

# 褪黑素对高糖诱导白内障形成抑制作用的实验研究

曲 宏, 刘 华

作者单位: (121000) 中国辽宁省锦州市, 辽宁医学院第五临床学院眼科 锦州市中心医院亚东眼科医院  
作者简介: 曲宏, 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 白内障。  
通讯作者: 刘华, 女, 博士, 主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向: 白内障. loveapecl@yahoo.cn  
收稿日期: 2011-01-11 修回日期: 2011-01-29

## Experimental study on the inhibitory effect of melatonin on cataractous lenses of rabbits induced by high glucose

Hong Qu, Hua Liu

Department of Ophthalmology, No. 5 Hospital of Liaoning Medical University, Jinzhou 121000, Liaoning Province, China  
**Correspondence to:** Hua Liu. Department of Ophthalmology, No. 5 Hospital of Liaoning Medical University, Jinzhou 121000, Liaoning Province, China. loveapecl@yahoo.cn  
Received: 2011-01-11 Accepted: 2011-01-29

### Abstract

• **AIM:** To observe the inhibitory effect of melatonin (MLT) on cataractous lenses of rabbits induced by high glucose.  
• **METHODS:** The lenses of the cultured normal rabbits *in vitro* were randomly divided into 3 groups: the control group (group A), the group treated by high glucose (group B), and the group treated by high glucose and MLT in 50 μmol/L (group C). The effect of the drug was observed at different time points (48 hours, 72 hours, 96 hours). At the same time, superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and malondialdehyde (MDA) were tested.  
• **RESULTS:** The observation of lenses after 96 hours culture, lenses in group A were transparent. The opacity in rabbits group C was apparently lower than that of in group B. The measurement of biochemical indicator of lenses: the levels of SOD and CAT were increased significantly in group C compared with that of group B ( $P < 0.01$ ). The level of MDA was significantly decreased compared with that of group B ( $P < 0.01$ ).  
• **CONCLUSION:** MLT plays an inhibitory role in high glucose induced rabbit lens oxidation injury and can delay and ameliorate the occurrence and development of diabetic cataract.  
• **KEYWORDS:** melatonin; cataract; SOD; MDA; CAT

Qu H, Liu H. Experimental study on the inhibitory effect of melatonin on cataractous lenses of rabbits induced by high glucose. *Cuqi Yanke Zazhi (Int J Ophthalmol)* 2011;11(3):403-405

### 摘要

目的: 观察褪黑素(melatonin, MLT)对高糖诱导体外培养

兔晶状体白内障形成的抑制作用。

**方法:** 选取发育正常的兔晶状体, 随机分为3组: A组空白对照组、B组高糖处理组、C组实验组(在高糖处理的基础上加MLT, 浓度为50 μmol/L)。观察不同培养时间(48, 72, 96h)各组晶状体混浊程度。通过黄嘌呤氧化酶法测定超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD); 化学比色法测定过氧化氢酶(catalase, CAT); 硫代巴比妥酸法测定丙二醛(malondialdehyde, MDA), 观察不同时间各组晶状体的生物化学变化。

**结果:** 晶状体混浊情况: 培养96h后, A组晶状体无明显变化, 晶状体完全透明为80%, II级混浊为20%; B组晶状体混浊逐渐加重, 晶状体IV级混浊为20%, V级混浊为80%; C组晶状体完全透明为60%, II级混浊为40%。晶状体生化指标的测定: C组兔晶状体组织中的SOD, CAT含量高于B组( $P < 0.01$ ), C组兔晶状体组织中MDA含量低于B组( $P < 0.01$ )。

**结论:** MLT可抑制高糖诱发的兔晶状体的氧化损伤, 延缓和减轻高糖诱导的兔白内障的发生和发展。

**关键词:** MLT; 白内障; 超氧化物歧化酶; 丙二醛; 过氧化氢酶

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2011.03.008

曲宏, 刘华. 褪黑素对高糖诱导白内障形成抑制作用的实验研究. 国际眼科杂志 2011;11(3):403-405

### 0 引言

随着生活水平的提高和人口的老龄化, 糖尿病(DM)患者日益增多, DM性白内障是最常见的眼部并发症之一。研究证明, 氧化损伤是DM性白内障发病的重要机制。虽然手术仍是其主要治疗方法, 但通过药物抑制晶状体的氧化损伤及其上皮细胞凋亡已经成为广大医学工作者研究的主要方向。褪黑素(melatonin, MLT)是人体内强有效的自由基清除剂及抗氧化剂。我们通过高糖条件下体外培养兔晶状体建立DM性白内障模型, 同时观察MLT对兔晶状体混浊的抑制情况, 为药物治疗进一步提供理论依据。

