

链脲佐菌素诱导糖尿病性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

万丽, 刘文斌, 沈焯宇, 俞秋丽, 张晶晶

作者单位: (210019) 中国江苏省南京市, 南京明基医院眼科
作者简介: 万丽, 女, 主治医师, 研究方向: 白内障。
通讯作者: 刘文斌, 男, 副主任医师, 研究方向: 白内障、近视。
adda@21.cn.com
收稿日期: 2014-05-04 修回日期: 2014-08-25

Oxidative stress-apoptosis mediated STZ-induced diabetic cataract and the interventions of puerarin

Li Wan, Wen-Bin Liu, Ye-Yu Shen, Qiu-Li Yu, Jing-Jing Zhang

Department of Ophthalmology, Nanjing Benq Hospital, Nanjing 210019, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Wen-Bin Liu. Department of Ophthalmology, Nanjing Benq Hospital, Nanjing 210019, Jiangsu Province, China. adda@21.cn.com

Received: 2014-05-04 Accepted: 2014-08-25

Abstract

• AIM: To explore the involvement of oxidative stress and apoptosis in the pathogenesis of diabetic cataract induced by Streptozotocin (STZ) and the interventions of puerarin in order to supply references for clinical treatment.

• METHODS: Male SD rats were divided into four groups randomly, control group, diabetic group, apocynin group and puerarin group. The diabetic group were replicated by single injection of STZ (65mg/kg, ip). The expression of p22, p47, p67, Bax/Bcl2, Caspase 3 and P53 proteins were detected by Western Blotting.

• RESULTS: The diabetic rats were replicated successfully and the expression of Bcl2 was downregulated while the expression of p22, p47, p67, Bax, Caspase 3 and P53 were upregulated in diabetic group with a significant statistical differences when compared with control group ($P < 0.05$). Apocynin and puerarin can reverse the abnormal expression of the aforementioned proteins dramatically ($P < 0.05$).

• CONCLUSION: NADPH oxidase mediated oxidative stress and P53, Bax/Bcl2 mediated apoptosis are involved in the pathogenesis of diabetic cataract and puerarin can alleviate cataract greatly by inhibiting the aforementioned signal pathway.

• KEYWORDS: streptozotocin; diabetes; cataract; oxidative stress; apoptosis; puerarin

Citation: Wan L, Liu WB, Shen YY, et al. Oxidative stress - apoptosis mediated STZ - induced diabetic cataract and the interventions of puerarin. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2014; 14 (10): 1773-1775

摘要

目的: 本文分析氧化应激及细胞凋亡机制在链脲佐菌素 (Streptozotocin, STZ) 诱导的糖尿病大鼠白内障发病中的参与机制及葛根素的改善作用, 为相关研究与临床治疗提供借鉴。

方法: SD 大鼠随机分为四组: 对照组、糖尿病模型组、葛根素干预组及乙酰香草素组。腹腔注射 STZ (65mg/kg) 复制糖尿病大鼠模型, Western Blotting 分析各组晶状体组织中氧化应激及细胞凋亡相关蛋白表达的变化。

结果: 糖尿病大鼠模型复制成功, 且大鼠晶状体组织中氧化应激蛋白分子 p22、p47 及 p67 表达上调 ($P < 0.05$), 细胞凋亡蛋白 Bax 及 Caspase 3 表达上调, Bcl2 表达下调 ($P < 0.05$)。乙酰香草素和葛根素对上述异常具有显著的改善作用 ($P < 0.05$)。

结论: NADPH 氧化酶介导的氧化应激及 P53 和 Bax/Bcl2 介导的细胞凋亡信号通路参与了糖尿病大鼠白内障的发病过程, 且葛根素通过抑制上述氧化应激通路起到改善作用。

关键词: 链脲佐菌素; 糖尿病; 白内障; 氧化应激; 细胞凋亡; 葛根素

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2014.10.08

引用: 万丽, 刘文斌, 沈焯宇, 等. 链脲佐菌素诱导糖尿病性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. 国际眼科杂志 2014; 14 (10): 1773-1775

