

引文格式:罗云霞,余曦,田敏,邓偲捷,吕红彬.叔丁基对苯二酚(tBHQ)对2型糖尿病大鼠视网膜的长期保护作用[J].眼科新进展,2021,41(1):32-36. doi:10.13389/j.cnki.rao.2021.0007

【实验研究】

# 叔丁基对苯二酚(tBHQ)对2型糖尿病大鼠视网膜的长期保护作用<sup>△</sup>

罗云霞 余曦 田敏 邓偲捷 吕红彬

**【摘要】** 目的 研究叔丁基对苯二酚(tBHQ)对2型糖尿病(DM)大鼠视网膜的长期保护作用及其机制。方法 将雄性 Sprague Dawley 大鼠90只随机分为正常对照组(NC组)和造模组。造模组构建2型DM模型,将成模的大鼠进一步随机分为DM组和tBHQ组,tBHQ组于成模后1周在其高脂高糖饲料中加入 $10\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  tBHQ进行干预。于tBHQ干预后4周、12周和20周处死各组大鼠,心脏采血检测空腹血糖、低密度脂蛋白(LDL-C)、甘油三酯(TG)和总胆固醇(TC)水平,取大鼠眼球切片行HE染色观察各组大鼠视网膜形态变化,免疫组织化学染色检测各组大鼠视网膜PI3K、缺氧诱导因子 $1\alpha$ (HIF- $1\alpha$ )蛋白分布及表达,qRT-PCR检测各组大鼠视网膜中PI3K、HIF- $1\alpha$ 及VEGF mRNA的表达。结果 干预后4周、12周和20周,3组大鼠间空腹血糖、TC、TG和LDL-C水平差异均具有统计学意义(均为 $P < 0.01$ );干预后12周和20周,DM组较NC组大鼠空腹血糖、TC、TG、LDL-C水平均升高,tBHQ组较DM组各指标均降低(均为 $P < 0.05$ )。HE染色结果显示,干预后12周和20周,tBHQ组较DM组视网膜各层排列规则、紧密。免疫组织化学染色检测结果显示,干预后12周、20周,DM组HIF- $1\alpha$ 、PI3K蛋白相对表达量均高于同时时间点NC组,tBHQ组HIF- $1\alpha$ 、PI3K蛋白相对表达量均低于同时时间点DM组(均为 $P < 0.05$ )。qRT-PCR检测结果显示,干预后4周、12周、20周,DM组HIF- $1\alpha$ 、VEGF、PI3K mRNA相对表达量均较NC组升高,tBHQ组均较DM组降低,差异均具有统计学意义(均为 $P < 0.05$ )。结论 tBHQ可能通过PI3K/HIF- $1\alpha$ /VEGF信号通路对2型DM大鼠视网膜起长期保护作用。

