

学校编码: 10384

分类号____密级____

学号: 24520141153508

UDC ____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

**G6PD 在糖尿病视网膜病变及缺氧所致内
皮细胞损伤中的变化及机制探讨**

**Involvement of G6PD in diabetic retinopathy and
hypoxia induced endothelial lesion and its underlying
mechanism**

杨晨

指导教师姓名: 杨叔禹 教授

专业名称: 内科学

论文提交日期: 2017年4月

论文答辩日期: 2017年5月

学位授予日期: 2017年6月

答辩委员会主席:

评 阅 人:

NAC 通过提高 GSPD 活性改善缺氧刺激下 EA.hy926 的细胞损伤

杨晨

指导教师

杨叔禹
教授

厦门大学

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

研究目的：糖尿病视网膜病变（Diabetic Retinopathy, DR）是发达国家成人致盲的主要原因，其发病机制尚不十分明确。磷酸戊糖途径(Pentose Phosphate Pathway, PPP)又叫磷酸己糖支路，是糖代谢的重要分支。大量研究表明磷酸戊糖途径在肿瘤的发生，细胞的增殖和抗氧化中发挥重要作用。N-乙酰半胱氨酸（N-acetyl-L-cysteine, NAC）有很好的抗氧化和抗炎作用，多年来在临床上用于治疗急性咳嗽呼吸道疾病，亦有研究表明 NAC 具有提高 G6PD 活性的作用。本课题旨在探究 G6PD 在糖尿病视网膜病变及缺氧所致内皮细胞损伤中的变化及机制。

研究方法：本课题首先构建了 STZ 诱导 1 型糖尿病 SD 大鼠模型，通过尾静脉注射 FITC-Dextran 荧光显微镜下观察视网膜渗漏，视网膜铺片染色观察周细胞丢失，以及 Real-Time PCR 检测视网膜 G6PD 的 mRNA 水平。体外实验中，采用 CoCl₂ 模拟缺氧刺激 EAHy.926 细胞，运用 Western Blot 检测 G6PD 蛋白的表达，G6PD 活性试剂盒检测 G6PD 的活性，NADPH/NADP⁺ 试剂盒检测 NADPH/NADP⁺，EdU 染色检测细胞的增殖，CCK-8 试剂盒检测细胞的活力，Matrigel 血管生成实验检测细胞成管能力，以及 Real-Time PCR 检测 VEGF、IL-1 β 和 IL-6 的表达情况。

研究结果：1) 在非增殖性糖尿病视网膜病变(Non-Proliferative Diabetic Retinopathy, NPDR)模型中 G6PD 的 mRNA 水平显著下降；细胞在缺氧刺激下 G6PD 蛋白表达及活性明显下降，细胞增殖、活力和成管能力也下降，VEGF、IL-1 β 和 IL-6 表达明显升高；6-AN 阻断 G6PD 的活性后可显著抑制内皮细胞的增殖、活力以及成管能力，提高 VEGF、IL-1 β 和 IL-6 的水平；2) NAC 可有效阻断 CoCl₂ 引起的 G6PD 活性下降；3) NAC 可以很大程度上缓解缺氧刺激下细胞的增殖、活力、成管能力的下降及抵抗 VEGF、IL-1 β 和 IL-6 的升高 4) NAC 对缺氧损伤的改善效果在通过抑制剂阻断 G6PD 活性的情况下显著减弱。

研究结论：本课题表明了 G6PD 在糖尿病视网膜病变模型中显著下降；同时内皮细胞在缺氧刺激下 G6PD 蛋白表达和活性下降，从而引起细胞的增殖、活力和血管生成能力下降以及 VEGF、IL-1 β 和 IL-6 的升高；而 NAC 能够明显提高 CoCl₂ 刺激下 G6PD 的活性，从而改善缺氧刺激引起的细胞损伤。这些结果提示我们，

G6PD 可能是糖尿病视网膜病变中发生发展的一个重要靶点，NAC 可能能够通过 G6PD 在糖尿病视网膜病变的防治方面发挥作用。

关键词：糖尿病视网膜病变；磷酸戊糖途径；N-乙酰半胱氨酸

厦门大学博硕士论文摘要库

Abstract

OBJECTIVE: Diabetic retinopathy is the leading cause of vision impairment in adults in Western world, its pathogenesis is not very clear. Pentose Phosphate Pathway (PPP), also known as hexose monophosphate shunt, is an important shunt of glucose metabolism. Many researches have demonstrated its important role in tumorigenesis, cell proliferation and antioxidation. N-acetyl cysteine (NAC), a well-known medicine with excellent antioxidant and anti-inflammatory effect has been widely applied in treatment of acute cough respiratory diseases to dissolve phlegm for many years. Previous studies have shown that NAC can enhance the activity of G6PD. This present study aims at exploring the change of G6PD in diabetic retinopathy and hypoxia induced endothelial cell injury and the underlying mechanism is discussed.

