

金樱子对大鼠糖尿病性白内障细胞凋亡和氧化应激的影响

周 俊,何湘珍,肖启国,彭辉灿,王俞方,李 洁

(南华大学附属第二医院眼科,湖南 衡阳 421001)

摘 要: **目的** 探讨金樱子对糖尿病大鼠晶状体上皮细胞凋亡的作用及氧化应激机制。**方法** 用 Streptozotocin (STZ) 腹腔注射建立 SD (Sprague-Dawley) 大鼠糖尿病模型,然后将其随机分为糖尿病模型组及金樱子干预组,另设正常对照组。12 周后,检测晶状体组织中总抗氧化能力 (TAC)、超氧化物歧化酶 (SOD) 活性和丙二醛 (MDA) 含量。采用流式细胞术检测大鼠晶状体上皮细胞凋亡率。**结果** 金樱子能显著降低糖尿病大鼠晶状体上皮细胞凋亡率 ($P < 0.05$)。金樱子能显著降低糖尿病大鼠的血糖、血脂及 MDA 含量,并提高 TAC 和 SOD 活性 ($P < 0.05$)。**结论** 金樱子能抑制晶状体上皮细胞凋亡和氧化应激,延缓糖尿病性白内障的发展。

关键词: 金樱子; 糖尿病性白内障; 氧化应激; 凋亡

中图分类号:R776.1

文献标识码:A

Effects of Rosa Laevigata on Diabetic Cataract in Rats Apoptosis and Oxidative Stress

ZHOU Jun, HE Xiangzhen, XIAO Qiguo, et al

(Department of Ophthalmology, the Second Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: **Objective** To investigate the mechanism of the stress of Rosa laevigata on apoptosis in diabetic rats lens epithelial cells and the role of oxidation. **Methods** SD (Sprague-Dawley) model of diabetic rats was established using Streptozotocin (STZ) intraperitoneal injection, and then randomly divided into diabetic model group and intervention group of Rosa laevigata. At the same time, the experimental control group was set. After 12 weeks, the rats were sacrificed, and their total antioxidant capacity assay lens tissues (TAC), superoxide dismutase (SOD) activity and malondialdehyde (MDA) content were measured. Lens epithelial cell apoptosis was detected by flow cytometry. **Results** Rosa laevigata could significantly decrease the apoptosis of lens epithelial cells of diabetic rat rate ($P < 0.05$). Rosa laevigata significantly decreased the blood glucose, blood lipid and MDA in diabetic rats, and improved TAC and SOD activity ($P < 0.05$). **Conclusion** Rosa laevigata can inhibit epithelial cell apoptosis and oxidative stress in lens, and delay the development of diabetic cataract.

Key words: Rosa Laevigata; diabetic cataract; oxidative stress; apoptosis

目前,糖尿病已成为严重影响人类健康的常见疾病之一,全球糖尿病患者约为 3.70 亿,中国患者已接近 1 亿,其并发症涉及器官组织较多,如眼、肾、心、血管、神经等,对人们的生活质量影响巨大,其中最易导致失明的眼部并发症就是糖尿病性白内障和

糖尿病性视网膜病变^[1],糖尿病性白内障最主要的发病机制之一就是氧化应激。研究已经表明,在白内障的形成和发展中伴随着晶状体上皮细胞的凋亡,而过度的氧化应激反应可加速晶状体上皮细胞的凋亡^[2]。最近的研究表明,金樱子能清除超氧阴离子自由基,羟自由基,抑制细胞凋亡,阻止脂质过氧化,降低血清 β_2 脂蛋白和胆固醇,降低肝脏,心脏脂肪沉积,调节血糖,具有显著的抗氧化和抗炎作用^[3],可以在一定程度上延缓大鼠糖尿病肾脏功能

收稿日期:2013-12-30

基金项目:湖南省科技厅项目(编号:2014SK3021)。

作者简介:周俊,硕士,主治医师,研究方向:白内障, E-mail: nhf2zhoujun@163.com.

