

学校编码: 10384

密级

学号: 24520131153567

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

小鼠角膜上皮祖细胞的抗氧化性
与 ROS 系统相关性的研究

The association between the antioxidant property and ROS
system in murine corneal epithelial progenitor cells

周晶

指导教师姓名: 周跃平教授

专业名称: 药理学

论文提交日期: 2016年4月

论文答辩日期: 2016年5月

2016年4月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

摘要

目的: 活性氧 (ROS) 是体内产生的一种高活性分子, 低浓度可以调节细胞代谢, 基因转录和磷酸酶的活性, 高浓度则会导致氧化损伤。目前, 有关干细胞自身特性的研究越来越受到学者们的重视, 但既往文献中关于干细胞对氧化应激反应以及应激条件下细胞内相关酶活性的变化规律却很少报道。本课题聚焦于, 在过氧化氢 (H_2O_2) 诱导的氧化应激条件下, 活性氧生成关键因子NOX4和抗氧化酶核转录因子NRF2在小鼠角膜上皮祖细胞 (TKE2) 和成熟的小鼠角膜上皮细胞 (MCE) 中的不同作用及相关机制。

方法: 利用小鼠角膜上皮祖细胞 (TKE2) 和成熟小鼠角膜上皮细胞 (MCE) 建立过氧化氢 (H_2O_2) 诱导的氧化应激细胞模型。首先我们通过实时荧光定量PCR (qRT-PCR)、免疫荧光染色法、免疫印迹和mRNA基因芯片检测技术比较了几种不同的类干细胞标志物在这两种细胞中的表达性差异。通过CCK8实验检测 H_2O_2 对这两种细胞的活性影响。通过流式细胞术检测细胞内的ROS水平, 采用免疫荧光染色和免疫印迹的方法分别检测两种细胞内氧化应激标志物3-硝基酪氨酸 (3-NT) 的含量, 并检测细胞内ROS清除剂超氧化物歧化酶 (SOD) 的活性。在机制研究方面, 利用荧光定量PCR (qRT-PCR)、免疫荧光染色和免疫印迹方法检测了ROS重要生成酶NADPH氧化酶4(NOX4)、双向特异性磷酸酯酶6 (DUSP6) 和核转录因子NRF2的表达水平, 同时, 也检测了基础状态下, NOX4和NRF2在两种不同细胞中的含量表达差异。此外, 应用RNA干扰技术和药理NOX4激动剂—佛波醇-12-十四酸酯-13-乙酸酯 (TPA) 来佐证 H_2O_2 条件下细胞中ROS关键因子的变化情况。

结果: 细胞鉴定结果表明, TKE2细胞的三磷酸腺苷结合转运蛋白G超家族成员2(ABCG2)、神经性钙粘附素 (N-cadherin) 等类干细胞标志物的表达水平明显高于MCE细胞, 且基因PAX6 (类细胞分化标志物) 含量显著低于MCE细胞。随着 H_2O_2 浓度的增高, TKE2细胞的细胞活性持续维持在较高水平, 而其对MCE细胞的细胞活性则具有明显的抑制作用, 并呈浓度依赖性。在 H_2O_2 诱导的氧化应激条件下, TKE2细胞中ROS水平下降、3-NT表达含量减少, 但SOD活性增强; 而在

MCE细胞中，ROS水平和3-NT表达含量增强，而SOD活性降低。H₂O₂下调TKE2细胞中ROS重要生成酶NOX4的水平，升高DUSP6的含量，显著提高NRF2的表达水平，并在加入激动剂TPA时，NOX4表达量明显上升；而在MCE细胞中，H₂O₂则上调ROS重要生成酶NOX4的水平，降低DUSP6和NRF2的表达量，且在转入小分子干扰RNA时NOX4水平显著下调。

结论：经验证，小鼠角膜上皮祖细胞（TKE2）较成熟小鼠角膜上皮细胞（MCE）而言具有干细胞特性。和MCE细胞相比，TKE2细胞具有较强的抗氧化应激特性；其作用机制是抑制ROS氧化产物的生成，下调ROS重要生成酶NOX4的表达，激活抗氧化应答并上调ROS清除剂超氧化物歧化酶SOD的表达水平。本研究发现，小鼠角膜上皮祖细胞（TKE2）呈现出不同的细胞内稳态和抗氧化应激特性，为角膜干/祖细胞在今后临床疾病的治疗和移植以及其他方面的应用提供了一定的思路 and 方向。

关键词：干细胞；角膜上皮细胞；活性氧(ROS)

