

黑莓、蓝莓冻干粉了的的抑菌抗炎活性研究

朱泓, 赵慧芳, 吴文龙, 李维林

(江苏省中国科学院植物研究所, 江苏南京 210018)

摘要: 黑莓、蓝莓富含花色苷和鞣花酸, 被认为具有抗菌消炎作用。以分离纯化自牛鼻间隔软骨的多重耐药奇异变形杆菌为主要测试菌种, 通过体外抑菌圈实验、最小抑菌浓度实验以及软骨体外培养实验, 对黑莓、蓝莓冻干粉的抑菌及抗炎活性进行了考察。研究结果显示: 冻干粉能够有效抑制奇异变形杆菌、大肠杆菌、枯草芽孢杆菌等革兰氏阳性菌及阴性菌的生长, 并能显著降低软骨细胞受奇异变形杆菌感染产生的炎症反应强度, 培养 4 d 后, 添加黑莓、蓝莓冻干粉培养液中糖胺聚糖 (GAG) 释放量分别降低 $41.59 \pm 0.30\%$ 和 $21.08 \pm 2.66\%$, 抑菌率分别达到 $53.75 \pm 3.00\%$ 和 $31.74 \pm 8.00\%$; 培养 20 d 后, GAG 释放量分别降低 $13.73 \pm 9.91\%$ 和 $56.04 \pm 0.00\%$, 抑菌率分别为 $50.43 \pm 0.00\%$ 和 $68.05 \pm 3.00\%$ 。测定培养液蛋白酶活力发现, 黑莓、蓝莓处理较对照分别下降 $50.02 \pm 0.30\%$ 和 $66 \pm 5.00\%$, 明胶酶谱检验也表明黑莓、蓝莓冻干粉能够强烈抑制降解培养液中软骨细胞间胶原组织的蛋白酶, 从而降低 GAG 的释放。

关键词: 蓝莓; 黑莓; 抑菌; 抗炎; 奇异变形杆菌

文章篇号: 1673-9078(2013)10-2410-2414

Anti-*Proteus mirabilis* Effect of Freeze-dried Powder of Polyphenolic Enriched Berry

ZHU Hong, ZHAO Hui-fang, WU Wen-long, LI Wei-lin

(Institute of Botany, Jiangsu Province and Chinese Academy of Science, Nanjing 210018, China)

Abstract: The black berry (*Rubus fruticosus*) and blue berry (*Vaccinium corymbosum*) contain bioactive polyphenols with reported anti-bacterial properties. This study sought to investigate the anti-bacterial, cartilage-protecting and anti-inflammatory effects of freeze-dried powder of polyphenolic-enriched berry by using a plate inhibition test, a minimum inhibitory concentration (MIC) test, and an *in vitro* bovine nasal explant cell culture model. Results showed that both gram-positive *Bacillus subtilis* and gram-negative *Escherichia coli* were inhibited by the freeze-dried powder. And a multiply antibiotic resistant bacterium *Proteus mirabilis* was also susceptible to berry freeze-dried powder. After a 20-day culture, the growth inhibition rate of *Proteus mirabilis* reached $50.43 \pm 0.00\%$ and $68.05 \pm 3.00\%$ in black berry and blue berry freeze-dried powder, respectively. Casein hydrolysis activity and gelatin zymography test indicated the protease activity significantly decreased to $50.02 \pm 0.30\%$ and $66.00 \pm 5.00\%$ in bovine nasal explant cell culture samples after black berry and blue berry freeze-dried powder were added. The release inhibition of glycosaminoglycan (GAG), which was a signal of inflammatory, was also found in according with protease inhibition by berry freeze-dried powder.

