

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.32.005

## 枸杞总黄酮提取物对 2 型糖尿病大鼠血管内皮细胞的保护作用\*

王伟<sup>1</sup>, 尚佳<sup>1△</sup>, 楚元奎<sup>2</sup>

(1. 巴彦淖尔市医院, 内蒙古巴彦淖尔 015000; 2. 宁夏医科大学检验学院, 银川 750004)

**[摘要]** **目的** 研究枸杞总黄酮提取物(TFLB)对链脲佐菌素(STZ)诱导建立的糖尿病(DM)大鼠损伤模型血管内皮细胞保护作用。**方法** 采用 STZ 诱导建立 DM 大鼠损伤模型, 实验分为正常对照组、DM 模型组和 TFLB 干预组(60、90、120 mg/mL)。正常对照组及 DM 模型组大鼠每天每只予以等量生理盐水灌胃, 干预组大鼠以不同浓度 TFLB 灌胃 4 周。灌胃满 4 周后, 采用 ELISA 法测定大鼠血清血管性血友病因子(vWF)、可溶性血栓调节蛋白(sTM)、可溶性血管内皮细胞蛋白 C 受体(sEPCR)变化情况, 摘取胸主动脉组织做 HE 染色, 观察 TFLB 对 DM 大鼠血管内皮的保护作用。**结果** TFLB 干预后, 与 DM 模型组相比较, 下调了血管内皮功能相关因子 vWF、sTM、sEPCR 的水平, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); 随着 TFLB 剂量的升高, 干预组大鼠主动脉内膜增厚程度明显减轻, 山峦样突起逐渐减少, 外膜未见明显损伤, 血管形态排列趋于规整。**结论** TFLB 可以改善高血糖对血管内皮细胞的损伤, 调节血管损伤相关因子含量的改变, 延缓 DM 并发症的进展程度, 起到保护心血管系统作用。

**[关键词]** 枸杞总黄酮; 糖尿病, 2 型; 血管内皮细胞**[中图分类号]** R285.5**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2017)32-4481-03

## Protective effect of total flavonoids of lycium barbarum on vascular endothelial cells in type 2 diabetic rats\*

Wang Wei<sup>1</sup>, Shang Jia<sup>1△</sup>, Chu Yuankui<sup>2</sup>

(1. Bayannur Hospital, Bayannur, Inner Mongolia 015000, China; 2. School of Laboratory Medicine, Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750004, China)

**[Abstract]** **Objective** To study the protective effect of total flavonoids of lycium barbarum(TFLB) on vascular endothelial cells in streptozotocin(STZ)-induced diabetic mellitus(DM) rats injury model. **Methods** The injury model of DM rats was induced by STZ, and the rats were divided into normal control group, DM model group and TFLB intervention group(60, 90 and 120 mg/mL). Rats in the normal control group and the DM model group were given the same amount of intragastric administration of normal saline every day. The rats in the intervention group were treated with TFLB at different concentrations for 4 weeks. After filling the stomach for 4 weeks, the blood samples were taken from the chest cavity, and the changes of serum vWF, sTM and sEPCR were measured by ELISA. The tissue of the thoracic aorta was removed and stained by HE, and the protective effect of TFLB on the vascular endothelium in DM rats was observed. **Results** Compared with DM model group, the levels of vascular endothelial function related factors vWF, sTM and sEPCR were down-regulated in the TFLB intervention group, and the difference was statistically significant( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). In the TFLB intervention group, with the increase of TFLB dose, the intima thickening degree of the rats was significantly reduced; the formation of mountain-like protrusions was gradually decreased; the outer membrane showed no significant damage; the vascular morphology arrangement tended to be regular. **Conclusion** TFLB can improve the hyperglycemia-caused damage of vascular endothelial cells, regulate the content of vascular injury related factors, delay the progression of DM complications, and protect the cardiovascular system.

