

糖尿病视网膜病变与凋亡相关因子的研究进展

韩佩晏, 吕红彬

作者单位: (646000) 中国四川省泸州市, 西南医科大学附属医院眼科

作者简介: 韩佩晏, 在读硕士研究生, 研究方向: 玻璃体视网膜疾病。

通讯作者: 吕红彬, 博士, 主任医师, 教授, 研究方向: 玻璃体视网膜疾病. oculistlvhongbin@163.com

收稿日期: 2016-01-12 修回日期: 2016-04-06

Research progress of diabetic retinopathy and apoptosis-relating genes

Pei-Yan Han, Hong-Bin Lü

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

Correspondence to: Hong-Bin Lü. Department of Ophthalmology, the Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan Province, China. oculistlvhongbin@163.com

Received: 2016-01-12 Accepted: 2016-04-06

Abstract

• Researches have shown that cell apoptosis participates pathogenesis of diabetic retinopathy, which is a process of polygenes regulation. The B-cell leukemia/lymphoma-2 (Bcl-2) family and Fas are all important genes that can regulate apoptosis. This article reviews the relation between diabetic retinopathy and apoptosis as well as expression of some related genes.

• KEYWORDS: diabetic retinopathy; apoptosis; B - cell leukemia/lymphoma-2; cytoine

Citation: Han PY, Lü HB. Research progress of diabetic retinopathy and apoptosis-relating genes. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2016;16(5):859-863

摘要

细胞凋亡是一个复杂的多基因调控过程,其参与了糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)的发病机制, B 细胞淋巴瘤/白血病 2 (B-cell leukemia/lymphoma-2, Bcl-2)、Fas 等都是重要的凋亡调节基因。本文就 DR 与凋亡的关系及其某些相关基因的表达予以综述。

关键词: 糖尿病视网膜病变; 凋亡; B 细胞白血病/淋巴瘤 2; 细胞因子

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2016.5.17

引用: 韩佩晏, 吕红彬. 糖尿病视网膜病变与凋亡相关因子的研究进展. *国际眼科杂志* 2016;16(5):859-863

0 引言

糖尿病是在全球范围内导致死亡和残疾的主要原因之一。据国际糖尿病联盟(International Diabetes Federation, IDF)在 2011 年的报道,全球约有 3.66 亿人患有糖尿病,而这一数据在 2030 年将会达到 5.52 亿^[1]。糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是糖尿病最常见的并发症之一,已成为全球工作年龄人群致盲的首要原因。其临床特征主要有毛细血管通透性增加、视网膜水肿以及内皮细胞增生^[2]。糖尿病导致 DR 发生的机制非常复杂,目前尚未完全明确。其发病机制的研究主要集中在多元醇通路、非酶糖基化学说、氧化应激和蛋白激酶 C 的活化等,无论哪一种机制视网膜细胞的凋亡是其共同的通路^[2]。大多数的研究更关注血管的改变,而在视网膜发生血管病变之前会出现一些退行性的改变,包括神经节细胞凋亡、小胶质细胞激活、谷氨酸代谢改变等^[3]。由 STZ 诱导的糖尿病大鼠在糖尿病发生后很快就会出现视网膜神经和血管细胞的凋亡^[4]。目前视网膜细胞凋亡已被视作导致视网膜神经退行性改变、血管功能异常、DR、青光眼等不可逆致盲眼病的中心事件^[4]。本文就凋亡相关基因与 DR 的研究进展予以综述。

