

葡萄皮和葡萄酒抗氧化活性与抑制斑马鱼血管生成研究

孙海燕^{1,2} 王 华³ 徐志民⁴ 李 华³

(1. 西北农林科技大学食品科学与工程学院, 陕西杨凌 712100; 2. 陕西理工大学陕西省资源生物重点实验室, 汉中 723000;
3. 西北农林科技大学葡萄酒学院, 陕西杨凌 712100; 4. 路易斯安那州立大学食品科学系, 巴吞鲁日 70803)

摘要: 对2种葡萄皮及其酿造的葡萄酒中粗酚进行提取,测定其体外DPPH清除率和总抗氧化能力,进一步利用转基因斑马鱼对提取物进行血管生成抑制活性检测。提取物处理斑马鱼胚胎22 h后,统计斑马鱼体节间血管的生长情况及提取物对斑马鱼体节间血管的抑制作用。试验结果显示,葡萄酒和葡萄皮均具有一定的体外抗氧化活性,但葡萄酒的DPPH清除率和总抗氧化能力均高于葡萄皮,其中葡萄酒1的DPPH清除率最高,为89.42%;比葡萄酒2高1.29个百分点,总抗氧化能力葡萄酒2最高,为223.24 U/mL;葡萄酒粗酚提取物能明显抑制斑马鱼血管生成,且节间血管数量较对照组明显减少,其中葡萄酒1的背长轴和体节间血管抑制效果更好;而葡萄皮粗酚提取物对斑马鱼血管生成无任何作用。

关键词: 葡萄酒; 多酚类物质; 抗氧化活性; 斑马鱼; 血管生成

中图分类号: TS201.2; R730.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-1298(2017)01-0260-07

Effect of Crude Phenol Extract in Grape Skin and Wine on Angiogenesis Activity of Zebrafish

SUN Haiyan^{1,2} WANG Hua³ XU Zhimin⁴ LI Hua³

(1. College of Food Science and Engineering, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China
2. Shaanxi Key Laboratory of Resource Biology, Shaanxi Sci-Tech University, Hanzhong 723000, China
3. College of Enology, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China
4. Department of Food Science, Louisiana State University, Baton Rouge, LA 70803, USA)

Abstract: Crude polyphenols were extracted from two types of grape skins and two wines. Total antioxidant activities and in vitro DPPH free radical scavenging activities of the extracts were evaluated. Meanwhile, the effect of those extracts on angiogenesis inhibition was investigated by using transgenic zebrafish model. After zebrafish embryos were treated with the crude polyphenol extracts for 22 h, the inhibitory effect on the intersegmental vessel (ISV) of zebrafish was investigated. The results indicated that the wines and grape skins all had in vitro antioxidant activities. However, the DPPH free radical scavenging activity and total antioxidant activity of wines were higher than those of grape skins. Wine 1 had the highest DPPH free radical scavenging activity (89.42%), which was 1.29 percentage points higher than that of wine 2. Wine 2 had the highest total antioxidant activity of 223.24 U/mL. Compared with control groups, zebrafish treated with crude polyphenol extracts of wines had significantly less ISV formation. Wine 1 had better inhibitory activity on ISV and dorsal longitudinal anastomotic vessel (DLAV) formation. However, the crude polyphenol extracts of grape skins showed little inhibitory effects on ISV and DLAV formation of zebrafish.

Key words: wine; polyphenol; antioxidant activity; zebrafish; angiogenesis

引言

血管生成即从已有的毛细血管或毛细血管后静

脉发展而形成新血管的过程,内皮细胞的激活、增殖和迁移在此过程中扮演重要角色。在正常情况下,生理性的血管生成是必要条件,如正常组织发育、生

收稿日期: 2016-05-18 修回日期: 2016-11-19
基金项目: “十二五”国家科技支撑计划项目(2012BAD31B00)、西北农林科技大学2013年试验成果转化项目(XNY2013-64)和国家火炬计划项目(2011GH551976)
作者简介: 孙海燕(1979—),女,博士生,陕西理工大学讲师,主要从事食品功能与化学研究,E-mail: diyson2008@163.com
通信作者: 王华(1959—),女,教授,博士生导师,主要从事葡萄与葡萄酒学研究,E-mail: wanghua@nwsuaf.edu.cn

殖、伤口愈合修复等,而持续的血管生成即病理性血管生成则是某些病变,如肿瘤组织的恶性增长、糖尿病性视网膜病变等^[1]。因为肿瘤的生长对血管生成具有依赖性,一方面,肿瘤通过诱导新生血管生成为其提供充足的营养物质;另一方面,新生血管的形成提供了肿瘤细胞远位转移的通道。因此有效抑制肿瘤诱导的新生血管生成将有效防治癌症。

目前,抗血管生成已成为肿瘤治疗的良好策略,而开发血管生成抑制剂也随之成为肿瘤研究的焦点。与传统抗肿瘤药物相比,血管生成抑制剂优点在于:抗肿瘤血管生成药物起到通过减少或阻断肿瘤组织的血液供应而使肿瘤细胞增殖周期延长,促进肿瘤细胞坏死作用,而不是直接杀死肿瘤细胞,故无明显的毒副作用,并且应用广泛,可治疗多种肿瘤,同时可克服化疗过程中的抗药性问题^[2-3]。