Key words: blue berry; black berry; polyphenols; anti-bacterial; anti-inflammatory; *Proteus mirabilis*

二十世纪 40 年代初青霉素问世后, 细菌引起的感染性疾病曾受到较好的控制, 但随着以青霉素的广泛使用, 有些细菌产生了青霉素酶, 后者能水解 β -内酰胺环从而表现出对青霉素的耐药。近年来, 能够抵抗多种抗生素的致病菌不断被发现和报导。如: 耐甲氧西林金葡萄菌 (*methicillin resistant Staphylococcus aureus*),

收稿日期: 2013-06-23

基金项目: 江苏省产学研联合创新资金项目 (BY2011198)

作者简介: 朱泓 (1982-), 男, 助理研究员, 主要从事黑莓、蓝莓等浆果功能性营养物质的研究与利用

通讯作者: 李维林 (1966-), 男, 研究员, 博士生导师

MRSA)^[1]。该类细菌在社会上引起了广泛的关注和恐慌。2005 年我国五家教学医院革兰阳性球菌耐药监测研究显示 MRSA 分离率已达到 51.3%, 其中上海的发生率更是高达 78.4%^[2]。

除金黄色葡萄球菌外, 耐药致病性奇异变形杆菌也越来越多的被报道。奇异变形杆菌是一类人和动物的寄生菌和病原菌。广泛分布在自然界中, 如土壤、水、垃圾、腐败有机物及人或动物的肠道内。奇异变形杆菌是一种与临床关系密切的条件致病菌, 在引起泌尿系统感染中仅次于大肠埃希菌, 致病因素有鞭毛、菌毛、内毒素、溶血毒素等。近年来奇异变形杆菌耐

药率逐渐上升,给临床抗感染治疗带来了困难^[3-4]。而一些植物来源的非抗生素类抗菌天然化合物,则能够有效抑制该类耐药细菌的生长。如王瑞君等人于2012年报道了一株分离自石蛙的致病性奇异变形杆菌,并发现中草药忍冬藤对该菌有显著抑制效果^[5]。黑莓和蓝莓均为在我国广泛种植的小浆果品种,具有明目、健齿、抗衰老等营养功能,并分别被称作“生命之果”和“抗氧化之王”,如今已制成果汁、果酒、果酱、果膏、果糕等产品,广受消费者欢迎。鲜果中富含多酚类物质,其多酚提取物被证实具有多种对人体健康有益的生物学活性,如抗氧化、抗癌等^[6-8]。除此之外,早在16世纪的欧洲,黑莓就被用来治疗口腔和眼部细菌感染。近年来,国外少数研究者报道了蓝莓等几种浆果多酚提取物的抗菌消炎作用。此前我们发现了黑莓、蓝莓多酚物质能够有效抑制包括奇异变形杆菌在内的几种致病菌的生长。冻干果是一种新型的小浆果储存方式和食品加工方法,通过低温冷冻干燥能够有效保留小浆果中的多酚等活性成分。冻干果存放方便,且能够制成冻干粉或直接食用,与多酚复杂的提取制备工艺相比冻干产品制备方便具有广阔的市场前景。因此黑莓、蓝莓冻干果是否也能抑制这些致病菌的生长和引发炎症的强度,引起了我们极大的兴趣。

本研究以一株分离纯化自牛鼻间隔软骨的多重耐药奇异变形杆菌为主要研究材料,通过体外抑菌圈实验、最小抑菌浓度实验以及软骨体外培养实验,对黑莓、蓝莓鲜果冻干粉抑制细菌生长和炎症发生方面的活性进行了初步的观测和分析,以期在黑莓、蓝莓的开发利用提供线索。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

奇异变形杆菌(*Proteus mirabilis*),分离自江苏省南京市麒麟镇灵山屠宰场新鲜肉牛鼻间隔软骨,枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*),购于中国工业微生物保藏中心,大肠杆菌(*Escherichia coli*),由南京大学赠予。

