

原花青素对 I 型糖尿病大鼠血管内皮功能、氧化性损伤和凋亡相关蛋白表达的影响

姜志云^{1,2}, 刘义¹

(1. 辽宁医学院药理学教研室, 辽宁省锦州市 121001; 2. 辽宁省普兰店市中心医院心内科, 辽宁省普兰店市 116200)

[关键词] 原花青素; 糖尿病; 血管内皮细胞; 细胞凋亡

[摘要] **目的** 研究原花青素(procyanidins, PC)对糖尿病大鼠血管内皮细胞的作用,并在三种凋亡相关蛋白水平探讨作用机制。**方法** 雄性 SD 大鼠,尾静脉注射链脲佐菌素(STZ)30 mg/kg 造成 I 型糖尿病动物模型,随机分为糖尿病模型组,50 mg/kg 原花青素治疗组和 100 mg/kg 原花青素治疗组,每组 8 只,另选 8 只健康雄性大鼠为正常对照组。各组大鼠灌服给药 12 周后,用血糖仪及专用血糖试纸现场检测各组大鼠空腹血糖;采用放射免疫分析仪检测血清内皮素 1(ET-1)和前列环素(PGI₂)水平;采用比色法检测血管内皮组织 MDA 含量和 SOD 活性;采用常规免疫组织化学染色方法对血管内皮细胞三种凋亡相关蛋白 Caspase-3、Bax 和 Bcl-2 的表达进行检测;用 Olympus 成像分析系统高倍镜(×400)下观察和采集显微图像,采用美国显微镜图像分析测量软件 Image-Pro Plus 6.0 采集整个视野黄染灰度值并自动转化为光密度值,计算出单个内皮细胞平均光密度值(mean-density),分析三种凋亡相关蛋白的表达情况。**结果** 糖尿病模型组大鼠,与正常对照组比较,大鼠空腹血糖水平明显增高,血清 ET-1 含量增高和 PGI₂ 含量降低($P < 0.01$),血管内皮组织 MDA 含量提高($P < 0.01$),血管内皮组织 SOD 活性降低($P < 0.01$),血管内皮 Caspase-3 和 Bax 蛋白表达均增强($P < 0.01$),Bcl-2 蛋白表达及 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达比值(Bcl-2/Bax)均减弱($P < 0.01$);50 mg/kg 原花青素治疗组和 100 mg/kg 原花青素治疗组,与糖尿病模型组比较,大鼠空腹血糖水平不同程度减低($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$),血清 ET-1 含量降低和 PGI₂ 含量升高($P < 0.01$),血管内皮组织 MDA 含量降低($P < 0.01$),血管内皮组织 SOD 活性提高($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$),血管内皮 Caspase-3 和 Bax 蛋白表达均减弱($P < 0.01$),Bcl-2 蛋白表达及 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达比值(Bcl-2/Bax)均提高($P < 0.01$),SOD 含量均高于糖尿病模型组。**结论** 原花青素对糖尿病大鼠血管内皮分泌功能和氧化性损伤有调节保护作用,同时可抑制血管内皮 Caspase-3 和 Bcl-2 蛋白表达水平,促进 Bcl-2 表达,提高 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达比值。

[中图分类号] R96

[文献标识码] A

The Influence of Procyanidins on Function, Oxidative Damage and Apoptosis Related Protein Expression of Vascular Endothelial Cell in Type I Diabetic Rats

JIANG Zhi-Yun^{1,2}, and LIU Yi¹

(1. Department of Pharmacology, Liaoning Medical University, Jinzhou, Liaoning 121001, China; 2. Department of Cardiac Internal Medicine, Puluandian Central Hospital, Puluandian, Liaoning 116200, China)