多酚物质是红葡萄酒的主要成分之一,具有延缓衰老、预防心血管疾病、预防癌症、抗炎症等作用^[4-8],但红酒多酚是否具有抑制动物血管生成活性,国内外尚未见研究报道。本文利用内皮细胞表达增强型绿色荧光蛋白的转基因斑马鱼品系 Tg (flk1:EGFP),在荧光显微镜下观察受精后 22 h 内斑马鱼胚胎内体节间血管的生成情况,从而对葡萄酒粗酚提取物抑制血管生成活性及机制进行初步研究,为预防肿瘤和血液病提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 葡萄外皮粗酚提取

葡萄品种不同(标记为葡萄 1、葡萄 2),但均为欧亚属,采于陕西省杨陵区曹辛庄,采收当天于 -80°C 冰箱分别冷冻葡萄 50 粒,流水下剥取葡萄皮,液氮冷冻粉碎成粉末,于冻干机中冻干 24 h,取出装于自封袋中,存放于 -80°C 冰箱。称取 1 g 过 60 目筛干粉于 50 mL 离心管中(离心管需用黑胶带或锡箔纸包裹),加入 10 mL 0.1% 盐酸甲醇溶液,于 60°C 水浴锅中提取 30 min 取出,于 10 000 r/min 下离心 10 min,收集上清液于离心管中,重复以上提取步骤 2 次,合并 3 次所有上清液于离心管中,上清液经过滤后收集,滤液经旋转蒸发仪(小于 40°C)蒸馏浓缩至体积小于原体积的 5%,定容至 5 mL 备用。

1.1.2 红葡萄酒的浓缩

由上述葡萄 1、葡萄 2 自酿红葡萄酒,得到对应的葡萄酒 1、葡萄酒 2。分别取 100 mL 红酒于旋转蒸发瓶中,在 38°C 下旋转蒸发浓缩至体积小于原体积的 15%,于冻干机中冻干 24 h 得浓缩干块, -80°C 冰箱存放备用。

1.1.3 试验动物

采用转基因斑马鱼品系 Tg (flk1:EGFP),该转基因斑马鱼品系内皮细胞表达含有 flk1 启动子控制的增强绿色荧光蛋白,因而血管可在荧光显微镜下观察,以便发现药物对血管的作用。斑马鱼胚胎由 Tg (flk1:EGFP) 纯合子或杂合子与野生型配对自然交配获得,每次交配准备 4 或 5 对成年斑马鱼,平均每对能产 200 ~ 300 个胚胎。所用斑马鱼均由上海南方模式生物研究中心提供。斑马鱼饲养于全封闭循环系统,养殖和繁殖均参照 Zebrafish Book 标准^[9],鱼房内光照、黑暗时间 14 h、10 h,室内温度 26°C ,水温 28.5°C ,每 1 L 反渗透水中加入 200 mg 速溶海盐,电导率 480 ~ 510 $\mu\text{S}/\text{cm}$;pH 值 6.9 ~ 7.2,其各项水质指标均符合要求。

1.1.4 试剂

二甲基亚砜(DMSO,分析纯,上海西陇化工有限公司);三卡因甲磺酸(分析纯,Sigma-Aldrich 公司);斑马鱼胚胎培养液(参照 Zebrafish Book 标准,0.137 mol/L NaCl,5.4 mmol/L KCl,0.25 mmol/L Na_2HPO_4 ,0.44 mmol/L K_2HPO_4 ,1.3 mmol/L CaCl_2 ,1.0 mmol/L MgSO_4 ,4.2 mmol/L NaHCO_3);PBS 缓冲液(8.0 g NaCl,0.2 g KCl,0.24 g K_2HPO_4 ,3.62 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$,先用少量超纯水依次溶解,再加至 1 000 mL,盐酸调 pH 值至 7.0);固定液(用 PBS 缓冲液配制 4% 多聚甲醛固定液);总抗氧化能力试剂盒(南京建成科技有限公司);没食子酸(标准品,购自中国食品药品检定研究院);氢氧化钠、硫酸铜、酒石酸钾钠等(分析纯,购自上海科兴商贸有限公司)。

1.2 仪器与设备

XSE104 型万分之一电子天平(上海巴玖实业有限公司);DZF-6090 型真空干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司);RQX-400 智能型人工气候箱(上海市百典仪器厂);Nikon SMZ1500 型高配置体式荧光显微镜(日本尼康公司);TGL-18M 型台式高速冷冻离心机(上海卢湘离心机仪器有限公司);R214-B3 型旋转蒸发仪(上海申生科技有限公司);UV-1700 型紫外可见分光光度计(日本岛津贸易有限公司);AL204 型万分之一天平(瑞士梅特勒公司);MP511 型酸度计(上海精密仪器仪表有限公司);WTY 型手持糖度计(北京鑫润科诺仪器仪表有限公司)。

1.3 方法

总糖测定参照斐林试剂滴定法^[10];总酸测定参照氢氧化钠滴定法^[10];pH 值参照酸度计法测定^[10];可溶性固形物测定参照手持糖度计法^[10];色

度测定^[11]方法为:将葡萄原酒经 0.45 μm 滤膜过滤后分别测其 pH 值,并用相同 pH 值的磷酸二氢钠-柠檬酸缓冲液稀释 10 倍,测定其在 420、520、620 nm 下的吸光度(A₁、A₂、A₃),吸光度之和乘以吸光倍数即为该葡萄酒的色度。

