

# SIRT1 基因在糖尿病性白内障患者晶状体上皮细胞表达的初步研究

金尚丽<sup>1,2,3</sup>, 郭海科<sup>2</sup>, 陈智慧<sup>3</sup>

基金项目:广东省医学科研基金(No. WSTJJ201401013708821-98011260421)

作者单位:<sup>1</sup>(510515)中国广东省广州市,南方医科大学;  
<sup>2</sup>(510080)中国广东省广州市,广东省人民医院 广东省医学科学院;  
<sup>3</sup>(523573)中国广东省东莞市,常平医院眼科

作者简介:金尚丽,在读博士研究生,主治医师,研究方向:白内障。

通讯作者:郭海科,博士,主任医师,研究方向:白内障. guohaike@medmail.com.cn

收稿日期:2015-02-03 修回日期:2015-05-25

## Preliminary study on expression of SIRT1 gene in lens epithelial cells of diabetic cataract patients

Shang-Li Jin<sup>1,2,3</sup>, Hai-Ke Guo<sup>2</sup>, Zhi-Hui Chen<sup>3</sup>

Foundation item: Guangdong Medical Research Fund (No. WSTJJ20140101370882198011260421)

<sup>1</sup>Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China; <sup>2</sup>Guangdong General Hospital, Guangdong Academy of Medical Sciences, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China; <sup>3</sup>Department of Ophthalmology, Changping Hospital, Dongguan 523573, Guangdong Province, China

Correspondence to: Hai-Ke Guo. Department of Ophthalmology, Guangdong General Hospital, Guangdong Academy of Medical Sciences, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China. guohaike@medmail.com.cn

Received: 2015-02-03 Accepted: 2015-05-25

## Abstract

• AIM: To investigate the expression of Sirtuin type I (SIRT1) gene in lens epithelial cells (LECs) of diabetic cataract.

• METHODS: Twenty diabetic cataract patients, 20 age-related cataract patients and 20 traumatic cataract patients diagnosed from January 2012 to October 2014 in our hospital were selected. RT-PCR method was used to detect the content of SIRT1 gene in LECs of each group patients. Western blot method was used for the detection of SIRT1 protein content in lens epithelial cells, apoptosis rate of LECs was detected by TUNEL.

• RESULTS: RT-PCR results showed that the relative

content of SIRT1 mRNA in patients of traumatic cataract group was highest for  $1.000 \pm 0.078$ , followed by the age related cataract group was  $0.427 \pm 0.067$ , then diabetic cataract group was  $0.389 \pm 0.112$ , those two groups compared with the traumatic cataract group, the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ); Western blot showed that SIRT1 protein expression in LECs of traumatic cataract patients was the highest, followed by the age related cataract group, diabetic cataract group the expression of SIRT1 protein was the minimum. The results of TUNEL showed that apoptosis rate of traumatic cataract group and age group LECs rates were  $(4.5 \pm 2.3)\%$  and  $(8.7 \pm 4.1)\%$ , respectively, the difference was not statistically significant; while the diabetic cataract group of LEC apoptosis rate was  $(24.3 \pm 6.1)\%$ , by comparing traumatic cataract group and age related cataract group, the difference was statistical significance ( $P < 0.05$ ).

• CONCLUSION: Expression of SIRT1 gene and protein decreased in LECs of diabetic cataract patients, suggesting that this gene was involved in diabetic cataract, this provides reliable theoretical basis for our further research in the future. Regulation of SIRT1 gene expression in LECs will explore the effective ways and provide a new idea for the diabetic cataract intervention treatment.

• KEYWORDS: Sirtuin type I gene; diabetic cataract; age-related cataract; traumatic cataract

Citation: Jin SL, Guo HK, Chen ZH. Preliminary study on expression of SIRT1 gene in lens epithelial cells of diabetic cataract patients. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2015;15(6):968-971

## 摘要

目的:探讨 SIRT1 基因在糖尿病性白内障晶状体上皮细胞的表达。

方法:选取 2012-01/2014-10 来我院治疗的糖尿病性白内障患者、年龄相关性白内障患者和外伤性白内障患者各 20 例,采用 RT-PCR 法检测各组患者晶状体上皮细胞中 SIRT1 基因含量,Western blot 法检测晶状体上皮细胞中 SIRT1 蛋白含量,TUNEL 法检测晶状体上皮细胞的凋亡率。

