

## · 临床研究 ·

# 先天性动脉导管未闭致病基因 *MESP2* 新突变的发现与功能分析

严梓 陈春英 杨奕清 刘兴元

**【摘要】 目的：**研究先天性动脉导管未闭（PDA）致病基因 *MESP2* 新突变。**方法：**选取 2016 年 2 月至 2019 年 11 月同济大学医学院附属同济医院儿科 208 例先天性心脏病（CHD）患儿和 232 名无 CHD 儿童，收集其血液标本及临床数据。常规纯化基因组 DNA，测序分析转录因子基因 *MESP2* 以发现新的致病突变。克隆野生型 *MESP2* 基因并构建其真核表达质粒，通过定位诱变产生突变型 *MESP2* 表达质粒，转染 HEK 293T 细胞，通过报告基因分析揭示突变体的功能特性。**结果：**1 例散发性先天性动脉导管未闭（PDA）患者检测出 1 个 *MESP2* 基因新突变，即 NM\_001039958.2:c.268G>T (p.Glu90\*) 突变。该突变不存在于对照组和其他 CHD 儿童中。报告基因分析显示突变型 *MESP2* 对靶基因 NKX2.5 的转录激活功能丧失。**结论：***MESP2* 基因缺陷可能是部分先天性 PDA 的分子病因，为先天性 PDA 的防治提供了新的分子靶标。

**【关键词】** 先天性动脉导管未闭；分子遗传学；转录因子；*MESP2* 基因；报告基因分析

doi: 10.3969/j.issn.1673-6583.2023.03.011

## Identification and functional assay of a new *MESP2* mutation responsible for congenital patent ductus arteriosus

YAN Zi<sup>1</sup>, CHEN Chunying<sup>1</sup>, YANG Yiqing<sup>2</sup>, LIU Xingyuan<sup>1</sup>.  
1. Department of Pediatrics, Tongji University School of Medicine, Shanghai 200065;  
2. Department of Cardiology, Cardiovascular Research Laboratory, Central Laboratory, Shanghai Fifth People's Hospital, Fudan University, Shanghai 200240, China

**【Abstract】 Objective:** To investigate a new *MESP2* mutation underpinning congenital patent ductus arteriosus (PDA). **Methods:** A cohort of 208 children inflicted with congenital heart disease (CHD) and a total of 232 control subjects with no CHD were recruited, and their blood specimens and clinical data were collected. Genomic DNA was routinely isolated from each study participant's blood leucocytes, which was utilized for sequencing analysis of the *MESP2* gene to identify a new mutation contributing to CHD. The wild-type *MESP2* gene was cloned, with its eucaryotic expression plasmid constructed. The mutant-type *MESP2* expression plasmid was produced through site-directed mutagenesis. HEK 293T cells were transfected with various expression plasmids, and the functional characteristics of the mutant-type *MESP2* were revealed by reporter gene analysis. **Results:** In a child suffering from sporadic congenital PDA, a new *MESP2* mutation, NM\_001039958.2: c.268G>T (p.Glu90\*), was detected, which was not observed in the control group or other CHD children. Reporter gene analysis showed that the mutant *MESP2* failed to transcriptionally activate its target gene NKX2.5. **Conclusion:** *MESP2* defect is likely to be a molecular etiology giving rise to congenital PDA in a subset of patients, providing a novel molecular target for the medical prophylaxis and therapy of congenital PDA.

基金项目：上海市自然科学基金（16ZR1432500）

作者单位：200065 上海，同济大学医学院附属同济医院儿科（严梓，陈春英，刘兴元）；200240 复旦大学附属上海市第五人民医院心内科、心血管研究室、中心实验室（杨奕清）

通信作者：刘兴元，E-mail: liuxingyuan402@tongji.edu.cn

【Key words】 Congenital patent ductus arteriosus; Molecular genetics; Transcriptional factor; *MESP2*; Reporter gene assay

