

## · 实验研究 ·

## 叔丁基对苯二酚对早期糖尿病模型大鼠视网膜结构和功能的保护作用及其机制

王娟<sup>1</sup> 韦芳<sup>2</sup> 曹阳<sup>1</sup> 田敏<sup>1</sup> 吕红彬<sup>1</sup><sup>1</sup>西南医科大学附属医院眼科, 泸州 646000; <sup>2</sup>上海交通大学附属第一人民医院眼科 上海市眼底病重点实验室, 上海 200080

通信作者: 吕红彬, Email: oculistlvhongbin@163.com

**【摘要】** 目的 研究抗氧化剂叔丁基对苯二酚 (tBHQ) 对早期糖尿病大鼠视网膜结构和功能的保护作用及其机制。方法 选取 8 周龄健康清洁级雄性 SD 大鼠 45 只, 采用随机数字表法将其分为正常对照组、糖尿病模型组和 tBHQ 干预组, 每组 15 只; 糖尿病模型组和 tBHQ 干预组采用一次性腹腔内注射链脲佐菌素 (STZ) 诱导糖尿病模型, 正常对照组大鼠腹腔内注射等容量枸橼酸钠缓冲液; tBHQ 干预组在 STZ 注射前 2 周喂食质量分数为 1% tBHQ 添加饲料, 其余 2 个组大鼠喂食普通饲料; 分别于造模后 72 h、2 周和 4 周尾静脉采血用于血糖检测。取造模成功的大鼠于造模后 4 周行视网膜电图 (ERG) 检测; 采用苏木精-伊红染色法观察大鼠视网膜组织形态结构变化; 采用 TUNEL 法观察视网膜组织各层细胞凋亡情况; Western blot 法检测视网膜组织中蛋白激酶 B (Akt)、p-Akt、内皮型一氧化氮合酶 (eNOS) 和 p-eNOS 的表达情况。另取体外培养的 Müller 细胞系 rMC-1 进行分组。正常对照组、甘露醇对照组、高糖组细胞分别在正常培养基、含 5.5 mmol/L 葡萄糖+24.5 mmol/L 甘露醇的培养基、高糖培养基中培养 72 h。tBHQ 干预组细胞先于含 5 μmol/L tBHQ 的正常糖培养基中预处理 24 h, 然后于含 5 μmol/L tBHQ 的高糖培养基中继续培养 72 h; 磷脂酰肌醇 3 激酶 (PI3K) 抑制剂组细胞先于含 5 μmol/L LY294002 的正常糖培养基中预处理 6 h, 然后于含 5 μmol/L LY294002 及 5 μmol/L tBHQ 的正常糖培养基中继续培养 24 h, 最后于含 5 μmol/L LY294002 及 5 μmol/L tBHQ 的高糖培养基中继续培养 72 h, 收集各组细胞提取蛋白, Western blot 法检测 Akt、p-Akt、eNOS 和 p-eNOS 的表达情况。结果 造模后 72 h、2 周和 4 周, 糖尿病模型组大鼠血糖较正常对照组和 tBHQ 干预组高, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.01$ )。造模后 4 周糖尿病模型组大鼠暗适应 ERG 的 a 波、b 波振幅较正常对照组和 tBHQ 干预组下降, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ )。组织病理学染色结果显示, 与正常对照组相比, 糖尿病模型组视网膜神经节细胞数目减少, 内丛状层水肿增厚, 内核层及外核层变薄, 结构疏松且排列紊乱, 而 tBHQ 干预组各结构较糖尿病模型组有所改善。TUNEL 染色结果显示, 糖尿病模型组大鼠视网膜细胞凋亡指数较正常对照组和 tBHQ 干预组高, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ ), 且凋亡细胞主要存在于外核层。Western blot 法检测结果显示, 正常对照组、糖尿病模型组和 tBHQ 干预组大鼠视网膜组织 p-Akt/Akt 的相对表达量分别为 0.76±0.11、0.52±0.10 和 1.14±0.31, p-eNOS/eNOS 的相对表达量分别为 0.83±0.06、0.52±0.08 和 1.03±0.13, 糖尿病模型组大鼠视网膜组织 p-Akt/Akt、p-eNOS/eNOS 的相对表达量均较正常对照组和 tBHQ 干预组降低, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.01$ ); 正常对照组、甘露醇对照组、高糖组、tBHQ 干预组和 PI3K 抑制剂组细胞 p-Akt/Akt 的相对表达量分别为 0.95±0.38、0.94±0.27、0.33±0.25、1.32±0.37 和 0.24±0.09, p-eNOS/eNOS 的相对表达量分别为 0.86±0.11、0.74±0.29、0.45±0.29、1.28±0.22 和 0.73±0.29, 高糖组细胞 p-Akt/Akt、p-eNOS/eNOS 的相对表达量较正常对照组和 tBHQ 干预组显著降低, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ ), PI3K 抑制剂组 p-Akt/Akt、p-eNOS/eNOS 的相对表达量较 tBHQ 干预组明显降低, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.01$ )。结论 tBHQ 对早期糖尿病大鼠视网膜结构和功能均具有保护作用, 其保护作用机制可能与 Akt/eNOS 信号通路的活化有关。

**【关键词】** 糖尿病/并发症; 视网膜病变; 抗氧化剂/叔丁基对苯二酚; 视网膜电图; 细胞凋亡; Akt/eNOS

**基金项目:** 上海市眼底病重点实验室开放课题项目 (030105); 四川省卫生与健康委员会课题项目 (18035); 泸州市人民政府-西南医科大学科技战略合作项目 (2017LZXNYD-J01)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20191225-00555

## Protective effect of tert-butylhydroquinone on retinal morphology and function in early diabetic rats and its mechanism

Wang Juan<sup>1</sup>, Wei Fang<sup>2</sup>, Cao Yang<sup>1</sup>, Tian Min<sup>1</sup>, Lyu Hongbin<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology, the Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, China; <sup>2</sup>Department of Ophthalmology, Shanghai General Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200080, China

