

封面：

分类号 R774.1

密级 \_\_\_\_\_

U D C 617

编号 \_\_\_\_\_

厦 门 大 学

博 士 后 研 究 工 作 报 告

过氧化物酶 6 对 RPE 细胞氧化应激损伤的保护作用  
及金诺芬对 RPE 细胞存活的影响

博士后姓名 陈晓冬

工作完成日期 2015 年 3 月—2017 年 3 月

报告提交日期 2017 年 3 月

厦门大学

2017 年 3 月

**过氧化物酶 6 对 RPE 细胞氧化应激损伤的保护作用  
及金诺芬对 RPE 细胞存活的影响**

**The protective role of peroxiredoxin 6 in RPE cell oxidative  
damage and the effect of auranofin on RPE cell survival**

博 士 后 姓 名 陈晓冬

流动站（一级学科）名称 生物学

专 业（二级学科）名称 眼科学

研究工作起始时间 2015 年 3 月

研究工作期满时间 2017 年 3 月

厦 门 大 学  
2017 年 3 月

# 厦门大学博士后研究工作报告 著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用博士后研究工作报告的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交该报告的纸质版和电子版，有权将该报告用于非赢利目的的少量复制并允许该报告进入学校图书馆被查阅，有权将该报告的内容编入有关数据库进行检索，有权将博士后研究工作报告的标题和摘要汇编出版。保密的博士后研究工作报告在解密后适用本规定。

本研究报告属于： 1、保密（）， 2、不保密（）

纸本在 \_\_\_\_\_ 年解密后适用本授权书；

电子版在 \_\_\_\_\_ 年解密后适用本授权书。

（请在以上相应括号内打“√”）

作者签名： \_\_\_\_\_ 日期： \_\_\_\_\_ 年 \_\_\_\_\_ 月 \_\_\_\_\_ 日

导师签名： \_\_\_\_\_ 日期： \_\_\_\_\_ 年 \_\_\_\_\_ 月 \_\_\_\_\_ 日

## 中文摘要

视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE) 细胞是位于光感受器外节和脉络膜毛细血管层之间的一层单层色素细胞,也是构成血视网膜屏障的一个重要组成部分,对于维持正常的视网膜的正常生理功能具有重要意义。一方面 RPE 细胞氧化应激损伤导致 RPE 功能障碍,是年龄相关性黄斑变性 (age-related macular degeneration, AMD) 等致盲性视网膜疾病的重要致病因素。另一方面, RPE 细胞异常增殖和迁徙在增殖性玻璃体视网膜病变 (proliferative vitreoretinopathy, PVR) 的发生和发展过程中起到关键作用。因此深入研究氧化应激诱导的 RPE 细胞损伤的作用机制,以及尝试使用药物干预 RPE 细胞的异常增殖和迁徙,对于防治 RPE 细胞功能异常相关性致盲眼病具有重要意义。

本研究通过体外培养 ARPE-19 细胞,利用 MTT 实验、流式细胞仪检测、Western blot,免疫荧光等方法检测了过氧化氢 (hydrogen peroxide,  $H_2O_2$ ) 诱导的氧化应激损伤对 RPE 细胞表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 信号通路的影响;并且研究了过氧化物酶 6 (peroxiredoxin 6, PRDX6) 对 RPE 细胞氧化应激损伤的保护作用。此外我们还深入研究了抗炎药金诺芬 (auranofin, AF) 对 RPE 细胞存活及 EGFR/MAPK 信号通路的影响。

### 主要结果:

1)  $H_2O_2$  诱导的氧化应激抑制 ARPE-19 细胞活力、增殖和迁徙;在  $H_2O_2$  诱导的 ARPE-19 细胞氧化应激损伤中, EGFR 和 AKT 蛋白表达下降,磷酸化 AKT 和 ERK 呈现先增高后降低的变化趋势;磷酸化 P38 和磷酸化 JNK 蛋白表达升高。此外  $H_2O_2$  诱导的氧化应激抑制 EGF 引起的 EGFR、AKT、ERK 磷酸化作用。