1 细胞凋亡的特征及相关基因

1.1 细胞凋亡的概况 细胞凋亡(apoptosis)是指生物体为维持内环境稳定,细胞在一定的生理或病理条件下,由基因控制的高度有序的并由一系列酶活动参与的细胞自主的死亡,是生物体为了更好地适应生存环境,遵循自身的程序而主动结束其生命的过程,又称为细胞程序性死亡(programmed cell death, PCD),它涉及一系列基因的激活、表达以及调控^[5]。凋亡的细胞有细胞质出泡和细胞核出泡的现象。伴随着出泡现象的发生,细胞核发生了改变,染色质固缩,附着于核膜上,产生大小不同的被膜包围的凋亡小体。凋亡小体被周边有吞噬功能的细胞吞噬清除,从而避免了炎症反应的发生。细胞凋亡是受凋亡相关基因调控的,它可自动地清除多余的特异性或分化能力和机体不相适应的、以及已经完成功能而又不再应用的细胞;清除有潜在危险的细胞,如自身反应性淋巴细胞, DNA 损伤又得不到修复的癌化危险细胞等。细胞凋亡可由以下因素来诱导:(1)理化因素:如射线、高温、抗癌药物等;(2)激素和生长因子失衡;(3)免疫因素;(4)生物因素:细菌、病毒等病原微生物。大多数情况下,来自于细胞外的细胞凋亡诱导因素作用于细胞后可转化为细胞凋亡信号,并通过胞内不同的信号转导途径,最终激活细胞死亡程序,导致细胞凋亡。因此,凋亡信号转导系统是连接凋亡诱导因素与核 DNA 片段化断裂及细胞结构蛋白降解的中间环节。当调控凋亡的基因接收到信号转导途径传来的

死亡信号后,就按照既定的程序启动,并合成执行凋亡所需的各种酶类及相关物质。

1.2 细胞凋亡的基因控制 细胞凋亡是多基因调控的过程。根据对细胞凋亡作用的不同,将细胞凋亡调控基因分为两大类:一类为促进细胞凋亡的基因,如线虫的 *ced-3*、*ced-4*,哺乳动物的 ICE (IL-1 β converting enzyme, ICE)、野生型 p53、Fas/Apo-1 等;另一类为抑制细胞凋亡的基因,称为细胞死亡抑制基因 (cell death suppressor gene),如线虫的 *ced-9*、哺乳动物的 Bcl-2^[6]。

Bcl-2 是 B 细胞淋巴瘤/白血病 2 (B cell lymphoma/leukemia, Bcl-2) 的缩写形式,它是第一个被确认有抑制凋亡作用的基因,是研究最早且与凋亡有关的、位于 t (14,18) 染色体异位断点的原癌基因,是人类滤泡型淋巴瘤的细胞遗传标志物,具有阻断程序化细胞死亡的作用。Bcl-2 蛋白主要分布在线粒体内膜、细胞膜内表面、内质网、核膜等处。广泛存在于造血细胞、上皮细胞、淋巴细胞、神经细胞及多种瘤细胞。Bcl-2 的高表达能抑制多种凋亡诱导因素 (如射线和化学药物等) 所引发的细胞凋亡,如依赖神经生长因子的神经细胞,当撤除神经生长因子后,细胞会迅速发生凋亡,如果将表达 Bcl-2 的基因质粒注入细胞中,则可防止神经细胞凋亡。目前认为该家族可细分成两大类:抗凋亡成员,如 Bcl-2、Bcl-XL、Bcl-W、髓细胞白血病因子-1 (MCL-1)、Bcl-2 相关蛋白 A1、Bcl-B 等,它们能使细胞免受凋亡;促凋亡成员,如 Bax、Bik、Bak、BH3-only 死亡蛋白。

p53 作为一种抑癌基因,在促进肿瘤细胞发生凋亡中有重要的作用。野生型的 p53 基因编码的 p53 蛋白是一种 DNA 结合蛋白,该蛋白在细胞周期的 G 期发挥调控点的作用,负责检查染色体 DNA 是否损伤,一旦发现缺陷 DNA,它启动 DNA 修复机制。如果修复失败,则活化诱导细胞凋亡基因 (如 *bax*) 的转录,促使损伤的细胞凋亡,避免细胞的癌变。若 p53 突变,则此功能丧失,且促进细胞增殖。

Myc 是常见的一种原癌基因,其基因家族主要含有三个成员:c-myc 基因、N-myc 基因、L-myc 基因,c-myc 既具有转录的功能又能抑制转录;既能诱导细胞周期的进程又有产生程序细胞死亡的作用。这主要是因为 c-myc 基因可以产生两种翻译产物,c-myc1 和 c-myc2,其作用是不同的,甚至可以说是相反的。可以认为 c-Myc2 与细胞的生长、分化和增殖与肿瘤的发生有关;c-Myc1 有抑制 c-Myc2 的作用,但在不同时期、不同位点表现出不同的功能,同时还受本身质和量的影响,也受细胞所处微环境的影响。总之,c-myc 基因及其表达蛋白产物 c-Myc12 在细胞的生长、分化过程中起重要作用,弄清它们的结构及作用机制,对于疾病的诊治具有重要的意义。

