

引文格式: 张笃贞, 张涤, 孙鹏, 王冬兰. 白藜芦醇对糖尿病大鼠视网膜中 SIRT1 基因表达的干预作用 [J]. 眼科新进展, 2014, 34 (4): 322-325. doi: 10.13389/j.cnki.rao.2014.0087

【实验研究】

白藜芦醇对糖尿病大鼠视网膜中 SIRT1 基因表达的干预作用

张笃贞 张涤 孙鹏 王冬兰

作者简介: 张笃贞, 女, 1983 年 1 月出生, 山东人, 在读硕士研究生。联系电话: 15245459556; E-mail: 18188894@qq.com

About ZHANG Du-Zhen: Female, born in January, 1983. Postgraduate student. Tel: 15245459556; E-mail: 18188894@qq.com

收稿日期: 2013-09-27

修回日期: 2013-12-19

本文编辑: 付中静

作者单位: 154007 黑龙江省佳木斯市, 佳木斯大学临床医学院 (张笃贞); 154002 黑龙江省佳木斯市, 佳木斯大学附属第一医院眼科 (张涤, 孙鹏, 王冬兰)

通讯作者: 王冬兰, E-mail: wdolph@163.com

Received date: Sep 27, 2013

Accepted date: Dec 19, 2013

From the Clinical College of Jiamusi University (ZHANG Du-Zhen), Jiamusi 154007, Heilongjiang Province, China; Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Jiamusi University (ZHANG Di, SUN Peng, WANG Dong-Lan), Jiamusi 154002, Heilongjiang Province, China

Responsible author: WANG Dong-Lan, E-mail: wdolph@163.com

Effects of resveratrol on SIRT1 gene expression in retina of diabetic rat

ZHANG Du-Zhen, ZHANG Di, SUN Peng, WANG Dong-Lan

【Key words】 resveratrol; diabetic retinopathy; SIRT1; P53

【Abstract】 **Objective** To observe the effects of resveratrol (Res) on the silent mating type information regulation 2 homolog 1 (SIRT1) expression in retina of diabetic rats induced by streptozotocin (STZ), and explore its possible effective mechanisms on diabetic retinopathy. **Methods** Fifteen normal rats were set as normal control group (group NC), 57 diabetic rats induced by STZ were random divided into diabetic model (DC) group, low Res dosage of medicine (RL) group, and high Res dosage of medicine (RH) group, 19 rats in each group. Each group was given different dose of Res by intragastric administration for 12 weeks, the rat retinal tissue pathological changes were observed by HE staining, immunohistochemical staining was used to observe P53 protein expression, and RT-PCR was used to assay SIRT1 and P53 mRNA expression in the rat retina. **Results** HE staining showed that the structures of the rat retinas of group NC were clear. The retinas of group DC became thin, structures were damaged, retinal ganglion cells reduced. Compared with group DC, the situations of group RL improved slightly. The structures of group RH were almost normal. Immunohistochemical staining showed that the number of yellow or brown granules in the nucleuses of rats retinas of group DC, group NC, group RL and group RH were 103.8571 ± 8.0711 , 9.1429 ± 2.0354 , 63.7143 ± 6.7507 and 15.7514 ± 1.9881 , respectively, there were statistical differences between each group (all $P < 0.05$). The expression of SIRT1 mRNA in the retina of group DC, group NC, group RL and group RH were 1.2346 ± 0.0260 , 1.4993 ± 0.0988 , 1.2697 ± 0.0280 and 1.3921 ± 0.0531 , respectively, the group DC were lower than the group RL, group RH, group NC, there were statistical differences between each group (all $P < 0.05$). The expressions of P53 mRNA in the retina of group DC, group NC, group RL and group RH were 1.5034 ± 0.0813 , 0.9520 ± 0.1102 , 1.4293 ± 0.1100 and 1.0271 ± 0.0887 , respectively, the group DC were higher than the group RL, group RH, group NC, there were statistical differences between each group (all $P < 0.05$). **Conclusion** Res has certain protective effects on the retinal damage of diabetic rats, its mechanism may be related with Res increasing SIRT1 expression in the retina and inhibiting retinal cell apoptosis.