2)  $H_2O_2$  诱导 ARPE-19 细胞死亡,引起活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 升高;在  $H_2O_2$  诱导的 ARPE-19 细胞氧化应激损伤中, EGFR 和 PRDX6 蛋白表达下降。PRDX6 过表达缓解  $H_2O_2$  诱导的 ARPE-19 细胞活性抑制、细胞死亡和 ROS 升高;PRDX6 过表达也缓解  $H_2O_2$  诱导的氧化应激对 EGFR/ERK 信号通路的抑制作用。

3) 金诺芬抑制 ARPE-19 细胞存活的作用机制与 ROS 依赖的 EGFR/MAPK 信号通路有关。

全文的研究意义如下：

- 1) 本研究探讨了  $H_2O_2$  诱导的氧化应激对 RPE 细胞 EGFR 信号通路的影响，有助于进一步理解 RPE 细胞氧化损伤的作用机制。
- 2) 本研究揭示 PRDX6 蛋白对 RPE 细胞氧化应激损伤的保护作用与 EGFR/ERK 信号通路相关；为 RPE 细胞氧化损伤相关性视网膜疾病的防治提供一定的理论依据。
- 3) 本研究探讨了金诺芬抑制 RPE 细胞存活的作用机制，为防治 PVR 发生和发展过程中 RPE 细胞异常增殖和迁徙提供了一个新思路。

**关键词：**视网膜色素上皮细胞，氧化应激，活性氧，表皮生长因子受体，蛋白激酶 B，丝裂原激活的蛋白激酶，过氧化物酶 6，金诺芬

## Abstract

The retinal pigment epithelium (RPE) cell, a monolayer of pigmented cells located between photoreceptor and the choriocapillaris, forms a part of the blood/retina barrier and plays an important role in maintaining the normal visual function. On one hand, oxidative injury of RPE cell, a key inducer of dysfunction of RPE, is considered as vital factor of some blinding disease such as age-related macular degeneration. On the other hand, abnormal proliferation and migration of RPE cell has been proved to play a prominent role in development of proliferative vitreoretinopathy (PVR). Therefore, investigating the mechanism of oxidative stress-induced injury of RPE cell and utilizing a special drug to intervene abnormal proliferation and migration of RPE cell might have very important significance for prevention and treatment of some sight-threatening diseases related to dysfunction of RPE cell.

In the present study, we detected the effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress injury on EGFR signaling pathway and the level of PRDX6 by using MTT assay, Flow cytometry, Western blot, Immunofluorescence and etc. We also investigated the protective role of overexpression of PRDX6 protein in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative injury of RPE cell. In addition, we investigated the effect of auranofin, a gold-containing drug, on RPE cell survival and EGFR/MAPK signaling pathway.

### Main results and conclusions are as follows:

1) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress inhibits ARPE-19 cell viability, proliferation, and migration. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress decreases expression levels of EGFR and AKT, and increases expression levels of phosphorylated P38 and phosphorylated JNK proteins. The levels of phosphorylated AKT and ERK are upregulated in early phase of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress and is reduced in late stage. Additionally, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress inhibits phosphorylation of EGFR, AKT and ERK stimulated by EGF.

2) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress inhibits cell viability, induces cell death, and increases the levels of ROS in ARPE-19 cells. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress decreases expression levels of EGFR and PRDX6. The overexpression of PRDX6 attenuates inhibition of cell viability, cell death, and the increase of ROS induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in ARPE-19 cells. The overexpression of PRDX6 also attenuates inhibition of EGFR/ERK signaling pathway induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

3) Auranofin inhibits ARPE-19 cell survival through ROS-dependent EGFR/MAPK signaling pathway.

### Innovation and research significance:

1) This study investigates the effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress on EGFR signaling pathway in RPE cell and contributes to us further understanding the mechanism of oxidative injury of RPE cell.

