

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2016.14.001

文章编号: 1005-8982(2016)14-0001-06

论著

## 白藜芦醇对糖尿病白内障大鼠正沉默信息 调节因子 2 相关酶 1 基因表达的影响\*

张剑, 齐艳秀, 姜伟, 王冬兰

(佳木斯大学附属第一医院 眼科, 黑龙江 佳木斯 154003)

**摘要:目的** 探讨白藜芦醇对糖尿病白内障大鼠晶状体正沉默信息调节因子 2 相关酶 1 (*SIRT1*) 基因表达的影响。**方法** 80 只 Wistar 大鼠随机分为 4 组: 正常对照组、糖尿病模型组及白藜芦醇低剂量组及白藜芦醇高剂量组。糖尿病模型组、白藜芦醇低剂量组及白藜芦醇高剂量组一次性腹腔注射链脲菌素 (STZ) (60 mg/kg) 制备糖尿病大鼠模型。成模后低剂量组每日 20 mg/kg, 高剂量组每日 100 mg/kg 予白藜芦醇灌胃。裂隙灯显微镜照相机记录各组晶状体变化。12 周实验结束时测定各组大鼠晶状体丙二醛 (MDA)、超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化酶含量。逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测各组大鼠晶状体 *SIRT1*、肿瘤抑制因子 P53、叉头转录因子 1、核转录因子  $\kappa B$  (NF- $\kappa B$ ) 表达情况。**结果** 糖尿病模型组大鼠晶状体均发生不同程度混浊, 甚至完全混浊, 形成白内障。白内障糖尿病大鼠晶状体 MDA ( $7.96 \pm 0.51$ ) nmol/mg·prot 较正常对照组 ( $4.21 \pm 0.27$ ) nmol/mg·prot 升高 ( $P < 0.01$ ), 糖尿病白内障大鼠晶状体 SOD、谷胱甘肽过氧化酶 [( $31.92 \pm 5.03$ ) 和 ( $7.43 \pm 1.53$ ) u/mg·prot] 较正常对照组 [( $61.86 \pm 6.17$ ) 和 ( $13.61 \pm 2.27$ ) u/mg·prot] 降低 ( $P < 0.01$ )。高剂量白藜芦醇组大鼠晶状体 MDA ( $4.64 \pm 0.42$ ) nmol/mg·prot 较白内障糖尿病大鼠晶状体 ( $7.96 \pm 0.51$ ) nmol/mg·prot 降低 ( $P < 0.01$ )。高剂量白藜芦醇组大鼠晶状体 SOD、谷胱甘肽过氧化酶 [( $52.41 \pm 6.54$ ) 和 ( $12.76 \pm 1.72$ ) u/mg·prot] 较白内障糖尿病大鼠晶状体 SOD、谷胱甘肽过氧化酶 [( $31.92 \pm 5.03$ ) 和 ( $7.43 \pm 1.53$ ) u/mg·prot] 增高 ( $P < 0.01$ )。白内障糖尿病大鼠晶状体 *SIRT1* mRNA 表达 ( $0.187 \pm 0.034$ ) 较正常对照组大鼠 ( $0.523 \pm 0.089$ ) 降低 ( $P < 0.01$ )。高剂量白藜芦醇组大鼠晶状体 *SIRT1* mRNA 表达 ( $0.497 \pm 0.072$ ) 较白内障糖尿病大鼠晶状体 ( $0.187 \pm 0.034$ ) 增强 ( $P < 0.01$ )。白内障糖尿病大鼠晶状体 *I53*、叉头转录因子 1、NF- $\kappa B$  mRNA 表达 ( $0.816 \pm 0.153$ )、( $1.269 \pm 0.231$ )、( $0.896 \pm 0.029$ ) 较正常对照组 ( $0.592 \pm 0.104$ )、( $0.674 \pm 0.112$ )、( $0.495 \pm 0.008$ ) 增强 ( $P < 0.01$ )。高剂量白藜芦醇组糖尿病大鼠晶状体 *I53*、叉头转录因子 1、NF- $\kappa B$  mRNA 表达 ( $0.609 \pm 0.107$ )、( $0.713 \pm 0.121$ )、( $0.397 \pm 0.018$ ) 较白内障糖尿病大鼠 ( $0.816 \pm 0.153$ )、( $1.269 \pm 0.231$ )、( $0.896 \pm 0.029$ ) 降低 ( $P < 0.01$ )。**结论** 白藜芦醇可能通过调节 *SIRT1* 表达, 进一步调节下游基因 *I53*、叉头转录因子 1、NF- $\kappa B$  的表达, 抑制和延缓晶状体上皮细胞凋亡, 延缓糖尿病大鼠白内障的发生发展。