酒精度、干浸出物测定参照文献[12];总酚含量测定参照福林-消卡法,结果以没食子酸计^[13];DPPH 清除率测定参考孟江飞^[14]的方法稍做调整后进行。DPPH 自由基清除率公式为

$$U = (A_2 - A) / A \times 100\%$$

式中 A₂——样品吸光度测定值
A——蒸馏水代替样品时的空白测定值
总抗氧化能力测定参照试剂盒法;斑马鱼胚胎血管生成活性测定方法如下:

转基因斑马鱼受精后在光照、黑暗时间为 14 h、10 h,28.5℃的人工气候箱内孵育 22 h 后对胚胎进行清理,移除已死亡胚胎,并根据胚胎的发育阶段挑选合适的胚胎^[15]。因为胚胎可以从自身的卵黄囊中获取营养物质,所以在受精后 9 d 内不需要喂食。用三卡因甲磺酸对各个发育阶段的斑马鱼进行过度暴露处理,从而将斑马鱼麻醉处死;麻醉处死的操作步骤符合美国兽医协会(AVMA)对动物麻醉处死的规范要求。为了评估斑马鱼胚胎血管生成活性,称取一定量的葡萄干粉和葡萄酒提取物浓缩干块,稀释于 0.1%二甲基亚砜(DMSO)中制成 100 μg/mL 的初始质量浓度,加入到 12 孔板中,将孵化 22 h 的胚胎也同时分配到上述 12 孔板中,每孔 30 胚胎,于人工气候箱中继续孵化 26 h,即为其治疗期,观察血管生成情况。同时设定阳性对照和阴性对照,其中没有添加药物的胚胎作为阴性对照,本试验采用质

量分数为 0.1%的 DMSO,在这个质量分数下不会对斑马鱼的生长和发育产生形态上的影响,而一种 VEGFR 抑制剂即 5 μm 新型酪氨酸激酶抑制剂 vatalanib(即 PTK787)作为阳性对照^[16-17]。筛选出有效葡萄酒的标准为:处理后斑马鱼胚胎活力较好,且节间血管数量显著减少。试验结束后,胚胎用三卡因甲磺酸处理,再用胚胎培养液润洗,4%多聚甲醛液固定,4℃冰箱放置 12 h,用 PBS 液冲洗,然后将斑马鱼取出分别置于载玻片上,荧光显微镜下成像观察拍照体节间血管生长情况以及对节间血管形成进行分析。

2 结果与分析

2.1 葡萄和葡萄酒的理化性质结果

总糖、总酸、pH 值、可溶性固形物、总酚含量等指标一般用来评价酿酒葡萄和葡萄酒的品质;在一定范围内,葡萄含糖量越高,所酿葡萄酒的质量越好。李明记等^[18-19]认为,酿酒葡萄的适宜总酸质量浓度为 6~10 g/L;适宜的 pH 值应在 3.00~3.60 之间。适当的糖酸比应为 32 左右。

由表 1 可知,所选 2 种葡萄糖酸比分别为 31.79 和 33.15,均在 32 左右,属于适宜糖酸比;对应酿制的葡萄酒酒精度最大值为 13.34%,干浸出物质量浓度最大值为 36.92 g/L;总糖质量浓度分别为 3.52 g/L 和 3.85 g/L,上述指标均符合国标规定的干型酒标准;pH 值分别为 3.53 和 3.36,属于适宜 pH 值范围。葡萄和葡萄酒的所有测定指标均符合相关标准^[12]。测定葡萄理化性质一方面可以直接反映对应酿制的葡萄酒品质,另一方面也可以间接说明葡萄皮的一些性质。

表 1 葡萄和葡萄酒理化性质测定结果
Tab.1 Physical and chemical properties of grape and wine

类别	总糖质量 浓度/ (g·L ⁻¹)	总酸质量 浓度/ (g·L ⁻¹)	pH 值	可溶性固 形物质量 分数/%	色度	酒精度/ %	干浸出物 质量浓度/ (g·L ⁻¹)	总酚 质量浓度/ (mg·L ⁻¹)
葡萄 1	165 ± 0.860 ^a	5.19 ± 0.112 ^c	3.73 ± 0.012 0 ^b	7.43 ± 0.058 ^c				94.21 ± 5.58 ^a
	178 ± 1.260 ^b	5.37 ± 0.220 ^b	3.67 ± 0.0058 ^a	7.83 ± 0.153 ^b				101.34 ± 5.06 ^b
葡萄酒 1	3.52 ± 2.570 ^a	5.25 ± 0.057 ^a	3.53 ± 0.015 0 ^c	5.20 ± 0.200 ^a	3.54 ± 0.050 ^{ab}	12.87 ± 0.062 ^a	35.08 ± 2.566 ^c	213.96 ± 6.05 ^c
	3.85 ± 1.155 ^c	5.07 ± 0.078 ^b	3.36 ± 0.0058 ^c	4.07 ± 0.062 ^b	6.53 ± 0.208 ^b	13.34 ± 0.020 ^a	36.92 ± 1.155 ^a	234.05 ± 6.06 ^b