2) This study demonstrates the protective role of PRDX6 protein in oxidative injury of RPE cell induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> through EGFR/ERK signaling pathway and provides some theoretical foundation for prevention and treatment of retinal degeneration diseases related to oxidative injury of RPE cell.

3) This study investigates the mechanism of auranofin inhibiting RPE cell survival and provides a novel perspective for prevention and treatment of abnormal proliferation and migration of RPE cell in PVR.

**Key words:** Retinal pigment epithelium cell, Oxidative stress, Reactive oxygen species, Epidermal growth factor receptor, Protein kinase B, mitogen-activated protein kinase, Peroxiredoxin 6, Auranofin

## 目 录

<b>第一章 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导氧化应激对 RPE 细胞 EGFR 信号通路的影响</b> .....	1
1.1 前言.....	1
1.2 材料和方法.....	3
1.3 结果.....	8
1.4 结论 .....	14
1.5 讨论 .....	15
<b>第二章 过氧化物酶 6 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导 RPE 细胞损伤的保护作用</b> .....	17
2.1 前言 .....	17
2.2 材料和方法 .....	18
2.3 结果 .....	22
2.4 结论 .....	30
2.5 讨论 .....	31
<b>第三章 金诺芬抑制 RPE 细胞存活的作用机制</b> .....	34
3.1 前言.....	34
3.2 材料和方法.....	35
3.3 结果.....	35
3.4 结论 .....	46
3.5 讨论 .....	46
全文结论.....	49
参考文献 .....	50
英文缩略词表.....	57
博士后研究工作期间科研成果 .....	58
致谢 .....	61
个人简历 .....	62



## 第一章 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导氧化应激对 RPE 细胞 EGFR 信号通路的影响

### 1.1 前言

视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE) 细胞是一层单层的色素细胞, 位于光感受器外节和脉络膜毛细血管层之间, 也是构成血视网膜屏障的一个重要组成部分<sup>[1]</sup>。作为一层含色素的细胞, RPE 细胞可以吸收由晶状体聚焦到视网膜的光能; 将视网膜下的铁离子、水、代谢终产物转运到血液; 同时摄取血液中的葡萄糖、视黄醇、脂肪酸等营养成分, 并将这些营养成分转移到光感受器细胞。此外 RPE 细胞可以将全-反式视黄醛转为 11-顺视黄醛, 吞噬脱落的光感受器外节, 分泌多种生长因子和免疫抑制因子<sup>[1]</sup>。因此 RPE 细胞对于维持视网膜的正常生理功能具有重要意义。

RPE 细胞氧化应激损伤是 RPE 功能障碍形成的重要诱因, 也是年龄相关性黄斑变性 (age-related macular degeneration, AMD) 和视网膜色素变性 (retinitis pigmentosa, RP) 等致盲性视网膜疾病的重要致病因素<sup>[2,3]</sup>。由 RPE 细胞氧化应激损伤引起的视觉功能减退已经成为发达国家和发展中国家致盲的重要原因。以 AMD 为例, 它是年龄超过 70 岁以上老人的重要的致盲眼病, 在发达国家占致盲眼病的首位, 也是世界上第三位的致盲眼病<sup>[4]</sup>。世界卫生组织 2007 年报告 AMD 占到全球致盲率的 8.7%, 并且预测随着人口老龄化的加剧, 将在 2020 年增加 1 倍<sup>[5]</sup>。我国随着人口老龄化的日益严重, AMD 患者也日趋增多, 最近的研究发现中国 50 岁以上人群中早期 AMD 患病率为 9.5%, 晚期 AMD 患病率为 1.0%<sup>[6]</sup>。

