

# 硫化氢对糖尿病性白内障大鼠氧化应激的作用及其机制研究

王燕, 李春艳, 杨莉

作者单位: (712000) 中国陕西省咸阳市中心医院眼科  
作者简介: 王燕, 毕业于兰州大学, 本科, 主治医师, 研究方向: 青光眼、白内障。  
通讯作者: 王燕. wmm\_365mas@163.com  
收稿日期: 2018-06-05 修回日期: 2018-11-02

## Mechanism and effect of H<sub>2</sub>S on oxidative stress in diabetic cataract rats

Yan Wang, Chun-Yan Li, Li Yang

Department of Ophthalmology, Xianyang Central Hospital, Xianyang 712000, Shaanxi Province, China

**Correspondence to:** Yan Wang. Department of Ophthalmology, Xianyang Central Hospital, Xianyang 712000, Shaanxi Province, China. wmm\_365mas@163.com

Received: 2018-06-05 Accepted: 2018-11-02

## Abstract

• **AIM:** To explore the effect of hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) on oxidative stress in diabetic cataract rats and its mechanism.

• **METHODS:** SD rats were randomly divided into control group, diabetic group, low-dosage NaHS-treated group, high-dosage NaHS-treated group, and NaHS treated alone group. NaHS was used as a donor of H<sub>2</sub>S. The diabetic model was established by a single intraperitoneally administrating streptozotocin (STZ, 65mg/kg). BQ900 slit lamp was used to recorded the changes of lenses. At the end of experiment, the level of superoxide dismutase (SOD) was measured by xanthine oxidase test, the activity of malondialdehyde (MDA) was detected by thiobarbituric acid test, and glutathione (GSH-Px) were detected by corresponding assay kits. Western blotting was applied to detect the expression of SIRT1.

• **RESULTS:** The lenses of diabetic group showed different levels of turbidity, which demonstrated that diabetic cataract model was successfully established. Low-dosage NaHS and high-dosage NaHS treatment dramatically alleviated turbidity levels of lenses in diabetic rats, respectively. Compared to diabetic group, low-dosage NaHS and high-dosage NaHS treatment obviously decreased the levels of MDA and increased the levels of SOD and GSH-Px. Furthermore, the SIRT1 expression in lens of diabetic rats was downregulated, and low-dosage NaHS as well as high-dosage NaHS treatment significantly reversed this change.

• **CONCLUSION:** H<sub>2</sub>S protects against oxidative stress in STZ-induced diabetic rats involving upregulation of SIRT1.

• **KEYWORDS:** diabetic cataract; streptozotocin; hydrogen sulfide; oxidative stress; silent information regulator 1

**Citation:** Wang Y, Li CY, Yang L. Mechanism and effect of H<sub>2</sub>S on oxidative stress in diabetic cataract rats. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2018;18(12):2142-2145

## 摘要

**目的:** 探讨硫化氢(H<sub>2</sub>S)对糖尿病性白内障大鼠氧化应激的作用及其作用机制是否涉及调控沉默信息调节因子1(SIRT1)。

**方法:** 将SD大鼠随机分为正常对照组、糖尿病模型组、低浓度NaHS组、高浓度NaHS组、单用NaHS组。NaHS作为H<sub>2</sub>S的供体。糖尿病模型组、低浓度NaHS组、高浓度NaHS组大鼠一次性腹腔注射链脲佐菌素(streptozotocin, STZ, 65mg/kg)建立糖尿病大鼠模型。采用BQ900裂隙灯观察各组大鼠晶状体的变化。自实验开始12wk后,采用硫代巴比妥酸法检测MDA的含量,黄嘌呤氧化酶法检测SOD的含量,二硫代二硝基苯甲酸法检测GSH-Px的含量;Western blotting检测大鼠晶状体SIRT1的表达。

**结果:** 糖尿病组大鼠晶状体出现不同级别的混浊,表明糖尿病性白内障大鼠模型复制成功。分别予低浓度NaHS、高浓度NaHS治疗后糖尿病大鼠晶状体混浊程度得到明显改善。与糖尿病模型组相比,分别给予低浓度NaHS、高浓度NaHS治疗的糖尿病大鼠晶状体MDA的含量明显下降,SOD和GSH-Px的水平显著增加。此外,Western blotting结果显示糖尿病模型组大鼠晶状体SIRT1的表达明显下调,分别予低浓度NaHS、高浓度NaHS治疗能有效逆转该趋势。