1.2 试剂与仪器

DMEM/F12培养液,购自美国Gibco公司;考马斯亮蓝G250,购自美国Amersco公司;硫酸软骨素、泰勒氏兰(1,9-二甲基亚甲蓝),购买自北京偶合科技有限公司;氨苄青霉素、链霉素,购自Biosharp公司。全自动酶标仪,购自Biotech公司。

1.3 实验方法

1.3.1 抑菌圈实验

取配成OD₆₀₀比浊为0.2的供试菌悬液各0.1 mL涂布于LB固体平板上。将直径为10 mm的无菌滤纸片用镊子轻放在固体培养基上,分别滴加去离子水(实验对照组)和浓度为25 mg/mL、100 mg/mL、200 mg/mL冻干粉水溶液各10 μL。将平板置于恒温培养箱中,37 °C培养24 h,取出测定抑菌圈直径。

1.3.2 最小抑菌浓度(MIC)测定

采用琼脂平板稀释法^[9]使LB琼脂平板中冻干粉终浓度为50 mg/mL、25 mg/mL、12.6 mg/mL、6.3 mg/mL、3.2 mg/mL、1.6 mg/mL、0.8 mg/mL、0.4 mg/mL,以超纯水LB琼脂平板为实验对照组。用超纯水将处于对数生长期的供试菌种稀释为OD₆₀₀比浊为0.2的种子液,取0.1 mL种子培养液涂布于药敏平板表面,37 °C培24 h,肉眼观察,无细菌菌落形成的最低稀释浓度即为MIC。

1.3.3 牛鼻间隔软骨体外培养实验

从江苏省南京市麒麟镇灵山屠宰场现宰肉牛上割取感染多重耐药奇异变形杆菌的鼻间隔软骨,将软骨切成3 mm见方的小块,浸泡于含抗生素的DMEM/12培养液(氨苄青霉素、链霉素各100 μg/mL)中洗涤后,将软骨块转移到48孔板中,加入含抗生素的培养液培养24 h后收获培养液作为空白对照样品,并重新加入含抗生素培养液作为对照组,分别加入含不同浓度(0.25、0.5、1 mg/mL)的黑莓、蓝莓冻干粉的含抗生素培养液作为实验组。培养液每隔4 d回收并更换一次,收获的培养液冻存于-80 °C。添加新培养液前用高浓度抗生素(10 mg/mL的青霉素、链霉素)浸泡软骨30 min以控制细菌的生长速度,浸泡结束后用无菌水浸洗两次去除残留的抗生素。培养液中细菌浓度、可溶性蛋白、总蛋白多糖含量以及基质金属蛋白酶活力测定见下文。

1.3.4 细菌浓度测定

培养液中细菌浓度测定采用比浊法,用酶标仪于600 nm测定收获的培养液吸光值,新鲜培养液为对照。抑菌率I(%)采用以下公式:

$$I(\%) = (A_{t,CK} - A_{0,CK}) - (A_{t,I} - A_{0,I}) / (A_{t,CK} - A_{0,CK}) \times 100\%$$

注:其中A_{0,CK}和A_{t,CK}分别作为对照的样品在未培养和培养t日的吸光度,A_{0,I}和A_{t,I}分别为含蓝莓多酚粗提物样品在未培养和培养t日的吸光度。

1.3.5 可溶性蛋白含量测定

可溶性蛋白含量使用Bradford法^[10]测定,每100

μL 考马斯亮蓝 R250 工作液与 10 μL 待测样品混合后常温放置 10 min 后于 595 nm 测定吸光值。参照标准品为牛血清白蛋白 (BSA)。测定数值单位为可溶性蛋白浓度 (mg/mL)。