Fas 是肿瘤坏死因子受体和神经生长因子受体家族的细胞表面分子,Fas 配体 (fas ligand, FasL) 是肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 家族的细胞表面分子。FasL 与其受体 Fas 结合导致携带 Fas 的细胞凋亡,故称之为死亡受体。人的 Fas 包含 325 个氨基酸。氨基端有信息顺序 (signal sequence),分子中都有跨膜区,属 I 类膜蛋

白,分子量为 45kD。结构分析证实 Fas 属于 TNF 和 NGF 受体家族。研究表明多种哺乳细胞表达 Fas,而 FasL 仅表达于活化的 T 细胞。抗 Fas 抗体、表达 FasL 的细胞和可溶性的 FasL 与 Fas 交联均产生细胞凋亡信息。经 Fas 诱导的细胞凋亡有以下几个特点:(1) 细胞浆及细胞核出现固缩及片段形成;(2) 凋亡并不要求有细胞核存在;(3) 不依赖于细胞外钙离子及细胞内大分子合成;(4) Bcl-2 过度表达或 Bcl-2 与结合蛋白 BAG-1 的共表达 (coexpression) 能抑制 Fas 致凋亡作用。

肿瘤坏死因子 (TNF) 是一种具有多种生物学效应的细胞因子,包括促进细胞生长、分化、凋亡及炎症诱发等。大多数正常细胞能抵抗 TNF 的细胞凋亡作用,被认为是由于在 TNF 与受体结合后细胞内缺乏某种令细胞裂解的信号;或由于 TNF 作用后细胞产生了保护性蛋白,使其免受 TNF 的细胞毒作用。研究发现,TNF 能诱导某些正常细胞凋亡,并提示当机体处于某病理状态时,这些作用具有一定的病理生理学意义。TNF 诱导人或动物血管内皮细胞、心肌细胞、肝细胞、造血干细胞、肾小球系膜细胞等细胞凋亡。TNF- α 对 DR 的发生发展起着重要的作用,表现在 TNF- α 参与视网膜血管屏障的破坏、血管通透性增加、视网膜局部缺氧等病理改变^[7]。

目前在哺乳动物细胞中已发现 14 种 ICE/Ced-3 蛋白酶家族成员,称为天冬氨酸特异的半胱氨酸蛋白酶 (cysteinyI aspartate specific proteinase, caspase),又称为“半胱天冬酶”。它们具有相似的氨基酸序列、结构和底物特异性。其家族成员的命名按发现的先后时间,在“caspase”后以阿拉伯数字表示,现已发现的 caspase 有 caspas-1~14。根据 caspase 的功能,可将其分为两大家族,一是 caspase-1 大家族,该亚家族成员主要参与炎症反应;另一 caspase-3 亚家族包括 caspase-3、6~10 等,它们介导细胞凋亡。细胞凋亡激活的生化途径包括细胞内、细胞外和 caspase 依赖型、非 caspase 依赖型^[8]。启动型凋亡蛋白包括 caspase-8、-9,一旦激活,这些蛋白便裂解并激活下游的效应凋亡蛋白,包括 caspase-3、-6、-7,以执行凋亡^[9]。Oshitari 等^[10]通过实验证明表达上调的 caspase-3、-9 和 Bax 与 DR 节细胞层的神经退行性改变密切相关。