**【关键词】** 叔丁基对苯二酚;糖尿病视网膜病变;PI3K;缺氧诱导因子 $1\alpha$ ;2型糖尿病

**【中图分类号】** R774.1

**作者简介:** 罗云霞 (ORCID: 0000-0003-2235-7708),女,1994年9月出生,四川南充人,在读硕士研究生。研究方向:眼底病。E-mail: Drluoyx@163.com

**通信作者:** 吕红彬 (ORCID: 0000-0002-5414-593X),女,博士。研究方向:眼底病、眼视光学。E-mail: oculistlvhongbin@163.com

**收稿日期:** 2020-02-16  
**修回日期:** 2020-05-01  
**本文编辑:** 盛丽娜

**△基金项目:** 四川省科学技术厅资助项目(编号:2015SZ0086, LZ-LY-37)

**作者单位:** 646000 四川省泸州市,西南医科大学附属医院眼科(罗云霞,田敏,吕红彬);646100 四川省泸州市,泸州市第二人民医院眼科(余曦);646000 四川省泸州市,西南医科大学附属医院内分泌科(邓偲捷)

糖尿病视网膜病变(DR)是糖尿病(DM)常见的微血管并发症之一,是工作年龄人群第一位的致盲疾病<sup>[1]</sup>。DR的发生发展与组织缺血缺氧、新生血管形成密切相关,新生血管的形成可能导致玻璃体体积血、牵拉性视网膜脱离,严重影响患者视功能<sup>[1]</sup>。目前DR发病机制尚不完全清楚。长期慢性高血糖、缺氧可诱导缺氧诱导因子 $1\alpha$ (HIF- $1\alpha$ )产生,HIF- $1\alpha$ 是新生血管形成过程中的关键因子,可刺激下游血管内皮生长因子(VEGF)等的表达,促进新生血管形成,加重DR缺血缺氧<sup>[2]</sup>。PI3K/Akt通路是诱导内皮细胞增殖和血管形成的关键信号通路<sup>[3]</sup>。叔丁基对苯二酚(tBHQ)是食品中常见的抗氧化添加剂,可通过激活核因子E2相关因子2(Nrf2)与抗氧化反应元件(ARE)结合发挥抗氧化作用<sup>[4-5]</sup>。本实验拟通过tBHQ干预2型DM大鼠,观察干预后4周、12周和20周时大鼠空腹血糖、血脂及视网膜中PI3K、HIF- $1\alpha$ 和VEGF的表达,探索tBHQ对2型DM大鼠视网膜的长期保护作用及其可能机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物及分组 健康雄性 Sprague Dawley

大鼠(6周龄左右,体质量 $160 \sim 180\text{ g}$ )90只,购自西南医科大学实验动物中心。适应性喂养1周后,采用随机数字表法抽取18只大鼠作为正常对照组(NC组),其余72只作为造模组。NC组大鼠给予基础饲料喂养,造模组大鼠给予高脂高糖饲料喂养。4周后,造模组大鼠禁食12 h后腹腔注射 $30\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 链脲佐菌素(STZ),1周后尾静脉采血,如血糖 $\geq 16.7\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 视为造模成功,剔除造模失败的4只大鼠,68只造模成功大鼠进一步随机分为DM组34只及tBHQ组(34只)。DM组继续高脂高糖饲料喂养,tBHQ组则于成模后1周喂养添加 $10\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  tBHQ的高脂高糖饲料。去除饲养过程中死亡的大鼠后,最终NC组18只,DM组26只,tBHQ组29只。实验动物的使用和管理遵守国家及西南医科大学制定的实验动物管理条例。

**1.1.2 主要试剂及仪器** STZ(美国Sigma公司);tBHQ(比利时Acros公司);总RNA提取试剂盒、qRT-PCR试剂盒、逆转录试剂盒、SYBR Green染料(日本宝生物工程有限公司);兔抗大鼠PI3K、HIF- $1\alpha$ 多克隆抗体(美国Abcom公司);PI3K、HIF- $1\alpha$ 、VEGF、GAPDH引物序列(上海生工生物工程有限公司)。血糖仪(德国罗氏公司);qRT-PCR仪CFX96

(美国 BIO-RAD 公司);7180 全自动生化分析仪(日本日立公司);Leica 生物显微镜(德国 Leica 公司)。

1.2 方法

1.2.1 生化指标检测及眼球标本制备 分别于 tBHQ 干预后 4 周、12 周和 20 周时,将 3 组大鼠禁食过夜后,采用 10 g · L<sup>-1</sup>戊巴比妥钠 50 mg · kg<sup>-1</sup>腹腔内注射,待大鼠麻醉生效后行心脏穿刺采血,采用 7180 全自动生化分析仪测定各组大鼠血脂和空腹血糖。其中干预后 4 周、12 周,每组各随机选择 8 只大鼠用于实验;干预后 20 周,各组剩余大鼠全部用于实验。心脏采血后处死各组大鼠,摘除双眼眼球,其中一只眼球以 40 g · L<sup>-1</sup>多聚甲醛溶液固定 24 h 以上,常规石蜡包埋后以 5 μm 连续切片;另一只眼球快速分离出大鼠视网膜,于 PBS 中漂洗后迅速放入无 RNA 酶的 EP 管中,立即于液氮中速冻后转移至 -80 ℃ 冰箱保存备用。

1.2.2 HE 染色和免疫组织化学染色检测 各组大鼠眼球石蜡切片部分用于常规 HE 染色,中性树胶封片后在光学显微镜下观察视网膜各层结构;部分用于标准免疫组织化学染色,采用兔抗大鼠 PI3K 和 HIF-1α 多克隆抗体作为一抗,加二抗后 DAB 显色。免疫组织化学切片于高倍镜下随机选择 3 个不同视野拍照,使用 Image-Pro Plus 图像分析软件分析,以棕黄色或棕褐色着色者为阳性反应,测定单位面积的平均光密度值。