1.3.6 总蛋白多糖测定

牛鼻软骨中主要的蛋白多糖为聚集蛋白聚糖, 该多糖结构为一个核心蛋白共价结合一个或多个带有负电荷的糖胺聚糖(GAG)。GAG 的含量可以通过泰勒氏蓝 (DMMB) 染色法测定。该方法的原理为带正电荷的 DMMB 和带负电荷的 GAG 结合后 DMMB 染料会发生颜色变化。200 μL DMMB 染色液 (40 mM 甘氨酸、40 mM 氯化钠、16 μg/mL DMMB、0.01 mol HCl) 与 50 μL 培养液混合于 96 孔板中, 立即用酶标仪 525 nm 测定吸光值。参照标准品为硫酸软骨素。测定数值单位为 GAG 浓度 (mg/mL) 每毫克软骨。

1.3.7 明胶酶谱测定

明胶酶谱法测定基质蛋白酶活力具体方法见文献^[11]。根据胶板大小配制一定体积的 8% 分离胶和 5% 浓缩胶, 分离胶中加入明胶溶液使明胶终浓度为 0.1%, 灌胶及电泳操作与普通 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳相同。凝胶制好后, 取备用的培养上清 (10 μL), 与 1/5 体积的样品缓冲液混合均匀后上样, 上样初始, 以 8 V/cm 电泳至溴酚蓝前沿进入分离胶, 然后将电压加至 10 V/cm, 继续电泳至溴酚蓝前沿离分离胶前端约 2cm 时, 停止电泳 (1~2 h); 取下凝胶, 移入 2.5% Triton X-100 溶液中, 在摇床上洗脱 2 次 (45 min/次), 加入明胶酶缓冲液, 在 37 °C 恒温中孵育 12~16 h。凝胶用染色液染色 4 h; 在脱色液中脱色 1~2 h, 至对照出现明显, 清晰的负染酶带, 用蒸馏水漂洗后观察。

1.3.8 蛋白酶活力测定

将培养液 10000 r/min 离心取上清, 以适当 pH 缓冲液稀释后, 取 200 μL 加入 2 mL 离心管中, 37 °C 水浴预热 1 min, 加入 200 μL 2% 酪素溶液, 37 °C 水浴保温 10 min, 迅速加入 600 μL 0.4 mol/L 三氯乙酸终止反应, 室温静置 15 min, 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清 500 μL, 置于试管中, 加入 2 500 μL 0.4 mol/L 碳酸钠溶液及 500 μL 福林酚工作液, 混匀, 40 °C 水浴 20 min 后, 测定 680 nm 吸光度。对照在加入酪素溶

液前先加入三氯乙酸, 其余反应条件相同。将每分钟水解酪素释放 1 μg 酪氨酸的酶量定义为一个蛋白酶活力单位。

1.4 数据分析

采用 Excel 2003 绘图, 采用 SPSS13.0 进行多重比较 (Duncan 检验, P<0.05) 分析。

2 结果与讨论

2.1 抑菌圈实验

黑莓、蓝莓除果肉鲜嫩可口外, 果实中还含有大量的多酚成分, 其中主要的组成成分为花色苷和鞣花酸^[12]。这些多酚除了具有抗氧化的功能外, 也被认为可能具有抗菌消炎作用。

表 1 三种常见致病菌和食物腐败菌对冻干粉的敏感性

Table 1 The sensitivity of berry freeze-dried powder to three common food pathogenic and corruption bacteria

供试菌种	黑莓/蓝莓冻干粉含量/(mg/mL)			
	0(对照组)	25	100	200
大肠杆菌	-/-	++/-	+++ /++	+++ /++
枯草芽孢杆菌	-/-	+++ /+	+++ /+++	+++ /+++
奇异变形杆菌	-/-	+++ /+++	+++ /+++	+++ /+++

注: -表示无抗菌性 (抑菌圈直径 6 mm); +表示有抗菌性 (抑菌圈直径 6~10 mm); ++表示轻度敏感 (10 mm); +++表示敏感 (11~15 mm); 空白滤纸片直径为 6 mm。

