

引文格式:徐卫星,李勇,徐军. 维生素 B12 对糖尿病大鼠视网膜神经细胞凋亡的影响[J]. 眼科新进展,2017,37(12):1114-1118. doi:10.13389/j.cnki.rao.2017.0281

【实验研究】

## 维生素 B12 对糖尿病大鼠视网膜神经细胞凋亡的影响<sup>△</sup>

徐卫星 李勇 徐军

作者简介:徐卫星,男,1991 年 6 月出生,河南驻马店人,在读硕士研究生。研究方向:糖尿病视网膜病变。  
E-mail: xuweixing158@163.com; ORCID: 0000-0003-2712-5025

**About XU Wei-Xing:** Male, born in June, 1991. Postgraduate student. E-mail: xuweixing158@163.com; ORCID: 0000-0003-2712-5025

收稿日期:2017-07-29

修回日期:2017-09-07

本文编辑:董建军

<sup>△</sup>基金项目:辽宁省科技厅联合基金项目(编号:2015020351)

作者单位:121001 辽宁省锦州市,锦州医科大学附属第一医院眼科

通讯作者:徐军, E-mail: xujun681101@163.com; ORCID: 0000-0002-3714-9103

Received date: Jul 29, 2017

Accepted date: Sep 7, 2017

**Foundation item:** Joint Fund Project of Liaoning Provincial Science and Technology Department (No: 2015020351)

From the Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Jinzhou Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China

**Responsible author:** XU Jun, E-mail: xujun681101@163.com; ORCID: 0000-0002-3714-9103

was higher than VitB12 group ( $P < 0.05$ ); and there was significant difference among the three groups ( $F = 14.926, P = 0.000$ ). Microscopic examination showed Caspase-3 protein expression was appeared in the retinal ganglion cell layer, the inner and the outer nuclear layer in the three groups. The Caspase-3 protein expression in DM and VitB12 groups was significantly increased compared with NC group, and VitB12 group was significantly lower than DM group. Moreover, the optical density of Caspase-3 in the DM and VitB12 groups was higher than that in the NC group (all  $P < 0.01$ ), and DM group was higher than VitB12 group ( $P < 0.01$ ), and there was significant difference among the three groups ( $F = 77.896, P = 0.000$ ).

**Conclusion** Vitamin B12 has certain protective effect on retinal ganglion cell of diabetic rats, of which the mechanism may be its antioxidant stress can inhibit the expression of Caspase-3, thereby suppressing the apoptosis of retinal ganglion cells.

【中图分类号】 R774

【关键词】 维生素 B12; 糖尿病视网膜病变; 氧化应激; Caspase-3; 凋亡

**【摘要】 目的** 观察维生素 B12 对糖尿病大鼠视网膜神经细胞凋亡的影响并分析其作用机制。**方法** 取清洁级 SD 大鼠 36 只, 随机分为正常对照组(NC 组)、糖尿病模型组(DM 组)、维生素 B12 治疗组(VitB12 组), 每组 12 只。DM 组和 VitB12 组腹腔注射链脲佐菌素建立糖尿病大鼠模型。确定造模成功后, 每天对 VitB12 组进行维生素 B12 ( $100 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 灌胃, 持续 8 周, NC 组和 DM 组用同体积生理盐水替代。停止灌胃 2 周后, 于第 10 周末将所有大鼠处死, 取颈静脉血, 用于检测血清中丙二醛含量及超氧化物歧化酶的活性; 取视网膜组织, 用于制备视网膜石蜡切片, 采用 TUNEL 法进行视网膜凋亡细胞原位标记, 计算视网膜神经节细胞凋亡指数(apoptosis index, AI); 采用免疫组织化学法检测视网膜组织 Caspase-3 蛋白的表达。**结果** 三组大鼠血清丙二醛含量比较, 差异有统计学意义( $F = 471.061, P = 0.000$ ), DM 组、VitB12 组丙二醛含量高于 NC 组(均为  $P < 0.01$ ), DM