METHODS: In this study, STZ-induced type 1 diabetic animal model was established. We observed retinal leakage using fluorescence microscope by injecting FITC – dextran from tail vein and pericyte loss using retinal whole mount staining. In vitro EA.Hy926 were simulated with CoCl_2 . We detected G6PD protein expression by Western Blot, G6PD activity and NADPH/NADP⁺ by relative assay kit. Cell viability, proliferation ability and tube formation ability were measured by CCK-8 assay kits and EdU assay kit and matrigel tube formation assay. Expression of inflammatory/angiogenic cytokines were determined by Real-Time PCR.

RESULTS : 1)G6PD mRNA was decreased significantly in the non-proliferative diabetic retinopathy, indicating that G6PD could be involved in the pathogenesis of diabetic retinopathy. Of note, in vitro study hypoxia stimulation could also decrease G6PD protein level and activity, cell proliferation, viability and tube formation, and increase the level of VEGF, IL-1 β , IL-6. Treatment with 6-AN, an inhibitor of G6PD activity, could also inhibit cell proliferation, viability and tube formation ability, and could increase the level of VEGF, IL-1 β , IL-6. 2)NAC treatment increase G6PD activity without affecting G6PD expression; 3)NAC could significantly abrogate decrease of cell proliferation, viability, tube formation ability and increase of VEGF, IL-1 β , IL-6

induced by hypoxia; 4) Furthermore, addition of 6-AN could efficiently abrogate the effect of NAC to rescue hypoxia induced cell lesions including decrease of cell viability, proliferation, tube formation and increase of VEGF, IL-1 β , IL-6.

CONCLUSIONS: This research demonstrate that hypoxia could induced decrease of G6PD expression and activity in endothelial cells, which further led to reduction of cell proliferation, viability, tube formation and increase of VEGF/IL-1 β /IL-6. NAC can rescue the decrease of G6PD activity under hypoxia stimulation, so as to improve cell damage. These results suggested that G6PD may play an important role in the pathogenesis of diabetic retinopathy, NAC could be a potential approach for therapy of diabetic retinopathy targeting G6PD.

Key Words: Diabetic retinopathy; Pentose Phosphate Pathway; N-acetyl-cysteine

目录

第一章 前言	1
第二章 实验材料与设备	6
2.1 实验动物	6
2.2 饲养环境	6
2.3 细胞系	6
2.4 主要试剂	6
2.5 主要实验设备	8
2.6 实验药品制备	8
第三章 实验方法	10
3.1 糖尿病模型和氧诱导视网膜病变模型的建立	10
3.1.1 大鼠糖尿病模型的建立	10
3.1.2 监测指标	10
3.1.3 视网膜铺片观察视网膜血管渗漏	10
3.1.4 视网膜铺片染色观察周细胞数量	11
3.2 细胞的培养与处理	11
3.2.1 细胞培养	11
3.2.2 细胞复苏	12
3.2.3 细胞冻存	12
3.2.4 实验处理	12
3.3 CCK-8 试剂盒检测细胞活力	12
3.4 Edu 试剂盒检测细胞增殖	13
3.5 血管生成实验	13
3.6 TUNEL 染色	13
3.7 G6PD 活性测定	14
3.8 NADPH/NADP 测定	14
3.9 乳酸含量测试	14

3.10 ROS 检测	15
3.11 GSH/GSSG 检测	15
3.11 western blot	16
3.11.1 细胞总蛋白的提取	16
3.11.2 蛋白质定量 (BCA 法)	16
3.11.3 电泳	17
3.11.4 转膜	17
3.11.5 封闭	17
3.11.6 抗原抗体杂交反应	17
3.11.7 显色反应 (ECL 发光法)	17
3.12 Real-Time PCR	18
3.12.1.RNA 提取	18
3.12.2 反转录	19
3.12.3 PCR 扩增	20
3.13 统计分析	21
第四章 实验结果	22
1. 大鼠糖尿病视网膜 G6PD 的 mRNA 水平表达下降	22
2. CoCl ₂ 模拟缺氧诱导内皮细胞损伤	25
3. 缺氧诱导内皮细胞 G6PD 的蛋白表达和活性显著下降	28
4. 抑制 G6PD 直接损伤内皮细胞	29
5. NAC 改善缺氧下 G6PD 活性的减少, 但对缺氧下 G6PD 的蛋白表达没有影响	31
6. NAC 显著改善缺氧诱导的内皮细胞损伤	33
7. NAC 通过 G6PD 介导改善缺氧刺激下内皮细胞的损伤	36
第五章 讨论	41
第六章 结论	48
英文缩略词表	49

