

原花青素对苯肾上腺素诱导的心肌肥大保护机制研究

丁文文^a, 夏鸿^a, 周静^a, 缪园欣^b(荆楚理工学院, a.医学院, b.生物工程学院, 湖北 荆门 448000)

摘要: 目的 探讨葡萄籽原花青素(grape seed proanthocyanidins, GSP)对苯肾上腺素(phenylephrine, PE)诱导的乳鼠心肌肥大的保护作用及其机制。方法 采用 PE(20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)刺激 48 h 建立乳鼠心肌肥大模型, 分为正常对照组、模型组和 GSP 低、中、高剂量组(10, 20, 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。持续给药 48 h 后, 采用 Image J 测定心肌细胞面积, Western blotting 检测心钠素和 β -肌凝蛋白重链的表达。后续实验分组: 正常对照组、模型组、GSP 阴性对照组、GSP 中剂量组, 采用荧光探针 DCFDA 检测活性氧含量, 采用试剂盒分别检测细胞内超氧化物歧化酶活性(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛含量、上清液乳酸脱氢酶活性, Western blotting 检测 RhoA 蛋白和 ROCK 活性。结果 与模型组相比, GSP 干预能够明显降低心肌细胞面积($P<0.05$), 减少肥大基因心钠素和 β -肌凝蛋白重链的表达($P<0.05$), 并且降低活性氧荧光含量($P<0.05$), 升高 SOD, 明显降低丙二醛以及乳酸脱氢酶活性($P<0.05$), 明显抑制 RhoA 蛋白和 ROCK 活性($P<0.05$)。结论 GSP 对心肌肥大的保护作用与抑制活性氧、RhoA/ROCK 信号通路活化有关。

关键词: 心肌肥大; 原花青素; 活性氧; RhoA; ROCK

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2021)15-1820-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2021.15.005

引用本文: 丁文文, 夏鸿, 周静, 等. 原花青素对苯肾上腺素诱导的心肌肥大保护机制研究[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(15): 1820-1825.

Study on Protective Mechanism of Proanthocyanidins on Phenylephrine-induced Cardiac Hypertrophy

DING Wenwen^a, XIA Hong^a, ZHOU Jing^a, MIAO Yuanxin^b(Jingchu University of Technology, a.School of Medical, b.School of Biological Engineering, Jingmen 448000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the protective effect and mechanism of grape seed proanthocyanidins(GSP) on phenylephrine(PE)-induced cardiac hypertrophy in neonatal rats. **METHODS** A model of neonatal cardiac hypertrophy was established by PE(20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) stimulation for 48 h, which was divided into normal control group, model group, GSP low, medium, and high dose group(10, 20, 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). After 48 h of continuous administration, Image J was used to measure the area of cells, Western blotting was used to detect the expression of atrial natriuretic peptide(ANP) and β -myosin heavy chain(β -MHC). Subsequent experimental groups: normal control group, model group, GSP negative control group, GSP medium dose group, fluorescent probe DCFDA was used to detect reactive oxygen species(ROS) content, kits were used to detect intracellular superoxide dismutase(SOD) activity, malondialdehyde(MDA) content, lactate dehydrogenase(LDH) activity of supernatant, Western blotting was used to detect RhoA protein and ROCK activity. **RESULTS** Compared with control group, GSP intervention could significantly reduce the area of cardiomyocytes($P<0.05$), reduce the expression of hypertrophic genes ANP and β -MHC($P<0.05$), and reduce the fluorescence content of ROS($P<0.05$), improve SOD activity, reduce MDA content and LDH activity($P<0.05$), and significantly inhibit RhoA protein and ROCK activity($P<0.05$). **CONCLUSION** The protective effect of GSP on cardiac hypertrophy is related to the inhibition of ROS and RhoA/ROCK signaling pathway.