Corresponding author: Lyu Hongbin, Email: oculistlvhongbin@163.com

**[Abstract]** **Objective** To investigate the protective effects of an antioxidant tert-butylhydroquinone (tBHQ) on the morphology and function of retina in early-stage experimental diabetic rats, and to explore the mechanism of its protective effect. **Methods** Forty-five healthy SD rats of clean degree were randomized into normal control group, diabetes model group and tBHQ intervention group, with 15 rats in each group according to a random number table. The diabetes model was established via a single intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ) in diabetes model group and tBHQ intervention group. Normal control group was intraperitoneally administered with an equal-volume injection of sodium citrate buffer. Rats in the tBHQ intervention group maintained a diet with 1% tBHQ for 2 weeks before the STZ injection, and the other two groups were fed with normal rat food only. Blood from tail vein was collected to assay the blood glucose level at 72 hours, 2 weeks and 4 weeks following modeling. Rat electroretinogram (ERG) was detected at 4 weeks after modeling. Morphological changes of rat retina were observed by hematoxylin and eosin staining. The apoptosis of retinal cells in different layers was detected by TUNEL assay. The expression of protein kinase B (Akt), p-Akt, endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and p-eNOS was detected by Western blot. Müller cell line rMC-1 cells cultured *in vitro* were divided into 5 groups, including normal control group (72-hour culturing in normal medium), mannitol control group (72-hour culturing in medium containing 5.5 mmol/L glucose and 24.5 mmol/L mannitol), high glucose group (72-hour culturing in high-glucose medium), tBHQ intervention group (24-hour culturing in normal-glucose medium containing 5  $\mu\text{mol/L}$  tBHQ, 72-hour culturing in high-glucose medium containing 5  $\mu\text{mol/L}$  tBHQ), and phosphoinositide 3-kinase (PI3K) inhibitor group (6-hour culturing in normal medium containing 5  $\mu\text{mol/L}$  LY294002, 24-hour culturing in normal-glucose medium containing 5  $\mu\text{mol/L}$  LY294002 and 5  $\mu\text{mol/L}$  tBHQ, 72-hour culturing in high-glucose medium containing 5  $\mu\text{mol/L}$  LY294002 and 5  $\mu\text{mol/L}$  tBHQ). The expression of Akt, p-Akt, eNOS and p-eNOS in the cells was detected by western blot. The use and care of animals complied with Regulations for the Administration of Laboratory Animals in Southwest Medical University. The study protocol was approved by the Animal Ethics Committee of Southwest Medical University (No. 201711189). **Results** The blood glucose level at 72 hours, 2 weeks and 4 weeks after modeling was higher in diabetic model group than tBHQ intervention group and normal control group (all at  $P < 0.01$ ). Four weeks after modeling, the scotopic ERG a-wave and b-wave amplitudes of diabetic model group were lower than those of normal control group and tBHQ intervention group (all at  $P < 0.05$ ). With edema and thickening of inner plexiform layer, thinning of inner nuclear layer and outer nuclear layer, as well as loosely arrangement and disorder of retinal layers, the number of retinal ganglion cells was decreased in diabetic model group in comparison with normal control group, all of which were improved in tBHQ intervention group in comparison with diabetic model group. There were more apoptotic retinal cells in diabetic model group than normal control group and tBHQ intervention group (both at  $P < 0.05$ ), which mainly existed in the outer nuclear layer. The relative expressions of p-Akt/Akt and p-eNOS/eNOS in rat retina of normal control group, diabetic model group and tBHQ intervention group were  $0.76 \pm 0.11$  and  $0.83 \pm 0.06$ ,  $0.52 \pm 0.10$  and  $0.52 \pm 0.08$ ,  $1.14 \pm 0.31$  and  $1.03 \pm 0.13$ , respectively. The relative expressions of p-Akt/Akt and p-eNOS/eNOS in diabetic model group were lower than those of normal control group and tBHQ intervention group (all at  $P < 0.01$ ). The relative expressions of p-Akt/Akt and p-eNOS/eNOS in normal glucose group, mannitol control group, high glucose group, tBHQ intervention group and PI3K inhibitor group were  $0.95 \pm 0.38$  and  $0.86 \pm 0.11$ ,  $0.94 \pm 0.27$  and  $0.74 \pm 0.29$ ,  $0.33 \pm 0.25$  and  $0.45 \pm 0.29$ ,  $1.32 \pm 0.37$  and  $1.28 \pm 0.22$ ,  $0.24 \pm 0.09$  and  $0.73 \pm 0.29$ , respectively. The relative expressions of p-Akt/Akt and p-eNOS/eNOS were significantly lower in high glucose group than those in normal glucose group and tBHQ intervention group (all at  $P < 0.05$ ), which were significantly lower in PI3K inhibitor group compared with tBHQ intervention group (both at  $P < 0.01$ ). **Conclusions** tBHQ has protective effects on the morphology and function of retina in early diabetic rats, and the mechanism may be related to

the activation of Akt/eNOS signaling pathway.

[ **Key words** ] Diabetes mellitus/complications; Retinopathy; Antioxidants/tert-butylhydroquinone; Electroretinogram; Apoptosis; Akt/eNOS

**Fund program:** Shanghai Critical Laboratory for Fundus Diseases (030105); Sichuan Health Commission Research Project (18035); Science and Technology Strategic Cooperation Program of Luzhou Municipal People's Government and Southwest Medical University (2017LZXNYD-J01)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20191225-00555

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是糖尿病的一种常见微血管并发症,早期防治是防止 DR 致盲的重要手段之一<sup>[1]</sup>。研究表明糖尿病大鼠的视网膜神经功能损伤早于血管损伤<sup>[2]</sup>。临床研究也证实了糖尿病患者尚未出现视网膜结构改变时,其视网膜电图(electroretinogram, ERG)的 b 波及振荡电位已出现振幅下降,并且随着病程延长及病情加重,ERG 振幅进一步下降,潜伏期延长<sup>[3]</sup>,充分说明糖尿病患者早期视网膜神经功能即已出现异常。因此,早期保护和恢复 DR 中视网膜神经元的功能对于防止 DR 致盲有重要意义。叔丁基对苯二酚(tert-butylhydroquinone, tBHQ)分子式为 C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>O<sub>2</sub>,是一种合成的酚类抗氧化剂,常被用作食品添加剂以防止油脂食品氧化变质,属于 II 相酶诱导剂之一,可有效防止氧化应激诱导的细胞功能障碍<sup>[4]</sup>。研究表明 tBHQ 可通过激活磷脂酰肌醇 3 激酶(phosphoinositide 3-kinase, PI3K)途径促进蛋白激酶 B(protein kinase B, Akt)磷酸化<sup>[5]</sup>;而磷酸化的 Akt 及其活化通路可对阿尔兹海默症等神经退行性疾病发挥抗细胞凋亡及抗氧化应激作用<sup>[6]</sup>,证实了 tBHQ 在保护神经元方面具有一定作用。在 DR 中,PI3K/Akt 途径受到抑制,并参与高糖诱导的视网膜细胞损伤<sup>[7]</sup>。因此恢复 PI3K/Akt 通路的活性将对防治 DR 起到关键作用。既往研究结果表明, tBHQ 可通过促进 Akt 的下游靶蛋白内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)活化发挥抵抗内皮功能损害和 eNOS 解耦联的作用<sup>[8]</sup>;而 tBHQ 能否恢复糖尿病诱导的 eNOS 活性尚未可知。本研究拟建立糖尿病动物模型和细胞高糖模型,观察 tBHQ 对 DR 早期视网膜结构和功能的作用,并探讨其作用机制。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

**1.1.1 实验动物** 选取 8 周龄清洁级雄性 SD 大鼠 45 只,体质量 180~200 g,购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司。饲养环境为 12 h/12 h 循环明暗光照,温度为 22~25 ℃,湿度为 40%~70%。实验动物的

