

论著

文章编号:1000-5404(2014)15-1582-05

## 靶向抑制 GLUT1 对糖尿病视网膜病变中视锥细胞的保护作用

石珂,赵璐,杨玉兰,王盈盈,汪昌运 (330006 南昌,南昌大学第二附属医院眼科)

**[摘要]** **目的** 观察抑制视网膜上葡萄糖转运蛋白-1 (glucose transporter-1, GLUT1) 对糖尿病视网膜病变中视锥细胞的影响。**方法** 27只8周龄 C57BL/6 小鼠按随机数字表法分为正常对照组、糖尿病对照组和 GLUT1 小干扰核糖核酸 (siRNA) 治疗组。腹腔注射链脲佐菌素建立糖尿病模型后, GLUT1 siRNA 治疗组予以玻璃体腔注射靶向 GLUT1 的 siRNA, 正常对照组和糖尿病对照组注射等量非靶向性 siRNA, 以上操作每2周重复注射1次, 共注射9次。建模第18周3组小鼠行明适应视网膜电图检查视锥细胞功能, 免疫荧光共定位法和免疫印迹法检查视网膜 GLUT1 的表达, 测定比较视网膜含糖量, 通过免疫荧光共定位法检查视锥细胞的密度及形态改变。**结果** 与糖尿病对照组相比, GLUT1 siRNA 治疗组小鼠视网膜 GLUT1 表达明显下调, 较正常对照组下降 68.51% ( $P < 0.01$ )。尽管糖尿病对照组和 GLUT1 siRNA 治疗组视网膜组织含糖量均高于正常对照组, 但 GLUT1 siRNA 治疗组小鼠视网膜含糖量比糖尿病对照组低 42.67%, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ); 糖尿病对照组和 GLUT1 siRNA 治疗组小鼠的明适应视网膜电图的 a 波及 b 波振幅均低于正常对照组, 但 GLUT1 siRNA 治疗组较糖尿病对照组分别高 47.59% 和 42.61%, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ); 形态学检查发现糖尿病对照组较 GLUT1 siRNA 组视锥细胞排列稀疏, 外节形态更为短小。**结论** GLUT1 siRNA 通过抑制 GLUT1 表达, 限制转运葡萄糖进入视网膜, 降低视网膜局部含糖量从而对光感受器视锥细胞产生保护作用。

**[关键词]** 葡萄糖转运蛋白-1; RNA, 小分子干扰; 糖尿病视网膜病变; 视锥细胞

**[中图分类号]** R339.146; R342; R774.13 **[文献标志码]** A

## Target inhibition of glucose transport-1 protects cone photoreceptors in diabetic retinopathy mice

Shi Ke, Zhao Lu, Yang Yulan, Wang Yingying, Wang Changyun (Department of Ophthalmology, Second Affiliated Hospital, Nanchang University, Nanchang, Jiangxi Province, 330006, China)

**[Abstract]** **Objective** To determine the effect of glucose transporter-1 (GLUT1) suppression on cone photoreceptors in diabetic retinopathy in mice. **Methods** Twenty-seven 8-week-old C57BL/6 mice were divided into normal control, diabetic control and GLUT1 siRNA treatment group. Diabetic model was established by intraperitoneal injection of streptozotocin. GLUT1 siRNA treatment group received intravitreal injection of siRNA-mediated GLUT1, and the other 2 groups received equal amount of non-specific siRNA. The intravitreal injection procedure was repeated every 2 weeks for 9 times in all. In 18 weeks after diabetic induction, photopic electroretinography (ERG) was performed to evaluate cone photoreceptors function, and immunofluorescence assay and Western blotting were carried out to examine the expression of GLUT1. The glucose concentration was determined in the retina. Immunofluorescence colocalization was employed to determine the density and morphological change of cone photoreceptors. **Results** The expression of GLUT1 was notably down-regulated in GLUT1 siRNA treatment group than diabetic control group, and was lower by 68.51% compared with normal control groups ( $P < 0.01$ ). Retinal glucose concentration was obviously higher in the diabetic control and GLUT1 siRNA treatment group than the normal control, but GLUT1 siRNA treatment group was decreased by 42.67% compared with diabetic control ( $P < 0.01$ ). A-wave and b-wave amplitudes in photopic ERG were lower in diabetic control and GLUT1 siRNA treatment group than the normal control, but GLUT1 siRNA treatment group was increased by 47.59% ( $P < 0.01$ ) and 42.61% ( $P < 0.01$ ) compared with diabetic control, respectively. Morphology examination showed that density of cones were decreased significantly and had a shorten outer-segment appearance in diabetic control group. **Conclusion** GLUT1 siRNA controls