2.2 体外抗氧化结果

2.2.1 葡萄皮和葡萄酒 DPPH 清除率的测定结果
DPPH 是一种典型的用于体外抗氧化性评价的

化学物质^[20],本试验对葡萄皮和葡萄酒粗酚提取液的 DPPH 自由基消除率进行测定,结果见图 1。由图 1 可知葡萄皮 2 的 DPPH 清除率更高,为

60.97%,比葡萄皮 1 高 16.61 个百分点;而对应的葡萄酒提取液的 DPPH 自由基消除率相当,葡萄 1 酿制的葡萄酒 1 清除率更好,为 89.42%;比葡萄酒 2 高 1.29 个百分点。由表 2 可知,葡萄酒的 DPPH 清除率远大于葡萄皮($p < 0.05$)。

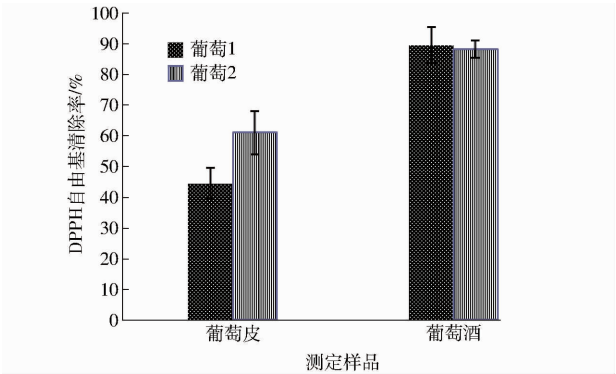


图 1 葡萄和葡萄酒的 DPPH 清除率

Fig.1 DPPH free radical scavenging activities of grape and wine

表 2 DPPH 清除率方差分析结果

Tab.2 Variance analysis result of DPPH free radical scavenging activities

因素	偏差平方和	自由度	F	F 临界值	显著性
葡萄 1	34.48	2	17.24	4.8794	*
葡萄 2	40.26	2	8.37	4.8794	*
葡萄酒 1	51.22	2	25.61	4.8794	*
葡萄酒 2	50.73	2	25.37	4.8794	*
误差	4.11	7			

注：* 表示在 $\alpha = 0.05$ 水平下差异显著,下同。

2.2.2 葡萄皮和葡萄酒总抗氧化能力的测定结果

由图 2 和表 3 可知,葡萄酒总抗氧化能力远大于葡萄皮($p < 0.05$),其中葡萄酒 2 总抗氧化能力最高,为 223.24 U/mL,其次为葡萄酒 1,总抗氧化能力为 178.98 U/mL,最低为葡萄皮 1 总抗氧化能力,仅为 105.30 U/mL,比葡萄酒 2 低 117.94 U/mL。由此进一步证明,葡萄酒具有较强的抗氧化能力,适当饮用对人体健康有益。

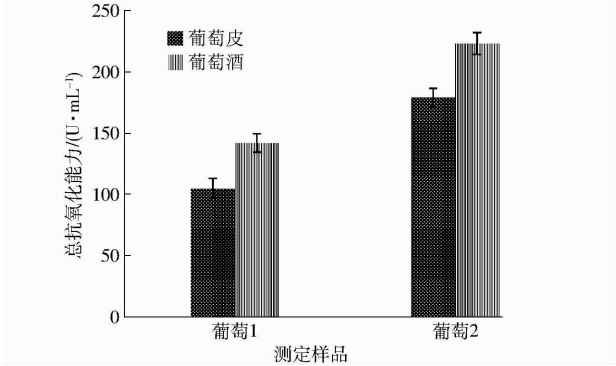


图 2 葡萄和葡萄酒的总抗氧化能力测定结果

Fig.2 Total antioxidant capability of grape and wine

表 3 总抗氧化方差分析结果

Tab.3 Variance analysis result of total antioxidant capability

因素	偏差平方和	自由度	F	F 临界值	显著性
葡萄 1	39.37	2	19.69	4.06178	*
葡萄 2	40.26	2	20.13	4.06178	*
葡萄酒 1	77.49	2	38.75	4.06178	*
葡萄酒 2	117.75	2	58.88	4.06178	*
误差	4.11	7			

有抗氧化作用的物质在一定程度上也具有抑制肿瘤的功能^[21],而肿瘤的生长和转移依赖于肿瘤血管^[22],为了研究具有抗氧化作用的葡萄酒是否也具有抑制血管生成的功能,进行了血管生成试验。

2.3 葡萄皮和葡萄酒粗酚提取物对斑马鱼模型的安全性分析结果

把葡萄酒作为药物进行试验,一般情况下,大剂量的药物会对斑马鱼造成明显的毒害,引起斑马鱼的死亡,因此在试验前应该筛选待测物质葡萄皮和葡萄酒对斑马鱼的毒性作用,从而得到测试葡萄皮和葡萄酒的最适浓度,即可抑制斑马鱼血管生成而无明显毒副作用的最小剂量。

由表 4 可以看出葡萄皮提取物对斑马鱼及胚胎无明显毒性,因此认为 100 $\mu\text{g/mL}$ 的提取物质量浓度对斑马鱼及胚胎是安全的,而且葡萄皮提取物与血管生成抑制剂 PTK787 同样具有抑制血管生成作用。