饲养、使用与处死方法均遵循西南医科大学实验动物管理条例,研究方案经西南医科大学实验动物伦理审查委员会审查批准(批文号:201711189)。

**1.1.2 实验细胞** 大鼠视网膜 Müller 细胞系 rMC-1(美国西北大学 Vijay Sarthy 实验室)。将细胞培养于含体积分数 10% 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)的 DMEM 培养基中,培养环境为体积分数 5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度,温度为 37 ℃。当细胞培养至 80%~90% 融合时,进行传代培养,取第 3~8 代细胞进行实验。

**1.1.3 主要试剂及仪器** tBHQ、链脲佐菌素(streptozocin, STZ)(美国 Sigma 公司);PI3K 抑制剂 LY294002(美国 Merck 公司);无糖 DMEM 培养基(美国 Gibco 公司);RIPA 裂解液、蛋白上样缓冲液、超敏型增强化学发光(enhanced chemiluminescence, ECL)试剂、一抗及二抗稀释液(上海碧云天生物技术有限公司);小鼠抗大鼠 eNOS 抗体(ab76198,美国 Abcam 公司);兔抗大鼠 p-eNOS ser1179 抗体(12454-2,美国 SAB 公司);兔抗大鼠 p-Akt ser473(4060s)、兔抗大鼠 Akt(4685s)、β-actin、HRP 标记单克隆抗体(5125s)(美国 CST 公司);TUNEL 凋亡检测试剂盒(瑞士 Roche 公司)。Ganzfeld ERG System(美国 Phoenix-Micron 公司);NANO DROP 分光光度计(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);激光扫描共聚焦荧光显微镜(TCS SP8,德国 Leica 公司)。

### 1.2 方 法

**1.2.1 动物分组及模型建立** 将 45 只大鼠按照随机数字表法分为正常对照组、糖尿病模型组和 tBHQ 干预组,每组 15 只。适应性喂养 1 周后,糖尿病模型组和 tBHQ 干预组大鼠腹腔内注射质量分数 1% STZ 溶液(6.5 ml/kg)建立糖尿病大鼠模型,正常对照组大鼠腹腔内注射等容量枸橼酸钠缓冲液。正常对照组和糖尿病模型组大鼠喂食普通饲料(上海帆泊生物技术有限公司),tBHQ 干预组自 STZ 注射前 2 周开始一直喂食质量分数 1% tBHQ 添加饲料(上海帆泊生物技术有限公司)。造模后 72 h,大鼠尾静脉采血测量空腹血糖(fasting plasma glucose, FPG),以 FPG>16.7 mmol/L



为建模成功,以后每 2 周检测 1 次随机血糖并记录。

**1.2.2 细胞分组及模型建立** 将 Müller 细胞系分为 5 个组,其中正常对照组细胞于含 5.5 mmol/L 葡萄糖的培养基中培养 72 h;甘露醇对照组细胞于含 5.5 mmol/L 葡萄糖及 24.5 mmol/L 甘露醇的培养基中培养 72 h;高糖组细胞于含 30 mmol/L 葡萄糖的培养基中培养 72 h;tBHQ 干预组细胞先于含 5  $\mu$ mol/L tBHQ 的正常糖培养基中预处理 24 h,然后于含 5  $\mu$ mol/L tBHQ 的高糖培养基中继续培养 72 h;PI3K 抑制剂组细胞先于含 5  $\mu$ mol/L LY294002 的正常糖培养基中预处理 6 h,然后于含 5  $\mu$ mol/L LY294002 及 5  $\mu$ mol/L tBHQ 的正常糖培养基中继续培养 24 h,最后于含 5  $\mu$ mol/L LY294002 及 5  $\mu$ mol/L tBHQ 的高糖培养基中继续培养 72 h。每天更换培养基。实验重复 5 次。

**1.2.3 ERG 检测大鼠视网膜功能** 造模后 4 周,剔除发生糖尿病性白内障的大鼠,各组选取 6 只,暗适应至少 12 h,使用质量分数 10% 水合氯醛腹腔内注射 (3 ml/kg) 麻醉,复方托吡卡胺滴眼液充分扩瞳,将大鼠俯卧位固定于实验台上,给予保温。采用 Ganzfeld ERG 系统记录暗适应视网膜反应。安装电极:角膜电极垂直于角膜顶点放置,充分接触角膜,使光线充分进入眼内;参考电极置于枕后矢状缝与两眼连线的交点处皮下;接地电极置于尾根部背侧皮下。根据前期预实验结果,刺激条件设置为:背景光强为 0 cd/m<sup>2</sup>,闪光强度分别为 -1.3、-0.3、0.7 log cd · s/m<sup>2</sup>,刺激间隔分别为 30、40、50 s,单次刺激持续时间为 10  $\mu$ s,每个光强度记录 5 次得出平均值,换另一只眼再进行上述步骤。全部实验均在红光微弱照射下完成。记录数据,分析各组大鼠不同刺激光强度下 ERG a 波、b 波振幅的差异。

**1.2.4 苏木精-伊红染色法观察视网膜组织形态结构** 造模后 4 周,各组分别取 5 只大鼠,使用 10% 水合氯醛 (3 ml/kg) 腹腔内注射麻醉后并处死,取右眼置于质量分数 4% 多聚甲醛溶液中固定 24 h。常规石蜡包埋,以平行于视神经方向行 5  $\mu$ m 厚连续切片。取各组视网膜组织石蜡切片,依次放入二甲苯 I、II 和梯度乙醇中脱蜡水化,苏木素染色 3~5 min,体积分数 1% 盐酸乙醇溶液浸泡 5 s,体积分数 1% 氨水返蓝 5 s,梯度乙醇脱水各 5 min,体积分数 0.5% 伊红溶液复染 5 min,无水乙醇脱水透明后中性树脂封片,光学显微镜下观察并拍照。

**1.2.5 TUNEL 法观察视网膜组织细胞凋亡情况** 造模后 4 周,各组分别取 5 只大鼠,使用 10% 水合氯醛

(3 ml/kg) 腹腔内注射麻醉并处死,取右眼置于 4% 多聚甲醛溶液中固定 24 h,常规制作冰冻切片,以平行于视神经方向行 12  $\mu$ m 厚连续切片。取各组视网膜冰冻切片室温风干,4% 多聚甲醛室温固定 20 min,磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS) 清洗 30 min,0.1% Triton X-100 4  $^{\circ}$ C 透膜 2 min, PBS 清洗,将配制好的 TUNEL 检测混合液滴于切片上,37  $^{\circ}$ C 孵育 1 h; DAPI 复染核并 PBS 洗涤后抗荧光淬灭封片剂封片。使用激光扫描共聚焦荧光显微镜观察并拍照,当红色荧光与细胞核重合时则该细胞为凋亡细胞,使用 ImageJ 软件分析整张视网膜图片,记录每张图片上的细胞总数及 TUNEL 染色阳性细胞数,凋亡指数 = 凋亡阳性细胞数/细胞总数  $\times$  100%。