**[基金项目]** 江西省教育厅青年科学基金(GJJ13046)

**[通信作者]** 石珂, E-mail: 86325294@qq.com

**[优先出版]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140717.1655.006.html> (2014-07-17)

the glucose transport into the retina by suppressing the expression of GLUT1, reduces the glucose concentration in retinal environment, and thus protects cone photoreceptors in diabetic retinopathy.

[Key words] glucose transporter type-1; siRNA; diabetic retinopathy; cone photoreceptors

Supported by the Science Foundation for Young Scholars of Jiangxi Provincial Department of Education (GJJ13046). Corresponding author: Shi Ke, E-mail: E-mail:86325294@qq.com

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是糖尿病(diabetes mellitus, DM)最常见和严重的并发症之一,也是全球最主要的致盲性眼病。在我国糖尿病患者中DR的患病率达44%~51.3%<sup>[1]</sup>。虽然DR具体发病机制尚不明确,但世界两大糖尿病多中心试验研究DCCT<sup>[2]</sup>及UKPDS<sup>[3]</sup>均揭示长时期高血糖是发生DR的决定性因素,体内长期高血糖环境会损伤光感受器细胞等视网膜神经元,这也是DR神经退行性变的基础之一。本研究设想通过限制葡萄糖转运进入视网膜而降低视网膜局部含糖量从而对视锥细胞等光感受器细胞产生相对保护作用。葡萄糖转运蛋白-1(glucose transporter-1, GLUT1)是目前已知的葡萄糖通过血-视网膜屏障的唯一载体,其在视网膜中除分布于神经节细胞、光感受器细胞、Müller细胞等,主要表达于血-视网膜内屏障的血管内皮细胞和外屏障的视网膜色素上皮细胞<sup>[4]</sup>。本研究拟利用siRNA靶向抑制GLUT1后,检测比较糖尿病小鼠明适应视网膜电图振幅、视网膜视锥细胞的密度及形态改变,以判断视锥细胞功能和形态的改变。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂和仪器

链脲佐菌素、焦碳酸二乙酯(diethylpyrocarbonate, DEPC)、水和葡萄糖含量测定试剂盒(美国Sigma-Aldrich公司), Western blot电泳系统和蛋白质含量测定试剂盒(美国Bio-Rad公司), Lipofectamine™ RNAiMAX转染试剂(美国Invitrogen公司),花生凝集素(peanut agglutinin, PNA)、4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)和羊抗兔荧光二抗(美国Vector公司),兔抗小鼠GLUT1一抗和兔抗小鼠opsin一抗(美国Millipore公司),RPE65由美国俄克拉荷马大学健康科学中心马建兴教授惠赠,柠檬酸缓冲液和山羊血清(北京天根生化科技有限公司),电子分析天平(上海精科天平厂),复方托吡卡胺滴眼液(日本参天制药株式会社),Espion视网膜电图仪(美国Diagnosys公司),光谱分析仪(德国Spectro公司),倒置荧光显微镜(日本Olympus株式会社),微量注射器(美国Hamilton公司)。

### 1.2 靶向GLUT1的siRNA合成

参考王耀东等<sup>[5]</sup>设计的有效siRNA序列,交由上海吉玛制药技术有限公司合成靶向GLUT1的siRNA,正义链5'-GGAATTC AATGCTGATGATGA-3',反义链5'-TCATCATCAGC-ATTGAATTC-3',另合成非靶向性siRNA作阴性对照,正义链5'-TTCTCCGAACGTGTCACGT-3',反义链5'-ACGTGACAG-TTCGGAGAA-3'。用DEPC处理过的生理盐水将siRNA溶解配制为浓度20 μmol/L。