[Rec Adv Ophthalmol, 2014, 34 (4): 322-325]

【关键词】 白藜芦醇; 糖尿病视网膜病变; SIRT1; p53

【摘要】 **目的** 观察白藜芦醇 (Resveratrol, Res) 对链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ) 诱导的糖尿病大鼠视网膜中沉默信息调节因子 (silent mating type information regulation 2 homolog 1, SIRT1) 基因表达的影响, 探讨其对糖尿病视网膜病变可能的作用机制。 **方法** 随机选择 15 只正常大鼠为正常对照组 (NC 组), STZ 成功诱导糖尿病模型大鼠 57 只, 用随机数字表法分为糖尿病模型 (DC) 组、Res 低剂量给药 (RL) 组、Res 高剂量给药 (RH) 组, 每组各 19 只。各组分别选择不同剂量 Res 灌胃 12 周, 苏木精-伊红染色观察大鼠视网膜组织病理学改变, 免疫组织化学染色检测抗癌基因 p53 蛋白表达, RT-PCR 检测 SIRT1、p53 mRNA 在大鼠视网膜中的表达情况。 **结果** HE 染色结果显示: NC 组视网膜结构层次清晰; DC 组较 NC 组视网膜变薄, 结构破坏, 神经节细胞数目减少; RL 组较 DC 组略有改善; RH 组视网膜结构基本正常。免疫组织化学染色结果显示: DC 组、NC 组、RL 组、RH 组大鼠 p53 阳性细胞核数目分别为 (103.8571 ± 8.0711) 个、 (9.1429 ± 2.0354) 个、 (63.7143 ± 6.7507) 个、 (15.7514 ± 1.9881) 个, 各组间差异均有统计学意义 (均为 $P < 0.05$)。DC 组、NC 组、RL 组、RH 组 SIRT1 mRNA 相对表达量分别为 1.2346 ± 0.0260 、 1.4993 ± 0.0988 、 1.2697 ± 0.0280 、 1.3921 ± 0.0531 , DC 组均低于 RL 组、RH 组、NC 组, 各组间两两比较差异均有统计学意义 (均为 $P < 0.05$)。DC 组、NC 组、RL 组、RH 组 p53 mRNA 相对表达量分别为 1.5034 ± 0.0813 、 0.9520 ± 0.1102 、 1.4293 ± 0.1100 、 1.0271 ± 0.0887 , DC 组均高于 RL、RH、NC 组, 各组间两两比较差异均有统计学意义 (均为 $P < 0.05$)。 **结论**

Res 对糖尿病大鼠的视网膜损害具有一定的保护作用,其机制可能与 Res 促进视网膜中 SIRT1 的表达从而抑制视网膜的细胞凋亡有关。
[眼科新进展,2014,34(4):322-325]

糖尿病是影响全身各组织器官血管功能并引发其病变的内分泌疾病,严重影响人类健康^[1]。而糖尿病性视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是糖尿病最常见、最严重的微血管并发症之一。白藜芦醇(Resveratrol, Res)目前已被国内外学者广泛应用于糖尿病肾病的研究中,但有关其对 DR 的干预作用及其机制的相关报道尚少。而 Res 对 DR 大鼠沉默信息调节因子(silent mating type information regulation 2 homolog 1, SIRT1)的干预作用,国内外研究者均未涉及。本实验以 Wistar 大鼠为研究对象,建立链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)诱导的 DR 模型,观察 Res 对 SIRT1 mRNA 表达的影响,旨在进一步探讨 DR 的发病机制及 Res 对 DR 早期的保护作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物 清洁级 Wistar 大鼠 80 只(长春亿斯动物实验中心),雌雄各半,鼠龄为(55±5)d,体重 160~220 g。

1.2 主要药品及试剂 Res(西安冠宇生物技术有限公司);STZ、二甲基亚砜(DMSO,美国 Sigma 公司);p53 一抗(武汉博士德生物有限公司);Trizol、DEPC(大连宝生物有限公司);RT-PCR 试剂盒(Fermentas 公司);DNA marker(北京博迈德生物技术有限公司);Taq PCR Master Mix 试剂(北京百泰克生物技术有限公司);血糖仪及血糖试纸(德国罗氏公司)。