**1.2.6 Western blot 法检测视网膜组织及细胞中 p-Akt、Akt、eNOS、p-eNOS 蛋白表达** 取各组 10 只大鼠的左眼,沿角巩膜缘剪开去除晶状体,分离出视网膜组织,同时收集各组细胞,冻存于 -80  $^{\circ}$ C 冰箱。利用 RIPA 裂解液提取视网膜组织和细胞内蛋白质,采用 NANO DROP 软件检测蛋白质浓度,并加入上样缓冲液煮沸后制备蛋白质样本。取各组蛋白样本 30  $\mu$ g 上样于质量分数 7.5% SDS-PAGE 凝胶泳道中,80~120 V 电压下电泳 1.5 h,恒定电流 0.36 A 冰浴 1.5 h 转印至 PVDF 膜;将 PVDF 膜置于含质量分数 5% 脱脂奶粉 TBST 中,室温下摇床上封闭 1.5 h;TBST 漂洗 3 次,每次 15 min,根据蛋白分子大小裁膜,分别加入抗 eNOS (1:200)、p-eNOS (1:200)、p-Akt (1:1 000)、Akt (1:1 000)、 $\beta$ -actin (1:1 000) 一抗,4  $^{\circ}$ C 孵育过夜;TBST 洗膜 3 次后,加入 HRP 标记二抗 (1:5 000),室温下摇床上孵育 1.5 h;TBST 洗膜 3 次后,采用超敏型 ECL 发光法显影。采用 ImageJ 软件测定各条带灰度值,以  $\beta$ -actin 为内参照,计算各蛋白相对表达水平。

### 1.3 统计学方法

采用 GraphPad Prism 8.0 统计学软件进行统计分析。计量资料数据经 W 检验证实呈正态分布,以  $\bar{x} \pm s$  表示。各组大鼠及细胞计量资料的总体差异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 各组大鼠造模后一般情况及不同时间点血糖浓度比较

5 只模型大鼠血糖不达标被剔除实验,最终成功造模 25 只,糖尿病模型组及 tBHQ 干预组分别为 15 只和 10 只,饲养过程中未出现死亡大鼠。造模后 72 h,

糖尿病模型组大鼠已开始出现尿量增多、饮水增加的变化,随着病程延长,出现毛发粗糙、枯黄,精神萎靡,反应迟钝,多食、多尿、多饮症状明显;而 tBHQ 干预组大鼠多食、多尿、多饮症状较糖尿病模型组大鼠轻,精神状况较好,伴有一定程度的毛发粗糙和枯黄;正常对照组大鼠毛发顺滑、精神佳、反应灵敏。

造模后 72 h、2 周和 4 周各组间大鼠血糖浓度总体比较差异均有统计学意义 ( $F = 100.80, P < 0.01; F = 77.38, P < 0.01; F = 73.94, P < 0.01$ )。糖尿病模型组造模后 72 h、2 周和 4 周大鼠血糖均较正常对照组及 tBHQ 干预组升高,差异均有统计学意义(均  $P < 0.01$ ) (表 1)。

**表 1 各组大鼠不同时间点血糖浓度比较 ( $\bar{x} \pm s, \text{mmol/L}$ )**  
**Table 1 Comparison of blood glucose concentration at different time points among various groups ( $\bar{x} \pm s, \text{mmol/L}$ )**

组别	样本量	造模后 72 h	造模后 2 周	造模后 4 周
正常对照组	10	6.01 ± 1.37 <sup>a</sup>	6.18 ± 1.10 <sup>a</sup>	6.70 ± 3.06 <sup>a</sup>
糖尿病模型组	15	30.70 ± 2.35	32.49 ± 4.05	33.73 ± 4.25
tBHQ 干预组	10	25.87 ± 1.34 <sup>a</sup>	26.39 ± 3.10 <sup>a</sup>	25.84 ± 3.64 <sup>a</sup>
F 值		100.80	77.38	73.94
P 值		<0.01	<0.01	<0.01

注:与同时点糖尿病模型组比较,<sup>a</sup> $P < 0.01$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验) tBHQ:叔丁基对苯二酚

Note: Compared with diabetic model group at corresponding time points, <sup>a</sup> $P < 0.01$  (One-way ANOVA, LSD-*t* test) tBHQ: tert-butylhydroquinone

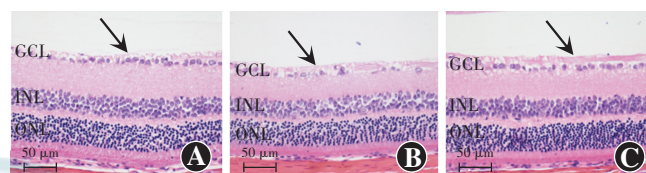
## 2.2 各组大鼠 ERG 振幅比较

当光强度为  $-1.3 \log \text{cd} \cdot \text{s}/\text{m}^2$  和  $-0.3 \log \text{cd} \cdot \text{s}/\text{m}^2$  时,各组大鼠暗适应 ERG 的 a 波和 b 波振幅总体比较差异均无统计学意义(均  $P > 0.05$ );当刺激光强度为  $0.7 \log \text{cd} \cdot \text{s}/\text{m}^2$  时,各组大鼠暗适应 ERG 的 a 波和 b 波振幅总体比较差异均有统计学意义 ( $F = 4.51, P = 0.03; F = 5.21, P = 0.02$ ),糖尿病模型组暗适应 ERG 的 a 波和 b 波振幅明显低于正常对照组和 tBHQ 干预组,差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ ) (表 2)。

## 2.3 各组大鼠视网膜结构比较

光学显微镜下可见正常对照组大鼠视网膜各层结

构清晰完整,内界膜表面光滑,细胞排列整齐。糖尿病模型组大鼠视网膜组织层次结构尚完整但欠清晰,细胞间质水肿,内界膜表面粗糙,神经节细胞层细胞数量明显减少,内核层及外核层变薄、结构疏松且细胞排列紊乱。tBHQ 干预组大鼠视网膜组织结构较完整,内界膜轻度增厚,神经节细胞层细胞轻度减少,内核层及外核层结构较疏松、细胞排列轻度紊乱(图 1)。



**图 1 各组大鼠视网膜组织病理染色变化 (HE ×400, 标尺 = 50 μm)**

A:正常对照组大鼠视网膜各层结构清晰完整 B:糖尿病模型组大鼠视网膜层次欠清晰,各层细胞数量明显减少,层间结构疏松紊乱 C:tBHQ 干预组大鼠视网膜结构基本完整,各层细胞数量轻度减少,层间结构较疏松 (箭头示内界膜) GCL:神经节细胞层;INL:内核层;ONL:外核层

**Figure 1 Histopathology of rat retinal tissues (HE ×400, bar = 50 μm)** A: The retinal layer structures of normal control group were clear and complete B: The retinal layers were not clear with the number of cells in each layer significantly reduced, and the interlayer structure was loose and disordered in diabetic model group C: The retinal structure was basically complete, and the number of cells in each layer was slightly reduced, and the interlayer structure was slightly loose in tBHQ intervention group (Arrows indicated the inner limiting membrane) GCL: ganglion cell layer; INL: inner nuclear layer; ONL: outer nuclear layer