表 4 葡萄皮、葡萄酒提取物的斑马鱼筛选试验

Tab.4 Screening experiment of grape skin and wine extracts in zebrafish model

提取物种类	胚胎缺陷所占百分比				%
	正常	死亡	发育缺陷	抑制血管生成	
葡萄皮 1	0	0	0	0	
葡萄皮 2	0	0	0	0	
葡萄酒 1	0	0	0	100	
葡萄酒 2	0	0	0	100	
对照	0	0	0	0	
PTK787	0	0	0	100	

2.4 葡萄皮粗酚提取物对斑马鱼胚胎体节间血管生成的抑制作用

无论是原发肿瘤还是转移性肿瘤的生长和扩散均与血管形成密切相关,肿瘤血管除向肿瘤细胞提供营养外,还不断地向人体其他部位输送肿瘤细胞,导致恶性肿瘤的生长和转移^[23-24]。因此,抑制血管生成是抑制肿瘤细胞生长转移的有效手段。

由图 3 可以看出,葡萄皮 1、葡萄皮 2 粗酚提取物对斑马鱼胚胎体节间血管生成均无明显作用,尤其葡萄皮 2 喂食斑马鱼,胚胎放大后影像与对照组

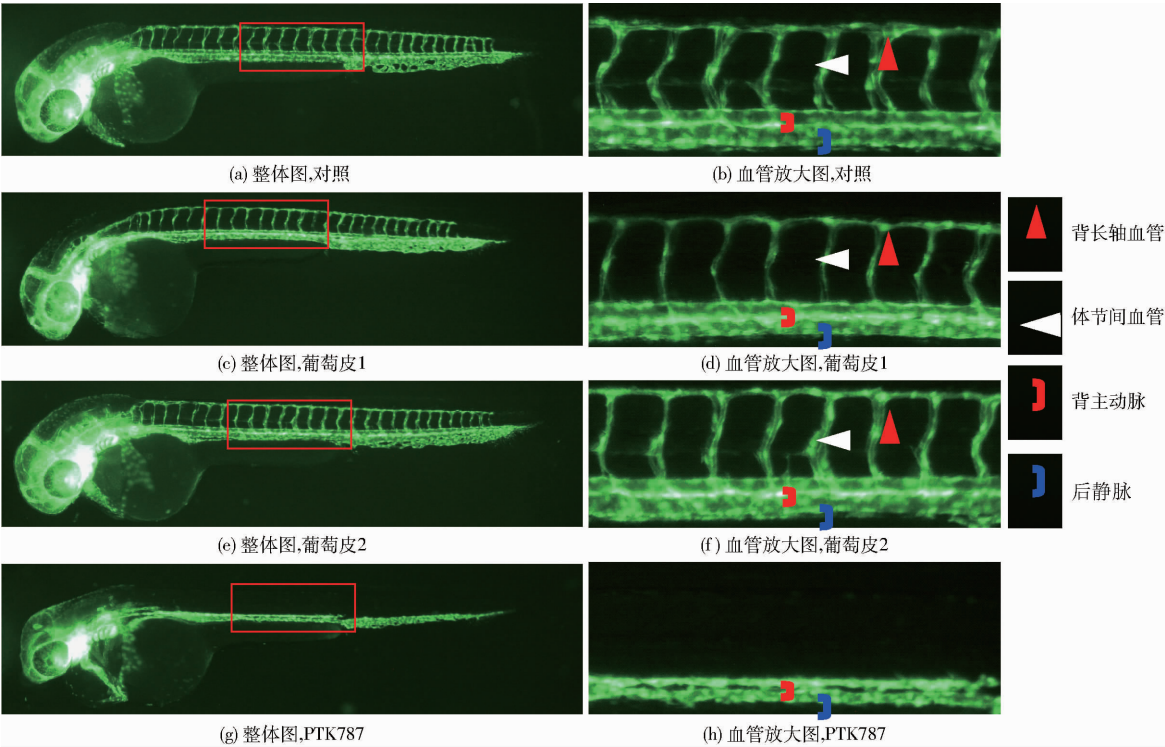


图 3 葡萄果皮粗酚提取物对斑马鱼胚胎体节间血管生成的抑制作用
Fig. 3 Inhibitory effect of grape skin on trunk angiogenesis in zebrafish

结果完全一致,葡萄皮 1 放大后斑马鱼胚胎体节间血管影像稍有弱化。由此可见,葡萄皮 1、葡萄皮 2 粗粉提取物对斑马鱼血管生成没有抑制作用。

2.5 葡萄酒粗酚提取物对斑马鱼胚胎体节间血管生成的抑制作用

斑马鱼节间血管发育时间为 24 ~ 48 h^[25],本试验中选择胚胎发育 22 h 血管尚未发育的斑马鱼作为受试对象,于胚胎培养液中加入葡萄酒提取物,继续培养 26 h 后剥除卵膜,在荧光显微镜下观察血管生成情况。