**关键词:** 白藜芦醇; 糖尿病性白内障; 正沉默信号调节因子相关酶 1; 肿瘤抑制因子 P53; 叉头转录因子 1; 核转录因子 -  $\kappa B$

中图分类号: R776.1; R587.1

文献标识码: A

### Effect of resveratrol on *SIRT1* gene expression in lenses of diabetic cataract rat \*

Jian Zhang, Yan-xiu Qi, Wei Jiang, Dong-lan Wang

(Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Jiamusi University, Jiamusi, Heilongjiang 154003, China)

收稿日期: 2015-12-14

\* 基金项目: 黑龙江省教育厅科研项目 (No: 12541822)

[通信作者] 王冬兰, E-mail: [chaiying1975@sohu.com](mailto:chaiying1975@sohu.com); Tel: 0454-8623587

**Abstract: Objective** To investigate the effects of resveratrol on silent information regulator protein 1 (*SIRT1*) gene expression in the lenses of diabetic cataract rat. **Methods** Eighty Wistar rats were randomly divided into four groups: control group (NC), diabetic model group (DC), low-dosage resveratrol group (RL) and high-dosage resveratrol group (RH). A single intraperitoneal injection with Streptozotocin (STZ 60 mg/kg) was used to establish the model of diabetic rats in diabetic model group, RL group and RH group. Resveratrol 20 mg/kg was administered to the rat model in the RL group daily, and resveratrol 100 mg/kg was administered to the rat model in the RH group daily through gastric perfusion. The changes of lenses were recorded by slit lamp microscope camera in the four groups. The content of malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) was detected in the lenses, and RT-PCR was used to assay *SIRT1*, *P53*, *FOXO1* and *NF- $\kappa$ B* mRNA expressions in the lenses. **Results** The diabetic cataract rats were replicated successfully in diabetic model group. The expression of MDA was significantly increased ( $P < 0.01$ ) and the expressions of SOD and GSH-Px were significantly decreased in the lenses of the diabetic cataract rats compared with the control group ( $P < 0.01$ ). Compared to the model group, the expression of MDA was significantly decreased ( $P < 0.01$ ), and the expressions of SOD and GSH-Px were significantly increased in the lenses of the RH group ( $P < 0.01$ ). The expression of *SIRT1* mRNA in the lenses of the model group was decreased significantly compared with the control group ( $P < 0.01$ ). The expression of *SIRT1* mRNA in the lenses of the RH group was increased significantly compared with that in the lenses of the model group ( $P < 0.01$ ). The mRNA expressions of *P53*, *FOXO1* and *NF- $\kappa$ B* in the lenses of the model group were increased significantly compared with those of the control group (all  $P < 0.01$ ). The mRNA expressions of *P53*, *FOXO1* and *NF- $\kappa$ B* in the lenses of the RH group were decreased significantly compared with those of the model group (all  $P < 0.01$ ). **Conclusions** Resveratrol may regulate the expression of downstream genes *P53*, *FOXO1* and *NF- $\kappa$ B* possibly by regulating the expression of *SIRT1*, ultimately inhibit and delay apoptosis of epithelial cells of the lenses and delay occurrence and development of diabetic cataract.

**Keywords:** resveratrol; diabetic cataract; silent information regulator factor 2 related enzyme 1; *P53*; forkhead box O1; nuclear factor- $\kappa$ B