## Effects of vitamin B12 on apoptosis of retinal ganglion cells of diabetic rat

XU Wei-Xing, LI Yong, XU Jun

**【Key words】** vitamin B12; diabetic retinopathy; oxidative stress; Caspase-3; apoptosis

**【Abstract】 Objective** To investigate the effects of vitamin B12 on apoptosis in retinal ganglion cells of rat with diabetes and its underlying mechanisms. **Methods**

Together 36 clean SD rats were randomly divided into 3 groups ( $n = 12$ ): negative control (NC) group, diabetic mellitus (DM) group and vitamin B12 treatment (VitB12) group. Then a model diabetic rats was conducted by intraperitoneal administration of streptozotocin in rats of DM and VitB12 groups. After modeling successfully,  $100 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  vitamin B12 was given to rats in the VitB12 group by intragastric administration 1 time per day for 8 consecutive weeks, and an equivalent amount of normal saline was utilized for the animals of NC and DM groups in the same way. After 10 weeks, all the rats were sacrificed to collect jugular blood for detection of serum malondialdehyde (MDA) level and superoxide dismutase (SOD) activity; and the retinal tissue was also collected for preparation of paraffin sections for observing the apoptosis of retinal ganglion cells and counting the apoptotic index (AI) by TUNEL staining. Finally, the expression of Caspase-3 in the retina was detected by immunohistochemistry. **Results**

The levels of serum MDA in the DM and VitB12 groups were both higher than that in the NC group (all  $P < 0.01$ ), and DM group was higher than VitB12 group ( $P < 0.01$ ); and there was significant difference among the three groups ( $F = 471.061, P = 0.000$ ). The activity of SOD in the DM and VitB12 groups were both lower than that in the NC group (all  $P < 0.01$ ), and DM group was lower than VitB12 group ( $P < 0.01$ ); and there was significant difference in the three groups ( $F = 356.923, P = 0.000$ ). Apoptotic cells were observed in retinal ganglion cell layer, inner and outer nuclear layer in three groups, and the number of apoptotic cells in the DM and VitB12 groups was significantly larger than that in the NC group, but the number of apoptotic cells in VitB12 group was decreased to some extent compared with DM group. The AI of retinal ganglion cells in the DM and VitB12 groups were both higher than that in the NC group (all  $P < 0.01$ ), and DM group was higher than VitB12 group ( $P < 0.05$ ); and there was significant difference among the three groups ( $F = 14.926, P = 0.000$ ). Microscopic examination showed Caspase-3 protein expression was appeared in the retinal ganglion cell layer, the inner and the outer nuclear layer in the three groups. The Caspase-3 protein expression in DM and VitB12 groups was significantly increased compared with NC group, and VitB12 group was significantly lower than DM group. Moreover, the optical density of Caspase-3 in the DM and VitB12 groups was higher than that in the NC group (all  $P < 0.01$ ), and DM group was higher than VitB12 group ( $P < 0.01$ ), and there was significant difference among the three groups ( $F = 77.896, P = 0.000$ ).

**Conclusion** Vitamin B12 has certain protective effect on retinal ganglion cell of diabetic rats, of which the mechanism may be its antioxidant stress can inhibit the expression of Caspase-3, thereby suppressing the apoptosis of retinal ganglion cells.

组高于 VitB12 组( $P<0.01$ );三组间血清超氧化物歧化酶活性差异有统计学意义( $F=356.923,P=0.000$ ),DM 组、VitB12 组超氧化物歧化酶活性低于 NC 组(均为  $P<0.01$ ),DM 组低于 VitB12 组( $P<0.01$ )。三组大鼠视网膜神经节细胞层、内核层和外核层均可见凋亡细胞,DM 组和 VitB12 组凋亡细胞数较 NC 组明显增多,VitB12 组凋亡细胞数较 DM 组有不同程度减少。三组视网膜神经节细胞 AI 值比较差异有统计学意义( $F=14.926,P=0.000$ ),DM 组、VitB12 组 AI 值均高于 NC 组(均为  $P<0.01$ ),DM 组 AI 值高于 VitB12 组( $P<0.05$ )。显微镜观察发现三组大鼠视网膜神经节细胞层、内核层和外核层均可见 Caspase-3 蛋白表达,DM 组和 VitB12 组 Caspase-3 蛋白表达均较 NC 组明显增多,VitB12 组 Caspase-3 蛋白表达较 DM 组明显减少。三组视网膜 Caspase-3 光密度值比较差异有统计学意义( $F=77.896,P=0.000$ ),DM 组、VitB12 组视网膜 Caspase-3 光密度值均高于 NC 组(均为  $P<0.01$ ),DM 组高于 VitB12 组( $P<0.01$ )。**结论** 维生素 B12 对糖尿病视网膜神经细胞有一定的保护作用,其机制可能是维生素 B12 通过抗氧化作用抑制 Caspase-3 的表达从而抑制神经细胞的凋亡。

