

槲皮素对葡萄糖胺条件下血管内皮细胞损伤的影响

蔡夏夏, 鲍雷, 丁叶, 李雪, 戴小倩, 张召锋, 李勇*
(北京大学公共卫生学院营养与食品卫生系, 北京 100191)

摘要:目的: 观察内质网应激(ERS)在葡萄糖胺条件下加速血管内皮细胞损伤中的作用; 研究槲皮素(quercetin)是否通过调节内皮细胞的ERS相关分子来改善内皮细胞的损伤和功能。方法: 采用15mmol/L的葡萄糖胺诱导人脐静脉内皮细胞(HUVEC)损伤模型。实验分为空白对照组、正常对照组, 甘露醇等渗对照组(15mmol/L)、阳性对照组(5 μ g/mL衣霉素)、葡萄糖胺模型组及槲皮素不同剂量干预组。通过MTT法检测细胞存活率, ELISA法检测细胞上清中细胞间黏附分子(ICAM-1)、血管间黏附分子(VCAM-1)、内皮素-1(ET-1)等含量, Western blotting法检测内质网应激及凋亡相关蛋白的表达。结果: 葡萄糖胺能明显抑制HUVEC细胞生长, 增加HUVEC细胞上清中ICAM-1、ET-1含量($P < 0.05$), 增加细胞凋亡及内质网应激相关蛋白的表达, 槲皮素(主要是20 μ mol/L组)能明显降低ICAM-1、ET-1含量($P < 0.05$), 减少内质网应激相关蛋白的表达, 促进细胞生长。结论: 葡萄糖胺能通过激活ERS促进和加重血管内皮细胞损伤; 适当剂量的槲皮素可能通过抑制ERS相关通路来减轻炎症应激及凋亡最终改善内皮细胞损伤。
关键词: 人脐静脉内皮细胞; 内质网应激; 葡萄糖胺; 槲皮素

Effect of Quercetin on Vascular Endothelial Cell Injury under Glucosamine Treatment

CAI Xia-xia, BAO Lei, DING Ye, LI Xue, DAI Xiao-qian, ZHANG Zhao-feng, LI Yong*
(Department of Nutrition and Food Hygiene, School of Public Health, Peking University, Beijing 100191, China)

Abstract: This work aimed to investigate the effect of endoplasmic reticulum stress (ERS) on accelerating vascular endothelial cell injury under glucosamine treatment, and to study whether quercetin improves the cell damage and function via regulating ERS related molecules. Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were exposed to 15 mmol/L glucosamine to induce cell injury. Different groups of HUVEC cells were created by the following treatments: 15 mmol/L mannitol as isotonic control, 5 μ g/mL tunicamycin as positive control group, 15 mmol/L glucosamine and varying doses of quercetin (5, 10, 20, 50 μ mol/L and 100 μ mol/L). The cell survival rate, the concentrations of ICAM-1, VCAM-1 and ET-1 in culture supernatants, the expression of ERS and apoptosis related molecules were determined. Compared with the normal control group, glucosamine significantly suppressed cell growth, and increased the concentrations of ICAM-1 and ET-1 ($P < 0.05$). In addition, it upregulated the expression levels of ERS and apoptosis related proteins in HUVEC cells. However, quercetin (especially at the dose of 20 μ mol/L) significantly reduced concentrations of ICAM-1 and ET-1 ($P < 0.05$), downregulated the expression levels of ERS and apoptosis related proteins and the cell proliferation was enhanced. Glucosamine might promote and aggravate vascular endothelial cell injury by activating ERS while quercetin might improve vascular endothelial cell by inhibiting ERS signal pathway which may reduce inflammation and apoptosis.

