

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.02.006

白藜芦醇对糖尿病大鼠视网膜 Muller 细胞凋亡的 防护作用及分子机制研究*

曾凯宏^{1,2}, 王元¹, 邓波¹, 余雪梅¹, 宋怡¹, 周雪¹, 黄璐娇¹

(1. 四川省医学科学院·四川省人民医院临床营养科, 成都 610072; 2. 电子科技大学医学院, 成都 610054)

[摘要] **目的** 视网膜 Muller 细胞凋亡发生在糖尿病视网膜病变(DR)早期, 探讨白藜芦醇在 DR 早期 Muller 凋亡中的重要意义。**方法** 5、10 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 白藜芦醇喂养健康和糖尿病大鼠 1~7 个月取材, 使用 TUNEL 检测 Muller 细胞凋亡, 免疫荧光检测转录因子特异性蛋白 1(SP1) 细胞定位, qRT-PCR 检测 miR-29b 和 SP1 基因表达, Western blot 检测 SP1 蛋白表达。**结果** 糖尿病 1、3、5 和 7 个月大鼠视网膜中均检测到 TUNEL 阳性细胞, 白藜芦醇干预能有效抑制糖尿病引起的大鼠视网膜内核层(INL) Muller 细胞凋亡($P < 0.01$)。与年龄相匹配的健康对照大鼠相比, 糖尿病大鼠视网膜中 miR-29b 的表达显著降低, SP1 表达显著增高($P < 0.01$), 糖尿病引起的 miR-29b 表达下调和 SP1 表达上调均能被白藜芦醇干预抑制($P < 0.05$)。**结论** 白藜芦醇是一个潜在的治疗 DR 的选择, miR-29b/SP1 信号通路在白藜芦醇的抗凋亡机制中起重要作用。

[关键词] 白藜芦醇; 糖尿病视网膜病变; Muller 细胞; 细胞凋亡; 微小 RNA-29b; 特异性蛋白 1

[中图分类号] R151.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2019)02-0202-05

Protective effects of resveratrol on apoptosis of Muller cells in rats with diabetic retinopathy and its molecular mechanisms*

ZENG Kaihong^{1,2}, WANG Yuan¹, DENG Bo¹, YU Xuemei¹, SONG Yi¹, ZHOU Xue¹, HUANG Lujiao¹

(1. Department of Clinical Nutrition, Sichuan Academy of Medical Sciences & Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu, Sichuan 610072, China; 2. School of Medicine, University of Electronic Science and Technology of China, Chengdu, Sichuan 610054, China)

[Abstract] **Objective** To evaluate the antiapoptosis effects of resveratrol on retinal Muller cells in rats with diabetic retinopathy (DR). **Methods** Retina was obtained from normal and diabetic rats with resveratrol (5, 10 mg·kg⁻¹·d⁻¹) treatments for 1—7 months. TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) was used to detect apoptosis. Immunofluorescence was used to assess the distribution of transcription specificity protein 1 (SP1) in retina. MiR-29b and SP1 mRNA expressions was evaluated by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). SP1 protein expression was evaluated by Western blot. **Results** TUNEL-positive cells can be dedected in the inner nuclear layer (INL) retina of 1-, 3-, 5-, 7- month diabetic rats and resveratrol administration effectively suppressed streptozotocin (STZ)-induced apoptosis of Muller cells in INL ($P < 0.01$). As compared with normal rats, miR-29b expression in diabetic rats retina decreased, and the SP1 expression significantly increased ($P < 0.01$). Furthermore, diabetes-induced down-regulated expression of miR-29b and up-regulated expression of SP1 could be rescued by resveratrol ($P < 0.05$). **Conclusion** Resveratrol is a potential therapeutic option for DR and miR-29b/SP1 pathway play roles in the anti-apoptosis mechanism of resveratrol.