### 1.3 实验动物与分组

健康8周龄无眼疾近交系雄性C57BL/6小鼠27只,体重20~30 g,清洁级,购自南昌大学动物科学部。将小鼠打上耳钉编号后根据随机数字表分为正常对照组、糖尿病对照组和GLUT1 siRNA治疗组3组,每组9只18眼。建立DM模型:小鼠禁食8 h后腹腔注射链脲佐菌素连续5 d,注射前将链脲佐菌素临时溶于pH 4.5的0.01 mol/L的柠檬酸缓冲液,糖尿病对照组和GLUT1 siRNA治疗组予以50 mg/kg腹腔注射。正常对照组予以等量柠檬酸盐缓冲液。第7天采尾部静脉血测量血糖,DM建模成功标准为血糖大于300 mg/dL。

### 1.4 玻璃体腔注射siRNA

3组小鼠予以腹腔麻醉后,眼部周围碘伏消毒,然后在显微镜下使用Hamilton微量注射器于角膜缘外1 mm向视神经方向进针,于瞳孔区见针尖后缓慢注射药物。GLUT1 siRNA治疗组于玻璃体腔内注入含20 μmol/L靶向GLUT1的siRNA 1 μL以及转染试剂1 μL的混合液,正常对照组和糖尿病对照组于玻璃体腔内注入含20 μmol/L非靶向性siRNA 1 μL以及转染试剂1 μL的混合液。每2周重复注射1次,共注射9次。

### 1.5 明适应视网膜电图检查

于建模第18周行明适应视网膜电图检查。3组小鼠使用复方托吡卡胺滴眼液散瞳后放于暗室过夜,次日予以氯胺酮(10 mg/kg)和赛拉嗪(60 mg/kg)混合液麻醉。然后将小鼠置于加热温板上,参比电极和接地电极插入腭部和尾巴,铂制角膜电极置于双眼角膜上并予以重组牛碱性成纤维细胞生长因子眼用凝胶润滑,在暗室弱红光照明下完成以上操作后开灯明适应10 min,然后在2 000 cd·s/m<sup>2</sup>光照强度下记录明视视网膜电图反应。

### 1.6 视网膜组织含糖量检测

3组小鼠完成视网膜电图检查后脊椎脱臼法处死,剔除6只眼球用作测量视网膜含糖量,取视网膜组织并加入50 μL去离子水,加热至70~75℃共15 min,然后超声裂解30 s,离心20 min后取上清液35 μL移至165 μL葡萄糖含量测定试剂,并设立标准曲线和空白对照,应用光谱分析仪测定标本的光密度,然后应用SPECTRO STAR NANO MARS软件计算葡萄糖浓度。再取10 μL上清液加至190 μL蛋白质含量测定试剂,同样设立标准曲线和空白对照,应用光谱分析仪测定标本的光密度,然后应用SPECTRO STAR NANO MARS软件计算蛋白质浓度。视网膜葡萄糖含量单位nmol/mg,计算公式:G×GV/GMW×(P×PV)。G:葡萄糖浓度(ng/mL);GV:葡萄糖含量测定反应液容积(mL);P:蛋白质浓度(mg/mL);PV:蛋白质含量测定反应液容积(mL);GMW:葡萄糖分子量(180.2)。

### 1.7 免疫荧光共定位法

将处死的小鼠剔除6只眼球后直接放入4%多聚甲醛固定1 h,剪除角膜和晶体后再次放入4%多聚甲醛固定15 min,后续步骤按《医学免疫学实验技术》<sup>[6]</sup>所述,制得石蜡切片后按常规方法进行脱蜡及抗原热修复等处理后孵育opsin一抗,次