### 1 材料和方法

**1.1 材料** 健康成年新西兰大白兔22只(由辽宁医学院实验动物中心提供), 雌雄不拘, 体质量2.5~3.0kg。在动物室适应性饲养2d, 饲养环境: 温度为18℃~25℃, 湿度为50%~60%, 正常光照, 饲养期间自由摄取自来水。MLT, DAB显色剂、DMEM培养基、小牛血清、D-葡萄糖、SOD(超氧化物歧化酶)、MDA(丙二醛)、CAT(过氧化氢酶)。

**1.2 方法** 将22只(44只晶状体)新西兰大白兔经耳缘静脉注射空气形成栓塞致死, 立即摘取眼球于超净工作台。后路法小心取出晶状体, 清除干净玻璃体, 置入含青霉素80万U+庆大霉素8万U的生理盐水500mL中, 1min后取出, 置入5mL DMEM低糖培养液(含100mL/L新生牛血清, 10<sup>5</sup>U/L青霉素和10<sup>5</sup>U/L链霉素)的12孔培

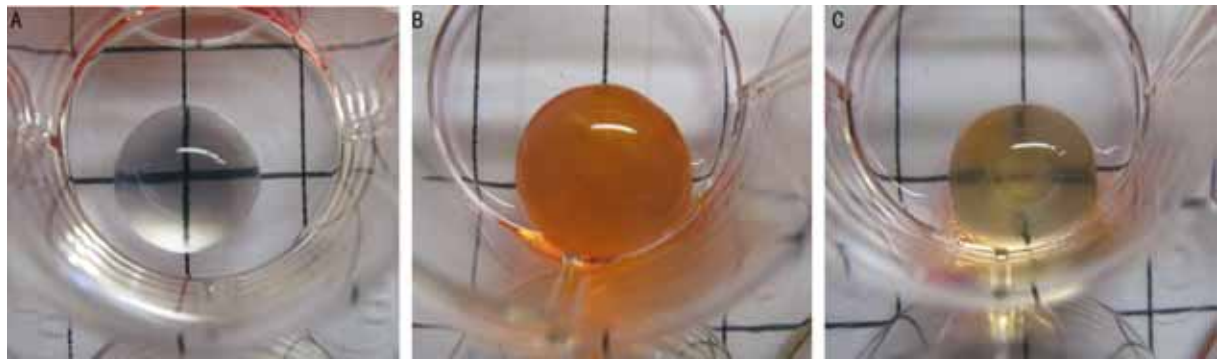


图1 褪黑素对高糖诱导白内障的晶状体混浊程度的影响 A:A组I级;B:B组V级;C:C组II级。

表1 各组晶状体 SOD 和 MDA 及 CTA 活性的比较

t/h	SOD(kU/g prot)			MDA(nmol/g prot)			CAT(kU/L)		
	A组	B组	C组	A组	B组	C组	A组	B组	C组
48	23.57 ± 0.53	11.46 ± 0.46 <sup>b</sup>	20.74 ± 0.42	0.65 ± 0.06	6.57 ± 0.46 <sup>b</sup>	1.09 ± 0.08	6.11 ± 0.17	2.28 ± 0.18 <sup>b</sup>	5.33 ± 0.07
72	22.49 ± 0.47	6.37 ± 0.42 <sup>b</sup>	17.39 ± 0.51	1.16 ± 0.08	8.20 ± 0.19 <sup>b</sup>	1.83 ± 0.05	5.67 ± 0.07	1.63 ± 0.08 <sup>b</sup>	5.03 ± 0.09
96	18.47 ± 0.64	4.27 ± 0.39 <sup>b</sup>	16.48 ± 0.51	1.74 ± 0.06	11.55 ± 0.37 <sup>b</sup>	2.82 ± 0.05	5.26 ± 0.11	0.92 ± 0.06 <sup>b</sup>	4.70 ± 0.09