Key words: human umbilical vein endothelial cells (HUVEC); endoplasmic reticulum stress (ERS); glucosamine; quercetin
中图分类号: R151.2 文献标志码: A 文章编号: 1002-6630(2013)13-0224-05
doi:10.7506/spkx1002-6630-201313047

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)导致的心脑血管疾病是发达国家病残率和死亡率最高的疾病^[1], 在我国也已成为导致成年人死亡的第一杀手。临床研究证实, 与

高同型半胱氨酸、胞内游离胆固醇一样, 糖尿病也是 AS 发生的独立危险因素。流行病学研究发现, 糖尿病患者发生AS的危险性是正常人的2~4倍^[2]。然而, 糖尿病致

收稿日期: 2013-02-19

基金项目: 国家自然科学基金项目(81172652); 高等学校博士学科点专项科研基金项目(20100001110060)

作者简介: 蔡夏夏(1988—), 女, 硕士研究生, 研究方向为营养与疾病。E-mail: caixiaxia1988@hotmail.com

*通信作者: 李勇(1958—), 男, 教授, 博士, 研究方向为营养与疾病。E-mail: liyong@bjmu.edu.cn

AS发生及发展的因素是多方面的,与多个信号反应通路和众多相关基因的表达调控有关。近年来研究显示,内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)在糖尿病动脉粥样硬化的发生发展中起重要作用^[3]。糖尿病机体长期处于高血糖状态使己糖胺途径过度激活,导致细胞内己糖胺产物水平升高。葡萄糖胺可能通过糖基化修饰相关蛋白质和蛋白质酶体,造成蛋白质在内质网腔内的累积,在这个过程中被称作非折叠蛋白反应(unfolded protein response, UPR)的ERS通路被持续激活,导致细胞病理学和一系列的组织功能紊乱,从而引发ERS。而内皮细胞损伤被认为是AS发生的始动环节,并且贯穿动脉粥样硬化发展的全过程^[4]。有研究发现5mmol/L葡萄糖胺可增加内皮细胞中ERS标志物的水平^[5],而且在内皮病变发生前即有发生^[6]。由此推测,葡萄糖胺通过引发ERS参与了糖尿病AS的发生,ERS可能是联系高血糖和AS的枢纽,是糖尿病AS发生发展的关键因素^[3]。它可能作为多种应激过程的共同通路,广泛地参与糖尿病AS的形成过程,被认为是糖尿病AS防治的新靶点。

研究表明,抗氧化剂通过对ERS的适当调节,可能在阻止或延缓糖尿病AS的发生发展中具有重要作用^[7]。槲皮素(querletin)是膳食中最丰富的黄酮类物质之一,多以苷的形式广泛存在于蔬菜、水果、茶叶等食物中,分子结构为羟基(—OH)取代骨架结构的3、5、7、3'、4'位上的H原子后形成的五羟基黄酮。本实验室的前期结果表明,槲皮素可以通过改善胰岛素抵抗和胰岛β细胞功能障碍对糖尿病具有一定的防治效果^[8]。在长期单纯高脂饮食或动脉损伤后短期高脂饮食建立的AS兔模型研究中发现,槲皮素减少了AS斑块的面积,改善了AS程度^[9-10]。然而,虽然槲皮素能够减少高脂条件下AS斑块的面积,并具有改善糖尿病的潜能,但是在糖尿病状态下能否延缓AS的发生文献中报道较少。为解决上述问题,本实验拟采用人脐静脉内皮细胞进行相关实验,观察ERS在葡萄糖胺条件下加速血管内皮细胞损伤中的作用;并且通过槲皮素预处理后,研究其是否通过调节内皮细胞的ERS相关分子来改善内皮细胞的损伤和功能,从而为槲皮素在临床营养治疗中的应用提供更充分的科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

HUVEC 细胞(人脐静脉内皮细胞株),购自美国模式培养物集存库(ATCC)。

槲皮素(纯度≥95%)、*N*-乙酰基-*D*-葡萄糖胺、衣霉素(tunicamycin, 简称T) 美国Sigma公司; Human

sICAM-1/CD54 Quantikine ELISA 试剂盒、Human sVCAM-1/CD106 Quantikine ELISA 试剂盒、Endothelin-1 Quantikine ELISA 试剂盒 美国R&D公司; BIP、CHOP、β-actin抗体 美国Cell Signaling Technology公司; Caspase-3抗体 美国Santa Cruz公司; HRP辣根酶标记山羊抗小鼠IgG(H+L)、HRP辣根酶标记山羊抗兔IgG(H+L)、HRP辣根酶标记山羊抗大鼠IgG(H+L) 北京中山金桥生物技术有限公司; 噻唑蓝(MTT) 中科迈晨(北京)科技有限公司。