日孵育二抗和PNA,加入DAPI封片,使用荧光显微镜观察。

### 1.8 免疫印迹法

将处死的小鼠剔除6只眼球后取视网膜组织放入Eppendorf管后加入200 μL裂解液,同时在眼杯中加入5 μL裂解液5 min以提取视网膜色素上皮层蛋白质,后续步骤按《医学免疫学实验技术》<sup>[6]</sup>所述,取等量蛋白样品进行SDS-PAGE电泳、转膜、孵育一抗及二抗后,进行凝胶图像分析并测定条带灰度值。

### 1.9 统计学处理

采用SPSS 17.0统计软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析及t检验。

## 2 结果

### 2.1 糖尿病模型的建立以及3组小鼠体质量和血糖水平测定

18只拟建糖尿病模型的雄性C57BL/6小鼠(糖尿病对照组和GLUT1 siRNA治疗组)经腹腔注射链脲佐菌素后第7天测得血糖均大于300 mg/dL,建模成功率100%。建模后第18周行明适应视网膜电图前予以再次测量体质量及血糖水平。发现,3组小鼠在刚建模成功时体质量差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),然而建模后第18周正常对照组小鼠较2组糖尿病小鼠(糖尿病对照组和GLUT1 siRNA治疗组)分别重28.44%和27.70%,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。2组糖尿病小鼠体型均消瘦,饮水量、进食量和尿量均较正常对照组多。血糖水平在刚建模成功时和建模后第18周正常对照组小鼠较糖尿病对照组低49.31%和55.85%,较GLUT1 siRNA治疗组低49.82%和54.36%,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),糖尿病对照组和GLUT1 siRNA治疗组在2个测量时间点血糖水平无统计学差异(表1)。

表1 3组小鼠的体质量和血糖水平比较( $n=9, \bar{x} \pm s$ )

组别	体质量(g)		血糖(mg/dL)	
	建模后第1天	建模后第18周	建模后第1天	建模后第18周
正常对照组	23.30 ± 1.58	31.07 ± 2.43	173.29 ± 20.36	166.13 ± 23.22
糖尿病对照组	22.16 ± 2.27	24.19 ± 3.12 <sup>a</sup>	341.23 ± 59.18 <sup>a</sup>	376.23 ± 52.96 <sup>a</sup>
GLUT1 siRNA组	22.88 ± 3.28	24.33 ± 3.20 <sup>a</sup>	345.13 ± 59.30 <sup>a</sup>	364.02 ± 77.23 <sup>a</sup>

a:  $P < 0.05$ ,与正常对照组比较

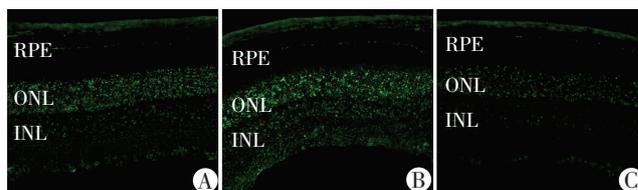
### 2.2 视网膜组织含糖量的测定

正常对照组小鼠视网膜含糖量为(38.72 ± 2.32) nmol/mg, 18周时糖尿病对照组小鼠视网膜含糖量高达(148.69 ± 7.13) nmol/mg, GLUT1 siRNA治疗组为(85.14 ± 3.93) nmol/mg, 2组糖尿病模型小鼠的视网膜含糖量均高于正常对照组,差异有统计学意义( $P < 0.01$ ), GLUT1 siRNA治疗组比糖尿病对照组低46.67%,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。