**[Key words]** total flavonoids from lycium barbarum; diabetes, type 2; vascular endothelial cell

关于心脑血管高危案例发生率、致残率、病死率的大量数据调查显示, 糖尿病(DM)在所有危险因素中的占比较高<sup>[1]</sup>, DM 患者如果长时间血糖浓度控制不稳定, 血管内皮细胞由于血糖浓度波动较大, 进而诱导机体发生应激机制<sup>[2]</sup>, 导致血管内皮细胞损伤和逐步凋亡, 若长期处于较高应激状态会导致细胞信号通路和基因性状发生突变, 高血糖是动脉粥样硬化(AS)发生的首要危险因素之一<sup>[3]</sup>。因此, 研讨怎样调节和保护长期高血糖状态下血管内皮细胞的功能, 对评估糖尿病及其并发症进程具有十分重要的意义。近年来黄酮类化合物作为天然产物发挥调节免疫功能、降血糖、降血脂、抗氧化等功能备受关注<sup>[4]</sup>。有关宁夏枸杞生物活性及指纹图谱等大量研究表明, 宁夏枸杞黄酮类化合物生物活性较广<sup>[5]</sup>, 具有抗肿瘤、抗氧化、对抗自由基、抗慢性凋亡等多重重要药理作用<sup>[6-7]</sup>。多年前, 宁夏地区专家已经证实了枸杞总黄酮在抗氧化方面的生物

活性<sup>[8]</sup>, 并正确运用正交优化实验验证了其最理想的分离提取方法。基于上述成熟条件, 加强枸杞黄酮化合物在对抗细胞氧化应激损伤分子机制方面的研发, 指导对心脑血管疾病的治疗具有非常重要的启发和补充。因此, 本研究运用链脲佐菌素(STZ)建立关于 2 型糖尿病大鼠的病理模型, 研究枸杞总黄酮提取物(TFLB)对其血管内皮细胞作用的分子机制, 现报道如下。

## 1 材料与方法

**1.1 饲料与动物** 常规饲料: 麸皮 20%; 玉米粉 30%; 豆类 10%; 酵母粉 2%; 标准粉 25%; 维生素、微量元素添加剂各 0.5%; 鱼肝油 1%; 骨粉 10%; 食用盐 1%。Sprague-Dawley (SD) 雄性大鼠: 80 只, 体质量 440~550 g, 6 周龄, 许可证号: SYXK(宁)2011-0001, 由宁夏医科大学动物中心提供;

**1.2 试剂与仪器** 枸杞总黄酮提取物(枸杞来源: 宁夏农业科

\* 基金项目: 宁夏自然科学基金资助项目(NZ111116); 氯化锂对小鼠糖尿病动脉粥样硬化防治作用的初步研究(XM2011008)。作者简介: 王伟(1983—), 主管技师, 硕士, 主要从事临床检验诊断学的研究。△ 通信作者, E-mail: 185362514@qq.com。

学研究院, 鉴定人: 研究员陈淑华; 总黄酮: 浓度 99.8 mg/mL。链脲佐菌素(STZ)购自美国 Sigma 公司; 大鼠可溶性血管内皮细胞蛋白 C 受体(sEPCR, 批号: JYM0566Ra)、大鼠可溶性血栓调节蛋白(sTM, 批号: JYM0936Ra)、大鼠血管性血友病因子(vWF, 批号: JYM0304Ra), 武汉基因美生物科技有限公司采购; HE 染色相关试剂: 宁夏医科大学检验学院提供。光学显微镜(日本 Olympus); 快速血糖仪(强生)及配套试纸条; 酶标仪(Me2tertech); 电子显微镜(日立 H-600); 切片机(瑞典 LKB-V); 蜡块包埋机、切割机(德国 Leica)。

### 1.3 方法

**1.3.1 2 型糖尿病大鼠模型建立** 常规饲养达标后, 随机选择 10 只大鼠作为正常对照组, 其余 70 只大鼠进行造模。隔夜禁食不禁水 12 h 以上, 一次性腹腔皮下注射 60 mg/kg STZ; 正常对照组大鼠在皮下(腹腔)注射同体积枸橼酸盐缓冲液。观察 72 h 后, 于大鼠尾静脉处穿刺采血, 用快速血糖仪测定空腹血糖值, 葡萄糖(GLU) > 11.1 mmol/L 为 DM 大鼠造模成功标准。

**1.3.2 实验分组及 TFLB 干预阶段** 将成模 DM 大鼠分成 4 组: DM 模型组、TFLB 干预组(低、中、高)。对照组和 DM 模型组大鼠每天采用等体积的生理盐水来灌胃; TFLB 干预组(低、中、高)大鼠每天分别以 60、90、120 mg/kg 总黄酮进行灌胃干预, 干预实验周期为 4 周。

**1.3.3 血清因子水平检测** 药物干预满 4 周实验结束后, 隔夜将大鼠禁食不禁水 12 h, 之后给予 50 mg/kg 苯巴比妥腹腔麻醉, 自腹部剪开皮肤于大鼠腹主动脉分叉处向外心端 1~3 mm 处穿刺取血, 以酶联免疫分析法测定(ELISA)法检测血清中 vWF、sTM、sEPCR 因子水平。