引用文献	50
致 谢	54

厦门大学博硕士学位论文摘要库

Table of content

Chapter 1 Introduction	1
Chapter 2 Materials and equipment	6
2.1 Experimental animals.....	6
2.2 Animal raising environment.....	6
2.3 cell line.....	6
2.4 main reagents.....	6
2.5 main laboratory equipment.....	8
2.6 Experimental drug preparation.....	9
Chapter 3 Experimental methods	10
3.1 Diabetes model and oxygen induced retinopathy model.....	10
3.1.1 Diabetic rat model.....	10
3.1.2 Monitoring index.....	10
3.1.3 Detection of retinal vascular leakage.....	10
3.1.4 Detection of retina pericyte number.....	10
3.2 Cell culture and treat.....	11
3.2.1 Cell culture.....	11
3.2.2 Cell recovery.....	12
3.2.3 Cell cryopreservation.....	12
3.2.4 Experimental treatments.....	12
3.3 CCK 8 kits to determine cell vitality.....	12
3.4 Edu kits to determine cell proliferation.....	12
3.5 Tube formation assay.....	13
3.6 TUNEL staining.....	13
3.7 The determination of G6PD activity.....	13
3.8 The determination of NADPH/NADP.....	14
3.9 The determination of lactate.....	14

3.10 The determination of ROS	14
3.11 The determination of GSH/GSSG	15
3.11 Western Blot	15
3.11.1 The extraction of total protein.....	15
3.11.2 BCA to determinate protein content.....	16
3.11.3 SDS-PAGE electrophoresis.....	16
3.11.4 Transmembrane	16
3.11.5 Blocking.....	17
3.11.6 Antigen-antibody reaction.....	17
3.11.7 ECL color development	17
3.12 Real-Time PCR	18
3.12.1 Total RNA extraction	18
3.12.2 RNA reverse transcription.....	19
3.12.3 . Real-Time PCR	20
3.13 Statistical analysis	21
Chapter4 Results.....	22
1. G6PD mRNA decrease in dabetic retinopathy	22
2. Hypoxia Simulated by CoCl₂ damage EA. hy926	25
3. G6PD protein expression and activity decline under hypoxia in endothelial cells	28
4. Inhibition of G6PD damage EA.hy926 derectly.....	29
5. NAC rescue the decrease of G6PD activity under hypoxia,but has no effect on its protein expression	31
6. NAC can reverse cell damage	33
7.NAC ameliorate hypoxia induced EA.hy926 endothelial cell damage by G6PD	35
Chapter 5 Discussion	40
Chapture 6 Conclusion.....	47

Abbreviation.....	48
Reference	49
Acknowledgement.....	53

厦门大学博硕士学位论文摘要库

第一章 前言

糖尿病视网膜病变是成人视力受损的主要原因,也是糖尿病最常见的并发症,约三分之一的糖尿病患者会发生糖尿病视网膜病变,预计 2030 年时,糖尿病患者人数将从现有的 38.8 亿增加到 59.2 亿,由此诱发的糖尿病视网膜病变在未来将成为一个严重危害病人身心健康和生活质量的健康问题和社会问题^[1]。

临床上糖尿病视网膜病变根据血管病变的程度,分为视网膜病变早期即非增殖性糖尿病视网膜病变和视网膜病变晚期即增殖性糖尿病视网膜病变 (Proliferative Diabetic Retinopathy, PDR)。事实上糖尿病视网膜病变是一种在长期慢性高血糖作用下发生的神经和微血管双重病变,虽然其发生的机制尚未十分明确,但是有几种比较公认的致病原因,包括氧化应激、炎症、糖基化终末产物的堆积、多元醇通路、氨基己糖通路及蛋白激酶 C 的激活,这些机制错综复杂,相互关联并加剧病变^[2]。这些途径的改变将最终引起视网膜血流动力学的改变、周细胞丢失、内皮细胞的损伤、血视网膜屏障 (Blood Retinal Barrier, BRB) 的破坏、视网膜微血管渗漏及水肿、视网膜血管基底膜逐渐增厚等,这些损伤随着糖尿病的进展而加剧,最终导致糖尿病视网膜病变的发生^[3]。