1.3 糖尿病动物模型的建立与分组 所有大鼠适应性喂养 1 周后,应用随机数字表法留取 15 只为正常对照(NC)组,剩余 65 只大鼠单次腹腔注射 60 mg·kg⁻¹STZ 以建立糖尿病动物模型,注射时用 pH 4.2 的 0.1 mol·L⁻¹ 枸橼酸缓冲液溶解 STZ 至 10 g·L⁻¹。3 d 后鼠尾静脉采血测空腹血糖,血糖浓度≥16.7 mmol·L⁻¹者即为糖尿病动物模型造模成功。剔除血糖<16.7 mmol·L⁻¹的 3 只大鼠以及 5 只死亡大鼠。将造模成功后 57 只大鼠纳入实验,用随机数字表法随机分为糖尿病模型(DC)组、Res 低剂量给药(RL)组、Res 高剂量给药(RH)组,每组各 19 只。自造模成功后第 2 天起,RL 组以 Res 混悬液(20 g·L⁻¹ Res + 0.022 g·L⁻¹ DMSO)20 mg·kg⁻¹·d⁻¹灌胃,RH 组以 Res 混悬液(100 g·L⁻¹ Res + 0.022 g·L⁻¹ DMSO)100 mg·kg⁻¹·d⁻¹灌胃,NC 组、DC 组以等量 DMSO 溶液灌胃,持续 12 周。

1.4 取材处理 在末次给药次日处死大鼠,左眼采用石蜡包埋组织化学技术,对各组切片行组织病理学及免疫组织化学染色,光学显微镜下观察视网膜组织病理学改变及 P53 蛋白表达情况。4℃取右眼

视网膜组织,组织匀浆和液氮中保存备用,各组样本行 SIRT1、p53 mRNA 复合逆转录-聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)检测。

1.5 指标测定

1.5.1 组织病理学及免疫组织化学检测 大鼠左眼浸泡于 40 g·L⁻¹多聚甲醛溶液中 24 h,经脱水、浸蜡、切片后制成 4 μm 厚大鼠视网膜组织切片,经苏木精-伊红染色,光学显微镜下观察各组大鼠视网膜组织形态学改变。按照 SP 及 DAB 显色试剂盒步骤进行免疫组织化学染色,一抗为兔抗大鼠 p53 抗体(1:100 稀释),二抗为生物素羊抗兔 IgG(1:100 稀释),DAB 显色,苏木精-伊红复染,中性树胶封片。光学显微镜下观察 p53 蛋白表达情况,以视网膜细胞核内出现黄色或棕黄色颗粒为阳性,每张切片在阳性表达区域选择 5 个无重叠高倍视野,采用双盲法平均计数阳性细胞核数。

1.5.2 RT-PCR 法测定 SIRT1、p53 mRNA 表达 按照试剂盒说明 Trizol 法提取总 RNA,琼脂糖凝胶电泳法检测 RNA 完整性,用 DU-800 紫外分光光度计检测 RNA 含量。选取 OD 值 1.8~2.2 的总 RNA(500 ng)为模板进行反转录,反转录条件:42℃ 60 min,70℃ 5 min,4℃ 结束。以 β-肌动蛋白(β-actin)为内参,行 RT-PCR 反应。PCR 反应体系:Master Mix 12.5 μL,上、下游引物各 1.0 μL,反转录产物 1.0 μL,灭菌蒸馏水 9.5 μL (PCR 引物见表 1)。

表 1 各基因的 PCR 引物

Table 1 PCR primers of each gene

Gene	Primer sequences	The length of amplification (L/bp)	Annealing temperature (T/℃)
β-actin	F-primer: 5'-CATCGTAAAGACCTCTATGCCAAC-3'	171	58
	R-primer: 5'-ATGACGCCACCGATCCACA-3'		
SIRT1	F-primer: 5'-ATGACAGAGCATCACACGCA-3'	393	58
	R-primer: 5'-TGGCTGACGATCTGGGAGA-3'		
p53	F-primer: 5'-CGACAGGGTCACCTAATTCAC-3'	413	58
	R-primer: 5'-GCGTCTCAGCACCTCAGTCAT-3'		

PCR 扩增条件(最佳退火温度):95℃预变性 2~5 min;95℃变性 30 s,58℃退火 30 s,72℃延伸 1 min,循环 30~35 次;72℃延伸 10 min,4℃结束。

