

学校编码: 10384

密级

学号: 24520131153555

廈門大學

硕士学位论文

**ROS 信号通路在小鼠角膜上皮祖细胞
(TKE2) 的抗氧化细胞特性中的作用以及
分子机制的研究**

**Molecular mechanism of the role of ROS signaling pathway
in the antioxidant properties of TKE2 cells**

葛连平

指导教师姓名: 周跃平教授

马建兴教授

专业名称: 药理学

论文提交日期: 2016 年 04 月

论文答辩时间: 2016 年 05 月

学位授予日期: 2016 年 月

答辩委员会主席:

评阅人:

2016 年 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(厦门大学眼科研究所周跃平)课题(组)的研究成果,获得(周跃平)课题(组)经费或实验室的资助,在(厦门大学眼科研究所)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: 目前ROS在干细胞生物学中的作用还没有得到充分说明和了解。在过氧化氢 (H_2O_2) 诱导的氧化应激条件下, 我们比较小鼠角膜上皮祖细胞 (TKE2)^[1]和成熟的小鼠角膜上皮细胞 (MCE) 的不同反应, 重点研究是角膜干细胞的抗氧化细胞特性及相关机制。

方法: 以小鼠角膜上皮祖细胞 (TKE2) 和成熟的小鼠角膜上皮细胞 (MCE) 为细胞模型, 通过CCK8细胞活性实验检测不同浓度 H_2O_2 对小鼠角膜上皮的祖细胞 (TKE2) 和成熟的小鼠角膜上皮细胞 (MCE) 的影响。利用 H_2O_2 处理细胞24小时后, 通过流式细胞术检测细胞内ROS的水平, 利用免疫荧光染色检测细胞内氧化应激标志物3-硝基酪氨酸(3-NT)表达情况, 通过实时定量PCR (qRT-PCR)、免疫荧光染色、免疫印迹等方法检测细胞主要Keap1-Nrf2-ARE抗氧化信号通路及细胞自噬水平的激活情况。往培养基中加入5%胎牛血清, 得到分化的TKE2细胞。在 H_2O_2 处理24小时后, 通过检测分化的TKE2细胞内ROS产生关键酶-NOX4及细胞主要Keap1-Nrf2-ARE抗氧化信号通路的激活情况, 进一步论证TKE2具有一定的抗氧化性质。

结果: 细胞活性实验结果显示, 在相同应激条件下, TKE2细胞则表现出较强的拮抗作用, 而MCE细胞存活受到抑制, 且呈浓度依赖关系。活性氧 (ROS) 实验测定与ROS标记物3-NT结果显示, 在相同应激条件下, TKE2细胞内ROS/3-NT表达降低, 而MCE细胞内ROS/3-NT表达升高; 相关抗氧化性机制研究表明 (相同应激条件), TKE2细胞内重要抗氧化应激信号通路的Keap1-Nrf2-ARE被激活, 而MCE细胞内应答较低。另一方面, H_2O_2 诱导4小时后, TKE2细胞中相关自噬标志物: Beclin1, LC3-II/LC3-I比值均上调, 而P62蛋白表达下调; MCE细胞中Beclin1, LC3-II/LC3-I比值均下调, 而P62蛋白表达上调。结果提示在氧化应激的早期阶段, TKE2细胞中自噬被激活, 而MCE细胞的自噬未被激活或被抑制。而在 H_2O_2 诱导24小时后, 未观察到TKE2和MCE细胞中自噬的明显改变。TKE2细胞与分化后的TKE2细胞比较结果证实: H_2O_2 处理分化的TKE2细胞24小时后, 测定细胞内ROS产生关键酶-NOX4表达升高, 且重要抗氧化应激信号通路Keap1-Nrf2-ARE未被激活, 提示TKE2干细胞具备一定的抗氧化性质。

结论: 在 H_2O_2 诱导的氧化应激条件下, 小鼠角膜上皮祖细胞 TKE2 较成熟小鼠角

膜上皮 MCE 细胞具有显著的抗氧化应激细胞特性，其机制是较强地激活抗氧化应激信号通路 Keap1-Nrf2-ARE 及早期自噬而实现的。结果首次提示角膜干细胞具有较强的抗氧化能力，对角膜干细胞以及其他干细胞的治疗及其他应用具有潜在的意义。

关键词：干细胞；抗氧化应激；自噬

厦门大学博硕士论文摘要库

Abstract

Purpose: The role of ROS in stem cell biology is not fully illustrated and understood. In this present research we compare the different responses under condition of oxidative stress induced by hydrogen peroxide (H_2O_2) between lately developed murine corneal epithelial progenitor cells (TKE2) and mature murine corneal epithelial cells (MCE) and investigate the antioxidant properties of TKE2 cells and the underlying mechanism.