2 DR 与细胞凋亡

2.1 DR 的病理变化 DR 中首先出现的病理改变是覆盖视网膜毛细血管的周细胞减少。毛细血管内皮细胞凋亡是由以下一些原因引起:如糖代谢异常、蛋白激酶 C 的激活、AGE 的形成、ROS 的增多、Müller 细胞促炎症因子的释放、视网膜小胶质细胞或黏附于毛细血管内皮细胞的白细胞、由血小板衍生生长因子激发的生存信号丢失、抑制血管生成信号或一些其他因子的上调^[11]。再灌注损伤和视网膜缺血能引起促新生血管因子的上调,如 VEGF、促红细胞生成素以及其他血管生成因子。这些因子能促进增生性 DR 的发生,并且引起血管渗漏。视力损害可继发于视网膜前血管形成后所致的玻璃体出血或黄斑前膜。细胞内稳态的改变以及血管生理的改变能引起一些血管并发症,能影响所有血管细胞的主要功能。血管通透性的增加以及周细胞的凋亡是 DR 的显著特征^[12]。

Mizutani 等^[13]曾采用 TUNEL 法检测经胰蛋白酶消化过的人体及动物的视网膜血管的凋亡,结果显示相较于没有糖尿病的志愿者,在平均有 9±4a 糖尿病史的志愿者的离体视网膜标本中检测出少量但很显著的血管细胞凋亡。在采用 STZ 诱导 31wk 后的糖尿病大鼠的视网膜中同样能得出这样的结果^[14]。还有一些其他研究同样证明了在糖尿病视网膜^[15]和 db/db 小鼠^[16]视网膜中的血管凋亡明显增多。Podestà 等^[17]用 TUNEL 标记人体的视网膜周细胞,发现在糖尿病患者中的阳性率是增高的,并且 Bax 的局部免疫反应性是增加的。对离体人视网膜进行的实验显示,一些血管虽然没有周细胞但仍有完整的内皮细胞,并且有微动脉瘤的血管通常没有周细胞,这说明周细胞的缺失使内皮细胞的生长不受控制^[18]。先采用胰蛋白酶使血管细胞从视网膜中分离再行病理检查,STZ 诱导的糖尿病大鼠视网膜及离体人视网膜的组织切片用 TUNEL 标记,结果显示糖尿病能增加神经细胞的凋亡,特别是在神经节细胞所在的内层视网膜^[19]。当 TUNEL 标记应用于全视网膜时,凋亡细胞的数量就能够量化,且大概是经胰蛋白酶消化的视网膜的 10 倍,这意味着在糖尿病中非血管细胞同样在发生凋亡^[20]。这些发现预示着神经细胞凋亡较血管细胞早,并且神经细胞凋亡的比例在糖尿病的病程中较为恒定。其他研究者采用同样的方法也得出同样的结果^[21]。以上实验都证明了糖尿病能引起视网膜神经细胞和血管细胞的凋亡,并且神经细胞的凋亡发生更早、持续时间更长。

2.2 Bcl-2 在 DR 中的表达 Bcl-2 家族被分为抗凋亡和促凋亡蛋白。抗凋亡 Bcl-2 蛋白能通过结合或抑制促凋亡蛋白以促生存及保持线粒体外膜的完整性;促凋亡蛋白能促进死亡和中和抗凋亡 Bcl-2 蛋白,并且能激活线粒体外膜的透化作用(MOMP)^[22]。抗凋亡 Bcl-2 蛋白最初的功能是对抗促凋亡 Bcl-2 蛋白,从而抑制 MOMP,并且阻断线粒体凋亡通路。在早期糖尿病大鼠视网膜血管和神经细胞中,凋亡相关基因 Bcl-2 和 Bax 的表达随病程的进展而增强,二者在糖尿病视网膜细胞凋亡中起重要作用。研究发现,将视网膜毛细血管周细胞置于高浓度的葡萄糖溶液中体外培养,观察到毛细血管周细胞的大量凋亡,并且细胞中 Bcl-2/Bax 的比率降低,由此认为 Bax 基因表达增强与 Bcl-2 基因表达减少可能加速了周细胞的凋亡,对周细胞的凋亡起到了调控作用。Bcl-2 作为一个抗凋亡因子,能够抑制细胞色素 C 的释放以及促凋亡因子的活动。Li 等^[23]通过 STZ 诱导糖尿病小鼠模型,并采用免疫组织化学、Western blot 等对 Bcl-2、Bax 进行检测,发现其在神经节细胞层(GCL)及内颗粒层(INL)的表达呈阳性,糖尿病组相较于正常组 Bax 的表达显著升高,Bcl-2 的表达相对减少,Bcl-2/Bax 值明显减低的。在糖尿病患者视网膜中同样能发现神经细胞的凋亡,这一点与动物实验相同。有数据表明在糖尿病视网膜中能发现血管及神经的凋亡^[24]。