目前主要认为 AMD 的病变部位在 RPE 层、感光细胞层和脉络膜等多层组织; 发病原因与年龄、遗传因素、环境影响、视网膜慢性光损伤、代谢障碍等有关; 常见临床表现包括: 玻璃膜疣, 色素异常, 地图状萎缩, 新生血管; 然而其确切发病机制尚不完全清楚<sup>[7,8]</sup>。在视网膜组织中, RPE 细胞具有特殊的解剖位置与代谢功能, 富含光敏色素, 对氧化应激非常敏感, 在持续暴露于光照之下, 容易积累光氧化效应; 同时 RPE 细胞吞噬光感受器外节盘膜以后, 细胞内将产生大量脂质过氧化物, 随着年龄增加, RPE 细胞抵抗氧化损伤的能力降低; 因此

有学者提出 RPE 细胞氧化损伤可能是 AMD 发生关键因素<sup>[9,10]</sup>。此外, 由于光化学损伤也是氧化应激损伤的重要诱因, 视网膜对于可见光的敏感性可造成其自身的光化学损伤, 使 RPE 更易受到光氧化损伤的影响。已有研究显示慢性光损伤可以诱导视网膜神经上皮层、RPE 层和脉络膜的磷脂氧化, 是 AMD 的诱发因素<sup>[11,12]</sup>。

近年来 RPE 氧化应激损伤除过被聚焦在 AMD 发病机制的研究以外, 在遗传性视网膜疾病方面的研究逐渐受到重视<sup>[13,14]</sup>。目前有研究显示 RPE 细胞氧化应激损伤最终导致的光感受器细胞变性凋亡也同样在遗传性视网膜疾病的进展过程中起重要作用<sup>[15,16]</sup>。鉴于导致视网膜变性疾病的原因复杂, 并且受遗传因子和环境因素的影响, 因此十分必要使用可靠的 RPE 细胞氧化损伤模型寻找干预 RPE 细胞氧化应激损伤的关键靶点。

表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 是一种广泛分布于人体各组织细胞膜上的多功能糖蛋白, 属于酪氨酸激酶受体, 主要与其配体表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF) 结合, 在细胞增殖、迁徙、分化过程中起到重要作用。EGFR 下游的信号转导通路主要有两条: 一条是 Ras/Raf/MEK/MAPK 通路, 而另一条是 PI3K/Akt/mTOR 通路<sup>[17,18]</sup>。丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 是细胞内的一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 主要包括: P38 丝裂原活化蛋白激酶 (P38 mitogen-activated protein kinase, P38MAPK), 细胞外调节蛋白激酶 (extracellular regulated protein kinase, ERK), 和 c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK) 三个亚族, 可以被生长因子、氧化应激、内质网应激等激活; 在细胞增殖、分化、转化及凋亡等的过程中具有至关重要的作用<sup>[19]</sup>。磷脂酰肌醇-3-激酶 (phosphatidylinositol-3 kinase, PI3K) 是一类特异的催化磷脂酰肌醇脂物质的激酶, 是磷脂激酶家族中的一个重要成员, 具有脂类激酶活性和蛋白激酶活性; 而蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB) 通常又被简称为 AKT, 具有丝/苏氨酸激酶活性, 是 PI3K 信号转导途径中一个重要的下游靶激酶, 促进细胞的增殖与分化<sup>[20]</sup>。有研究发现 EGF 通过 PI3K 和 MAPK 信号通路增加 RPE 细胞的存活, 对 RPE 细胞的增殖和迁徙起到关键作用<sup>[21]</sup>; EGF 也通过 EGFR/PI3K/AKT 信号通路调节 RPE 细胞迁徙<sup>[22]</sup>。在氧化应激状态下, EGFR/ERK 通路可调节醛糖还原酶上调, 促进细胞存活<sup>[23]</sup>; 当激活

EGFR/AKT 信号通路时可以保护 RPE 细胞免受氧化应激引起的损伤<sup>[24]</sup>。此外 EGF/EGFR 信号通路在眼的发育过程中具有显著的功能，对细胞的增殖，存活和分化起到重要作用<sup>[25]</sup>。