[KEY WORDS] Procyanidins; Diabetes; Vascular Endothelial Cell; Cell Apoptosis

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of Procyanidins on vascular endothelial cell in diabetic rats and discuss the possible mechanism. **Methods** Male SD rats were injected streptozotocin (STZ, 30 mg/kg) by tail intravenous for establishing the type I diabetes animal model, randomly divided into diabetes model group, 50 mg/kg procyanidins treatment group and 100 mg/kg procyanidins treatment group, and other 8 healthy male SD rats were included into the control group. The rats took medicine by irrigation stomach for 12 weeks, rat fasting blood glucose was detected with glucose meter and special in-situ; serum ET-1 and PGI₂ level were detected with radiation immunity analyzer; MDA and SOD in vascular endothelial cell were detected by the methods of ELISA; Caspase-3, Bax and Bcl-2 in vascular endothelial cell were detected by the conventional immunohistochemical treatment and dyeing methods; vascular endothelial cell microscopic image

[收稿日期] 2014-08-06

[修回日期] 2014-10-25

[作者简介] 姜志云, 硕士研究生, 副主任医师, 研究方向为心血管疾病, E-mail 为 jzy0258@126.com。通讯作者刘义, 硕士, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为心血管药理, E-mail 为 jyliuyi@163.com。

was observed and collected with being future-proof imaging analysis system ($\times 400$) at high magnification; Caspase-3, Bax and Bcl-2 in vascular endothelial cell were analysed by mean-density using the microscope Image analysis software Image-Pro Plus 6.0 in yellow. **Results** Compared with the normal control group, in Diabetes model rats, rat fasting blood glucose level increased, serum ET-1 level increased and PGI2 level reduced ($P < 0.01$), MDA in vascular endothelial cell increased ($P < 0.01$), SOD in vascular endothelial cell reduced ($P < 0.01$), Caspase-3 and Bax in vascular endothelial cell increased ($P < 0.01$); Bcl-2 and Bcl-2/Bax in vascular endothelial cell reduced ($P < 0.01$); In 50 mg/kg procyanidins treatment group and 100 mg/kg procyanidins treatment group, rat fasting blood glucose level decreased ($P < 0.05, P < 0.01$), serum ET-1 level reduced and PGI2 level increased ($P < 0.01$), MDA in vascular endothelial cell reduced ($P < 0.01$), SOD in vascular endothelial cell increased ($P < 0.05, P < 0.01$), Caspase-3 and Bax in vascular endothelial cell reduced ($P < 0.01$); Bcl-2 and Bcl-2/Bax in vascular endothelial cell increased ($P < 0.01$). **Conclusion** Procyanidins has protective effect on diabetic rats vascular endothelial cell secretion function and oxidative damage, meanwhile can inhibit Caspase-3 and Bax, induce Bcl-2 and Bcl-2/Bax of diabetic rat vascular endothelial cell.

糖尿病血管病变通常是糖尿病最早出现的病理过程,可能会累及视网膜、肾脏、肢体或主要脏器血管以及血压等组织器官功能变化,严重影响糖尿病患者的生活质量,提高多种并发症的发生率。因此,糖尿病治疗过程应尽早采取防治糖尿病血管病变的药物,但目前可供临床选用的有确切疗效的药物非常有限,研究开发安全有效防治糖尿病血管病变的药物备受重视。有资料显示^[1-2],高糖和糖基化血红蛋白均可引起血管内皮细胞凋亡和功能减退,在糖尿病血管病变中产生重要作用。保护血管内皮细胞功能在防治糖尿病血管并发症过程中可能有重要价值。原花青素(procyanidins, PC)是一大类聚多酚类混合物,植物界分布广泛,如葡萄、银杏、山楂和松树皮等^[3]。目前已有多位学者研究报道了原花青素对糖尿病动物模型的保护作用,多项研究显示,原花青素在糖尿病及其并发症的防治上可能有应用价值^[4-7]。同时,原花青素对血管内皮细胞的保护作用,十多年来也不断有学者研究报道^[8-12]。我们也研究报道了原花青素对血管内皮细胞的保护作用,并提出机制可能与抗氧化和凋亡有关^[13-14]。但原花青素对糖尿病血管内皮细胞保护作用目前尚未见报道。我们采用大鼠尾静脉注射链脲佐菌素(STZ)造成1型糖尿病动物模型,研究原花青素对糖尿病大鼠血管内皮细胞功能、氧化性损伤和凋亡相关蛋白表达的影响,为原花青素防治糖尿病的作用和机制提供新的实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SD大鼠40只,雄性,体重180~220 g,购于辽宁医学院实验动物中心。