Abstract

Purpose: Reactive oxygen species (ROS) is a molecular of high activity produced in human body. It can regulate metabolism, gene transcription and phosphatase activity at low concentrations, while cause oxidative damage at higher concentrations. Nowadays, the stem cell properties has increasingly aroused the public concern, but there are still few papers published about the the reponse and changes of related cell enzymes' activity under the oxidative stress. Our present research focuses on the different roles and underlying mechanism of ROS generation enzyme NADPH oxidase 4 (NOX4) and antioxidant nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (NRF2) of murine corneal epithelial progenitor cells (TKE2) and mature murine corneal epithelial cells (MCE) under oxidative stress conditions.

Methods: Murine corneal epithelial progenitor cells (TKE2) and mature murine corneal epithelial cells (MCE) are used to establish the oxidative stress model induced by hydrogen peroxide(H_2O_2). Firstly we identified and compared these two cells using stem cell associated markers by quantitative RT-PCR, immunofluorescence staining, western blot and mRNA microarray. Then the cell viability of these two cells was detected by cell counting kit-8 assays. Afterwards, the intracellular ROS levels of these two cells were detected by fluorescent DCF assay using flow cytometry, and the expression level of endogenous ROS bio-markers 3-nitrotyrosine (3-NT) was also examined by immunofluorescence staining and western blot. Further, the activity of ROS scavenger: the superoxide dismutases (SOD) assay kits were assessed. For the mechanism study, we detected the expression level of ROS generation enzyme NADPH oxidase 4 (NOX4), dual specificity phosphatase 6 (DUSP6) and nuclear factor (erythroid-derived2)-like 2 (NRF2) of TKE2 and MCE cells under 0.1mM and 0.25mM H_2O_2 and normal conditions with quantitative RT-PCR, immunofluorescence staining and western blot. Furthermore, we applied the siRNA transfection techniques and pharmacological agonist to prove the alterations of intracellular ROS key factors.

Results: The identification results showed that TKE2 cells had stronger expressions of ATP-Binding Cassette Transporter G2 (ABCG2) and N-cadherin, which are the associated markers of adult stem cells, instead of PAX6 that is an indicator associated with cell differentiation than those of MCE cells. It was demonstrated that the cell viability of TKE2 maintained a relative high level with the augment of concentrations

of H₂O₂, but the cell viability of MCE was significantly decreased in concentration-dependent manner. Meanwhile, H₂O₂ induced reductions of ROS production in TKE2 but increases in MCE. The expression level of 3-NT was also suppressed in TKE2 cells, but increased in MCE cells. In addition, the activity of SOD was significantly increased in TKE2, but reduced in MCE. In the underlying mechanism study, TKE2 inhibited ROS generation enzyme NADPH oxidase 4 (NOX4) and increased dual specificity phosphatase 6 (DUSP6) which was a related factor of NOX4, and even activated nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (NRF2). Moreover, NOX4 agonist TPA increased the expression of NOX4 in TKE2 cells. However, it was demonstrated by NOX4 siRNA that MCE promoted the expression of NOX4, suppressed DUSP6 and NRF2.

Conclusions: The results revealed that murine corneal epithelial progenitor cells (TKE2) had a stronger antioxidant property. The underlying mechanism was through inhibitions of the generation of ROS via suppressing the key ROS generation enzyme NOX4, activation of antioxidant response, and increases of ROS scavenger SOD. Our novel evidence suggests that TKE2 has a different homeostasis and strong antioxidant properties, providing new ideas and directions of treatment of clinical diseases or other applications using corneal stem/progenitor cells.