因此深入探讨 RPE 细胞氧化应激损伤中 EGFR 信号通路相关蛋白的变化规律，可能对进一步理解和阐明 RPE 氧化应激损伤相关性视网膜变性疾病的发病机制具有重要意义。

## 1.2 材料与方法

### 1.2.1 实验材料

**实验用细胞：**人视网膜色素上皮细胞系（ARPE-19），购自 ATCC。

**实验试剂及抗体：**

DMEM/F12 培养基	Gibco
胎牛血清	Gibco
青链霉素（P/S）	Gibco
0.25%胰蛋白酶+EDTA	Gibco
PBS 缓冲液	Gibco
明胶（gelatin）	Santacruz
DTT(二硫苏糖醇)	AMRESCO
40% AB(丙烯酰胺/甲叉双丙烯酰胺溶液)	Bio-Rad
APS(过硫酸铵)	Bio-Rad
SDS(十二烷基磺酸钠)	sangon
蛋白 Marker	Bio-Rad
BSA (牛血清白蛋白)	Santacruz
过氧化氢（H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ）	Sigma
噻唑蓝	Sigma
BrdU	Selleck Chemicals
EGFR inhibitor (erlotinib)	Selleck Chemicals
PI3K inhibitor (A66)	Selleck Chemicals
AKT inhibitor (MK-2206)	Selleck Chemicals
抗荧光封片剂	Sigma

二甲基亚砷 (DMSO)	Sigma
脱脂奶粉	BD Biosciences
PVDF 膜	Millipore
p-EGFR 抗体	CST
EGFR 抗体	CST
pP38 抗体	CST
P38 抗体	CST
pERK 抗体	CST
ERK 抗体	CST
pJNK 抗体	CST
JNK 抗体	CST
$\beta$ -Actin 抗体	CST
Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody	CST
Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody	CST
p-AKT 抗体	Santacruz
AKT 抗体	Santacruz
BrdU 抗体	Proteintech
荧光二抗	Abcam

#### 主要实验仪器

超净工作台	The Baker Company
5%CO <sub>2</sub> 培养箱	Thermo Scientific
低温离心机	Eppendorf
移液枪	Eppendorf
电泳及电转仪	Biorad
核酸蛋白测定仪	Thermo Scientific
Western blot 仪	Biorad
Bio-Rad ChemiDoc XRS system	Biorad
多功能酶标仪	BMG Labtech
光学显微镜 (Nikon TE2000)	Nikon
激光共聚焦显微镜	Carl zeiss Germany

## 1.2.2 研究方法

### 1) 细胞活力检测 (MTT 实验)

以  $1.0 \times 10^4$  个细胞/孔接种 ARPE-19 细胞在 96 孔板中,  $37^\circ\text{C}$ ,  $5\%\text{CO}_2$  的湿润环境下孵育 12 小时, 给予 0、10ng/ml、25ng/ml、50ng/ml、100ng/ml 的 EGF 处理 12 小时 或 0、100 $\mu\text{M}$ 、200 $\mu\text{M}$ 、300 $\mu\text{M}$ 、400 $\mu\text{M}$ 、500 $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  处理 6 小时, 然后将细胞在含有 MTT (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 的培养液中,  $37.5^\circ\text{C}$ ,  $5\%\text{CO}_2$ , 孵育 4 小时。在倒置显微镜下观察见细胞碎裂, 出现紫色结晶。小心移去孔内培养液, 每孔加入 150 $\mu\text{l}$  二甲基亚砜, 置于水平摇床上, 350 转/分钟, 振荡 10 分钟, 使结晶物充分溶解。在酶联免疫检测仪 (POLARstar Omega) 吸光度为 570nm 处测量各孔的吸光值。