[Key words] resveratrol; diabetic retinopathy; Muller cells; apoptosis; microRNA-29b; specificity protein 1

本课题组前期研究结果表明, 在糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)早期视网膜微血管病变之前即可检测到视网膜 Muller 细胞凋亡^[1-3]。SILVA 等^[4]研究 DR 早期神经细胞微小 RNA(miRNA, miR)表达时发现, miR-29b 在 DR 早期视网膜 Muller 细胞凋亡中起重要作用。miR-29b 通过转录因子特

异蛋白 1(SP1)参与 DR 早期视网膜 Muller 细胞凋亡。白藜芦醇是非黄酮类多酚化合物, 近年发现白藜芦醇对 DR 有防护效应, 白藜芦醇可改善 C57BL/6 DR 小鼠视网膜血管渗漏、微血管周细胞丢失及上调表皮生长因子受体(VEGF)表达^[5-7], 证实白藜芦醇对 DR 晚期视网膜微血管病变有防护作用。最近, 白藜

芦醇经 miR 通路起作用的机制已被关注。本研究通过建立糖尿病大鼠动物模型,研究白藜芦醇对糖尿病早期大鼠视网膜 Muller 细胞凋亡及视网膜组织中 miR-29b 和 SP1 表达的影响,为指导人们通过膳食途径防治 DR 提供科学依据,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物 清洁级成年 Sprague-Dawley (SD) 大鼠购于四川省医学科学院·四川省人民医院实验动物研究所。

1.2 试剂 白藜芦醇纯品、链脲佐菌素 (STZ) 购于美国 Sigma 公司。

1.3 方法

1.3.1 糖尿病动物模型建立及实验分组 实验前大鼠禁食 12 h,用 STZ 诱导建立糖尿病大鼠动物模型,临用前用 0.1 mol/L (pH 4.2) 的柠檬酸缓冲液配制成 2% STZ 溶液,按 60 mg/kg 一次性左下腹腔注射,注射后 72 h 检测定性尿糖和血糖,用尿糖试纸测尿糖达(+++)以上,尾静脉采血测血糖浓度大于 16.7 mmol/L 即为模型建立成功。将糖尿病大鼠分为 3 组:糖尿病未治疗组,低剂量(5 mg · kg⁻¹ · d⁻¹)白藜芦醇干预糖尿病组,高剂量(10 mg · kg⁻¹ · d⁻¹)白藜芦醇干预糖尿病组。健康大鼠也分为 3 组:健康对照组,低剂量(5 mg · kg⁻¹ · d⁻¹)白藜芦醇干预健康对照组,高剂量(10 mg · kg⁻¹ · d⁻¹)白藜芦醇干预健康对照组,每组大鼠 68 只。所有大鼠在整个实验时间内都可以自由获取食物和水。每天监测大鼠情况,每周从尾静脉抽取血液,通过标准实验室方法测定血浆葡萄糖和果糖胺水平。

1.3.2 TUNEL 染色联合免疫荧光标记 摘眼球后立即在 4%多聚甲醛中固定 2 h。去除角膜和晶状体,将剩余的眼杯置于相同的固定剂中 4 h。使用试剂盒 (TdT-FragEL DNA Fragmentation Detection Kit; Oncogene, Boston, MA) 在 7 μm 视网膜切片上进行 TUNEL 染色,然后用 20 μg/mL 蛋白酶 K 孵育,用 TdT/dUTP 反应混合物在 37 °C 孵育 1 h 进行 DNA 片段标记,然后使用 PBS 洗 3 次。用含有 5% 正常山羊血清的封闭缓冲液封闭 1 h。将切片在封闭缓冲液中与兔抗大鼠 SP1 抗体(1 : 1 000,美国 Sigma 公司)一起孵育 1 h。在避光、室温条件下孵二抗(1 : 200,美国 Chemicon International 公司)40 min。进一步冲洗后,用盖玻片覆盖切片。通过将切片暴露于 DNA 酶中进行 DNA 断裂的阳性对照实验,阴性对照省略了 TdT/dUTP 标记混合物,导致无染色。在 Olympus 共激光共聚焦扫描显微镜中观察切片。计数视网膜内核层(INL)中 TUNEL 阳性细胞数。使用 OpenLab 软件测量 INL 的面积。

