

DOI:10.3724/SP.J.1008.2012.00436

内皮素及其受体蛋白家族在糖尿病大鼠视网膜中的表达

袁爱花^{1,2}, 蒋平¹, 梅妍², 羊惠君^{2*}

1. 上海交通大学医学院附属精神卫生中心遗传研究室, 上海 200030
2. 四川大学华西医学中心人体解剖与组织胚胎学教研室, 成都 610041

[摘要] **目的** 探讨内皮素-1(ET-1)、ET-2、ET-3、内皮素受体 A(ETRA)、ETRB 和内皮素转换酶(ECE)在 8 周糖尿病 SD 大鼠视网膜中的表达。**方法** 采用限制性片段差异显示 PCR(RFDD-PCR)技术建立正常和 8 周糖尿病大鼠视网膜基因差异表达谱,并以半定量 RT-PCR 和蛋白免疫印迹方法分别对两组间表达存在差异的 6 个基因(ET-1、ET-2、ET-3、ETRA、ETRB、ECE)的表达进行验证。**结果** RFDD-PCR 结果显示,糖尿病组 ET-1、ET-2、ET-3、ETRA、ETRB 和 ECE 表达上调。半定量 RT-PCR 结果和蛋白免疫印迹结果显示,6 种基因和蛋白在糖尿病组的表达(相对光密度比值)高于正常组,表达差异具有统计学意义(P 均 <0.05 , P 均 <0.01)。**结论** ET-1、ET-2、ET-3、ETRA、ETRB 和 ECE 在糖尿病视网膜中呈高表达,提示这 6 种基因可能参与了糖尿病视网膜的发病过程。

[关键词] 糖尿病视网膜病变;内皮素;内皮素受体;内皮素转换酶

[中图分类号] R 587.26 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2012)04-0436-05

Expression of endothelins and endothelin receptors in retina of diabetic rats

YUAN Ai-hua^{1,2}, JIANG Ping¹, MEI Yan², YANG Hui-jun^{2*}

1. Department of Genetics, Shanghai Mental Health Center, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200030, China
2. Department of Human Anatomy and Embryology, West China Medical Centre, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan, China

[Abstract] **Objective** To investigate the expression of endothelin-1 (ET-1), ET-2, ET-3, endothelin receptor A (ETRA), ETRB and endothelin converting enzyme (ECE) in the retinas of 8-week-old diabetic SD rats. **Methods** The retinal gene expression profiles of healthy and 8-week-old diabetic rats were constructed with restriction fragment differential display polymerase chained reaction (RFDD-PCR), and the differential expression of ET-1, ET-2, ET-3, ETRA, ETRB and ECE was verified using semi-quantitative RT-PCR and Western blotting analysis. **Results** The results of RFDD-PCR showed that the expression of ET-1, ET-2, ET-3, ETRA, ETRB and ECE was up-regulated in diabetic retina. The results of semi-quantitative RT-PCR and Western blotting analysis showed that the expression levels of the six genes and proteins (relative D ratio) in diabetic group were significantly higher than those in the normal retinas ($P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively). **Conclusion** The expression of ET-1, ET-2, ET-3, ETRA, ETRB and ECE is up-regulated in diabetic retina, suggesting that the six genes may be involved in the pathogenesis of diabetic retina.

[Key words] diabetic retinopathy; endothelin; endothelin receptor; endothelin converting enzyme

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(4):436-440]

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是糖尿病最为常见和严重的微血管并发症,是主要的致盲性眼病,其发病机制尚未明确。目前,有研究表明许多血管活性物质参与了其发生和发展^[1]。本实验首先采用限制性片段差异显示聚合酶链反应(RFDD-PCR)技术建立正常和 8 周糖尿病大鼠视网膜基因差异表达谱,经生物信息学分析筛选出内皮素

(endothelin, ET)的 3 种异构肽(ET-1、ET-2、ET-3)、内皮素受体 A (endothelin receptor A, ETRA)、内皮素受体 B (endothelin receptor B, ETRB)和内皮素转换酶(endothelin converting enzyme, ECE)为正常和 8 周糖尿病大鼠视网膜差异表达基因,并进一步以半定量 RT-PCR 和蛋白免疫印迹方法验证上述基因在两组视网膜组织中的表达情况。