的损害^[4]。该课题通过研究金樱子对大鼠糖尿病性白内障细胞凋亡和氧化应激的影响,探讨糖尿病性白内障的防治新途径。

1 材料与方法

1.1 试剂与大鼠

金樱子从衡阳中药材公司购买;STZ、碘化丙啶从美国 Sigma 公司购买;膜联蛋白 V 凋亡检测试剂盒从美国 BD 公司购买;丙二醛(MDA)检测试剂盒、超氧化物歧化酶(SOD)检测试剂盒和总抗氧化能力检测试剂盒(TAC)从南京建成生物工程研究所购买;其余试剂均从上海生物工程有限公司购买。Sprague Dawley(SD)大鼠从南华大学实验动物部购买,大鼠重量为 250 ± 5 g,经散瞳实验检查显示晶状体均正常透明。

1.2 方法

1.2.1 糖尿病大鼠白内障模型的建立与金樱子干预 将 60 只 SD 大鼠腹腔注射链脲佐菌素(60 mg/kg),72 h 后尾静脉取血测量空腹血糖大于 14 mmol/L 表示糖尿病模型建立成功,然后将成模的大鼠再随机分为糖尿病模型组和金樱子干预组,每组各 30 只。同时设立正常对照组 SD 大鼠 30 只。金樱子干预组按 400 mg/kg 体重用金樱子灌胃,4 周、8 周和 12 周,每组各取 10 只大鼠,经 0.01 g/L 戊巴比妥钠麻醉处死后取晶状体备用。

1.2.2 血糖与血脂检测 处死大鼠前,禁食(不禁水)10 h,称体重,末次给药后 1 h,麻醉大鼠,取腹主动脉血,离心分离血清,检测血糖、血脂水平用半自动生化分析仪。

1.2.3 晶状体混浊度检测 用 1% 复方托吡卡胺眼液在大鼠双眼各点 1 次,5 min 后乙醚蒸气麻醉,每 4 周用 TOPCON SL-2G 裂隙灯显微镜观察晶状体变化,根据 Azuma 等^[5]的分级标准,将晶状体混浊水平分为 5 个等级,Ⅰ级:无混浊,晶体透明;Ⅱ级:轻度混浊,周边部分晶体皮质开始出现空泡样改变;Ⅲ级:中度混浊,周边部的空泡样改变开始向中央发展,晶体核开始出现少量的雾样混浊;Ⅳ级:重度混浊,晶体的空泡样改变范围继续扩大并向晶体核区蔓延,出现严重的雾状混浊;Ⅴ级:晶体皮质及核全部混浊。

1.2.4 分光光度法检测 麻醉处死大鼠后,将大鼠的晶状体摘除, 0.9% 氯化钠注射液冲洗后称重,

然后将晶状体组织匀浆,低温离心,取上清液,参照试剂盒说明书,分光光度法检测晶状体组织中 TAC、MDA 活性和 SOD 含量。

1.2.5 流式细胞仪检测晶状体上皮细胞凋亡 获取大鼠晶状体,显微镜下撕取晶状体前囊膜,并用 300 目滤网制备成单细胞悬液, $1\,000\text{ r/min}$ 离心 5 min 后,PBS 洗涤 2 次,调整细胞密度为 $1 \times 10^9/\text{L}$ 。加入预冷的 $1 \times$ 结合缓冲液、Annexin V-FITC 液 $5\text{ }\mu\text{L}$ 和 PI $10\text{ }\mu\text{L}$,充分混匀,室温避光染色 15 min,PBS 洗涤多余染料后,用流式细胞仪($\gamma = 488\text{ nm}$)检测细胞凋亡率。

1.3 统计学分析

实验数据均平行测定 3 次,用均数 $\pm$ 标准差表示,所有数据采用 SPSS13.0 统计软件进行分析,晶状体混浊程度用 H 检验,计量资料组间比较采用单因素方差分析及 q 检验,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 糖尿病大鼠的一般情况

大鼠注射 STZ 后 1 周,其饮水量、进食量及尿量均显着增加。正常对照组大鼠体重迅速增加,但金樱子干预组和糖尿病模型组体重增长缓慢。4 周后糖尿病模型组大鼠精神不振、体重减轻、毛发干枯与脱毛,糖尿病的并发症开始逐步显现反应迟钝和多发感染等。称重发现,金樱子干预组体重明显较糖尿病模型组增加(表 1, $P < 0.05$),一般情况明显好于糖尿病模型组。12 周时糖尿病模型组大鼠体重明显低于正常对照组和金樱子干预组($P < 0.05$)。

表 1 不同时间各组大鼠的体重变化($g,n=10$)

组别	4 周	8 周	12 周
正常对照组	323.11 ± 2.82	390.83 ± 2.18	464.01 ± 2.47
糖尿病模型组	223.81 ± 2.31^a	190.02 ± 2.39^a	151.90 ± 2.38^a
金樱子干预组	304.00 ± 2.57^b	370.49 ± 2.32^b	412.99 ± 2.17^b

与正常对照组比较,a: $P < 0.05$;与糖尿病模型组比较,b: $P < 0.05$

2.2 血糖与血脂

正常对照组大鼠血糖值一直正常。用 STZ 诱发后 3 天,60 只大鼠血糖均 $> 14\text{ mmol/L}$,与注射前相比血糖明显升高($P < 0.05$)。诱发 4 周后,金樱子干预组大鼠血糖与血脂明显下降,而糖尿病模型