PCR 产物 5 μL 行溴化乙锭(ethidium bromide, EB)配制的 20 g·L⁻¹琼脂糖凝胶电泳,120 V 电泳 30 min。凝胶成像系统(Quantity One)进行数据分析,以各组中 cDNA 扩增产物的条带与 β-actin 条带灰度比值表示 mRNA 表达水平。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计学软件进行统计分析。所有数据均以均值±标准值($\bar{x} \pm s$)表示,两组间均数比较采用 *t* 检验。*P*<0.05 为差异有

统计学意义。

2 结果

2.1 组织病理学及免疫组织化学检测 HE 染色结果显示(图1): NC 组大鼠视网膜基本结构层次分明,细胞排列紧密、整齐;DC 组较 NC 组大鼠视网膜各层厚度变薄,内核层尤为明显,内界膜断裂,神经节细胞水肿,数目减少,细胞排列不规则;RL 组较 DC 组略有改善;RH 组大鼠视网膜组织结构基本正常,较 DC 组明显改善。免疫组织化学染色结果显示(图2): NC 组大鼠仅视网膜神经节细胞层细胞核内可见黄色或棕黄色颗粒, P53 蛋白阳性细胞核数为

(9.1429 ± 2.0354) 个; DC 组大鼠视网膜神经节细胞层、内核层及外核层细胞核内均出现黄色或棕黄色颗粒, P53 蛋白阳性细胞核数为 (103.8571 ± 8.0711) 个,较 NC 组明显增多; RL 组大鼠视网膜神经节细胞层、内核层细胞核内可见黄色或棕黄色颗粒, P53 蛋白阳性细胞核数为 (63.7143 ± 6.7507) 个,较 DC 组有所改善; RH 组大鼠 P53 蛋白主要在视网膜神经节细胞层表达,内核层可见极少量黄色或棕黄色颗粒, P53 蛋白阳性细胞核数为 (15.7514 ± 1.9881) 个,较 DC 组、RL 组明显减少; 各组间两两比较差异均有统计学意义(均为 $P < 0.05$)。

Figure 1 Pathological changes of rats retina in different groups (HE, $\times 100$). A: Group NC; B: Group DC; C: Group RL; D: Group RH 各组大鼠视网膜组织病理变化情况 (HE, $\times 100$)。A: NC 组; B: DC 组; C: RL 组; D: RH 组

Figure 2 Expression of p53 in rats retina of different groups detected by immunohistochemical staining ($\times 400$). A: Group NC; B: Group DC; C: Group RL; D: Group RH 免疫组织化学法检测各组大鼠视网膜中 p53 的表达情况 ($\times 400$)。A: NC 组; B: DC 组; C: RL 组; D: RH 组

2.2 RT-PCR 检测 NC 组、DC 组、RL 组、RH 组大鼠视网膜中 SIRT1/ β -actin 的相对灰度值分别为 1.4993 ± 0.0988 、 1.2346 ± 0.0260 、 1.2697 ± 0.0280 、 1.3921 ± 0.0531 , DC 组大鼠视网膜中 SIRT1 mRNA 的表达较 NC 组、RL 组、RH 组明显降低,各组间两两比较差异均有统计学意义(均为 $P < 0.05$)。NC 组、DC 组、RL 组、RH 组大鼠视网膜中 p53/ β -actin 的相对灰度值分别为 0.9520 ± 0.1102 、 1.5034 ± 0.0813 、 1.4293 ± 0.1100 、 1.0271 ± 0.0887 , NC 组、RL 组、RH 组大鼠视网膜中 p53 mRNA 的表达较 DC 组降低,各组间两两比较差异均有统计学意义(均为 $P < 0.05$, 见图3)。

3 讨论

DR 的发病基础是视网膜血管微循环障碍,其最早出现的病理变化是周细胞缺失,基本病理改变为血-视网膜屏障破坏及新生血管形成^[2]。大量研究表明,周细胞的缺失与细胞凋亡密切相关^[3],曾有文献报道,DR 也存在神经细胞的凋亡^[4]。本实验也表明,STZ 诱导的糖尿病大鼠模型可出现神经节细胞的水肿及数目减少、视网膜的结构破坏等 DR 早期病理学改变。而氧化应激、糖基化终产物生产增加