**结论:** H<sub>2</sub>S能够抑制糖尿病性白内障大鼠氧化应激水平,其机制可能涉及上调SIRT1的表达。

**关键词:** 糖尿病性白内障;链脲佐菌素;硫化氢;氧化应激;沉默信息调节因子1

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2018.12.05

**引用:** 王燕,李春艳,杨莉. 硫化氢对糖尿病性白内障大鼠氧化应激的作用及其机制研究. 国际眼科杂志 2018;18(12):2142-2145

## 0 引言

随着社会经济的发展以及人们生活方式的改变,糖尿病的患病率逐年上涨,给人类的健康和生活质量造成严重的困扰<sup>[1]</sup>。作为糖尿病常见的并发症之一,糖尿病性白内

表 1 各组大鼠晶状体混浊情况

只

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	0	0	0	4	10	6
低浓度 NaHS 组	1	3	4	7	4	1
高浓度 NaHS 组	2	10	5	2	1	0
单用 NaHS 组	20	0	0	0	0	0

障伴随着糖尿病的发展而发展,是导致失明的一大危险疾病<sup>[2]</sup>。目前的研究表明,氧化应激作为晶状体的酶防御体系在白内障的发病过程中扮演着重要的角色,过度的氧化应激加剧晶状体上皮细胞凋亡,从而促进白内障的发展<sup>[3-4]</sup>。硫化氢(hydrogen sulfide, H<sub>2</sub>S)作为一种新型的气体信号分子,对机体发挥着重要的支持和调节作用,具有治疗疾病的潜力<sup>[5-6]</sup>。大量的研究发现, H<sub>2</sub>S 具有抗氧化应激的作用<sup>[7-8]</sup>。因此,本研究将探讨 H<sub>2</sub>S 是否具有抗糖尿病性白内障大鼠氧化应激的作用。

沉默信息调节因子 1 (silent information regulator 1, SIRT1) 作为 Sirtuins 家族研究最为广泛的成员之一,在调控细胞凋亡、衰老、代谢以及延长寿命等方面扮演着重要的角色<sup>[9-10]</sup>。近年来的研究发现,糖尿病性白内障患者晶状体 SIRT1 的表达下调<sup>[11]</sup>,且通过调控 SIRT1 的表达能延缓疾病的发展<sup>[12]</sup>。因此,本文以 SIRT1 为切入点探讨 H<sub>2</sub>S 调控糖尿病性白内障氧化应激的机制。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 雄性健康 SD 大鼠购买于湖南长沙斯莱克景达实验动物有限公司,共 100 只,体质量为 200 ~ 250g;链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)和 NaHS(H<sub>2</sub>S 供体)购自美国 Sigma 公司;兔抗 SIRT1 单克隆抗体购自 Abcam 公司;超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(malondialdehyde, MAD)以及谷胱甘肽(glutathione peroxidase, GSH-Px)试剂盒购自南京建成公司。本研究严格遵守中华人民共和国国家科学技术委员颁布的《实验动物管理条例》。

## 1.2 方法

**1.2.1 实验分组** 实验用 SD 大鼠共 100 只,随机分为 5 组:正常对照组、糖尿病模型组、低浓度 NaHS 组、高浓度 NaHS 组、单用 NaHS 组,每组 20 只。适应环境 1wk 后,糖尿病模型组、低浓度 NaHS 组、高浓度 NaHS 组大鼠一次性腹腔注射 STZ 65mg/kg,正常对照组和单用 NaHS 组给予等量的枸橼酸溶液。72h 后进行尾静脉采血,测大鼠空腹血糖浓度,血糖浓度超过 16.7mmol/L 则视为糖尿病模型复制成功。然后,低浓度 NaHS 组、高浓度 NaHS 组、单用 NaHS 组大鼠分别按照 30、100、100μmol/kg 的量每日腹腔注射 NaHS,正常对照组、糖尿病模型组每日腹腔注射等量的磷酸盐缓冲液,总共 4wk。