### 2.3 GLUT1在3组小鼠视网膜中的表达

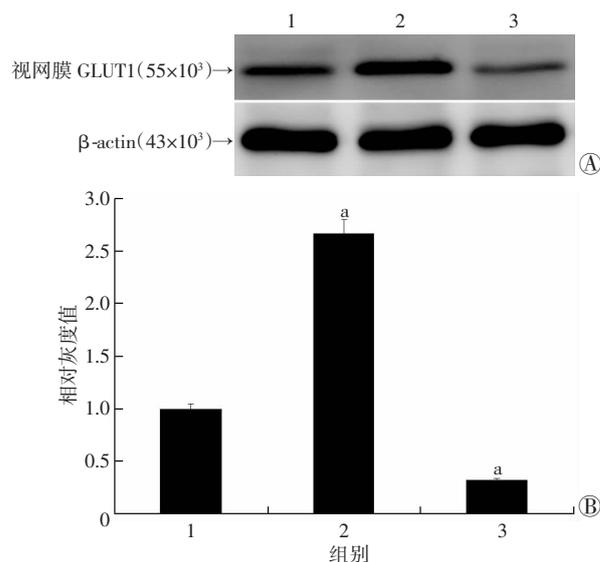
分别应用免疫荧光共定位法和免疫印迹法检测GLUT1在小鼠视网膜中的表达,发现正常条件下GLUT1在视网膜广泛表达,在糖尿病条件下其表达上调。使用靶向GLUT1的siRNA处理后,GLUT1表达下降(图1)。应用免疫印迹法后进行统计学分析发现GLUT1 siRNA治疗组小鼠神经视网膜层GLUT1较正常对照组表达约下降68.51%,仅为糖尿病对照组的11.99%,

差异均有统计学意义( $P < 0.01$ ,图2)。然而色素上皮层上GLUT1虽仅为糖尿病对照组49.49%,差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),但与正常对照组比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ ,图3)。



A: 正常对照组; B: 糖尿病对照组; C: GLUT1 siRNA治疗组; 绿色: GLUT1; RPE: 视网膜色素上皮层; ONL: 外核层; INL: 内核层

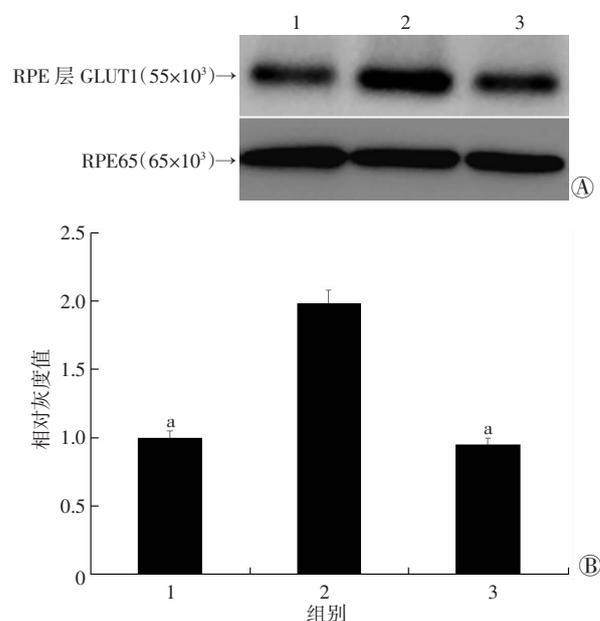
图1 免疫荧光法检测GLUT1在小鼠视网膜中的表达(荧光显微镜×400)



1: 正常对照组; 2: 糖尿病对照组; 3: GLUT1 siRNA治疗组

A: Western blot检测; B: 半定量分析 a:  $P < 0.01$ ,与正常对照组比较

图2 免疫印迹法检测GLUT1在小鼠神经视网膜层中的表达



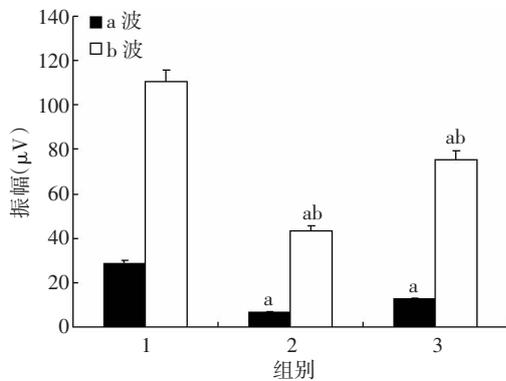
1: 正常对照组; 2: 糖尿病对照组; 3: GLUT1 siRNA治疗组

A: Western blot检测; B: 半定量分析 a:  $P < 0.01$ ,与糖尿病对照组比较

图3 免疫印迹法检测GLUT1在小鼠视网膜色素上皮层中的表达

## 2.4 明适应视网膜电图的改变

糖尿病对照组和 GLUT1 siRNA 治疗组的小鼠明适应视网膜电图的 a 波及 b 波振幅均较正常对照组低, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), 但 GLUT1 siRNA 组小鼠的明适应视网膜电图的 a 波及 b 波振幅较糖尿病对照组高 47.59% 和 42.61% ( $P < 0.01$ , 图 4)。