## 2.4 各组大鼠视网膜组织中细胞凋亡情况比较

正常对照组大鼠视网膜各层可见少量 TUNEL 红色荧光染色的凋亡细胞;糖尿病模型组大鼠视网膜中红色荧光染色细胞较正常对照组增多,主要位于外核层;tBHQ 干预组大鼠视网膜中红色荧光染色细胞较糖尿病模型组减少(图 2)。正常对照组、糖尿病模型组和 tBHQ 干预组细胞凋亡指数分别为  $(7.63 \pm 6.49)\%$ 、 $(55.26 \pm 26.63)\%$ 、 $(8.59 \pm 7.98)\%$ ,总体比较差异有统计学意义 ( $F = 10.04, P = 0.01$ ),糖尿病模型组细胞凋亡指数较正常对照组和 tBHQ 干预组显著升高,差异均有统计学意义 ( $P = 0.02, P < 0.01$ ) (图 3)。

**表 2 各组不同刺激光强度下大鼠 ERG 振幅比较 ( $\bar{x} \pm s, \mu V$ )**

**Table 2 Comparison of ERG amplitudes of rats in different groups under different stimulus light intensities ( $\bar{x} \pm s, \mu V$ )**

组别	样本量	$-1.3 \log \text{cd} \cdot \text{s}/\text{m}^2$ 光强度下		$-0.3 \log \text{cd} \cdot \text{s}/\text{m}^2$ 光强度下		$0.7 \log \text{cd} \cdot \text{s}/\text{m}^2$ 光强度下	
		a 波	b 波	a 波	b 波	a 波	b 波
正常对照组	6	11.23 ± 10.75	138.50 ± 81.21	33.68 ± 10.80	173.00 ± 100.70	92.37 ± 31.95 <sup>a</sup>	270.60 ± 134.70 <sup>a</sup>
糖尿病模型组	6	14.27 ± 13.46	62.02 ± 37.92	21.60 ± 7.15	69.37 ± 33.32	44.72 ± 18.81	94.65 ± 37.25
tBHQ 干预组	6	16.73 ± 11.11	123.20 ± 52.01	37.10 ± 17.00	152.80 ± 76.29	86.92 ± 36.65 <sup>a</sup>	242.90 ± 106.70 <sup>a</sup>
F 值		0.33	2.75	2.61	3.18	4.51	5.21
P 值		0.73	0.10	0.11	0.07	0.03	0.02

注:与糖尿病模型组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验) tBHQ:叔丁基对苯二酚

Note: Compared with diabetic model group, <sup>a</sup> $P < 0.05$  (One-way ANOVA, LSD-*t* test) tBHQ: tert-butylhydroquinone

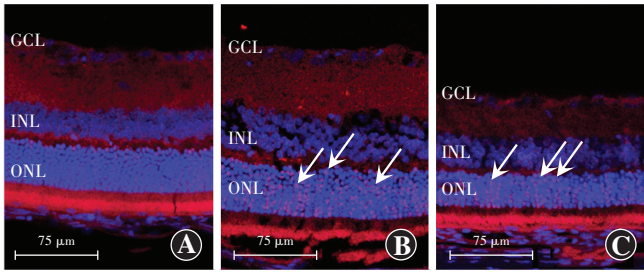


图 2 各组大鼠视网膜组织细胞 TUNEL 染色情况 (×200, 标尺 = 75 μm) A: 正常对照组大鼠视网膜组织中可见少量红色荧光染色细胞 B: 糖尿病模型组大鼠视网膜外核层可见大量红色荧光染色细胞 C: tBHQ 干预组大鼠视网膜外核层可见少量红色荧光染色细胞 (箭头示红色与蓝色荧光重合部分) GCL: 神经节细胞层; INL: 内核层; ONL: 外核层

Figure 2 TUNEL staining of rat retinal tissues (×200, bar = 75 μm) A: Red fluorescent cells were rarely observed in rat retinal tissue of normal control group B: A large number of red fluorescent cells were observed in the outer nuclear layer of retina in diabetic model group C: Few red fluorescent cells were observed in the outer nuclear layer of retina in tBHQ intervention group (Arrows indicated overlapped red and blue fluorescence) GCL: ganglion cell layer; INL: inner nuclear layer; ONL: outer nuclear layer

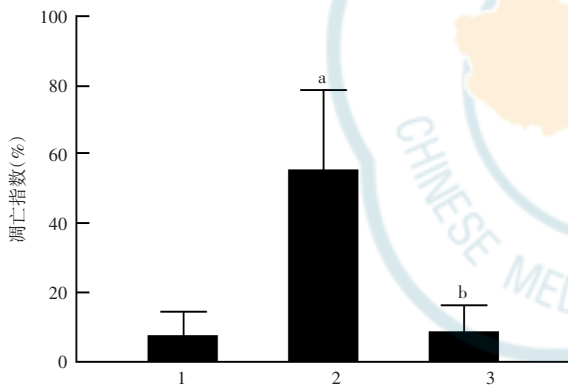


图 3 各组大鼠视网膜组织细胞凋亡指数比较  $F = 10.04, P = 0.01$ . 与正常对照组比较,  $^a P < 0.05$ ; 与糖尿病模型组比较,  $^b P < 0.01$  (单因素方差分析, LSD- $t$  检验,  $n = 5$ ) 1: 正常对照组; 2: 糖尿病模型组; 3: tBHQ 干预组

Figure 3 Comparison of apoptosis index of rat retinal tissue among different groups  $F = 10.04, P = 0.01$ . Compared with normal control group,  $^a P < 0.05$ ; compared with diabetic model group,  $^b P < 0.01$  (One-way ANOVA, LSD- $t$  test,  $n = 5$ ) 1: normal control group; 2: diabetic model group; 3: tBHQ intervention group

## 2.5 各组大鼠视网膜组织及细胞中蛋白表达情况比较

正常对照组、糖尿病模型组、tBHQ 干预组大鼠视网膜组织 p-Akt/Akt 的相对表达量分别为  $0.76 \pm 0.11$ 、 $0.52 \pm 0.10$  和  $1.14 \pm 0.31$ , p-eNOS/eNOS 的相对表达量分别为  $0.83 \pm 0.06$ 、 $0.52 \pm 0.08$  和  $1.03 \pm 0.13$ , 总体比较差异均有统计学意义 ( $F = 12.77, P < 0.01$ ;  $F = 36.88, P < 0.01$ ); 与正常对照组大鼠比较, 糖尿病模型组大鼠视网膜组织中 p-Akt/Akt 和 p-eNOS/eNOS 相对表达量降低, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.01$ ); 与糖

尿病模型组比较, tBHQ 干预组大鼠视网膜组织中 p-Akt/Akt 和 p-eNOS/eNOS 相对表达量显著升高, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.01$ ) (图 4)。