KEYWORDS: cardiac hypertrophy; proanthocyanidins; reactive oxygen species(ROS); RhoA; ROCK

心脏肥大是心脏发病率增加的主要原因之一, 死亡率高, 因为它最终导致心肌缺血, 心律不齐, 心力衰竭, 猝死^[1-2]。RhoA 是一种小分子 G 蛋白, Rho 亚族的主要成员之一, 在心肌细胞中, 活化的 Rho 对肌原纤维组织有深远的影响, 能增加心肌肥大相关标志物 c-fos 和心钠素(atrial natriuretic peptide, ANP)的增高, 使用 Rho 激酶抑制剂可抑制内皮素-1, 血管紧张素 II 和苯肾上腺素(phenylephrine, PE)等各种刺激物引起的细胞收

缩, 从而改善心肌重构^[3-4]。Rho 相关卷曲螺旋形成的蛋白激酶(Rho-associated kinase, ROCK)是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 是第一个被发现的 RhoA 下游效应物, ROCK 通过调节下游的目标蛋白的磷酸化水平, 从而调控细胞的形态、骨架的重建。应用 ROCK 的抑制剂 Y-27632 足以防止各种刺激引起的心脏肥大^[5-6]。因此, RhoA/ROCK 信号级联反应是介导心脏肥大和心力衰竭发展的关键途径。近年来, 许多研究证明 RhoA/ROCK 信

基金项目: 荆楚理工学院校级重点项目(ZD202001); 湖北省教育厅中青年人才项目(Q20204305); 湖北省高等学校优秀中青年科技创新团队项目(T201819)

作者简介: 丁文文, 女, 博士, 讲师 Tel: 13165628385 E-mail: 529757605@qq.com

号途径是否激活与活性氧(reactive oxygen species, ROS)具有相关性^[7], 如 Jernigan 等^[8]证实 RhoA/ROCK 信号响应内皮素-1 诱导的心肌肥大是 ROS 介导的。在 2015 年, Dong 等^[9]证实, ROS 特异性抑制剂超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)模拟物(MnTBAP)能减轻 PE 诱导的 ROCK 活性增高。由此可见, ROS-RhoA/ROCK 信号轴在病理性心肌肥厚中重要作用已成共识。

葡萄籽原花青素(grape seed proanthocyanidins, GSP)是一种从葡萄籽提取分离的天然化合物, 属于多酚物质, 研究报道 GSP 可抑制氧化应激、细胞凋亡、炎症反应等, 用于抗氧化、抗衰老等^[10-11]。在心血管领域, GSP 具有广阔前景。Bagchi 等^[12]报道 GSP 通过氧化应激通路改善了缺血后左心室功能, 减少了心肌梗死面积。最新的数据表明 GSP 明显减轻各种心肌病理损伤, 抑制自发性高血压大鼠左室重塑, 其效果与卡托普利一致, 但关于其改善左室重塑机制并不明确^[13-14]。鉴于 GSP 有较强抗氧化活性, 本课题拟从 ROS-RhoA/ROCK 信号途径来查明 GSP 的保护机制, 以期找到新的治疗心肌肥大的药物。

1 材料

1.1 试剂

GSP(瑞士阿达玛斯试剂有限公司, 批号: P04460; 纯度>95%); β -actin 抗体(北京博奥森生物技术有限公司, 批号: AG07197903); 血清(杭州四季青生物工程材料有限公司, 批号: 19090501); 高糖培养基(DMEM)(批号: AD24926277), 青、链霉素双抗(批号: J130071)均购自 Hyclone; II 型胶原酶(Worthington, 批号: F8H18380); BCA 蛋白浓度测定试剂盒(批号: 120720210514)、Western blotting 发光液(批号: 112020210209)均购自碧云天; PE(上海禾丰制药有限公司, 批号: 07170201); 单克隆鼠抗 ANP(货号: sc-20158)、单克隆兔抗 β -MHC(货号: sc-20641)均购自 Santa Cyuz; 单克隆兔抗 RhoA(CST, 货号: 2117S); 单克隆兔抗 tMBS(货号: sc-25618)、单克隆兔抗 pMBS(货号: sc-37751)均购自 Santa Cruz; 辣根过氧化物酶标记山羊抗兔免疫球蛋白(批号: 103349)、山羊抗鼠(批号: 105525)均购自中杉金桥生物技术公司; 乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH, 批号: 20140117)、丙二醛(malondialdehyde, MDA, 批号: S0131S)、SOD(批

号: S0109)检测试剂盒均购自南京建成; 二氢荧光素乙酰乙酸(2',7'-dichlorofluorescein diacetate, DCFDA)(Invitrogen 公司, 货号: D399)。