[收稿日期] 2011-10-08 **[接受日期]** 2011-12-29

[基金项目] 上海市卫生局青年课题(2010Y030)。Supported by Youth Project of Shanghai Health Bureau (2010Y030)。

[作者简介] 袁爱花,助理研究员。E-mail: yuanaihua1997ster@gmail.com

* 通信作者(Corresponding author)。Tel: 028-85501261, E-mail: he500209@mail.sc.cninfo.net

1 材料和方法

1.1 材料 体质量 200~250 g 的健康雄性 SD 大鼠 57 只, 购于四川大学动物实验中心。四氧嘧啶和抗体购自美国 Sigma 公司。TRIzol 试剂盒购自美国 Invitrogen 公司。DNA 酶购自日本 TaKaRa 公司。反转录试剂盒购自美国 MBI 公司。Display PROFILE 试剂盒购自美国 Q-biogene 公司。Real-time PCR Master Mix 试剂盒购自日本 Toyobo 公司。Cy5 荧光标记试剂盒购自 Amersham 公司。抗体均购自美国 Santa Cruz 公司。引物由日本 TaKaRa 公司合成。引物序列: ET-1 上游 5'-CTC TCT GCT GTT TGT GGC TTT C-3', 下游 5'-GTT CCC TTG GTC TGT GGT CTT-3', 301 bp; ET-2 上游 5'-ATG TGT GTA CTT CTG CCA CCT G-3', 下游 5'-AGA TGT CCC TCA GCT TTT GGA G-3', 278 bp; ET-3 上游 5'-GTG TCT ACT ATT GCC ACC TGG AC-3', 下游 5'-GTG GGC TTT ATC TGT CCT TGA C-3', 371 bp; ETRA 上游 5'-CTG GTG GCT CTT TGG ATT CTA C-3', 下游 5'-GTT CTG TGT TGT GGT TCT GCT C-3', 485 bp; ETRB 上游 5'-GTC TCT GTG GTT CTG GCT GTC-3', 下游 5'-TGC TCT GGT CAT AAA GGG TGA G-3', 379 bp; ECE 上游 5'-CTG GAA GTT TTG CGT GAG TGA C-3', 下游 5'-GTT CTT GGT GGG CGA GTA GTA G-3', 430 bp; β -actin 上游 5'-CCG TAA AGA CCT CTA TGC CAA C-3', 下游 5'-ACT CAT CGT ACT CCT GCT TGC T-3', 227 bp。

1.2 糖尿病大鼠模型建立 32 只健康成年 SD 大鼠适应性喂养 8 d, 在禁食 12 h 后, 按 220 mg/kg 的剂量一次性腹腔注射四氧嘧啶。24 h 后空腹血糖值 >16 mmol/L、尿糖 $>+$ 为造模成功。此后每周测一次尿糖和血糖。造模后, 1 只转阴, 3 只死亡, 最后可用于本实验的 8 周糖尿病大鼠共 28 只。

1.3 RFDD-PCR 建立大鼠视网膜基因表达谱 用 TRIzol 试剂盒分别抽提正常和 8 周糖尿病 SD 大鼠视网膜的总 RNA, DNA 酶处理, 纯化 RNA。1.5% 琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度仪检测结果显示 RNA 含量和纯度已达到实验要求。分别取正常和 8 周糖尿病 SD 大鼠视网膜的总 RNA 各 900 ng, 按 Display PROFILE 试剂盒说明进行操作; 以随机锚定引物 5' TnV 反转录成 cDNA, 用 *Taq* I 限制性内切酶对 cDNA 进行消化, 得到的表达基因转录片段以 T_4 DNA 连接酶与两种特殊设计的 DNA 接头混合相连制备成差异显示模板, 用 64 个特异引物以及 Cy5 标记的通用引物分别在 64 个反应体系中用 "touch-down" PCR 对两组模板进行扩增。应用高电压垂直电泳系统, 以 7% 尿素聚丙烯酰胺凝胶恒功率 (60 W) 电泳, 分离 64 个表达窗的扩增片段。在 TYPHOON 9200 荧光成像系统上扫描凝胶, 获得差异表达谱电泳图像。运用图像分析软件, 再根据 GenBank 数据及公司提供的数据 (<http://www.qbio-gene.com/displayfit/>) 对所有的电泳条带进行生物信息学分析, 筛选候选基因。

