

引文格式:余曦,田敏,何薇,胡萍,吕红彬.叔丁基对苯二酚对糖尿病大鼠视网膜的保护作用及其机制研究[J].眼科新进展,2018,38(8):719-723. doi:10.13389/j.cnki.rao.2018.0169

【实验研究】

# 叔丁基对苯二酚对糖尿病大鼠视网膜的保护作用及其机制研究<sup>△</sup>

余曦 田敏 何薇 胡萍 吕红彬

作者简介:余曦,女,1991年11月出生,四川泸州人,2015级硕士研究生。研究方向:眼底病。联系电话:15386589201; E-mail: yuxihappy@foxmail.com; ORCID: 0000-0003-0921-9028

About YU Xi: Female, born in November, 1991. Postgraduate student. Tel: 15386589201; E-mail: yuxihappy@foxmail.com; ORCID: 0000-0003-0921-9028

收稿日期:2018-01-30  
修回日期:2018-03-28  
本文编辑:盛丽娜

△基金项目:四川省应用基础研究项目(编号:14JC0172)

作者单位:646000 四川省泸州市,西南医科大学附属医院眼科

通讯作者:吕红彬, E-mail: oculistlvhongbin@163.com; ORCID: 0000-0002-5414-593X

Received date: Jan 30, 2018  
Accepted date: Mar 28, 2018

Foundation item: Supported by the Applied Basic Research Projects of Sichuan Province(No:14JC0172)

From the Department of Ophthalmology, the Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan Province, China

Responsible author: LV Hong-Bin, E-mail: oculistlvhongbin@163.com; ORCID: 0000-0002-5414-593X

mir-551b-3p

## Protective effects of tert-butylhydroquinone on the retina of diabetic rats and its mechanisms

YU Xi, TIAN Min, HE Wei, HU Ping, LV Hong-Bin

**[Abstract] Objective** To investigate the protective effect and mechanism of tert-butylhydroquinone (tBHQ) on the retina of diabetic rats and provide new targets for prevention of DR. **Methods** Totally 18 male SD rats were randomly divided into three groups: normal group, diabetic group (high-glucose-high-fat diet) and tBHQ intervention group (addition of mass fraction of 1% tBHQ to a high-glucose-high-fat diet). After dietary intervention for 4 weeks of the last two groups, diabetic rat models were established. Rats in each group were sacrificed after 3 months of dietary intervention. The rats were sacrificed to collect the fasting blood for measuring the biochemical and insulin-related indicators. HE staining was used to observe the pathological changes of retinal tissue. The miRNA expression profile microarray was used to measure the differential miRNAs of rat retinas. The expression levels of specific miRNAs in the three groups of rat retinas were verified by PCR. The relevant pathways of differential miRNAs were analyzed. **Results** The fasting blood glucose in the tBHQ intervention group [ $(15.073 \pm 7.079) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ] was higher than that in the normal group [ $(7.635 \pm 1.421) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ], which was lower than that in the diabetic group [ $(22.331 \pm 1.824) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ] (both  $P < 0.05$ ). The serum insulin in the tBHQ intervention group [ $(47.961 \pm 15.256) \mu\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$ ] was lower than that in the normal group [ $(78.090 \pm 20.974) \mu\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$ ], but it was higher than that in the diabetic group [ $(17.533 \pm 3.959) \mu\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$ ] (both  $P < 0.01$ ). Severe retinal edema appeared in the retina of the diabetic group, and the structural layer was unclear based on HE staining. The pathological changes of the retina in the tBHQ intervention group were slight. Compared with diabetic rats, miR-325-3p and miR-551b-3p were up-regulated ( $> 1.5$ -fold) and miR-652-3p was down-regulated ( $> 2.0$ -fold) in the tBHQ group. MiR-325-3p and miR-551b-3p were identified as differential miRNAs after PCR verification. By combining the results of the microarray experiments, we found that 21 pathways might be subject to miR-325-3p regulation from tBHQ treatment. **Conclusion** tBHQ has protective effects on diabetic retina through miR-325-3p and its mediated signaling pathways.