**1.3.4 制作主动脉 HE 染色切片** 摘取各实验组大鼠胸主动脉, 放置于固定液浓度为 10% 的甲醛中浸泡, 在常温条件下短期保存, 为 HE 染色病理切片做好相关准备。

**1.4 统计学处理** 应用统计软件 SPSS11.7 进行数据分析, 计量资料用  $\bar{x} \pm s$  来表示, 两组样本间比较用  $t$  检验分析, 各組间比较采用方差分析检验, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 2 型糖尿病大鼠模型的成功建立及灌胃饲养情况** 常规

饲养达标后腹腔注射 STZ, 3 d 后大鼠均出现多食、多饮、多尿症状, 且伴随精神状态萎靡不振、动作反应缓慢迟钝、体型消瘦, 毛发枯黄、不洁、干涩等状态。模型组与正常对照组大鼠空腹 GLU 测定值相比较, 差异有统计学意义( $P < 0.01$ ), 在尾静脉处穿刺取血测得 67 只大鼠空腹 GLU 水平均大于 11.1 mmol/L, 其中血糖水平最低为 15.8 mmol/L, 最高达 20.1 mmol/L, 造模成功, 达到 2 型糖尿病造模标准; 造模过程没有大鼠死亡, 有 3 只血糖水平测定值小于 11.1 mmol/L, 未成模, 弃之不用。在实验阶段正常对照组大鼠死亡 2 只, DM 模型组大鼠死亡 19 只。

**2.2 TFLB 对 DM 模型组大鼠 GLU 水平的调控及影响** DM 模型组大鼠灌胃前、中、后 GLU 与正常对照组相比升高( $P < 0.01$ ); TFLB 高剂量组灌胃后 GLU 水平与 DM 模型组相比有一定意义的下降, 提示在特定浓度下其对控制血糖水平有一定的效果( $P < 0.05$ ); 低、中剂量组大鼠 GLU 水平, 差异无统计学意义( $P > 0.05$ ), 见表 1。

**2.3 TFLB 对 DM 大鼠 sTM、sEPCR、vWF 检测水平的影响** 与正常对照组相比较, DM 模型组 sTM、sEPCR、vWF 因子的生成量明显上调( $P < 0.01$ )。其中 TFLB 低剂量组 sTM、vWF 水平与 DM 模型组相比差异无统计学意义( $P > 0.05$ ), 而 sEPCR 检测水平较 DM 模型组相比较下调, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); TFLB 高、中剂量组 sTM、sEPCR、vWF 因子检测水平与 DM 模型组相比均下调( $P < 0.01$ ), 见表 2。

**2.4 TFLB 干预后各实验组主动脉做 HE 染色后的横切面图** 各组 HE 染色结果见图 1。正常对照组大鼠, 其主动脉壁内部结构完整, 形态分布规则; 外膜整洁光滑未见明显异常; 中层平滑肌细胞排列整齐、紧密、形态大小分布一致; 血管内皮细胞分布均匀, 光滑连续; DM 模型组大鼠主动脉内膜可见有明显损伤突起, 增厚显著并出现粥样硬化病变; 内膜下间隙明显增大、弹性纤维形态增粗且排列顺序散乱, 散在区域可见泡沫细胞, 部分区域可见斑块; TFLB 低、中剂量组大鼠主动脉内膜仍见明显突起且明显增厚, 外膜损伤程度有所减轻, 血管内皮细胞可见明显增生, 排列尚不规整, 偶见散在泡沫细胞; TFLB 高剂量组大鼠主动脉内膜可见轻度增厚, 血管内皮细胞增生相对轻度、排列相对趋于规整, 镜下外膜未见显著损伤。

表 1 各组大鼠 GLU 水平比较( $\bar{x} \pm s$ , mmol/L,  $n=8$ )