Figure 3 Relative expressions of SIRT1 and P53 mRNA compared with β -actin mRNA in rats retina of different groups 各组大鼠视网膜中 SIRT1 mRNA、p53 mRNA 较 β -actin mRNA 的相对表达量及蛋白激酶 C 的激活均可诱导视网膜细胞凋亡,导致 DR。由于视网膜细胞膜中含有大量多不饱和脂肪酸,耗氧量及葡萄糖氧化作用最多,因此相对于其他组织来说,视网膜组织对氧化应激反应更敏感。目前认为氧化应激可导致周细胞及神经细胞的凋亡,已经成为防治 DR 的重要靶点。

SIRT1 是烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD^+) 依赖的第 III 组组蛋白去乙酰化酶,广泛存在于多物种之中,在转录沉默、染色质稳态、DNA 损伤后修复、延长

细胞周期中起着重要作用^[5]。SIRT1 具有调节多种可控制代谢及内分泌信号的转录因子,包括 p53^[6]、核因子- κ B (NF- κ B)^[7]、叉头转录因子 O 亚家族 (forkhead O subfamily, FOXO)^[8]、过氧化物酶体增生生物激活受体 γ (peroxisome prolifer-activated receptor gamma, PPAR- γ)^[9]、PPAR- γ 共激活物 1- α (peroxisome proliferative activated receptor gamma co-activator 1- α , PGC1- α)^[10]等。p53 是 SIRT1 的生理性底物之一, SIRT1 可通过使抑癌基因 p53 特异位点的赖氨酸残基发生去乙酰化作用从而负性调节其活性^[11]。Luo 等^[12]发现 SIRT1 能使促凋亡因子 p53 蛋白的 lys382 去乙酰化,抑制 p53 与靶 DNA 顺式原件结合,减少由 p53 诱导的氧化应激反应及 DNA 损伤导致的细胞凋亡,从而使视网膜细胞的存活率升高。野生型 SIRT1 的过量表达可以逆转辐射诱导的 p53 乙酰化,并且降低 p53 靶蛋白 p21 的水平,有降低大鼠视网膜周细胞凋亡及延长视网膜细胞寿命的可能^[12-13]。本研究结果显示,高糖状态下大鼠视网膜中 SIRT1 mRNA 的表达明显减少, P53 蛋白及 mRNA 水平的表达均明显增多,表明在 DR 早期 SIRT1、p53 的平衡状态已受到破坏,其表达量的变化进一步诱导了 DR 病情的发展。

Res 是非黄酮类多酚化合物,广泛存在于葡萄、花生、虎杖、藜芦等植物中^[14],是 SIRT1 的天然激动剂^[8,10]。Res 具有降低血脂、抗血小板聚集、诱导肿瘤细胞凋亡、提高免疫功能、降低脂质过氧化、促进抗氧化防御作用等生理活性^[15]。研究发现,啮齿类动物能量限制的情况下,其肝脏、胰腺、肌肉、大脑及脂肪组织中的 SIRT1 表达增高^[16-17]。有研究认为 Res 能够提高 SIRT1 酶活性并提高乙酰化底物的亲和力^[14,18],可有效清除羟基和过氧化物,抵御脂质过氧化物产生的自由基对细胞膜和 DNA 的损害^[19]。本研究结果显示,在应用不同剂量 Res 治疗一段时间后,大鼠视网膜组织结构、细胞形态及数目均有改善, SIRT1 mRNA 的转录和表达增多, p53 mRNA 水平的表达相应减少, RL 组、RH 组与 DC 组差异均有统计学意义 (均为 $P < 0.05$), RH 组效果优于 RL 组 ($P < 0.05$)。因此说明,在本实验条件下, SIRT1 可能是通过抑制下游底物 p53 信号通路而影响视网膜细胞代谢,早期应用 Res 可提高 SIRT1 酶的活性,改善和延缓 DR 的发展,且 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ Res 的治疗效果尤为明显。

综上所述, SIRT1 有可能成为 DR 防治的新作用靶点, Res 可以改善早期 DR 的发展,其治疗应考虑在 DR 早期就进行,以期在其初期抑制视网膜的组织病理改变,延缓甚至控制其进一步的发展。本研