1.4 半定量 RT-PCR 正常和 8 周糖尿病 SD 大鼠视网膜总 RNA 抽提、浓度和纯度检测如上所述。各样本总 RNA 反

转录为 cDNA。分别取等量 cDNA, 利用 ET-1、ET-2、ET-3、ETRA、ETRB、ECE 和 β -actin 的特异性引物进行 PCR 扩增, 等量取各 RT-PCR 产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳。凝胶扫描系统进行光密度值 (D 值) 分析, 结果以相对 D 比值 (目的基因 D 值/ β -actin D 值) 表示, 对每个样本目的 mRNA 检测重复 3 次, 取其平均值作为该样本目的 mRNA 的 D 值。

1.5 蛋白质免疫印迹分析 取一对视网膜组织液氮研磨后, 加入 1.5 ml 预冷组织裂解液, 冰上静置 1 h, 4℃、20 000×g 离心 40 min, 取上清液, 考马斯亮蓝测定蛋白浓度。取 15 μ g 蛋白样品加 5 μ l 上样缓冲液, 100℃煮沸 5 min 后, 行 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质, 电转移法将蛋白转移到 NC 膜, 10% 脱脂牛奶封闭 2 h, 加入一抗, 4℃冰箱中过夜, Tris-HCl 缓冲盐溶液 (TBST) 洗膜 10 min 3 次, 加入二抗, 37℃、1 h, TBST 洗膜 10 min 3 次后作 ECL 化学发光, 显影, 用 FluorChem 8900 软件分析 α -、 β -、 γ -synuclein 条带 D 值, 并与内参 β -actin 的 D 值比较。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 11.0 软件进行统计学分析, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 对两组间种基因的表达量行独立样本 t 检验, 检验水平 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 一般资料 建模成功的 28 只糖尿病大鼠随机分为 3 组, 第 1 组用于构建基因表达谱, 共 4 只, 体质量为 (204.00 \pm 19.71) g, 血糖值为 (18.25 \pm 1.89) mmol/L, 尿糖均 $>+$; 第 2 组用于荧光定量 PCR 实验, 共 12 只, 体质量为 (184.67 \pm 18.81) g, 血糖值为 (18.92 \pm 1.73) mmol/L, 尿糖均 $>+$; 第 3 组用于蛋白质印迹分析, 共 12 只, 体质量为 (194.67 \pm 28.25) g, 血糖值为 (19.25 \pm 1.71) mmol/L, 尿糖均 $>+$; 3 组间的体质量及血糖差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。其余 25 只大鼠作为正常对照并随机分为 3 组, 第 1 组用于构建基因表达谱, 共 3 只, 体质量为 (237.67 \pm 11.72) g, 血糖值为 (12.67 \pm 2.08) mmol/L, 尿糖均为 +~ -; 第 2 组用于荧光定量 PCR 实验, 共 11 只, 体质量为 (246.82 \pm 21.06) g, 血糖值为 (12.00 \pm 2.05) mmol/L, 尿糖均为 +~ -; 第 3 组用于蛋白质免疫印迹法分析, 共 11 只, 体质量为 (249.18 \pm 15.99) g, 血糖值为 (11.36 \pm 2.11) mmol/L, 尿糖均为 +~ -; 3 组间的体质量及血糖差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。

2.2 RFDD-PCR 检测结果 对 2 个基因表达谱的 DNA 片段数目及 2 种组织间有差异的片段数目进行统计, 获得有意义的片段共 3 639 个, 其中糖尿病视网膜 1 826 个, 正常视网膜 1 813 个。以荧光强度相差 3 倍以上为表达差异标准, 获得有差异的片段 840 个。与正常相比, 糖尿病状态下表达信号减弱的基因片段有 283 个, 增强的有 225 个; 与正常相比, 糖尿病状态下消失的有 145 个, 出现的有 187 个。13 号表达窗 179 bp 的 ET-1 片段 (图 1A)、20 号表达窗 58 bp 的 ET-2 片段 (图 1B)、17 号表达窗 244 bp 的 ET-3 片段 (图 1C)、39 号表达窗 59 bp 的 ETRA 片段 (图 1D)、1 号表达窗 180 bp 的