临床工作中注意到, DR 一旦发生则不可逆。对于 DR 的早期治疗主要依赖于良好的血糖和血压的控制,以防止 DR 的进一步加剧。DR 晚期的一些治疗手段主要包括激光治疗,玻璃体切除术以及玻璃体内注射 VEGF 拮抗剂,但是这些方式存在药物安全、长期疗效和并发症等问题。因此探究 DR 发生的机制、研制新的治疗方式具有重大意义。

磷酸戊糖途径是糖代谢的主要分支。葡萄糖进入细胞后经葡萄糖激酶磷酸化生成 6-磷酸葡萄糖,然后经过葡萄糖-6-磷酸异构酶的催化进入糖酵解 (glycolysis) 或者参与糖原的合成。而在葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 (Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase, G6PD) 的催化作用下可进入磷酸戊糖途径。磷酸戊糖途径分为氧化阶段和非氧化阶段,氧化阶段的关键酶主要有 G6PD 和磷酸葡萄糖酸脱氢酶 (6-Phosphogluconate Dehydrogenase, PGD), 两者通过催化葡萄糖-6-磷酸的连续脱氢反应产生烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NADPH 又叫还原型辅酶 II) 和五碳

糖；NADPH 被用来合成核酸、氨基酸及脂质的前体^[4]，另外，NADPH 是抗氧化系统中重要的物质，能够维持谷胱甘肽还原酶的活性从而把氧化型谷胱甘肽转化成还原型谷胱甘肽（Reduced Glutathione, GSH）从而维持还原型谷胱甘肽的含量^[5]。磷酸戊糖途径在非氧化阶段，转酮醇酶（Transketolase, TKT）和转醛醇酶（Transaldolase, TALDO1）把五碳糖转化成糖酵解的中间产物。G6PD 是 PPP 氧化分支中的第一个关键酶，起到控制葡萄糖进入 PPP 流量的作用，因此本研究中以 G6PD 为切入点探讨磷酸戊糖途径在糖尿病视网膜病变中的作用。

目前 G6PD 在细胞代谢、增殖以及肿瘤发生中的相关研究较多，在多种肿瘤细胞中均发现 G6PD 的表达增高^[6]，这与它催化合成的 NADPH 在蛋白、脂质和核苷酸等细胞增殖所需的大分子物质中的必要性密切相关；在人类肿瘤细胞中 P53 相关蛋白 TAp73 有激活 G6PD 表达促进细胞的增殖和肿瘤发生的作用^[7]；在牛主动脉内皮细胞中敲降 G6PD 的表达会导致细胞的增殖和血管生成能力降低，而用腺病毒过表达 G6PD 则显著提高内皮细胞的增殖和血管生成能力^[8]。在白血病中白血病细胞的增殖主要依赖于 PPP 限速酶 G6PD，敲除 G6PD 的表达会限制白血病细胞的增殖^[4]。

此外，G6PD 也参与调控氧化应激和炎症。在脂肪细胞中过表达 G6PD 可以激活 NF- κ B 同时增加促氧化酶包括 iNOS 和 NADPH 氧化酶家族的 mRNA 的表达，而对抗氧化酶系统如超氧化物歧化酶（Cu, Zn-SOD）、谷胱甘肽过氧化物酶（GPx-1）等则无明显的促进作用^[9]。视网膜色素上皮细胞在高糖培养下，进入细胞内的葡萄糖量增加四倍，但是糖酵解的产物乳酸和糖原的合成减少，而进入磷酸戊糖途径的葡萄糖量明显增加，这是由于视网膜在高糖情况下氧化应激增加，因此细胞需要通过激活 PPP 途径以增加 NADPH 来维持细胞的还原能力^[10]。有研究提出在肝细胞、肝癌细胞、纤维母细胞中直接敲除 G6PD，IL-8 的表达明显提高^[11]。IL-1 β 刺激可导致高糖培养下的人主动脉平滑肌细胞(HASMC)摄入的葡萄糖增多，并进入 PPP 通路代谢，从而导致 NADPH 氧化酶过度激活，最终引起自由基的增加及下游促炎信号通路的激活^[12]；在人类脂肪组织中，G6PD 的 mRNA 水平与巨噬细胞标志物（CD68 和 Mac1）以及 MCP-1 的表达成正相关，巨噬细胞中 G6PD 可促进 MAPK 和 NF- κ B 通路的激活^[13]。综上，G6PD 广泛参

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 for delivery details.

廈門大學博碩士論文摘要庫