**[Key words]** diabetic retinopathy; tert-butylhydroquinone; microrna; mir-325-3p;

**【摘要】 目的** 探讨叔丁基对苯二酚(tert-Butylhydroquinone, tBHQ)对糖尿病大鼠视网膜的保护作用及其机制,为DR防治提供新靶点。**方法** 18只雄性SD大鼠随机分成3组:正常组、糖尿病组(高脂高糖饮食)和tBHQ干预组(高脂高糖饮食中加入质量分数1% tBHQ),后两组饮食干预4周后建立糖尿病大鼠模型,饮食干预3个月后将各组大鼠处死。采集大鼠空腹血用于测定生化和胰岛素相关指标,HE染色观察大鼠视网膜各层组织变化,使用miRNA表达谱芯片测量大鼠视网膜差异性miRNA,实时定量PCR验证特定miRNA在3组大鼠视网膜的表达水平,分析差异性miRNA的相关通路。**结果** tBHQ干预组 $(15.073 \pm 7.079) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 较正常组 $(7.635 \pm 1.421) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 空腹血糖升高( $P < 0.05$ ),较糖尿病组 $(22.331 \pm 1.824) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 降低( $P < 0.05$ )。tBHQ干预组 $(47.961 \pm 15.256) \mu\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$ 血清胰岛素较正常组 $(78.090 \pm 20.974) \mu\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$ 减少,而较糖尿病组 $(17.533 \pm 3.959) \mu\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$ 增多(均为 $P < 0.01$ )。HE染色结果示,糖尿病组大鼠视网膜出现严重水肿,各层结构不清,tBHQ干预组视网膜改变相对轻微。与糖尿病组大鼠相比,tBHQ干预组视网膜中miR-325-3p( $> 2.0$ 倍)和miR-551b-3p( $> 1.5$ 倍)上调,miR-652-3p( $> 2.0$ 倍)下调。实时定量PCR验证miR-325-3p和miR-551b-3p为差异性miRNA,靶基因预测分析示miR-325-3p可介导21条信号通路。**结论** tBHQ可能通过miR-325-3p介导的信号通路对2型糖尿病大鼠视网膜起保护作用。

**【关键词】** 糖尿病视网膜病变;叔丁基对苯二酚;miRNA;miR-325-3p;miR-551b-3p

**【中图分类号】** R774.1

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是糖尿病常见的微血管并发症,也是工作年龄人群失明的主要原因<sup>[1]</sup>。叔丁基对苯二酚(*tert*-Butylhydroquinone, tBHQ)是一种高效的酚类抗氧化剂,较多研究<sup>[2-4]</sup>发现,tBHQ通过Nrf2/ARE途径对体内多种细胞起保护作用。本课题组前期研究表明,tBHQ在2型糖尿病大鼠视网膜中可诱导血红素氧合酶-1的表达并抑制血管内皮生长因子的表达<sup>[5]</sup>。然而,tBHQ对糖尿病患者视网膜的确切保护机制尚不完全清楚。miRNA一般长20~22个核苷酸,其通过与靶mRNA的3'非翻译区结合来调节基因表达,引起mRNA降解和(或)翻译抑制。miRNA在同一生物的不同组织、不同发展阶段表达水平均具有显著差异,这种表达模式具有分化性和时效性,能特异性调控生物进程。本研究拟采用tBHQ干预2型糖尿病大鼠模型,探讨tBHQ对2型糖尿病大鼠视网膜的保护作用,寻求tBHQ的潜在保护机制,为DR的防治提供新的靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

**1.1.1 实验动物** 6~8周龄体质量100~200 g的雄性Sprague Dawley大鼠18只,购自西南医科大学实验动物中心。大鼠在(18±2)℃的环境下喂养,节律光照(12 h光照,12 h黑暗),自由摄取食物和水。

**1.1.2 主要仪器与试剂** 链脲佐菌素(streptozotocin, STZ;美国Sigma),血糖仪(德国Roche Diagnostics),tBHQ(上海阿拉丁),RNAstore液(中国天根),Trizol液(加拿大Invitrogen),Rneasy Mini试剂盒(德国QIAGEN),M-MLV逆转录酶(美国Epicentre),7180型Hitachi自动生化检测仪(日本Yokohama),碘[<sup>125</sup>I]胰岛素放射免疫分析试剂盒(北京北方生物技术研究所),BX 53显微镜(日本Olympus),ND-1000分光光度计(美国Thermo公司)。