正常对照组、甘露醇对照组、高糖组、tBHQ 干预组和 PI3K 抑制剂组细胞 p-Akt/Akt 的相对表达量分别为  $0.95 \pm 0.38$ 、 $0.94 \pm 0.27$ 、 $0.33 \pm 0.25$ 、 $1.32 \pm 0.37$  和  $0.24 \pm 0.09$ , p-eNOS/eNOS 的相对表达量分别为  $0.86 \pm 0.11$ 、 $0.74 \pm 0.29$ 、 $0.45 \pm 0.29$ 、 $1.28 \pm 0.22$  和  $0.73 \pm 0.29$ , 总体比较差异均有统计学意义 ( $F = 12.36, P < 0.01$ ;  $F = 7.35, P < 0.01$ ); 与正常对照组比较, 高糖组细胞中 p-Akt/Akt 和 p-eNOS/eNOS 蛋白相对表达量明显降低, 差异均有统计学意义 (均  $P = 0.02$ ); 与高糖组比较, tBHQ 干预组细胞中 p-Akt/Akt 和 p-eNOS/eNOS 相对表达量明显升高, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.01$ ); 与 tBHQ 干预组比较, PI3K 抑制剂组中 p-Akt/Akt 和 p-eNOS/eNOS 相对表达量明显降低, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.01$ ) (图 5)。

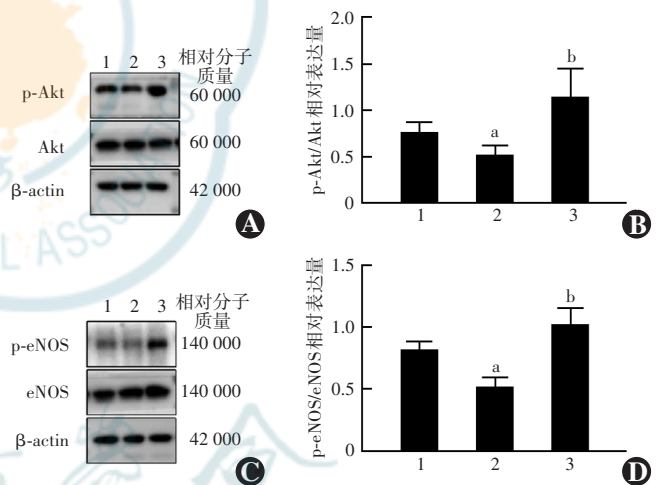
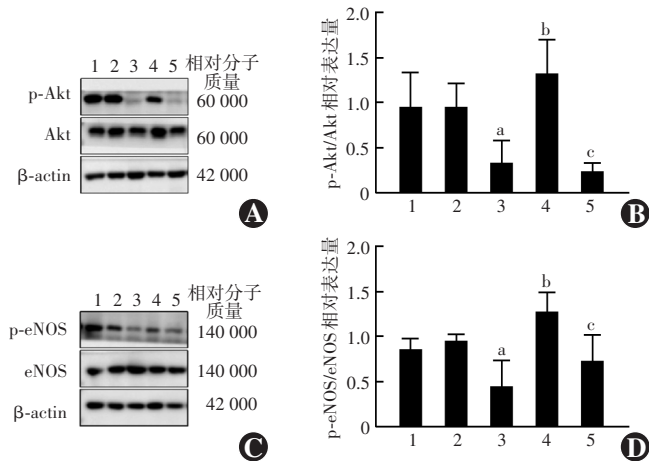


图 4 各组大鼠视网膜组织中 p-Akt/Akt、p-eNOS 和 eNOS 蛋白表达比较 A: 各组 p-Akt/Akt 蛋白电泳条带 B: 各组 p-Akt/Akt 蛋白相对表达量比较  $F = 12.77, P < 0.01$ . 与正常对照组比较,  $^a P < 0.01$ ; 与糖尿病模型组比较,  $^b P < 0.01$  (单因素方差分析, LSD- $t$  检验,  $n = 9$ ) C: 各组 p-eNOS/eNOS 蛋白电泳条带 D: 各组 p-eNOS/eNOS 蛋白相对表达量比较  $F = 36.88, P < 0.01$ . 与正常对照组比较,  $^a P < 0.01$ ; 与糖尿病模型组比较,  $^b P < 0.01$  (单因素方差分析, LSD- $t$  检验,  $n = 9$ ) 1: 正常对照组; 2: 糖尿病模型组; 3: tBHQ 干预组 Akt: 蛋白激酶 B; eNOS: 内皮型一氧化氮合酶

Figure 4 Comparison of p-Akt/Akt, p-eNOS and eNOS protein expression in rat retinal tissues among different groups A: Protein bands of p-Akt and Akt B: Comparison of the relative expression of p-Akt/Akt protein  $F = 12.77, P < 0.01$ . Compared with normal control group,  $^a P < 0.01$ ; compared with diabetic model group,  $^b P < 0.01$  (One-way ANOVA, LSD- $t$  test,  $n = 9$ ) C: Protein bands of p-eNOS and eNOS D: Comparison of the relative expression of p-eNOS/eNOS protein  $F = 36.88, P < 0.01$ . Compared with normal control group,  $^a P < 0.01$ ; compared with diabetic model group,  $^b P < 0.01$  (One-way ANOVA, LSD- $t$  test,  $n = 9$ ) 1: normal control group; 2: diabetic model group; 3: tBHQ intervention group Akt: protein kinase B; eNOS: endothelial nitric oxide synthase





**图 5 各组细胞中 p-Akt、Akt、p-eNOS、eNOS 蛋白表达比较** A: 各组 p-Akt、Akt 蛋白电泳条带 B: 各组 p-Akt/Akt 蛋白相对表达量比较  $F = 12.36, P < 0.01$ 。与正常对照组比较,  $^a P < 0.05$ ; 与高糖组比较,  $^b P < 0.01$ ; 与 tBHQ 干预组比较,  $^c P < 0.01$  (单因素方差分析, LSD-*t* 检验,  $n = 9$ ) C: 各组 p-eNOS、eNOS 蛋白电泳条带 D: 各组 p-eNOS/eNOS 蛋白相对表达量比较  $F = 7.35, P < 0.01$ 。与正常对照组比较,  $^a P < 0.05$ ; 与高糖组比较,  $^b P < 0.01$ ; 与 tBHQ 干预组比较,  $^c P < 0.01$  (单因素方差分析, LSD-*t* 检验,  $n = 9$ ) 1: 正常对照组; 2: 甘露醇对照组; 3: 高糖组; 4: tBHQ 干预组; 5: PI3K 抑制剂组 Akt: 蛋白激酶 B; eNOS: 内皮型一氧化氮合酶

**Figure 5 Comparison of p-Akt, Akt, p-eNOS and eNOS protein expression in rMC-1 cell among different groups** A: Protein bands of p-Akt and Akt B: Comparison of the relative expression of p-Akt/Akt protein  $F = 12.36, P < 0.01$ . Compared with normal control group,  $^a P < 0.05$ ; compared with high glucose group,  $^b P < 0.01$ ; compared with tBHQ intervention group,  $^c P < 0.01$  (One-way ANOVA, LSD-*t* test,  $n = 9$ ) C: Protein bands of p-eNOS and eNOS D: Comparison of the relative expression of p-eNOS/eNOS protein  $F = 7.35, P < 0.01$ . Compared with normal control group,  $^a P < 0.05$ ; compared with high glucose group,  $^b P < 0.01$ ; compared with tBHQ intervention group,  $^c P < 0.01$  (One-way ANOVA, LSD-*t* test,  $n = 9$ ) 1: normal control group; 2: mannitol control group; 3: high glucose group; 4: tBHQ intervention group; 5: PI3K inhibitor group Akt: protein kinase B; eNOS: endothelial nitric oxide synthase