结果:RT-PCR 检测结果显示,外伤性白内障患者组

SIRT1 mRNA 相对含量最高为  $1.000 \pm 0.078$ , 其次为年龄相关性白内障患者组为  $0.427 \pm 0.067$ , 糖尿病性白内障组为  $0.389 \pm 0.112$ , 与外伤性白内障组比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); Western blot 检测显示, 外伤性白内障患者晶状体上皮细胞中 SIRT1 蛋白的表达量最高, 其次是年龄相关性白内障组, 糖尿病性白内障组 SIRT1 蛋白的表达量最低; TUNEL 法检测结果显示, 外伤性白内障组和年龄相关性白内障组患者 LECs 细胞凋亡率分别为  $(4.5 \pm 2.3)\%$  和  $(8.7 \pm 4.1)\%$ , 差异无统计学意义; 而糖尿病性白内障组 LECs 凋亡率为  $(24.3 \pm 6.1)\%$ , 与外伤性白内障组及年龄相关性白内障组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

**结论:** 糖尿病性白内障患者晶体上皮细胞中 SIRT1 基因及蛋白表达下降, 提示该基因参与了糖尿病性白内障的发生, 这为我们今后进一步的研究提供了可靠的理论依据。探索调节 SIRT1 基因在晶状体上皮细胞中表达的有效途径, 将为糖尿病性白内障的早期干预治疗提供新的思路。

**关键词:** SIRT1 基因; 年龄相关性白内障; 糖尿病性白内障; 外伤性白内障

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2015.6.07

**引用:** 金尚丽, 郭海科, 陈智慧. SIRT1 基因在糖尿病性白内障患者晶状体上皮细胞表达的初步研究. 国际眼科杂志 2015; 15(6):968-971

## 0 引言

随着人们生活水平的提高, 糖尿病患者日益增多, 而白内障是糖尿病的常见并发症之一, 也是糖尿病患者眼部病变致盲的重要原因之一, 严重危害着人类的健康。关于糖尿病性白内障 (diabetic cataract, DC) 的发病机制主要有渗透损伤学说和晶状体蛋白氧化损伤学说等<sup>[1,2]</sup>, 而晶状体上皮细胞 (lens epithelial cells, LECs) 的凋亡和晶状体蛋白改变是病理学基础的主要表现<sup>[3]</sup>。沉默信息调节因子相关酶 1 (sirtuin type 1, SIRT1) 是一种细胞代谢辅酶 NAD<sup>+</sup> 依赖的 III 类组蛋白去乙酰化酶, 是机体自身抗凋亡抗衰老体系的重要元素, 具有延长低等生物寿命和延缓多种年龄相关性疾病发展的作用<sup>[4,5]</sup>。本研究报告了糖尿病性白内障患者晶状体上皮细胞中 SIRT1 基因的表达情况, 并进行了初步研究。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 选取 2012-01/2014-10 来我院治疗的白内障患者, 根据发病机制不同, 分为糖尿病性白内障 (diabetic cataract, DC) 组、年龄相关性白内障 (age-related cataract, ARC) 组以及外伤性白内障组 (traumatic cataract, TC) 组, 每组 20 例 20 眼, 取直径 4mm×4mm 晶状体前囊膜作为研究对象。DC 组和 ARC 组白内障类型统一为: 皮质性白内障, 所有患者均经体检及眼科专科检查排除其他全身及眼部疾病。糖尿病性白内障组 20 眼, 男 10 眼, 女 10 眼, 年龄 53~76 (平均  $66.71 \pm 5.89$ ) 岁; 纳入标准按照

1999 年 WHO 的 2 型糖尿病的诊断和分型标准。排除标准: (1) 失眠、文盲、中风史; (2) 明确的认知障碍或精神疾病; (3) 脑动脉疾病与腔隙性梗死的患者; (4) 语言交流障碍、酒精依赖; (5) 2 型糖尿病急性并发症、甲减病史、高血压病史。术前空腹血糖在 8.3mmol/L 以下, 血清糖化血红蛋白 (glycosylated hemoglobin, HbAlc) 小于 6.0%; 血压监测均在 140/90mmHg 以下。年龄相关性白内障组 20 眼, 男 9 眼, 女 11 眼, 年龄 57~79 (平均  $68.43 \pm 7.89$ ) 岁; 所有患者无糖尿病、高血压等全身慢性疾病病史; 术前常规行空腹血糖检查在 6.2mmol/L 以下, 葡萄糖耐量试验阴性; 血压监测均在 140/90mmHg 以下; 外伤性白内障组 20 例 20 眼外伤性白内障患者, 男 12 眼, 女 8 眼, 年龄 30~55 (平均  $43.55 \pm 6.34$ ) 岁; 人体标本的使用遵从赫尔辛基宣言, 并获得常平医院伦理委员会批准。三组患者性别上无统计学差异, 具有可比性; 但是 TC 组患者的较 DC 组和 ARC 组患者年轻, 且差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 所以选择 TC 组作为对照组, 纳入研究。所有患者术前行眼前段及后段检查, 排除玻璃体、眼底病、青光眼等其他眼部疾患。