### 2) 细胞增殖的检测 (BrdU 吸收实验)

5-溴脱氧尿嘧啶核苷 (5-bromodeoxyuridine, BrdU), 是胸腺嘧啶 (thymidine) 类似物, 在 DNA 合成期 (S 期), BrdU 可以被增殖期的细胞吸收而渗入正在复制的 DNA 分子中, 使用荧光标记的 BrdU 抗体进行染色, 是一种研究细胞增殖的良好标记物。取对数生长期细胞, 以  $1.0 \times 10^5$  个细胞/孔接种于 12 孔板中 0.1% 明胶包被过的玻璃片上,  $37.5^\circ\text{C}$ ,  $5\%\text{CO}_2$  的湿润环境下孵育 12 小时, 至细胞全部贴壁。给与 100ng/ml EGF, 300 $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ , 100ng/ml EGF + 300 $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  处理 24 小时。终止细胞培养前, 加入终浓度为 30 $\mu\text{M}$  的 BrdU,  $37.5^\circ\text{C}$ , 孵育 4 小时。弃培养液, 细胞爬片用 PBS 洗涤 3 次。使用 4% 多聚甲醛在室温固定 30 分钟, PBS 洗 3 次。将细胞在含有 2M 盐酸的 0.1% PBST 中酸化变性 30 分钟。使用含有 5% BSA 的 PBST 室温封闭非特异性抗原 1 小时。使用 0.1% PBST 以 1:100 稀释 BrdU 抗体, 室温孵育 2 小时。PBS 洗 3 次, 再使用 PBST 以 1:1000 稀释荧光二抗, 室温孵育 1 小时, PBS 洗 3 次。使用含有 DAPI 的抗荧光封片剂, 封片。荧光显微镜下观察, 计数, 并摄像。

### 3) 细胞迁徙实验 (划痕法)

以  $1.0 \times 10^5$  个细胞/孔将 ARPE-19 细胞接种于 12 孔板中, 培养 24 小时至细胞全部融合; 每组 3 个复孔, 用 10 $\mu\text{l}$  微量移液器吸头在 12 孔板内垂直划痕, PBS 洗 2 次, 将细胞分为对照组, 100ng/ml EGF 处理组, 300 $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  处理组,

100ng/ml EGF + 300 $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理组；37.5 °C，5%CO<sub>2</sub>，的湿润环境下孵育 24 和 36 小时，倒置显微镜下观察，测量细胞迁徙距离，并摄像。

#### 4) Western blot 检测

以  $1.0 \times 10^5$  个细胞/孔，将 ARPE-19 细胞接种于 12 孔板中，在 5% CO<sub>2</sub>，37°C 的环境下孵育 12~24 小时。根据实验目的，给与不同浓度的 EGF 和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 或抑制剂处理。处理完毕后，PBS 洗两次。使用等量体积的 1 $\times$ SDS 蛋白上样缓冲液裂解细胞，100°C 加热 10 分钟使蛋白质变性，8000rpm 离心 2 分钟，负 80°C 冻存或行 Western blot 检测。根据检测目标蛋白的分子量大小选择合适浓度的分离胶。EGFR 选择 8% 分离胶，其余使用 10% 的分离胶。将两块专用玻璃板固定在制胶架上，注意玻璃板下缘要平齐，防止漏胶。固定好后，两块玻板之间的标准距离为 1.0mm。将配制好的分离胶沿玻璃板壁缓慢加入两玻板之间，液面至距离短玻璃板上缘约 2cm 处停止，加入适量 95% 乙醇使分离胶表面平齐。室温放置 30min，待分离胶凝固，出现明显的分界线，移去胶槽内的乙醇。缓慢将 5% 浓缩胶溶液加入，稍漫过短玻板上缘，插上加样孔梳，37°C 静置 20~30 分钟，待浓缩胶凝固；将玻璃板安装入电泳槽内的架子，短板面相对，扣紧，形成内槽，注入电泳缓冲液，两块玻璃板之间必须注满；玻璃板之外的电泳槽内也注入电泳缓冲液，需漫过导电金属丝，在电泳液中缓慢拔出梳子，勿使加样孔变形；按每个加样孔加入含等量蛋白的上样缓冲液，用微量加样器将样品加至加样孔底部，加入 1 $\times$ SDS 蛋白上样缓冲液配平各孔之间的体积，样品两边加入预染蛋白 marker；将电泳槽按正负极正确接入电泳仪，恒压 100V 运行，当预染蛋白 marker 通过分离胶界面，少量分开时，改为恒压 150V 运行，当显示最小分子量的预染蛋白 marker 到达分离胶底部时关闭电源。