2.3 Fas/FasL 在 DR 中的表达 当内皮细胞受损和血-视网膜屏障被破坏后,血小板聚集在受损血管处,这在一定程度上可修补被破坏的血-视网膜屏障。在糖尿病患者及大鼠的视网膜中都能发现血小板微血栓,并且在空间

上与内皮细胞凋亡有关^[25]。血小板的聚集与 DR 中 Fas/FasL 的表达一致。在糖尿病中白细胞表达的 FasL 与内皮细胞的凋亡密切相关。有实验结果显示,在体内阻断 FasL 的表达可以抑制内皮细胞的损伤、血管渗漏、血小板聚集,意味着 Fas/FasL 系统是内皮细胞受损与血小板聚集的原因^[26]。虽然视网膜内皮细胞的凋亡是 DR 的主要标志,但是糖尿病如何导致血管内皮细胞受损及凋亡的机制却不甚清楚,可能与 FasL、IL-1 β 等增多有关。

2.4 caspase 在 DR 中的表达 caspase 家族包含 14 种半胱氨酸蛋白酶,与凋亡密切相关^[27]。caspase 可根据同源的序列分为 3 个亚族:caspase-1(前体 ICE 家族)、caspase-2(ICE 同源物 ICH-1)家族、caspase-3(半胱氨酸蛋白 32 即 CPP-32)。不同的 caspase 家族成员参与至少 1~2 个不同的信号通路,如促炎症因子的激活和促细胞的凋亡。其他如 caspase-2,-6,-7,-8,-10 是促进和执行凋亡的因子。有研究证明 caspase 在糖尿病、半乳糖喂养的大鼠和糖尿病患者的视网膜中均可检测到。通过免疫组织化学检测出糖尿病患者的视网膜节细胞层中有 caspase-3, caspase-9, Bax, Bad 和 Fas^[9,27-29]。Li 等^[30]发现用 STZ 诱导糖尿病大鼠后 2wk 即可发现视网膜中 caspase-3 的含量有所增加,在节细胞、神经纤维层、外光感受器层的含量最高。

2.5 DR 与细胞凋亡信号的转导 当来自于细胞外的细胞凋亡诱导因素作用于细胞后转化为细胞凋亡信号,通过胞膜相关受体将凋亡信号传入胞内,再通过级联反应激活胞内凋亡信号通路,诱导视网膜细胞凋亡。目前为止,较为明确引发 DR 凋亡的机制主要与三条通路相关:死亡受体通路、线粒体通路和内质网通路。

死亡受体介导的凋亡通路又称为外凋亡通路。所谓的死亡受体,即细胞膜表面的某些蛋白质,它们能与携带凋亡信号的专一性配体结合,并迅速将凋亡信号转导至胞内而诱导细胞凋亡。目前,已发现 20 多个成员被认定为死亡受体,主要有肿瘤坏死因子受体 1(TNFR1)、Fas 分子(cD95/AP01)、死亡受体 3(DR3, WSL-1, TRAMP, LARD)、DR4 和 DR5(AP02, TRAIL-R2, TRICK, KILLER)。Fas 分子的配体为 FasL, TNFR1 的配体为 TNF α , DR3 的配体为 AP03L。这些蛋白和细胞表面死亡受体如 Fas, TNFR, DR3-5 结合,使受体三聚化并活化,三聚化的死亡受体通过死亡域(death domain, DD)募集衔接蛋白如 TRADD 和(或)FADD。衔接蛋白通过死亡效应域(death effector domain, DED)与 procaspase-8 形成死亡诱导信号复合物。Procaspase-8 具有弱的催化活性,可发生自我剪接并活化,然后释放到胞浆并启动 caspase-8 的级联反应,激活下游的效应 caspase 如 caspase-3、6 和 7,导致细胞凋亡;活化的 caspase-8 同时能激活 Bcl-2 家族的促凋亡因子 Bid(binding interface database),形成一种截短的 Bid(truncated Bid, tBid),后者转移到线粒体,破坏线粒体膜的通透性,从而诱导细胞色素 C(Cyto-C)释放进入胞浆,进而激活死亡受体通路和线粒体通路,有效地扩大了凋亡信号。Crosby-Nwaobi 等^[31]通过对 380 例 DR 患者的血样分析发现,TNF- α 在 PDR 患者中明显升高,许多研究同样能证明这个观点^[32]。在高糖或氧化应激环境下,TNF- α