糖尿病视网膜病变作为 2 型糖尿病的主要并发症之一,是导致糖尿病患者视力损伤的重要原因,也是防治盲的主要难题<sup>[1]</sup>。目前临床上治疗糖尿病视网膜病变主要聚焦于防止视网膜新生血管形成以及血管渗漏<sup>[2]</sup>,而忽略了视网膜神经病变对糖尿病患者视力的早期影响。有研究表明,糖尿病视网膜神经元进行性病变的发生远早于视网膜新生血管形成,是糖尿病患者早期视力损伤的重要影响因素<sup>[3]</sup>,其发病机制可能是由于糖尿病患者体内产生过量的活性氧簇以及抗氧化剂的减少,导致体内过氧化反应增强,从而损伤视网膜神经元<sup>[4]</sup>。维生素 B12 作为体内重要的元素之一,参与体内各种代谢活动,是机体重要的抗氧化剂<sup>[5-6]</sup>。大量研究表明维生素 B12 对周围神经有很好的保护作用,可以加快受损伤轴突的生长速度,促进周围神经损伤后的功能重建<sup>[7]</sup>;乔芳<sup>[8]</sup>发现对于糖尿病周围神经病变患者联合应用甲钴胺与胰激肽原酶有很好效果。本实验通过建立糖尿病大鼠模型,给予大鼠维生素 B12 灌胃治疗,观察维生素 B12 对糖尿病大鼠视网膜神经细胞凋亡的影响,并探讨其作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物与分组

选取雄性 2 月龄清洁级 SD 大鼠 36 只,体重(250±20)g,随机分为正常对照组(NC 组)、糖尿病模型组(DM 组)、维生素 B12 治疗组(VitB12 组),每组 12 只,购自锦州医科大学实验动物研究中心,饲养于锦州医科大学附属第一医院动物房,饲养环境符合医学实验动物环境设施要求。

### 1.2 主要试剂和仪器

链脲佐菌素、丙二醛测定试剂盒、超氧化物歧化酶测定试剂盒(南京建成生物工程研究所),维生素 B12 粉剂(合肥博美生物科技有限责任公司),TUNEL 细胞凋亡原位检测试剂盒、免疫组织化学 SP 试剂盒、兔抗大鼠 Caspase-3 多克隆抗体(沈阳万类生物科技有限公司)。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 糖尿病模型的制作

DM 组、VitB12 组大鼠禁食 12 h 后,一次性腹腔注射链脲佐菌素溶液( $60\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )制作糖尿病模型。72 h 后测空腹血糖值 $\geq 16.7\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 为造模成功。NC 组注射等体积的柠檬酸钠缓冲液,72 h 后测空腹血糖值( $4.0\sim 7.0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )。

#### 1.3.2 给药方式及观察

造模成功后,VitB12 组每天给予维生素 B12 水溶液  $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,用灌胃针进行灌胃 1 次,持续治疗 8 周;NC 组和 DM 组每天进行 1 次等体积生理盐水灌胃,持续 8 周。每周 1 次测量血糖、体质量,观察饮水量及尿量变化。实验过程中,VitB12 组和 DM 组大鼠血糖均无自行恢复,每天饮水量、尿量明显高于 NC 组,体质量明显低于 NC 组。

#### 1.3.3 取材及标本制备

停止灌胃 2 周后,所有大鼠均于第 10 周末用  $100\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 水合氯醛腹腔注射麻醉,迅速取颈静脉血,离心后取上层血清。立即摘取右眼球浸入  $40\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 多聚甲醛固定液中 24 h 后,去除眼前节,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,行与视神经矢状轴平行的视网膜连续切片。

