫细胞凋亡情况^[10]。

1.2.5 统计学分析 平行试验 3 组,试验数据采用 SPSS 18.0 统计分析,所有数据都以平均值 $\pm$ 标准差表示,组间比较采用 Tukey 分析。

2 结果与讨论

2.1 线虫体内抗氧化酶测定结果

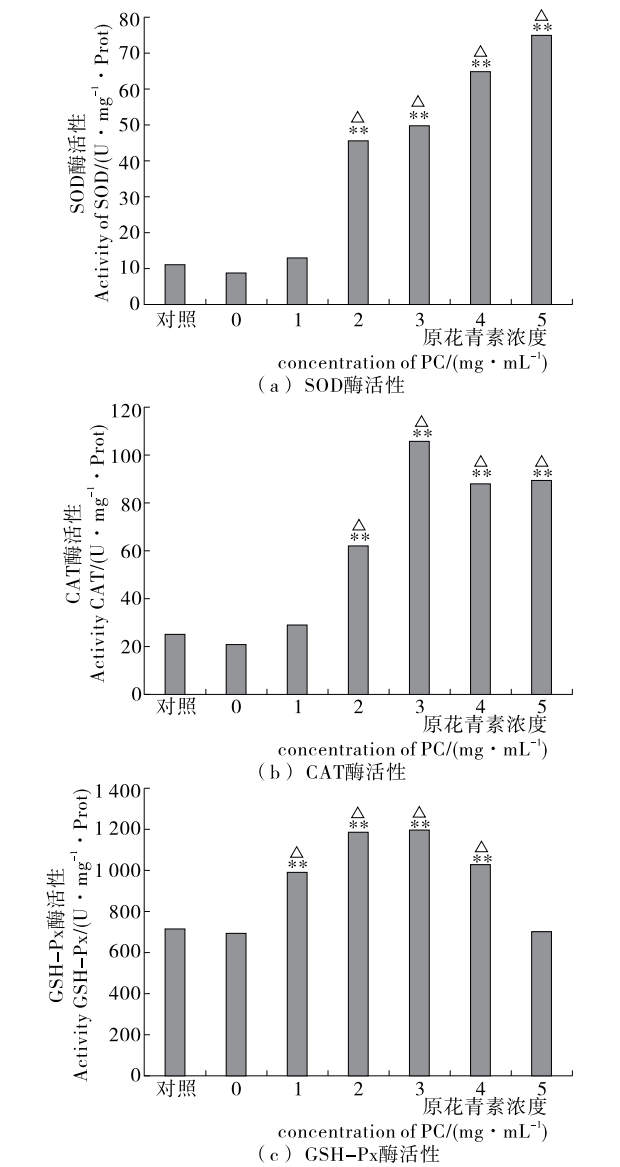
由图 1(a)可知,含原花青素 0 mg/mL 蓝莓果酒组的线虫体内 SOD 酶活性与 OP50 组相比无显著差异,而含原花青素 1~5 mg/mL 蓝莓果酒组线虫体内 SOD 酶活性与 OP50 组对比呈梯度趋势显著提高,并呈现出浓度依赖性。

由图 1(b)可知,与对照组相比,含原花青素 1~5 mg/mL 蓝莓果酒组线虫体内 CAT 酶活性均有提高。当蓝莓果酒中原花青素浓度为 1~3 mg/mL 时,呈现出浓度依赖性,原花青素浓度大于 1 mg/mL 时,蓝莓果酒对线虫体内 CAT 酶活性表现出显著增益作用,3 mg/mL 原花青素对线虫体内 CAT 酶活性的增益作用最显著。当蓝莓果酒中原花青素浓度大于 3 mg/mL,原花青素对线虫体内 CAT 酶活性的增益作用呈现出降低的趋势。