组血糖与血脂继续上升 ($P < 0.05$) ; 至 12 周时, 金樱子干预组大鼠血糖与血脂较糖尿病模型组大鼠明显降低 (表 2, $P < 0.05$) 。

表 2 各组大鼠 FBG、TC、TG 的变化 (mmol/L, $n = 10$)

组别	FBG	TC	TG
正常对照组	4.12 ± 1.09	1.68 ± 0.53	1.12 ± 0.43
糖尿病模型组	25.02 ± 2.27 ^a	5.10 ± 0.45 ^a	3.67 ± 0.32 ^a
金樱子干预组	5.62 ± 1.25 ^b	3.25 ± 0.36 ^b	2.36 ± 0.50 ^b

与正常对照组比较, a: $P < 0.05$; 与糖尿病模型组比较, b: $P < 0.05$

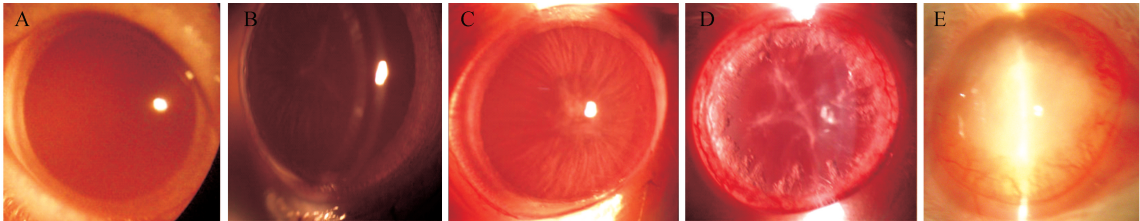


图 1 晶体混浊程度分级 (I ~ V 级) A: I 级; B: II 级; C: III 级; D: IV 级; E: V 级

2.4 晶状体组织中 TAC、SOD 活性和 MDA 含量

与正常对照组比较, 糖尿病模型组大鼠晶状体组织 MDA 含量显著增加, TAC 和 SOD 活性则显著降低 (表 3, $P < 0.05$) ; 经金樱子处理后, 不但显著降低了晶状体组织的 MDA 含量, 而且明显增强了 TAC 和 SOD 的活性 (见表 3, $P < 0.05$) 。说明金樱子能够降低脂质过氧化物, 提高晶状体组织抗氧化酶活性, 提高总抗氧化力, 从而降低晶状体的氧化应激反应的影响, 延缓糖尿病性白内障的发生和发展。

表 3 第 12 周时各组晶状体组织中 TAC、SOD 活性和 MDA 含量 ($n = 20$)

组别	MDA (μmol/mg)	SOD (U/mg)	TAC (U/mg)
正常对照组	1.12 ± 0.21	197.23 ± 3.26	4.19 ± 0.12
糖尿病模型组	4.22 ± 0.56 ^a	125.15 ± 1.54 ^a	1.34 ± 0.16 ^a
金樱子干预组	2.53 ± 0.24 ^b	168.45 ± 2.15 ^b	3.18 ± 0.06 ^b

与正常对照组比较, a: $P < 0.05$; 与糖尿病模型组比较, b: $P < 0.05$

2.5 细胞凋亡率

4 周、8 周和 12 周时糖尿病模型组细胞凋亡率均显著高于正常对照组 (见表 4, $P < 0.05$) ; 金樱子干预组细胞凋亡率较糖尿病模型组显著降低 (见表 4, $P < 0.05$) 。

2.3 晶状体混浊程度

正常对照组大鼠晶状体在 4 ~ 12 周内一直保持透明, 糖尿病模型组、金樱子干预组大鼠在注射 STZ 后第 4 周均逐渐出现不同程度的晶状体混浊; 到 12 周时, 糖尿病模型组大鼠大部分都出现了比较严重的晶状体皮质及核的混浊, 少部分的晶状体还出现了全白色的混浊, 但金樱子干预组大鼠发生晶状体混浊的数量及程度均较糖尿病模型组低 (图 1, $P < 0.05$) 。

表 4 各组 LECs 的凋亡率比较 (% , $n = 20$)

组别	4 周	8 周	12 周
正常对照组	2.56 ± 0.36	2.84 ± 0.34	3.12 ± 0.45
糖尿病模型组	11.22 ± 0.74 ^a	16.10 ± 0.84 ^a	23.45 ± 1.08 ^a
金樱子干预组	5.21 ± 0.65 ^b	7.56 ± 1.12 ^b	9.76 ± 1.52 ^b