Methods: The mouse corneal epithelial progenitor cells (TKE2) and mature mouse corneal epithelial cells (MCE) were applied to establish the cell model. The cell viability was measured by CCK8 assay in cultured TKE2 and MCE cells exposed to H_2O_2 at different concentrations. ROS production was detected by fluorescent DCF assay using flow-cytometry. The expression level of oxidative stress markers 3-nitrotyrosine (3-NT) was assessed by immunofluorescence staining. The main factors of Keap1-Nrf2-ARE signaling pathway and the levels of autophagy makers were detected by real-time quantitative PCR (qRT-PCR), immunofluorescence staining, and Western blot. Differentiated-TKE2 cells were obtained by adding 5% fetal bovine serum to the culture medium. After treatment of H_2O_2 for 24 hours, NOX4, which is a key enzymes of ROS production, and the main proteins of Keap1-Nrf2-ARE signaling pathway were measured in differentiated-TKE2 cells in order to further prove the antioxidant properties of TKE2 cells.

Results: TKE2 cells showed a significant and strong resistance of cell viability against the oxidative stress induced by H_2O_2 , while the cell viability of MCE cells was decreased in a concentration dependent manner under the same stress conditions. H_2O_2 reduced the production of ROS and the level of 3-NT in TKE2 cells, however the amount of ROS generation and the level of 3-NT within MCE cells were increased. It was shown that the important cellular signaling pathway of oxidative stress (Keap1-Nrf2-ARE) of was activated in TKE2 cells, but not in MCE cells. On the other hand, it was demonstrated that at early stage of oxidative stress, i.e. 4 hours after exposure of H_2O_2 , the related autophagy markers-Beclin1, the ratios of LC3-II and LC3-I were up-

regulated and P62 was down-regulated in TKE2 cells, but not in MCE cells, which were considered as the activation of autophagy. After treatment of H₂O₂ for 24 hours, these markers of autophagy were not significantly changed between TKE2 and MCE cells. Furthermore, we compared TKE2 cells and differentiated-TKE2 cells to further support the antioxidant properties of TKE2 cells. It was demonstrated that the level of important ROS generation enzyme: NOX4 was up-regulated and the Keap1-Nrf2-ARE pathway was not activated in differentiated-TKE2 cells.

Conclusion: The experimental results revealed that mouse corneal epithelial progenitor cells (TKE2) have stronger antioxidant properties against oxidative stress than mouse corneal epithelial cells (MCE) via activating Keap1-Nrf2-ARE signaling pathway and autophagy. We, for the first time, provided the evidence that the corneal stem cells have a strong antioxidant capacity, indicating a potential beneficial value of corneal stem/progenitor cells in therapy and other applications.

Keywords: Stem cells; antioxidants; Autophagy

目 录

摘 要	I
Abstract	III
目 录	I
第一章 前 言	1
1.1 氧化应激.....	1
1.1.1 氧化应激简述.....	1
1.1.2 氧化应激与眼科疾病的进展.....	1
1.1.3 氧化应激模型的建立.....	2
1.1.4 氧化应激相关蛋白阐述.....	2
1.2 抗氧化应激信号通路.....	4
1.2.1 Keap1-Nrf2-ARE 信号通路.....	4
1.2.2 Nrf2 与眼科疾病进展.....	8
1.2.3 Keap1-Nrf2-ARE 信号通路其他信号通路关系.....	8
1.3 氧化应激与自噬研究进展.....	10
1.3.1 自噬的简述.....	10
1.3.2 氧化应激与自噬关系.....	11
1.3.3 ROS 介导自噬相关的眼科疾病.....	12
第二章 实验材料	13
2.1 实验材料与仪器.....	13
2.1.1 细胞.....	13
2.1.2 实验试剂.....	13
2.1.3 实验仪器.....	15
2.1.4 主要溶液配.....	16
第三章 实验方法	19