由图 1(c)可知,含原花青素 1~4 mg/mL 蓝莓果酒喂食

的线虫体内 GSH-Px 酶活性显著增加。当蓝莓果酒中原花青素浓度为 1~3 mg/mL 时,呈现出浓度依赖性,其中含花青素 3 mg/mL 蓝莓果酒组最高。当蓝莓果酒中原花青素大于 3 mg/mL,蓝莓果酒对线虫体内 GSH-Px 酶活性的增益作用逐渐降低,含原花青素 5 mg/mL 蓝莓果酒组与 0 mg/mL 蓝莓果酒组、对照组相比已无显著差异。

在原花青素单因素试验中,随着蓝莓果酒中原花青素浓度的增加,线虫体内的 SOD、CAT、GSH-Px 酶活性均保持在较高水平,综合来看,含花青素 3 mg/mL 蓝莓果酒组的抗氧化酶活性最高;CAT、GSH-Px 酶活性呈现先上升后降低的趋势,可能是高浓度的原花青素对 CAT 酶和 GSH-Px 酶产生了抑制作用。

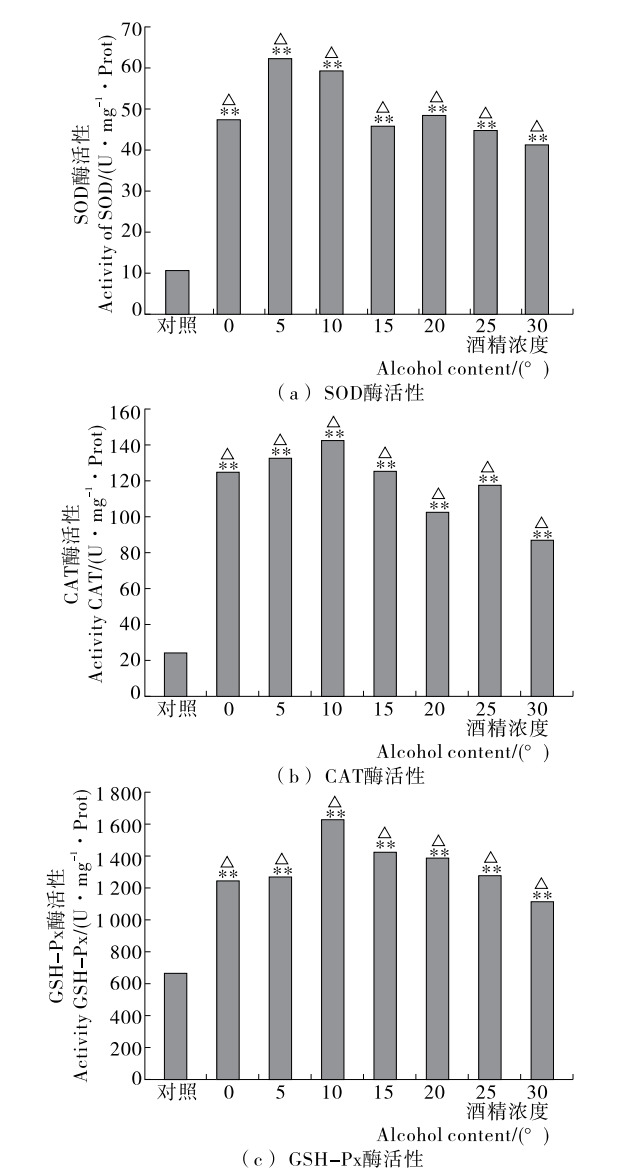


* *. 与对照组相比,差异极显著($P<0.01$) Δ. 与 0 mg/mL 组相比,差异显著($P<0.05$)

图 1 不同原花青素浓度蓝莓果酒对线虫体内酶活性的影响
Figure 1 Effect of blueberry with different concentration of PC on the activity of antioxidant enzyme

由图 2(a)可知,试验组与对照组相比均有显著差异,当蓝莓果酒中酒精含量(体积分数)为 0%~5%时,呈现出浓度依赖性,其中含酒精(体积分数)5%蓝莓果酒喂食的线虫体内 SOD 酶活性最高。当蓝莓果酒中酒精含量(体积分数)大于 5%,蓝莓果酒对线虫体内 SOD 酶活性的增益作用开始降低,含酒精(体积分数)30%蓝莓果酒组线虫体内 SOD 酶活性最低。