以抗生素多重抗性菌奇异变形杆菌及几种常见的致病菌和食物腐败菌为指标菌, 进行了抑菌敏感性测试。结果表明, 冻干粉对革兰氏阳性及阴性菌均有抑制作用, 由表 1 可见, 奇异变形杆菌、枯草芽孢杆菌及大肠杆菌对冻干粉敏感。

2.2 冻干粉对细菌 MIC 测定结果

分别以大肠杆菌、枯草芽孢杆菌及奇异变形杆菌为指示菌, 琼脂平板稀释法测定其 MIC 浓度, 由表 2 可见, 黑莓、蓝莓冻干果粉对大肠杆菌的 MIC 都为 50 mg/mL, 对枯草芽孢杆菌的 MIC 分别为 12.6 mg/mL 和 25 mg/mL, 对奇异变形杆菌的 MIC 均为 50 mg/mL。

表 2 冻干粉对三种常见致病菌和食物腐败菌的 MIC 测定

Table 2 The MIC results of berry freeze-dried powder to Common food pathogenic and corruption bacteria

供试菌种	黑莓/蓝莓冻干粉含量/(mg/mL)								
	50	25	12.6	6.3	3.2	1.6	0.8	0.4	0
大肠杆菌	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
枯草芽孢杆	-/-	-/-	-/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
奇异变形杆	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+

注: -表示无菌生长; +表示有菌生长

2.3 冻干粉对软骨细胞致病菌生长的抑制

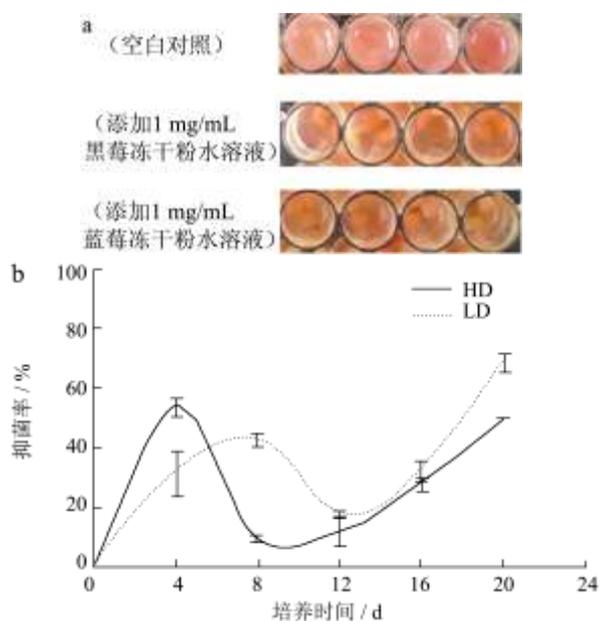


图1 冻干粉对软骨细胞细菌感染的抑制

Fig.1 The bacteriostatic effect of berry freeze-dried powder

注: a: 不同处理含抗生素(100 μg/mL 氨苄青霉素和链霉素)培养液中细菌生长量图像; b: 添加 1 mg/mL 黑莓 (HD)、蓝莓 (LD) 冻干粉后培养液在不同培养时间的抑菌率测定。

为了验证冻干粉对抗生素多重耐药菌奇异变形杆菌的抑制作用,我们进行了软骨体外培养实验。每4d更换并收集培养液,测定浊度并计算抑菌率。尽管黑、蓝莓冻干粉多酚含量远低于萃取得到的多酚提取物,依然表现出了明显的抑菌能力(图1a),平均抑菌率达到了 $30.44 \pm 2.20\%$ 和 $38.2 \pm 3.60\%$ 。由图1b所示,黑莓、蓝莓冻干粉抑菌率在培养第4d分别达到 $53.75 \pm 3.00\%$ 和 $31.74 \pm 8.00\%$,随后分别在8d和12d显著降低,之后再次逐渐增加。该结果是由于第4d收获培养液后第一次使用10 mg/mL高浓度抗生素浸泡软骨,导致在第8d及第12d实验组和对照组的菌浓度均显著降低。对照培养液中抗性菌对抗生素的耐受性随着培养时间的延长逐步显现,在第12、16及20d细菌浓度逐渐提高,表现出了对青霉素和链霉素的敏感性。而与多酚提取物相同,冻干粉对奇异变形杆菌生长的抑制作用能够长效维持,培养20d后添加微量黑莓、蓝莓冻干粉的抑菌率分别为 $50.43 \pm 0.00\%$ 和 $68.05 \pm 3.00\%$ 。