1.3.3 实时荧光定量 PCR 法 (qRT-PCR) 分析 qRT-PCR 检测 miR-29b 和 SP1 基因表达,分别设计

miR-29b 和 SP1 基因引物及 TaqMan 荧光探针(由大连宝生物公司合成)。引物序列为:miR-29b 正向引物 5'-CGT AGC ACC ATT TGA AAT CAG TGT T-3',反向引物 5'-GTG CAG GGT CCG AGG T-3'; SP1 正向引物 5'-AGG TGC ACC AGC TTC CAG GCC TG-3',反向引物 5'-CCA GGT CCA TGA AGG CCA AGT TG-3'; RPL13A 正向引物 5'-AAG CCT ACA AGA AAG TTT GCC TAT C-3',反向引物 5'-TGT TTC CGT AGC CTC ATG AGC-3'。用常规酚/氯仿法提取大鼠视网膜微血管周细胞(RMPs)的 mRNA,进行 qPCR 反应,反应体系 25 μL:2 × TaqMan University PCR 混合液 12.5 μL,10 μmol/L 正、反向引物各 0.5 μL,10 μmol/L TaqMan 探针 0.3 μL,100 ng/μL DNA 0.2 μL,同时设立内对照 RPL13A 基因,反应在 ABI Prism 7000 荧光定量 PCR 仪上进行。反应条件为:93 °C 2 min;93 °C 1 min,55 °C 1 min,共 40 个循环。采用低循环数(Ct)比较法计算目的基因的相对拷贝数与表达水平。

1.3.4 Western blot 分析 提取总蛋白,使用 Bradford 方法(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)测定蛋白质浓度。将蛋白(60 μg)在 10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)上分离,然后电泳转移到硝酸纤维素膜(Bio-Rad, USA)。通过将膜与 5%脱脂奶在三乙醇胺缓冲盐溶液(TBS)加 0.1%吐温(TBST)中孵育 60 min 来阻断非特异性位点。然后分别用以下一抗 SP1(1 : 1 000,美国 Sigma 公司)、GAPDH(1 : 2 000,美国 Sigma 公司),4 °C 孵育过夜。洗涤后,将膜与辣根过氧化物酶(HRP)共轭二抗一同孵育 60 min。使用 Bandleader 3.0 软件通过光密度测定分析相对表达水平。然后将每个蛋白的光密度读数计算用于归一化的 GAPDH 强度读数的比率。

1.4 统计学处理 采用 SPSS20.0 软件进行数据分析,正态分布的计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用方差分析;非正态分布、方差不齐的计量资料用中位数(四分位间距)表示;计数资料用频数或百分比表示,组间比较采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