**1.2.2 晶状体混浊情况的观察** 每 2wk 用托品酰胺滴眼液散瞳,5min 后用乙醚蒸汽麻醉大鼠,采用 BQ900 裂隙灯观察大鼠晶状体混浊程度,并根据晶状体混浊情况进行分级,具体标准参照 Azuma 等的分级标准<sup>[13]</sup>,选取每只大鼠晶状体混浊程度最严重的那只眼进行分级。

**1.2.3 大鼠晶状体 MDA、SOD 以及 GSH-Px 的检测** 自实验开始 12wk 后,每组选取 3 只大鼠处死,快速摘取眼球,分离晶状体组织。将晶状体研磨成匀浆,提取蛋白。

低温离心取上清液。按照 BCA 蛋白定量试剂盒说明书测定总蛋白。采用硫代巴比妥酸法检测 MDA 的含量,二硫代二硝基苯甲酸法检测 GSH-Px 的含量,黄嘌呤氧化酶法检测 SOD 的含量,具体操作严格按照 MDA、SOD 以及 GSH-Px 试剂盒说明书进行。

**1.2.4 Western blotting 检测晶状体 SIRT1 的表达** 自实验开始 12wk 后,每组取 3 只大鼠的晶状体组织,将其充分匀浆,低温离心 10min,取上清液,并测定总蛋白量。将蛋白样品与 5×上样缓冲液混合,沸水煮 5min 使蛋白变性。经 SDS-PAGE 电泳使分子量不同的蛋白分开,接着采用湿转恒流将蛋白转至 PVDF 膜上。室温下用 5% 的脱脂牛奶封闭 2h 后,4℃ 孵育一抗 (SIRT1, 1:1000; β-actin, 1:2000) 过夜, TBST 洗膜 3 次,每次 10min。二抗 (1:5000) 孵育 2h,按照前面的方法洗膜,显影。所得到的蛋白条带用 Alpha Imager 2200 软件进行灰度值扫描。

统计学分析:采用 SPSS 20.0 软件统计分析数据。计量资料用均数±标准误( $\bar{x} \pm SE$ )表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-t 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 H<sub>2</sub>S 能缓解糖尿病性白内障大鼠晶状体混浊程度** 自实验开始 12wk 后,各组大鼠晶状体的混浊程度见表 1。正常对照组大鼠晶状体未发生任何变化,晶状体透明。糖尿病模型组大鼠晶状体出现不同程度的混浊,少数糖尿病大鼠出现晶状体 III 期混浊,除空泡在晶状体周边皮质密集外,部分皮质有片状混浊现象,多数糖尿病大鼠出现晶状体核混浊和核周边皮质混浊现象,有的糖尿病大鼠晶状体甚至完全混浊,表明糖尿病性白内障模型建立成功。给予 NaHS 治疗后,低浓度 NaHS 组多数大鼠有周边片状混浊现象,少数出现中等空泡在皮质周边聚集、晶状体核混浊及核周边皮质混浊现象,与糖尿病模型组大鼠相比较晶状体混浊程度有所缓解。高浓度 NaHS 组大鼠晶状体周边皮质有细小空泡出现,极少数有皮质片状混浊现象,且与糖尿病模型组大鼠比较其晶状体混浊程度明显得到改善。

**2.2 H<sub>2</sub>S 拮抗糖尿病性白内障大鼠晶状体氧化应激** 取大鼠晶状体检测氧化应激水平的变化情况发现,糖尿病模型组大鼠晶状体 MDA 的含量显著增加,GSH-Px、SOD 的含量明显减少,表明糖尿病大鼠晶状体氧化应激的水平增加。给予不同浓度的 NaHS 治疗后,糖尿病大鼠晶状体 MDA 的含量降低,GSH-Px、SOD 的含量呈上升趋势,且高浓度 NaHS 的抗氧化应激的效果明显优于低浓度 NaHS 的效果(表 2,图 1)。以上结果表明 H<sub>2</sub>S 能够抑制糖尿病性白内障大鼠晶状体的氧化应激水平。