与死亡受体结合后激活胞内 Fas 相关死亡结构域蛋白和 TNFR1 相关死亡结构域蛋白,激活 caspase-8 和 c-Jun 氨基末端激酶,从而诱导细胞凋亡^[33-34]。此外,Huang 等^[35]对基因敲除 TNF- α 的小鼠研究发现,TNF- α 在血-视网膜屏障的最后一道屏障中起着至关重要的作用。也有越来越多的研究表明死亡受体通路在 DR 中的重要作用。Wang 等^[36]研究证明 Fas/FasL 能导致细胞的凋亡,且随着糖基化终末产物的堆积,Fas-FasL 信号通路可以诱导 caspase-8 的产生,促进细胞色素 C 的释放,进一步诱导 caspase-3 的产生,导致细胞凋亡。Valverde 等^[37]研究发现,抑制 Fas/FasL 死亡受体信号通路可能会成为对抗 DR 的新兴治疗方案。

线粒体通路又称为内凋亡通路,是众多细胞凋亡信号转导途径中最重要的途径之一。此通路与线粒体膜通透性改变有密切关系,主要由死亡受体非依赖的凋亡诱导信号(如射线、化疗药、微生物、细胞因子和生长因子缺乏等)启动。一般认为氧化应激所致的损伤可作用于线粒体通透性转换孔,导致线粒体膜的通透性增高,促使线粒体释放凋亡启动因子,从而导致细胞凋亡。而在此过程中,起主要调节作用的是 Bcl-2 家族,由于研究证明当线粒体功能紊乱时 Bcl-2 和 Bcl-XL 的含量均会降低,而促凋亡的 Bax 含量会增加,Bcl-2 与 Bax 的相对含量决定了细胞凋亡的启动^[38]。在高血糖状态下,Bax 含量增加、线粒体膜通透性增高,caspase-9 的前体及细胞色素 C 从线粒体中释放,它们所构成的凋亡酶激活因子 1 能够促进 caspase-9 及 caspase-3 的激活。

内质网是除原核细胞及成熟的红细胞外,普遍存在于所有真核细胞,其分布也并非仅仅局限于内胞质区域,还常常扩展到靠近细胞膜的外胞质区域。内质网是细胞内生物大分子物质如脂类、蛋白质等合成的场所。内质网可以介导凋亡通路,当各种应激因素导致内质网稳态被打破,使过多的未折叠或错误折叠蛋白在内质网蓄积时,将引起内质网应激(ERS)。为减轻应激,内质网将启动一个在进化上保守的信号级联反应即未折叠蛋白反应(UPR)。UPR 通过减少蛋白翻译、上调分子伴侣表达和降解未折叠蛋白,以调节、恢复内质网的功能。如果过度的应激使内质网功能严重受损,则细胞常发生凋亡。内质网中过多蛋白的积累或钙平衡的破坏,可以引起内质网压力增高导致细胞凋亡。有研究通过检测 STZ 诱导的早期糖尿病大鼠视网膜中不同的氧化应激生物标记的含量,发现网状应激蛋白 CHOP 增多,CHOP 是 ERS 时促凋亡的重要信号分子,并证明内质网应激是 DR 发病早期的重要机制^[39]。