先天性心脏病 (CHD) 作为最常见的出生缺陷可分为 20 种以上不同的临床类型,包括室间隔缺损、房间隔缺损和动脉导管未闭 (PDA) 等,可引发中枢神经发育障碍或脑组织损伤、血栓栓塞性脑中风、肺动脉高压、心力衰竭、室性心律失常甚至死亡<sup>[1-2]</sup>。遗传流行病学研究结果表明,CHD 主要由遗传缺陷导致,已经发现了 100 多个 CHD 致病基因,包括 *MESP1* 基因<sup>[3-6]</sup>。鉴于 *MESP2* 与 *MESP1* 的表达与功能特点部分重叠,有一定的相互代偿功能<sup>[7-8]</sup>,因此, *MESP2* 基因作为重要的 CHD 候选基因,有必要明确部分 CHD 是否由 *MESP2* 基因突变所致。

## 1 对象与方法

### 1.1 研究对象

2016 年 2 月至 2019 年 11 月间,选取同济医院儿科 208 例 CHD 患病儿童 (病例组),其中男性 110 例,女性 98 例,年龄为 (5±3) 岁,范围 1~13 岁。对照组为 232 名无先天性心脏病儿童,其中男性 125 名,女性 107 名,年龄 (5±3) 岁,范围 1~13 岁。2 组入选者皆为中国汉族人,均经过临床检测,包括病史和家族史回顾、体检、超声心动图检查。根据检测结果或心脏手术记录诊断 CHD<sup>[1]</sup>。病例组中有 16 例患儿 CHD 家族史阳性 (约 8%),对照组中无 CHD 家族史阳性者,2 组均无 CHD 的遗传环境因素。研究对象的排除标准:(1) 综合征型 CHD 或分子病因已明确的 CHD 患者;(2) 不同意参与研究。本研究经同济大学医学院附属同济医院伦理委员会审批。经监护人知情同意后,收集外周全血标本,常规纯化基因组 DNA。

### 1.2 方法

1.2.1 *MESP2* 的体外扩增 借助软件 Primer3web (<https://primer3.ut.ee/>) 辅助设计扩增 *MESP2* 基因 2 个编码外显子的引物 (由于编码外显子 1 较大,分成 2 段进行扩增):编码外显子 1 第 1 段正向引物为 5'-TGTCCCTCCCATACTTCCCG-3',编码外显子 1 第 1 段反向引物为 5'-GGCACTGCAGACTCTCCTCG-3',扩增片段长 685 bp;编码外显子 1 第 2 段正向引物为 5'-GACCAAGATCGAGACGCTGC-3',编码外显子 1 第 2 段反向引物为 5'-CCTTCCATTCTCCCCTCCGT-3',扩增片段长 683 bp;

编码外显子 2 正向引物为 5'-TAGCAGAGTGTCTCCCGAGC-3',编码外显子 2 反向引物为 5'-GCACCACAGCTACAGGACTG-3',扩增片段长 491 bp。以每位研究对象的基因组 DNA 为模板,应用化学合成的上述扩增 *MESP2* 基因的引物和 DNA 聚合酶试剂盒 (美国 NEB 公司),在聚合酶链反应 (PCR) 仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司) 上对 *MESP2* 进行扩增。PCR 混合物的总体积定为 25 μL,包括 10×PCR 缓冲液 2.5 μL,正、反向引物 (10 μmol/L) 各 0.5 μL, dNTPs (10 mmol/L) 0.5 μL、基因组 DNA (40 ng/μL) 2 μL, DNA 聚合酶 (5 U/μL) 0.125 μL,双蒸水 18.875 μL。PCR 的条件设定:95 °C 预变性 30 s,接着进行 35 个热循环,每 1 个热循环包括 95 °C 变性 30 s、62 °C 退火 45 s 和 68 °C 延伸 1 min,最后 68 °C 延伸 5 min。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离后回收后,用凝胶 DNA 纯化试剂盒 (德国 Qiagen 公司) 纯化备用。