### 3 讨论

既往研究表明, tBHQ 具有保护 STZ 诱导的糖尿病模型大鼠视网膜的作用, 并在一定程度上降低模型大鼠的血糖, 增加视网膜组织中 HO-1、Bcl-2 等抗凋亡及抗氧化应激因子的表达<sup>[9-10]</sup>。本研究结果也显示, tBHQ 干预的糖尿病大鼠血糖较糖尿病模型组显著降低, 证实了 tBHQ 具有对抗高血糖的作用, 其机制可能是 tBHQ 发挥了对糖尿病模型大鼠胰岛  $\beta$  细胞的保护作用, tBHQ 干预的糖尿病模型大鼠可分泌更多的胰岛素, 从而达到抗高血糖的作用<sup>[11]</sup>。

临床研究表明, DR 患者出现眼底微血管病变之前视网膜功能已出现异常<sup>[12]</sup>, 主要表现为色觉、对比敏感度以及暗适应能力的降低, ERG 表现为振幅下降及潜伏期延长<sup>[13]</sup>。动物实验也显示糖尿病大鼠发生

视网膜功能损害早于血管病变<sup>[14]</sup>。ERG a 波和 b 波主要来源于视网膜光感受器细胞(视锥细胞、视杆细胞)及双极细胞, 反映细胞受到刺激时的电位变化。本研究结果显示, 造模后 4 周糖尿病模型组大鼠 ERG 出现异常, 与正常对照组相比主要表现为 a 波和 b 波振幅下降, 说明 STZ 诱导的糖尿病大鼠早期即出现 ERG 振幅下降, 与 Chesler 等<sup>[15]</sup>研究发现的糖尿病模型大鼠早期出现视功能障碍的结果一致。有证据表明, tBHQ 在神经退行性病变中具有潜在的皮质神经元及运动神经元的保护作用<sup>[16]</sup>。本研究结果显示, tBHQ 干预组大鼠 ERG 的 a 波和 b 波振幅较糖尿病模型组有所升高, 推测 tBHQ 可在一定程度上改善糖尿病模型大鼠的视网膜功能, 这种作用可能是 tBHQ 通过保护糖尿病模型大鼠的视网膜神经细胞产生的。

本研究中组织病理染色结果显示糖尿病模型组大鼠视网膜外核层及内核层变薄、细胞排列紊乱; TUNEL 染色结果显示糖尿病模型组大鼠视网膜中凋亡细胞主要位于外核层, 推测已有光感受器细胞和双极细胞受到损害, 并且细胞数量减少。而 tBHQ 干预组大鼠视网膜上述情况则有所改善, 说明 tBHQ 对糖尿病大鼠视网膜结构及神经细胞损害均有保护作用。各组大鼠视网膜组织形态结构特征及细胞凋亡情况也与 ERG a 波和 b 波振幅改变一致。

高糖诱导的氧化应激被认为是导致 DR 发生和发展的关键机制之一<sup>[17]</sup>。因此各种抑制氧化应激反应的蛋白或细胞因子对防治 DR 进展具有积极作用。eNOS 作为机体内催化 NO 合成的酶之一, 其在 DR 发病机制中有重要作用。病理情况下, eNOS 来源的 NO 与超氧阴离子 ( $O_2^{\cdot -}$ ) 反应, 形成过氧亚硝酸盐 ( $ONOO^-$ ), 诱导细胞发生氧化应激反应, 进而发生细胞凋亡, 同时增强血管通透性<sup>[18]</sup>; 大量的氧化产物可导致 eNOS 解偶联及失活, 导致氧化应激的恶性循环<sup>[19]</sup>。本研究发现, 糖尿病模型大鼠视网膜组织中及高糖培养的细胞中磷酸化 eNOS 表达下降, 提示高糖状态下 eNOS 存在失活, 可能介导 DR 过程中高糖导致的视网膜结构和功能损害; 在使用 tBHQ 干预的糖尿病大鼠视网膜或高糖细胞中发现, 磷酸化 eNOS 表达升高。Chen 等<sup>[20]</sup>研究表明, eNOS ser1179 位点磷酸化能提高 eNOS 对辅因子 (L-精氨酸、BH4) 的亲合力, 改善病理情况下的 eNOS 解偶联, 减少 eNOS 失活, 提示 tBHQ 具有促进或恢复 eNOS 活性的作用, 并可能由此发挥抗视网膜神经元凋亡及抗氧化应激的作用。

eNOS 的上游信号通路 PI3K/Akt 可介导人类多种疾病, 包括癌症、糖尿病、心血管疾病和神经疾

病<sup>[21-22]</sup>。既往研究表明, Akt ser473 位点被磷酸化后, 可激发 Akt 的完全酶活性, 通过抑制促凋亡蛋白(如 Bad)或抑制促凋亡信号(Foxo)实现调节作用<sup>[23]</sup>。在 DR 的发病过程中, PI3K/Akt 通路被抑制, Akt 磷酸化表达水平显著降低, 下游凋亡级联反应被激活, 引起视网膜神经元的氧化应激损伤和凋亡<sup>[24]</sup>。本研究中结果显示, 糖尿病大鼠视网膜组织和高糖培养的细胞中磷酸化 Akt 表达降低, 而 tBHQ 干预的糖尿病大鼠视网膜或高糖细胞中磷酸化 Akt 表达升高, 表明 tBHQ 可能通过促进 Akt 蛋白 ser473 位点的磷酸化, 使 Akt 活化, 发挥对 DR 中视网膜的保护作用。进一步探讨 tBHQ 的保护作用机制发现, PI3K 抑制剂组细胞中磷酸化 Akt 和磷酸化 eNOS 表达水平较 tBHQ 干预组下降, 表明 tBHQ 的促进 Akt 和 eNOS 磷酸化作用可被 PI3K 抑制剂阻断, 但其确切的机制有待进一步研究。

综上所述, 本研究结果表明 tBHQ 可能通过 PI3K 活化 Akt/eNOS 途径对早期糖尿病模型大鼠视网膜结构和功能发挥保护作用, 为 tBHQ 及其衍生制品防治 DR 视网膜损伤提供了理论依据, 对早期 DR 的防治具有重要意义。但因为视网膜结构的复杂性及细胞的多样性, 本研究中未对视网膜细胞间相互作用进行实验, 并且尚缺乏 tBHQ 通过 Akt 介导的 eNOS ser1179 磷酸化的直接证据, 有待后续的研究进一步探讨。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