ETRB片段(图1E)和8号表达窗682 bp的ECE片段(图1F),其糖尿病组表达强于正常组。

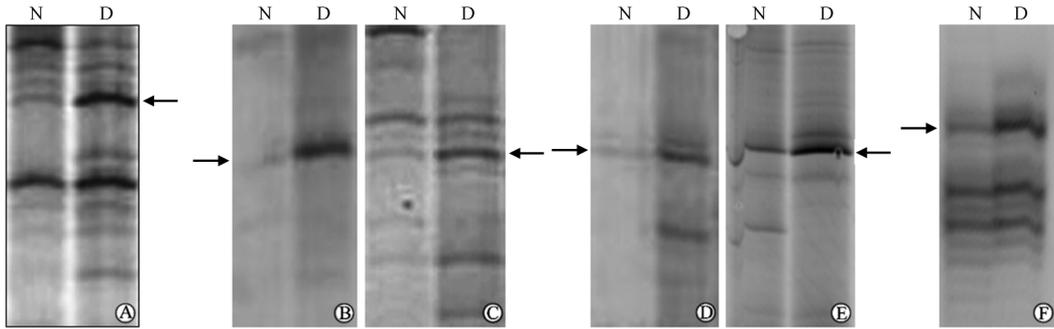


图1 RFDD-PCR方法检测正常组(N)和糖尿病组(D)大鼠视网膜组织ET-1、ET-2、ET-3、ETRA、ETRB和ECE的差异表达

A: ET-1; B: ET-2; C: ET-3; D: ETRA; E: ETRB; F: ECE. 箭头示目标条带

2.3 半定量 RT-PCR 检测结果 在正常大鼠视网膜中,可检测出 ET-1 (0.29 ± 0.08)、ET-2 (0.19 ± 0.07)、ET-3 (0.35 ± 0.06)、ETRA(0.35 ± 0.08)、ETRB(0.24 ± 0.08)、ECE(0.44 ± 0.09),但在8周糖尿病大鼠视网膜中,ET-1 (0.39 ± 0.09)、ET-2 (0.31 ± 0.06)、ET-3 (0.49 ± 0.08)、ETRA(0.51 ± 0.10)、ETRB(0.39 ± 0.09)、ECE(0.60 ± 0.11)的表达升高(P均 < 0.05,图2)。

(P均 < 0.01,图3)。

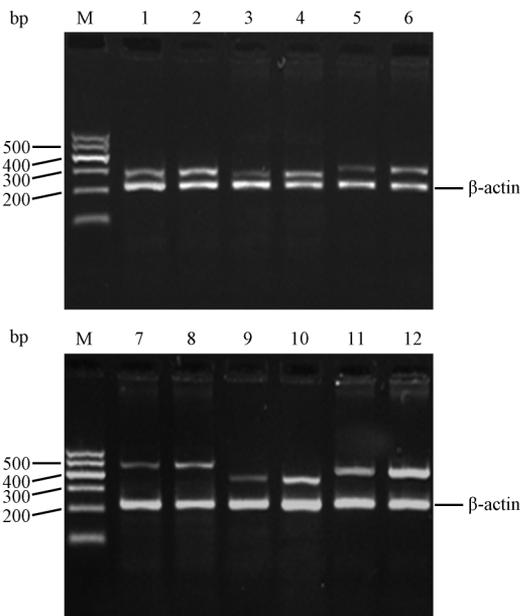


图2 半定量 RT-PCR 检测正常组(1, 3, 5, 7, 9, 11)和糖尿病组(2, 4, 6, 8, 10, 12)大鼠视网膜 ET-1、ET-2、ET-3、ETRA、ETRB 和 ECE mRNA 的表达