随着社会经济发展,都市化的生活方式和社会人口的老齡化,我国糖尿病患病率逐年升高。白内障是糖尿病最常见的眼部并发症,其导致机制至今尚未完全阐明。近年来表观遗传学的出现,为许多疾病发病机制的研究开拓了新方向。Ⅲ类组蛋白去乙酰化酶是表观遗传学的分支之一,正沉默信息调节因子 2 相关酶 1(silent information regulator factor 2 related enzyme 1, SIRT1) 是一种细胞代谢辅酶,为烟酰胺腺嘌呤二核苷酸依赖的Ⅲ类组蛋白去乙酰化酶,在基因沉默、DNA 修复及维持基因稳定等方面有重要作用, SIRT1 是重要的抗衰老因子。SIRT1 通过调控 P53、FOXO1、核转录因子 - $\kappa$ B (nuclear transcription factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B) 组蛋白脱乙酰作用调节多种转录因子活性对抗氧化应激损伤及细胞凋亡,延长细胞寿命<sup>[1-2]</sup>。近年研究发现, SIRT1 与年龄相关性白内障、视网膜病变、青光眼、葡萄膜炎、视神经病变等多种眼部疾病的发病密切相关, SIRT1 与糖尿病性白内障发病关系及白藜芦醇对其影响的研究国内尚少报道<sup>[3]</sup>。氧化应激损伤引起的晶状体上皮细胞凋亡和所致的蛋白质改变是白内障发病的主要原因<sup>[4]</sup>。探讨糖尿病高血糖引发氧

化应激损伤时 *SIRT1* 基因调控晶状体上皮细胞凋亡的病理过程和机制,观察白藜芦醇对这一病理过程的影响,可能为糖尿病性白内障的防治提供新的理论依据和治疗新途径。本实验应用链脲菌素复制糖尿病白内障大鼠模型,测定白内障糖尿病大鼠晶状体丙二醛(Malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)变化及 *SIRT1*、*P53*、*FOXO1*、*NF- $\kappa$ B* 表达的改变,观察白藜芦醇对其改变的影响,探讨 *SIRT1* 在糖尿病性白内障发病中可能的调控作用,为糖尿病性白内障的防治寻求新靶点。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

清洁级 Wistar 大鼠 80 只,由佳木斯大学实验动物中心提供,体重(190 ± 10)g,经托吡卡胺散瞳裂隙灯检查晶状体透明,尾静脉采血测血糖 <6.7 mmol/L。

### 1.2 主要药品及试剂

白藜芦醇和链脲菌素购自美国 Sigma 公司(纯度 >99%、98%),MDA、SOD、GSH-Px 试剂盒由南京

建成生物工程研究所提供,Trizol 试剂、焦碳酸二乙酯(大连宝生生物有限公司),逆转录-聚合酶链反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)试剂盒(加拿大 Fermentas 公司),DNA marker(北京迈德生物技术有限公司),Taq PCR Master Mix 试剂(北京百泰克生物技术有限公司),DU-800 型紫外分光光度仪。

### 1.3 方法

**1.3.1 实验方法** 80 只 Wistar 大鼠按完全随机法分为 4 组:正常对照组 20 只,糖尿病模型组 20 只,白藜芦醇低剂量组 20 只,白藜芦醇高剂量组 20 只。适应性喂养 1 周后,糖尿病模型组、白藜芦醇低剂量组及白藜芦醇高剂量组在进食 8 h 后一次性腹腔注射链脲菌素(Streptozotocin, STZ)(溶于新鲜配制的 0.1 mmol/L 柠檬酸缓冲溶液, pH4.5)60 mg/kg 正常对照组。72 h 后尾静脉取血测空腹血糖,血糖 >16.7 mmol/L 即为糖尿病模型。成模后白藜芦醇低剂量组按 20 mg/kg、白藜芦醇高剂量组按 100 mg/kg 每日给予白藜芦醇灌胃,疗程 12 周。正常对照组和糖尿病模型组给等量生理盐水灌胃。给标准大鼠饲料、自由饮水。

**1.3.2 大鼠晶状体混浊程度的观察** 隔周以托吡卡胺散瞳,裂隙灯显微镜照相机记录晶状体变化。将晶状体混浊分为 0~V 期<sup>[6]</sup>。0 期:晶体透明;I 期:晶体周边皮质散在细小空泡;II 期:晶体周边皮质呈环状密集中等空泡;III 期:除晶体周边皮质密集空泡外,部分皮质片状混浊;IV 期:晶体核及核周边皮质混浊;V 期:晶体完全混浊。

**1.3.3 晶状体 MDA、SOD、MSH-Px 的测定** 实验 12 周后处死大鼠,立即于冰面上取大鼠左眼晶状体,用预冷的 0.9%生理盐水漂洗拭干。电子天平秤

重,加冷生理盐水,电动匀浆机充分研磨,制成 10% 冰冷晶状体匀浆液。40℃、3 000 r/min 离心 15 min 吸取上清液,以考马斯亮蓝测定晶状体蛋白质含量,计算含 50 μg 的加样体积。硫代巴比妥酸法测 MDA 含量;黄嘌呤氧化酶法测 SOD 含量;二硫代二硝基苯甲酸法测 GSH-Px 含量。