1.2.3 qRT-PCR 检测 RNA 提取试剂盒提取各组大鼠视网膜总 RNA,逆转录试剂盒逆转录为 cDNA,采用 SYBR Green 实时荧光定量 PCR 法扩增 cDNA。反应条件:95 ℃ 3 min,95 ℃ 10 s,58 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s;共 40 个循环。以 GAPDH 作为内参照,计算 PI3K、HIF-1α、VEGF mRNA 的相对表达量。引物序列如下: HIF-1α: 正向引物为 5'-GTGCTGATTTGTGAACCCATTC-3',反向引物为 5'-TCAACCCAGACATATCCACCTC-3'; VEGF: 正向引物为 5'-GCTACTGCCGTCGATTGAG-3',反向引物为 5'-GGCTTTGTTCTGTCTTTCTTTGGT-3'; PI3K: 正向引物为 5'-CACGGCGATTACACTCTTACACT-3',反向引物为 5'-ATCCTGCTGGTATTTGGACACT-3'。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 24.0 统计学软件进行统计分析。三样本均数比较,符合正态分布且方差齐者用方差检验,进一步两两比较用 LSD 法;方差不齐者行 Welch 方差分析。检验水准:α = 0.05。

2 结果

2.1 各组大鼠一般情况 干预后 4 周、12 周、20 周,3 组大鼠间空腹血糖水平总体差异均具有统计学意义(均为  $P < 0.01$ )。与同时时间点 NC 组相比,DM 组大鼠空腹血糖均明显升高(均为  $P < 0.05$ );与同时时间点 DM 组相比,tBHQ 组大鼠空腹血糖均降低,差异均有统计学意义(均为  $P < 0.05$ )。干预后 4

周、12 周、20 周,DM 组大鼠空腹血糖水平总体差异具有统计学意义( $F = 49.323, P < 0.01$ ),随着造模时间延长,DM 组大鼠空腹血糖呈升高趋势。tBHQ 组在不同时间点空腹血糖水平总体呈逐渐降低的趋势,但差异无统计学意义( $P > 0.05$ )(见表 1)。

表 1 3 组大鼠不同时间点空腹血糖水平

干预时间	空腹血糖/mmol · L <sup>-1</sup>			F 值	P 值
	NC 组	DM 组	tBHQ 组		
4 周	4.65 ± 0.92	18.82 ± 1.44 *	12.94 ± 3.78 **	275.499	<0.01
12 周	4.86 ± 0.31	24.45 ± 4.23 *▲	10.78 ± 2.67 **	121.706	<0.01
20 周	4.74 ± 0.30	28.73 ± 2.18 *△	9.13 ± 1.14 **	395.057	<0.01

注:与同时时间点 NC 组比较,\* $P < 0.05$ ;与同时时间点 DM 组比较,\*\* $P < 0.05$ ;与干预后 4 周时 DM 组比较,▲ $P < 0.05$ ;与干预后 12 周时 DM 组比较,△ $P < 0.05$ 。

2.2 各组大鼠血脂情况 干预后 4 周、12 周、20 周,DM 组、tBHQ 组和 NC 组间 TC、LDL-C 水平比较差异均具有统计学意义(均为  $P < 0.01$ ),DM 组、tBHQ 组 TC、LDL-C 水平均较 NC 组升高(均为  $P < 0.01$ );干预后 4 周,tBHQ 组 TC、LDL-C 水平与 DM 组比较差异均无统计学意义( $P = 0.109, 0.581$ );干预后 12 周、20 周,tBHQ 组 TC、LDL-C 水平均较 DM 组降低(均为  $P < 0.05$ )。随着造模时间的延长,DM 组大鼠 TC 水平呈升高趋势( $F = 25.163, P < 0.01$ );tBHQ 组在干预后不同时间点间 TC 水平差异无统计学意义( $F = 2.027, P = 0.155$ )。干预后 4 周、12 周、20 周,DM 组、tBHQ 组和 NC 组间 TG 水平比较差异均具有统计学意义(均为  $P < 0.01$ );DM 组 TG 水平均较 NC 组升高(均为  $P < 0.01$ );tBHQ 组 TG 水平均较 DM 组降低(均为  $P < 0.05$ )(见表 2)。

2.3 各组视网膜 HE 染色结果 不同时间点 NC 组大鼠视网膜各层结构均清晰,细胞排列均整齐。干预后 4 周,DM 组、tBHQ 组大鼠视网膜各层排列稍紊乱。干预后 12 周,DM 组、tBHQ 组大鼠视网膜神经节细胞呈空泡样改变,内丛状层、外丛状层排列紊乱、变薄,内核层、外核层细胞密度减少,排列稀疏,厚度变薄;tBHQ 组较 DM 组形态改变轻。干预后 20 周,DM 组大鼠视网膜各层水肿,形态学改变较干预后 12 周更为明显;tBHQ 组较 DM 组视网膜各层排列整齐,水肿不明显(图 1)。