1.2.2 *MESP2* 的 PCR 测序分析 以纯化后的 *MESP2* 的 PCR 产物为模板,用 1 条 *MESP2* 的扩增引物和 DNA 测序试剂盒 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司) 在 PCR 仪上进行测序反应。测序反应混合物的体积定为 20 μL,包括预混合液 8 μL、双蒸水 8 μL、正向引物 (2 μmol/L) 2 μL 和 *MESP2* 基因片段 DNA (10 ng/μL) 2 μL。测序反应的条件设定<sup>[9]</sup>:共 30 次循环,每 1 次循环包括 95 °C 变性 20 s、50 °C 退火 15 s 和 60 °C 延伸 1 min。测序反应产物经纯化回收后在 DNA 分析仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司) 上进行测序。通过分析所测的 *MESP2* 序列与核苷酸数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Nucleotide>) 中的 *MESP2* 序列 (登陆号: NM\_001039958.2) 比对以识别 *MESP2* 变异。一旦发现 *MESP2* 变异,则测序分析 232 名对照者的 *MESP2*,同时检索 SNP (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>) 和 PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov>) 数据库以明确所检测出的 *MESP2* 变异的新颖性。

1.2.3 *MESP2* 变异的致病性预测 借助软件 MutationTaster2021 (<https://www.mutationtaster.org/>) 预测 *MESP2* 变异的致病性。

1.2.4 构建 *MESP2* 等的真核表达质粒 以人心肌 cDNA 为模板, 设计合成扩增 *MESP2* 全长 cDNA 的引物(正向引物 5'-CAGGAATTCAGCCTCCCAG AGCCTGCAGC-3', 反向引物 5'-CTGCTCGAGG AAAGAGGGAAGCCGAGGCC-3'), 通过 PCR 获得 *MESP2* 全长 cDNA。PCR 混合物的总体积定为 50  $\mu$ L, 包括 5 $\times$ PCR 缓冲液 10  $\mu$ L、正、反向引物 (10  $\mu$ mol/L) 各 2.5  $\mu$ L、dNTPs (10 mmol/L) 1  $\mu$ L、cDNA (10 ng/ $\mu$ L) 2  $\mu$ L、DNA 聚合酶 (2 U/ $\mu$ L) 0.5  $\mu$ L、双蒸水 31.5  $\mu$ L。PCR 条件: 98 $^{\circ}$ C 预变性 30 s, 然后 30 个热循环, 每 1 个热循环包括 98 $^{\circ}$ C 变性 10 s、62 $^{\circ}$ C 退火 30 s 和 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 8 min。用核酸内切酶 *EcoR* I 和 *Xho* I 分别消化纯化后的 *MESP2* 全长 cDNA 和空质粒 pcDNA3.1, 借助 T4 DNA 连接酶将 *MESP2* 全长 cDNA 亚克隆入 pcDNA3.1 质粒, 构建野生型 *MESP2* 表达质粒 *MESP2*-pcDNA3.1 并测序证实。以野生型 *MESP2*-pcDNA3.1 为模板, 用 1 对以突变点为中心、长各为 31 个核苷酸碱基的互补引物和定点诱变试剂盒 (美国 Agilent 公司), 定点诱变 PCR 获得突变型 *MESP2*-pcDNA3.1。用 *Dpn* I (美国 NEB 公司) 切除野生型 *MESP2*-pcDNA3.1 以获得突变型 *MESP2*-pcDNA3.1 并测序证实。NKX2.5 基因启动子驱动萤火虫荧光素酶表达的质粒 (NKX2.5-luc) 构建方法见参考文献 [10]。