3.1 细胞培养	19
3.1.1 细胞的复苏.....	19
3.1.2 细胞的传代.....	19
3.1.3 细胞的冻存.....	20
3.1.4 细胞计数及种板.....	20
3.1.5 细胞爬片的制作.....	20
3.1.6 TKE2/MCE 细胞的 H ₂ O ₂ 处理	21
3.1.7 TKE2/MCE 细胞 SFN 处理及 NRF2 siRNA 转染	21
3.2 CCK-8 法测定细胞的活性	21
3.3 流式细胞术检测细胞内 ROS 的水平	22
3.4 免疫荧光染色	22
3.5 免疫印迹实验(Western Blotting)	23
3.6 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)	25
3.7 基因芯片	28
3.8 统计学分析	28
第四章 结果	29
4.1 H₂O₂ 诱导小鼠角膜上皮祖细胞(TKE2)/小鼠成熟角膜上皮细胞(MCE)	29
4.1.1 H ₂ O ₂ 对 TKE2/MCE 细胞活性的影响	29
4.1.2 H ₂ O ₂ 诱导 TKE2/MCE 细胞氧化应激	30
4.1.3 H ₂ O ₂ 诱导 TKE2/MCE 细胞抗氧化应激的作用机制研究	32
4.1.4 H ₂ O ₂ 诱导 TKE2/MCE 细胞自噬作用研究	37
4.2 H₂O₂ 诱导小鼠角膜上皮祖细胞 TKE2 分化前后的研究	41
4.2.1 H ₂ O ₂ 诱导小鼠角膜上皮祖细胞 TKE2 分化前后细胞形态的影响 .	41
4.2.2 H ₂ O ₂ 诱导分化的 TKE2 相关干细胞标记物表达减弱	42
4.2.3 H ₂ O ₂ 诱导分化的 TKE2 细胞氧化应激的作用机制研究	43
第五章 讨论	47
第六章 总结	50
参考文献	51

缩写索引	62
附录二 在学期间科研成果.....	65
致 谢	66

厦门大学博硕士论文摘要库

Table of Contents

Abstract in Chinese	1
Abstract in English	11
Chapter 1 Introduction	1
1.1 Oxidative Stress	1
1.1.1 Introduction of Oxidative Stress	1
1.1.2 Oxidative Stress and Eye disease.....	1
1.1.3 Oxidative Stress Model.....	2
1.1.4 Related proteins of Oxidative stress	2
1.2 Antioxidant signaling pathways	4
1.2.1 Keap1-Nrf2-ARE signaling pathways	4
1.2.2 Nrf2 and Eye disease	8
1.2.3 Relationship between Keap1-Nrf2-ARE and other pathways	9
1.3 Research of Oxidative Stress and Autophagy	10
1.3.1 Introduction of Autophagy	10
1.3.2 Oxidative Stress and Autophagy	11
1.3.3 ROS-mediated autophagy and Eye disease.....	12
Chapter 2 Materials	13
2.1 Experiment Materials and Equipments	13
2.1.1 Cell.....	13
2.1.2 Experiment Reagents	13
2.1.3 Experiment Equipments.....	15
2.1.4 Solution prepare	16
Chapter 3 Methods	19
3.1 Cell Culture	19
3.1.1 Cell Resuscitation	19
3.1.2 Cell Propagation.....	19

3.1.3 Cell Freezing	20
3.1.4 Cell Counting	20
3.1.5 Preparation of Cell Slide	20
3.1.6 Treatment with H ₂ O ₂ in the TKE2 and MCE cells.....	21
3.1.7 Treatment with SFN and Transfection with NRF2 siRNA	21
3.2 CCK-8 assay	21
3.3 ROS detection by Flow Cytometry assay.....	22
3.4 Immunofluorescence Staining.....	22
3.5 Western Blotting.....	23
3.6 Quantitative Real-Time PCR.....	25
3.7 mRNA microarray	28
3.8 Statistical Analysis	28
Chapter 4 Results.....	29
4.1 H₂O₂ induced Oxidative Stress on TKE2 and MCE cells.....	29
4.1.1 Effects of H ₂ O ₂ on the cell viability of TKE2 and MCE cells.....	29
4.1.2 H ₂ O ₂ induced Oxidative Stress on TKE2 and MCE cells.....	30
4.1.3 H ₂ O ₂ Mechanism of H ₂ O ₂ induced antioxidant properties on TKE2 and MCE cells.....	32
4.1.4 H ₂ O ₂ induced Autophagy on TKE2 and MCE cells.....	37
4.2 H₂O₂ induced Differentiated-TKE2 cells	41
4.2.1 Effects of H ₂ O ₂ on the morphology of TKE2 and Differentiated-TKE2 cells	41
4.2.2 H ₂ O ₂ down-regulated the expression of stem cell marker on Differentiated-TKE2 cells.....	42
4.2.3 The underlying mechanism of H ₂ O ₂ induced Oxidative Stress on Differentiated-TKE2 cells.....	43
Chapter 5 Discussion	47
Chapter 6 Conclusion	50
Reference	51
Appendices.....	62