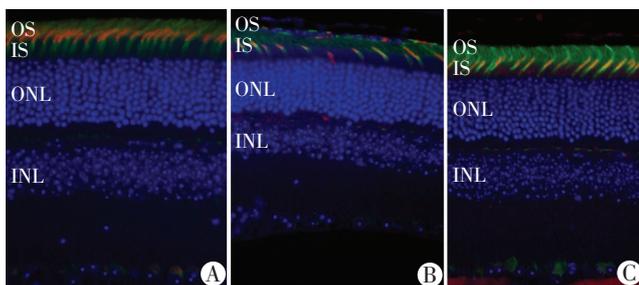
1: 正常对照组; 2: 糖尿病对照组; 3: GLUT1 siRNA 治疗组

a:  $P < 0.01$ , 与正常对照组比较; b:  $P < 0.01$ , 与糖尿病对照组比较

图 4 3 组小鼠明适应视网膜电图 a 波及 b 波振幅统计学分析

## 2.5 视锥细胞形态学改变

免疫荧光共定位法检测 3 组小鼠视网膜视锥细胞的形态学改变发现, 与正常对照组相比较, 糖尿病对照组和 GLUT1 siRNA 治疗组的视锥细胞密度均发生下降, 排列较稀疏, 糖尿病对照组这种改变更为明显, 且其外节形态也较 GLUT1 siRNA 治疗组短小。见图 5。



A: 正常对照组; B: 糖尿病对照组; C: GLUT1 siRNA 治疗组; 绿色: PNA; 红色: opsin; 蓝色: DAPI; OS: 视锥细胞外节; IS: 视锥细胞内节; ONL: 外核层; INL: 内核层

图 5 免疫荧光共定位法检测 3 组小鼠视网膜视锥细胞的形态学变化 (荧光显微镜  $\times 400$ )

## 3 讨论

DR 是糖尿病最常见和严重的眼部并发症, 严重威胁着患者的生活质量, 已成为一个广泛的公众健康问题。一直以来 DR 被认为是糖尿病微血管病变, 因此大量基础研究集中于微血管病变方面, 但近年来学者发现糖尿病动物模型视网膜神经细胞死亡增加, 星形胶质细胞和 Müller 细胞中 GFAP 表达异常以及小胶

质细胞活化, 基于此学者们逐渐共识 DR 还是一种慢性神经退行性变。光感受器是重要的视网膜神经元, 负责一级视觉传导通路。光感受器的退行性变是糖尿病患者未出现 DR 之前发生色觉异常、对比敏感度异常的主要原因, 也是 DR 的重要早期病理改变<sup>[7]</sup>。国内也有报道应用闪光视网膜电图检查发现非增殖期 DR 的患者在未出现眼底新生血管等微血管病变时已出现了视网膜光感受器功能障碍<sup>[8]</sup>。目前研究认为 DR 神经退行性变可能的机制包括氧化应激<sup>[9]</sup>、糖基化终产物增多<sup>[10]</sup>和肾素血管紧张素系统激活<sup>[11]</sup>等, 而且神经退行性变早于 DR 微血管病变<sup>[12]</sup>。研究<sup>[2-3]</sup>已揭示长时期血糖位于高水平是糖尿病患者罹患 DR 的决定性因素。高糖环境下氧化应激产物生成过量、蛋白激酶 C 激活、糖基化终末产物合成增多等启动了视网膜组织细胞包括光感受器等神经细胞的损伤<sup>[13]</sup>。视锥细胞是光感受器的重要组成部分, 虽然其数量只占光感受器的 3%, 但由于其生理作用为昼光觉和色觉, 故现代社会环境下视锥细胞受损相对更加影响患者的视功能及日常生活<sup>[14]</sup>。既然糖尿病条件下视锥细胞所处的高糖微环境对其有损伤效应, 那么控制视网膜组织局部含糖量、改善其高糖环境可能是解决此问题的一把钥匙, 视网膜的葡萄糖由血液转运而来, 然而葡萄糖由于其水溶性而无法通过哺乳动物细胞膜的磷脂双分子层, 因此视网膜组织细胞摄取葡萄糖需依靠一类转运葡萄糖的载体蛋白即 GLUT1<sup>[15]</sup>, GLUT1 是葡萄糖通过血—视网膜屏障的唯一载体<sup>[4]</sup>。