1.2.5 *MESP2* 突变的效应分析 HEK 293T 细胞的培养和表达质粒的转染方法见参考文献 [10]。每次细胞质粒转染时用 600 ng 的 pcDNA3.1 空质粒或 600 ng 的野生型 *MESP2*-pcDNA3.1 质粒或 600 ng 的 Glu90\*- 突变型 *MESP2*-pcDNA3.1 质粒或 300 ng 的 pcDNA3.1 空质粒 + 300 ng 的野生型 *MESP2*-pcDNA3.1 质粒或 300 ng 的野生型 *MESP2*-pcDNA3.1 质粒 + 300 ng 的 Glu90\*- 突变型 *MESP2*-pcDNA3.1 质粒, 同时共转染 1.0  $\mu$ g 的 NKX2.5-luc 质粒和 10 ng 的 pGL4.75 质粒 (美国 Promega 公司)。共转染表达海肾荧光素酶的内对照质粒 pGL4.75 旨在平衡转染效率。转染后 48 h 收集并裂解 HEK-293T 细胞。应用双报告基因分析试剂 (美国 Promega 公司) 在荧光分析仪 (美国 Promega 公司) 上分析细胞裂解液中的荧光素酶活性, 以萤火虫荧光素酶与海肾荧光素酶的活性之比表示靶基因 NKX2.5 启动子的转录活性。

### 1.3 统计学分析

连续变量如研究对象的年龄、靶基因 NKX2.5 启动子的转录活性等用均数  $\pm$  标准差表示; 分类变量如研究对象的性别、种族等用例数 (百分比) 表示。两组连续变量的比较用非配对 Student *t* 检验; 两组分类变量的比较选用 Fisher 精确检验。双侧检验值  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 发现 *MESP2* 新突变

本研究病例组 ( $n=208$ ) 与对照组 ( $n=232$ ) 均为汉族人, 2 组间的性别分布差异无统计学意义 (经 Fisher 检验  $P > 0.05$ ), 年龄构成差异也无统计学意义 (经 Student *t* 检验  $P > 0.05$ )。通过对 208 例 CHD 患病儿童的 *MESP2* 的全部编码外显子进行测序分析, 在 1 例家族史阴性的 6 岁 PDA 女患儿中发现了 1 种 *MESP2* 杂合突变, 即 NM\_001039958.2: c.268G>T (p.Glu90\*) 突变。对 232 名对照组儿童的 *MESP2* 基因进行测序分析没有检出该无义突变。该突变也不存在于 SNP 或 PubMed 数据库, 表明该 *MESP2* 突变是新突变。该例先天性 PDA 患者的 *MESP2* 基因 c.268G>T 杂合突变及其野生型对照碱基序列见图 1。