1.2 方法

**1.2.1 实验分组及处理** 适应性喂养1周后,将大鼠随机分为正常组、糖尿病组和tBHQ干预组,每组各6只。正常组大鼠喂养标准饲料,糖尿病组给予高脂高糖饮食,tBHQ干预组在高脂高糖饮食中补充质量分数1% tBHQ。糖尿病组和tBHQ干预组使用高脂高糖饮食联合小剂量STZ建立糖尿病模型<sup>[6]</sup>。高脂高糖饮食由质量分数22%脂肪、质量分数48%碳水化合物和质量分数20%蛋白质组成;饮食干预4周后,糖尿病组和tBHQ干预组大鼠腹腔注射STZ 30 mg·kg<sup>-1</sup>(STZ溶于0.1 mmol·L<sup>-1</sup>、pH 4.4的柠檬酸钠缓冲液中),同时正常组大鼠腹腔注射同等剂量柠檬酸盐缓冲液(pH=4.4)。在STZ注射后第7天通过血糖仪评估血糖水平。如果葡萄糖浓度超过16.6 mmol·L<sup>-1</sup>,则认为造模成功。

**1.2.2 取材** 饮食干预3个月后,各组大鼠禁饮禁

食过夜,戊巴比妥钠(50 mg·kg<sup>-1</sup>)腹腔注射麻醉,心脏穿刺采集血液样品2管,每管3~4 mL,以4000 r·min<sup>-1</sup>离心10 min后收集血清,一管置-80℃冰箱保存用于胰岛素测定,另一管行生化检测。摘除大鼠眼球,钝性分离大鼠一侧眼视网膜立即浸入RNAstore溶液,4℃过夜后储存于-80℃冰箱,用于miRNA的检测;另一眼使用19 G穿刺刀穿刺前房后,置于40 g·L<sup>-1</sup>多聚甲醛溶液中4℃放置24 h后用于HE染色。

**1.2.3 生化和胰岛素测量** 使用Hitachi自动生化检测仪7180测量血清总胆固醇、甘油三酯、高密度脂蛋白胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇和空腹血糖。按照碘[<sup>125</sup>I]胰岛素放射免疫分析试剂盒说明书测定空腹血清胰岛素。

**1.2.4 HE染色** 将眼球固定、脱水并包埋于液体石蜡中,连续切片,切片厚度为4.0 μm,常规HE染色,显微镜下观察视网膜结构并采集图像。

**1.2.5 筛选差异性miRNA** 使用TRIzol分离总RNA,根据说明书用Rneasy Mini试剂盒纯化,使用分光光度计测量RNA质量和数量,凝胶电泳测定RNA完整性。按照上海康成生物工程有限公司miRNA微阵列芯片分析,根据Exiqon手册完成RNA标记和阵列杂交。用GenePix Pro 6.0软件读取芯片扫描图像,提取出每一个探针的信号值。相同的探针取平均值作为研究数据。使用倍数变化和P值筛选两组样品间的差异表达miRNA。

**1.2.6 实时定量PCR(qRT-PCR)** 将筛选出的差异性miRNA使用M-MLV逆转录酶逆转录成cDNA。设计具有茎环结构的逆转录酶引物用于miRNA的聚合酶链式反应,U6 RNA作为内参(表1)。使用比较阈值循环方法(2<sup>-ΔΔCt</sup>)计算每个miRNA的相对表达水平,重复三次取平均值。