1.2 主要药物、试剂和器械

原花青素(PC),天津市尖峰天然产物研究开发有限公司提供,纯度 $\geq 95\%$,批号1006007-10。链脲佐菌素(STZ),美国sigma公司产品。丙二醛(malondialdehyde, MDA)和超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)试剂盒,南京建成生物工程研究所产品。7.5% EDTA- Na_2 ,北京普尔伟业生物科技有限公司产品。消炎痛-EDTA- Na_2 ,北京普尔伟业生物科技有限公司产品。抑肽酶(4万 KIU/mL),北京普尔伟业生物科技有限公司产品。6-酮-PGF_{1a}(前列环素)试剂盒和内皮素1(ET-1)试剂盒,均为北京普尔伟业生物科技有限公司产品。二步法非免疫血清、生物素二抗、辣根酶标记的链酶亲和素试剂盒(PV6001)、DAB显色试剂盒、兔抗大鼠Bcl-2抗体、Bax单克隆抗体,均为中山杉生物技术公司提供。生物素化二抗试剂盒(SP0023)和Caspase-3单克隆抗体,均为北京博奥森公司产品。DP72型光学成像分析系统,为日本OLYMPUS产品。GC-911 r放射免疫计数器,中国科大中佳公司生产。京都II型血糖检测仪,日本ARKRAY, Inc株式会社产品。TGL-168高速台式离心机,上海安亭科学仪器厂生产。IU400自动血生化仪,日本Olympus公司生产。600型电热恒温三用水箱,北京市永光明医疗器械厂产品。DY89-II型电动玻璃匀浆机,宁波新芝生物科技股份有限公司生产。LEICA-RM2135石蜡切片机,德国莱卡公司产品。DNM-9602G酶标分析仪,北京普朗新技术有限公司生产。

1.3 动物分组与处理

SD大鼠40只,雄性,随机选取其中8只作为正常对照组,其余32只尾静脉注射30 mg/kg STZ(柠檬酸盐缓冲液配制而成, pH 4.5),正常对照组大鼠同等体积的缓冲液作对照。造模后3天,禁食12 h后剪大鼠尾尖部取血,血糖仪现场测定血糖浓度,28

只大鼠血糖均高于 16.7 mmol/L, 显示 1 型糖尿病造模成功。然后将造模成功的 28 只大鼠随机选取 24 只, 随机分为糖尿病模型组 50 mg/kg PC 治疗组和 100 mg/kg PC 治疗组, 每组 8 只。连续每日灌胃给药 12 周, 正常对照组和糖尿病模型组大鼠每日灌服等量蒸馏水。每间隔 2 周测定大鼠体重调整给药剂量 1 次。实验结束时, 首先将各组大鼠禁食水 12 h, 然后按随机实验顺序, 依次采用 5% 水合氯醛腹腔麻醉, 剪大鼠尾尖部取血, 血糖仪现场测定血糖浓度, 然后心室内相继取血 2 次。第一次取血 3 mL, 注入含有抑肽酶 40 μ L 和 7.5% EDTA 二钠 30 μ L 的试管中, 混匀, 4 $^{\circ}$ C、3000 r/min, 10 min, 留取血浆, -20 $^{\circ}$ C 冰柜存放待测内皮素。第二次取血 3 mL, 注入装有 0.2 mL 消炎痛-EDTA、Na₂ 液试管中混匀, 4 $^{\circ}$ C、3500 r/min, 离心 15 min, 留取血浆, -20 $^{\circ}$ C 存放待测前列环素。取血后迅速取出胸主动脉, 以冰盐水冲洗, 剪取主动脉一块放入 10% 中性甲醛内, 24 h 后石蜡包埋; 另一块动脉纵向剖开, 在冰盒上剥离的血管内皮, 立即在冰冷生理盐水中漂洗, 滤纸吸干并称重, 置 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中保存。测定指标时将所有标本取出, 用移液管吸取生理盐水(按 4 mL/1 mg), 加入有组织的塑料离心管, 用眼科小剪尽快将血管内皮组织块剪碎, 然后用捣碎机将组织捣碎, 3000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 用于测定 SOD 和 MDA。