1.2 仪器

1658033 电泳仪(美国 Bio-Rad 公司); Tanon4200 蛋白发光凝胶成像系统(上海天能科技有限公司); DFM-80D 荧光显微镜(上海蔡康光学仪器有限公司)。

1.3 动物

正常新生 SD 乳鼠, 1~3 d 龄, 雌雄不限, 200 只, 由湖北省实验动物中心研究所提供。动物合格证等级为 SPF 清洁级, 动物合格证号 42000600036156。

2 方法

2.1 乳鼠心肌细胞培养

取新生的 SD 乳鼠(1~3 d 龄), 置于 75%酒精中皮肤消毒, 取出心脏, 用胰蛋白酶冰上 4℃过夜消化 12~16 h, 次日, 37℃恒温水浴, 以每只 2 mg II 型胶原酶消化, 每次消化 10 min 直至形成单细胞悬液, 5%CO₂、37℃培养箱中培养 1 h 后去除成纤维细胞, 细胞重悬, 计数后接种于培养皿中, 加入 5-Brdu 使其终浓度为 0.1 mmol·L⁻¹。在培养箱中培养 24 h 后, 按照实验设计需求随机分组加入干预因素。其中, PE 浓度为 20 μ mol·L⁻¹, 培养 48 h^[15]。

2.2 细胞试验分组

正常对照组: 正常细胞培养, 不做任何处理; 模型组: 加入 PE(20 μ mol·L⁻¹)作用 48 h; GSP 阴性对照组: 加入 GSP(20 μ mol·L⁻¹)作用 48 h; GSP 低剂量组: 同时加入 PE(20 μ mol·L⁻¹)和 GSP(10 μ mol·L⁻¹)作用 48 h; GSP 中剂量组: 同时加入 PE(20 μ mol·L⁻¹)和 GSP(20 μ mol·L⁻¹)作用 48 h; GSP 高剂量组: 同时加入 PE(20 μ mol·L⁻¹)和 GSP(50 μ mol·L⁻¹)作用 48 h。

2.3 胞内 ROS 水平分析

ROS 含量利用 DCFDA 进行检测。培养 48 h 后的各组细胞, 用 PBS 清洗 3 次, 按照 1:1000 用无血清培养液稀释 DCFDA, 使终浓度为 10 μ mol·L⁻¹。加入的体积以能充分盖住细胞为宜。37℃细胞培养箱内孵育 30 min。再用 PBS 清洗 2 次, 以充分去除未进入细胞内的 DCFDA, 置于荧光显微镜拍照并分析胞内产生荧光强度的变化, 以此反映细胞内 ROS 水平。

2.4 LDH 活性、细胞内 MDA 含量和 SOD 活性测定

取各组细胞培养液遵照试剂盒使用说明测定 LDH 活性。各组细胞经处理后, 吸弃原培养液, 用 PBS 洗 3 次, 置-80℃冰箱反复冻融, 取上清液, 按试剂盒操作步骤测定 MDA 含量和 SOD 活性。

2.5 Western blotting 检测蛋白表达

提取各组总蛋白, BCA 试剂盒检测蛋白浓度。从各样品中取等量的蛋白并加入 5×上样缓冲液, 充分混匀后在 100℃的干式恒温器上加热 10 min, 使蛋白充分变性, 根据目的蛋白的分子量配制适宜浓度的 SDS-PAGE 胶, 点样后用 100 V 恒压进行电泳。电泳结束, 于 4℃冰上转膜至 PVDF 膜, 室温摇床牛血清白蛋白封闭 1 h 后加入一抗(ANP, 1:1 000; β -MHC, 1:1 000; RhoA, 1:500; pMBS, 1:200; tMBS, 1:200; β -actin, 1:5 000)过夜。次日, TBST 漂洗 30 min 加入二抗, 室温孵育 1 h, TBST 再清洗 30 min, ECL 发光, 采用凝胶成像分析系统采集图像, Image J 软件进行灰度分析。

2.6 统计学分析

实验所得数据采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。多组间比较采用单因素方差分析, 方差齐时采用 LSD 法, 方差不齐时采用 Dunnett's T3 法。正常对照组蛋白结果分析数据归一化, s 由 3 次实验结果归化前数值算出。