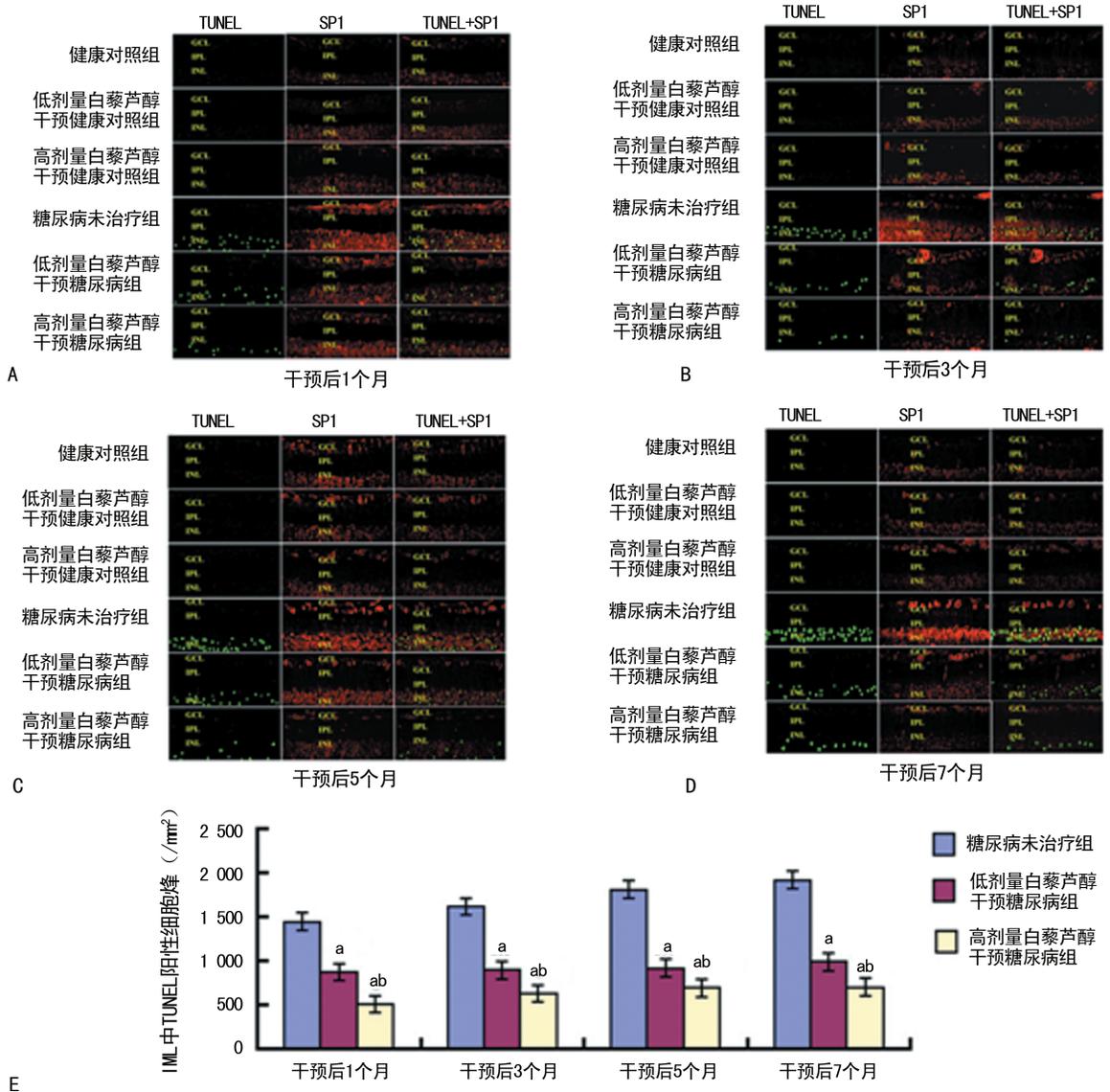
2 结果

2.1 白藜芦醇对糖尿病大鼠血浆葡萄糖和果糖胺水平的影响 糖尿病大鼠血浆葡萄糖和果糖胺水平与年龄匹配的健康对照组大鼠相比均显著升高($P < 0.05$);在所有时间点,白藜芦醇(5、10 mg · kg⁻¹ · d⁻¹)处理的糖尿病大鼠血浆葡萄糖和果糖胺水平均显著低于糖尿病未治疗组大鼠($P < 0.05$);而经白藜芦醇(5、10 mg · kg⁻¹ · d⁻¹)处理的健康大鼠的血浆葡萄糖和果糖胺水平较健康对照组大鼠未发生明显改变($P > 0.05$),见表 1、2。

表 1 白藜芦醇对糖尿病大鼠血浆葡萄糖水平的影响($\bar{x}\pm s$,mmol/L)