**1.2 方法** 标本来源: 白内障超声乳化摘除术中撕除前囊膜, 手术均有经验丰富的同一位医生操作, 所有的标本均 PBS 液清洗后, 平放于离心管内封存, 置于液氮罐中备用。

**1.2.1 逆转录聚合酶链反应** 按照 TRIzol Reagent 总 RNA 抽提试剂盒 (美国 Invitrogen 生命技术公司) 的说明书步骤分离总 RNA, 并以总 RNA 为模板逆转录合成 cDNA。采用 SYBR Green 试剂盒 (美国 ABI 公司) 说明书方法与步骤以 cDNA 为模板进行逆转录聚合酶链反应 (real time quantitative reverse transcription, RT-PCR) 检测, 使用荧光定量 PCR 仪 (美国伯乐公司) 检测荧光强度。应用荧光定量统计软件进行分析, 结果以待测基因与 GAPDH 的比值表示。检索 Genbank 提供的 SIRT1 基因序列设计引物如下: Forward: 5'-CCTGACTTCAGATCAAGAGACGGT-3'; Reverse: 5'-CTGATTAATAATGTCTCCACGAACAG-3'; GAPDH: Forward: 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'; Reverse: 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'。引物均由上海生工公司合成。

**1.2.2 Western blot 法检测晶状体上皮细胞中 SIRT1 蛋白的表达** 将盛有组织样本的 1.5mL EP 管置于碎冰中, 用超声波细胞粉碎机将细胞打碎, 12000r/min 4℃ 离心, 30min, 取上清, 采用 Bradford 试剂盒 (上海生工公司) 进行蛋白定量。将样品调至同一浓度后, 加上样缓冲液进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 电泳后进行转膜 2h。转膜完毕后, 用 PBST 在室温下洗膜 10min, 然后用 5% 脱脂奶粉封闭过夜。加入 SIRT1 单抗 (1:500) (美国 Santa Cruz 公司) 室温孵育 4h 后, PBST 洗 3 次, 每次 10min。二抗室温孵育 1.5h, PBST 洗 3 次, 每次 10min, 最后进行 ECL 显色。

**1.2.3 TUNEL 法检测晶状体上皮细胞的凋亡率** 将提取的晶状体前囊膜组织铺于载玻片上, 立即用 4% 多聚

甲醛室温固定30min。0.1% TritonX-100和0.1% 枸橼酸钠混合液在4℃处理5~10min,再用0.01mg/mL蛋白酶K消化液于37℃消化5min,按照TUNEL试剂盒操作步骤进行。于显微镜(日本Olympus BX50)下观察凋亡细胞染色情况并统计晶状体上皮细胞凋亡百分率。

统计学分析:本研究数据采用SPSS 19.0统计学软件进行统计学分析。首先对各计量资料变量进行分布状态分析,对呈正态分布计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素ANOVA检验;计数资料的组间比较采用 $\chi^2$ 检验。以 $\alpha=0.05$ 为检验水准,以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 RT-PCR检测SIRT1 mRNA的含量** RT-PCR检测结果显示,各晶状体上皮细胞中SIRT1 mRNA相对GAPDH mRNA的含量,TC组最高为 $1.000 \pm 0.078$ ,其次为ARC组为 $0.427 \pm 0.067$ ,DC组为 $0.389 \pm 0.112$ ,ARC组和DC组与TC组比较,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),而DC组与ARC组比较差异无统计学意义( $P>0.05$ ),见图1。

**2.2 Western blot法检测各组晶体细胞中SIRT1蛋白含量** Western blot检测显示,TC组SIRT1蛋白的表达量最高,其次是ARC组,DC组SIRT1蛋白的表达量最低,与RT-PCR结果一致,见图2。

**2.3 TUNEL法检测LEC凋亡** TUNEL检测凋亡阳性细胞的细胞核被特异性染成棕黄色,而未发生凋亡的细胞核复染为蓝紫色。每组铺片读取3个非边缘视野,每个视野计数200个细胞,计算凋亡细胞百分比。结果显示,TC组和ARC组患者LEC细胞凋亡率为 $(4.5 \pm 2.3)\%$ 和 $(8.7 \pm 4.1)\%$ ,差异无统计学意义;而DC组LEC凋亡率为 $(24.3 \pm 6.1)\%$ ,与TC组及ARC组比较差异有统计学意义( $P<0.05$ )。