配置电转液，电泳结束后，从玻璃板中取出分离胶，与纤维垫、Whatman 滤纸于电转液中平衡 10min，根据目标蛋白和内参蛋白的分子量，根据预染蛋白 Marker 的位置估计裁剪相应的 PVDF 膜，并将裁剪好的 PVDF 膜放入甲醇激活 15 秒；在电转液中从负极到正极依次放置纤维垫、Whatman 滤纸、分离胶、PVDF 膜、Whatman 滤纸、纤维垫，然后夹好；注意消除分离胶和 PVDF 之间的气泡，以免转膜时受到干扰。将电转夹固定于电转槽中，注意正负极相对应，电转槽中放入预冷的转膜缓冲液和适当大小的冰盒，安装好的电转槽放入冰上。接入电转

仪。转膜设置条件为恒定电流 300mA 共 120 分钟。

然后完成免疫印迹反应，首先 0.1%PBST 缓冲液配制 5%脱脂奶粉封闭液，转膜结束后取出 PVDF 膜浸入 5%脱脂奶粉，室温封闭液封闭 1~2 小时。使用 0.1%PBST 缓冲液配一抗稀释液，稀释浓度 1:1000，将 PVDF 膜蛋白面向上浸入一抗稀释液中，4℃孵育过夜；取出 PVDF 膜，0.1%PBST 液漂洗三次，水平摇床轻轻摇晃，每次 10min；选择相应的二抗以 0.1%PBST 缓冲液稀释（1:2000），将 PVDF 膜蛋白面向上，浸入二抗稀释液中，室温，缓慢摇床孵育 1 小时；使用 0.1%PBST 缓冲液洗膜三次，每次 3min；配制 ECL 发光液（A 液 1mL 与 B 液 1ml 等体积混合），在暗室中将 PVDF 膜蛋白面向下浸入发光液中孵育 1~5min；在化学发光成像系统（Bio-Rad ChemiDoc XRS system）内将 PVDF 膜曝光显影，进行多帧图像实时采集。采用 Image J 图像分析软件，测定各条带的灰度值，将各目的条带灰度值与内参  $\beta$ actin 条带的灰度值之比作为该蛋白的相对表达含量，计算各待测蛋白的表达相对值并进行比较分析。

## 5) 免疫荧光检测

- (1) 75%酒精浸泡消毒盖玻片 30 分钟，ddH<sub>2</sub>O 洗 2 次；
- (2) 0.1% gelatin 浸泡 1 小时包被盖玻片；
- (3) 将盖玻片放 12 孔板中，在生物安全柜内自然干燥，每孔接种  $5\sim 10\times 10^4$  个细胞，37.5℃，5%CO<sub>2</sub>，的湿润环境下孵育 12~24 小时，根据不同的实验目的进行处理；
- (4) 终止处理后，4%多聚甲醛室温固定 15 分钟；
- (5) PBS 洗 3 次，每次 3 分钟；
- (6) 0.1%Triton-100 冰上破膜 3 分钟；
- (7) PBS 洗 3 次，每次 3 分钟；
- (8) 含 5%的血清白蛋白的 PBST 封闭 1h；
- (9) PBS 洗 3 次，每次 3 分钟；
- (10) 4℃，一抗（1:100~1:200）孵育过夜；
- (11) PBS 洗 3 次，每次 3 分钟；
- (12) 免疫荧光二抗（1:1000），避光，室温孵育 1 小时；
- (13) PBS 洗 3 次，每次 3 分钟；

(14) 使用含有 DAPI 的抗荧光封片剂封片;