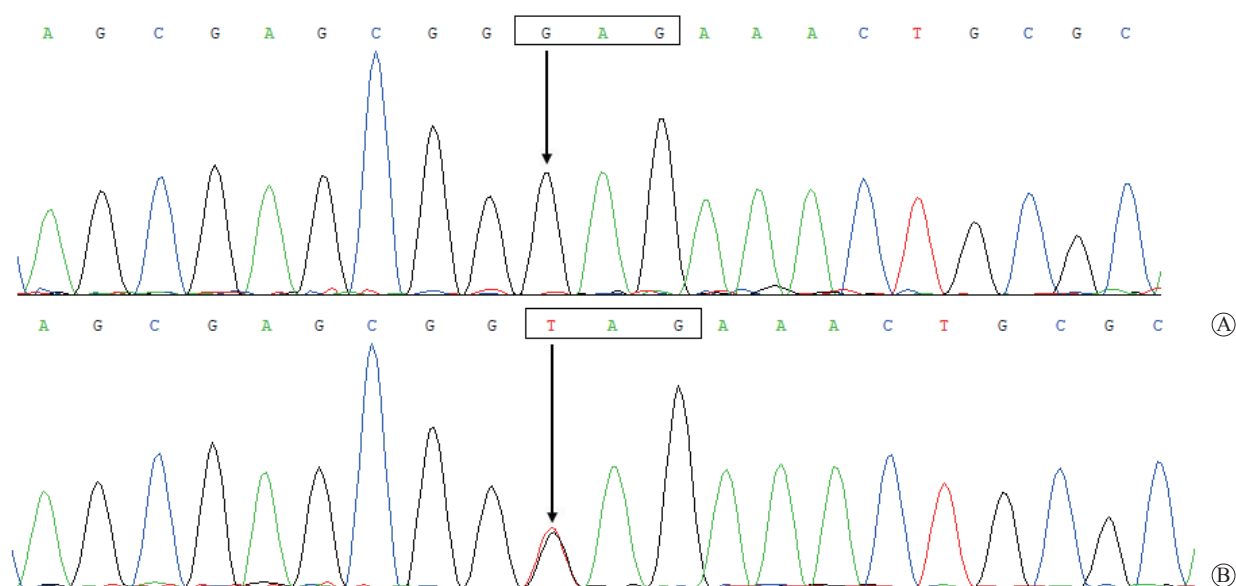
### 2.2 *MESP2* 新突变 c.268G>T 为致病性突变

*MESP2* 新突变 c.268G>T 被 MutationTaster 2021 预测有致病性, 该预测正确的概率接近于 1 ( $>0.9999$ )。

### 2.3 Glu90\*- 突变型 *MESP2* 对靶基因 NKX2.5 的转录激活作用消失

在转染了多种基因表达质粒的 HEK-293T 细胞, 600 ng 的野生型 *MESP2*-pcDNA3.1 质粒和等量 (600 ng) 的 Glu90\*- 突变型 *MESP2*-pcDNA3.1 质粒对靶基因 NKX2.5 启动子的转录激活效应分别约为 237 倍 ( $237.04 \pm 20.94$ ) 和 83 倍 ( $82.97 \pm 11.72$ ), 两组间的 NKX2.5 启动子活性差异有统计学意义 ( $t=11.12, P < 0.01$ ); 而在同时转染 300 ng 的野生型 *MESP2*-pcDNA3.1 和等量 (300 ng) 的 Glu90\*- 突变型 *MESP2*-pcDNA3.1 时, 所产生的 NKX2.5 启动子活性约为 127 倍 ( $126.57 \pm 11.39$ ), 显著低于 600 ng 的野生型 *MESP2*-pcDNA3.1 对靶基因 NKX2.5 启动子的转录激活效应即 237 倍左右, 两组间的 NKX2.5 启动子活性差异有统计学意义 ( $t=8.03, P < 0.01$ )。





注：箭头指向为 *MESP2* 基因之野生 G/G 碱基 (A) 和 c.268G>T 杂合突变 G/T (B)

图1 *MESP2* 基因c.268G>T杂合突变及其野生型对照碱基序列

### 3 讨论

本研究在 1 例女性 PDA 患儿鉴定出 1 个新的 *MESP2* 杂合突变即 NM\_001039958.2: c.268G>T (p.Glu90\*) 突变。该 *MESP2* 无义突变不存在于 232 名无 CHD 儿童。功能研究揭示 Glu90\*-突变型 *MESP2* 对靶基因 *NKX2.5* 启动子的转录激活功能完全丧失, 而 *NKX2.5* 基因功能缺失性变异已被发现可导致多种类型的 CHD, 包括 PDA<sup>[11-13]</sup>。因此, *MESP2* 的新突变 c.268G>T 即 Glu90\* 极可能是该例 PDA 患儿的分子病因。

人类 *MESP2* 定位于 15q26.1, 编码 1 种由 397 个氨基酸残基组成的转录因子<sup>[10]</sup>。*MESP2* 在人和小鼠胚胎发育期间大量表达于心脏, 包括心房、心室和心脏流出道<sup>[10]</sup>, 主要通过调控对心血管发育具有重要影响的靶基因如 *NKX2.5* 和 *GATA4* 等的表达, 而对心血管的正常发育发挥关键作用<sup>[10]</sup>。不仅如此, *NKX2.5* 和 *GATA4* 基因功能缺失性突变均已被证实可导致 CHD<sup>[11-15]</sup>。本研究发现 *MESP2* 功能缺失性突变可导致 PDA, 提示 *MESP2* 基因单倍型不足可能是人类 PDA 发生的罕见分子机制之一。

实验动物研究表明, 与 *MESP1* 类似, *MESP2* 基因也与心血管发育有关<sup>[16]</sup>。在小鼠, *MESP1* 和 *MESP2* 均大量表达于中胚层, 而中胚层细胞发育成心脏、血管等组织结构<sup>[16]</sup>。*MESP1* 基因敲除可导致小鼠胚胎心脏发育畸形 (心脏二分叉), 表