**作者贡献声明** 王娟: 参与选题与实验设计、实验操作、数据整理、统计分析、论文撰写及修改; 韦芳: 参与实验设计、实验指导与实验操作; 曹阳、田敏: 参与实验选题、实验设计、实验指导; 吕红彬: 参与实验选题、实验指导、论文修改及定稿

## 参考文献

- Hendrick AM, Gibson MV, Kulshreshtha A. Diabetic retinopathy [J]. *Prim Care*, 2015, 42(3): 451-464. DOI: 10.1016/j.pop.2015.05.005.
- Antonetti DA, Barber AJ, Bronson SK, et al. Diabetic retinopathy: seeing beyond glucose-induced microvascular disease [J]. *Diabetes*, 2006, 55(9): 2401-2411. DOI: 10.2337/db05-1635.
- Srinivasan S, Sivaprasad S, Rajalakshmi R, et al. Early retinal functional alteration in relation to diabetes duration in patients with type 2 diabetes without diabetic retinopathy [J/OL]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 11422 [2022-07-26]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35794201>. DOI: 10.1038/s41598-022-15425-x.
- Gharavi N, Haggarty S, El-Kadi AO. Chemoprotective and carcinogenic effects of tert-butylhydroquinone and its metabolites [J]. *Curr Drug Metab*, 2007, 8(1): 1-7. DOI: 10.2174/138920007779315035.
- Zhu TT, Zhu CN, Qiu Y, et al. Tertiary butylhydroquinone alleviated liver steatosis and increased cell survival via  $\beta$ -arrestin-2/PI3K/AKT pathway [J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2021, 24(10): 1428-1436. DOI: 10.22038/IJBMS.2021.58156.12924.
- Li H, Kang T, Qi B, et al. Neuroprotective effects of ginseng protein on PI3K/Akt signaling pathway in the hippocampus of D-galactose/A $\beta$ 1C13 inducing rats model of Alzheimer's disease [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 179: 162-169. DOI: 10.1016/j.jep.2015.12.020.
- Huang X, Liu G, Guo J, et al. The PI3K/AKT pathway in obesity and type 2 diabetes [J]. *Int J Biol Sci*, 2018, 14(11): 1483-1496. DOI: 10.7150/ijbs.27173.
- Luo Z, Aslam S, Welch WJ, et al. Activation of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 coordinates dimethylarginine dimethylaminohydrolase/PPAR- $\gamma$ /endothelial nitric oxide synthase pathways that enhance nitric oxide generation in human glomerular endothelial cells [J]. *Hypertension*, 2015, 65(4): 896-902. DOI: 10.1161/HYPERTENSIO.NAHA.114.04760.
- Li B, Liu S, Miao L, et al. Prevention of diabetic complications by activation of Nrf2: diabetic cardiomyopathy and nephropathy [J/OL]. *Exp Diabetes Res*, 2012, 2012: 216512 [2012-08-12]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22645602>. DOI: 10.1155/2012/216512.
- 田敏, 张思远, 韩佩晏, 等. 叔丁基对苯二酚激活 Nrf2 信号通路增强对 2 型糖尿病大鼠视网膜的保护作用 [J]. *眼科新进展*, 2017, 37(3): 220-224. DOI: 10.13389/j.cnki.rao.2017.0056.
- Tian M, Zhang SY, Han PY, et al. tBHQ activates Nrf2 signaling pathways to enhance retinal protection in type 2 diabetic rats [J]. *Rec Adv Ophthalmol*, 2017, 37(3): 220-224. DOI: 10.13389/j.cnki.rao.2017.0056.
- Nishizono S, Hayami T, Ikeda I, et al. Protection against the diabetogenic effect of feeding tert-butylhydroquinone to rats prior to the administration of streptozotocin [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2000, 64(6): 1153-1158. DOI: 10.1271/bbb.64.1153.
- Neckell A. Adaptometry in diabetic patients [J]. *Oftalmologia*, 2007, 51(3): 95-97.
- Villarreal M, Ciudin A, Hernández C, et al. Neurodegeneration: an early event of diabetic retinopathy [J]. *World J Diabetes*, 2010, 1(2): 57-64. DOI: 10.4239/wjd.v1.i2.57.
- Li Q, Zemel E, Miller B, et al. Early retinal damage in experimental diabetes: electroretinographical and morphological observations [J]. *Exp Eye Res*, 2002, 74(5): 615-625. DOI: 10.1006/exer.2002.1170.
- Chesler K, Motz C, Vo H, et al. Initiation of L-DOPA treatment after detection of diabetes-induced retinal dysfunction reverses retinopathy and provides neuroprotection in rats [J/OL]. *Transl Vis Sci Technol*, 2021, 10(4): 8 [2022-07-30]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34003986>. DOI: 10.1167/tvst.10.4.8.
- Bahia PK, Pugh V, Hoyland K, et al. Neuroprotective effects of phenolic antioxidant tBHQ associate with inhibition of FoxO3a nuclear translocation and activity [J]. *J Neurochem*, 2012, 123(1): 182-191. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2012.07877.x.
- Behl T, Kaur I, Kotwani A. Implication of oxidative stress in progression of diabetic retinopathy [J]. *Surv Ophthalmol*, 2016, 61(2): 187-196. DOI: 10.1016/j.survophthal.2015.06.001.
- Othman R, Vaucher E, Couture R. Bradykinin type 1 receptor-inducible nitric oxide synthase: a new axis implicated in diabetic retinopathy [J/OL]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 300 [2021-09-12]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30983997>. DOI: 10.3389/fphar.2019.00300.
- Luo S, Lei H, Qin H, et al. Molecular mechanisms of endothelial NO synthase uncoupling [J]. *Curr Pharm Des*, 2014, 20(22): 3548-3553. DOI: 10.2174/13816128113196660746.
- Chen Y, Jiang B, Zhuang Y, et al. Differential effects of heat shock protein 90 and serine 1179 phosphorylation on endothelial nitric oxide synthase activity and on its cofactors [J/OL]. *PLoS One*, 2017, 12(6): e0179978 [2017-10-16]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28654706>. DOI: 10.1371/journal.pone.0179978.
- Yang HH, Chen Y, Gao CY, et al. Protective effects of microRNA-126 on human cardiac microvascular endothelial cells against hypoxia/reoxygenation-induced injury and inflammatory response by activating PI3K/Akt/eNOS signaling pathway [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 42(2): 506-518. DOI: 10.1159/000477597.
- Graupera M, Potente M. Regulation of angiogenesis by PI3K signaling networks [J]. *Exp Cell Res*, 2013, 319(9): 1348-1355. DOI: 10.1016/j.yexcr.2013.02.021.
- Wei Y, Zhou J, Yu H, et al. AKT phosphorylation sites of Ser473 and Thr308 regulate AKT degradation [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2019, 83(3): 429-435. DOI: 10.1080/09168451.2018.1549974.
- Yang X, Huo F, Liu B, et al. Crocin inhibits oxidative stress and pro-inflammatory response of microglial cells associated with diabetic retinopathy through the activation of PI3K/Akt signaling pathway [J]. *J Mol Neurosci*, 2017, 61(4): 581-589. DOI: 10.1007/s12031-017-0899-8.

(收稿日期: 2021-11-04 修回日期: 2022-08-01)

(本文编辑: 张宇 骆世平)