(15) 激光共聚焦显微镜下观察, 并摄像。

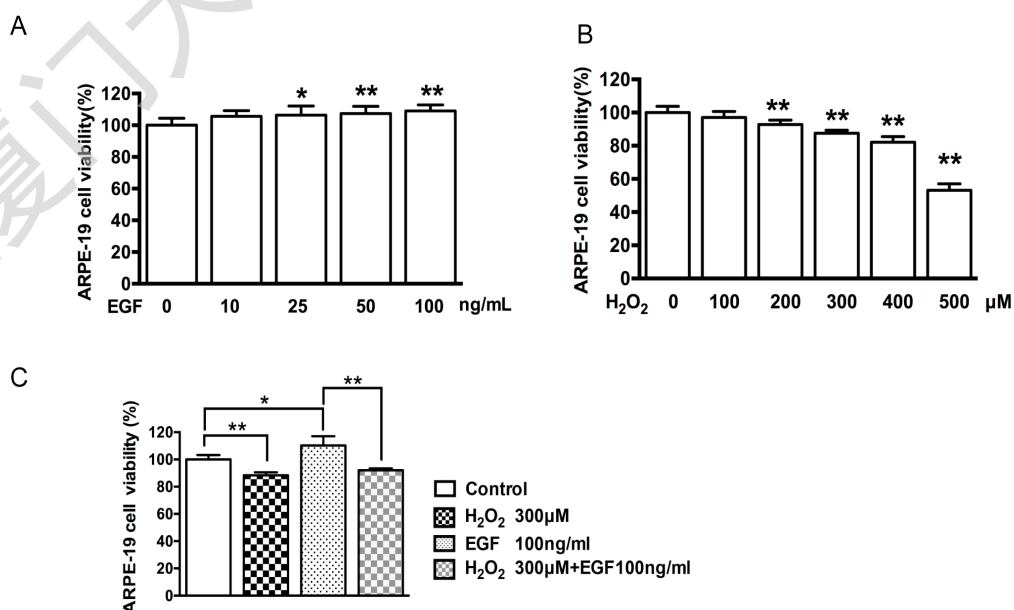
## 6) 统计方法

所有数据使用平均数±标准误( $\bar{x}\pm\text{SEM}$ )或平均数±标准差( $\bar{x}\pm\text{SD}$ )表示, 应用 GraphPad Prism 5 软件进行分析, 两组之间的比较使用 Student's t-test, 多组之间的比较使用单因素方差分析, post-hoc Tukey's test。以\*表示  $P<0.05$ , 差异有统计学意义, \*\*表示  $P<0.01$ , 差异有显著的统计学意义。

## 1.3 结果

### 1.3.1 EGF 和 $\text{H}_2\text{O}_2$ 对 ARPE-19 细胞活力的影响

通过 MTT 实验我们检测了 EGF 和  $\text{H}_2\text{O}_2$  对 ARPE-19 细胞活力的影响。结果如图 1-1.A 显示: EGF 诱导 ARPE-19 细胞活力增加。与对照组相比较, 10、25、50、100ng/ml 的 EGF 处理 12 小时使细胞活力平均分别增加 5.6 %, 6.3 % ( $P < 0.05$ ), 7.4 % ( $P < 0.01$ )和 8.9 % ( $P < 0.01$ )。  $\text{H}_2\text{O}_2$  对 ARPE-19 细胞活力具有显著的抑制作用 (图 1-1.B)。与对照组比, 100、200、300、400、500  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  处理 6 小时后, 细胞活力平均分别下降了 2.9 %, 7.2 % ( $P < 0.01$ ), 12.5 % ( $P < 0.01$ ), 17.9 % ( $P < 0.01$ )和 46.7 % ( $P < 0.01$ )。此外我们发现 300  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  也能抑制 100ng/ml 的 EGF 处理 12 小时诱导的细胞活力增加 (1-1.C)。





Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士学位论文摘要库