siRNA 是一类 19~21 bp 大小的 RNA 片段, 它可特异性降解某特定基因 mRNA, 从而对该基因产生抑制作用。本实验参考既往研究有效的 GLUT1 siRNA 序列并进行局部应用以观察是否可以减少葡萄糖转运进入视网膜。如前所述, 2 组糖尿病小鼠的总体血糖水平在建模后第 18 周差异无统计学意义, 然而 GLUT1 siRNA 组在接受玻璃体腔注射 GLUT1 siRNA 后, 视网膜组织中 GLUT1 表达相应下调, 较糖尿病对照组下降约 88.01%, 较正常对照组约下降 68.51%。我们同时测得 GLUT1 siRNA 治疗组视网膜局部含糖量较糖尿病对照组低 42.67%, 说明 GLUT1 siRNA 抑制 GLUT1 后确实可以有效减少葡萄糖转运进入视网膜。但是我们也发现 GLUT1 siRNA 治疗组视网膜局部含糖量仍然较正常对照组高约 54.48%, 其原因在于我们使用玻璃体腔法注射 GLUT1 siRNA 对视网膜内屏障的 GLUT1 有明显的抑制作用, 然而对 RPE 层即视网膜外屏障作用有限, RPE 层 GLUT1 表达未出现

明显下调,同时由于糖尿病条件下 GLUT1 其生物学活性较正常条件下上调<sup>[16]</sup>,因此从视网膜外屏障转运进入的葡萄糖导致 GLUT1 siRNA 治疗组视网膜含糖量较正常对照组高。但我们通过限制内屏障 GLUT1 也已达到了我们假说所设定的条件,接下来我们则通过明适应视网膜电图法和免疫荧光共定位法检查局部含糖量减少是否可以影响视锥细胞的功能及形态。

明适应视网膜电图是闪光视网膜电图检测内容的一部分,它采用白色标准闪光刺激时视锥细胞产生的电位,可通过角膜表面的铂制电极进行无创记录<sup>[17]</sup>。明适应视网膜电图常用于反映视锥细胞的功能状态,临床上譬如进行性视锥细胞营养不良,全色盲等视锥细胞相关性疾病均可见明适应视网膜电图的异常<sup>[18]</sup>。本实验发现 GLUT1 siRNA 治疗组小鼠明适应视网膜电图的 a 波及 b 波波幅尽管比正常对照组小鼠低,但比糖尿病对照组分别高 47.59% 和 42.61%。提示 GLUT1 siRNA 限制葡萄糖转运进入视网膜后糖尿病小鼠视锥细胞的功能损害相对较轻,视网膜的相对低糖环境对视锥细胞产生了保护作用。本研究在完成视锥细胞功能评估后采用 PNA 对视锥细胞进行整体标记,此外由于视锥细胞中感受强光和色觉的视蛋白主要分布于外节上,还采用 opsin 标记视锥细胞外节<sup>[19]</sup>进行免疫荧光共定位检查以观察视锥细胞结构的改变,发现糖尿病对照组较 GLUT1 siRNA 治疗组视锥细胞排列稀疏,外节形态短小,提示本研究中尽管视锥细胞在糖尿病条件下不断死亡,但 GLUT1 siRNA 治疗组的视锥细胞损伤及死亡相对较少,同样说明视网膜的相对低糖环境对视锥细胞产生了保护作用。