由图 2(b)可知,试验组与对照组相比均有显著差异,当蓝莓果酒中酒精浓度(体积分数)为其 0%~10%时,呈现出浓度依赖性,含酒精(体积分数)10%蓝莓果酒喂养的线虫体内 CAT 酶活性最高。随着果酒中酒精浓度的增加,当蓝莓果酒中酒精浓度大于 10%,蓝莓果酒对线虫体内 CAT 酶活性的增益作用开始下降,含酒精(体积分数)30%蓝莓果酒组



* *. 与对照组相比,差异极显著($P<0.01$) Δ. 与 0 mg/mL 组相比,差异显著($P<0.05$)

图 2 不同酒精浓度蓝莓果酒对线虫体内酶活性的影响
Figure 2 Effect of blueberry with different acohol content on the activity of antioxidant enzyme

线虫体内 CAT 酶活性最低。

由图 2(c)可知,试验组与对照组相比均有显著差异,当蓝莓果酒中酒精浓度(体积分数)为 0%~10%时,呈现出浓度依赖性,其中含酒精(体积分数)10%蓝莓果酒组的 GSH-Px 酶活性最高。当蓝莓果酒中酒精浓度(体积分数)大于 10%,随蓝莓果酒中酒精度增加,线虫体内 GSH-Px 酶活性不断下降,呈现负相关性。含酒精(体积分数)30%蓝莓果酒组线虫体内 GSH-Px 酶活性最低。

在酒精单因素试验中,随着酒精浓度的增加,SOD、CAT、GSH-Px 3 种酶的酶活性均呈现先上升后降低的趋势,总体来看,含酒精(体积分数)10%蓝莓果酒喂养的线虫抗氧化酶活性最高,低浓度的酒精能提高机体抗氧化能力。

2.2 线虫细胞凋亡测定结果

2.2.1 不同原花青素质量浓度的蓝莓果酒对线虫细胞凋亡的影响 线虫体内凋亡细胞由于 DNA 断裂,在吖啶橙染色后呈现黄色或者橙色,而正常细胞则呈现绿色,在荧光显微镜下可明显观察到线虫体内的正常细胞^[11]。由图 3 可知,与对照组相比,试验组均能减缓线虫细胞凋亡程度。随着蓝莓果酒中原花青素浓度的增加,虫体在显微镜下显现的绿光越来越明显,正常细胞越来越多,细胞凋亡程度显著降低,呈现出浓度依赖性,其中以含原花青素 5 mg/mL 蓝莓酒组最