Acknowledgement.....66

厦门大学博硕士学位论文摘要库

第一章 前言

1.1 氧化应激

1.1.1 氧化应激简述

氧化应激 (Oxidative Stress, OS) 是指机体持续暴露在各种各样的内源性、外源性氧化及亲电子化学物之中, 体内高活性分子如活性氧自由基 (reactive oxygen species, ROS) 和活性氮自由基 (reactive nitrogen species, RNS) (ROS 包括超氧阴离子 ($\cdot\text{O}_2^-$)、羟自由基 ($\cdot\text{OH}$) 和过氧化氢 (H_2O_2) 等; RNS 包括一氧化氮 ($\cdot\text{NO}$)、二氧化氮 ($\cdot\text{NO}_2$) 和过氧化亚硝酸盐 ($\cdot\text{ONOO}^-$) 等) 产生过多, 氧化程度超出氧化物的清除, 机体氧化系统和抗氧化系统失衡, 持续的氧化应激会引起细胞各种结构损伤, 尤其包括对脂质、蛋白和核酸的破坏。一般情况, 认为氧化应激反应分为两种: 慢性、急性。急性氧化应激包括缺血损伤、急性中毒反应等; 慢性氧化应激包括肿瘤、老年慢性神经退行性病变等。然而, 无论急性还是慢性氧化应激, 在应激的状态下, 产生过多的高活性分子 (ROS/RNS) 引起细胞脂质, 蛋白质和 DNA 的损伤, 进而引起细胞死亡, 组织损伤, 与此同时, 氧化应激被认为是导致衰老和疾病的一个重要因素^[2]。

1.1.2 氧化应激与眼科疾病的进展

角膜是暴露于空气中的人体器官, 由于外界的一些刺激因素, 例如紫外照射、空气污染等, 使细胞内产生过量的活性氧物质, 如超氧自由基、过氧化氢等, 导致角膜氧化应激, 进而引起角膜发生感染、炎症发以及新生血管等病理改变, 甚至导致圆锥角膜、翳肉等角膜疾病的发生^[3]。

1.1.2.1 眼表疾病与氧化应激

眼表疾病主要是指发生在角、结膜的一类疾病, 其中包括角膜炎、干眼症、结膜炎、翼状胬肉等等。眼表长期暴露于体外, 受到各种理化因素刺激, 导致细胞内活性氧的增加。Cejková 等^[4]研究证明, 干眼症患者的结膜上皮组织中, 活性氧增加, 导致眼表组织的氧化应激增强, 进而增加干眼症患者的症状。Balci 等^[5]通过研究证明: 在翼状胬肉组织中, 各种过氧化物酶含量都较低, 差异具有统计学意义。翼状胬肉患者眼表的氧化还原平衡失衡, 这种失衡导致眼表结膜损

伤，正常组织发生增生导致赘肉增长。

1.1.2.2 青光眼与氧化应激

青光眼是眼压升高而导致眼底视神经损害的一类眼科疾病。房水中的氧自由基可以使小梁网发生氧化应激，从而导致细胞内线粒体损害，加重组织受损程度^[6]。Izzotti 等^[7]

发现，在部分青光眼患者中，小梁网细胞会丢失，而这种细胞丢失与线粒体损伤、丢失及氧化应激有关。

1.1.2.3 白内障与氧化应激

年龄的增长、紫外线的照射、辐射、外伤等易引起体内组织自由基的增加，自由基对晶状体产生氧化损伤及生化改变，导致晶状体的混浊，且大量的 NO 对晶状体产生损伤作用，促使晶状体细胞的凋亡^[8]。