### 1.3.4 RT-PCR 测定大鼠晶状体 SIRT1、P53、FOXO1、NF-κB mRNA 表达

取大鼠右眼晶状体按照试剂盒说明书 Trizol 法提取总 RNA,琼脂糖凝胶电泳法检测 RNA 完整性,用 DU-800 紫外分光光度计检测 RNA 含量。选取光密度值 1.8~2.2 的总 RNA 500 μg 为模板,按照 RT-PCR 试剂盒说明书进行逆转录,合成 cDNA 第一链条,逆转录条件:30℃ 预变性 10 min,45℃ 变性 60 min,99℃ 退火 5 min,5℃ 结束。以 β-肌动蛋白(β-action)为内参,行 RT-PCR 反应。PCR 反应体系:Master Mix 12.5 μl,正反向引物各 1.0 μl,逆转录产物 1.0 μl,灭菌蒸馏水 9.5 μl(见表 1)。PCR 扩增反应条件为 94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 30 s,60℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 1 min,共 35 个循环;72℃ 再延伸 10 min,4℃ 结束。PCR 产物 5 μl 行溴化乙锭配制的 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳,120 V 电泳 30 min。凝胶成像系统(Quantity One)进行数据分析,以各组中 cDNA 扩增产物的条带与 β-actin 条带灰度值比值表示相应 mRNA 表达水平。

### 1.4 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计软件进行数据处理,计量资料以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间差异性测定采用方差分析,两两比较用 LSD-t 检验。等级资料比较用 kruskal-Wallis H 检验,其两两比较用 Nemengyi 法检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

表 1 各基因的 PCR 引物

引物名称	引物序列	退火温度/℃	扩增长度/bp
β-actin	正向引物:5'-CTGAGAGGGAAATCGTGCCTGAC-3'	60	210
	反向引物:3'-GAACCCATACCTTAGGACACCGT-5'		
SIRT1	正向引物:5'-GAACCTTTGCCTCATCTACATTTTG-3'	60	216
	反向引物:3'-CAAGTAAATAGTCTCAACGGTGGTT-5'		
FOXO1	正向引物:5'-ACGTGCATTCCCTGGTGTATCC-3'	60	221
	反向引物:3'-GTGGCGGTTTGTGGTCAGATTTA-5'		
P53	正向引物:5'-AAGACAGGCAGACTTTTCGCCACAG-3'	60	212
	反向引物:3'-GAAACTCCAAGCACAACACGGA-5'		
NF-κB	正向引物:5'-ATGTTCCGGTAGAGCGGTG-3'	60	170
	反向引物:5'-ATGTTCCGGTAGAGCGGTG-3'		

## 2 结果

### 2.1 各组大鼠晶状体混浊程度比较

实验结束时,正常对照组大鼠晶状体透明。糖尿病模型组大鼠少数出现晶状体皮质混浊,多数出现晶状体核及核周皮质混浊,甚至完全混浊。白藜芦醇低剂量组大鼠多数出现晶状体周边密集空泡皮质片状混浊,少数出现完全混浊,白藜芦醇高剂量组大鼠多数晶状体周边皮质出现空泡,少数出现皮质片状混浊。各组晶状体混浊程度比较经 Kruskal-Wallis  $H$  检验,差异有统计学意义( $H=62.113, P=0.000$ )。各组晶状体混浊程度经 Nemenyi 法检验,糖尿病模型组较正常对照组晶状体混浊程度加重( $\chi^2=42.371, P=0.001$ ),白藜芦醇高剂量组晶状体混浊程度较糖尿病模型组减轻( $\chi^2=36.684, P=0.004$ )。见表 2。