由图 4、5 可以看出,葡萄酒粗酚提取物处理斑马鱼胚胎 26 h 后,斑马鱼背长轴血管和体节间血管基本消失,均已模糊看不出,与对照组相比,斑马鱼胚胎饮用葡萄酒粗酚提取物后背长轴血管和体节间血管形态不完全或部分缺失,仅隐约能见背主动脉的肉芽,且体节间血管数量较对照组明显减少,血管生成受到明显抑制。试验结果表明葡萄酒粗酚提取物具有部分抑制血管异常生成的作用,但又不影响背主动脉和静脉血管的完整性,即葡萄酒粗酚提取物具有抗血管生成的药理活性,且葡萄酒 1 粗酚提

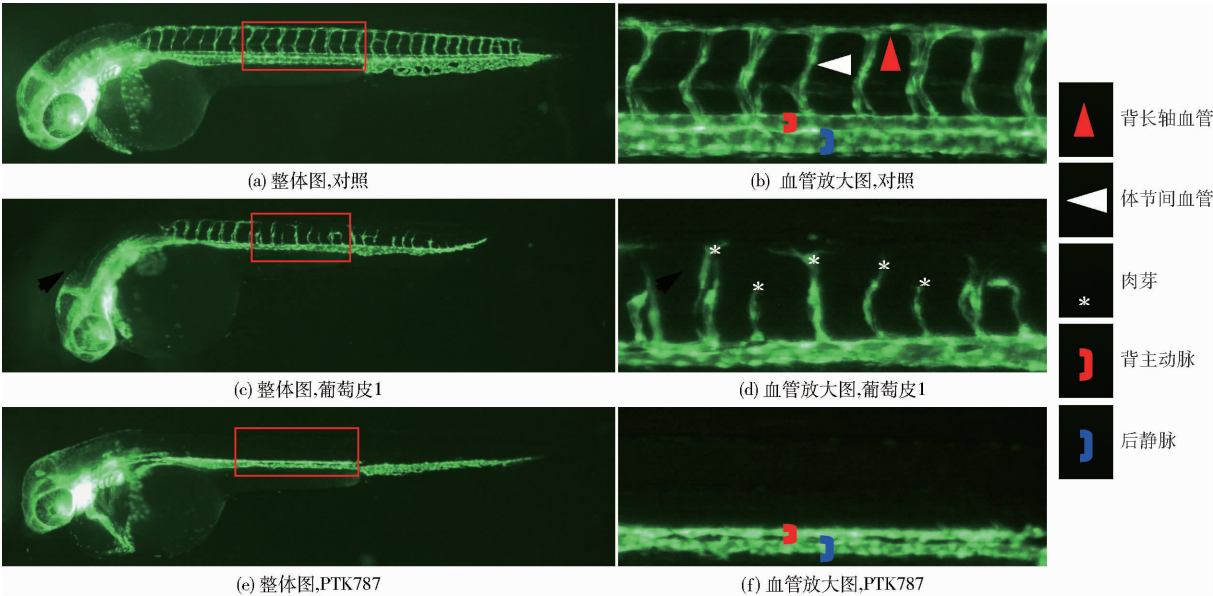


图 4 葡萄酒 1 粗酚提取物对斑马鱼胚胎体节间血管生成的抑制作用
Fig. 4 Inhibitory effect of wine 1 on trunk angiogenesis in zebrafish

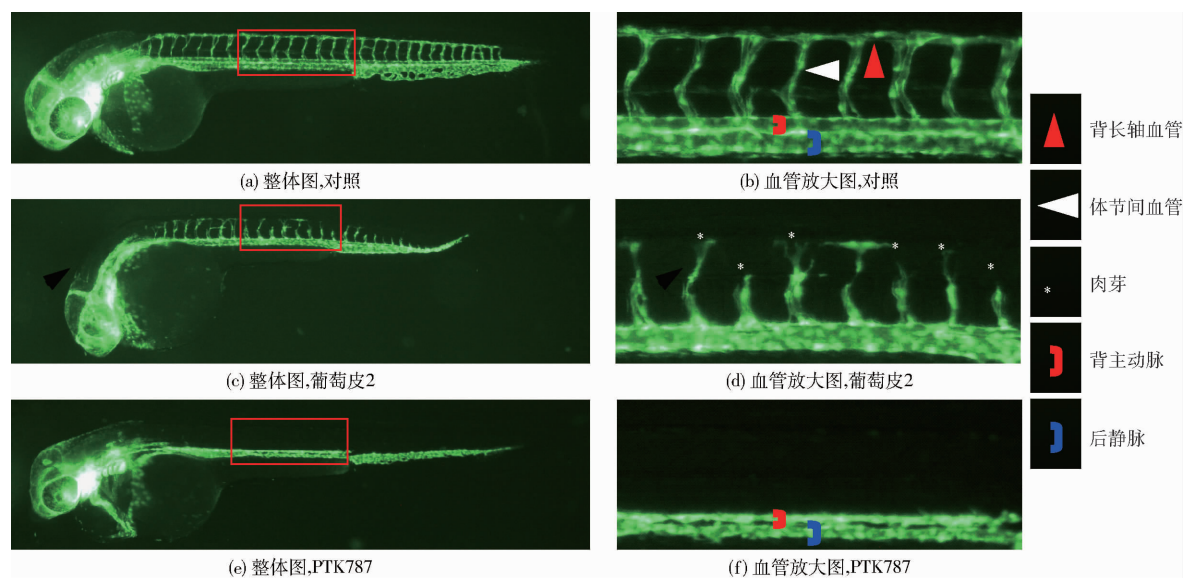


图 5 葡萄酒 2 粗酚提取物对斑马鱼胚胎体节间血管生成的抑制作用

Fig. 5 Inhibitory effect of wine 2 on trunk angiogenesis in zebrafish

取物对斑马鱼胚胎体节间血管生成的抑制作用大于葡萄酒 2。由对照组可以看出,背长轴血管和体节间血管均完整,由对照组用抑制剂 PTK787 后的表象图可以看出,PTK787 具有明显抑制背长轴血管和体节间血管生成的作用,使用后已经完全看不到 2 种血管,说明抑制效果非常明显。