1.1.2.4 糖尿病视网膜病变与氧化应激

大量研究表明，很多的眼底疾病，如糖尿病视网膜病变、黄斑变性等都与眼底的脂质过氧化息息相关^[9]。

综上所述，氧化应激对眼部的疾病影响已经研究多年且较为明确，相信通过减少氧化应激对眼部损伤作用用来预防就治疗部分的眼部疾病。

1.1.3 氧化应激模型的建立

建立成功可靠的氧化应激模型，是研究氧化应激相关机制的研究前提。成功的模型需要具有可靠性、可控性、特异性。关于目前氧化应激模型主要分为两大类：动物模型、体外细胞培养模型。动物模型主要有 D-半乳糖模型^[10]、辐照模型、臭氧损伤模型^[11]、阿霉素模型^[12]、四氧嘧啶模型^[12]、尼古丁损伤模型^[13]等。而体外模型目前主要是不同浓度的过氧化氢介导的氧化应激^[14]。

1.1.4 氧化应激相关蛋白阐述

在机体内氧化还原的平衡主要是由两个系统共同作用决定的：促氧化系统和抗氧化系统，且各个系统环节中的因子都起着重要的作用。

1.1.4.1 ROS 生成酶

(Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH) 氧化酶是细胞内 ROS 生成的主要来源^[15]，并且在细胞中发现了一系列 NADPH 氧化酶催化亚基 (gp91phox) 同源物，称其为 NOX1, NOX2 (gp91phox), NOX3,

NOX4,NOX5,DUOX1 及 DUOX2,之后被命名为 NOX 的蛋白家族。NOX 分子大致可以分为 N 端的疏水跨膜区和 C 端两大结构域,羧基末端含有保守的黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)和 NADPH 结合域。NOX 酶是单电子转运,传递电子方向:从 NADPH-FAD-第一血红素-第二血红素-形成活性氧^[16]。

1.1.4.2 氧化应激标志物

3-硝基酪氨酸(3-NT):3-硝基酪氨酸是机体中的脂蛋白、酪氨酸残基的蛋白质被硝基化后的相关产物,既往氧化应激中都发现 3-NT 水平的升高,因此,3-NT 被作为氧化应激的标志物之一^[17]。

4-HNE:4-HNE 是内源性脂质过氧化的产物,由 ω -6 多不饱和脂肪酸(PUFAs)的脂质过氧化产生的。4-HNE 在机体内主要以三种形式存在:游离存在的 4-HNE、与生物分子结合/自身代谢产物及合成的衍生品^[18]。

8-OHdG:8-羟基脱氧鸟苷作为内、外源性因素氧化损伤的生物标志物,是由于 ROS 攻击 DNA 内的鸟嘌呤碱基中的第 8 位碳原子^[19]。

1.1.4.3 氧化应激标志物

抗氧化剂内源产生,包括超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(Catalase)、过氧化物酶(peroxiredoxins)等^[20]。超氧化物歧化酶(Superoxide Dismutase SOD)是广泛存在于生命体内的金属酶,主要是催化超氧自由基(O_2^-)发生歧化的反应,是体内 O_2^- 的消除剂^[21]。过氧化氢酶主要催化 H_2O_2 分解为 H_2O 、 O_2 ,使得形成-OH 的量降低,几乎存在于所有细胞中。过氧化物酶是一类过氧化氢作为电子受体,然后催化底物氧化的酶类。存于细胞的过氧化物酶体中,具有消除过氧化氢、胺类等毒性物质。

1.1.4.4 抗氧化相关信号通路

目前研究认为 Keap1-Nrf2-ARE 信号通路为抗氧化应激中最主要的信号通路,同时还存在很多信号通路与抗氧化应激之间是密切相关的。例如有研究表明 JAK2/STAT3 和 SIRT1 通路可减轻线粒体氧化应激损害、抗凋亡等作用^[22];氧化应激中通过 FOXO-Wnt 信号通路参与氧化应激介导的骨质疏松及机制研究^[23];mTOR(雷帕霉素靶蛋白)信号通路介导细胞生长、细胞凋亡及抗氧化的作用^[24]。

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.