M: Marker; 1,2: ET-1; 3,4: ET-2; 5,6: ET-3; 7,8: ETRA; 9,10: ETRB; 11,12: ECE

2.4 蛋白质免疫印迹分析结果 结果显示, ET-1、ET-2、ET-3、ETRA、ETRB 和 ECE 蛋白在正常视网膜组织中呈弱表达(0.12 ± 0.02; 0.23 ± 0.06; 0.15 ± 0.03; 0.09 ± 0.01; 0.16 ± 0.07; 0.35 ± 0.02),在8周糖尿病大鼠视网膜组织中呈强表达(0.27 ± 0.08; 0.64 ± 0.01; 0.76 ± 0.04; 0.54 ± 0.03; 0.71 ± 0.05; 0.81 ± 0.06),两组比较差异有统计学意义

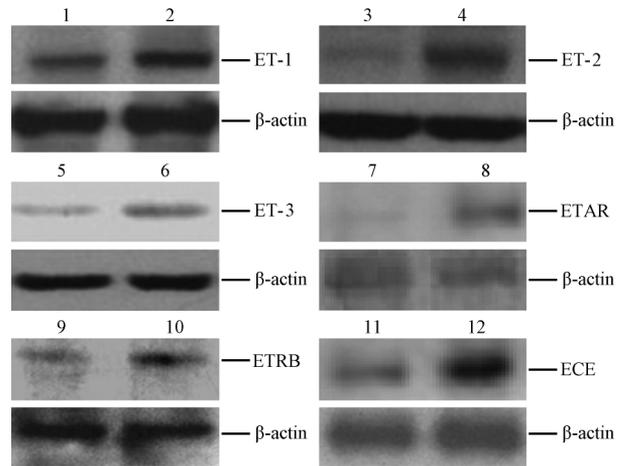


图3 蛋白质免疫印迹检测正常组(1, 3, 5, 7, 9, 11)和糖尿病组(2, 4, 6, 8, 10, 12)大鼠视网膜 ET-1、ET-2、ET-3、ETRA、ETRB 和 ECE 的表达

1,2: ET-1; 3,4: ET-2; 5,6: ET-3; 7,8: ETRA; 9,10: ETRB; 11,12: ECE

3 讨论

ET 是由其氨基酸前体(原内皮素-1)经 ECE 作用生成,其家族成员包括 3 种异构肽:ET-1、ET-2 和 ET-3。ET 经 ETRA 和 ETRB 发挥生理作用。ET、ETRA 及 ETRB 可表达于正常视网膜的色素上皮细胞、节细胞、血管内皮细胞、星形胶质细胞和周细胞[2]。生理条件下,低浓度 ET 与其特异性 ETRA 或 ETRB 的结合在调节和维持视网膜舒缩及血流稳定性中起到关键性作用[3]。在高糖环境中,体外培养的牛视网膜周细胞 ETRB 表达增加[4]。

本研究采用 RFDD-PCR 技术建立了正常大鼠和 8 周糖尿病大鼠视网膜基因差异表达谱,通过生物信息学分析,筛选出 ET-1、ET-2、ET-3、ETRA、ETRB、ECE 为正常大鼠和糖尿病大鼠视网膜差异表达基因,并进一步通过半定量 RT-PCR 方法和蛋白质免疫印迹方法证实了上述因子在 8 周糖

尿病大鼠视网膜中的表达水平升高。这与 Evans 等^[5]观察到的半乳糖喂养大鼠视网膜 ET1、ET3、ETRA mRNA 水平增高一致。在生理条件下,ETRA 主要存在于视网膜周细胞,选择性地作用于 ET-1,介导血管的收缩,而 ETRB 主要由内皮细胞表达,对 ET-1、ET-2、ET-3 无特异性,通过释放一氧化氮(NO)和前列腺素介导血管扩张。两受体在视网膜血管舒缩和血流的调节中起重要作用。但 ET、ETR 及 ECE 的升高是否会导致视网膜血管血流的变化呢? Polak 等^[6]和 Mori 等^[7]对大鼠眼球的玻璃体内分别注射 ET1 和 ET3 进行对比研究,结果发现其视网膜组织的血流量变化分别为减少和升高,而当分别给予 ETRA 和 ETRB 拮抗剂后,其血流量均恢复正常。另外,对糖尿病大鼠视网膜研究结果表明,其血流量减少了 33%,但 ETRA 拮抗剂的使用可使其血流量恢复正常水平^[8]。上述研究均提示,ET、ETR 及 ECE 的表达上调可能参与了视网膜血流动力学的改变。