**2.3 H<sub>2</sub>S 上调糖尿病性白内障大鼠晶状体 SIRT1 的表达** 为了探讨 H<sub>2</sub>S 抗糖尿病性白内障大鼠氧化应激的作

表2 H<sub>2</sub>S对大鼠晶状体氧化应激指标的影响

组别	MDA (nmol/mg · protein)	SOD (U/mg · protein)	GSH-Px (U/mg · protein)
正常对照组	5.167±0.29	13.26±0.14	62.74±0.96
糖尿病模型组	8.051±0.26 <sup>b</sup>	8.197±0.41 <sup>b</sup>	41.68±0.80 <sup>b</sup>
低浓度 NaHS 组	7.387±0.13 <sup>c</sup>	10.04±0.49 <sup>c</sup>	49.65±3.01 <sup>c</sup>
高浓度 NaHS 组	6.650±0.09 <sup>d</sup>	12.61±0.89 <sup>d</sup>	62.34±2.24 <sup>d</sup>
单用 NaHS 组	5.080±0.14	13.57±0.57	61.77±0.64
<i>F</i>	0.263	0.251	0.084
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001

注:<sup>b</sup>*P*<0.01 vs 正常对照组;<sup>c</sup>*P*<0.05,<sup>d</sup>*P*<0.01 vs 糖尿病模型组。

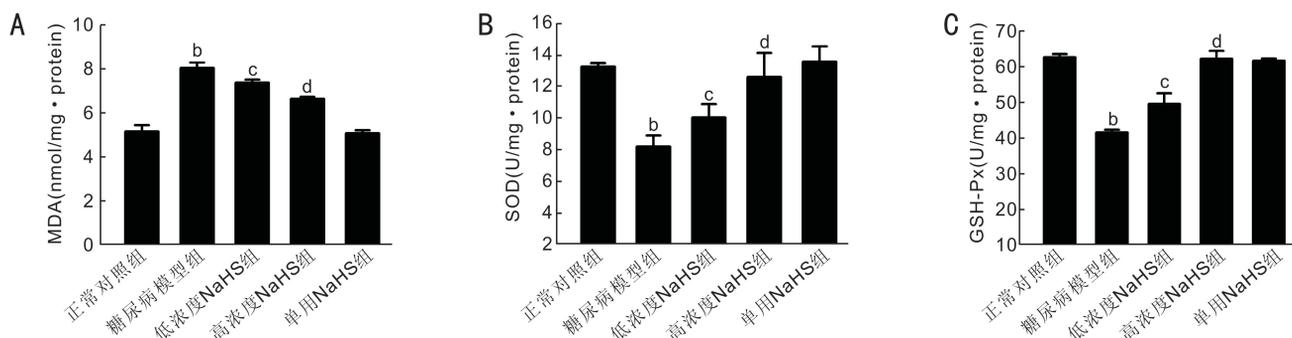


图1 H<sub>2</sub>S对大鼠晶状体氧化应激指标的影响 A:H<sub>2</sub>S对MDA水平的影响;B:H<sub>2</sub>S对SOD水平的影响;C:H<sub>2</sub>S对GSH-Px水平的影响。<sup>b</sup>*P*<0.01 vs 正常对照组,<sup>c</sup>*P*<0.05,<sup>d</sup>*P*<0.01 vs 糖尿病模型组。

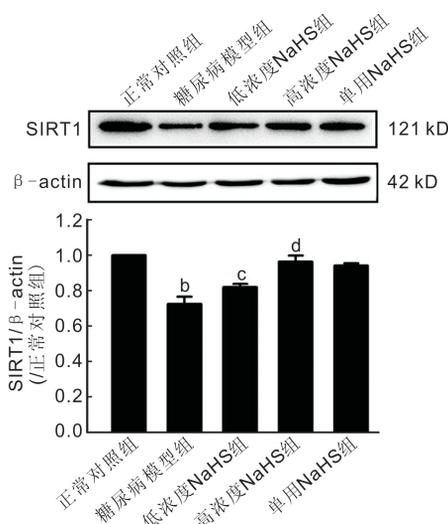


图2 H<sub>2</sub>S糖尿病大鼠晶状体 SIRT1 表达的影响 <sup>b</sup>*P*<0.01 vs 正常对照组;<sup>c</sup>*P*<0.05,<sup>d</sup>*P*<0.01 vs 糖尿病模型组。