大量的证据都证明,细胞凋亡参与到 DR 的神经细胞的损伤,然而高血糖和相关的氧化应激下的具体病理机制却是未知的。在视网膜神经节细胞中发现这些促凋亡因子存在,暗示了这些物质在糖尿病视网膜神经退行性疾病中起着关键作用,这促使了在对视网膜神经细胞凋亡的进一步研究中寻找并确定关键因子,为打破视网膜神经萎缩的级联病理反应提供可能性。糖尿病所致的视力损害成为一个日趋严重的全球问题,随着对 DR 中细胞凋亡及其相关基因的进一步深入研究,可能为 DR 的临床药物治疗提供新的治疗靶点或思路。

参考文献

- 1 Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract* 2010;87(1):4-14
- 2 Barber AJ. A new view of diabetic retinopathy: a neurodegenerative disease of the eye. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2003;27(2):283-290
- 3 Whitmore W, Al-Gayyar MMH, Abdelsaid M, et al. Alteration of growth factors and neuronal death in diabetic retinopathy: what we have learned so far. *Mol Vis* 2011;17(9):300-308
- 4 Jing G, Wang JJ, Zhang SX. ER stress and apoptosis: a new mechanism for retinal cell death. *Exp Diabetes Res* 2012;2012(1):137-147
- 5 商战平,王万铁. 病理生理学. 南京:江苏科学技术出版社 2013;107
- 6 刘彬,谷兆侠,张学武. 医学生物化学与分子生物学. 郑州:郑州大学出版社 2008;375
- 7 Scanlon PH, Aldington SJ, Stratton IM. Epidemiological issues in diabetic retinopathy. *Middle East Afr J Ophthalmol* 2013;20(4):293-300
- 8 Barber AJ, Gardner TW, Abcouwer SF. The significance of vascular and neural apoptosis to the pathology of diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52(2):1156-1163
- 9 Du ZJ, Yamamoto T, Ueda T, et al. Activated protein C rescues the retina from ischemia-induced cell death. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52(2):987-993
- 10 Oshitari T, Yamamoto S, Hata N, et al. Mitochondria- and caspase-dependent cell death pathway involved in neuronal degeneration in diabetic retinopathy. *Br J Ophthalmol* 2008;92(4):552-556
- 11 Hammes HP, Feng Y, Pfister F, et al. Diabetic retinopathy: targeting vasoregression. *Diabetes* 2011;60(1):9-16
- 12 Rask - Madsen C, King GL. Vascular complications of diabetes: mechanisms of injury and protective factors. *Cell Metab* 2013;17(1):20-33
- 13 Mizutani M, Kern TS, Lorenzi M. Accelerated death of retinal microvascular cells in human and experimental diabetic retinopathy. *J Clin Invest* 1996;97(12):2883
- 14 Engerman RL, Kern TS. Retinopathy in animal models of diabetes. *Diabetes Metab Rev* 1995;11(2):109-120
- 15 Behl Y, Krothapalli P, Desta T, et al. Diabetes-enhanced tumor necrosis factor- α production promotes apoptosis and the loss of retinal microvascular cells in type 1 and type 2 models of diabetic retinopathy. *Am J Pathol* 2008;172(5):1411-1418
- 16 Cheung AKH, Fung MKL, Lo ACY, et al. Aldose reductase deficiency prevents diabetes-induced blood-retinal barrier breakdown, apoptosis, and glial reactivation in the retina of db/db mice. *Diabetes* 2005;54(11):3119-3125
- 17 Podestà F, Romeo G, Liu WH, et al. Bax is increased in the retina of diabetic subjects and is associated with pericyte apoptosis *in vivo* and *in vitro*. *Am J Pathol* 2000;156(3):1025-1032
- 18 Cogan DG, Toussaint D, Kuwabara T. Retinal vascular patterns: IV. Diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol* 1961;66(3):366-378
- 19 Kerrigan LA, Zack DJ, Quigley HA, et al. TUNEL-positive ganglion cells in human primary open-angle glaucoma. *Arch Ophthalmol* 1997;115(8):1031-1035
- 20 Barber AJ, Lieth E, Khin SA, et al. Neural apoptosis in the retina during experimental and human diabetes. Early onset and effect of insulin. *J Clin Invest* 1998;102(4):783
- 21 El - Remessy AB, Al - Shabrawey M, Khalifa Y, et al. Neuroprotective and blood - retinal barrier - preserving effects of cannabidiol in experimental diabetes. *Am J Pathol* 2006;168(1):235-244