3 结果

3.1 GSP 对 PE 诱导的心肌细胞面积的影响

经 PE 处理 2 d 的心肌细胞显示, 与正常对照组相比, 模型组细胞面积显著升高($P < 0.01$); 用不同浓度的 GSP 处理心肌细胞 48 h, 随着 GSP 浓度的增大, 对心肌细胞面积的抑制作用逐渐增强, 其中原花青素低剂量组细胞面积为 $(1\ 007.6 \pm 165.5) \mu\text{m}^2$, 与正常对照组和模型组相比, 差异均有统计学意义($P < 0.05$), 而中剂量组和高剂量组的 GSP 可将扩大的细胞表面积减少至 $(902.2 \pm 101.4) \mu\text{m}^2$ 和 $(842.6 \pm 80.7) \mu\text{m}^2$, 与正常对照组相比差异无统计学意义, 与模型组相比差异具有统计学意义($P < 0.05$)。结果见表 1。

3.2 GSP 对 PE 诱导的心肌肥大基因的影响

与正常对照组相比, PE 将 ANP 和 β -MHC 的蛋白表达提高了约 2 倍($P < 0.05$)。GSP 呈剂量依赖性抑制 PE 诱导的 ANP 和 β -MHC 增加。与模型组

相比, 低剂量的 GSP 明显降低 ANP 和 β -MHC 蛋白表达($P < 0.05$), 但与正常对照组相比, 差异仍然具有统计学意义($P < 0.05$)。而中剂量的 GSP 处理几乎可以完全抑制, 与模型组相比差异具有统计学意义($P < 0.05$)。因此, 在本实验后续研究中, 选择 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ GSP 作为治疗剂量。结果见图 1。

表 1 不同剂量 GSP 对心肌细胞面积的影响($\bar{x} \pm s$, $n=30$)
Tab. 1 Effects of different doses of GSP on cardiomyocyte area($\bar{x} \pm s$, $n=30$)

组别	细胞面积/ μm^2
正常对照组	789.7 $\pm$ 91.1
模型组	1 201.0 $\pm$ 140.4 ²⁾
原花青素低剂量组	1 007.6 $\pm$ 165.5 ¹⁾³⁾
原花青素中剂量组	902.2 $\pm$ 101.4 ³⁾
原花青素高剂量组	842.6 $\pm$ 80.7 ³⁾

注: 与正常对照组比较, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较, ³⁾ $P < 0.05$ 。
Note: Compared with normal control group, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; compared with model group, ³⁾ $P < 0.05$.

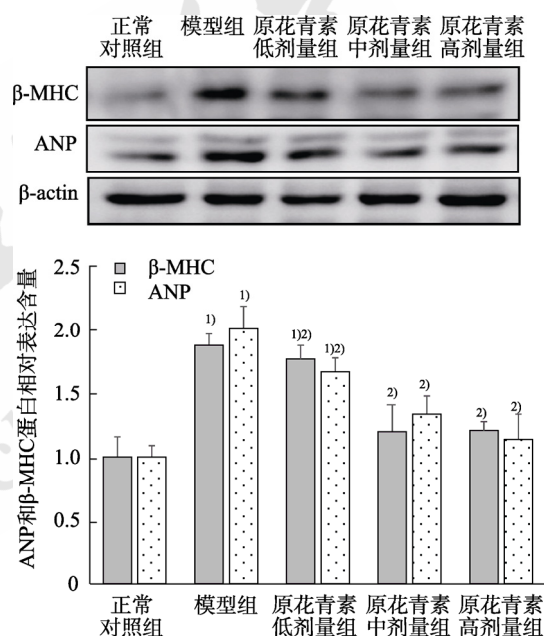


图 1 不同剂量 GSP 对 ANP、 β -MHC 蛋白的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)
与正常对照组相比, ¹⁾ $P < 0.05$; 与模型组相比, ²⁾ $P < 0.05$ 。

Fig. 1 Effects of different doses of GSP on ANP and β -MHC protein($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Compared with normal control group, ¹⁾ $P < 0.05$; compared the model group, ²⁾ $P < 0.05$.