用机制,我们检测了各组大鼠晶状体 SIRT1 的表达情况(图2)。结果显示,各组大鼠晶状体 SIRT1 的表达差异有统计学意义( $F=0.102, P<0.001$ ),与正常对照组(1.000±0.00)相比较,糖尿病大鼠晶状体 SIRT1 的表达(0.726±0.04)明显下降( $P<0.001$ ),给予不同浓度的 NaHS 治疗后,糖尿病大鼠晶状体 SIRT1 的表达(低浓度 NaHS 组:0.821±0.02;高浓度 NaHS 组:0.964±0.03)显著增加,差异均有统计学意义( $P=0.025, <0.001$ ),表明 H<sub>2</sub>S 能上调糖尿病大鼠晶状体 SIRT1 的表达。

### 3 讨论

糖尿病性白内障作为糖尿病的并发症之一,其发病机制主要包括氧化应激、渗透损伤以及晶状体蛋白非酶糖基化三大学说<sup>[14-15]</sup>。其中氧化应激在糖尿病性白内障的发

生发展过程中占据着重要地位。晶状体的成纤维细胞或者上皮细胞中脂质受自由基的攻击,会发生脂质过氧化,从而破坏膜蛋白,促使白内障的形成。基础研究以及临床研究均证实,过度的氧化应激可加速糖尿病性白内障的形成<sup>[16-17]</sup>。与之相符,本研究也发现糖尿病性白内障大鼠晶状体氧化应激水平增加。有学者发现运用姜黄素、维生素 C 等抗氧化剂具有治疗白内障的效果<sup>[18-19]</sup>,但是对这些抗氧化剂的使用剂量、安全性还不明确,因此需继续挖掘治疗糖尿病性白内障的有效药物。

H<sub>2</sub>S 被证实为是一种新型的内源性信号分子,广泛地参与各项生理及病理过程<sup>[6,20]</sup>。H<sub>2</sub>S 能抑制脂质过氧化以及清除自由基,从而达到抗氧化应激的作用。研究发现,H<sub>2</sub>S 在呼吸系统、心血管系统以及神经系统中都发挥着抗氧化应激的作用<sup>[21]</sup>,但 H<sub>2</sub>S 在糖尿病性白内障中的作用尚未报道。据此,本研究探讨了 H<sub>2</sub>S 对糖尿病性白内障大鼠氧化应激的影响。结果表明,给予不同浓度的 NaHS 治疗后,糖尿病大鼠晶状体 MDA 的水平明显降低,SOD 以及 GSH-Px 的水平明显增加,且高浓度的 NaHS 治疗效果优于低浓度 NaHS 的治疗效果,表明 H<sub>2</sub>S 能够抑制糖尿病性白内障大鼠晶状体的氧化应激作用,同时再次证实 H<sub>2</sub>S 具有抗氧化应激的生物学作用<sup>[21]</sup>。此外,给予 NaHS 治疗后,糖尿病大鼠晶状体的混浊程度得到有效改善,表明 H<sub>2</sub>S 具有治疗白内障的潜在效果。

作为 Sirtuins 家族的成员之一,SIRT1 备受学者们的青睐。SIRT1 介导细胞的遗传及蛋白毒性应激和氧化应激,维持细胞的氧化还原处于平衡状态<sup>[22-23]</sup>。有学者发现,在白内障的发生发展过程中,SIRT1 的表达水平呈下降趋势<sup>[11,24]</sup>。张剑等<sup>[17]</sup>发现糖尿病性白内障大鼠 SIRT1 的表达降低。本研究探讨 H<sub>2</sub>S 抗糖尿病性白内障的机制是否涉及 SIRT1,结果证实,糖尿病模型大鼠晶状体 SIRT1

的表达显著性下调,给予不同浓度的 NaHS 治疗后使得糖尿病模型大鼠晶状体 SIRT1 的表达上升,表明 H<sub>2</sub>S 抗糖尿病性白内障的机制可能涉及调控 SIRT1 的表达。

综上所述,H<sub>2</sub>S 可能通过上调糖尿病性白内障大鼠晶状体 SIRT1 的表达,从而抑制氧化应激达到改善白内障的效果。本研究为治疗白内障提供了新的研究方向,H<sub>2</sub>S 有望成为治疗白内障的潜在治疗方法,但具体机制仍有待于进一步研究。