1.4 血液和血管内皮指标检测

用血糖仪及专用血糖试纸现场检测大鼠血糖。前列环素和内皮素测定均利用液相竞争抑制原理, 采用非平衡法进行血液样品放射性测定, 结合标准曲线, 测定浓度。血管内皮组织 MDA 含量的测定采用硫代巴比妥酸(TBA)比色法测定, 通过黄嘌呤及黄嘌呤氧化酶反应法测定 SOD 活力。

1.5 HE 染色和免疫组化染色

HE 染色: 主动脉组织石蜡包埋, 进行 5 μ m 系列切片, 常规 HE 染色, 中性树脂封片。

免疫组织化学染色: 主动脉石蜡包埋块常规切片、脱蜡和高压修复抗原; 3% 过氧化氢溶液处理以去除内源性过氧化物酶; 滴加 1:100 稀释的滴加第一抗体(bcl-2, bax), 4 $^{\circ}$ C 过夜; 滴加辣根酶标记羊抗兔 IgG 多聚体(PV 6001), 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min; 滴加生物素化第二抗体, 37 $^{\circ}$ C 20 min; 滴加辣根酶标记链霉亲和素工作液, 37 $^{\circ}$ C 20 min; 使用 DAB 显色试剂盒 1 mL 蒸馏水加显色剂 A、B、C 各一滴, 混匀, 加至标本上, 显色 6 min, 充分水洗; 苏木素复染细胞核 1 min, 充分水洗, 1% 盐酸酒精分化、1% 胺水反蓝、充分水洗、经乙

醇逐级脱水、二甲苯透明, 最后中性树脂封片。Caspase-3 检测: 一抗洗涤后, 滴加生物素化羊抗兔 IgG(SP0023), 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min; 滴加试剂 SP, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min; DAB 显色。其余步骤同上。

1.6 量化分析

Olympus 成像分析系统高倍镜下观察和采集显微图像, 采用美国显微镜图像分析测量软件 Image-Pro Plus 6.0 量化分析单个内皮细胞平均光密度值(mean-density), 黄色为阳性表达, 逐项分析 Caspase-3、Bcl-2 以及 Bax 的表达情况。分析时, 每个切片随机选取 5 个视野, 每视野采集单个内皮细胞的棕黄色灰度值并自动转化成光密度值, 计算 5 个视野平均光密度值的平均值, 以此作为该切片的蛋白表达值。每只大鼠取 3 张连续切片完成量化分析, 将 3 张切片的平均值作为该大鼠的实验数据。

1.7 统计学处理

采用 SPSS13.0 软件完成实验数据的统计分析。实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用单因素方差分析及 LSD 法对计量资料组间差异进行分析和比较, $P < 0.05$ 组间差异统计学意义显著。

2 结果

2.1 原花青素对糖尿病大鼠空腹血糖水平和体重的影响

糖尿病模型组大鼠空腹血糖水平显著高于正常对照组($P < 0.01$); 低剂量原花青素保护组, 糖尿病大鼠空腹血糖水平略低于糖尿病模型组($P < 0.05$); 高剂量原花青素保护组, 糖尿病大鼠空腹血糖水平明显低于糖尿病模型组($P < 0.01$)。结果表明, 低和高剂量原花青素对糖尿病大鼠空腹血糖增高有抑制作用。糖尿病模型组大鼠体重显著低于正常对照组($P < 0.01$); 低剂量原花青素保护组和高剂量原花青素保护组, 糖尿病大鼠体重与糖尿病模型组比较, 组间差异均无统计学意义($P < 0.05$; 表 1)。