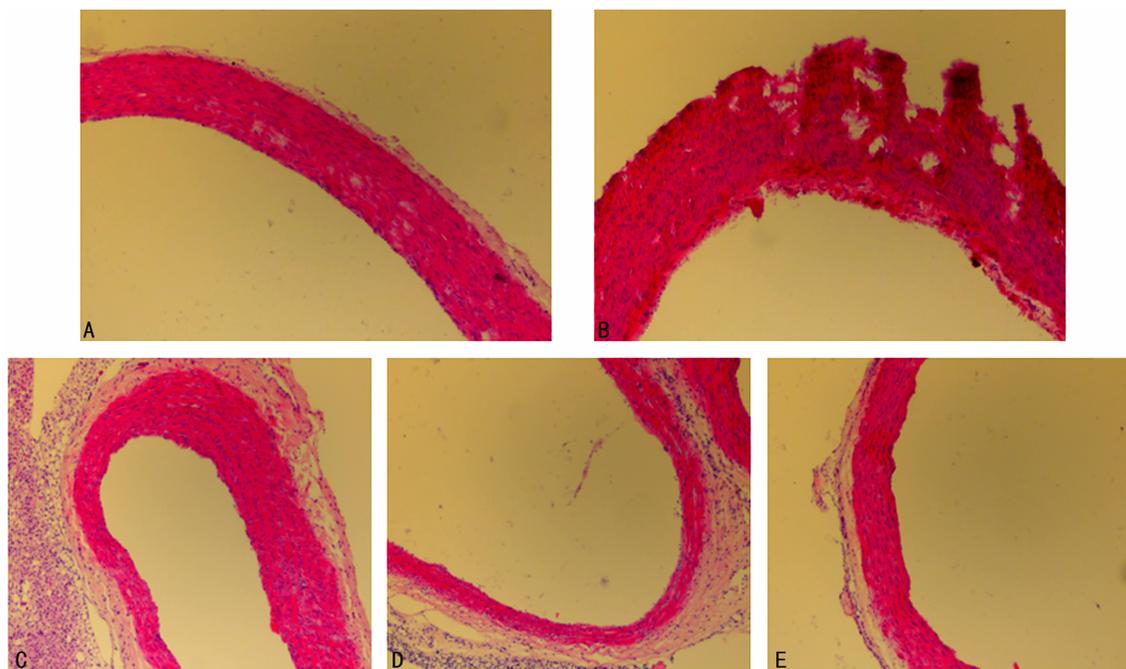
组别	灌胃前	灌胃中(2周)	灌胃后(4周)
正常对照组	5.86 ± 0.83	5.36 ± 0.67	6.01 ± 0.89
DM 模型组	16.80 ± 2.36 <sup>a</sup>	24.80 ± 1.26 <sup>a</sup>	27.80 ± 2.24 <sup>a</sup>
TFLB 低剂量组	16.70 ± 3.75	24.90 ± 1.65	26.00 ± 0.69
TFLB 中剂量组	16.30 ± 1.35	24.10 ± 1.75	25.40 ± 2.15
TFLB 高剂量组	16.00 ± 3.48	23.77 ± 1.79	24.30 ± 0.49 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ , 与正常对照组比较; <sup>b</sup>:  $P < 0.05$ , 与 DM 模型组比较

表 2 各组大鼠血清 sTM、sEPCR、vWF 水平比较( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=8$ )

组别	sTM(ng/mL)	sEPCR(ng/L)	vWF(IU/mL)
正常对照组	13.090 ± 0.752	2 394.380 ± 104.769	0.585 ± 0.055
DM 模型组	16.650 ± 0.865 <sup>a</sup>	3 772.500 ± 206.502 <sup>a</sup>	0.743 ± 0.020 <sup>a</sup>
TFLB 低剂量组	16.650 ± 1.508	3 482.920 ± 114.905 <sup>b</sup>	0.698 ± 0.041
TFLB 中剂量组	15.260 ± 1.209 <sup>b</sup>	3 198.840 ± 109.130 <sup>b</sup>	0.673 ± 0.034 <sup>b</sup>
TFLB 高剂量组	13.900 ± 1.910 <sup>b</sup>	2 696.250 ± 406.458 <sup>b</sup>	0.632 ± 0.015 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ , 与正常对照组比较; <sup>b</sup>:  $P < 0.05$  与 DM 模型组比较



A: 正常对照组; B: DM 模型组; C: TFLB 低剂量组; D: TFLB 中剂量组; E: TFLB 高剂量组

图 1 各组主动脉 HE 染色横切面图 (HE×100)