究结果为早期 DR 的药物治疗提供一条新的思路,但 Res 对 DR 防治的作用机制还有待于进一步探索。

参考文献

- 1 谭静,殷闯,郭明好,张晓利.血清胱抑素 C 和 C 反应蛋白联合检测在评估糖尿病肾损害中的应用价值[J].新乡医学院学报,2013,30(4):290-291.
- 2 Chung HS, Harris A, Halter PJ, Kagemann L, Roff EJ, Garzozzi HJ, et al. Regional differences in retinal vascular reactivity[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1999, 40(10):2448-2453.
- 3 刘学政,萧鸿,王中彬,李瑞祥.糖尿病早期大鼠视网膜毛细血管细胞凋亡研究[J].眼科研究,2001,19(1):35-38.
- 4 Moore P, El-sherbeny A, Roon P, Schoenlein PV, Ganapathy V, Smith SB. Apoptosis cell death in the mouse retinal ganglion cell layer is induced *in vivo* by the excitatory amino acid homocysteine[J]. *Exp Eye Res*, 2001, 73(1):45-57.
- 5 Gray SG, Ekstrom TJ. The human histone deacetylase family[J]. *Exp Cell Res*, 2001, 262(2):75-83.
- 6 Michishita E, Park JY, Bumekis JM, Barrett JC, Horikawa I. Evolutionarily conserved and nonconserved cellular localizations and functions of human SIRT proteins[J]. *Mol Biol Cell*, 2005, 16(10):4623-4635.
- 7 Escande C, Chini CC, Nin V, Dykhouse KM, Novak CM, Levine J, et al. Deleted in breast cancer-1 regulates SIRT1 activity and contributes to high-fat diet-induced liver steatosis in mice[J]. *J Clin Invest*, 2010, 120(2):545-548.
- 8 Giannakou ME, Partridge L. The interaction between FOXO and SIRT1: tipping the balance towards survival[J]. *Trends Cell Biol*, 2004, 14(8):408-412.
- 9 Picard F, Kurtev M, Chung N, Topark-Ngarm A, Senawong T, Machado De Oliveira, et al. Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR-gamma[J]. *Nature*, 2004, 429(6993):771-776.
- 10 Revollo JR, Grimm AA, Imai S. The NAD biosynthesis pathway mediated by nicotinamide phosphoribosyltransferase regulates Sir2 activity in mammalian cells[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(49):50754-50763.
- 11 Inoue Y, Iemura S, Natsume T, Miyazawa K, Inamura T. Suppression of p53 activity through the cooperative action of ski and histone deacetylase SIRT1[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(8):6311-6320.
- 12 Luo J, Nikolaev AY, Imai S, Chen D, Su F, Shiloh A, et al. Negative control of p53 by Sir-alpha promotes cell survival under stress[J]. *Cell*, 2001, 107(2):137-148.
- 13 Vaziri H, Dessain SK, Ng Eaton E, Imai SI, Frye RA, Pandita TK, et al. Hsir2 (SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase[J]. *Cell*, 2001, 107(2):149-159.
- 14 Borra MT, Smit BC, Denu JM. Mechanism SIRT1 activation by resveratrol[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(17):17187-17195.
- 15 Tyler VE. Grape expectations (compound in grapes may fight cancer) includes related article on grape-seed extract and on ehinacea[J]. *Prevention*, 1997, 49(6):80-84.
- 16 Al-Regaiey KA, Masternak MM, Bonkowski M, Sun L, Bartke A. Long-lived growth hormone receptor knockout mice: interaction of reduced insulin-like growth factor I/insulin signaling and caloric restriction[J]. *Endocrinology*, 2005, 146(2):851-860.
- 17 Wood JG, Rogina B, Lavu S, Howitz K, Helfand SL, Tatar M, et al. Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans[J]. *Nature*, 2004, 430(7000):686-689.
- 18 Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, Lavu S, Wood JG, et al. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan[J]. *Nature*, 2003, 425(6954):191-196.
- 19 Elmali N, Esenkaya I, Karadag N, Tas F, Elmali N. Effects of resveratrol on skeletal muscle in ischemia-reperfusion injury[J]. *Ulus Tivara Acil Cerrahi Derg*, 2007, 13(4):274-280.