#### 参考文献

- 1 Siddiqui S. Depression in type 2 diabetes mellitus--a brief review. *Diabetes Metab Syndr* 2014;8(1):62-65
- 2 Balakumar M, Saravanan N, Prabhu D, et al. Benefits of early glycemic control by insulin on sensory neuropathy and cataract in diabetic rats. *Indian J Exp Biol* 2013;51(1):56-64
- 3 Kim B, Kim SY, Chung SK. Changes in apoptosis factors in lens epithelial cells of cataract patients with diabetes mellitus. *J Cataract Refract Surg* 2012;38(8):1376-1381
- 4 Ramana KV, Chandra D, Wills NK, et al. Oxidative stress-induced up-regulation of the chloride channel and Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger during cataractogenesis in diabetic rats. *J Diabetes Complications* 2004;18(3):177-182
- 5 Kimura H. H<sub>2</sub>S 2014 in Kyoto; the 3rd International Conference on H<sub>2</sub>S in Biology and Medicine. *Nitric Oxide* 2015;46:1-6
- 6 Wang R. Hydrogen sulfide; the third gasotransmitter in biology and medicine. *Antioxid Redox Signal* 2010;12(9):1061-1064
- 7 杨锐,贾强,刘小粉,等. 硫化氢对大鼠糖尿病心肌病氧化应激及内质网应激的影响. *中国应用生理学杂志* 2016;32(1):8-12
- 8 尹蔚兰,何剑琴,唐国华,等. 硫化氢对 MPP<sup>+</sup>诱导 PC12 细胞氧化应激损伤的保护作用. *中南医学科学杂志* 2011;39(1):7-9,17
- 9 Silvestre MF, Viollet B, Caton PW, et al. The AMPK-SIRT signaling network regulates glucose tolerance under calorie restriction conditions. *Life Sci* 2014;100(1):55-60
- 10 Luo LL, Chen XC, Fu YC, et al. The effects of caloric restriction and a high-fat diet on ovarian lifespan and the expression of SIRT1 and SIRT6

- 11 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
- 12 张剑,齐艳秀,姜伟,等. 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. *中国现代医学杂志* 2016;26(14):1-6
- 13 Bahmani F, Bathaie SZ, Aldavood SJ, et al. Glycine therapy inhibits the progression of cataract in streptozotocin-induced diabetic rats. *Mol Vis* 2012;18:439-448
- 14 Altomare E, Vendemiale G, Grattagliano I, et al. Human diabetic cataract; role of lipid peroxidation. *Diabetes Metab* 1995;21(3):173-179
- 15 李立梅,杨笑天,刘戈飞,等. 过氧化氢酶基因重组腺病毒对大鼠晶状体氧化损伤的防护作用. *中华眼科杂志* 2005;41(2):64-68
- 16 艾则孜·吾买尔,丁汝新. 糖尿病性白内障患者血清和房水中 MDA 与 SOD 的变化. *国际眼科杂志* 2010;10(7):1300-1302
- 17 张剑,齐艳秀,姜伟,等. 白藜芦醇对糖尿病性白内障大鼠 MDA、SOD 和 GSH-Px 的影响. *哈尔滨医科大学学报* 2016;50(6):497-500
- 18 Shui YB, Holekamp NM, Kramer BC, et al. The gel state of the vitreous and ascorbate-dependent oxygen consumption; relationship to the etiology of nuclear cataracts. *Arch Ophthalmol* 2009;127(4):475-482
- 19 杜玲玲,高维奇,冯万国,等. 姜黄素对体外培养的硒性白内障形成的作用. *眼科研究* 2010;28(8):756-759
- 20 Wang R. Physiological implications of hydrogen sulfide: a whiff exploration that blossomed. *Physiol Rev* 2012;92(2):791-896
- 21 王洪瑾,李毅. 硫化氢与氧化应激. *医学研究生学报* 2011;28(4):433-436
- 22 Khan RS, Fonseca - Kelly Z, Callinan C, et al. SIRT1 activating compounds reduce oxidative stress and prevent cell death in neuronal cells. *Front Cell Neurosci* 2012;6:63
- 23 Chong ZZ, Shang YC, Wang S, et al. SIRT1; new avenues of discovery for disorders of oxidative stress. *Expert Opin Ther Targets* 2012;16(2):167-178
- 24 季青山,俞茜,孙思勤,等. miR-34a/SIRT1 表达水平与大鼠白内障发生的相关性研究. *中华临床医师杂志(电子版)* 2017;11(13):1982-1986