0 引言

随着人们生活方式的改变及饮食结构的改变, 糖尿病的发病率和死亡率有逐年升高的趋势。糖尿病已成为继除肿瘤、冠心病、脑血管病以外的第四大威胁人类健康的疾病, 严重威胁人类健康和生活质量^[1,2]。糖尿病主要通过其大血管和微血管并发症影响患者健康, 其中糖尿病性白内障就是其重要的并发症之一^[3-5]。白内障是临床上致盲性眼病之一, 目前尚无有效的治愈方法。机体内氧化与抗氧化失去平衡, 导致中性粒细胞炎性浸润, 细胞内产生大量自由基等氧化中间产物, 即导致细胞发生氧化应激反应。氧化应激介导了机体内一系列的病理状态, 包括糖尿病心肌病、肾病等并发症。细胞凋亡是细胞的程序化死亡过程, 也参与了细胞的多种生理及病理状态^[6-8]。NADPH 氧化酶 (Nicotinamide-adenine dinucleotide Phosphate Oxidase) 家族成员有与细胞膜结合的催化亚单位 NOX, 包

括 Nox1-Nox5 以及 Duox1 和 Duox2,作用是把电子从 NADPH 转移到分子氧上;还有调控亚单位,包括蛋白 p22phox(在多数细胞膜中起稳定 Nox 的作用)、胞浆中蛋白 p47phox、激活蛋白 p67phox 等。乙酰香草素为 NADPH 氧化酶抑制剂,在本研究中作为阳性对照药物。目前已有有关氧化应激和细胞凋亡参与白内障的相关报道,但是对氧化应激和细胞凋亡参与糖尿病性白内障的相关分子机制及葛根素改善的分子机制报道较少。

本文分析氧化应激及细胞凋亡机制在链脲佐菌素 (Streptozotocin,STZ) 诱导的糖尿病大鼠白内障发病中的参与机制及葛根素的改善作用,为相关研究与临床治疗提供借鉴。

1 材料和方法

1.1 材料 动物、药品及试剂:

SD 大鼠,雌雄不拘,由浙江省实验动物中心提供;链脲佐菌素 (Streptozotocin,STZ) 购自美国 Sigma 公司;兔抗鼠 p22/47/67 单克隆抗体、兔抗 Bax/Bcl2、Caspase3 及 P53 单克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司、HRP 标记的二抗及 DAB 显色液购自武汉博士德生物工程有限公司。本实验中所有动物实验操作均符合《江苏省实验动物管理条例》有关规定。乙酰香草素 (NADPH 氧化酶抑制剂) 购自 Sigma 公司。其他试剂均为市售分析纯。仪器:低温高速离心机为德国 Eppendorf 公司产品;凝胶成像仪购自 Bio-RAD 公司;蛋白质电泳仪 (DYJ-7C) 购自北京市六一仪器厂;半干转膜仪 (TE70XP), Hoefer 公司。

1.2 方法

1.2.1 动物模型复制

STZ (65mg/kg, ip) 注射复制大鼠糖尿病模型。持续 8wk 血糖水平增加超过 16.7mmol/L 作为糖尿病大鼠。40 只大鼠随机分为 4 组:正常对照组;糖尿病模型组;乙酰香草素组和葛根素组 (n=10)。乙酰香草素和葛根素药物治疗从第 5 周持续到第 8 周,共 28d。所有动物均自由饮食。STZ 注射 8wk 后颈总动脉放血处死大鼠,血样收集并离心进行生化分析。

1.2.2 血清生化指标测定

葡萄糖测定试剂盒、总胆固醇测定试剂盒、低密度脂蛋白 (low density lipoprotein cholesterol,LDLC) 和高密度脂蛋白 (high density lipoprotein cholesterol,HDLC) 测定试剂盒均购自南京建成生物工程有限公司。所有操作均按照说明书进行。

1.2.3 Western blotting

每 0.1g 大鼠晶状体组织中加入 0.5mL 裂解液充分匀浆,于 13000g,4℃ 离心 20min,并进行蛋白含量后。将蛋白样品与 5×SDS 加样缓冲液混合,沸水煮变性。经 SDS-PAGE 电泳后,将蛋白电转至硝酸纤维素膜上,封闭液室温封闭 1h,然后按照顺序依次加入一抗和二抗进行孵育。DAB 显色,UV 影像分析系统照相。 β -actin 为内参照。