3.3 GSP 对 PE 诱导的心肌细胞 ROS 的影响

为了探究 GSP 是否通过降低细胞内 ROS 水平抑制 ROCK, 笔者首先研究了 GSP 对 PE 诱导的 ROS 产生的影响。DCFDA 荧光染料反映心肌细胞内 ROS 水平, 图像分析结果显示, PE 处理后的细胞内 ROS 的水平增加(是正常对照组的 2.6 倍, $P < 0.05$)。与模型组相比, GSP 中剂量组 ROS 的水平明显下降。此外, 在没有 PE 的情况下, 单独加

入 GSP(GPS 阴性对照组)对细胞 ROS 没有直接影响。结果见图 2。

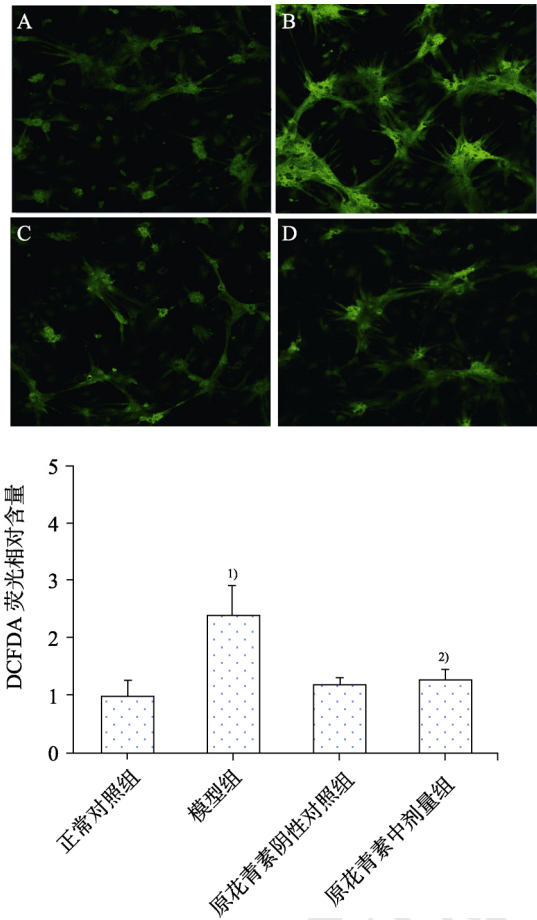


图2 GSP 对 PE 诱导的心肌细胞 ROS 的影响($\bar{x} \pm s, n=3, 20\times$)

A-正常对照组; B-模型组; C-原花青素阴性对照组; D-原花青素中剂量组; 与正常对照组相比, ¹⁾ $P<0.05$; 与模型组相比, ²⁾ $P<0.05$ 。

Fig. 2 Effect of GSP on PE-induced cardiomyocyte ROS ($\bar{x} \pm s, n=3, 20\times$)

A-normal control group; B-model group; C-proanthocyanidins negative control group; D-medium concentration of proanthocyanidins group; compared with normal control group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with model group, ²⁾ $P<0.05$ 。

3.4 GSP 对 PE 诱导的心肌细胞氧化应激指标的影响

与正常对照组相比, 模型组心肌细胞 LDH 活性、MDA 含量显著升高($P<0.01$), SOD 活性显著下降($P<0.01$)。与模型组相比, GSP 中剂量组明显降低 LDH 活性、MDA 含量, 并上调 SOD 活性, 差异均有统计学意义($P<0.05$)。GSP 阴性对照组对以上指标无显著影响。结果见表 2。

3.5 GSP 对 PE 诱导的心肌细胞 RhoA 和 ROCK 的影响

RhoA/ROCK 信号途径在心肌肥大的发生发展中具有重要作用。为了研究 GSP 的抗心肌肥大

作用是否与抑制 ROCK 信号级联有关, 本研究采用 pMBS 与 tMBS 的比率来表示 ROCK 活性, 该方法被广泛用于测定 ROCK 活性。

与正常对照组相比, 模型组使 RhoA 的蛋白表达和 ROCK 的活性增加 2 倍以上($P<0.05$), 这与 PE 刺激诱导 ANP 和 β -MHC 蛋白升高一致。与模型组相比, GSP 中剂量组使用 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 GSP 处理后, RhoA 蛋白表达和 ROCK 活性显著被抑制($P<0.05$)。提示 GSP 发挥抗心肌肥大作用是通过抑制 RhoA/ROCK 途径。结果见图 3。