尽管由于目前方法学的局限,通过 GLUT1 siRNA 局部注射我们无法同时显著抑制视网膜内屏障及外屏障 GLUT1,但限制内屏障 GLUT1 后发现糖尿病小鼠的视网膜已足以形成一个相对低糖环境。在此环境下,视锥细胞的功能和形态学病变均较普通糖尿病小鼠有所缓解。提示通过靶向抑制 GLUT1 从而限制视网膜局部含糖量有可能成为未来防治 DR 的一个新方向。

### 参考文献:

[1] 葛坚. 眼科学[M]. 2版. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 251-252.  
[2] The Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Research Group. Retinopathy and nephropathy in patients with type 1 diabetes four years after a trial of

intensive therapy[J]. *N Engl J Med*, 2000, 342(6): 381-389.  
[3] UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33)[J]. *Lancet*, 1998, 352(9131): 837-853.  
[4] Thorens B, Mueckler M. Glucose transporters in the 21st Century[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2010, 298(2): E141-E145.  
[5] 王耀东, 李生娇, 廖建兴. GLUT1 基因有效 siRNA 序列的筛选实验研究[J]. *口腔颌面外科杂志*, 2012, 22(5): 312-317.  
[6] 柳忠辉. 医学免疫学实验技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 38-105.  
[7] 李筱荣, 黎晓新, 惠延年. 糖尿病眼病[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 131-212.  
[8] 方晏红. 非增生性糖尿病视网膜病变的视网膜电图特征研究[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2012.  
[9] Wong T Y, Simo R, Mitchell P. Fenofibrate-a potential systemic treatment for diabetic retinopathy[J]. *Am J Ophthalmol*, 2012, 154(1): 6-12.  
[10] Chen M, Curtis T M, Stitt A W. Advanced glycation end products and diabetic retinopathy[J]. *Curr Med Chem*, 2013, 20(26): 3234-3240.  
[11] Sjolje A K, Dodson P, Hobbs F R. Does renin-angiotensin system blockade have a role in preventing diabetic retinopathy? A clinical review[J]. *Int J Clin Pract*, 2011, 65(2): 148-153.  
[12] Villarreal M, Ciudad A, Hernandez C, et al. Neurodegeneration: An early event of diabetic retinopathy[J]. *World J Diabetes*, 2010, 1(2): 57-64.  
[13] Gerales P, Hiraoka-Yamamoto J, Matsumoto M, et al. Activation of PKC-delta and SHP-1 by hyperglycemia causes vascular cell apoptosis and diabetic retinopathy[J]. *Nat Med*, 2009, 15(11): 1298-1306.  
[14] Punzo C, Xiong W, Cepko C L. Loss of daylight vision in retinal degeneration: are oxidative stress and metabolic dysregulation to blame? [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(3): 1642-1648.  
[15] Gospe S M 3rd, Baker S A, Arshavsky V Y. Facilitative glucose transporter Glut1 is actively excluded from rod outer segments [J]. *J Cell Sci*, 2010, 123(Pt 21): 3639-3644.  
[16] Zhang J Z, Gao L, Widness M, et al. Captopril inhibits glucose accumulation in retinal cells in diabetes[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2003, 44(9): 4001-4005.  
[17] Ryan S J. 视网膜[M]. 黎晓新, 赵家良, 译. 天津: 天津科技翻译出版公司, 2011: 180-203.  
[18] 张承芬. 眼底病学[M]. 2版. 北京: 人民卫生出版社, 2013: 85.  
[19] Gaillard F, Kuny S, Sauve Y. Topographic arrangement of S-cone photoreceptors in the retina of the diurnal Nile grass rat (*Arvicantis niloticus*)[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2009, 50(11): 5426-5434.

(收稿:2014-04-09;修回:2014-05-30)  
(编辑 张 维)