表1 miR-325-3p、miR-652-3p、miR-551b-3p和U6的反转录及qRT-PCR引物序列

引物名称	引物序列
U6	反转录:5'-CGCTTCACGAATTTCGCTGTCAT-3'
	上游:5'-GCTTCGCGCAGCACATATACTAAAAAT-3'
	下游:5'-CGCTTCACGAATTTCGCTGTCAT-3'
miR-325-3p	反转录:5'-GTCGTATCCAGTGCCTGCTGCGAGTCGGC AATTGCATCGGATACGACCACAACC-3'
	上游:5'-GGGGTTTATTGACACCTCC-3'
	下游:5'-CAGTGCCTGCTCGTGGACT-3'
miR-652-3p	反转录:5'-GTCGTATCCAGTGCCTGCTGCGAGTCGGC AATTGCATCGGATACGACCACAACC-3'
	上游:5'-GGGAAATGGCGCCACTAG-3'
	下游:5'-GTGCGTGTCTGCGAGTCG-3'
miR-551b-3p	反转录:5'-GTCGTATCCAGTGCCTGCTGCGAGTCGGC AATTGCATCGGATACGACTGAAA-3'
	上游:5'-GATTGGCGACCCATACCTTG-3'
	下游:5'-CAGTGCCTGCTCGTGGACT-3'

**1.2.7 miRNA 靶点的预测** 使用 Target Scan (<http://www.targetscan.org>) 和 miRDB (<http://www.mirdb.org/>) 两个网站预测 miRNA 中表达显著差异的靶基因,取两个数据库交集的靶基因作为目标靶基因。

**1.2.8 靶基因 Gene Ontology (GO) 分析** 将得到的靶基因进行显著性功能分析,计算靶基因富集的显著性。根据 *P* 值大小判断靶基因中显著富集的 GO term。

**1.2.9 靶基因 Pathway 分析** 将得到的靶基因进行 Pathway 显著性分析。分析每个 Pathway 中所包含的靶基因个数,用统计检验方法计算出反映 Pathway 中靶基因分布富集显著性的 *P* 值,根据 *P* 值大小找出与靶基因功能显著相关的生物学通路。

**1.3 统计学分析** 采用 SPSS 18.0 和 GraphPad Prism 7 软件进行统计学分析。miRNA 值以均数 ± 标准差表示,配对 *t* 检验用于评估组间 miRNA 的表达差异。计量资料采用单因素方差分析,计数资料采用  $\chi^2$  检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

**2.1 大鼠一般情况** 各组大鼠自由摄取食物和水,摄食量无显著差异。随着喂养时间的延长,正常组与糖尿病组体质量差异逐渐增大。正常组大鼠生长迅速,皮毛干净,有光泽,对环境变化敏感。糖尿病

组大鼠出现典型的糖尿病症状,如多饮、多尿、食量增加、体质量减轻等;大鼠体质量增长缓慢,甚至没有增加或下降;毛色变黄,失去光泽,活动减少;4 只糖尿病大鼠被观察到有白内障发生。与糖尿病组相比,tBHQ 干预组大鼠皮肤清洁有光泽,精神状态改善,活动较糖尿病组增多。

**2.2 大鼠生化值变化** 各组大鼠生化值见表 2。与正常组相比,糖尿病组大鼠空腹血液中的总胆固醇、甘油三酯和高密度脂蛋白胆固醇均有升高的趋势,但差异均无统计学意义(*P* = 0.24、0.10、0.22);而糖尿病组大鼠的空腹血糖值明显高于正常组,血清胰岛素水平明显低于正常组,差异均有统计学意义(均为 *P* < 0.01)。

与糖尿病组相比,tBHQ 干预组的总胆固醇降低,但仍高于正常组,差异均有统计学意义(均为 *P* < 0.01)。tBHQ 干预组甘油三酯的含量居于正常组及糖尿病组之间,但差异均无统计学意义(*P* = 0.24、0.62)。tBHQ 干预组的高密度脂蛋白胆固醇和低密度脂蛋白胆固醇与正常组及糖尿病组相比,均有升高的趋势,其中高密度脂蛋白胆固醇与正常组相比,差异有统计学意义(*P* = 0.02)。tBHQ 干预组的空腹血糖较正常组显著升高,但较糖尿病组显著降低,差异均具有统计学意义(均为 *P* < 0.05)。tBHQ 干预组的血清胰岛素值较正常组减少,但较糖尿病组增多,差异均具有统计学意义(均为 *P* < 0.01)。