- 22 Zheng JH, Viacava Follis A, Kriwacki RW, *et al.* Discoveries and controversies in BCL-2 protein-mediated apoptosis. *FEBS J* 2015 [Epub ahead of print]
- 23 Li D, Yang F, Cheng H, *et al.* Protective effects of total flavonoids from *Flos Puerariae* on retinal neuronal damage in diabetic mice. *Mol Vis* 2013;19(2):1999-2010
- 24 El-Asrar AMA, Dralands L, Missotten L, *et al.* Expression of apoptosis markers in the retinas of human subjects with diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45(8):2760-2766
- 25 Yamashiro K, Tsujikawa A, Ishida S, *et al.* Platelets accumulate in the diabetic retinal vasculature following endothelial death and suppress blood-retinal barrier breakdown. *Am J Pathol* 2003;163(1):253-259
- 26 Jousen AM, Poulaki V, Mitsiades N, *et al.* Suppression of Fas-FasL-induced endothelial cell apoptosis prevents diabetic blood-retinal barrier breakdown in a model of streptozotocin-induced diabetes. *FASEB J* 2003;17(1):76-78
- 27 Nicholson DW, Thornberry NA. Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci* 1997;22(8):299-306
- 28 Losiewicz MK, Fort PE. Diabetes impairs the neuroprotective properties of retinal alpha-crystallins. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52(9):5034-5042
- 29 Borrie SC, Duggan J, Cordeiro MF. Retinal cell apoptosis. *Expert Rev Ophthalmol* 2009;4(1):27-45
- 30 Li Y, Zhuo Y, Lü L, *et al.* Caspase-dependent retinal ganglion cell apoptosis in the rat model of acute diabetes. *Chin Med J(Engl)* 2008;121(24):2566-2571
- 31 Crosby-Nwaobi R, Chatziralli I, Sergentanis T, *et al.* Cross Talk between Lipid Metabolism and Inflammatory Markers in Patients with Diabetic Retinopathy. *J Diabetes Res* 2015;2015(1):131-140
- 32 Koleva-Georgieva DN, Sivkova NP, Terzieva D. Serum inflammatory cytokines IL-1, IL-6, TNF- α and VEGF have influence on the development of diabetic retinopathy. *Folia Med(Plovdiv)* 2011;53(2):44-50
- 33 Jousen AM, Doehmen S, Le ML, *et al.* TNF- α mediated apoptosis plays an important role in the development of early diabetic retinopathy and long-term histopathological alterations. *Mol Vis* 2009;15(151):1418-1428
- 34 Circu ML, Aw TY. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic Biol Med* 2010;48(6):749-762
- 35 Huang H, Gandhi JK, Zhong X, *et al.* TNF- α is required for late BRB breakdown in diabetic retinopathy, and its inhibition prevents leukostasis and protects vessels and neurons from apoptosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52(3):1336-1344
- 36 Wang P, Xing Y, Chen C, *et al.* Advanced glycation end-product (AGE) induces apoptosis in human retinal ARPE-19 cells via promoting mitochondrial dysfunction and activating the Fas-FasL signaling. *Biosci Biotechnol Biochem* 2016;80(2):250-256
- 37 Valverde AM, Miranda S, García-Ramírez M, *et al.* Proapoptotic and survival signaling in the neuroretina at early stages of diabetic retinopathy. *Mol Vis* 2012;19(1):47-53
- 38 Tsukahara S, Yamamoto S, Tin-Tin-Win-Shwe, *et al.* Inhalation of low-level formaldehyde increases the Bcl-2/Bax expression ratio in the hippocampus of immunologically sensitized mice. *Neuroimmunomodulation* 2006;13(2):63-68
- 39 Sánchez-Chávez G, Hernández-Ramírez E, Osorio-Paz I, *et al.* Potential Role of Endoplasmic Reticulum Stress in Pathogenesis of Diabetic Retinopathy. *Neurochem Res* 2015;2015(12):1-9