2.2 原花青素对糖尿病大鼠血管内皮细胞分泌功能和氧化性损伤的影响

糖尿病模型组大鼠血清 PGI₂ 含量显著低于正常对照组($P < 0.01$), ET-1 含量高于正常对照组($P < 0.01$); 低剂量和高剂量原花青素组, 大鼠血清 PGI₂ 含量均高于糖尿病模型组($P < 0.01$) 大鼠血清 ET-1 含量均低于糖尿病模型组($P < 0.01$)。表明低和高剂量原花青素对糖尿病大鼠血管内皮细胞分泌功能有调节作用。糖尿病模型组大鼠血管内皮组织 MDA 含量明显高于正常对照组($P < 0.01$); 低和高剂量原

花青素组,大鼠血管内皮组织 MDA 含量均低于糖尿病模型组($P < 0.01$)。表明低和高剂量原花青素对糖尿病大鼠血管内皮细胞脂质过氧化有保护作用。糖尿病模型组大鼠血管内皮组织 SOD 含量明显低于

正常对照组($P < 0.01$);低和高剂量原花青素组,大鼠血管内皮组织 SOD 含量均高于糖尿病模型组($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$;表 2)。

表 1. 原花青素对糖尿病大鼠空腹血糖水平和体重的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1. The influence of Procyanidins on fasting blood glucose level and body weight in diabetic rats

项 目	正常对照组	糖尿病模型组	50 mg/kg PC 治疗组	100 mg/kg PC 治疗组
空腹血糖 (mmol/L)	5.38 ± 0.94	18.6 ± 3.92 ^a	15.2 ± 1.20 ^b	12.7 ± 1.73 ^c
大鼠体重(g)	409.6 ± 39.9	191.9 ± 35.8 ^a	196.1 ± 10.9	208.1 ± 42.0

a 为 $P < 0.01$,与正常对照组比较;b 为 $P < 0.05$,c 为 $P < 0.01$,与糖尿病模型组比较。

表 2. 原花青素对糖尿病大鼠血管内皮细胞分泌功能和氧化性损伤的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2. The influence of Procyanidins on secretion function and oxidative damage of vascular endothelial cell in diabetic rats

分 组	ET-1 (ng/L)	PGI2 (ng/L)	MDA (mmol/L)	SOD (kU/L)
正常对照组	58.7 ± 8.99	825.8 ± 36.2	1.57 ± 0.12	44.8 ± 5.54
糖尿病模型组	95.8 ± 14.9 ^a	280.4 ± 55.6 ^a	5.95 ± 0.87 ^a	26.8 ± 6.49 ^a
50 mg/kg PC 治疗组	74.9 ± 5.28 ^c	410.4 ± 47.3 ^c	4.53 ± 0.93 ^c	33.3 ± 4.85 ^a
100 mg/kg PC 治疗组	68.9 ± 6.08 ^c	740.3 ± 70.3 ^c	3.62 ± 1.09 ^c	37.9 ± 3.14 ^c

a 为 $P < 0.01$,与正常对照组比较;b 为 $P < 0.05$,c 为 $P < 0.01$,与糖尿病模型组比较。

2.3 原花青素对糖尿病大鼠血管内皮细胞凋亡相关蛋白表达的影响

糖尿病模型组,大鼠血管内皮 Caspase-3 和 Bax 蛋白表达均强于正常对照组($P < 0.01$),同时 Bcl-2 蛋白表达,及 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达比值 (Bcl-2/

Bax)均弱于正常对照组($P < 0.01$);低剂量和高剂量 PC 治疗组,血管内皮 Caspase-3 和 Bax 蛋白表达均弱于糖尿病模型组(均 $P < 0.01$),同时 Bcl-2 蛋白表达,及 Bcl-2/Bax 均弱于糖尿病模型组($P < 0.01$;表 3 和图 1)。