2.4 冻干粉对软骨细胞炎症反应的抑制

炎症反应是身体的一种自我保护反应,可由细菌、病毒、霉菌等感染引起,但是过度的炎症反应则

会对机体造成损伤。将培养液中可溶性蛋白以及GAG含量的增加作为鉴别软骨细胞炎症情况的指标。

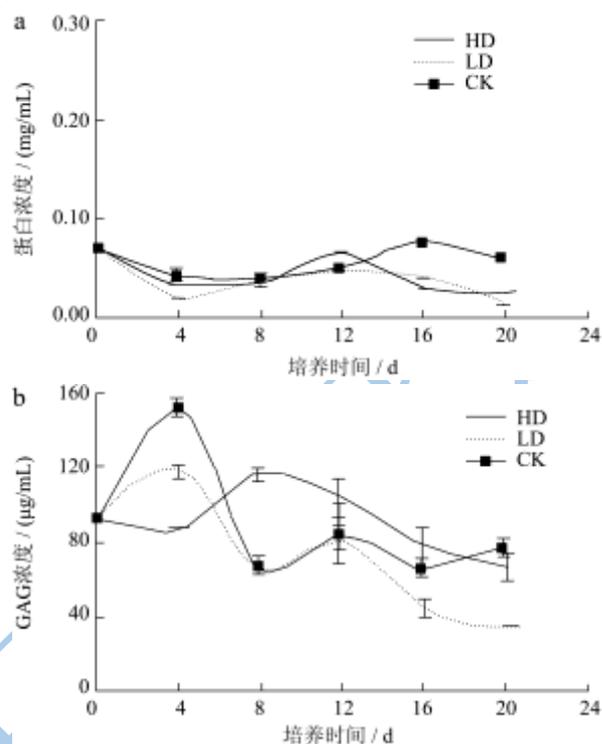


图2 冻干粉对软骨细胞炎症的抑制

Fig.2 *In vitro* effects of the polyphenol-enriched berry freeze-dried powder on nasal bovine cartilage degradation

注: a: 添加1 mg/mL黑莓(HD)、蓝莓(LD)冻干粉后培养液在不同培养时间的可溶性蛋白浓度; b: 添加1 mg/mL黑莓(HD)、蓝莓(LD)冻干粉后培养液在不同培养时间的GAG浓度。

通过测定培养液中可溶性蛋白含量发现,图2a中冻干粉实验组中可溶性蛋白从培养起与对照组差异不大,直到培养第20d才显著低于对照。图2b是培养液中GAG释放量曲线,由图可知在培养第4d和第20d时软骨细胞向培养基中释放了较高浓度的GAG,参照培养期间的细菌生长情况可以确认这种软骨细胞炎症反应正是由于细菌大量繁殖引起的。蓝莓冻干粉实验组培养液中GAG的释放量均显著减少,分别在第4d降低了 $21.08 \pm 2.66\%$,在第20d降低了 $56.04 \pm 0.00\%$ 。而黑莓冻干粉实验组培养液中GAG的释放量分别在第4d降低了 $41.59 \pm 0.30\%$,在第20d降低了 $13.73 \pm 9.91\%$ 。同时发现而黑莓冻干粉实验组培养液中GAG的释放量分别在第8、12、16d高于对照,培养液中总蛋白含量在第12d高于对照。该结果表明,蓝莓冻干粉能有效抑制软骨细胞因细菌感染产生的炎症反应。黑莓冻干粉尽管在短期内抑制炎症效果优于蓝莓冻干粉,但随着培养时间的增长对软骨细