3 讨论

斑马鱼是辐鳍亚纲鲤科短担尼鱼属的一种热带淡水硬骨鱼,主要分布于印度恒河流域^[26]。2009 年斑马鱼全基因组测序完成,斑马鱼体内存在的人类同源基因比例高达 87%,某些疾病相关基因与人类基因保守性高达 99%,这意味着在其身上做药物试验所得到的结果在多数情况下也适用于人体^[26-28]。因此斑马鱼成为一种公认的新型模式生物^[29-30]。

抑制血管生成是抗肿瘤治疗研究的热点,文献^[31]也证实了血管生成是肿瘤生长的关键。实体肿瘤的生长必须依赖持续和广泛的血管生成,无

血管状态的肿瘤极少超过 2~3 mm,新生的肿瘤血管可持续不断地为肿瘤细胞提供营养及氧气,带走代谢产物,而且肿瘤血管也是肿瘤转移的主要途径。血管的生成是一个复杂的过程,受血管刺激因子和血管抑制因子的调节^[23-24]。因此研究血管生成调节与肿瘤的关系有着重要的理论意义及临床价值,针对肿瘤血管形成的某些因子及其关键步骤进行干预,可切断肿瘤血供及转移途径,对肿瘤的治疗具有重要的意义。

4 结束语

以斑马鱼为试验模型,表明葡萄酒能有效抑制斑马鱼胚胎发育的体节间血管生成。试验选取与血管生成关系密切的节间血管、背长轴血管和肉芽作为指标,对斑马鱼胚胎的血管生成进行研究,结果显示葡萄皮粗酚提取物对抑制斑马鱼体节间血管生成则无明显作用,而斑马鱼胚胎饮用 2 种葡萄酒后的体节间血管的生成明显减少,说明葡萄酒粗酚提取物对抑制血管生成,即对抑制肿瘤发生有一定的作用。

参 考 文 献

1 JEMAL A, SIEGEL R, WARD E, et al. Cancer statistics, 2008 [J]. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2008, 58(2): 71-96.
2 王春阳. 斑马鱼化学遗传学筛选抑制血管生成药物治疗前列腺癌的实验研究[D]. 天津:天津医科大学, 2010.
WANG Chunyang. Chemical genetics screening of zebra fish experimental study on antiangiogenesis drugs for prostate cancer[D]. Tianjin: Tianjin Medical University, 2010. (in Chinese)
3 杨勐航, 藏远胜, 李兵. 肺癌新生血管生成机制研究进展[J]. 第二军医大学学报, 2013, 34(4): 434-438.
YANG Menghang, ZANG Yuansheng, LI Bing. Mechanism of lung cancer angiogenesis: recent advance[J]. Academic Journal of Second Military Medical University, 2013, 34(4): 434-438. (in Chinese)
4 史红梅, 丁燕, 孙玉霞, 等. 葡萄酒中多酚物质抗氧化活性测定方法的研究[J]. 酿酒科技, 2011(7): 94-98.
SHI Hongmei, DING Yan, SUN Yuxia, et al. Research on the determination of antioxidation activity of polyphenols in grape wine [J]. Liquor-making Science & Technology, 2011(7): 94-98. (in Chinese)
5 高川, 缪冰旋, 马三梅, 等. 葡萄酒抗氧化的研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2013, 39(5): 149-151.
GAO Chuan, MIU Bingxuan, MA Sanmei, et al. Research progress of antioxidant in wine [J]. Food and Fermentation Industry,