2.4 各组大鼠视网膜 PI3K 和 HIF-1α 蛋白相对表达量 PI3K 主要表达于视网膜神经节细胞层,少部分表达于内核层,HIF-1α 主要表达于视网膜神经节细胞层和内核层。干预后 4 周、12 周、20 周,NC 组大鼠视网膜可见少量 PI3K 和 HIF-1α 蛋白的阳性表达,DM 组、tBHQ 组 PI3K 和 HIF-1α 蛋白的阳性表达量均显著增加。3 组大鼠在不同时间点视网膜中 PI3K 和 HIF-1α 蛋白相对表达水平总体差异均具有统计学意义(均为  $P < 0.05$ )。干预后不同时间点 DM 组、tBHQ 组大鼠视网膜 HIF-1α 和 PI3K 蛋白相对表达量均较 NC 组升高,差异均有统计学意义(均

表 2 3 组大鼠不同时间点血清中 TC、TG 和 LDL-C 变化情况

指标	干预时间	NC 组	DM 组	tBHQ 组	F 值	P 值
TC/mmol · L <sup>-1</sup>	4 周	1.13 ± 0.12	1.77 ± 0.39 *	1.56 ± 0.23 *	9.182	0.001
	12 周	1.26 ± 0.29	2.30 ± 0.21 *▲	1.91 ± 0.37 *#	21.702	<0.01
	20 周	1.37 ± 0.13	2.66 ± 0.12 *△	1.81 ± 0.56 *#	149.025	<0.01
TG/mmol · L <sup>-1</sup>	4 周	0.68 ± 0.27	1.62 ± 0.06 *	1.22 ± 0.38 *#	36.337	<0.01
	12 周	0.53 ± 0.14	2.01 ± 0.48 *	1.37 ± 0.37 *#	45.212	<0.01
	20 周	0.60 ± 0.08	2.36 ± 0.80 *	0.94 ± 0.70#	13.511	<0.01
LDL-C/mmol · L <sup>-1</sup>	4 周	0.43 ± 0.06	0.77 ± 0.12 *	0.74 ± 0.08 *	28.720	<0.01
	12 周	0.35 ± 0.06	0.86 ± 0.11 *	0.71 ± 0.09 *#	58.836	<0.01
	20 周	0.37 ± 0.04	0.93 ± 0.02 *	0.72 ± 0.16 *#	45.990	<0.01

注:与同时时间点 NC 组比较,\**P* < 0.01;与同时时间点 DM 组比较,#*P* < 0.05;与干预后 4 周时 DM 组比较,▲*P* < 0.05;与干预后 12 周时 DM 组比较,△*P* < 0.05。

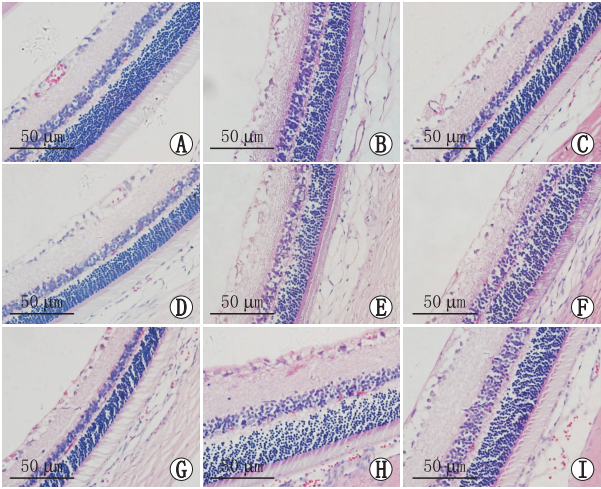


图 1 光学显微镜下不同时间点各组大鼠视网膜组织形态(HE 染色, ×400) A、B、C 为干预后 4 周,D、E、F 为干预后 12 周,G、H、I 为干预后 20 周;A、D、G 为 NC 组,B、E、H 为 DM 组,C、F、I 为 tBHQ 组。

为 *P* < 0.05)。干预后 12 周、20 周,tBHQ 组 HIF-1α 和 PI3K 蛋白相对表达量均较 DM 组降低,差异均有统计学意义(均为 *P* < 0.05)。tBHQ 组大鼠视网膜 HIF-1α 蛋白相对表达量随时间增加呈下降趋势(*F* = 21.30, *P* < 0.01),PI3K 蛋白相对表达量在不同时间点差异无统计学意义(*F* = 0.226, *P* = 0.802)。DM 组大鼠视网膜 PI3K 蛋白相对表达量干预后 20