### 2.2 各组大鼠晶状体 MDA、SOD、MSH-Px 变化比较

各组大鼠晶状体 MDA、SOD、MSH-Px 含量比较,经单因素方差分析差异有统计学意义( $P=0.000$ )。大鼠晶状体 MDA 含量经 LSD- $t$  检验,糖尿病模型组较正常对照组升高( $t=29.051, P=0.000$ );白藜芦醇高剂量组较糖尿病模型组降低( $t=16.914, P=0.000$ );白藜芦醇低剂量组与糖尿病模型组差异无统计学意义( $t=1.560, P=0.101$ )。大鼠晶状体 SOD、MSH-Px 含量经 LSD- $t$  检验,糖尿病模型组较正常对照组降低( $t=16.820$  和  $8.865, P=0.000$ );白藜芦醇高剂量组较糖尿病模型组升高( $t=9.013$  和  $8.652, P=0.000$ );白藜芦醇低剂量组与糖尿病模型组差异无统计学意义( $t=1.514$  和  $1.532, P=0.139$  和  $0.134$ )。见表 3。

### 2.3 各组大鼠晶状体 SIRT1、P53、FOXO1、NF- $\kappa$ B 相对表达量比较

由表 4 可见,各组大鼠晶状体 SIRT1、P53、

表 2 各组大鼠晶状体混浊程度比较 ( $n=20$ ,例)

组别	0 期	I 期	II 期	III 期	IV 期	V 期
正常对照组	20	0	0	0	0	0
糖尿病模型组 <sup>1)</sup>	0	0	0	2	11	7
白藜芦醇低剂量组	1	2	4	6	5	2
白藜芦醇高剂量组 <sup>2)</sup>	6	8	4	2	0	0
$H$ 值	62.113					
$P$ 值	0.000					

注:1)与正常对照组比较, $P<0.01$ ;2)与糖尿病模型组比较, $P<0.01$

表 3 各组大鼠晶状体 MDA、SOD、MSH-Px 比较

( $n=20, \bar{x} \pm s$ )

组别	MDA/ (nmol/mg·prot)	SOD/ (u/mg·prot)	MSH-Px/ (u/mg·prot)
正常对照组	4.21 ± 0.27	61.86 ± 6.17	13.61 ± 2.27
糖尿病模型组	7.96 ± 0.51 <sup>1)</sup>	31.92 ± 5.03 <sup>1)</sup>	7.43 ± 1.53 <sup>1)</sup>
白藜芦醇低剂量组	7.88 ± 0.49	34.56 ± 5.97	8.19 ± 1.61
白藜芦醇高剂量组	4.64 ± 0.42 <sup>2)</sup>	52.41 ± 6.54 <sup>2)</sup>	12.76 ± 1.72 <sup>2)</sup>
$F$ 值	235.088	116.418	60.312
$P$ 值	0.000	0.000	0.000

注:1)与正常对照组比较, $P<0.01$ ;2)与糖尿病模型组比较, $P<0.01$

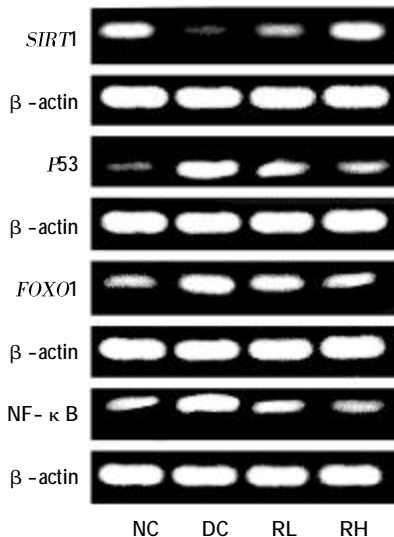
FOXO1、NF- $\kappa$ B mRNA 相对表达量经单因素方差分析差异有统计学意义( $P=0.000$ )。大鼠晶状体 SIRT1 mRNA 表达量经 LSD- $t$  检验,糖尿病模型组较正常对照组降低( $t=15.771, P=0.000$ );白藜芦醇高剂量组较糖尿病模型组升高( $t=17.410, P=0.000$ );白藜芦醇低剂量组与糖尿病模型组比较,差异无统计学意义( $t=1.025, P=0.314$ )。大鼠晶状体 P53、FOXO1 mRNA 表达量经 LSD- $t$  检验,糖尿病模型组较正常对照组升高( $t=5.415$  和  $10.372, P=0.000$ );白藜芦醇高剂量组较糖尿病模型组降低( $t=4.964$  和  $9.541, P=0.000$ );白藜芦醇低剂量组与糖