### 3 讨论

大量研究表明,DM 并发症累及器官较多,其中心脑血管病变是其早期主要并发症之一<sup>[9]</sup>,且损伤程度相对较为显著。血管内皮细胞可以分泌、合成多种细胞因子,具有吞噬异物、细菌、坏死和衰老组织的功能,同时还可以参与集体免疫活动及调节保护血管活性物质,在护保血管通透性起到十分重要的作用,是保证和维护血管功能正常的一道天然屏障。血糖控制不理想,可诱导机体产生氧化应激,内皮细胞膜被大量自由基氧化损伤,导致内皮细胞膜调节水平下降、功能异常、紊乱<sup>[10]</sup>,进而诱发机体大血管和微血管方面的病变<sup>[11]</sup>,引起全身多系统的代谢障碍,严重影响了糖尿病患者的生活质量。目前体内外实验研究发现:sTM、sEPCR、vWF 合成及分泌水平均与血管内皮细胞的功能状态直接相关,以上 3 个因子水平的调节变化,可以间接地反映血管内皮细胞在外因诱导应激状态下损伤的不同程度。sMT 是存在于血管内皮细胞膜表面的一种糖蛋白,当不同外界因素诱发血管内皮细胞应激损伤时其合成量增多<sup>[12]</sup>;当损伤累及病变程度较重,大血管损伤的标志因子 sEPCR 合成量也显著增加<sup>[13]</sup>,与此同时鉴定内皮细胞受损程度特异性标志因子 vWF 随损伤程度的不同相对升高<sup>[14]</sup>。因此研讨怎样保护和调节血管内皮细胞的功能,对指导和治疗心脑血管疾病有十分重要的现实意义。当前对于能够保护心脑血管功能,抑制血管内皮细胞慢性凋亡药物的研发已成为心脑血管疾病靶向治疗的热点<sup>[15]</sup>。

因此本实验以 TFLB 为研究对象,结合 STZ 诱导建立 DM 大鼠损伤模型。结果提示 TFLB 对 DM 大鼠血管内皮细胞具有一定程度保护功效,对 DM 并发症的发生、发展起到积极的预防保护作用;但总黄酮的成分很多,需后续进一步作深入的研究证实,为研究新型治疗糖尿病疾病中药材提供理论依据。

### 参考文献

[1] 郝彦峰,郑冬凌. 2 型糖尿病对心血管疾病的影响[J]. 中国社区医师(医学专业),2011,13(22):74.  
 [2] 姜慧芳,李向荣,陈晓乐,等. 紫心甘薯总黄酮对糖尿病大鼠血糖及氧化应激的影响[J]. 中国药理学杂志,2011,46

(20):1570-1573.  
 [3] 鲍晓梅,陆国平. 高同型半胱氨酸血症致血管内皮损伤与早期动脉粥样硬化[J]. 医学综述,2009,15(2):191-193.  
 [4] 廖国玲,王伟. 反相高效液相色谱法测定枸杞活性成分[J]. 医学信息,2013,26(2):68.  
 [5] 张自萍,廖国玲,李弘武. 宁夏枸杞黄酮类化合物 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中草药,2008,39(1):103-105.  
 [6] 王辉,田呈瑞,马守磊,等. 绿原酸的研究进展[J]. 食品工业科技,2009,30(5):341-345.  
 [7] 廖国玲,杨凤琴,王伟. 枸杞总黄酮对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤人脐静脉内皮细胞的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(24):139-142.  
 [8] 黄文波. 宁夏枸杞总黄酮的提取、纯化及其抗氧化活性研究[D]. 银川:宁夏大学,2006.  
 [9] 史爱梅. 心血管疾病的危险因素分析[J]. 当代医药论丛,2014,12(8):251-252.  
 [10] 任蓓,潘澄,林鹏,等. 高糖诱发氧化应激导致血管内皮细胞凋亡机制研究[J]. 海峡药学,2013,25(6):268-271.  
 [11] 李羚. 2 型糖尿病血管并发症流行情况及早发糖尿病血管并发症患病风险研究[D]. 天津医科大学,2015.  
 [12] 廖国玲,杨华,杨凤琴,等. II 型糖尿病患者血浆 sEPCR、sTM、vWF 变化的研究[J]. 中国输血杂志,2013,26(6):553-555.  
 [13] 张子彦,张敏,柳惠荣. 2 型糖尿病患者血浆可溶性内皮细胞蛋白 C 受体和凝血酶激活的纤溶抑制物的变化及意义[J]. 苏州大学学报(医学版),2010,30(1):178-179.  
 [14] Azou B, Fernandez P, Bareille R, et al. In vitro endothelial cell susceptibility to xenobiotics; comparison of three cell types[J]. Cell Biol Toxicol, 2005, 21(2): 127-137.  
 [15] 程宁. 多靶点黄酮衍生物的合成及抗糖尿病血管并发症研究[D]. 湘潭:湘潭大学,2014.