1.2 仪器与设备

Nikon ECLIPSE TE2000-S倒置荧光显微镜 日本尼康公司; Microtek Scanmarker 5900扫描仪 上海中晶科技有限公司; Bio-Rad酶联免疫检测仪、Bio-Rad PAC200电泳仪 美国Bio-Rad公司; BD FACSCalibur流式细胞仪 美国BD公司。

1.3 方法

1.3.1 人脐静脉内皮细胞培养及分组

人脐静脉内皮细胞(HUVEC)在高糖DMEM培养基(含10%胎牛血清), 37℃、5% CO₂培养箱中培养。分别设空白对照组(无细胞)、正常对照组(N)、等渗对照组(M)(15mmol/L 甘露醇)、阳性对照组(T)(5μg/mL 衣霉素)、15mmol/L葡萄糖胺(G)、15mmol/L葡萄糖胺+不同剂量槲皮素干预组(Q5~Q100)(5、10、20、50、100μmol/L), 及槲皮素Q50、Q100对照组, 即在正常对照组中加入50、100μmol/L槲皮素后进行实验, 其中阳性对照组5μg/mL衣霉素干预4h, 其余组培养16h后, 进行以下实验。

1.3.2 标本采集

将细胞按 8×10^4 个/mL接种于24孔板, 待细胞贴壁后使用无血清DMEM饥饿6h按上述实验分组干预细胞16h, 收集细胞上清离心, 取上清存于-80℃待用。将细胞按 2×10^6 个/mL接种于100mm培养皿, 待细胞贴壁后使用无血清DMEM饥饿6h按上述实验分组干预细胞16h后使用Western blotting及IP细胞裂解液提取细胞蛋白, 并按照BCA蛋白浓度测定试剂盒说明进行蛋白定量后分装40μL/管待用。

1.4 检测指标

1.4.1 MTT法检测细胞存活率

将细胞按 10^4 个/mL接种于96孔板, 待细胞贴壁后使用无血清DMEM饥饿6h按上述实验分组干预细胞16h; 用无酚红DMEM培养基配制5mg/mL的MTT溶液后, 每孔加入20μL MTT溶液, 37℃继续孵育4h后, 弃去培养液, 每孔加入150μL二甲基亚砜, 室温低速振荡10min, 在酶联免疫检测仪490nm处检测光密度值(OD_{490nm})。

1.4.2 细胞上清细胞间黏附分子-1(ICAM-1)、血管细胞间黏附分子-1(VCAM-1)、内皮素-1(ET-1)表达水平的测定按照ELISA试剂盒进行检测。

1.4.3 Western blotting法检测相关蛋白表达情况

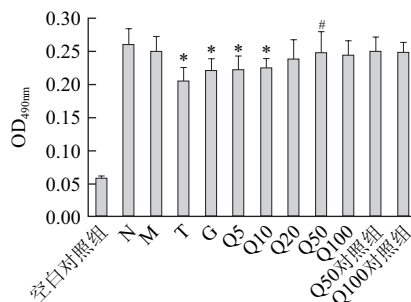
灌制SDS-PAGE分离胶, 室温放置约30min至分离胶凝固, 轻轻加入浓缩胶液, 插入样品梳, 室温凝胶约30min后拔去梳子用电泳液冲洗加样孔; 往40μL蛋白样品中加入10μL 5×上样缓冲液, 将二者轻轻混合, 100℃变性5min, 短暂离心后以适当体积轻轻加入凝胶孔中, 保证各孔中蛋白总量相等; 接通电源, 将电压调至80V, 使样品通过浓缩胶, 当染料进入分离胶后, 将电压调至120V, 继续电泳使染料至分离胶适当位置; 将样品胶与处理过的PVDF膜装入标有正、负极的转膜夹板中, 由阳极侧开始, 依次为海绵→4张Whatman滤纸→PVDF膜→凝胶→4张Whatman滤纸→海绵, 放入含有电转移缓冲液的电泳槽中。接通电源, 置于冰中, 200mA转膜2h。小心取出转移膜在1×TBST液中漂洗两次, 将转移后的膜放入5%脱脂奶粉中封闭2h, 在摇床上缓慢转动(约60r/min)。GRP78、CHOP、β-actin、Caspase-3等一抗按照1:1000稀释后, 用杂交袋封膜, 室温平衡反应30~60min后, 置于冰箱4℃过夜, 取出PVDF膜, TBST洗膜3次, 每次10min。二抗按照1:5000稀释后, 于37℃恒温箱中孵育1h, TBST洗膜3次, 每次10min。化学发光, 显影、定影后将胶片进行扫描或拍照后利用Image Pro-Plus软件进行灰度分析。