另外,糖尿病视网膜组织中 ET、ETR 及 ECE 的高表达也可能参与了视网膜的血管病变的发生。如有报道显示,视网膜组织中 ET-1 和 ET-3 的高表达可诱导超氧化物的产生增多^[9-10],而超氧化物阴离子可与 NO 结合形成血管毒性的过氧硝酸盐^[11],结合我们既往的研究发现,在 NO 合成中起关键作用的诱导型一氧化氮合酶(iNOS)在糖尿病大鼠视网膜组织中表达也较正常组增高^[12]。另有研究表明,6 个月糖尿病大鼠视网膜组织中 ET-1、ET-2、ETRA 和 ETRB 的 mRNA 表达水平较正常组升高,并认为与糖尿病视网膜血管闭塞有关^[13]。研究提示,糖尿病视网膜组织中 ET-1、ET-2、ET-3、ETRA 和 ETRB 的高表达可能与糖尿病视网膜的血管病变有关^[14]。

ET 除了与视网膜血管病变有关,最近有研究表明 ET 也可能与视网膜神经细胞损伤有关。对体外培养的视网膜神经细胞的研究发现,当给予高浓度的 ET-1 处理后,16% 的无长突神经细胞发生死亡,ETRA 拮抗剂和 ETRB 拮抗剂能够使死亡细胞数量减少^[15-16]。Lau 等^[17]对大鼠的研究也观察到,当其眼内注射 ET-1 后,36% 视网膜节细胞发生凋亡,31% 视神经轴突发生缺失,且伴有视功能损害,表现为瞳孔反应速率下降 31%,收缩持续时间增长,并认为 ET-1 的异常升高导致视网膜节细胞的凋亡和视神经的不完整。大鼠视网膜节细胞体外存活抑制实验表明,ET-2 的表达上调可以导致视网膜节细胞的存活率升高^[18],同时 ET-2 的表达上调在受损的视网膜光感受器细胞中起保护作用^[19]。近年研究显示,ET-3 在神经的发生过程中起重要作用。ET-3 可以调控神经嵴来源的神经细胞的增殖、分化和迁移,参与神经元轴突生长和神经突触的形成^[20-21]。本研究发现,ET 和 ETR 家族成员及 ECE 在糖尿病大鼠视网膜中的表达上调,徐格致等^[22]研究发现早期糖尿病大鼠视网膜上存留的视网膜神经节细胞树突和胞体存在形态学的改变,可推测 ET、ETR 及 ECE 的表达上调可能与视网膜神经细胞变化有关,并参与了糖尿病早期神经视网膜病变的发生。