与正常对照组比较, a: $P < 0.05$; 与糖尿病模型组比较, b: $P < 0.05$

3 讨 论

糖尿病性白内障是多种因素综合作用的结果, 其经典发病机制包括氧化应激学说、渗透压学说以及晶体蛋白的非酶糖基化学说, 在各种导致白内障的病因中都有一个相同的途径即由自由基介导的氧化应激^[6]。生理条件下, 晶状体有两类自由基防御系统: 酶防御系统 (超氧化物歧化酶 (SOD), 过氧化氢酶 (CAT), 谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-PX) 及其同工酶 CuZnSOD 等); 另一个是非酶防御系统 (维生素 C、E 和巯基化合物等, 它的主要功能是保护晶状体蛋白巯基功能、减少 H₂O₂ 和其他氧化物生成^[7])。主要用于清除自由基, 维持细胞和机体的正常生理功能。抗氧化防御屏障受很多因素的影响, 一旦受损可以导致谷胱甘肽 (GSH)、抗坏血酸, 维生素 C 和 E 等的含量减少, 抗氧化酶 (GSH-PX、CAT、SOD) 活力降低, 使晶体 O²⁻、OH⁻、H₂O₂ 等自由基清除率降低或生成量增加, 使晶状体的上皮细

胞和纤维细胞发生凋亡,蛋白质和脂质发生过氧化最终导致白内障的形成^[8]。超氧化物歧化酶是晶状体内抗氧化的关键物质,现已证实:糖尿病发生时,当 SOD、CAT、GSH-PX 活力明显降低时有大量 OH^- 、 O_2^- 和 H_2O_2 等活性氧自由基产生,其源自葡萄糖与蛋白质发生糖基化作用后葡萄糖的自氧化过程,因此,有学者认为自由基引起的过度的氧化应激反应是引发糖尿病性白内障的主要原因^[9]。TAC 衡量的是机体或组织内总的抗氧化能力的大小,SOD 是酶促防御系统中的关键酶,它既是一种抗氧化剂,又不同于一般的抗氧化剂,它是机体自身产生的一种特殊的抗氧化酶,其作用远远大于一般的抗氧化剂,大约是一般抗氧化剂的 1000 倍以上,对其含量的测定可以反映出机体自身抗氧化能力的大小。MDA 是氧化应激反应的一种标志性产物,它是脂质在自由基作用下产生氧化应激反应所生成的产物,且具有细胞毒性,通常用来评价机体氧化应激水平,因此,MDA 含量越高说明氧化应激反应就越强。

晶状体上皮细胞在晶状体透明性的保护方面有着非比寻常的意义,当晶状体上皮细胞凋亡达到一定的数量,细胞增生和凋亡失衡导致晶状体混浊的发生,国内外学者较为一致的观点是晶状体上皮细胞的凋亡是年龄相关性白内障、代谢性白内障以及外伤性白内障等形成的细胞学基础^[10]。已有研究显示,在高血糖的环境下,晶状体内环境代谢失衡,高糖产生的氧化应激、高渗透压等损害因子会增加更快,破坏晶状体的稳定,攻击晶状体上皮细胞,破坏晶状体上皮细胞增生和凋亡的平衡,使晶状体上皮细胞加速凋亡,最终导致白内障^[11]。

中草药金樱子(*Rosa Laevigata* Mickx)属蔷薇科蔷薇属的常绿蔓性灌木,其果实中富含几十种生理活性物质^[12],如维生素、氨基酸、多糖、黄酮类、三萜类等。已有研究发现金樱子除了可以大幅降低血清胆固醇、甘油三脂和 β 脂蛋白,还能消炎,保肝护肾,固本培元,止尿及抗衰老,金樱子中的多糖类和黄酮类化合物能明显清除肝肾等组织中 OH^- 、 O_2^- 等超氧自由基,有明显的抗氧化和抑制细胞凋亡的作用^[13-14]。目前,金樱子对糖尿病性白内障是否具有防治作用尚无研究报告。

本研究结果证实,在实验的 12 周内糖尿病大鼠随着病情的发展,晶状体混浊发展的同时晶状体上皮细胞凋亡率也在相应的增加。然而,经过金樱子处理后的大鼠,LEC 凋亡水平明显低于糖尿病模型组,说