组别	干预后 1 个月	干预后 3 个月	干预后 5 个月	干预后 7 个月
健康对照组	4.41±0.22	4.51±0.32	4.41±0.32	4.32±0.23
低剂量白藜芦醇干预健康对照组	4.52±0.21	4.33±0.33	4.33±0.12	4.23±0.12
高剂量白藜芦醇干预健康对照组	4.31±0.12	4.42±0.21	4.41±0.22	4.31±0.22
糖尿病未治疗组	24.61±0.31 ^a	22.53±0.22 ^a	24.33±0.22 ^a	27.21±0.52 ^a
低剂量白藜芦醇干预糖尿病组	11.22±0.24 ^{ab}	12.22±0.23 ^{ab}	11.52±0.31 ^{ab}	16.33±0.42 ^{ab}
高剂量白藜芦醇干预糖尿病组	10.31±0.32 ^{ab}	13.62±0.43 ^{ab}	13.32±0.11 ^{ab}	15.91±0.42 ^{ab}

^a: $P < 0.05$, 与健康对照组比较; ^b: $P < 0.05$, 与糖尿病未治疗组比较



A~D: 干预后 1、3、5、7 个月后 TUNEL 染色联合 SP1 免疫荧光染色图; E: 视网膜 INL 中 TUNEL 阳性细胞计数结果; ^a: $P < 0.01$, 与糖尿病未治疗组比较; ^b: $P < 0.05$, 与低剂量白藜芦醇干预糖尿病组比较

图 1 白藜芦醇对 DR 大鼠细胞凋亡及 SP1 分布改变的影响

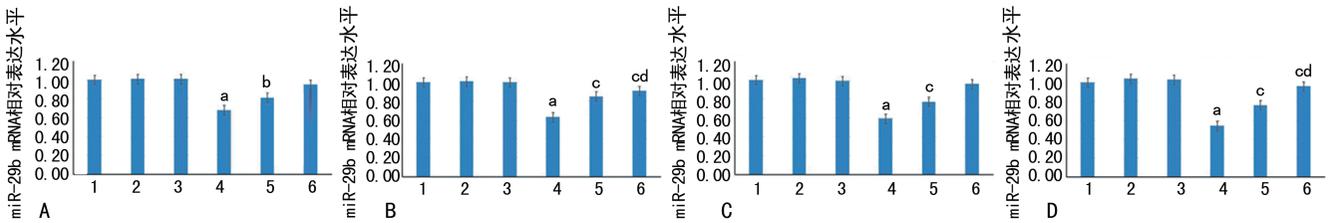
2.2 白藜芦醇对糖尿病大鼠视网膜细胞凋亡的影响 在 STZ 诱导和白藜芦醇治疗后的 1、3、5 和 7 个月时, 糖尿病未治疗组和低、高剂量白藜芦醇 ($5、10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) 干预组大鼠视网膜中均可观察到 TUNEL 阳性信号, TUNEL 阳性信号主要位于视网膜的 INL。而在健康对照组和低、高剂量白藜芦醇干预健康对照组大鼠视网膜中均未观察到 TUNEL 阳

性信号。与糖尿病未治疗组相比, 低、高剂量白藜芦醇 ($5、10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) 干预糖尿病组大鼠视网膜 INL 中 TUNEL 阳性细胞数量显著降低 ($P < 0.01$)。在研究的 4 个时间点, 高剂量白藜芦醇干预糖尿病组与低剂量白藜芦醇干预糖尿病组比较, INL 中 TUNEL 阳性细胞的数量显著降低 ($P < 0.05$), 见图 1。

表 2 白藜芦醇对糖尿病大鼠血浆果糖胺水平的影响($\bar{x} \pm s, \text{mmol/L}$)