表 2 GSP 对心肌细胞 LDH 活性、MDA 含量及 SOD 活性的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab. 2 Effects of GSP on LDH activity, MDA content and SOD activity of cardiomyocytes($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	LDH 活性/ $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$	SOD 活性/ $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$	MDA 含量/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$
正常对照组	30.88 ± 3.17	44.23 ± 4.38	0.613 ± 0.076
模型组	$80.72\pm9.41^{2)}$	$20.56\pm2.19^{2)}$	$0.967\pm0.135^{2)}$
原花青素阴性对照组	31.45 ± 3.65	43.78 ± 3.16	0.742 ± 0.071
原花青素中剂量组	$57.76\pm8.35^{1)3)}$	$36.51\pm4.30^{3)}$	$0.603\pm0.091^{3)}$

注: 与正常对照组相比, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$; 与模型组相比, ³⁾ $P<0.05$ 。
Note: Compared with normal control group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$; compared with model group, ³⁾ $P<0.05$ 。

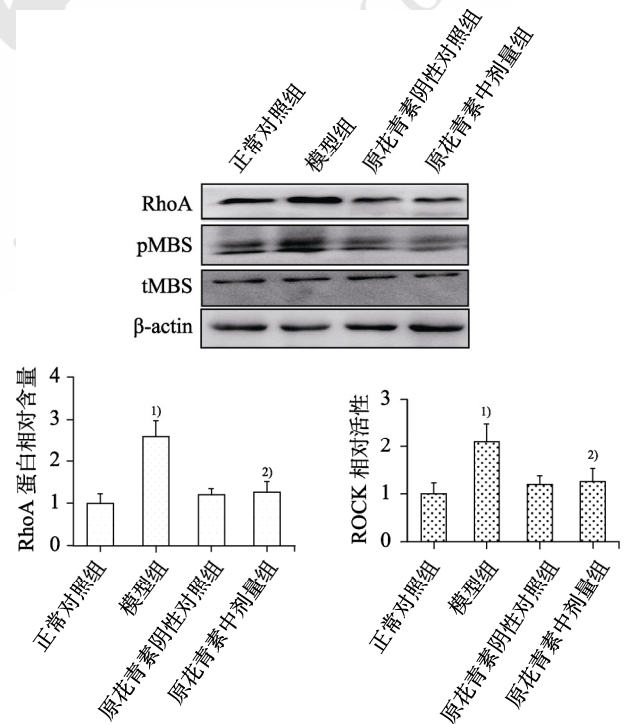


图3 GSP 对心肌细胞 RhoA 和 ROCK 的影响($\bar{x} \pm s, n=3$) 与正常对照组相比, ¹⁾ $P<0.05$; 与模型组相比, ²⁾ $P<0.05$ 。

Fig. 3 Effect of GSP on RhoA and ROCK of cardiomyocytes($\bar{x} \pm s, n=3$)

Compared with normal control group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with model group, ²⁾ $P<0.05$ 。

4 讨论

近年来,氧化应激与心肌肥厚的关系受到了国内外学者的关注。生理情况下,机体内产生的氧自由基量很少,主要调节细胞生长、基因表达、杀菌以及血管舒缩。病理情况下,当 ROS 生成速率大于被清除的速率时,造成 ROS 的蓄积,此时,ROS 通过下游信号级联反应,如 RhoA/ROCK 信号途径改变体内一系列的酶、细胞、分子、基因的表达,从而诱导心肌细胞的肥大,心肌间质的纤维化等,最终导致心肌肥厚^[16-17]。因此,一个普遍的共识就是 ROS 对 ROCK 激活有直接影响。