Key words: stem cells; corneal epithelial cells; reactive oxygen species

目 录

中文摘要.....	II
英文摘要.....	IV
第一章前言.....	1
1.1 氧化应激.....	1
1.1.1 氧化应激的概念.....	1
1.1.2 氧化应激状态的评价.....	2
1.1.2.1 氧化应激的代谢产物及氧化反应标志物.....	2
1.1.2.1.1 DNA 的氧化产物.....	2
1.1.2.1.2 脂质过氧化产物.....	2
1.1.2.1.3 蛋白氧化产物.....	3
1.1.2.1.4 小结.....	3
1.1.2.2 抗氧化物质和抗氧化信号通路.....	4
1.1.2.2.1 机体内可再生的抗氧化剂.....	4
1.1.2.2.2 线粒体靶向抗氧化剂.....	5
1.1.2.2.3 药物代谢动力学靶向抗氧化剂.....	5
1.1.2.2.4 KEAP1-NRF2-ARE 抗氧化信号通路.....	6
1.1.3 氧化应激与 ERK 信号通路.....	7
1.1.4 氧化应激在眼科疾病研究中的最新进展.....	7
1.1.5 氧化应激与细胞衰老.....	8
1.2 NADPH 氧化酶 4 的特性:.....	9
1.2.1 NOX4 的基本结构, 及组织、细胞内的分布.....	9
1.2.1.1 NOX4 的基本结构.....	9
1.2.1.2 NOX4 在组织、细胞内的分布.....	10
1.2.2 NOX4 的活化.....	10
1.2.3 NOX4 相关信号传导通路.....	11
1.2.4 NOX4 与相关疾病.....	11
1.3 角膜上皮干细胞.....	12
1.3.1 角膜上皮干细胞的概念与生物标志物.....	12
1.3.2 ROS 调节干细胞特性.....	13
第二章实验材料.....	15

2.1 实验材料与仪器	15
2.1.1 细胞系与实验动物	15
2.1.2 实验试剂	15
2.1.3 实验仪器	17
2.2 主要溶液配制	18
2.2.1 细胞培养相关溶液	18
2.2.2 细胞裂解液	18
2.2.3 Western Blot 实验溶液	19
2.2.4 免疫荧光实验溶液	19
第三章 实验方法	20
3.1 细胞培养	20
3.1.1 细胞的复苏	20
3.1.2 MCE 细胞的获取方法	20
3.1.3 细胞的传代	20
3.1.4 细胞的冻存	21
3.1.5 细胞的计数与种板	21
3.1.6 细胞爬片的制作	21
3.1.7 细胞的 H ₂ O ₂ 及激动剂 TPA 的处理	22
3.1.8 MCE 细胞的小干扰 RNA 转染	22
3.2 CCK8 法测定细胞活性	22
3.3 流式细胞仪检测细胞内 ROS 水平	23
3.4 免疫荧光染色	23
3.5 免疫印迹实验	24
3.5.1 TKE2 和 MCE 细胞总蛋白提取	24
3.5.2 蛋白定量与样品制备	24
3.5.3 电泳分离	25
3.5.3.1 凝胶制备	25
3.5.3.2 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳	25
3.5.4 转膜	26
3.5.5 免疫反应与显影	26
3.5.6 膜再生	27
3.6 实时荧光定量 PCR	27

3.6.1 RNA 提取	27
3.6.2 逆转录	28
3.6.3 实时荧光定量 PCR	28
3.7 mRNA 基因芯片分析	29
3.8 统计学分析	29
第四章 实验结果	30
4.1 H₂O₂ 诱导小鼠角膜上皮细胞的氧化应激作用	30
4.1.1 不同浓度的 H ₂ O ₂ 对细胞活性的影响	30
4.1.2 H ₂ O ₂ 在不同时间点对细胞活性的影响	30
4.1.3 H ₂ O ₂ 诱导细胞中的氧化应激	31
4.1.3.1 H ₂ O ₂ 调节细胞中 ROS 的水平变化	31
4.1.3.2 H ₂ O ₂ 调节细胞中 3-NT 的表达变化	32
4.1.3.3 H ₂ O ₂ 调节细胞中 SOD 的表达变化	33
4.2 验证 TKE2 细胞的干细胞特征	34
4.2.1 细胞形态比较	34
4.2.2 细胞中不同生物标记物的表达差异	35
4.2.2.1 细胞中类成体干细胞生物标记物表达差异	36
4.2.2.2 细胞中类细胞分化生物标记物表达差异	37
4.3 H₂O₂ 诱导小鼠角膜上皮细胞氧化应激的机制研究	37
4.3.1 在正常条件下, ROS 关键因子的基础表达水平	38
4.3.2 H ₂ O ₂ 调节细胞中活性氧 ROS 的生成	38
4.3.2.1 H ₂ O ₂ 调节细胞中 ROS 生成酶 NOX4 的变化	38
4.3.2.2 siRNA 对 H ₂ O ₂ 调节细胞中 NOX4 表达的验证	40
4.3.2.3 激动剂 TPA 对 H ₂ O ₂ 调节细胞中 NOX4 表达的验证	41
4.3.3 H ₂ O ₂ 调节细胞中磷酸酯酶 DUSP6 的变化	42
4.3.4 H ₂ O ₂ 调节细胞中的核转录因子 NRF2 的含量变化	43
第五章 讨论	45
第六章 总结	48
参考文献	49
附录	57
致 谢	60