周均较干预后 12 周、4 周增加,差异均有统计学意义(均为 *P* < 0.01)(见图 2)。

**2.5 3 组大鼠视网膜中 PI3K、HIF-1α 和 VEGF mRNA 的表达** 干预后 4 周、12 周、20 周,3 组大鼠间视网膜 HIF-1α、VEGF 和 PI3K mRNA 相对表达量总体差异均具有统计学意义(均为 *P* < 0.01)。不同时间点 DM 组 HIF-1α、VEGF、PI3K mRNA 相对表达量均较同时时间点 NC 组增加,tBHQ 组均较同期 DM 组降低,差异均有统计学意义(均为 *P* < 0.05)(图 3)。DM 组 PI3K mRNA 相对表达量随时间的延长而增加(均为 *P* < 0.05),VEGF 和 HIF-1α mRNA 相对表达量在干预后 20 周均较干预后 4 周明显增加,差异均有统计学意义(均为 *P* < 0.05)。

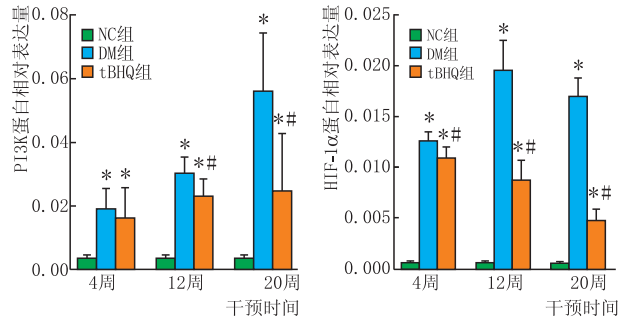


图 2 各组不同时间点视网膜 PI3K、HIF-1α 蛋白相对表达量 注:与同时时间点 NC 组比较,\**P* < 0.05;与同时时间点 DM 组比较,#*P* < 0.05。

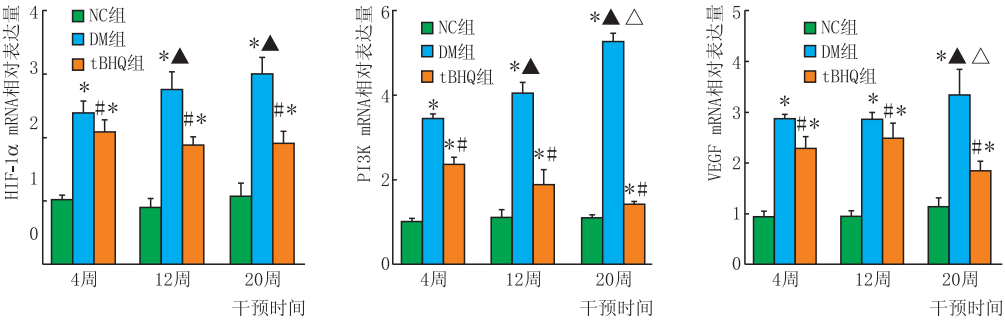


图 3 qRT-PCR 检测 3 组大鼠视网膜中 PI3K、HIF-1α、VEGF mRNA 的相对表达量 注:与同时时间点 NC 组比较,\**P* < 0.05;与同时时间点 DM 组比较,#*P* < 0.05;与干预后 4 周时 DM 组比较,▲*P* < 0.05;与干预后 12 周时 DM 组比较,△*P* < 0.05。



### 3 讨论

根据国际 DM 联盟发布的第九版全球 DM 地图, 2019 年 DM 年龄标化患病率为 8.3%, 预计 2030 年为 9.2%, 中国 DM 患者数量居世界之首<sup>[6]</sup>, 有研究表明, 35% 的 DM 患者伴有不同程度的 DR<sup>[7]</sup>。发生 DR 的危险因素众多, 包括高血压、高血糖、高血脂、高年龄和遗传倾向等<sup>[8]</sup>。DR 是 DM 常见的微血管并发症之一, 血-视网膜屏障破坏及新生血管形成是最终导致失明的主要原因<sup>[9]</sup>。tBHQ 是食品中常用的抗氧化剂, 具有抗炎、抗动脉粥样硬化和神经保护作用<sup>[10]</sup>。本实验通过腹腔注射 STZ 并予以高脂高糖饮食成功诱导 2 型 DM 大鼠模型, DM 组大鼠 TC、TG 和 LDL-C 水平均较 NC 组明显升高。