综上所述,ET 和 ETR 所有家族成员及 ECE 在 8 周糖

尿病大鼠视网膜组织中表达升高,可推测这些因子表达水平的变化可能与视网膜血流动力学的改变及视功能损害有关,但本研究仅是糖尿病大鼠视网膜组织的上述基因表达的初步研究,仍需进一步论证上述基因的异常表达与糖尿病视网膜病变之间的因果关系。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 李明武,黎晓新,赵明威,纪立弄. 一氧化氮合酶基因多态性与糖尿病视网膜病变相关性研究[J]. 中华眼底病杂志,2010,26:135-138.
- [2] Torbidoni V, Iribarne M, Suburo A M. Endothelin receptor in light-induced retinal degeneration[J]. *Exp Biol Med*, 2006, 31:1095-1100.
- [3] Hein T W, Ren Y, Yuan Z, Xu W, Somvanshi S, Nagaoka T, et al. Functional and molecular characterization of the endothelin system in retinal arterioles [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2009, 50:3329-3336.
- [4] Ceccarelli F, Rosa M M, Chakravarthy U. Binding characteristics of ET receptors in retinal pericytes and effects of high glucose incubation[J]. *Curr Eye Res*, 2001, 23:263-270.
- [5] Evans T, Xi Deng D, Mukherjee K, Downey D, Chakrabarti S. Endothelins, their receptors, and retinal vascular dysfunction in galactose-fed rats[J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2000, 48:75-85.
- [6] Polak K, Luksch A, Frank B, Jandrasits K, Polska E, Schmetterer L. Regulation of human retinal blood flow by endothelin-1 [J]. *Exp Eye Res*, 2003, 76:633-640.
- [7] Mori F, King G L, Clermont A C, Bursell D K, Bursell S E. Endothelin-3 regulation of retinal hemodynamics in nondiabetic and diabetic rats[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2000, 41:3955-3962.
- [8] Wang Z, Yadav A S, Leskova W, Harris N R. Attenuation of streptozotocin-induced microvascular changes in the mouse retina with the endothelin receptor A antagonist atrasentan[J]. *Exp Eye Res*, 2010, 91:670-675.
- [9] Lyle A N, Griendling K K. Modulation of vascular smooth muscle signaling by reactive oxygen species [J]. *Physiology*, 2006, 21:269-280.
- [10] Cukiernik M, Hileto D, Evans T, Mukherjee S, Downey D, Chakrabarti S. Vascular endothelial growth factor in diabetes induced early retinal abnormalities[J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2004, 65:197-208.
- [11] Toda N, Nakanishi-Toda M. Nitric oxide, ocular blood flow, glaucoma, and diabetic retinopathy [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2007, 26:205-238.
- [12] 袁爱花,梅妍,周鸿鹰,项涛,羊惠君. 一氧化氮合酶在糖尿病大鼠视网膜中表达模式的研究 [J]. 南方医科大学学报, 2007, 27:454-460.
- [13] Lam H C, Lee J K, Lu C C, Chu C H, Chuang M J, Wang M C. Role of endothelin in diabetic retinopathy [J]. *Curr Vasc Pharmacol*, 2003, 1:243-250.
- [14] Matsuo J, Oku H, Kanbara Y, Kobayashi T, Suqiyama T, Ikeda T. Involvement of NADPH oxidase and protein kinase C in endothelin-1-induced superoxide production in retinal microvessels

[J]. *Exp Eye Res*, 2009, 89: 693-699.

[15] Kobavashi T, Oku H, Fukuhara M, Kojima S, Komori A, Ichikawa M, et al. Endothelin-1 enhances glutamate-induced retinal cell death, possibly through ETA receptors[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2005, 46: 4684-4690.

[16] Oku H, Fukuhara M, Komori A, Okuno T, Suqiyama T, Ikeda T. Endothelin-1 (ET-1) causes death of retinal neurons through activation of nitric oxide synthase (NOS) and production of superoxide anion[J]. *Exp Eye Res*, 2008, 86: 118-130.

[17] Lau J, Dang M, Hockmann K, Ball A K. Effects of acute delivery of endothelin-1 on retinal ganglion cell loss in the rat[J]. *Exp Eye Res*, 2006, 82: 132-145.

[18] Seitz R, Hackl S, Seibuchner T, Tamm E R, Ohlmann A. Norrin mediates neuroprotective effects on retinal ganglion cells via activation of the Wnt/beta-catenin signaling pathway and the induction of neuroprotective growth factors in Muller cells[J]. *J Neurosci*, 2010, 30: 5998-6010.

[19] Bürgi S, Samardzija M, Grimm C. Endogenous leukemia inhibitory factor protects photoreceptor cells against light-induced degeneration[J]. *Mol Vis*, 2009, 18: 1631-1637.

[20] Nagy N, Goldstein A M. Endothelin-3 regulates neural crest cell proliferation and differentiation in the hindgut enteric nervous system[J]. *Dev Biol*, 2006, 293: 203-217.

[21] Makita T, Sucov H M, Garipey C E, Yanagisawa M, Ginty D D. Endothelins are vascular-derived axonal guidance cues for developing sympathetic neurons[J]. *Nature*, 2008, 452: 759-763.

[22] 徐格致, 秦要武, 王文吉. 早期糖尿病大鼠视网膜神经节细胞树突形态异常的研究[J]. *中华眼底病杂志*, 2008, 24: 249-254.

[本文编辑] 尹 茶