明 *MESP1* 基因是心脏正常发育所必须的<sup>[17]</sup>。尽管 *MESP2* 基因敲除小鼠心脏发育未见明显畸形, 但 *MESP1* 和 *MESP2* 双基因敲除小鼠心脏发育畸形更加严重 (未分化中胚层细胞聚集), 而且 *MESP1* 和 *MESP2* 基因可以拯救彼此敲除所引起的一些发育异常, 表明 *MESP1* 和 *MESP2* 基因功能上互相代偿<sup>[7-8]</sup>。对基于基因编辑技术建立的遗传工程小鼠模型进行研究发现, 仅敲除 *MESP1* 或 *MESP2* 任何 1 个基因未见心脏发育畸形, 但同时敲除 *MESP1* 和 *MESP2* 双基因可导致严重的心脏发育畸形, 而且补充 *MESP2* 可以完全纠正 *MESP1* 基因敲除所导致的异常<sup>[16]</sup>。这提示 *MESP2* 基因功能障碍可以导致人类心血管发育畸形。

值得一提的是, 有报道 *MESP2* 基因突变可导致多种不同临床类型的 CHD, 包括右心室双流出道、法洛四联症、大动脉转位、肺动脉闭锁、室间隔缺损、单心房、单心室和主动脉离断<sup>[10]</sup>。本研究发现 *MESP2* 功能缺失性新突变可导致 PDA, 从而扩大了 *MESP2* 基因突变的表型谱。

### 参考文献

- [1] Benjamin EJ, Virani SS, Callaway CW, et al. Heart disease and stroke statistics—2008 update: a report from the American Heart Association[J]. Circulation, 2018, 137(12):e67-e492.
- [2] Huang RT, Guo YH, Yang CX, et al. SOX7 loss-of-function variation as a cause of familial congenital heart disease[J]. Am J Transl Res, 2022, 14(3):1672-1684.

- [3] Lahm H, Deutsch MA, Dreßen M, et al. Mutational analysis of the human MESP1 gene in patients with congenital heart disease reveals a highly variable sequence in exon 1[J]. *Eur J Med Genet*, 2013, 56(11):591-598.
- [4] Werner P, Latney B, Deardorff MA, et al. MESP1 mutations in patients with congenital heart defects[J]. *Hum Mutat*, 2016, 37(3):308-314.
- [5] Zhang M, Li FX, Liu XY, et al. MESP1 loss-of-function mutation contributes to double outlet right ventricle[J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(3):2747-2754.
- [6] Diab NS, Barish S, Dong WL, et al. Molecular genetics and complex inheritance of congenital heart disease[J]. *Genes (Basel)*, 2021, 12(7):1020.
- [7] Saga Y. Genetic rescue of segmentation defect in *MesP2*-deficient mice by *MesP1* gene replacement[J]. *Mech Dev*, 1998, 75(1/2):53-66.
- [8] Kitajima S, Takagi A, Inoue T, et al. *MesP1* and *MesP2* are essential for the development of cardiac mesoderm[J]. *Development*, 2000, 127(15):3215-3226.
- [9] 乔祺, 杨晨曦, 顾佳宁, 等. KLF15 基因突变导致心房颤动的机制[J]. 国际心血管病杂志, 2021, 48(1): 53-57.
- [10] Zhang E, Yang J, Liu Y, et al. *MESP2* variants contribute to conotruncal heart defects by inhibiting cardiac neural crest cell proliferation[J]. *J Mol Med (Berl)*, 2020, 98(7):1035-1048.
- [11] Schott JJ, Benson DW, Basson CT, et al. Congenital heart disease caused by mutations in the transcription factor NKX2-5[J]. *Science*, 1998, 281(5373):108-111.
- [12] Peng T, Wang L, Zhou SF, et al. Mutations of the GATA4 and NKX2.5 genes in Chinese pediatric patients with non-familial congenital heart disease[J]. *Genetica*, 2010, 138(11):1231-1240.
- [13] Reamon-Buettner SM, Borlak J. NKX2-5: an update on this hypermutable homeodomain protein and its role in human congenital heart disease (CHD) [J]. *Hum Mutat*, 2010, 31(11):1185-1194.
- [14] Garg V, Kathiriyi IS, Barnes R, et al. GATA4 mutations cause human congenital heart defects and reveal an interaction with TBX5[J]. *Nature*, 2003, 424(6947):443-447.
- [15] Yu Y, Lei W, Yang JJ, et al. Functional mutant GATA4 identification and potential application in preimplantation diagnosis of congenital heart diseases[J]. *Gene*, 2018, 641: 349-354.
- [16] Ajima R, Sakakibara Y, Sakurai-Yamatani N, et al. Formal proof of the requirement of MESP1 and MESP2 in mesoderm specification and their transcriptional control via specific enhancers in mice[J]. *Development*, 2021, 148(20):dev194613.
- [17] Saga Y, Miyagawa-Tomita S, Takagi A, et al. *MesP1* is expressed in the heart precursor cells and required for the formation of a single heart tube[J]. *Development*, 1999, 126(15):3437-3447.