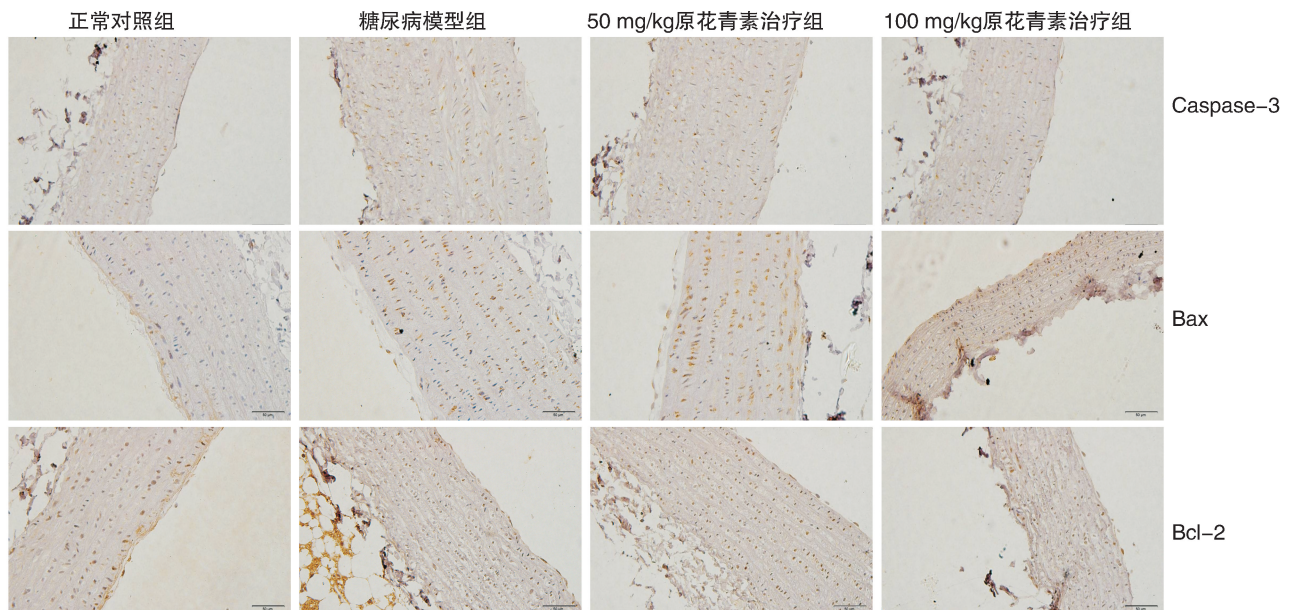


图 1. 原花青素对糖尿病大鼠血管内皮细胞凋亡相关蛋白表达的影响($\times 400$)

Figure 1. The influence of Procyanidins on apoptosis related protein expression of vascular endothelial cell in diabetic rats ($\times 400$)

表 3. 原花青素对糖尿病大鼠血管内皮细胞凋亡相关蛋白表达(平均光密度值)的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 3. The influence of Procyanidins on apoptosis related protein expression(mean-density) of vascular endothelial cell in diabetic rats

分 组	Caspase-3	Bax	Bcl-2	Bcl-2/Bax
正常对照组	0.47 ± 0.06	0.59 ± 0.11	1.82 ± 0.16	3.16 ± 0.66
糖尿病模型组	0.97 ± 0.14 ^a	0.98 ± 0.09 ^a	0.68 ± 0.08 ^a	0.71 ± 0.11 ^a
50 mg/kg PC 治疗组	0.73 ± 0.09 ^b	0.70 ± 0.08 ^b	1.08 ± 0.18 ^b	1.56 ± 0.33 ^b
100 mg/kg PC 治疗组	0.56 ± 0.11 ^b	0.64 ± 0.07 ^b	1.26 ± 0.18 ^b	1.98 ± 0.28 ^b

a 为 $P < 0.01$, 与正常对照组比较; b 为 $P < 0.01$, 与糖尿病模型组比较。

3 讨 论

内皮素(ET-1)和前列环素(PGI₂)是血管内皮细胞产生和分泌的重要活性因子,分别具有收缩和舒张血管等生物活性,是研究检测血管内皮细胞功能的主要指标^[15-17]。本实验中,糖尿病大鼠血 ET-1 浓度增高而 PGI₂ 浓度降低,反映血管内皮细胞分泌收缩性活性因子占优势,而 50 mg/kg 和 100 mg/kg 原花青素对糖尿病大鼠血管内皮细胞分泌 ET-1 和 PGI₂ 功能有调节作用,抑制 ET-1 分泌同时促进 PGI₂ 分泌,这有利于降低血管的收缩性。