统计学分析:所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素 ANOVA 分析,用 *t*-test 进行两组间的显著性分析,结果 *P*<0.05 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 动物一般状态观察

大鼠腹腔一次性大剂量注射 STZ 后,糖尿病大鼠饮水、排尿量明显增加,且体质量明显降低,皮毛光泽差。采用裂隙灯观察发现,糖尿病模型组大鼠晶状体周边可见到空泡,且有絮状混浊。解剖前糖尿病模型组大鼠晶状体完全混浊,乙酰香草素组和葛根素组

表 1 四组糖尿病大鼠血糖、胆固醇及 LDLC、HDLC 变化及药物的干预作用

组别	血糖	胆固醇	LDLC	HDLC
对照组	7.14	1.26	0.31±0.04	0.54±0.14
糖尿病模型组	22.32 ^b	2.13 ^b	0.99±0.14 ^b	0.21±0.09 ^b
乙酰香草素组	18.51 ^c	1.92 ^c	0.74±0.24 ^c	0.32±0.12 ^c
葛根素治疗组	16.43 ^d	1.61 ^d	0.53±0.02 ^d	0.33±0.20 ^d

^b*P*<0.01 vs 对照组; ^c*P*<0.05, ^d*P*<0.01 vs 糖尿病模型组。

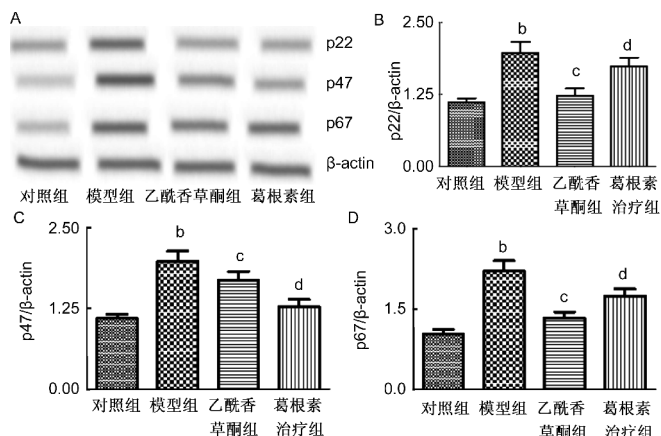


图 1 氧化应激相关分子 p22/47/67 表达的变化及药物干预作用 A:药物干预前后 p22/p47/p67 蛋白分子表达变化;B:p22 蛋白分子表达及药物干预后统计分析;C:p47 蛋白分子表达及药物干预后统计分析;D:p67 蛋白分子表达及药物干预后统计分析。^b*P*<0.01 vs 对照组; ^c*P*<0.05, ^d*P*<0.01 vs 糖尿病模型组。

大鼠晶状体的混浊程度较模型组大鼠轻。而对照组大鼠的晶状体全部透明,表明糖尿病性白内障大鼠模型复制成功,且乙酰香草素和葛根素药物干预可以从一般状态层次上具有起到改善作用。

2.2 糖尿病大鼠血糖及总胆固醇水平变化

本文发现,对照组大鼠血糖和总胆固醇水平分别为 7.14mmol/L 和 1.26mmol/L,而糖尿病模型组大鼠血糖为 22.32mmol/L 和 2.13mmol/L,见表 1。同时,我们也发现糖尿病组大鼠血清的 LDLC 明显升高,而 HDLC 水平明显降低,且与对照组有极显著的统计学差异性 (*P*<0.01)。乙酰香草素组和葛根素治疗组大鼠血糖和总胆固醇水平明显降低,并能恢复 LDLC 及 HDLC 的异常,且药物治疗前后具有极显著的改善作用 (*P*<0.05, *P*<0.01),见表 1。