#### 1.3.4 血清氧化应激指标的检测

收集静脉血离心后取上层血清,硫代巴比妥酸法测定丙二醛,黄嘌呤氧化酶法测定超氧化物歧化酶,严格按照说明书操作,由分光光度计比色法测定。每个指标重复操作 5 次,取平均值。

#### 1.3.5 视网膜神经细胞凋亡和 Caspase-3 蛋白表达的检测

视网膜神经细胞凋亡的检测:采用 TUNEL 法,按照说明书进行检测。细胞核中有棕色颗粒者为阳性细胞,在 200 倍光学显微镜下以视网膜神经节细胞层为观察边框,每张玻片随机选 5 个视野,计数阳性细胞数和视网膜神经细胞总数得到平均值,计算凋亡指数(apoptosis index,AI),即  $\text{AI}=\text{凋亡细胞数}/\text{视网膜神经细胞总数}\times 100\%$ 。视网膜 Caspase-3 蛋白表达的检测:采用免疫组织化学法,按照说明书进行检测。细胞核及细胞浆呈黄色或棕黄色染色者为阳性细胞。用计算机辅助图像分析系统分析,对染色阳性物质进行光密度测定,在 200 倍光学显微镜下每张切片随机选取 5 个视野,计算平均光密度值。

### 1.4 统计学分析

采用 SPSS 20.0 统计软件分析所有数据,计量资料以  $\bar{x}\pm s$  表示,多组计量资料比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD 检验, $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组血清氧化应激指标的比较

三组大鼠血清丙二醛含量比较,差异有统计学意义( $F=$

471.061,  $P = 0.000$ ), DM 组、VitB12 组丙二醛含量高于 NC 组(均为  $P < 0.01$ ), DM 组高于 VitB12 组( $P < 0.01$ ); 三组间血清超氧化物歧化酶活性差异有统计学意义( $F = 356.923, P = 0.000$ ), DM 组、VitB12 组超氧化物歧化酶活性低于 NC 组(均为  $P < 0.01$ ), DM 组低于 VitB12 组( $P < 0.01$ , 见表 1)。

2.2 各组视网膜神经细胞凋亡情况

2.2.1 显微镜观察结果 三组大鼠视网膜神经节

细胞层、内核层和外核层均可见凋亡细胞, DM 组和 VitB12 组凋亡细胞数较 NC 组明显增多, VitB12 组凋亡细胞数较 DM 组有不同程度减少(图 1)。

2.2.2 各组视网膜神经节细胞 AI 三组视网膜神经节细胞 AI 值比较差异有统计学意义( $F = 14.926, P = 0.000$ ), DM 组、VitB12 组 AI 值均高于 NC 组(均为  $P < 0.01$ ), DM 组 AI 值高于 VitB12 组( $P < 0.05$ , 见表 1)。

表 1 三组大鼠血清丙二醛含量、超氧化物歧化酶活性、AI、Caspase-3 光密度值的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	<i>n</i>	丙二醛( $c/nmol \cdot mL^{-1}$ )	超氧化物歧化酶活性/ $U \cdot mL^{-1}$	AI/%	Caspase-3 光密度值
NC 组	12	4.47 $\pm$ 0.36	112.77 $\pm$ 4.55	11.32 $\pm$ 6.43	0.117 $\pm$ 0.042
DM 组	12	8.27 $\pm$ 0.23 <sup>a</sup>	66.51 $\pm$ 3.88 <sup>a</sup>	27.29 $\pm$ 8.95 <sup>a</sup>	0.388 $\pm$ 0.048 <sup>a</sup>
VitB12 组	12	6.45 $\pm$ 0.30 <sup>ab</sup>	86.61 $\pm$ 4.30 <sup>ab</sup>	19.60 $\pm$ 5.71 <sup>ab</sup>	0.284 $\pm$ 0.067 <sup>ab</sup>
<i>F</i> 值		471.061	356.923	14.926	77.896
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000	0.000