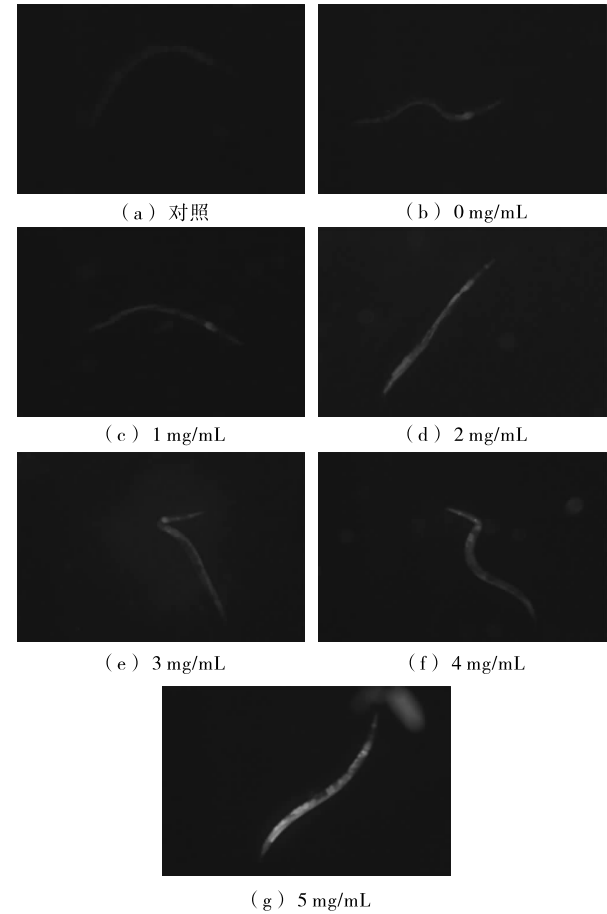


图 3 不同原花青素浓度蓝莓果酒对线虫细胞凋亡的影响
Figure 3 Effect of blueberry with different concentration of PC on apoptosis

为显著。可能是原花青素能抑制 ROS 的产生^[12],ROS 的减少不利于 P53、caspase-9 的表达,进而降低线虫体内细胞凋亡水平。
2.2.2 不同酒精度的蓝莓果酒对线虫细胞凋亡的影响 由图 4 可知,与对照组相比,试验组线虫体内细胞凋亡减缓。酒精度 0%蓝莓果酒组的线虫呈现出绿光最为明显,随着酒精度增加,虫体的绿光随之减弱,呈现出浓度依赖性,酒精度 30%蓝莓果酒组的线虫绿光仍略强于对照组。酒精的作用使线虫凋亡细胞增加、正常细胞减少。可能是酒精增强了线粒体的呼吸作用,导致 ROS 增加,ROS 活化 NFkB,活化的 NFkB 促进由 FasL 介导的细胞凋亡。

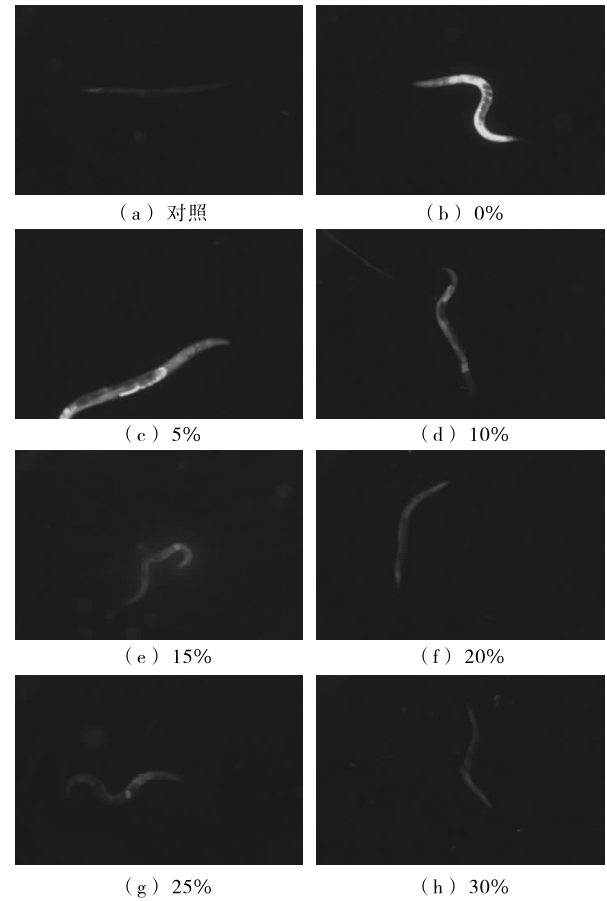


图 4 不同酒精浓度蓝莓果酒对线虫细胞凋亡的影响
Figure 4 Effect of blueberry with different acohol content on apoptosis