表 4 大鼠晶状体中 SIRT1、P53、FOXO1、NF- $\kappa$ B 表达量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	mRNA			
	SIRT1/ $\beta$ -actin	P53/ $\beta$ -actin	FOXO1/ $\beta$ -actin	NF- $\kappa$ B/ $\beta$ -actin
正常对照组	0.523 ± 0.089	0.592 ± 0.104	0.674 ± 0.112	0.495 ± 0.008
糖尿病模型组	0.187 ± 0.034 <sup>1)</sup>	0.816 ± 0.153 <sup>1)</sup>	1.269 ± 0.231 <sup>1)</sup>	0.896 ± 0.029 <sup>1)</sup>
白藜芦醇低剂量组	0.201 ± 0.051	0.798 ± 0.165	1.195 ± 0.243	0.542 ± 0.031 <sup>2)</sup>
白藜芦醇高剂量组	0.497 ± 0.072 <sup>2)</sup>	0.609 ± 0.107 <sup>2)</sup>	0.713 ± 0.121 <sup>2)</sup>	0.397 ± 0.018 <sup>2)</sup>
$F$ 值	158.681	15.739	56.091	270.269
$P$ 值	0.000	0.000	0.000	0.000

注:1)与正常对照组比较, $P<0.01$ ;2)与糖尿病模型组比较, $P<0.01$

尿病模型组差异无统计学意义 ( $t=0.360$  和  $0.970$ ,  $P=0.721$  和  $0.338$ )。大鼠晶状体 *NF- $\kappa$ B* mRNA 表达量经 LSD-*t* 检验,糖尿病模型组较正常对照组升高 ( $t=16.993$ ,  $P=0.000$ ),白藜芦醇高剂量组和白藜芦醇低剂量组较糖尿病模型组降低 ( $t=16.290$  和  $19.382$ ,  $P=0.000$ )。见附图。



附图 各组大鼠 *SIRT1*、*P53*、*FOXO1*、*NF- $\kappa$ B* mRNA 较  $\beta$ -actin 的相对表达量

### 3 讨论

白藜芦醇是 1940 年由 TAKAOKA 从毛叶藜芦的根部分离得到的一种含多羟基芪类结构非黄酮类多酚化合物。近年研究发现白藜芦醇广泛存在于虎仗、藜芦、葡萄皮、花生等多种植物中,具有抗氧化、抗衰老、抗炎等多种生理作用,在抵抗与衰老、氧化应激等相关疾病中发挥重要作用<sup>[6-7]</sup>。本研究发现,白藜芦醇可能通过抵抗氧化应激损伤,调控 *SIRT1*、*P53*、*FOXO1*、*NF- $\kappa$ B* 基因的表达,影响糖尿病大鼠白内障的发病过程。

本研究结果显示,形成白内障糖尿病大鼠晶状体 MDA 较正常对照组大鼠升高,白内障糖尿病大鼠晶状体 SOD、GSH-Px 较正常对照组大鼠降低。MDA 是脂质过氧化终产物,MDA 含量反映细胞受自由基攻击氧化应激损伤的程度<sup>[8]</sup>。SOD 与超氧化物阴离子发生歧化反应清除自由基,GSH-Px 分解过氧化氢  $H_2O_2$ 、还原氢氧化物阻断氧化反应,SOD、GSH-Px 是反映机体抗氧化活性的关键酶。SOD、GSH-Px 活性反映机体抗氧化活性和机体清除自由基的能力<sup>[9]</sup>。糖尿病大鼠随着血糖持续升高,晶状体

混浊逐渐加重,实验结束时裂隙灯检查大鼠晶状体均发生不同程度的混浊、甚至完全混浊,未经治疗的糖尿病大鼠均发生了白内障。形成白内障大鼠晶状体 MDA 含量较正常对照组大鼠升高,SOD、GSH-Px 活性降低。提示白内障糖尿病大鼠晶状体发生了氧化应激损伤。过氧化损伤可能是白内障发生的重要原因<sup>[10]</sup>。

本研究结果显示,高剂量白藜芦醇组糖尿病大鼠晶状体 MDA 含量较白内障糖尿病大鼠、低剂量白藜芦醇大鼠降低,SOD、GSH-Px 活性升高。应用高剂量白藜芦醇大鼠 0 期、I 期晶体混浊多于应用小剂量白藜芦醇大鼠,而发生 II、III 期晶体混浊少于高剂量白藜芦醇大鼠,均无 IV、V 期晶体混浊发生。而应用低剂量白藜芦醇大鼠 0、I 期晶体混浊明显少于高剂量白藜芦醇大鼠,II、III 期晶体混浊较高剂量组增多,且有  $>1/3$  的个体 (7/20) 发生 IV、V 期晶体混浊。研究结果显示白藜芦醇对糖尿病大鼠晶体有清除自由基,增强抗氧化酶活性作用。白藜芦醇通过清除自由基,抗过氧化损伤<sup>[11]</sup>,保护晶体细胞,减轻延缓糖尿病大鼠白内障的发生、发展。