1.5 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用SPSS17.0统计软件, 组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 MTT法检测细胞存活率



*.与正常对照组(N)比较有极显著差异($P < 0.01$);
#.与葡萄糖胺组(G)比较有显著性差异($P < 0.05$).

图1 各组细胞的存活率($n=6$)

Fig.1 OD_{490nm} value of HUVEC cells in different treatment groups ($n=6$)

如图1所示, 与正常对照组(N)相比, 阳性对照组(T)、葡萄糖胺组(G)及槲皮素Q5、Q10干预组细胞光密度明显降低($P < 0.01$), 与葡萄糖胺组相比, 槲皮素Q50干预组细胞光密度明显升高($P < 0.05$), 且与正常对照组没有显著性差异, 槲皮素Q50、Q100对照组与正常对照组相比亦没有显著性差异。

2.2 细胞上清中ICAM-1、VCAM-1、ET-1含量

表1 细胞上清中ICAM-1、VCAM-1、ET-1含量测定结果($\bar{x} \pm s$, $n=4$)
Table 1 Concentrations of ICAM-1, VCAM-1 and ET-1 in culture supernatants ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

组别	ICAM-1含量/(ng/mL)	VCAM-1含量/(ng/mL)	ET-1含量/(ng/mL)
N	598.20±55.56	707.60±34.79	779.62±70.26
M	602.20±64.20	717.60±56.28	778.65±125.00
T	765.20±72.96**	796.60±83.55*	1014.23±60.93**
G	693.20±33.15**	764.60±70.46	908.46±162.79*
Q5	607.20±23.21###	742.60±56.32	820.96±47.25
Q10	535.20±35.55###	779.60±55.67	806.54±43.34
Q20	611.20±66.49###	735.60±81.68	765.19±34.02#
Q50	508.20±14.38###	707.60±29.30	730.58±107.53###
Q100	580.20±36.72###	743.60±42.39	672.88±49.99###

注: *.与正常对照组(N)比较有显著性差异($P < 0.05$), **.与正常对照组(N)比较有极显著性差异($P < 0.01$); #.与葡萄糖胺组(G)比较有显著性差异($P < 0.05$); ##.与葡萄糖胺组(G)比较有极显著性差异($P < 0.01$).下同。

由表1可知, 细胞上清ICAM-1葡萄糖胺组(G)较正常对照组(N)明显升高($P < 0.01$), 槲皮素各剂量干预组比葡萄糖胺组均有明显降低($P < 0.01$); VCAM-1阳性对照组(T)与正常对照组有显著性差异($P < 0.05$), 其余各组间无统计学差异; ET-1葡萄糖胺组与正常对照组有显著性差异($P < 0.05$)、槲皮素Q20($P < 0.05$)、Q50($P < 0.01$)、Q100($P < 0.01$)干预组较葡萄糖胺组明显降低。