前期研究表明, tBHQ 通过激活 Nrf2/ARE 通路诱导一系列抗氧化作用<sup>[4-5]</sup>。但有研究表明, 除 Nrf2/ARE 通路外, tBHQ 还可通过 PI3K/Akt 信号通路对血管内皮细胞起保护作用<sup>[11]</sup>。Bahia 等<sup>[12]</sup>研究表明, tBHQ 可以激活 PI3K/Akt 信号通路, 抑制 FoxO3a 的转运和活性发挥神经保护作用。因此, 值得进一步探索 tBHQ 对 2 型 DM 患者视网膜的保护机制及是否具有长期保护作用。

缺氧是导致 DR 至关重要的因素, 在缺氧条件下, HIF-1 $\alpha$  亚基与  $\beta$  亚基形成复合体异位到细胞核内与 HIF 反应元件结合, 参与氧化应激、凋亡、新生血管形成等一系列反应<sup>[13]</sup>。STZ 诱导的 DM 大鼠胰岛素分泌降低, 组织对葡萄糖的摄取能力降低, 加剧了视网膜的缺血缺氧。HIF-1 $\alpha$  是机体适应氧浓度变化的主要转录因子, Zhang 等<sup>[2]</sup>通过玻璃体内注射 HIF-1 $\alpha$  反义寡核苷酸发现, 玻璃体内 HIF-1 $\alpha$  与 VEGF 表达呈现一致性, 抑制 HIF-1 $\alpha$  可减轻视网膜新生血管形成, 且 HIF-1 $\alpha$  表达随 DR 病程延长而增加。本实验中, DM 组大鼠 HIF-1 $\alpha$  表达随喂养时间的延长而有所增加, 干预后 4 周、12 周和 20 周, tBHQ 组 HIF-1 $\alpha$  表达均较同时间点 DM 组下降, 说明 tBHQ 可以通过抑制 HIF-1 $\alpha$  表达, 抑制血管内皮细胞增殖、迁移, 从而抑制视网膜新生血管形成。有研究表明, 在高糖环境下, HIF-1 $\alpha$  蛋白表达水平增加并增强其转录活性, 刺激下游基因如 VEGF 等表达, 促进新生血管形成<sup>[14]</sup>。HIF-1 $\alpha$  也可以调节细胞葡萄糖摄取的葡萄糖转运蛋白 1 (glucose transporter 1, GLUT1) 和 GLUT3 的表达, 参与糖酵解过程的酶的表达, 加重组织的缺血缺氧, 再次刺激 HIF-1 $\alpha$  的表达<sup>[15]</sup>。本研究干预后不同时间点, tBHQ 组大鼠血糖均较 DM 组明显降低, 且干预后 20 周时血糖较同时间点 DM 组降低幅度更大, 说明 tBHQ 有一定的降低血糖作用, 可能间接影响了视网膜组织中 HIF-1 $\alpha$  的表达, 同时说明 tBHQ 对 DM 组大鼠视网膜具有长期保护作用。干预后 20 周时 tBHQ 组大鼠空腹血糖较同时间点 NC 组仍升高, 说明 tBHQ 改善胰岛素  $\beta$

细胞的功能具有一定局限性。

PI3K/Akt 通路是诱导内皮细胞增殖和血管形成的关键信号通路<sup>[3]</sup>。Liu 等<sup>[16]</sup>研究表明, 在高糖环境下, PI3K/Akt 通路对 Nrf2 表达的调控在细胞抗氧化和抗凋亡反应的调控中起重要作用。Paeng 等<sup>[17]</sup>研究发现, 缺氧条件下活性氧簇生成时, PI3K/Akt 激活诱导 VEGF 生成的上游信号, 使用活性氧抑制剂可显著地抑制 PI3K/AKT 的激活, 以及 HIF-1 $\alpha$  和 VEGF 的表达, 这与本实验结果部分一致。本实验中, DM 组视网膜 PI3K 表达较 NC 组增加, 且随着高糖状态时间的延长, 干预后 20 周较干预后 12 周和 4 周明显升高, tBHQ 组 PI3K 表达较 DM 组明显降低, 在干预后 20 周趋势更加明显。这说明 tBHQ 对 2 型 DM 大鼠视网膜起保护作用可能是通过抑制 PI3K/Akt 通路从而抑制 HIF-1 $\alpha$ /VEGF 表达实现的。