表 2 各组大鼠的生化值及血清胰岛素值

分组	TC/mmol · L <sup>-1</sup>	TG/mmol · L <sup>-1</sup>	HDL-C/mmol · L <sup>-1</sup>	LDL-C/mmol · L <sup>-1</sup>	FBG/mmol · L <sup>-1</sup>	INS/μU · L <sup>-1</sup>
正常组	1.066 ± 0.258	0.490 ± 0.211	0.460 ± 0.364	0.145 ± 0.117	7.635 ± 1.421	78.090 ± 20.974
糖尿病组	2.311 ± 0.516 <sup>**</sup>	1.021 ± 0.355	0.721 ± 0.316	0.136 ± 0.110	22.331 ± 1.824 <sup>###*</sup>	17.533 ± 3.959 <sup>###*</sup>
tBHQ 干预组	1.750 ± 0.326 <sup>###</sup>	0.521 ± 0.110	0.991 ± 0.391 <sup>#</sup>	0.278 ± 0.107	15.073 ± 7.079 <sup>###</sup>	47.961 ± 15.256 <sup>##</sup>

注:TC:总胆固醇;TG:甘油三酯;HDL-C:高密度脂蛋白胆固醇;LDL-C:低密度脂蛋白胆固醇;FBG:空腹血糖;INS:血清胰岛素。与正常组相比,<sup>#</sup>*P* < 0.05,<sup>###</sup>*P* < 0.01;与 tBHQ 干预组相比,<sup>\*</sup>*P* < 0.05,<sup>\*\*</sup>*P* < 0.01

**2.3 视网膜形态学变化** 大鼠视网膜 HE 染色结果显示,正常组大鼠视网膜各层结构清晰完整,细胞排列整齐(图 1A);糖尿病组大鼠视网膜出现严重的水肿,各层结构肿胀增厚,视网膜神经节细胞数减少,

内核层和外核层融合,细胞排列紊乱,细胞内可见脂肪空泡(图 1B);tBHQ 干预组大鼠视网膜各层结构排列整齐,细胞轻度水肿,内核层和外核层未发生融合,病理改变轻于糖尿病组(图 1C)。

图 1 各组大鼠视网膜 HE 染色。A:正常组;B:糖尿病组;C:tBHQ 干预组

**2.4 差异性 miRNA 表达** 共筛查了 765 个 miRNA, 与糖尿病组相比, tBHQ 干预组 miR-325-3p ( $>2.0$  倍,  $P=0.040$ ) 和 miR-551b-3p ( $>1.5$  倍,  $P=0.027$ ) 上调, 而 miR-652-3p ( $>2.0$  倍,  $P=0.046$ ) 下调。

选择 miR-325-3p、miR-551b-3p 和 miR-652-3p 进行 qRT-PCR。tBHQ 干预组 miR-325-3p 和 miR-551b-3p 的表达水平显著高于糖尿病组, 而 miR-652-3p 的表达两组相比差异无统计学意义。qRT-PCR 结果与微阵列分析结果 (图 2) 基本一致, 验证了微阵列差异基因筛选结果的可靠性和准确性。

**2.5 靶基因预测** miR-325-3p 比 miR-551b-3p 具有更高的表达, 调控 661 个靶基因, 而 miR-551b-3p 仅具有 9 个靶基因, 包括含有 SUZ RNA 结构域 1、RGD1562914、辅酶 Q10 同源物 B、脂蛋白 3、癌胚抗原相关细胞黏附分子 19、富含脯氨酸的跨膜蛋白 2、sushi 结构域 5、bromodomain 和 PHD finger 1 以及 LOC102552911。