2.3 葡萄糖胺条件下HUVEC细胞内凋亡相关蛋白、GRP78的表达情况及槲皮素对其的影响

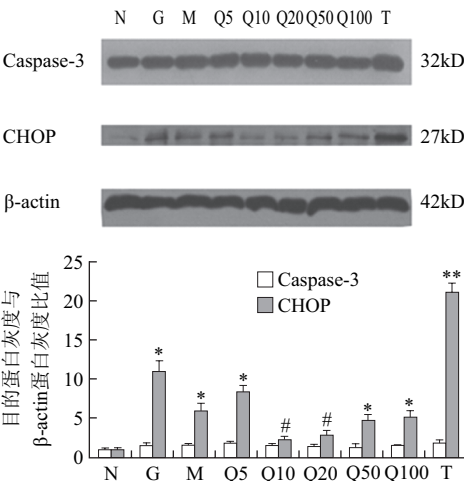


图2 HUVEC细胞内凋亡相关蛋白的表达

Fig.2 Western blotting of apoptotic protein in HUVEC

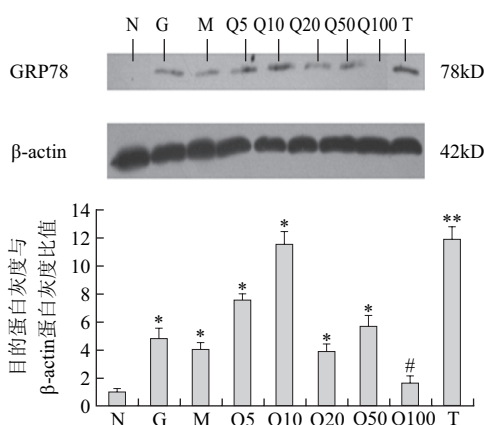


图3 HUVEC细胞内GRP78的表达
Fig.3 Western blotting of GRP78 in HUVEC

与正常对照组(N)相比, Western blotting结果显示葡萄糖胺组(G)/C/EBP同源蛋白(CHOP)表达明显增多($P<0.05$), 槲皮素干预Q10、Q20组表达较葡萄糖胺组明显减少($P<0.05$), Q50、Q100组CHOP表达较正常对照组明显增多, 与葡萄糖胺组表达无明显差异(图2); 而各组间Caspase-3表达没有明显差异。与正常对照组相比, 阳性对照组(G)($P<0.01$)及葡萄糖胺组($P<0.05$)葡萄糖调节蛋白78(GRP78)表达明显增多, 槲皮素干预Q100组GRP78改善效果较明显($P<0.05$)(图3)。

3 讨论

2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)已经成为当今严重影响人类生命健康的疾病之一。而动脉粥样硬化是2型糖尿病的重要并发症和致死原因^[11]。同样的, 2型糖尿病患者主要的AS并发症的复发率在心血管疾病(cardiovascular disease, CVD)事件中占主要地位, 大约每年6%^[12], 调查显示糖尿病人群中80%的死亡原因与AS有关, 而一般人群中只有1/3^[13]。这些结果都表明, 糖尿病是心血管疾病尤其是AS的主要危险因素。

目前学术界已公认“动脉粥样硬化的形成过程是动脉内皮细胞受损后引发的慢性炎症的过程”, 本研究中细胞上清ELISA结果显示, 与正常对照组相比, 葡萄糖胺组ICAM-1水平明显升高, 这也说明在葡萄糖胺的作用下, 内皮细胞受损并分泌大量炎症因子, 可能导致慢性炎症的发生发展。除了慢性炎症, 作为一种渐进性的血管病变, AS包含一系列的血管脂质沉积和重塑、纤维化和血栓的形成。林涛等^[14]对2型糖尿病患者血浆ET-1与大血管病变的相关性研究发现, 2型糖尿病患者ET-1参与大血管病变的发生, 可作为早期诊断和病情监测的指标。本实验葡萄糖胺组细胞上清中ET-1水平明显高于正常对照组, 亦从细胞水平证实葡萄糖胺导致了血管内皮细胞功能受损, 这也是糖尿病AS的始发环节。