胞细菌感染产生的炎症反应会产生一定的促进作用。

2.5 冻干粉对细菌胞外蛋白酶的抑制

关于浆果多酚抑菌消炎的机理仍没有被阐明,有研究报道该现象很可能源于多酚对炎症反应的促进者基质金属蛋白酶活力的抑制^[13-14]。将第4 d培养液中细菌胞外蛋白酶进行明胶酶谱分析发现,与图3中未添加冻干粉的对照组相比(泳道1),黑莓、蓝莓冻干粉处理组(泳道2、3)培养液中的蛋白酶活力显著下降。该结果表明,冻干粉能够显著抑制细菌对软骨组织中蛋白质组分的酶解强度。比较添加黑莓冻干粉(泳道2)和蓝莓冻干粉(泳道3)实验组中蛋白酶活力可以发现,蓝莓冻干粉有更强的蛋白酶抑制能力。以酪素为底物测定培养液样品蛋白酶活力,发现黑莓冻干粉处理组酶活力为 14.13 ± 0.30 U/mL,蓝莓冻干粉处理组为 9.58 ± 0.12 U/mL,与对照组相比分别降低 $50.02 \pm 0.30\%$ 和 $66.10 \pm 5.00\%$ 。对比对照组,我们发现实验组在40 kDa附近均出现一条蛋白酶条带。而该条带在我们对黑莓、蓝莓多酚提取物实验组进行的酶谱实验中并未出现。该结果表明,冻干粉作为一种混合物对细菌诱导炎症发生的抑制效果与多酚提取物有一定差异。尽管冻干粉中的多酚类物质能够有效抑制培养液中的多数蛋白酶成分,但其余成分则可作为细菌生长的营养和40 KD蛋白酶产生的诱导物。

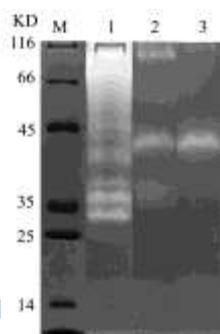


图3 明胶酶谱检测冻干粉对细菌胞外蛋白酶活力的抑制

Fig.3 Gelatinolytic activity of culture media collected

注: M: 蛋白分子量标记; 1: 未处理对照培养液中蛋白酶活力; 2: 添加1 mg/mL黑莓冻干粉(HD)后培养液中蛋白酶活力; 3: 添加1 mg/mL蓝莓冻干粉(LD)后培养液中蛋白酶活力。

3 结论

本研究以分离纯化自牛鼻间隔软骨的多重耐药奇异变形杆菌为主要测试菌种,通过体外抑菌圈实验、最小抑菌浓度实验以及软骨体外培养实验,对黑莓、蓝莓冻干粉的抑菌及抗炎活性进行了考察。研究结果显示:黑莓、蓝莓冻干粉能够有效抑制大肠杆菌、枯

草芽胞杆菌以及多重耐药奇异变形杆菌的生长,多重耐药奇异变形杆菌平均抑菌率达到 $30.44 \pm 2.20\%$ 和 $38.2 \pm 3.60\%$;黑莓、蓝莓冻干粉能通过抑制基质中蛋白的释放以及蛋白降解酶的活力来降低炎症的强度,比较两种冻干粉,蓝莓冻干粉展现出更加良好的抑制时效性。