GSP 是由儿茶素和(或)表儿茶素组成的多酚类化合物,作为一种多酚物质,是公认的能有效清除体内自由基的天然物质,具有多种生物药理活性,如保护心血管、抗肿瘤、抗糖尿病和抗炎等^[18-24]。GSP 可通过抑制氧化应激,下调大鼠血清肌钙蛋白 I、MDA 表达水平,上调血清 SOD、谷胱甘肽过氧化物酶表达水平,减轻大鼠心肌损伤。张先杰等^[14]发现 GSP 可通过降低机体氧化应激水平从而改善高血压大鼠心室重构。GSP 减轻左室重塑,可能与降低收缩压、抑制氧化应激及下调 p47phox 蛋白表达有关。陈彦文等^[25]研究结果显示,GSP 可能通过下调 miR-34a 表达进而减轻 H₂O₂ 诱导的心肌细胞损伤。GSP 还通过激活 Nrf2/HO-1 信号通路减轻缺氧/复氧诱导的心肌细胞氧化损伤^[26]。然而,GSP 能否通过 ROS-RhoA/ROCK 信号通路抑制心肌肥大,尚无相关报道。本研究体外试验结果证实,GSP 具有抗肥大作用。给予 PE 刺激引起细胞内 ROS 和 MDA 增加,同时肥大基因 ANP 和 β -MHC 也显著增加,20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 GSP 治疗剂量显著抑制 PE 诱导的心肌肥大基因的表达,同时,抑制细胞内 ROS 的产生和 PE 诱导的 RhoA/ROCK 激活。GSP 具有类似于 ROS 清除剂 MnTBAP 的作用,废除了 PE 刺激对 ROS-RhoA/ROCK 信号通路的激活,因此,GSP 抑制 PE 激活 RhoA/ROCK 途径可以作为其抗肥大作用的机制之一。

综上所述,本实验验证了 GSP 体外抗肥大作用,GSP 可能具有潜在的治疗慢性心力衰竭的功效。但是,不能排除 GSP 通过其他非特定机制,需要进一步研究。

REFERENCES

- [1] SAMAK M, FATULLAYEV J, SABASHNIKOV A, et al. Cardiac hypertrophy: An introduction to molecular and cellular basis[J]. *Med Sci Monit Basic Res*, 2016(22): 75-79.
- [2] ZHANG Y B, MENG Y H, CHANG S, et al. High fructose causes cardiac hypertrophy via mitochondrial signaling pathway[J]. *Am J Transl Res*, 2016, 8(11): 4869-4880.
- [3] WINGARD C J, HUSAIN S, WILLIAMS J, et al. RhoA-Rho kinase mediates synergistic ET-1 and phenylephrine contraction of rat corpus cavernosum[J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2003, 285(5): R1145-R1152.
- [4] RAVAROTTO V, PAGNIN E, MAIOLINO G, et al. The blocking of angiotensin II type 1 receptor and RhoA/Rho kinase activity in hypertensive patients: Effect of olmesartan medoxomil and implication with cardiovascular-renal remodeling[J]. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, 2015, 16(4): 1245-1250.
- [5] SHIMIZU T, LIAO J K. Rho kinases and cardiac remodeling[J]. *Circ J*, 2016, 80(7): 1491-1498.
- [6] SHIMOKAWA H, SUNAMURA S, SATOH K. RhoA/rho-kinase in the cardiovascular system[J]. *Circ Res*, 2016, 118(2): 352-366.
- [7] MORIS D, SPARTALIS M, TZATZAKI E, et al. The role of reactive oxygen species in myocardial redox signaling and regulation[J]. *Ann Transl Med*, 2017, 5(16): 324. Doi: 10.2103T/atm.2017.06.17.
- [8] JERNIGAN N L, WALKER B R, RESTA T C. Reactive oxygen species mediate RhoA/Rho kinase-induced Ca²⁺ sensitization in pulmonary vascular smooth muscle following chronic hypoxia[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2008, 295(3): 515-529.
- [9] DONG M, DING W W, LIAO Y S, et al. Polydatin prevents hypertrophy in phenylephrine induced neonatal mouse cardiomyocytes and pressure-overload mouse models[J]. *Eur J Pharmacol*, 2015(746): 186-197.
- [10] PINENT M, CASTELL-AUVÍ A, GENOVESE M I, et al. Antioxidant effects of proanthocyanidin-rich natural extracts from grape seed and cupuassu on gastrointestinal mucosa[J]. *J Sci Food Agric*, 2016, 96(1): 178-182.
- [11] LIU X T, LIN X, MI Y L, et al. Grape seed proanthocyanidin extract prevents ovarian aging by inhibiting oxidative stress in the hens[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2018(2018): 9390810. Doi: 10.1155/2018/9390810.
- [12] BAGCHI D, SEN C K, RAY S D, et al. Molecular mechanisms of cardioprotection by a novel grape seed proanthocyanidin extract[J]. *Mutat Res*, 2003(523/524): 87-97.
- [13] NUNES M A, PIMENTEL F, COSTA A S G, et al. Cardioprotective properties of grape seed proanthocyanidins: An update[J]. *Trends Food Sci Technol*, 2016(57): 31-39.
- [14] 张先杰, 王晓玲, 黄霜枝, 等. 葡萄籽原花青素对自发性高血压大鼠左室重塑和氧化应激的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2018, 38(7): 1692-1694.
- [15] DING W W, XIA H, ZHOU J, et al. Low MiRP1 expression mediates neonatal rat cardiac hypertrophy in ERK1/2/PPAR α