内质网对细胞内稳态的改变极为敏感, 多种因素如高血糖、低氧、化学毒物等使内质网 Ca^{2+} 耗竭、蛋白质糖基化抑制、二硫键错配以及内质网内蛋白质向高尔基体转运减少, 导致未折叠或错误折叠蛋白质在内质网腔蓄积, 对多不饱和脂肪酸、甾醇、磷脂的合成功能下降以及 Ca^{2+} 平衡紊乱的状态, 称为ERS。Werstuck等^[15]研究发现, 葡萄糖胺处理平滑肌细胞和肝细胞18~24h后, 细胞内的ERS标志因子GRP78、CHOP的mRNA表达水平较对照组显著增加。动物实验结果显示, 利用链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)诱导 $apoE$ 基因缺失($apoE^{-/-}$)小鼠建立的高血糖AS模型比单纯基因缺失($apoE^{-/-}$)小鼠出现更显著的进展性AS, 其相关机制可能与肝脏及主动脉根部粥样斑块ERS相关因子表达显著增加相关, 同时, 该研究发现葡萄糖胺与ERS标志因子PERK共定位于斑块内^[15-16]。本研究利用15mmol/L的葡萄糖胺干预HUVEC细胞后发现, 与正常对照组相比, 葡萄糖胺组GRP78表达明显增高, 这与使用ERS激活剂衣霉素干预的阳性对照组类似, 初步证明了葡萄糖胺能够引发ERS, 从而导致内皮细胞损伤。ERS是细胞的一种自我保护机制, 适度的ERS可促进内质网对网腔内的错误折叠或未折叠蛋白质的降解, 从而有利于维持细胞的正常功能, 保护细胞。但是持久而严重的ERS将使内质网稳态无法恢复, 从而启动细胞的一系列凋亡途径^[17]。本实验中虽然Caspase-3表达各组间没有明显差异, 但与正常对照组相比, 葡萄糖胺组细胞凋亡相关蛋白CHOP表达明显增多, 而且MTT结果显示, 葡萄糖胺组细胞吸光度较正常对照组明显降低, 说明葡萄糖胺明显抑制细胞生长, 促进内皮细胞凋亡。而无论是炎症应激的产生和细胞特异性凋亡的诱发都是AS的特征。

人群研究及动物实验表明, 富含黄酮类物质的饮食能降低血糖^[18]、血脂和AGEs含量, 并能增强胰岛 β 细胞的功能等^[19-21]。其中属于黄酮及黄酮醇类的槲皮素及其甙类是植物界分布最广, 最多的黄酮类化合物。细胞实验发现, 槲皮素硫酸盐及其葡萄糖苷酸共同作用能抑制高糖诱导的人脐静脉内皮细胞HUVEC的凋亡^[22]。本研究发现, 高浓度的槲皮素对HUVEC细胞的生长具有抑制作用, 而适当浓度的槲皮素能够抑制葡萄糖胺条件下细胞凋亡相关蛋白CHOP的表达, 减少细胞上清ICAM-1、ET-1的分泌, 并能促进细胞的生长, 而这些可能与其抑制ERS通路相关。

本研究结果从细胞水平初步探讨了糖尿病状态下过度激活的己糖胺通路代谢产生的葡萄糖胺可能是通过激活ERS加速了血管内皮细胞的损伤, 从而促进和加重了AS的发生发展, 高浓度的槲皮素对血管内皮细胞HUVEC的生长具有抑制作用, 而适当浓度的槲皮素, 主要是20 μ mol/L组可能通过抑制ERS通路相关分子来减轻

炎症应激及凋亡, 最终改善内皮细胞的损伤。本研究为槲皮素作为糖尿病心血管并发症的临床营养治疗提供了一定的理论依据, 但是AS是多细胞参与的渐进性的血管病变, 而且单纯的体外细胞研究并没有考虑槲皮素的生物利用度及在体内的代谢情况, 所以, 需要结合巨噬细胞、血管平滑肌细胞等体外实验以及体内实验来进一步证实ERS在糖尿病AS发生发展中的作用, 及槲皮素对其的影响, 并进一步明确槲皮素的有效剂量。

参考文献:

- [1] ROSS R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s[J]. *Nature*, 1993, 362: 801-809.
- [2] LEE C D, FOLSOM A R, PANKOW J S, et al. Cardiovascular events in diabetic and nondiabetic adults with or without history of myocardial infarction[J]. *Circulation*, 2004, 109(7): 855-860.
- [3] HUMMASTI S, HOTAMISLIGIL G S. Endoplasmic reticulum stress and inflammation in obesity and diabetes[J]. *Circ Res*, 2010, 107(5): 579-591.
- [4] ZHAO B, ZHANG Y, LIU B, et al. Endothelial cells injured by oxidized low density lipoprotein[J]. *Am J Hematol*, 1995, 49(3): 250-252.
- [5] NI M, LEE A S. ER chaperones in mammalian development and human diseases[J]. *FEBS Letters*, 2007, 581(19): 3641-3651.
- [6] KHAN M I, PICHNA B A, SHI Y, et al. Evidence supporting a role for endoplasmic reticulum stress in the development of atherosclerosis in a hyperglycaemic mouse model[J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2009, 11(9): 2289-2298.
- [7] MALHOTRA J D, MIAO H, ZHANG K, et al. Antioxidants reduce endoplasmic reticulum stress and improve protein secretion[J]. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(47): 18525-18530.
- [8] DAI Xiaoqian, DING Ye, ZHANG Zhaofeng, et al. Quercetin and quercitrin protect against cytokineinduced injuries in RINm5F beta-cells via the mitochondrial pathway and NF-kappaB signaling[J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2013, 31(1): 265-271.
- [9] JUZWIAK S, WOJCICKI J, MOKRZYCKI K, et al. Effect of quercetin on experimental hyperlipidemia and atherosclerosis in rabbits[J]. *Pharmacological Reports*, 2005, 57(5): 604-609.
- [10] MOTOYAMA K, KOYAMA H, MORIWAKI M, et al. Atheroprotective and plaque-stabilizing effects of enzymatically modified isoquercitrin in atherogenic apoE-deficient mice[J]. *Nutrition*, 2009, 25(4): 421-427.
- [11] 郭立新, 潘琦, 初明峰, 等. 高同型半胱氨酸血症与糖尿病患者颈动脉内膜中层厚度关系及强化控制的影响[J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2006, 22(2): 19-22.
- [12] GIORDA C B, AVOGARRO A, MAGGINI M, et al. Recurrence of cardiovascular events in patients with type 2 diabetes: epidemiology and risk factors[J]. *Diabetes Care*, 2008, 31(11): 2154-2159.
- [13] GU K, COWIE C C, HARRIS M I. Mortality in adults with and without diabetes in a national cohort of the U.S. population, 1971-1993[J]. *Diabetes Care*, 1998, 21(7): 1138-1145.
- [14] 林涛, 李若男, 林桂芳. 2型糖尿病患者血浆内皮素-1与大血管病变的相关性研究[J]. *实用老年医学*, 2009, 23(6): 429-431.
- [15] WERSTUCK G H, KHAN M I, FEMIA G, et al. Glucosamine-induced endoplasmic reticulum dysfunction is associated with accelerated atherosclerosis in a hyperglycemic mouse model[J]. *Diabetes*, 2006, 55(1): 93-101.
- [16] ZHOU J, LHOTAK S, HILDITCH B A, et al. Activation of the unfolded protein response occurs at all stages of atherosclerotic lesion development in apolipoprotein E-deficient mice[J]. *Circulation*, 2005, 111(14): 1814-1821.
- [17] KAUFMAN R J, BACK S H, SONG B, et al. The unfolded protein response is required to maintain the integrity of the endoplasmic reticulum, prevent oxidative stress and preserve differentiation in β -cells[J]. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 2010, 12(Suppl 2): 99-107.
- [18] LI Yanqin, ZHOU Fengchao, GAO Fei, et al. Comparative evaluation of quercetin, isoquercetin and rutin as inhibitors of α -glucosidase[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, 57(24): 11463-11468.
- [19] 杜精晴, 陶贵周. 银杏叶提取物对2型糖尿病大鼠血管病变的干预作用[J]. *中国老年学杂志*, 2011(2): 292-293.
- [20] LU Qian, YIN Xiaoxing, WANG Jianyun, et al. Effects of *Ginkgo biloba* on prevention of development of experimental diabetic nephropathy in rats[J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2007, 28(6): 818-828.
- [21] KUDOLO G B. The effect of 3-month ingestion of *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) on pancreatic beta-cell function in response to glucose loading in individuals with non-insulin-dependent diabetes mellitus[J]. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 2001, 41(6): 600-611.
- [22] CHAO C L, HOU Y C, WENG C S, et al. The antioxidant effects of quercetin metabolites on the prevention of high glucose-induced apoptosis of human umbilical vein endothelial cells[J]. *British Journal of Nutrition*, 2009, 101(8): 1165-1170.