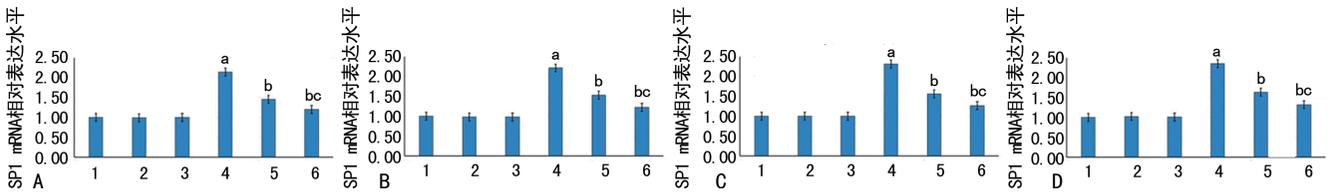
组别	干预后 1 个月	干预后 3 个月	干预后 5 个月	干预后 7 个月
健康对照组	0.62±0.04	0.52±0.06	0.65±0.04	0.65±0.03
低剂量白藜芦醇干预健康对照组	0.68±0.03	0.66±0.05	0.67±0.04	0.63±0.03
高剂量白藜芦醇干预健康对照组	0.65±0.04	0.56±0.04	0.63±0.01	0.69±0.02
糖尿病未治疗组	3.15±0.04 ^a	3.78±0.07 ^a	3.55±0.05 ^a	3.75±0.05 ^a
低剂量白藜芦醇干预糖尿病组	2.01±0.06 ^{ab}	2.51±0.04 ^{ab}	2.07±0.05 ^{ab}	2.44±0.05 ^{ab}
高剂量白藜芦醇干预糖尿病组	1.95±0.05 ^{ab}	2.05±0.04 ^{ab}	1.84±0.07 ^{ab}	1.77±0.08 ^{ab}

^a: $P < 0.05$, 与健康对照组比较; ^b: $P < 0.05$, 与糖尿病未治疗组比较



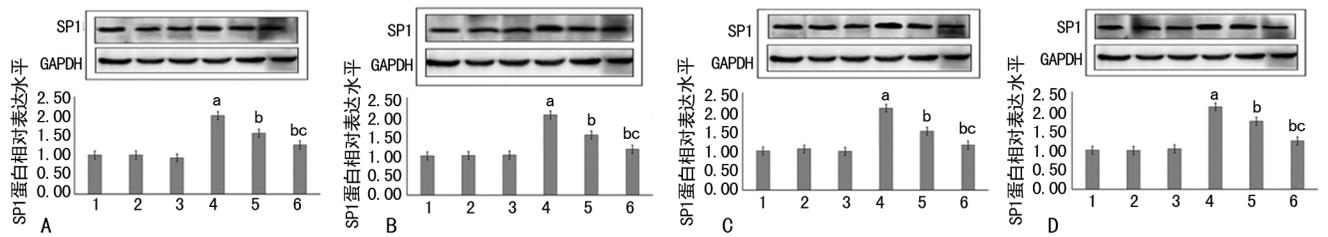
A: 干预后 1 个月; B: 干预后 3 个月; C: 干预后 5 个月; D: 干预后 7 个月; ^a: $P < 0.01$, 与正常对照组比较; ^b: $P < 0.05$, ^c: $P < 0.01$, 与糖尿病未治疗组比较; ^d: $P < 0.05$, 与低剂量白藜芦醇干预糖尿病组比较; 1: 健康对照组; 2: 低剂量白藜芦醇干预健康对照组; 3: 高剂量白藜芦醇干预健康对照组; 4: 糖尿病未治疗组; 5: 低剂量白藜芦醇干预糖尿病组; 6: 高剂量白藜芦醇干预糖尿病组

图 2 白藜芦醇对 DR 大鼠 miR-29b 表达的影响



A: 干预后 1 个月; B: 干预后 3 个月; C: 干预后 5 个月; D: 干预后 7 个月; ^a: $P < 0.01$, 与正常对照组比较; ^b: $P < 0.01$, 与糖尿病未治疗组比较; ^c: $P < 0.05$, 与低剂量白藜芦醇干预糖尿病组比较; 1: 健康对照组; 2: 低剂量白藜芦醇干预健康对照组; 3: 高剂量白藜芦醇干预健康对照组; 4: 糖尿病未治疗组; 5: 低剂量白藜芦醇干预糖尿病组; 6: 高剂量白藜芦醇干预糖尿病组