**2.6 靶基因 GO 分析** 将得到的靶基因进行 GO 分析, 发现 miR-325-3p 和 miR-551b-3p 共同参与的前 10 位生物进程见图 3。

图2 各组大鼠视网膜差异性 miRNA 的相对表达水平。与糖尿病组相比, \*\*  $P<0.01$ , \*  $P<0.05$

**2.7 靶基因 Pathway 分析** 根据靶基因 Pathway 分析得到与靶基因 miR-325-3p 功能显著相关的 21 条通路, 其中图 4 显示了其在视网膜中可能参与的前 10 位调节通路。

图4 基于 miR-325-3p 的前 10 位靶基因通路

### 3 讨论

2 型糖尿病是由胰岛素抵抗和胰岛素分泌缺陷引起的综合征。在糖尿病大鼠中使用高脂高糖饮食诱导胰岛素抵抗, 低剂量的 STZ 破坏胰岛  $\beta$  细胞, 这种动物模型被认为比较符合人类糖尿病的发病规律<sup>[6-7]</sup>。在本研究中,  $30\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  STZ 注射产生明显的高血糖, 但糖尿病组和正常组之间甘油三酯、高密度脂蛋白胆固醇和低密度脂蛋白胆固醇水平没有显著变化, 这可能是由于样本量不足所致。既往 HE 染色观察发现, 糖尿病大鼠 3 个月时视网膜具有典型的 DR 病理改变<sup>[8-9]</sup>, 这与本研究结果相似。通过降低生化和内分泌指标, 减轻视网膜病理改变显示了 tBHQ 对糖尿病大鼠视网膜潜在的保护作用。

在 DR 进展过程中, 越来越多异常表达的 miRNA 已经被鉴定出来, 部分已被应用于临床治疗<sup>[10]</sup>, 而环状 miRNA 可被用作 DR 的生物标志物<sup>[11]</sup>。既往研究已发现了 STZ 诱导的糖尿病大鼠视网膜异常的 miRNA 表达谱<sup>[12-13]</sup>。氧化应激是 DR 最重要的发病机制, 当使用抗氧化剂 tBHQ 干预后, 糖尿病大鼠视网膜的 miRNA 表达谱发生改变, 本研究发现了三个与 tBHQ 干预相关的 miRNA: miR-325-3p、miR-551b-3p 和 miR-652-3p。其中, miR-325-3p 和 miR-551b-3p 的表达水平显著上调, 表明 miR-325-3p 和 miR-551b-3p 可能参与 tBHQ 对 DR 的保护作用, 而 miR-652-3p 表达降低, qRT-PCR 结果显示 miR-652-3p 的表达与糖尿病组相比差异无统计学意义, 表明 miR-652-3p 可能未参与 tBHQ 对 DR 的保护作用。

有研究表明, miR-325-3p 的下调可能参与眼屈

图3 GO 分析示 miR-325-3p 和 miR-551b-3p 共同参与的前 10 位生物进程

光调节的发育<sup>[14]</sup>。在不同应激条件下,miR-325-3p的靶向抑制在缺血缺氧性脑损伤模型中具有保护作用<sup>[15]</sup>。在本研究中,tBHQ 干预组大鼠视网膜中的miR-325-3p 表达水平上调,通过 GO 分析,miR-325-3p 参与了体内各种病理生理过程。miR-325-3p 的靶基因和视网膜相关的有 Multicellular organismal water homeostasis、Cellular response to stress、Mitotic cell cycle process、Water homeostasis、Nervous system development 等。因此我们认为,miR-325-3p 可能参与了 tBHQ 的生物调控过程。

既往研究发现,在胃癌中 miR-551b-3p 与肿瘤的分化程度和 TNM 分期密切相关<sup>[16-17]</sup>。我们查阅相关文献和本研究对 miR-551b-3p 的靶基因分析结果显示,miR-551b-3p 参与 DR 生物学进程的可能性很小。

Pathway 分析结果显示,miR-325-3p 可介导 21 条信号通路,其中可能和 DR 相关的信号通路有 Propanoate metabolism、P53 signaling pathway、cGMP-PKG signaling pathway、RNA transport、Inositol phosphate metabolism、Valine、leucine and isoleucine degradation 等,从而对糖尿病大鼠视网膜病理生理过程进行调控。因此,tBHQ 对 DR 的保护作用可能通过 miR-325-3p 介导的信号转导通路和潜在生物学进程实现,未来有望从 miR-325-3p 介导的相关通路或靶基因找到 DR 的防治新方法。