Table of Contents

Abstract in Chinese	II
Abstract in English	IV
Chapter 1Introduction	1
1.1 Oxidative stress	1
1.1.1 Introduction.....	1
1.1.2 Evaluation	2
1.1.2.1Oxidative stress products and bio-markers.....	2
1.1.2.1.1Oxidative stress of DNA.....	2
1.1.2.1.2Oxidative stress of lipid	2
1.1.2.1.3Oxidative stress of protein	3
1.1.2.1.4 Conclusion.....	3
1.1.2.2 Antioxidants and antioxidative signaling pathway	4
1.1.2.2.1Recycling antioxidants.....	4
1.1.2.2.2Mitochondrial targeting antioxidants.....	5
1.1.2.2.3Pharmacokinetic targeting antioxidants.....	5
1.1.2.2.4 KEAP1-NRF2-ARE pathway	6
1.1.3 Oxidative stress and ERK signaling pathway	7
1.1.4 Oxidative stress and eye disease	7
1.1.5 Oxidative stress and senility	8
1.2 Characteristics of NADPH enzyme 4	9
1.2.1 Structure and tissue distribution of NOX4.....	9
1.2.1.1 Basic structure	9
1.2.1.2 Tissue and cell distribution of NOX4	10
1.2.2 Activation of NOX4	10
1.2.3 NOX4 related signaling pathway.....	11
1.2.4 NOX4 and related disease	11
1.3 Corneal epithelial stem cells	12
1.3.1 Definition and related bio-markers	12
1.3.2 Stem cell properties regulator ROS	13
Chapter 2Materials	14
2.1 Experiment materials and equipments	15

2.1.1 Cell line and experiment animals	15
2.1.2 Experiment reagents	15
2.1.3 Experiment equipments	17
2.2 Main solution preparations	18
2.2.1 Medium.....	18
2.2.2 Lysis buffer	18
2.2.3 Experiment solutions of Western Blot	19
2.2.4 Experiment solutions of Immunofluorescence	19
Chapter 3 Methods	20
3.1 Cell culture	20
3.1.1 Cell Resuscitation	20
3.1.2 Obtainment of MCE cells	20
3.1.3 Cell Propagation	20
3.1.4 Cell Freezing.....	21
3.1.5 Cell Counting.....	21
3.1.6 Preparation of Cell Slide.....	21
3.1.7 Treatment of H ₂ O ₂ and TPA on cells	22
3.1.8 siRNA transfections on MCE	22
3.2 CCK8 assay	22
3.3 ROS assay by Flow Cytometry assay	23
3.4 Immunofluorescence Staining	23
3.5 Western Blot	24
3.5.1 Total protein extraction	24
3.5.2 Preparation and quantification of Protein sample.....	24
3.5.3 Electrophoretic Separation.....	25
3.5.3.1 Gel preparation	25
3.5.3.2 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis	25
3.5.4 Membrane Transfer.....	26
3.5.5 Immune response and development.....	26
3.5.6 Membrane Regeneration.....	27
3.6 Real-Time Fluorescence Quantitative PCR	27
3.6.1 RNA extraction	27
3.6.2 Reverse Transcription	28
3.6.3 PCR amplification	28
3.7 mRNA microarray	29

3.8 Statistical Analysis	29
Chapter 4 Results	30
4.1 H₂O₂ induced oxidative stress on murine corneal epithelial cells	30
4.1.1 Effects of H ₂ O ₂ of different concentrations on the cell viability	30
4.1.2 Effects of H ₂ O ₂ of different time points on the cell viability	30
4.1.3 H ₂ O ₂ induced cell oxidative stress.....	31
4.1.3.1 Regulation of H ₂ O ₂ on cellular ROS level.....	31
4.1.3.2 Regulation of H ₂ O ₂ on cellular 3-NT level.....	32
4.1.3.3 Regulation of H ₂ O ₂ on cellular SOD level	33
4.2 Confirmation of stem cell properties on TKE2	34
4.2.1 Comparison of cell morphology	34
4.2.2 Difference of bio-markers' expression on cells	35
4.2.2.1 Difference of stem cell associated markers.....	35
4.2.2.2 Difference of related cell differentiated markers.....	37
4.3 The underlying mechanism of H₂O₂ induced murine corneal epithelial cell oxidative stress	37
4.3.1 The basic cellular ROS level under normal conditions.....	38
4.3.2 H ₂ O ₂ regulated cellular ROS generation	38
4.3.2.1 H ₂ O ₂ regulated the expression of ROS generated enzyme NOX4 ...	38
4.3.2.2 Confirmation of siRNA on changes of H ₂ O ₂ regulated cellular expression of NOX4 in MCE.....	40
4.3.2.3 Confirmation of agonist TPA on changes of H ₂ O ₂ regulated cellular expression of NOX4 in TKE2.....	41
4.3.3 H ₂ O ₂ regulated cellular expression of DUSP6	42
4.3.4 H ₂ O ₂ regulated cellular expression of nuclear transcription factor NRF2	43
Chapter 5 Discussion	45
Chapter 6 Conclusion	48
Reference	49
Appendices	57
Acknowledgement	60