明金樱子能在一定程度上抑制或延缓了凋亡的发生。

本研究结果发现,糖尿病模型组大鼠与正常对照组比较,一方面晶状体组织中 MDA 含量显著增加,另一方面 SOD、TAC 活性显著减弱,经金樱子处理后的糖尿病大鼠晶状体组织中 MDA 含量显著降低,SOD、TAC 活性显著增强。研究结果表明,金樱子可以降低晶状体组织中脂质过氧化产物的生成,提高抗氧化酶的活性和总抗氧化能力,减轻晶状体的氧化应激反应,起到保护晶状体维持透明性的作用。本实验发现,从成模后的第 4 周开始糖尿病模型组大鼠晶状体混浊度均显著高于另外两组($P < 0.05$),经金樱子处理后的大鼠晶状体混浊度发展速度则显著低于糖尿病模型组($P < 0.05$)。

综上所述,本研究从晶状体的形态学、生物酶学及细胞学三个方面初步研究了金樱子对糖尿病大鼠晶状体的保护作用,结果发现金樱子对糖尿病性白内障大鼠晶状体上皮细胞凋亡具有一定的抑制功能,并可能与其具有较强的抗氧化能力,最终通过抑制晶状体组织的氧化应激而实现治疗糖尿病性白内障的作用。因此,金樱子有望成为糖尿病性白内障治疗的一种潜在药物,但其具体的调控机制还有待进一步研究,同时,对于金樱子中最有效的抗氧化成分的研究还有待深入研究。

参考文献:

- [1] Balakumar M, Saravanan N, Prabhu D, et al. Benefits of early glycemic control by insulin on sensory neuropathy and cataract in diabetic rats[J]. *Indian J Exp Biol*, 2013, 51(1):56-64.
- [2] Kim B, Kim SY, Chung SK. Changes in apoptosis factors in lens epithelial cells of cataract patients with diabetes mellitus[J]. *J Cataract Refract Surg*, 2012, 38(8):1376-1381.
- [3] Zhang S, Zheng L, Dong D, et al. Effects of flavonoids from *Rosa laevigata* Michx fruit against high-fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease in rats[J]. *Food Chemistry*, 2013, 141(3):2108-2116.
- [4] 周枉娟,廖前进,张秋菊. 金樱子对糖尿病大鼠肾 MCP-1 表达的影响[J]. *现代生物医学进展*, 2009, 9(23):4425-4427.
- [5] Bahmani F, Bathaie SZ, Aldavood SJ, et al. Glycine therapy inhibits the progression of cataract in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. *Mol Vis*, 2012, 18:439-448.
- [6] Balakumar M, Saravanan N, Prabhu D, et al. Benefits of early glycemic control by insulin on sensory neuropathy

- and cataract in diabetic rats[J]. Indian J Exp Biol,2013, 51(1):56-64.
- [7] Katta AV, Katkam RV, Geetha H. Lipid peroxidation and the total antioxidant status in the pathogenesis of age related and diabetic cataracts: a study on the lens and blood [J]. J Clin Diagn Res, 2013, 7(6):978-981.
- [8] Li Y, Jia Y, Zhou J, et al. Effect of methionine sulfoxide reductase B1 silencing on high-glucose-induced apoptosis of human lens epithelial cells[J]. Life Sci, 2013, 92(3):193-201.
- [9] Li Y, Jia Y, Zhou J, et al. Effect of methionine sulfoxide reductase B1 silencing on high-glucose-induced apoptosis of human lens epithelial cells[J]. Life Sci, 2013, 92(3):193-201.
- [10] Kim J, Kim OS, Kim CS, et al. Accumulation of argpyrimidine, a methylglyoxal-derived advanced glycation end product, increases apoptosis of lens epithelial cells both in vitro and in vivo[J]. Exp Mol Med, 2012, 44(2):167-175.
- [11] Kumari SS, Eswaramoorthy S, Mathias RT, et al. Unique and analogous functions of aquaporin 0 for fiber cell architecture and ocular lens transparency. Biochimica et biophysica acta[J]. Biochim Biophys Acta, 2011, 1812(9):1089-1097.
- [12] Meng J, Fang Y, Gao J, et al. Phenolics composition and antioxidant activity of wine produced from spine grape (*Vitis davidii* Foex) and Cherokee rose (*Rosa laevigata* Michx.) fruits from South China[J]. J Food Sci, 2012, 77(1):C8-14.
- [13] Zhang S, Zheng L, Dong D, et al. Effects of flavonoids from *Rosa laevigata* Michx fruit against high-fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease in rats[J]. Food Chemistry, 2013, 141(3):2108-2116.
- [14] Zhang S, Qi Y, Xu Y, et al. Protective effect of flavonoid-rich extract from *Rosa laevigata* Michx on cerebral ischemia-reperfusion injury through suppression of apoptosis and inflammation[J]. Neurochem Int, 2013, 63(5):522-532.

(此文编辑:秦旭平)