## 3 讨论

白内障的病理学基础主要表现在LECs细胞的凋亡和晶体蛋白的改变,而晶体蛋白的改变会导致LECs的进一步凋亡<sup>[6]</sup>。SIRT1是一种对抗衰老和凋亡的保护性酶,对于该蛋白的研究可能在寻找LECs抗凋亡的保护途径或者激活其自身的抗凋亡系统具有重要意义。SIRT1可以调节叉头转录因子(forkhead box O, FOXOs)、NF- $\kappa$ B和P53等转录因子的活性,通过组蛋白脱乙酰基作用,发挥抗凋亡和抗氧化应激的作用<sup>[7]</sup>。P53是SIRT1最重要的作用底物之一,正常情况下,该蛋白处于休眠状态,当细胞处于应激状态如DNA损伤、氧化应激等,P53被激活并诱导下游多种靶基因转录,进而诱导细胞凋亡<sup>[8]</sup>。然而,SIRT1蛋白可以抑制P53介导的转录激活,从而抑制细胞凋亡<sup>[9]</sup>。有研究<sup>[10]</sup>显示,SIRT1通过调节P53信号通路抑制凋亡,不仅在LECs的抗凋亡中发挥作用,在心肌细胞,神经细胞以及胰岛B细胞的抗凋亡中也发挥重要作用,从而实现了在心脏病、神经退行性疾病和2型糖尿病等疾病的干预作用,尤其是作为2型糖尿病的治疗

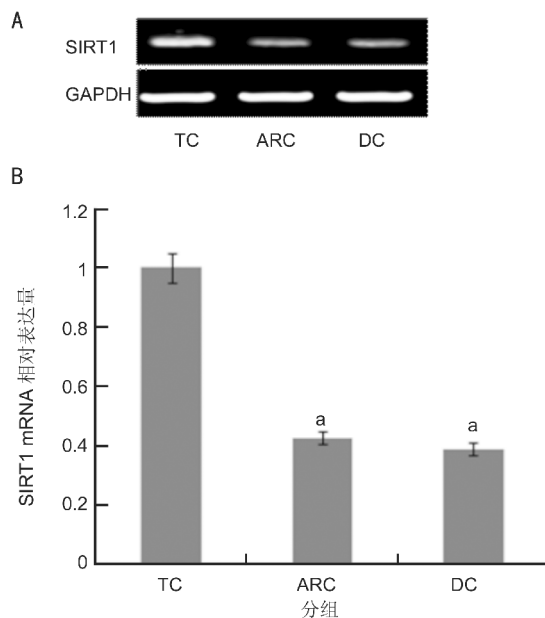


图1 RT-PCR法检测各组晶体细胞中SIRT1 mRNA的相对含量 A:RT-PCR结果;B:mRNA相对含量柱状图,<sup>a</sup> $P<0.05$  vs TC组。

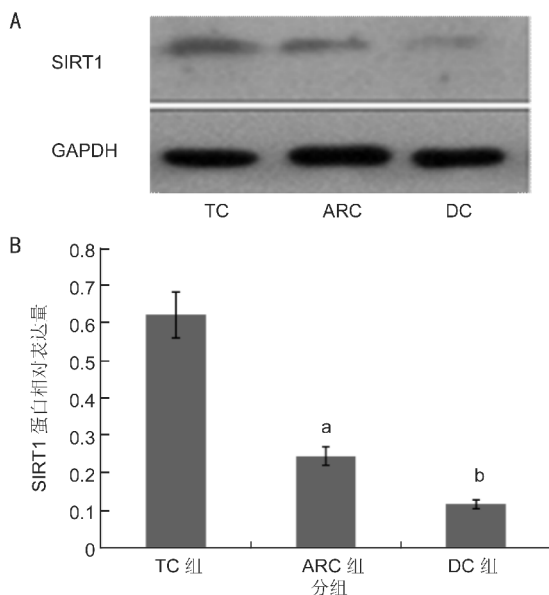


图2 Western blot法检测各组晶体细胞中SIRT1蛋白含量 A:Western blot结果;B:蛋白相对含量柱状图,<sup>a</sup> $P<0.05$ ,<sup>b</sup> $P<0.01$  vs TC组。