综上, 本研究结果表明, tBHQ 对 2 型 DM 大鼠视网膜具有较长的保护作用, 且其机制可能是通过 PI3K/HIF-1 $\alpha$ /VEGF 通路实现的。

### 参考文献

- [1] WERT K J, MAHAJAN V B, ZHANG L, YAN Y, LI Y, TOSI J, et al. Neuroretinal hypoxic signaling in a new preclinical murine model for proliferative diabetic retinopathy [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2016, 1: 16005.
- [2] ZHANG D, LV F L, WANG G H. Effects of HIF-1 $\alpha$  on diabetic retinopathy angiogenesis and VEGF expression [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22 (16): 5071-5076.
- [3] GONG Q, XIE J, LI Y, LIU Y, SU G. Enhanced ROBO4 is mediated by up-regulation of HIF-1 $\alpha$ /SP1 or reduction in miR-125b-5p/miR-146a-5p in diabetic retinopathy [J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23 (7): 4723-4737.
- [4] 张思远, 田敏, 李晶艳, 韩佩晏, 黄棋, 吕红彬. tBHQ 对 2 型糖尿病大鼠视网膜 HO-1、VEGF 表达及胰岛功能作用的研究 [J]. *中华眼科杂志*, 2016, 52 (5): 373-381.
- [5] ZHANG S Y, TIAN M, LI J Y, HAN P Y, HUANG Q, LYU H B. Influence of tert-butyl-hydroquinone on the islets function and expression of HO-1, VEGF in the retina of type 2 diabetic rats [J]. *Chin J Ophthalmol*, 2016, 52 (5): 373-381.
- [5] 田敏, 张思远, 韩佩晏, 李晶艳, 吕红彬. 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.
- [5] TIAN M, ZHANG S Y, HAN P Y, LI J Y, LYU H B. tBHQ activates Nrf2 signaling pathways to enhance retinal protection in type 2 diabetic rats [J]. *Rec Adv Ophthalmol*, 2017, 37 (3): 220-224.
- [6] International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas [M]. 9th ed. Brussels: Belgium, 2019.
- [7] YAU J W, ROGERS S L, KAWASAKI R, LAMOUREUX E L, KOWALSKI J W, BEK T, et al. Global prevalence and major risk factors of diabetic retinopathy [J]. *Diabetes Care*, 2012, 35 (3): 556-564.
- [8] ZHAO C, WANG W, XU D, LI H, LI M, WANG F. Insulin and risk of diabetic retinopathy in patients with type 2 diabetes mellitus: data from a meta-analysis of seven cohort studies [J]. *Diagn Pathol*, 2014, 9 (1): 130.
- [9] 中华医学会眼科学会眼底病学组. 我国糖尿病视网膜病变临床指南 (2014 年) [J]. *中华眼科杂志*, 2014, 50 (11): 851-856.
- [9] Chinese Academy of Ophthalmology. Guidelines for clinical diagnosis and treatment of diabetic retinopathy in China (2014) [J]. *Chin J Ophthalmol*, 2014, 50 (11): 851-856.
- [10] SHINTYAPINA A B, VAVILIN V A, SAFRONOVA O G, LLYAKHOVICH V V. The gene expression profile of a drug metabolism system and signal transduction pathways in the liver of mice treated with tertbutyl hydroquinone or 3-(3'-tert-butyl-4'-hydroxyphenyl) propylthiosulfonate of sodium [J]. *PLoS One*, 2017, 12 (5): e0176939.