3 结论

蓝莓果酒具有抗氧化和延缓衰老的功效。当蓝莓果酒中原花青素浓度为 1~3 mg/mL 时,线虫体内的抗氧化酶活性增加,凋亡细胞减少,并具有浓度依赖性;当蓝莓果酒中酒精度(体积分数)为 5%~10%时,线虫体内抗氧化酶活性增加,凋亡细胞减少,且具有浓度依赖性。对于酒精度(体积分数)高于 10%的蓝莓果酒,随着酒精浓度增加,线虫体内抗氧化酶活性降低、细胞凋亡数量呈现出升高的趋势。综上所述,蓝莓酒中的原花青素是延缓衰老的有效成分,低浓度酒精也能延缓衰老,但是当酒精度(体积分数)高于 10%时,则

(下转第 33 页)

3 结论

运用微生物生长机理模型与神经网络相结合建立的混合模型,对微生物生长过程生物量进行估算。结果表明混合动力学模型有很好的泛化能力,样本的均方差为 0.25×10^{-3} ,而以静态多层前馈网络建模的样本均方差为 1.73×10^{-3} ,模型的估算值与实测值存在一定的偏差,这主要由于微生物处于生长动态过程。而将微生物生长机理模型与神经网络建模技术相结合,建立神经网络—生长动力学混合模型,能保证混合网络最后输出结果不会偏离生长规律。混合模型估算精确度优于单独使用的神经网络,运用该网络的修正模型,以某公司的 1 个月生产报表提供的信息为基础,对报表数据进行了分析与筛选,估算生产过程中酵母生物量的浓度,结果表明网络的估算值与实际测量值有较好的吻合。

参考文献

[1] 曾祥燕, 赵良忠, 蒋盛岩. BP 神经网络优化槐花中芦丁的提取工艺[J]. 天然产物研究与开发, 2013, 3(25): 312-316.

[2] 许哲军, 何云, 郭美锦, 等. 重组毕赤酵母表达期菌体浓度的软测量模型[J]. 食品与生物技术学报, 2006, 25(5): 28-34.

[3] 曾祥燕, 赵良忠, 孙文兵, 等. 基于 PCA 和 BP 神经网络的葡萄酒品质预测模型[J]. 食品与机械, 2014, 30(1): 40-44.

[4] 李冰, 郭祀远, 李琳, 等. PRNN 对 *Bacillus cereus*DM423 分批培养过程中生物量的软测量[J]. 华南理工大学学报: 自然科学版, 2009, 37(4): 111-115.

[5] 黎移新. 基于前馈神经网络的脐橙糖度及有效酸度检测[J]. 食品与机械, 2009, 25(1): 78-81.

[6] Wilson J A, Zorzetto L F M. A generalized approach to process state estimation using hybrid artificial neural network/

mechanistic models[J]. Computers Chem. Engng., 1997, 21(9): 951-963.

[7] Psychogios C D, Ungar L H. A hybrid neural network-first principles approach to process modeling[J]. AIChE Journal, 1992, 38(10): 1 499-1 511.

[8] 朱海燕, 朱晓莲, 黄頔. 基于动态 BP 神经网络的预测方法及其应用[J]. 计算机与信息技术, 2007(21): 3-6.

[9] 黎移新. 多层前馈神经网络几种算法的样本顺序敏感性[J]. 食品与机械, 2010, 26(6): 100-103.

[10] 隋青美, 于正欧. 发酵过程混合神经网络建模方法比较[J]. 山东工业大学学报, 2001, 26(4): 95-97.

[11] Pan Li-jun, Zhang Chan-chan, Jiang Shao-tong, et al. Medium optimization of *L*-lactic acid fermentation by lactic acid bacteria with rape cake hydrolysate as nitrogen source[J]. Food Sci., 2007, 10(6): 313-316.

[12] 曹乐平, 谢培甫. Vfb 基于补偿模糊神经网络的立式转鼓水果分级系统设计[J]. 食品与机械, 2007, 23(2): 70-73.

[13] 袁丽红. 微生物学实验[M]. 北京: 化学工业出版社, 2010: 67-69.

[14] 宁正祥. 食品分析[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1994: 90-100.