第一章 前言

氧化应激是指机体内的氧化和抗氧化系统失衡,也是导致衰老和疾病的重要因素之一。具体来说,氧化应激过程中的产物主要是活性氧(ROS),例如超氧阴离子(O_2^-),过氧化氢(H_2O_2),羟基自由基($OH\cdot$)等等^[1]。细胞内的活性氧也被认为是细胞凋亡的第二信使,参与细胞凋亡过程。它可以与各类分子(包括一些无机小分子)发生相互作用,如蛋白质、核酸、脂质以及碳水化合物等等,并在这些过程中不可逆地改变或毁坏这些靶分子的功能和结构^[2]。

近年来,干细胞的研究进展迅速,并已开展了初步的临床应用。干细胞细胞特性的研究受到重视,且作为干细胞特性之一的活性氧以及抗氧化性的研究引起了学者们的广泛关注。研究表明与以往ROS的损伤作用不同,ROS还可以作为第二信使,通过调节干细胞的自我更新和分化过程来维持干细胞的特性^[3];也有研究表明胚胎干细胞,间充质干细胞,以及肺脂肪基质干细胞等具有一定的抗氧化性^[4-6],但其机制仍有待进一步揭示。

人体器官中眼睛位于体表,容易受到各种理化因素的“攻击”影响导致氧化应激^[7]。有些眼表疾病的发生机制与干细胞的缺损有关。在实验研究方面,近年来已建立了不同来源的角膜上皮干细胞。深入研究角膜上皮干细胞的抗氧化特性,将为干细胞在今后角膜疾病的治疗或者其他方面的应用提供一定的证据和思路。

1.1 氧化应激

1.1.1 氧化应激概念

氧化应激,是指机体内氧化作用与抗氧化作用失衡,从而导致中性粒细胞炎性浸润,蛋白酶分泌异常增加,产生大量的氮氧化中间产物。通常认为氧化应激是自由基在机体内产生的一种损伤作用,它分为活性氧簇和活性氮簇:活性氧簇(ROS)包括超氧阴离子($\cdot O_2^-$)、羟自由基($\cdot OH$)、烷氧自由基($\cdot OR$)和过氧化氢($RO_2\cdot$)等;活性氮簇(RNS)包括一氧化氮($\cdot NO$)、二氧化氮($\cdot NO_2$)和过氧化亚硝酸盐($\cdot ONOO^-$)等。

在正常生理条件下,机体内的氧化系统和抗氧化系统通常处于动态平衡状态,抗氧化系统可以及时清除掉过多的自由基,并使之维持在一个合理的较低

的水平；而当受到外界刺激发生氧化应激时，则会不断产生并积累活性物质，最终引起细胞、组织的损伤，乃至疾病的发生。

ROS 之前被认为是氧化还原的副产物，发生在线粒体，过氧化物酶体，细胞色素 P-450，和其它细胞成分中^[8-14]。和早期认识 ROS 只是线粒体有氧代谢磷酸化的副产物不同，现在研究表明，ROS 除了参与宿主防御以外，还是信号转导、免疫功能、激素生物合成功能的活性产物^[15]。总而言之，ROS 具有“双刃剑”作用：低浓度时，具有调节细胞代谢、磷酸酶的活性、高灵敏的氧化还原反应，以及基因转录等的功能^[16]；而在高浓度时，则会导致氧化应激损伤和很多病理过程的产生。

1.1.2 氧化应激状态的评价

1.1.2.1 氧化应激的代谢产物及氧化反应标志物

据研究显示，ROS 主要与 DNA、脂质以及蛋白质等生物分子发生相互作用，并导致氧化损伤。因此，通过检测机体组织和体液中代谢出的氧化应激产物来评价氧化应激状态极具合理性，并受到广大医护人员和学者的重视。