图 3 白藜芦醇对 DR 大鼠 SP1 mRNA 表达的影响



A: 干预后 1 个月; B: 干预后 3 个月; C: 干预后 5 个月; D: 干预后 7 个月; ^a: $P < 0.01$, 与正常对照组比较; ^b: $P < 0.01$, 与糖尿病未治疗组比较; ^c: $P < 0.05$, 与低剂量白藜芦醇干预糖尿病组比较; 1: 健康对照组; 2: 低剂量白藜芦醇干预健康对照组; 3: 高剂量白藜芦醇干预健康对照组; 4: 糖尿病未治疗组; 5: 低剂量白藜芦醇干预糖尿病组; 6: 高剂量白藜芦醇干预糖尿病组

图 4 白藜芦醇对 DR 大鼠 SP1 蛋白表达改变的影响

2.3 白藜芦醇对糖尿病大鼠视网膜中 miR-29b 表达的影响

在干预后 1、3、5 和 7 个月,与健康对照组大鼠比较,糖尿病未治疗组大鼠视网膜中 miR-29b 的表达显著降低 ($P < 0.01$)。与未治疗糖尿病组比较,4 个时间点的低、高剂量白藜芦醇干预糖尿病组 miR-29b 表达均上调至少 1.2 倍 ($P < 0.05$)。在 4 个研究时间点,高剂量白藜芦醇干预糖尿病组的 miR-29b 表达水平平均高于低剂量白藜芦醇干预糖尿病组 ($P < 0.05$);健康对照组大鼠视网膜中的 miR-29b 表达未被白藜芦醇干预改变 ($P > 0.05$),见图 2。

2.4 白藜芦醇对糖尿病大鼠视网膜中 SP1 表达的影响

在干预 1、3、5 和 7 个月,与健康对照比较,糖尿病视网膜中 SP1 mRNA 表达分别增加 2.1、2.2、2.3 和 2.3 倍 ($P < 0.01$);SP1 蛋白表达分别增加 2.0、2.1、2.1 和 2.1 倍 ($P < 0.01$)。与未治疗糖尿病组比较,4 个时间点的低、高剂量白藜芦醇干预糖尿病组 SP1 mRNA 和蛋白表达均明显降低 ($P < 0.01$)。在 4 个时间点,高剂量白藜芦醇干预糖尿病组的 SP1 mRNA 及蛋白表达水平均低于低剂量白藜芦醇干预糖尿病组 ($P < 0.01$)。健康对照组大鼠视网膜中的 SP1

表达未被低、高剂量白藜芦醇干预改变($P>0.05$),见图 3、4。

3 讨 论

糖尿病发展成 DR 是一个缓慢的过程,一般需要 5~6 年的时间。糖尿病明确诊断、眼底出现改变之前的阶段被称作 DR 的临床前期。研究发现,DR 的临床前期是先有视网膜组织代谢的损害,然后才是组织学或检眼镜下可见的血管异常。研究认为,视网膜神经元和神经胶质细胞功能异常出现最早。Muller 细胞是视网膜的主要神经胶质细胞。Muller 细胞的功能是维持视网膜的稳态和完整性。以往研究还发现,miR-29b 的下调可能是 DR 诱导视网膜神经损伤的主要因素^[7]。本研究中,笔者在 STZ 注射后的 4 个时间点都观察到了视网膜 miR-29b 的下调表达。

目前国内外关于 DR 防护的研究不胜枚举,多数研究证明,高级糖基化终产物抑制剂、蛋白激酶 C 抑制剂、肾素-血管紧张素系统抑制剂及一些抗氧化剂等对 DR 有防护效应,但对 DR 早期视网膜损伤防护效果不明显^[4-6]。白藜芦醇具有很多生物学效应,例如抗氧化、抗炎、抗癌、抗凝血和心脏保护作用^[8-12]。迄今为止,已有大量研究证实白藜芦醇对糖尿病和 DR 有保护效应^[13-16],但白藜芦醇对 DR 早期视网膜 Muller 细胞损伤的作用如何尚未见报道。在本研究中,笔者观察了白藜芦醇抗 DR 诱导的视网膜 Muller 细胞凋亡作用,结果表明,采用白藜芦醇可有效抑制糖尿病大鼠血浆葡萄糖和果糖胺水平的升高,白藜芦醇可有效地抑制体内 STZ 诱导的 INL 中视网膜 Muller 细胞胞体所在层的细胞凋亡。此外,本研究表明,糖尿病诱导的 miR-29b 下调和 SP1 上调可被白藜芦醇抑制。这些发现表明白藜芦醇是 DR 的潜在治疗选择,miR-29b/SP1 途径可能在白藜芦醇的抗凋亡机制中发挥作用。