注:与 NC 组比较, <sup>a</sup> $P < 0.01$ ; 与 DM 组比较, <sup>b</sup> $P < 0.01$

图 1 各组视网膜神经细胞凋亡情况( $\times 200$ )。A:NC 组;B:DM 组;C:VitB12 组

2.3 各组视网膜神经细胞 Caspase-3 蛋白表达情况

2.3.1 显微镜观察结果 三组大鼠视网膜神经节细胞层、内核层和外核层均可见 Caspase-3 蛋白表

达, DM 组和 VitB12 组 Caspase-3 蛋白表达均较 NC 组明显增多, VitB12 组 Caspase-3 蛋白表达较 DM 组明显减少(图 2)。

图 2 各组视网膜中 Caspase-3 蛋白的表达情况( $\times 200$ )。A:NC 组;B:DM 组;C:VitB12 组

2.3.2 各组视网膜 Caspase-3 光密度值情况 三组视网膜 Caspase-3 光密度值比较差异有统计学意义( $F = 77.896, P = 0.000$ ), DM 组、VitB12 组视网膜 Caspase-3 光密度值均高于 NC 组(均为  $P < 0.01$ ), DM 组高于 VitB12 组( $P < 0.01$ , 见表 1)。

3 讨论

糖尿病视网膜病变作为 2 型糖尿病的主要并发

症之一,是导致糖尿病患者视力损伤的主要因素。糖尿病视网膜病变发病机制较为复杂,是多因素、多机制共同作用的结果。目前普遍认为其机制主要是糖尿病微循环代谢障碍引起视网膜缺血缺氧进而导致视网膜微血管病变,发病原因与氧化应激<sup>[9]</sup>、炎症反应及基因多态性等多种因素有关<sup>[10-11]</sup>。研究表明,在糖尿病引起视网膜微血管病变前已发生了视网膜神经元的病变,糖尿病代谢紊乱可能首先影响

视网膜神经元,微血管病变则是其继发影响的结果<sup>[3]</sup>。视神经元病变的发生与视网膜光感受器细胞及神经节细胞等神经细胞的凋亡密切相关<sup>[12]</sup>。所以,研究早期糖尿病视网膜神经细胞的凋亡机制及延缓视网膜神经细胞凋亡的发生,对于糖尿病视网膜病变的早期预防和治疗有重要价值。

氧化应激在细胞凋亡中有着重要作用,有研究发现在病理情况下通过线粒体电子传递链产生的过量活性氧簇在诱导细胞凋亡中起关键作用<sup>[4]</sup>。Scatena<sup>[13]</sup>报道活性氧簇在皮摩尔水平可诱发细胞凋亡。Perdomo等<sup>[14]</sup>发现活性氧簇可以触发线粒体释放PKC,它是激活Caspase-3的重要事件,同时是启动凋亡的关键步骤。Caspases家族是哺乳动物一切凋亡信号转导的共同通路,正常情况下以无活性的酶原形式存在于细胞浆中,Caspase的激活被认为是进入凋亡途径的特异性标志,其中Caspase-3是细胞凋亡过程中最重要的终末执行酶<sup>[15]</sup>。

维生素B12作为体内重要的元素之一,参与体内各种代谢活动,是机体重要的抗氧化剂<sup>[5,6]</sup>。研究表明维生素B12对周围神经有很好的保护作用,王东强等<sup>[7]</sup>发现维生素B12可以加快受损伤轴突的生长速度,延缓失去神经支配肌肉的萎缩,促进周围神经损伤后的功能重建。本实验通过建立糖尿病大鼠模型,给予大鼠维生素B12灌胃治疗,观察维生素B12对糖尿病大鼠视网膜神经细胞凋亡的影响,并探讨其作用机制。

在本研究中,于第10周末将所有大鼠处死,制备视网膜石蜡切片,并进行TUNEL凋亡标记。通过显微镜观察发现,DM组和VitB12组大鼠在视网膜神经节细胞层、内核层和外核层均可见凋亡细胞,且数量明显多于NC组大鼠。有研究表明16周以前是糖尿病视网膜病变的背景期,而视网膜的血管内皮细胞出现凋亡则主要是在24周以后或是更晚<sup>[17]</sup>。