糖尿病血管内皮细胞分泌功能紊乱,氧化性损伤可能是重要原因,因为血液中高糖、糖基化血红蛋白、氧化性低密度脂蛋白等都可引起^[18]。此外,血管内皮细胞内系列抗氧化酶活性下降,也有助于氧化性损伤的发生。本试验中 50 mg/kg 和 100 mg/kg 原花青素对糖尿病大鼠血管内皮细胞脂质过氧化损伤指标 MDA 有抑制作用,对主要抗氧化酶 SOD 有保护作用,显示原花青素对糖尿病大鼠血管内皮细胞氧化性损伤有抑制作用,这可能是其调节血管内皮分泌功能的原因之一。

糖尿病发病过程,高糖和糖基化血红蛋白等诸多因素还可调控多系列凋亡相关基因促进血管内皮细胞凋亡过程,降低内皮细胞功能,在血管性疾病的发生和发展过程中发挥着重要作用^[19-20]。现代研究认为,细胞在接受凋亡信号后凋亡调控蛋白间发生相互作用,促使蛋白水解酶的活化,引起细胞膜、线粒体和染色体结构改变等一系列连续反应过程,导致细胞凋亡,因此, Caspase-3 等多种蛋白水解酶的表达增强常作为启动凋亡的重要标志^[21]。Bcl-2 和 Bax 蛋白就是一对重要的凋亡调控蛋白,它们分别与凋亡呈负相关和正相关, Bcl-2/Bax 比值也被许多学者作为评价凋亡调控的重要指标^[20]。本实验糖尿病大鼠血管内皮细胞 Caspase-3 和 Bax 表达均增强,而 Bcl-2 表达减弱, Bcl-2/Bax 比值降低,

表明凋亡启动信号明显, 50 mg/kg 和 100 mg/kg 原花青素可抑制 Caspase-3 和 Bax 表达,提高 Bcl-2 表达,并提高 Bcl-2/Bax 比值。这表明原花青素可通过提高 Bcl-2/Bax 比值,抑制 Caspase-3 引发凋亡,抑制糖尿病血管内皮细胞细胞凋亡过程。这可能也是原花青素调节保护血管内皮细胞功能的原因之一。

目前研究表明,高血糖在糖尿病氧化性损伤和凋亡过程中发挥关键的促进作用。本实验 50 mg/kg 和 100 mg/kg 原花青素对糖尿病大鼠空腹血糖增高有抑制作用,也可能是其对抗血管内皮细胞氧化性损伤和凋亡的重要因素。

原花青素对糖尿病血管内皮细胞的调节保护作用,使我们有理由相信,原花青素在糖尿病血管并发症形成过程中可能有进一步研究和开发价值。

[参考文献]

- [1] Chen YY, Chen J, Hu JW, et al. Enhancement of lipopolysaccharide-induced toll-like receptor 2 expression and inflammatory cytokine secretion in HUVECs under high glucose conditions[J]. Life Sci, 2013, 92(10): 582-588.
- [2] Friberg J, Tonnesen MF, Heller S, et al. Inhibition of the nuclear factor- κ B pathway prevents beta cell failure and diet induced diabetes in Psammomys obesus[J]. PLoS One, 2010, 5(10): 133-141.
- [3] 张小军, 夏春镗, 吴建铭, 等. 原花青素的资源研究[J]. 中药材, 2009, 32(6): 1 154-158.
- [4] 韩彩和, 韩怡文, 富环, 等. 银杏叶及葡萄籽提取物体外抑制蛋白糖化终末产物生成作用的研究[J]. 中国药理学杂志, 2004, 39(7): 507-509.
- [5] 刘湘红, 郭松超, 李艳飞, 等. 葡萄籽原花青素对 2 型糖尿病大鼠血清中 SOD GSH MDA 及 NO 表达的影响[J]. 中国药物与临床, 2008, 3: 193-195.
- [6] 姜燕飞, 张召锋, 鲍雷, 等. 原花青素长期干预对 II 型糖尿病氧化应激水平的影响[J]. 食品科学, 2013, 7: 262-265.
- [7] 贾玉洁, 姜兴千, 张状, 等. 原花青素对 2 型糖尿病大