2.3 氧化应激相关分子的上调表达及药物的干预作用

本研究发现,与对照组相比,糖尿病模型组大鼠晶状体组织的 p22、p47 及 p67 蛋白表达明显上调 (*P*<0.01)。乙酰香草素及葛根素干预之后上述蛋白的异常表达得到明显的恢复,且与模型组相比具有极显著的统计学差异性 (*P*<0.01),见图 1。

2.4 细胞凋亡相关蛋白 Bax/Bcl2 及 P53 表达的变化

本研究发现,与对照组相比,糖尿病模型组大鼠促凋亡蛋白 P53 及 Bax 蛋白质表达较对照组均明显上调,而抑制凋亡蛋白 Bcl2 表达明显下调,且具有极显著的统计学差异性 (*P*<0.01),乙酰香草素和葛根素干预后上述异常得到极明显的恢复 (*P*<0.01),见图 2。

3 讨论

糖尿病白内障是由患者醛糖还原酶活性增强,葡萄糖转化为山梨醇导致的,在糖尿病较为严重的年轻患者中多见。

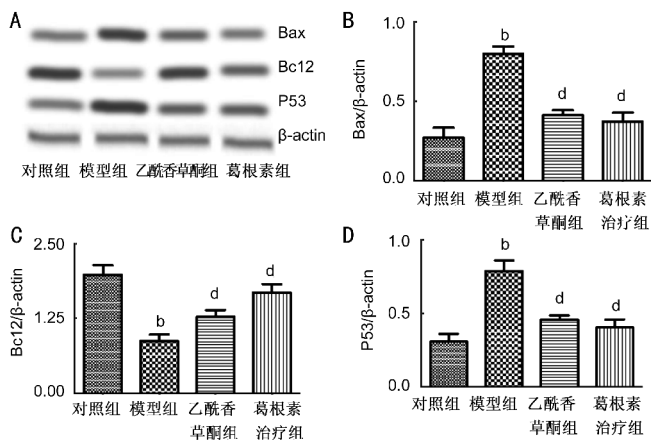


图2 细胞凋亡相关蛋白 Bax/Bcl2 及 P53 表达的变化及药物干预作用 A: Bax、Bcl2 及 P53 蛋白分子表达变化; B: Bax 蛋白分子表达及药物干预后统计分析; C: Bcl2 蛋白分子表达及药物干预后统计分析; D: P53 蛋白分子表达及药物干预后统计分析。^b $P < 0.01$ vs 对照组; ^d $P < 0.01$ vs 糖尿病模型组。

糖尿病白内障通常双眼发病,在数周内可引起晶状体完全混浊^[9]。白内障的发生可能与患者维生素或微量元素摄入不足有关,也可能由于人体处于缺氧环境下导致的晶状体钙、钠元素增加有关。另外,阳光和紫外线也会导致磷和晶状体中的离子状态的钙相结合,导致晶状体钙化。但是,关于糖尿病白内障的确切分子机制尚未得到阐明。

氧化应激是细胞氧化和抗氧化能力的失衡。氧化应激状态下细胞内反应氧自由基(reactive oxygen species, ROS)含量增高,细胞受到过多 ROS 的刺激而受到损伤。氧化应激参与了机体的一系列病理及生理过程,如糖尿病心肌病、糖尿病肾病等多种糖尿病并发症。NADPH 氧化酶是细胞内介导氧化应激的主要酶系之一,其主要有多个亚基组成,包括膜上的 gp91, p22 亚基及胞浆内的 p47, p67 亚基。本文中发现 p22 亚基、p47 亚基和 p67 亚基在糖尿病视网膜病变组的晶状体上表达都有极显著的升高,表明 NADPH 氧化酶是其氧化应激的主要参与酶系,且主要是由上述三个蛋白分子所介导的。细胞凋亡是细胞受到外界不良刺激之后的一种程序化死亡过程。细胞凋亡是有一系列的细胞凋亡蛋白所介导的,包括 Caspase 家族蛋白、Bax/Bcl2 及 P53 蛋白等。氧化应激和细胞凋亡介导了机体的一系列病理及生理反应。本文中糖尿病大鼠晶状体 P53 蛋白及 Bax 蛋白表达均明显升高,且 Bcl2 蛋白表达明显降低,提示三者均参与可糖尿病视网膜病变的发生过程。在其他病理过程中, P53 蛋白异常表达可能诱导 Bax/Bcl2 蛋白的表达异常,进一步加剧细胞凋亡的过程。在以后的研究中我们将进一步探讨二者的相关性。