<sup>b</sup>P < 0.01 vs A组, C组。

养板内,每孔一个晶状体。于37℃ 50mL/L CO<sub>2</sub>培养箱内培养6h,选取透明晶状体42只,随机分为3组,另有2只晶状体因不符合筛选标准予以剔除。A空白对照组:将筛选后的透明晶状体14只置于含低糖DMEM培养液(葡萄糖终浓度为5.56mmol/L)5mL的12孔培养板内,每孔1个晶状体,其余处理同高糖组。B高糖处理组:将筛选后的透明晶状体14只置于12孔培养板内,每孔1个晶状体,高糖DMEM培养液(含100mL/L新生牛血清,10<sup>5</sup>U/L青霉素和10<sup>5</sup>U/L链霉素,葡萄糖终浓度为55.6mmol/L)5mL。置于37℃ 50mL/L CO<sub>2</sub>培养箱内培养,每12h更换一次培养液以确保营养充足。C实验组:用高糖培养液配置50μmol/L MLT母液,将筛选后的透明晶状体14只置于12孔培养板内,每孔1个晶状体,DMEM培养液5mL,MLT终浓度50μmol/L,每12h更换一次培养液以确保营养充足,其余处理同高糖组。分别于培养48,72,96h进行观察,用照相的方法记录培养过程中兔晶状体的形态改变。照相过程中使用同一照相模式,照明条件保持一致,由同一人将每个晶状体放在白色背景的另一黑色“+”字交叉线上照相存档。晶状体混浊程度参照Azuma等的标准分为5级:I级:无混浊,晶状体透明;II级:轻度混浊,晶状体周边出现空泡;III级:中度混浊,晶状体周边空泡向中心扩展,核出现雾状混浊;IV级:高度混浊,晶状体周边空泡扩展到核区,核雾状混浊加重;V级:核混浊,白内障成熟<sup>[1]</sup>。每组随机取3个晶状体,将每个晶状体分别匀浆,低温高速离心机离心15min后,取上清液测定以下指标:黄嘌呤氧化酶法测定SOD;化学比色法测定CAT;硫代巴比妥酸法测定MDA,上述测定步骤均严格按试剂盒说明操作。

统计学分析:数据经SPSS 16.0统计软件处理,所有数据采用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间比较采用单因素方差分析。P < 0.05表示差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 晶状体混浊程度的观察 随着培养时间延长,A组晶状体无明显变化(图1A),直到96h出现一个晶状体II级混浊(20%)。B组晶状体混浊逐渐加重,随时间的推移出

现由赤道部扩展至皮质的混浊。培养96h后,晶状体IV级混浊为20%,V级混浊为80%(图1B)。C组晶状体较B组混浊程度明显减轻,其中晶状体完全透明为60%,II级混浊为40%(图1C)。

2.2 晶状体生化指标的检测 各组晶状体SOD,MDA和CAT活性的比较见表1。

## 3 讨论

DM是一种全球范围内严重危害人类健康的常见内分泌代谢性疾病。DM以高血糖为主要特征,可影响人体多脏器和多系统而引起多种并发症。DM性白内障是重要的致盲因素。目前对DM性白内障发生机制的研究已取得了明显进展,其主要的发病途径有3种,即渗透压学说、蛋白质糖基化学说和氧化应力学说。近年来的研究已经证实,氧化损伤在DM性白内障的形成中起重要作用,氧化损伤可以使晶状体的抗氧化酶失活,氧化防御系统紊乱,蛋白氧化,晶状体纤维交链,最终导致晶状体上皮细胞膜与DNA损伤,晶状体上皮细胞凋亡形成白内障。

MLT是化学名称为N-乙酰基-5-甲氧基色胺,是脊椎动物脑中松果体合成和分泌的具有较高生物活性的内源性吲哚类激素。MLT自松果体分泌后迅速进入血液循环,分布到全身各部位,对机体多数器官和组织细胞发挥作用。MLT是一种有效的抗氧化剂,能清除自由基并提高几种抗氧化酶的活性,对许多神经细胞具有保护作用,使之免受氧化应激以及氧自由基损伤。

目前制作DM性白内障模型主要有两种方法,一种是制作DM动物模型,一种是晶状体的离体培养。Jain等<sup>[2]</sup>和王强等<sup>[3]</sup>均采用此方法成功制作出DM性白内障模型。本实验通过体外高糖条件下培养兔晶状体,采用后巩膜十字切开方法,尽量避免损伤晶状体,同时预培养6h,减少了DM白内障模型制作过程中其它混杂因素,成功制作出DM性白内障模型。实验结果表明,在高糖条件下,兔晶状体混浊程度明显加重,培养96h后,晶状体IV级混浊为20%,V级混浊为80%,而实验组96h后晶状体完全透明为60%,II级混浊为40%。表明加入MLT组晶状体的透明度明显高于高糖组。晶状体的氧化损伤被认为是DM

性白内障的一个主要激发因素<sup>[4]</sup>。氧自由基由机体通过酶系统与非酶系统产生,它能攻击生物膜中的多不饱和脂肪酸引发脂质过氧化反应,形成醛基(MDA)等脂质过氧化物,体内过氧化脂质水平反映了机体受自由基攻击损伤的程度,通常以MDA作为评价脂质过氧化的一个客观指标<sup>[5]</sup>。SOD能清除超氧阴离子自由基,保护细胞免受损伤,CAT可以分解氢氧自由基,保护机体细胞稳定的内环境及细胞的正常生活。因而测定SOD和CAT高低也有其重要意义。