本研究结果证实了糖尿病视网膜神经元病变发生早于视网膜微血管病变。本实验还发现,DM组和VitB12组丙二醛含量高于NC组,而DM组和VitB12组超氧化物歧化酶活性低于NC组。其中丙二醛反映氧化损伤水平<sup>[18]</sup>,超氧化物歧化酶活性代表抗氧化水平<sup>[19]</sup>。这提示糖尿病大鼠血清中活性氧簇生成增多,抗氧化防御能力下降,提示氧化应激可能参与了糖尿病大鼠视网膜神经细胞的凋亡。另外,本研究通过免疫组织化学法检测视网膜组织Caspase-3蛋白表达后发现,三组在视网膜神经节细胞层、内核层和外核层均可见Caspase-3蛋白表达。但是,与NC组相比,DM组和VitB12组Caspase-3蛋白表达明显增多,而且DM组和VitB12组视网膜Caspase-3光密度值高于NC组,这提示Caspase-3在糖尿病大鼠视网膜神经细胞的凋亡发生中起到一定的作用。综上结果分析,糖尿病大鼠体内过多的活性氧簇可能通过激活Caspase-3来启动视网膜神经细胞的早

期凋亡。

在本实验中,VitB12组用维生素B12灌胃治疗8周,NC组和DM组用等体积生理盐水替代治疗,对比分析结果发现:DM组、VitB12组丙二醛含量高于NC组,DM组高于VitB12组;DM组、VitB12组超氧化物歧化酶活性低于NC组,DM组低于VitB12组。这表明VitB12组大鼠在维生素B12灌胃治疗8周后,其体内的活性氧簇生成较DM组减少,抗氧化防御能力有所增强。3组大鼠视网膜神经节细胞层、内核层和外核层均可见凋亡细胞,但3组AI值有显著差异,其中DM组、VitB12组高于NC组,DM组高于VitB12组。这表明维生素B12可以在一定程度上抑制糖尿病大鼠视网膜神经细胞的凋亡,起到保护视神经的作用。此外,3组在视网膜神经节细胞层、内核层和外核层均可见Caspase-3蛋白表达,DM组、VitB12组Caspase-3蛋白表达高于NC组,DM组高于VitB12组。这提示维生素B12在一定程度上抑制了糖尿病大鼠视网膜Caspase-3蛋白的表达。以上结果说明维生素B12可能通过其抗氧化作用降低Caspase-3蛋白的表达,抑制糖尿病大鼠视网膜神经细胞的凋亡,从而达到保护视神经的作用。

综上所述,维生素B12对糖尿病视网膜神经细胞有一定的保护作用,维生素B12虽然不是最强的抗氧化剂,但其无明显的副作用,已在临床广泛应用于治疗周围神经病变。维生素B12在糖尿病视网膜病变视神经保护方面有较好的临床应用前景,有望成为早期干预和治疗糖尿病视网膜病变的一种临床常规用药。

### 参考文献

[1]

葛坚. 眼科学[M]. 北京:人民卫生出版社,2010:305-308.  
GE J. Ophthalmology[M]. Beijing:People's Medical Publishing House,2010:305-308.

[2]

杨宇,田敏,吕红彬. 糖尿病视网膜病变的治疗进展[J]. 眼科新进展,2015,35(5):497-500.  
YANG Y, TIAN M, LV HB. Recent advances in treatment of diabetic retinopathy[J]. Rec Adv Ophthalmol, 2015, 35(5): 497-500.

[3]

TAM J, DHAMDHARE KP, TIRUVEEDHULA P, LUJAN BJ, JOHNSON RN, BEARSE MA JR, et al. Subclinical capillary changes in non-proliferative diabetic retinopathy[J]. Optom Vis Sci, 2012, 89(5):692-703.

[4]

LI X, ZHANG M, ZHOU H. The morphological features and mitochondrial oxidative stress mechanism of the retinal neurons apoptosis in early diabetic rats[J]. J Diabetes Res, 2014, 2014(26):678123.

[5]

查锡良,药立波. 生物化学与分子生物学[M]. 北京:人民卫生出版社,2013:111-141.  
ZHA XL, YAO LB. Biochemistry and molecular biology[M]. Beijing:People's Medical Publishing House,2013:111-141.