## 参考文献

- [1] TING D S,CHEUNG G C,WONG T Y. Diabetic retinopathy: global prevalence,major risk factors,screening practices and public health challenges;a review[J]. *Clin Exp Ophthalmol*, 2016,44(4):260-277.
- [2] XU W,LI F,XU Z,SUN B,CAO J,LIU Y. Tert-butylhydroquinone protects PC12 cells against ferrous sulfate-induced oxidative and inflammatory injury via the Nrf2/ARE pathway[J]. *Chem Biol Interact*,2017,273(1):28-36.
- [3] JIN X L,WANG K,LIU L,LIU H Y,ZHAO F Q,LIU J X. Nuclear factor-like factor 2-antioxidant response element signaling activation by tert-butylhydroquinone attenuates acute heat stress in bovine mammary epithelial cells[J]. *J Dairy Sci*, 2016,99(11):9094-9103.
- [4] SUN J,REN X,SIMPKINS J W. Sequential upregulation of superoxide dismutase 2 and Heme oxygenase 1 by tert-Butylhydroquinone protects mitochondria during oxidative Stress[J]. *Mol Pharmacol*,2015,88(3):437-449.
- [5] ZHANG S,TIAN M,LI J,HAN P,HUANG Q,LIU H. Influence of tert butylhydroquinone on the islets function and expression of HO-1 and VEGF in retina of type 2 diabetic rats[J]. *Chin J Ophthalmol*,2016,52(5):373-381.
- [6] ZHANG M,LV X Y,LI J,XU Z G,CHEN L. The characterization of high-fat diet and multiple low-dose streptozotocin induced type 2 diabetes rat model[J]. *Exp Diabetes Res*,2008(6):704045.
- [7] SKOVSO S. Modeling type 2 diabetes in rats using high fat diet and streptozotocin[J]. *J Diabetes Invest*,2014,5(4):349-358.
- [8] ZHANG Z H,CHEN Q Z,JIANG F,TOWNSEND T A,MAO C J,YOU C Y,*et al.* Changes in TL1A levels and associated cytokines during pathogenesis of diabetic retinopathy[J]. *Mol Med Rep*,2017,15(2):573-580.
- [9] YIN Y,CHEN F,WANG W,WANG H,ZHANG X. Resolvin D1 inhibits inflammatory response in STZ-induced diabetic retinopathy rats:Possible involvement of NLRP3 inflammasome and NF-kappaB signaling pathway[J]. *Mol Vis*,2017,23:242-250.
- [10] ZHANG Y,SUN X,ICLI B,FEINBERG M W. Emerging roles for microRNAs in diabetic microvascular disease:Novel targets for therapy[J]. *Endocr Rev*,2017,38(2):145-168.
- [11] SIMO-SERVAT O,SIMO R,HERNANDEZ C. Circulating biomarkers of diabetic retinopathy:An overview based on physiopathology[J]. *J Diabetes Res*,2016,2016(3):5263798.
- [12] GONG Q,XIE J,LIU Y,LI Y,SU G. Differentially expressed microRNAs in the development of early diabetic retinopathy[J]. *J Diabetes Res*,2017,2017:4727942.
- [13] ZHUANG P,MURALEESHARAN C K,XU S. Intraocular delivery of miR-146 inhibits diabetes-induced retinal functional defects in diabetic rat model[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*,2017,58(3):1646-1655.
- [14] TKATCHENKO A V,LUO X,TKATCHENKO T V,VAZ C,TANAVDE V M,MAURER-STROH S,*et al.* Large-scale microRNA expression profiling identifies putative retinal miRNA-mRNA signaling pathways underlying form-deprivation myopia in mice[J]. *PLoS One*,2016,11(9):e0162541.
- [15] YANG Y,SUN B,HUANG J,XU L,PAN J,FANG C,*et al.* Up-regulation of miR-325-3p suppresses pineal aralkylamine N-acetyltransferase (Aanat) after neonatal hypoxia-ischemia brain injury in rats[J]. *Brain Res*,2017,1668(1):28-35.
- [16] LI Z,CAO Y,JIE Z,LIU Y,LI Y,LI J,*et al.* MiR-495 and miR-551a inhibit the migration and invasion of human gastric cancer cells by directly interacting with PRL-3[J]. *Cancer Lett*,2012,323(1):41-47.
- [17] CHEN Z,LIU X,HU Z,WANG Y,LIU M,LIU X,*et al.* Identification and characterization of tumor suppressor and oncogenic miRNAs in gastric cancer[J]. *Oncol Lett*,2015,10(1):329-336.