- 2013,39(5):149–151. (in Chinese)
- 6 王晓宇,杜国荣,李华. 抗氧化能力的体外测定方法研究进展[J]. 食品与生物技术学报,2012,31(3):247–250.
WANG Xiaoyu, DU Guorong, LI Hua. Progress of analytical methods for antioxidant capacity in vitro[J]. Journal of Food and Biotechnology, 2012, 31(3):247–250. (in Chinese)
- 7 NAKATA R, TAKAHASHI S, INOUE H. Recent advances in the study on resveratrol[J]. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2012, 35(3):273–279.
- 8 TANGNEY C C, RASMUSSEN H E. Polyphenols, inflammation, and cardiovascular disease[J]. Current Atherosclerosis Reports, 2013, 15(5):1–10.
- 9 WESTERFIELD M. The zebrafish book; a guide for the laboratory use of zebrafish[M]. Eugene: The University of Oregon Press, 1993.
- 10 王华. 葡萄酒分析检验[M]. 北京: 中国农业出版社, 2011.
- 11 张军贤. 不同整形方式对赤霞珠葡萄酒质量的影响[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2010; 22.
ZHANG Junxian. Different ways of shaping influence on quality of Cabernet sauvignon wine [D]. Yangling: Northwest A&F University, 2010; 22. (in Chinese)
- 12 GB/T 15037—2006 葡萄酒[S]. 2006.
- 13 岳泰新. 不同生态区酿酒葡萄与葡萄酒品质的研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2015.
YUE Taixin. In different ecological areas of study on quality of wine grape and wine [D]. Yangling: Northwest A&F University, 2015. (in Chinese)
- 14 孟江飞. 山西乡宁地区葡萄采收时间对葡萄及葡萄酒酚类物质与抗氧化活性影响[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2011.
MENG Jiangfei. Effect of harvest time on phenolic and antioxidant properties of grape and wine in Xiangning County, Shanxi Province [D]. Yangling: Northwest A&F University, 2011. (in Chinese)
- 15 KIMMEL C B, BALLARD W W, KIMMEL S R, et al. Stages of embryonic development of the zebrafish[J]. Developmental Dynamics, 1995, 203(3):253–310.
- 16 CHAN J, BAYLISS P E, WOOD J M, et al. Dissection of angiogenic signaling in zebrafish using a chemical genetic approach [J]. Cancer Cell, 2002, 1(3):257–267.
- 17 BAYLISS P E, BELLAVANCE K L, WHITEHEAD G G, et al. Chemical modulation of receptor signaling inhibits regenerative angiogenesis in adult zebrafish[J]. Nature Chemical Biology, 2006, 2(5):265–273.
- 18 李明记, 李华. 不同地区酿酒葡萄成熟度与葡萄酒质量的研究[J]. 落叶果树, 1995(1):3–6.
LI Mingji, LI Hua. Wine quality in relation to maturity of wine grape grown in different regions[J]. Deciduous Fruits, 1995(1): 3–6. (in Chinese)
- 19 HAGGERTY L M. Ripening profile of grape berry acids and sugars in university of minnesota wine grape cultivars, select vitis vinifera, and other hybrid cultivars[M]. Minnesota: Dissertations & Theses-Gradworks, 2013.
- 20 GHOSH S, BHATEJA P, RANI J, et al. In vitro evaluation of antioxidant activity of bitter melon (*Momordica charantia* L.) [J]. International Journal of Pharmtech Research, 2014, 6(4):1374–1382.
- 21 彭吕杨. 七种水果提取物抗氧化和抑制肿瘤活性研究[D]. 天津: 天津大学, 2014.
PENG Lüyang. Investigation on antioxidant and anti-tumor capacity of seven fruits extracts [D]. Tianjin: Tianjin University, 2014. (in Chinese)
- 22 王耀焱, 张培彤. 肿瘤血管正常化的研究现状[J]. 中国肿瘤, 2015, 24(6):494–500.
WANG Yaohan, ZHANG Peitong. Research progress of normalization of tumor vasculature [J]. Chinese Tumour, 2015, 24(6): 494–500. (in Chinese)
- 23 SZALA S, JAROSZ M. Tumor blood vessels[J]. Postepy Higieny i Medycyny Doswiadczonej, 2011, 65(4):437–446.
- 24 WU H C, CHANG D K. Peptide-mediated liposomal drug delivery system targeting tumor blood vessels in anticancer therapy[J]. Journal of Oncology, 2010:723–730.
- 25 朱亚杰, 程朋, 苏晓妹. 红景天甙对肝癌细胞增殖及斑马鱼血管生成作用的研究[J]. 现代肿瘤医学, 2012, 20(11):2239–2241.
ZHU Yajie, CHENG Peng, SU Xiaomei. Effect of salidroside on proliferation of carcinoma cell and angiogenesis of zebrafish [J]. Journal of Modern Oncology, 2012, 20(11):2239–2241. (in Chinese)
- 26 LITTLETON R M, HOVE J R. Zebrafish: a nontraditional model of traditional medicine [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2013, 145(3):677–685.
- 27 WANG C, TAO W, WANG Y, et al. Rosuvastatin, identified from a zebrafish chemical genetic screen for antiangiogenic compounds, suppresses the growth of prostate cancer [J]. European Urology, 2010, 58(3):418–426.
- 28 OAK M H, BEDOUI E L J, SCHINI-KERTH V B. Antiangiogenic properties of natural polyphenols from red wine and green tea [J]. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2005, 16(1):1–8.
- 29 VLIEGENTHART A D B, TUCKER C S, POZO J D, et al. Zebrafish as model organisms for studying drug-induced liver injury [J]. British Journal of Clinical Pharmacology, 2014, 78(6):1217–1227.
- 30 BELIAEVA N F, KASHIRTSEVA V N, MEDVEDEVA N V, et al. Zebrafish as a model organism for biomedical studies [J]. Biomeditsinskaya Khimiya, 2010, 56(1):120–131.
- 31 ABDOLLAHI A, FOLKMAN J. Evading tumor evasion: current concepts and perspectives of anti-angiogenic cancer therapy [J]. Drug Resistance Updates Reviews & Commentaries in Antimicrobial & Anticancer Chemotherapy, 2010, 13(13):16–28.