[6]

宋淑萍,郭沛艳,窦若兰,罗惠辛,胡若梅,王娟,等. 叶酸和维生素B12防治糖尿病肾病的研究[J]. 现代中西医结合杂志, 2011, 20(25):3123-3125, 3142.  
SONG SP, GUO PY, DOU RL, LUO HX, HU RM, WANG J, et al. Study on prevention and treatment for diabetic nephropathy with folic acid and vitamin B12[J]. Mod J Integr Tradit Chin West Med, 2011, 20(25):3123-3125, 3142.

[7]

王东强,郭义,李志军,李庆,张书荷. 甲钴胺促进周围神经再生的实验研究[J]. 天津医药,2010,38(03):223-225.  
WANG DQ, GUO Y, LI ZJ, LI Q, ZHANG SH. Experimental

- 

- [2] VILLARROEL M, CIUDIN A, HERNANDEZ C, SIMO R. Neurodegeneration: An early event of diabetic retinopathy[J]. *World J Diabetes*, 2010, 1(2) : 57-64.
- [3] WANG L, DENG QQ, WU XH, YU J, YANG XL, ZHONG YM. Upregulation of glutamate-aspartate transporter by glial cell line-derived neurotrophic factor ameliorates cell apoptosis in neural retina in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2013, 19(12) : 945-953.
- [4] BERK BA, VOGLER S, PANNICKE T, KUHR T, GARCIA TB, WIEDEMANN P, *et al*. Brain-derived neurotrophic factor inhibits osmotic swelling of rat retinal glial (Müller) and bipolar cells by activation of basic fibroblast growth factor signaling[J]. *Neuroscience*, 2015, 295 : 175-186.
- [5] SAITO T, ABE T, WAKUSAWA R, SATO H, ASAI H, TOKITA-ISHIKAWA Y, *et al*. TrkB-T1 receptors on Müller cells play critical role in brain-derived neurotrophic factor-mediated photoreceptor protection against phototoxicity[J]. *Curr Eye Res*, 2009, 34(7) : 580-588.
- [6] HARADA C, GUO X, NAMEKATA K, KIMURA A, NAKAMURA K, TANAKA K, *et al*. Glia- and neuron-specific functions of TrkB signalling during retinal degeneration and regeneration[J]. *Nat Commun*, 2011, 2 : 189.
- [7] REICHENBACH A, BRINGMANN A. New functions of Müller cells[J]. *Glia*, 2013, 61(5) : 651-678.

- [8] SIMÓ R, HERNÁNDEZ C. Neurodegeneration in the diabetic eye; new insights and therapeutic perspectives [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2014, 25(1): 23-33.
- [9] BRUNET A, DATTA SR, GREENBERG ME. Transcription-dependent and-independent control of neuronal survival by the PI3K-Akt signaling pathway [J]. *Curr Opin Neurobiol*, 2001, 11(3): 297-305.
- [10] ARTHUR JS, FONG AL, DWYER JM, DAVARE M, REESE E, OBRIETAN K, *et al*. Mitogen-and stress-activated protein kinase 1 mediates cAMP response element-binding protein phosphorylation and activation by neurotrophins [J]. *J Neurosci*, 2004, 24(18): 4324-4332.
- [11] LEHRE KP, DAVANGER S, DANBOLT NC. Localization of the glutamate transporter protein GLAST in rat retina [J]. *Brain Res*, 1997, 744(1): 129-137.
- [12] LLHA J, CENTENARO LA, BROETTO CUNHA N, DE SOUZA DF, JAEGER M, DO NASCIMENTO PS, *et al*. The beneficial effects of treadmill step training on activity-dependent synaptic and cellular plasticity markers after complete spinal cord injury [J]. *Neurochem Res*, 2011, 36(6): 1046-1055.
- [13] OLA MS, MAWAZ MI, EL-ASRAR AA, ABOUAMMOH M, AL-HOMIDA AS. Reduced levels of brain derived neurotrophic factor (BDNF) in the serum of diabetic retinopathy patients and in the retina of diabetic rats [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2013, 33(3): 359-367.