参考文献

- [1] Jevons M P, Knox R, Rolinson G N. "Celbenin"-resistant staphylococci [J]. *BMJ*, 1961, 1(5219): 113-114
- [2] 王辉,孙宏莉,陈民钧,等.2005年我国五家教学医院革兰阳性球菌耐药监测研究[J].*中华检验医学杂志*,2006,29:873-877
WANG Hui, SUN Hong-li, CHEN Min-jun, et al. Antimicrobial resistance surveillance of gram-positive cocci isolated from 5 teaching hospitals in China in 2005 [J]. *Chinese Journal of Laboratory Medicine*, 2006, 29: 873-877
- [3] 应春妹,何澄,汪雅萍,等.奇异变形杆菌产超广谱 β 内酰胺酶基因检测[J].*中国感染与化疗杂志*,2009,9(5):343-346
YING Chun mei, HE Cheng, Wang Ya-ping, et al. The genotypes of extended-spectrum β -lactamases in 119 clinical isolates of *Proteus mirabilis* [J]. *Chinese Journal of Infection and Chemotherapy*, 2009, 9(5): 343-346
- [4] 王辉,陈民钧,倪语星,等.2003-2004年中国十家教学医院革兰阴性杆菌的耐药分析[J].*中华检验医学杂志*,2005,28(12): 1295-1303
WANG Hui, CHEN Min-jun, NI Yu-xing, et al. Antimicrobial resistance analysis among nosocomial gram-negative bacilli from 10 teaching hospitals in China [J]. *Chinese Journal of Infection and Chemotherapy*, 2005, 28(12): 1295-1303
- [5] 王瑞君,熊筱娟.棘胸蛙烂皮病奇异变形杆菌的分离、鉴定及对药物敏感性研究[J].*淡水渔业*,2012,42(4):31-34
WANG Rui-jun, XIONG Xiao-juan. Isolation, identification and drug sensitivity tests of *Proteus mirabilis* from rotten-skin disease of *Rana spinosa* [J]. *Freshwater Fisheries*, 2012, 42(4): 31-34
- [6] Lydia K, Luke R H, Latha D. The Blackberry Fruit: A Review on Its Composition and Chemistry, Metabolism and Bioavailability, and Health Benefits [J]. *J Agric Food Chem*, 2012, 60: 5716-5727
- [7] Anita B, Timothy J L. Strawberries, Blueberries, and Cranberries in the Metabolic Syndrome: Clinical Perspectives [J]. *J Agric Food Chem*, 2012, 60: 5687-5692
- [8] Karine F, Mark F, Vu D L, et al. Cranberry Proanthoc

- yanidins: Natural Weapons against Periodontal Diseases [J]. *J Agric Food Chem*, 2012, 60: 5728-5735
- [9] 朱亚芳,赵浩如.中药体外抑制痤疮丙酸杆菌的活性测定[J].*药学与临床研究*,2009,17(3):224-226
ZHU Ya-fang, ZHAO Hao-ru. *In vitro* antimicrobial activities of traditional Chinese medicine to *Propionibacterium acnes* [J]. *Pharmaceutical and Clinical Research*, 2009, 17(3): 224-226
- [10] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248-254
- [11] 蹇爱荣,商澎,陈志南.改良明胶酶谱测定明胶酶活性[J].*解放军医学杂志*,2003,28(3):282-283
QIAN Ai-rong, SHANG peng, CHEN Zhi-nan. Modified gelatin zymography detect gelatinase activity [J]. *Medical Journal of Chinese People's Liberation Army*, 2003, 28 (3): 282-283
- [12] 曲信芹,穆晓惠,李甜甜.一株致病性奇异变形杆菌的分离与鉴定[J].*山东畜牧兽医*,2012,4:15-16
QU Xin-qin, MU Xiao-hui, LI Tian-tian. Isolation and Identification of a pathogenic *Proteus mirabilis* [J]. *Shandong Journal of Animal Science and Veterinary Medicine*, 2012, 4: 15-16
- [13] Neto C C. Cranberry and its phytochemicals: a review of in vitro anticancer studies [J]. *J Nutr*, 2007, 137: 186S-193S
- [14] Neto C C. Cranberry and blueberry: evidence for protective effects against cancer and vascular diseases [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2007, 51: 652-664