葛根素又称葛根黄酮,是一种黄色结晶。葛根素在临床上具有扩张血管,改善微循环,保护肝组织免疫损害的作用^[10-12]。同时,葛根素对增强心肌收缩力、抗血小板聚集和刺激干扰素具有较好的作用。已有的研究证实,葛根

素对糖尿病大鼠肾脏氧化应激损伤及心肌组织氧化应激损伤具有较好的保护作用,但是关于糖尿病白内障的作用报道较少。本文中我们发现,腹腔注射 STZ 的糖尿病模型组复制成功,且大鼠晶状体中氧化应激分子及多种细胞凋亡分子表达异常。乙酰香草素和葛根素对上述细胞凋亡分子 P53、Bax 及 Bcl2 的异常表达均有显著的恢复作用,对 NADPH 氧化酶亚基的异常也有显著的改善作用,表明二者主要通过抑制 NADPH 氧化酶亚基及细胞凋亡分子的异常表达,进一步抑制氧化应激-细胞凋亡通路实现对糖尿病白内障起到改善作用。这为葛根素治疗糖尿病白内障病变的临床更合理应用提供了理论支持。

因此, NADPH 氧化酶介导的氧化应激及 P53、Bax/Bcl2 介导的细胞凋亡信号通路参与了糖尿病大鼠白内障的发病过程,且葛根素通过抑制氧化应激-细胞凋亡通路起到改善作用。

参考文献

- Bocci V, Zanardi I, Huijberts MS, et al. An integrated medical treatment for type-2 diabetes. *Diabetes Metab Syndr* 2013;8(1):57-61
- Siddiqui S. Depression in type 2 diabetes mellitus - A brief review. *Diabetes Metab Syndr* 2013;8(1):62-65
- Manaviat MR, Oveisi N, Zare-Bidoki A. Accelerated bilateral cataract formation as a first manifestation of diabetes mellitus. *Prague Med Rep* 2013;114(4):258-262
- Wang Y, Luk AO, Ng MC, et al. Additive effect of aldose reductase Z-4 microsatellite polymorphism and glycaemic control on cataract development in type 2 diabetes. *J Diabetes Complications* 2013;28(2):147-151
- Zabeen B, Khaled Z, Nahar J, et al. Cataract in children and adolescents with fibrocalculous pancreatic diabetes. *Mymensingh Med J* 2013;22(2):331-335
- Iancu AD, Stavaru C. Double transgenic mice--a suitable model for studying oxidative stress in type 1 diabetes mellitus. *Roum Arch Microbiol Immunol* 2012;71(4):201-220
- Naziroglu M, Dikici DM, Dursun S. Role of oxidative stress and Ca(2)(+) signaling on molecular pathways of neuropathic pain in diabetes: focus on TRP channels. *Neurochem Res* 2012;37(10):2065-2075
- Sedeek M, Montezano AC, Hebert RL, et al. Oxidative stress, Nox isoforms and complications of diabetes - potential targets for novel therapies. *J Cardiovasc Transl Res* 2012;5(4):509-518
- Olafsdottir E, Andersson DK, Stefansson E. The prevalence of cataract in a population with and without type 2 diabetes mellitus. *Acta Ophthalmol* 2012;90(4):334-340
- Saha P, Saraswat G, Chakraborty P, et al. Puerarin, a selective oestrogen receptor modulator, disrupts pregnancy in rats at pre-implantation stage. *Reproduction* 2012;144(5):633-645
- Zhao Y, Zhou Y. Puerarin improve insulin resistance of adipocyte through activating Cbl binding protein path. *Chin J Integr Med* 2012;18(4):293-298
- Wang Y, Ma Y, Zheng Y, et al. In vitro and in vivo anticancer activity of a novel puerarin nanosuspension against colon cancer, with high efficacy and low toxicity. *Int J Pharm* 2012;441(1-2):728-735