- signal pathway[J]. Guangdong Med J(广东医学), 2018, 39(17): 2575-2578.
- [16] SRIRAMULA S, FRANCIS J. Tumor necrosis factor- α is essential for angiotensin II-induced ventricular remodeling: Role for oxidative stress[J]. PLoS One, 2015, 10(9): e0138372. Doi: 10.1371/journal.pone.0138372.
- [17] DAI Y, LUO W, CHANG J. Rho kinase signaling and cardiac physiology[J]. Curr Opin Physiol, 2018(1): 14-20.
- [18] SANNA R S, MUTHANGI S, B K C S, et al. Grape seed proanthocyanidin extract and insulin prevents cognitive decline in type 1 diabetic rat by impacting Bcl-2 and Bax in the prefrontal cortex[J]. Metab Brain Dis, 2019, 34(1): 103-117.
- [19] VISSER J, VAN STADEN P J, SOMA P, et al. The stabilizing effect of an oligomeric proanthocyanidin on red blood cell membrane structure of poorly controlled type II diabetes[J]. Nutr Diabetes, 2017, 7(5): e275. Doi: 10.1038/nutd.2017.25.
- [20] ALI RAJPUT S, SUN L, ZHANG N Y, et al. Ameliorative effects of grape seed proanthocyanidin extract on growth performance, immune function, antioxidant capacity, biochemical constituents, liver histopathology and aflatoxin residues in broilers exposed to aflatoxin B₁[J]. Toxins(Basel), 2017, 9(11): E371. Doi: 10.3390/toxins9110371.
- [21] DU Y M, HAN H D, GUO Z Y, et al. Effect of grape seed proanthocyanidin extract on cisplatin-induced apoptosis of mouse testicular sertoli TM4 cells[J]. Food Sci(食品科学), 2020, 41(9): 98-104.
- [22] NOWSHEHRI J A, BHAT Z A, SHAH M Y. Blessings in disguise: Bio-functional benefits of grape seed extracts[J]. Food Res Int, 2015, 77(3): 333-348.
- [23] LIU S X, MAO L F, YU F, et al. Pathogenesis of Alzheimer's disease and the therapeutic mechanism of natural polyphenols[J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2017, 26(23): 2799-2804.
- [24] CHEN N, JIANG T. Effects of grape seed procyanidins on pulmonary fibrosis rats induced by bleomycin[J]. Chin J New Drugs Clin Rem(中国新药与临床杂志), 2016, 35(1): 35-39.
- [25] CHEN Y W, XU M L. Study of the grape seed proanthocyanidin reducing hydrogen peroxide- inducedcardiacmuscle cell injury by down-regulating miR-34a[J]. Chin J Clin Pharmacol(中国临床药理学杂志), 2019, 35(18): 2051-2054.
- [26] MA L X, LUO H, FU G, et al. Proanthocyanidin in inhibiting hypoxia/reoxygenation-induced oxidative damage of H9c2 cardiomyocytes[J]. Chin J Clin Pharmacol(中国临床药理学杂志), 2020, 36(14): 2029-2032.

收稿日期: 2020-07-20

(本文责编: 沈倩)