- [11] ZHOU N Q, LIU N, LI P, PING S, PENG Q S, SHI W D. Tert-butyl hydroquinone promotes angiogenesis and improves heart functions in rats after myocardial infarction[J]. *Clin Exp Hypertens*, 2017, 39(5):402-408.
- [12] BAHIA P K, PUGH V, HOYLAND K, HENSLEY V, RATTRAY M, WILLIAMS R J. Neuroprotective effects of phenolic antioxidant tBHQ associate with inhibition of FoxO3a nuclear translocation and activity[J]. *J Neurochem*, 2012, 123(1):182-191.
- [13] WU J, KE X, MA N, WANG W, FU W, ZHANG H, et al. Formononetin, an active compound of Astragalus membranaceus (Fisch) Bunge, inhibits hypoxia-induced retinal neovascularization via the HIF-1 $\alpha$ /VEGF signaling pathway[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2016, 10:3071-3081.
- [14] WANG D, WANG L, GU J, YANG H, LIU N, LIN Y, et al. Scutellarin inhibits high glucose-induced and hypoxia-mimetic agent-induced angiogenic effects in human retinal endothelial cells through reactive oxygen species/hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ /vascular endothelial growth factor pathway[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2014, 64(3):218-227.
- [15] GU L, XU H, ZHANG C, YANG Q, ZHANG L, ZHANG J. Time-dependent changes in hypoxia- and gliosis-related factors in experimental diabetic retinopathy[J]. *Eye (Lond)*, 2019, 33(4):600-609.
- [16] LIU Y, ZHANG S, XUE J, WEI Z, AO P, SHEN B, et al. CGRP reduces apoptosis of DRG cells induced by high-glucose oxidative stress injury through PI3K/AKT induction of heme oxygenase-1 and Nrf-2 expression[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019:2053149.
- [17] PAENG S H, JUNG W K, PARK W S, LEE D S, KIM G Y, CHOI Y H, et al. Caffeic acid phenethyl ester reduces the secretion of vascular endothelial growth factor through the inhibition of the ROS, PI3K and HIF-1 $\alpha$  signaling pathways in human retinal pigment epithelial cells under hypoxic conditions[J]. *Int J Mol Med*, 2015, 35(5):1419-1426.

## Long-term protective effect of tert-butyl hydroquinone on the retina of type 2 diabetic rats

LUO Yunxia<sup>1</sup>, YU Xi<sup>2</sup>, TIAN Min<sup>1</sup>, DENG Sijie<sup>3</sup>, LÜ Hongbin<sup>1</sup>

1. Department of Ophthalmology, Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan Province, China

2. Department of Ophthalmology, Luzhou Second People's Hospital, Luzhou 646100, Sichuan Province, China

3. Department of Endocrinology, Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan Province, China

**Corresponding author:** LÜ Hongbin, E-mail: oculistlvhongbin@163.com

**[Abstract] Objective** To investigate the long-term protective effect and mechanism of tert-butyl hydroquinone (tBHQ) on the retina of type 2 diabetic rats. **Methods** Ninety male SD rats were randomly divided into normal group (NC group) and model group. Model group was used to build a type 2 DM model. The modeled rats were further randomly divided into diabetes group (DM group) and tBHQ group. In the tBHQ group, 10 g · L<sup>-1</sup> tBHQ was added to the high-fat and high-sugar feed one week after forming the model. The rats in each group were sacrificed 4 weeks, 12 weeks and 20 weeks after the intervention of tBHQ. Cardiac blood was collected to detect serum fasting blood glucose, low-density lipoprotein (LDL-C), triglyceride (TG) and total cholesterol (TC) levels. Rat eyeball sections were stained with HE to observe the morphological changes of the retina of each group. The distribution and expression of PI3K and hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) protein in each group were determined by immunohistochemistry, and qRT-PCR was used to determine the expression of PI3K, HIF-1 $\alpha$  and VEGF mRNA in the retina of each group. **Results** At 4 weeks, 12 weeks and 20 weeks after the intervention, the differences in fasting blood glucose, TC, TG and LDL-C levels among the three groups of rats were statistically significant (all  $P < 0.01$ ). At 12 weeks and 20 weeks after the intervention, the fasting blood glucose, TC, TG and LDL-C of the DM group were higher than that of the NC group (all  $P < 0.05$ ). The indexes of tBHQ group were lower than those of DM group (all  $P < 0.05$ ). HE staining of retina showed that the cells in the tBHQ group were more regular and tighter than the DM group at 12 and 20 weeks after the intervention. The immunohistochemistry showed that the protein level of retinal HIF-1 $\alpha$  and PI3K in the DM group was higher than those in the NC group at the same time point at 12 and 20 weeks. HIF-1 $\alpha$  and PI3K protein expression levels in the tBHQ group was lower than that in the DM group in the same period (both  $P < 0.05$ ). The qRT-PCR test results at 4 weeks, 12 weeks, and 20 weeks after the intervention were all statistically significant (all  $P < 0.05$ ). The expression of HIF-1 $\alpha$ , VEGF and PI3K mRNA in the DM group were significantly higher than those in the NC group, and the tBHQ group was significantly lower than those in the DM group (all  $P < 0.05$ ). **Conclusion** tBHQ may play a long-term protective effect on the retina of type 2 DM rats through the PI3K/HIF-1 $\alpha$ /VEGF signaling pathway.

**[Key words]** tert-butyl hydroquinone; diabetic retinopathy; PI3K; hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ ; type 2 diabetes