本研究结果显示,白内障糖尿病大鼠晶状体 *SIRT1* mRNA 表达较正常对照组大鼠降低,*P53*、*FOXO1*、*NF- $\kappa$ B* mRNA 表达较正常对照组大鼠增强。提示在氧化应激状态下 *SIRT1* 通过调控 *P53*、*FOXO1*、*NF- $\kappa$ B* 基因的表达参与糖尿病性白内障发病的病理生理过程。*SIRT1* 是  $NAD^+$  依赖的去乙酰化酶,氧化应激通过降低  $NAD^+/NADH$  比率使 *SIRT1* 表达降低<sup>[12]</sup>。*P53* 是生物体内重要的抑癌基因,*P53* 在细胞生长发育过程中对细胞内 DNA 起监控作用。正常生理情况下 *SIRT1* 通过对 *P53* 进行去乙酰化修饰使 *P53* 处于休眠状态,减少 *P53* 介导的细胞凋亡过程<sup>[13]</sup>。糖尿病白内障大鼠氧化应激损伤使大鼠晶状体 *SIRT1* 表达降低,*SIRT1* 表达降低使 *P53* 去乙酰化作用减弱,*P53* 基因表达上调,通过降低 Bel-2/Bax 比例,激活半胱氨酸蛋白酶水解酶通路等<sup>[14]</sup>途径,诱导晶状体上皮细胞凋亡,导致白内障。

转录因子 FOXOs 是调节细胞寿命、代谢、发育、促进细胞周期停滞凋亡,参与应激反应等细胞进程的转录辅激活因子。*SIRT1* 能通过去乙酰化作用直接或间接调节 FOXO3 和 FOXO4 活性。*SIRT1* 通过使 FOXO1 去乙酰化调节细胞周期阻滞、DNA 修复和抗氧化应激,进而减弱 FOXO1 诱导的晶状体上皮细胞凋亡<sup>[12]</sup>。白内障糖尿病大鼠 *SIRT1* 基因表达

减弱,对 *FOXO1* 基因的抑制作用减弱,*FOXO1* 基因表达增强诱导晶状体上皮细胞的凋亡,促进白内障发生、发展。

*NF-κB* 是一种具有多向转录调节作用的蛋白质,*NF-κB* 的活性受 *SIRT1* 的调节,*SIRT1* 作用于 *NF-κB* P65 亚基的 K221、K310 位点,加强 P65 与 *IκB* 的相互作用,抑制 *NF-κB* 基因的表达<sup>[15]</sup>。白内障糖尿病大鼠晶状体 *SIRT1* 表达减弱使晶状体中 *NF-κB* 表达增强。*NF-κB* 活化激活某些凋亡通路促进细胞凋亡,同时 *NF-κB* 激活介导的炎症反应损伤细胞,也促进细胞凋亡的发生<sup>[16]</sup>。*SIRT1* 去乙酰化作用减弱使晶状体上皮细胞 *NF-κB* 表达增强是糖尿病大鼠发生白内障的另一重要原因。

本研究结果显示,高剂量白藜芦醇组糖尿病大鼠晶状体 *SIRT1* mRNA 表达较白内障糖尿病大鼠增强,高剂量白藜芦醇治疗组糖尿病大鼠晶状体 *P53*、*FOXO1*、*NF-κB* mRNA 表达较白内障糖尿病大鼠降低。提示白藜芦醇治疗可提高白内障糖尿病大鼠晶状体 *SIRT1* 基因表达,降低晶状体 *P53*、*FOXO1*、*NF-κB* 基因表达。氧化应激能够减少 *NAD<sup>+</sup>/NADH* 比率,降低 *SIRT1* 基因表达。本研究结果证明,白藜芦醇对糖尿病大鼠晶状体有很强的抗氧化应激损伤作用,白藜芦醇通过降低糖尿病大鼠晶状体氧化应激反应,增强晶状体 *SIRT1* 基因表达,从而调控 *P53*、*FOXO1*、*NF-κB* 基因转录,抵抗晶状体上皮细胞凋亡,延缓糖尿病性白内障的发生发展。