1.1.2.1.1 DNA 的氧化产物

DNA 的氧化损伤主要由羟自由基($\cdot\text{OH}$)引发：它能够攻击脱氧核糖，分解五碳糖，断裂 3',5'-磷酸二酯键，导致 DNA 出现单链或者双链的断裂畸变^[17, 18]。通常线粒体 DNA 的突变形式是：由胸腺嘧啶(T)突变为胞嘧啶(C)，或由鸟嘌呤(G)突变为腺嘌呤(A)。例如：8-羟基脱氧鸟苷(8-OHdG)现已被认为是内源性或外源性因素导致 DNA 氧化损伤的生物标志物^[19]。它的原理是机体内鸟嘌呤(G)被氧化成了 8-羟基脱氧鸟苷(8-OHdG)，在核酸内切酶和葡糖糖基转移酶的剪切修复作用下，以 8-OHdG 被切除，并经尿排出。故尿中检测到的 8-OHdG 含量是机体 DNA 经氧化损伤后排出的总量，可以反映出机体对氧化损伤修复的能力。同理，也有报道显示，尿中的胸腺嘧啶核乙二醇含量也能反映出羟自由基对机体的 DNA 损伤程度^[20]。

1.1.2.1.2 脂质过氧化产物

据研究报道，作为细胞生物膜的主要成分，磷脂中富含多不饱和脂肪酸(PUFA)，在氧化应激条件下，极易遭受氧自由基和其活性衍生物的攻击，引发脂质过氧化链式反应，最终形成各种代谢产物^[21]。例如：4-羟基壬烯醛(4-HNE)

是脂质过氧化反应中的主要产物之一，具有很强的生物活性，可以靶向作用于多种生物分子。氧化应激条件下，4-HNE 浓度较高，可以扰乱细胞的正常功能，造成细胞损伤甚至引发疾病的发生；而在正常浓度时，它又可以作为生物活性分子，动态调节多种细胞信号转导通路、基因转录，以及多种生物学功能。4-HNE 是一种含氧的 $\alpha\beta$ 不饱和醛，主要来源于细胞中 ω -6PUFAs（亚油酸、亚麻酸以及花生四烯酸等）的脂质氧化过程。4-HNE 是一个具有亲水性和亲脂性的两性分子，且在机体的细胞、组织中分布广泛。此外，在食用和储存富含 ω -6PUFAs 的食物时，也可能有微量的 4-HNE 产生^[22, 23]。因此，在科学研究中，4-HNE 现已被广泛用为脂质过氧化的生物标记物，并在体外细胞实验中被用来诱导氧化应激或自噬过程的发生^[23, 24]，如在眼表用 4-HNE 造模诱导氧化应激，在体外细胞实验和体内动物实验中，检测相关角膜上皮的损伤现象并研究相对应的临床药物治疗^[25]，已取得初步成效。

1.1.2.1.3 蛋白氧化产物

蛋白质在机体内存在分布广泛，在氧化应激条件下，极易受到ROS和RNS的攻击，导致蛋白质氨基酸（如赖氨酸、精氨酸和脯氨酸等）被氧化或硝基修饰，主要包括：蛋白质分子之间相互的交联聚合、蛋白质的肽链断裂以及氨基酸氧化脱氨反应等等。目前，公认的关于蛋白质氧化损伤的检测指标主要有两个：羰基化（蛋白质羰基生成）和硝基化（蛋白质中的酪氨酸硝基化）。应激状态下，ROS 自由基若攻击蛋白分子的侧链氨基酸，则会氧化产生相对应的蛋白质羰基衍生物，并且其稳定性较高，适合作为判断蛋白质氧化损伤的指标^[26]；又如机体内含有酪氨酸残基的蛋白质，可被过氧亚硝基硝化产生特异性的3-硝基酪氨酸（3-NT），已有研究报道指出，在多种疾病中发现3-硝基酪氨酸的表达水平增高，是普遍认可的蛋白质氧化应激损伤标志物之一^[27, 28]。

1.1.2.1.4 小结

总而言之，在氧化应激条件下，活性氧自由基在损伤机体生物分子后，会导致一系列特异性氧化代谢产物的产生，合理检测机体组织或体液中的代谢产物含量，可以准确反映出机体内的氧化应激损伤情况。值得注意的是，若仅单独使用某一种标志物表达水平来判断难免较为片面，最好能综合考虑到化学生物中各种情况的氧化代谢产物。

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts 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 for delivery details.