[15] 王树青. 生化反应过程模型化及计算机控制[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 1998.

[16] Leal R R, Butler P, Lane P, et al. Data fusion and artificial neural networks for biomass estimation [J]. IEE Proc-Sci. Meas. Technol., 1997, 144(2): 69-72.

[17] 戚以政, 汪叔雄. 生化反应动力学与反应器[M]. 北京: 化学工业出版社, 1998: 57-63.

[18] Ratkov A L, Georgiev T Z, Ivanova V, et al. Investigation of *L*-lysine fed-batch fermentation process with droppings by mathematical modeling[J]. IEEE 26th Int. Conf. Information Technology Interfaces, 2004(6): 543-547.

(上接第 19 页)

具有反作用。原花青素浓度 3 mg/mL、酒精度(体积分数)10%的蓝莓果酒对线虫的抗衰老作用最佳。

本试验填补了此前未用生物模型从整体上研究蓝莓果酒抗氧化和抗衰老功能的空白,间接证实了王艳菊等^[13]发现在氧化应激胁迫条件下葡萄籽原花青素能够很好地保护秀丽隐杆线虫,缓解极端氧化条件对线虫的损伤、周华丽等^[14]发现酒精促进了小鼠肝细胞凋亡等研究结果,但是关于蓝莓果酒引起秀丽隐杆线虫生化指标改变的机理还需作更深入的研究。

参考文献

[1] 李斌, 雷月, 孟宪军, 等. 蓝莓营养保健功能及其活性成分提取技术研究进展[J]. 食品与机械, 2015, 31(6): 251-254.

[2] 蒋本庆, 高铭坤. 果酒的保健功效及蓝莓果酒发展分析研究[J]. 酿酒, 2015, 42(2): 115-118.

[3] 赵慧芳, 吴文龙, 马丽, 等. 基于抗氧化活性分析的蓝莓多酚提取工艺[J]. 食品工业科技, 2015, 36(5): 251-266.

[4] Vanessa Cardenosa, Amadeo Girones-Vilaplana. Influence of genotype, cultivation system and irrigation regime on antioxidant capacity and selected phenolics of blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.)[J]. Food Chemistry, 2016, 202: 276-283

[5] 杨曙方, 汪金杰, 周伟东, 等. 蓝莓果酒主发酵工艺研究[J]. 酿酒, 2013, 40(4): 88-91.

[6] 刘子菱, 李影. 添加蜂蜜和白糖对蓝莓果酒品质的影响[J]. 食品科技, 2013, 38(7): 118-122.

[7] Seo Seung-ho, Na Chang-su. Effectiveness of banana additions for completion of stuck and sluggish fermentation of blueberry wine[J]. LWT - Food Science and Technology, 2015, 64(2): 1 143-1 148.

[8] Brenner S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*[J]. Genetics, 1974, 77(1): 71-94.

[9] 李鹏飞. sir-2.1 RNA 干扰线虫模型的建立及 DhHP-6 抗衰老作用机制的初步研究[D]. 吉林: 吉林大学, 2009: 26-27.

[10] Benjamin Lant, Wbrent Derry. Fluorescent Visualization of germline apoptosis in living *caenorhabditis elegans* [J]. Cold Spring Harbor Laboratory Protocols, 2014(4): 420-427.

[11] 沈蓉蓉, 郑筱娇. 干细胞生长因子抑制肿瘤细胞凋亡作用研究[J]. 中国药学杂志, 2012, 47(18): 1 478-1 482.

[12] 孙传范. 原花青素的研究进展[J]. 食品与机械, 2010, 26(4): 146-152.

[13] 王艳菊, 马建伟, 王曦茁, 等. 葡萄籽原花青素对秀丽隐杆线虫抗衰老的影响[J]. 食品工业科技, 2014, 35(20): 369-375.

[14] 周华丽. 长期酒精摄入对大鼠肝细胞凋亡与增殖的影响[D]. 浙江: 浙江大学, 2003: 38-39.