药物已经进入临床实验阶段。然而,糖尿病性白内障患者SIRT1蛋白在LECs细胞凋亡途径中的具体作用机制还有待进一步研究。

我们的研究结果显示,各组LECs中SIRT1的基因及蛋白均有表达,TC患者LECs中SIRT1 mRNA及蛋白相对表达量均高于年龄相关和糖尿病白内障患者,且糖尿病性白内障患者LECs中表达最低,与TC组具有统计学差异( $P<0.05$ )。这可能与患者的年龄具有一定的相关性,TC组患者年龄相对年轻,而ARC组患者的年龄较大,随着年龄增加SIRT1 mRNA和蛋白的含量下降<sup>[11]</sup>。而DC组患者不但是因为年龄增加,而且血糖升高进一步下调LECs中SIRT1的基因及蛋白的表达;因此年龄和

血糖升高均可能是影响 LECs 中 SIRT1 基因及蛋白下调的因素,促进 LECs 细胞凋亡的诱因,但具体机制还有待进一步研究。

有学者通过高血糖诱导的糖尿病性白内障兔子与正常兔子组同期比较发现,糖尿病白内障组 LEC 凋亡百分率明显高于正常组,且有显著意义<sup>[12]</sup>。在高血糖的病理因素的刺激下,打破了晶状体上皮细胞凋亡和增殖的平衡关系。相关研究表明高血糖可引起细胞内 DAG-PKC (二脂酰甘油-蛋白激酶 C)信号传导通路的激活<sup>[13]</sup>。我们研究发现,糖尿病性白内障组 LECs 的凋亡率最高,为 24.3%,与 TC 组比较差异有统计学意义,该结果与文献结果相一致。糖尿病性白内障组 LECs 较高的凋亡发生率可能与 SIRT1 蛋白的表达量低有关,促使下游凋亡转录因子(如 P53)的启动,进一步促进 LECs 的凋亡。因此,通过调节 SIRT1 基因在晶状体上皮细胞中表达,可能是治疗或早期干预糖尿病白内障发展的又一新靶点,为今后的进一步研究提供新的理论依据。

#### 参考文献

- 1 Seitzman GD, Gottsch JD, Stark WJ. Cataract surgery in patients with Fuchs' corneal dystrophy: expanding recommendations for cataract surgery without simultaneous keratoplasty. *Ophthalmology* 2005; 112(3):441-446
- 2 Zeng L, Chen R, Liang F, et al. Silent information regulator, Sirtuin 1, and age-related diseases. *Geriatr Gerontol Int* 2009; 9(1):7-15
- 3 Marmorstein R. Structure and chemistry of the Sir2 family of NAD<sup>+</sup>-

dependent histone/protein deacetylases. *Biochem SocTrans* 2004; 32(pt6):904-909

4 刘婕,赵娴,张恒丽,等. 不同类型白内障患者术后晶状体后囊膜混浊发生率的比较. *眼科* 2014; 2(5):91-93

5 Srivastava PK, Amato PJ. Heat shock proteins: the 'Swiss Army knife' vaccines against cancers and infectious agents. *Vaccine* 2001; 19(17-19):2590-2597

6 Wick G, Perschinka H, Millonig G. Atherosclerosis as an autoimmune disease: an update. *Trends Immunol* 2001; 22(12):665-669

7 Kume S, Kitada M, Kanasaki K, et al. Anti-aging molecule, Sirt1: a novel therapeutic target for diabetic nephropathy. *Arch Pharm Res* 2013; 36(2):230-236

8 Bai L, Pang WJ, Yang YJ, et al. Modulation of Sirt1 by resveratrol and nicotinamide alters proliferation and differentiation of pig preadipocytes. *Mol Cell Biochem* 2008; 307(1-2):129-140

9 Xu Y, Nie L, Yin YG, et al. Resveratrol protects against hyperglycemia-induced oxidative damage to mitochondria by activating SIRT1 in rat mesangial cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2012; 259(3):395-401

10 侯艳丽,王艳玲. 白内障术前患者角膜内皮细胞减少原因的探讨. *首都医科大学学报* 2010; 31(1):48-50

11 Qin Y, Zhao J, Min X, et al. MicroRNA-125b inhibits lens epithelial cell apoptosis by targeting p53 in age-related cataract. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1842(12PA):2439-2447

12 Obrosova IG, Chung SS, Kador PF. Diabetic cataracts: mechanisms and management. *Diabetes Metab Res Rev* 2010; 26(3):172-180

13 Zorie L, Elek-Vlajic S, Jovanovic M, et al. Oxidative stress intensity in lens and aqueous depending on age-related cataract type and brunescence. *Eur J Ophthalmol* 2008; 18(5):669-674