- 鼠局灶性脑缺血再灌注后脑组织 Bel-2 和 Caspase-3 蛋白表达的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2014, 6: 28-31.
- [8] Aldini G, Carini M, Piccoli A, et al. Procyanidins from grape seeds protect endothelial cells from peroxynitrite damage and enhance endothelium-dependent relaxation in human artery: new evidences for cardio-protection[J]. Life Sci, 2003, 73(22): 2 883-898.
- [9] Kenny TP, Keen CL, Jones P, et al. Cocoa procyanidins inhibit proliferation and angiogenic signals in human dermal microvascular endothelial cells following stimulation by low-level H₂O₂[J]. Exp Biol Med (Maywood), 2004, 229(8): 765-771.
- [10] García-Conesa MT, Tribolo S, Guyot S, et al. Oligomeric procyanidins inhibit cell migration and modulate the expression of migration and proliferation associated genes in human umbilical vascular endothelial cells[J]. Mol Nutr Food Res, 2009, 53(2): 266-276.
- [11] Byun EB, Ishikawa T, Suyama A, et al. A procyanidin trimer promotes NO production in rat aortic endothelial cells via both hyperpolarization and PI3K/Akt pathways[J]. Eur J Pharmacol, 2012, 692(3): 52-60.
- [12] Kaufeld AM, Pertz HH, Kolodziej H. 2, 3-cis-procyanidins elicit endothelium-dependent relaxation in porcine coronary arteries via activation of the PI3/Akt kinase signaling pathway[J]. J Agric Food Chem, 2013, 61(40): 9 609-616.
- [13] 王桂霞, 刘义, 杨春玲. 原花青素对血管内皮细胞过氧化氢损伤的保护作用[J]. 中国动脉硬化杂志, 2009, 17(3): 193-196.
- [14] 于晗, 刘义. 原花青素对心肌缺血再灌注损伤大鼠血管内皮细胞活性因子的研究[J]. 中国分子心脏病学杂志, 2011, 11(2): 94-97.
- [15] Corder R, Warburton RC, Khan NQ, et al. The procyanidin-induced pseudo laminar shear stress response: a new concept for the reversal of endothelial dysfunction[J]. Clin Sci (Lond), 2004, 107(5): 513-517.
- [16] 张风雷, 高海青, 沈琳, 等. 葡萄籽原花青素对 AGEs 诱导的内皮细胞分泌 NO 及 ET-1 的影响[J]. 中国老年学杂志, 2007, 12: 1 148-151.
- [17] Shih MF, Cherng JY. Reduction of adhesion molecule Production and alteration of eNOS and endothelin-1 mRNA expression in endothelium by euphorbia hirta L. through its beneficial β -amyrin molecule[J]. Molecules, 2014, 19(7): 10 534-545.
- [18] Puiggros F, Llopiz N, Ardevol N, et al. Grape seed procyanidins prevent oxidative injury by modulating the expression of antioxidant enzyme systems[J]. J Agric Food Chem, 2005, 53: 6 080-086.
- [19] Vannini N, Pfeffer U, Lorusso G, et al. Endothelial cell aging and apoptosis in prevention and disease: E-selectin expression and modulation as a model[J]. Curr Pharm Des, 2008, 14(3): 221-225.
- [20] Aminzadeh A, Dehpour AR, Safa M, et al. Investigating the Protective Effect of Lithium Against High Glucose-Induced Neurotoxicity in PC12 Cells: Involvements of ROS, JNK and P38 MAPKs, and Apoptotic Mitochondria Pathway[J]. Cell Mol Neurobiol, 2014, [Epub ahead of print].
- [21] Huang Y, Dong F, Du Q, et al. Swainsonine Induces Apoptosis through Mitochondrial Pathway and Caspase Activation in Goat Trophoblasts[J]. Int J Biol Sci, 2014, 10(7): 789-797.

(此文编辑 李小玲)