我们观察到48h高糖组SOD值为 $11.46 \pm 0.46$ ,明显低于空白对照组的 $23.57 \pm 0.53$ ,而高糖组的MDA值为 $6.57 \pm 0.46$ ,明显高于空白对照组的 $0.65 \pm 0.06$ 。实验组中加入MLT的兔晶状体中SOD值为 $20.74 \pm 0.42$ ,明显高于高糖组( $P < 0.01$ ),CAT值为 $5.33 \pm 0.07$ ,明显高于高糖处理组,而MDA值为 $1.09 \pm 0.08$ ,低于高糖处理组( $P < 0.01$ ),此实验表明MLT组抗氧化能力高。MLT不仅本身具有明显的抗氧化作用,且被氧化后的多级代谢产物亦有较强的抗氧化作用,形成了MLT级联放大的抗氧化机制<sup>[6,7]</sup>,还具有同时清除氧族和氮族自由基的双重功效及上调多种抗氧化酶的功能。MLT可增强抗氧化酶的活性及其基因表达<sup>[8]</sup>。它能利用咪唑环上的5-甲氧基,直接清除机体内各种氧自由基及活性产物<sup>[9]</sup>,它能够抑制 $Ca^{2+}$ 内流,可以有效抑制晶状体上皮细胞的氧化损伤,它还可以减少线粒体活性氧的形成,减轻 $Ca^{2+}$ 超载,改善线粒体通透孔的状态,具有较强的线粒体保护作用。因此MLT有稳定细胞膜的作用,使细胞对自由基的攻击有更强的耐受能力。MLT作为强有力的抗氧化剂以及自由基清除剂,可用于白内障的治疗,已在不少研究中得到证实。Anwar等分别通过不同的方法诱导出白内障,发现眼内SOD活性明显降低,表明兔晶状体细胞受到了自由基损伤,应用MLT后晶状体内SOD酶的活性明显增强,同时降低了MDA含量,明显抑制了晶状体混浊的形成<sup>[10-12]</sup>,这与我们的实验结果一致。

通过本实验研究,体外高糖条件下培养兔晶状体,可以获得DM性白内障模型,同时应用MLT作为内源性抗氧化剂以及抗白内障药物,发挥其治疗作用。MLT可抑

制高糖诱发的兔晶状体的氧化损伤,延缓和减轻高糖诱导的兔白内障的发生和发展。

#### 参考文献

- 1 葛坚. 眼科学. 北京:人民卫生出版社 2005:119
- 2 Jain AK, Lim G, Langford M, *et al.* Effect of high-glucose levels on protein oxidation in cultured lens cells, and in crystalline and albumin solution and its inhibition by vitamin B6 and N-acetylcysteine; its possible relevance to cataract formation in diabetes. *Free Radic Biol Med* 2002; 33(12):1615-1621
- 3 王强,张俊青,张晶,等. 兔眼晶状体上皮细胞的体外培养. 眼科新进展 2000;20(4):257-258
- 4 Kim NH, Kim YS, Lee YM, *et al.* Inhibition of aldose reductase and xylose-induced lens opacity by puerariafuran from the roots of Pueraria lobata. *Biol Pharm Bull* 2010;33(9):1605-1609
- 5 杨一涛,唐罗生,董晓光,等. 褪黑素在眼科应用的最新进展. 眼科新进展 2009;29(2):146-147
- 6 Hara M, Yoshida M, Nishijima H, *et al.* Melatonin, a pineal secretory product with antioxidant properties, protects against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *J Pineal Res* 2001;30(3):129-138
- 7 Maharaj DS, Maharaj H, Daya S, *et al.* Melatonin and 6-hydroxymelatonin protect against iron-induced neurotoxicity. *J Neurochem* 2006;96(1):78-81
- 8 Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM, *et al.* Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J Pineal Res* 2004;36(1):1-9
- 9 Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, *et al.* Melatonin directly scavenges hydrogen peroxide: a potentially new metabolic pathway of melatonin biotransformation. *Free Radic Biol Med* 2000;29(11):1177-1185
- 10 Anwar MM, Moustafa MA. The effect of melatonin on eye lens of rats exposed to ultraviolet radiation. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2001;129(1):57-63
- 11 Yildirim N, Ozer A, Inal M, *et al.* The effect of N-acetyl serotonin on ultraviolet-radiation-induced cataracts in rats. *Ophthalmologica* 2003; 217(2):148-153
- 12 Yagci R, Aydin B, Erdurmus M, *et al.* Use of melatonin to prevent selenite-induced cataract formation in rat eyes. *Curr Eye Res* 2006;31(10):845-850