因此在临床上应用白藜芦醇或其他 *SIRT1* 激动剂,通过 *SIRT1* 的脱乙酰基作用调节 *P53*、*FOXO1*、*NF-κB* 等转录因子的活性,抵抗氧化应激等损伤所致的晶状体上皮细胞凋亡,可能成为糖尿病性白内障治疗的一条新途径。

#### 参 考 文 献:

- [1] MIMURA T, KAJI Y, NOMA H, et al. The role of *SIRT1* in ocular aging[J]. *Exp Eye Res*, 2013, 116(1): 17-26.
- [2] 史燕茹,常艳,辛鹏,等. 沉默信息调节因子相关酶 1 及脂肪合成酶在非酒精性脂肪肝大鼠模型中的表达及意义[J]. *中国现代医学杂志*, 2015, 25(32): 9-13.
- [3] 徐可可,李志坚. *SIRT1* 与眼科疾病的研究进展[J]. *国际眼科杂志*, 2015, 15(5): 803-806.
- [4] 万丽,刘文斌,沈华宇,等. 链脲菌素诱导糖尿病大鼠白内障的氧化应激-细胞凋亡机制及葛根素的改善作用[J]. *国际眼科杂志*, 2014, 14(10): 1773-1775.
- [5] 黄鑫,张伟芳,赵凯. 糖尿病模型大鼠白内障形成过程及枸杞多糖干预的实验研究[J]. *宁夏医科大学学报*, 2013, 35(6): 640-647.
- [6] LI J, FENG L, XING Y, et al. Radioprotective and antioxidant effect of resveratrol in hippocampus by activating *SIRT1* [J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(4): 5928-5939.
- [7] 李长兴,李红芳,黄金炳,等. 白藜芦醇对雌二醇诱发的去卵巢大鼠子宫内模渗出和血清 VEGF 的影响[J]. *中国现代医学杂志*, 2013, 23(3): 23-26.
- [8] GUNAL S Y, USTUNDAG B, GUNAL A I, et al. The assessment of oxidative stress on patients with chronic renal failure at different stages and on dialysis patients receiving different hypertensive treatment[J]. *Indian J Clin Biochem*, 2013, 28(4): 390-395.
- [9] LEE Y, LEE J Y, OH J Y, et al. Expression of hepatic and ovarian antioxidant enzymes during Estrous cycle in rats[J]. *Toxicol Lett*, 2012, 212(3): 329-336.
- [10] MAEDEL S, HIRMSCHALL N, CHEN Y A, et al. Effect of heparin coating of a foldable intraocular lens on inflammation and capsular bag performance after cataract surgery [J]. *J Cataract Refract Surg*, 2013, 39(12): 1810-1817.
- [11] CHEN B, XUE J, MENG X, et al. Resveratrol prevents hypoxia-induced arginase II expression and proliferation of human pulmonary artery smooth muscle cells via Akt-dependent signaling [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2014, 317(4): 1317-1325.
- [12] ZHENG T, LU Y. Changes in *SIRT1* expression and its downstream pathways in age-related cataract in human [J]. *Current Eye Res*, 2011, 36(5): 449-455.
- [13] KUME S, KITADA M, KANASAKI K, et al. Anti-aging molecular, *Sirt1*: a novel therapeutic target for diabetic nephropathy[J]. *Arch Pharm Res*, 2013, 36(2): 230-236.
- [14] BHATTACHARYA S, CHAUM E, JOHNSON D A, et al. Age-related susceptibility to apoptosis in human retinal pigment epithelial cells is triggered by disruption of *P53-Mdm2* association[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2012, 53(13): 8350-8366.
- [15] YANG H, ZANG W, PAN H, et al. *SIRT1* activators suppress inflammatory responses through promotion of *P65* decetylation and inhibition of *NF-κB* activity [J]. *PLoS One*, 2012, 7(9): 246-253.
- [16] MOON M H, JEONG J K, LEE Y J, et al. *SIRT1*, a class III histone deacetylase, regulate *TNF-α*-induced inflammation in human chondrocytes[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2013, 21(3): 470-480.

(张蕾 编辑)