参考文献

[1] ZENG K, YANG N, WANG D, et al. Resveratrol prevents retinal dysfunction by regulating glutamate transporters, glutamine synthetase expression and activity in diabetic retina[J]. *Neurochem Res*, 2016, 41(5):1050-1064.

[2] ZENG K, MING J, YANG N, et al. Taurine prevents high glucose-induced angiotensin-2/tie-2 system alterations and apoptosis in retinal microvascular pericytes[J]. *Mol Cell Biochem*, 2014, 396(1/2):239-248.

[3] ZENG K, XU H, CHEN K, et al. Effects of taurine on

glutamate uptake and degradation in Müller cells under diabetic conditions via antioxidant mechanism [J]. *Mol Cell Neurosci*, 2010, 45(2):192-199.

- [4] SILVA V A, POLESSKAYA A, SOUSA T A, et al. Expression and cellular localization of microRNA-29b and RAX, an activator of the RNA-dependent protein kinase (PKR), in the retina of streptozotocin-induced diabetic rats[J]. *Mol Vis*, 2011, 17:2228-2240.
- [5] GOUTHAM G, MANIKANDAN R, BEULAJA M, et al. A focus on resveratrol and ocular problems, especially cataract: from chemistry to medical uses and clinical relevance [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 86:232-241.
- [6] SOUFI F G, ARBABI-AVAL E, KANA VI M R, et al. Anti-inflammatory properties of resveratrol in the retinas of type 2 diabetic rats[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2015, 42(1):63-68.
- [7] BOLA C, BARTLETT H, EPERJESI F. Resveratrol and the eye: activity and molecular mechanisms [J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2014, 252(5):699-713.
- [8] 李先宽, 李赫宇, 李帅, 等. 白藜芦醇研究进展 [J]. *中草药*, 2016, 47(14):2568-2578.
- [9] 安梅, 周瑾, 陈晓宇. 白藜芦醇药理学作用的研究进展 [J]. *肿瘤药学*, 2014, 4(4):242-246.
- [10] 董雯, 王蓉. 白藜芦醇诱导细胞自噬在神经退行性疾病进展中的作用 [J]. *药学报*, 2016, 51(1):18-22.
- [11] NAKATA R, TAKAHASHI S, INOUE H. Recent advances in the study on resveratrol [J]. *Biol Pharm Bull*, 2012, 35(3):273-279.
- [12] TENNEN R I, MICHISHITA-KIOI E, CHUA K F. Finding a target for resveratrol [J]. *Cell*, 2012, 148(3):387-389.
- [13] SZKUDELSKI T, SZKUDELSKA K. Anti-diabetic effects of resveratrol [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2011, 1215:34-39.
- [14] KU C R, LEE H J, KIM S K, et al. Resveratrol prevents streptozotocin-induced diabetes by inhibiting the apoptosis of pancreatic β -cell and the cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase [J]. *Endocr*, 2012, 59(2):103-109.
- [15] ABBATE M, CRAVEDI P, ILIEV I, et al. Prevention and treatment of diabetic retinopathy: evidence from clinical trials and perspectives [J]. *Curr Diabetes Rev*, 2011, 7(3):190-200.
- [16] ZHU Y, ZHANG X L, ZHU B F, et al. Effect of antioxidant N-acetylcysteine on diabetic retinopathy and expression of VEGF and ICAM-1 from retinal blood vessels of diabetic rats [J]. *Mol Biol Rep*, 2012, 39(4):3727-3735.