( 收稿:2022-06-22 修回:2023-03-31 )

( 本文编辑:丁媛媛 )

( 上接第 136 页 )

- [23] Merra G, Noce A, Marrone G, et al. Influence of mediterranean diet on human gut microbiota[J]. *Nutrients*, 2020, 13(1):7.
- [24] Bartolomaeus H, Balogh A, Yakoub M, et al. Short-chain fatty acid propionate protects from hypertensive cardiovascular damage[J]. *Circulation*, 2019, 139(11):1407-1421.
- [25] Menni C, Lin C, Cecelja M, et al. Gut microbial diversity is associated with lower arterial stiffness in women[J]. *Eur Heart J*, 2018, 39(25):2390-2397.
- [26] Larsson SC. Coffee, tea, and cocoa and risk of stroke[J]. *Stroke*, 2014, 45(1):309-314.
- [27] Yang CS, Hong J. Prevention of chronic diseases by tea: possible mechanisms and human relevance[J]. *Annu Rev Nutr*, 2013, 33:161-181.
- [28] Ried K, Fakler P, Stocks NP. Effect of cocoa on blood pressure[J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2017, 4(4):CD008893.
- [29] Draijer R, de Graaf Y, Slettenaar M, et al. Consumption of a polyphenol-rich grape-wine extract lowers ambulatory blood pressure in mildly hypertensive subjects[J]. *Nutrients*, 2015, 7(5):3138-3153.
- [30] McCullough ML, Chevaux K, Jackson L, et al. Hypertension, the Kuna, and the epidemiology of flavanols[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2006, 47(Suppl 2):S103-S109.
- [31] do Rosario VA, Schoenaker DAJM, Kent K, et al. Association between flavonoid intake and risk of hypertension in two cohorts of Australian women: a longitudinal study[J]. *Eur J Nutr*, 2021, 60(5): 2507-2519.
- [32] Kontogianni MD, Vijayakumar A, Rooney C, et al. A high polyphenol diet improves psychological well-being: the polyphenol intervention trial (PPhIT)[J]. *Nutrients*, 2020, 12(8):2445.
- [33] Odai TMI, Terauchi M, Kato K, et al. Effects of grape Seed proanthocyanidin extract on vascular endothelial function in participants with prehypertension: a randomized, double-blind, placebo-controlled study[J]. *Nutrients*, 2019, 11(12):2844.
- [34] Nguyen MA, Staubach P, Wolfram S, et al. Effect of single-dose and short-term administration of quercetin on the pharmacokinetics of talinolol in humans—implications for the evaluation of transporter-mediated flavonoid-drug interactions[J]. *Eur J Pharm Sci*, 2014, 61:54-60.
- [35] Summerlin N, Soo E, Thakur S, et al. Resveratrol nanoformulations: challenges and opportunities[J]. *Int J Pharm*, 2015, 479(2):282-290.

( 收稿:2022-07-14 修回:2022-11-27 )

( 本文编辑:胡晓静 )