

【设计思路】 本实验拟建立免疫性肝损伤模型,从细胞、蛋白、基因水平对 Th17、Treg 细胞数量及功能进行评估,探究 Th17/Treg 细胞失衡与肝损伤的相关性及机制。并采用 LBH589 分别从体内、体外观测免疫调控效果。

【实验内容】 Wistar 大鼠随机分为两组。尾静脉注射 ConA 建立模型组(CC),PBS 注射建立对照组(HC)。CC 组自第六周始腹腔注射 LBH589(乙组),甲组注射 PBS 至建模结束,血清学肝功能检测及肝脏病理分析确定建模成功。取外周取血检测 TIMP-1、HA 水平。取 PBMC 体外细胞培养,用不同浓度 LBH589 处理(G2、G3),PBS 处理作为对照组(G1),ELISA 检测上清液 IL-17、IL-6 等相关细胞因子的含量。FCM 检测 Th17 细胞和 Treg 细胞频率变化,计算 Th17/Treg 比值;免疫组织化学法检测 Foxp3、ROR γ t 蛋白表达情况;ELISA 法检测外周血 IL-17、IL-6 等相关细胞因子。

【材料】 健康的雄性 wistar 大鼠、流式细胞仪、conA(白色冻干粉)、OLYMPUS400 自动生化仪,免疫组化试剂、ELISA 反应试剂盒、TIMP-1 单克隆抗体试剂盒、DMSO 溶剂、大鼠透明质酸 ELISA 试剂盒、96 孔培养板。

【可行性】 课题思路逻辑、合理、创新,前期预结果良好。具备该课题实施所需的人员素质和实验环境。课题指导教师多年来致力于肝病的免疫学研究,并取得一定成果。所属实验室为山东省十二五重点实验室,国家级实验与教学示范中心,具有完善的实验科研环境。

【创新性】 肝病临床难治,关键在于机制不清。本课题首次提出把各细胞亚群的网络平衡学说应用于疾病的研究,认为肝病的发展演变,关键在于 Th17/Treg 细胞亚群的失衡,为肝病发生发展机制提供了理论依据。并通过阻断 STAT3 免疫调控 Th17/Treg 细胞平衡状态,以期肝脏损害发生改变,从而达到抑制病情的治疗目的,为其临床治疗提供新的线索。

关键词: Th17 细胞; Treg 细胞; STAT3; 肝损伤

B-S2-30

用 Substrate Trapping 对 PP2C 家族未知底物的探究

王闻博¹,刘宏达²,李康帅³,屈昌秀⁴,潘畅⁵;指导教师:孙金鹏

1. 山东大学 2010 级临床医学七年制
2. 山东大学 2009 级齐鲁医学班
3. 山东大学 2010 级齐鲁医学班
4. 山东大学 2013 级研究生
5. 山东大学 2006 级齐鲁医学班

【立论依据】 蛋白质磷酸化是细胞信号转导的重要调控机制,由蛋白磷酸酶和蛋白激酶协同调控。人体内由 100 多个酪氨酸磷酸酶和近 40 个丝氨酸/苏氨酸磷酸酶完成大约 2 万 5 千个蛋白的去磷酸化反应,其磷酸酶与底物的作用机制及其选择性是细胞信号转导的核心问题之一。丝氨酸/苏氨酸磷酸酶有十分重要的作用,而许多底物仍然未知,所以我们主要研究此类磷酸酶。PPM1A 是金属离子依赖性蛋白磷酸酶,属于丝氨酸/苏氨酸磷酸酶中的 PP2C 家族,目前已经有人对其进行了一些研究,因此我们将 PPM1A 作为本课题的切入点。

【设计思路】 首先,本课题将对 PPM1A 的催化机制及底物特异性进行研究。然后,基于对 PPM1A 催化机理的阐明,本课题将发明一种全新的底物陷阱技术——substrate trapping,从而为整个 PP2C 磷酸酶家族底物的阐明带来革命性的变化。我们将利用这种新发展的底物陷阱技术,发现重要的 PP2C 磷酸酶家族成员,如 PPM1D 和 PPM1G 的未知底物。Substrate trapping 是一种发现酶的未知底物的新方法。由于酶与底物反应迅速,没有充足的时间捕捉底物的信息,而酶的“陷阱突变体”可以结合底物但不水解底物,即底物亲和力、底物特异性不变,但催化活性降低,从而可以帮助我们找到未知底物。

【实验内容】 (1)构建 PPM1A 的不同突变体,用小分子底物 pNPP 和短肽分别进行酶学分析,找到 trapping mutant;(2)GST pull down 验证找到的突变体的可行性;(3)将 PPM1A 的研究方法推广到 PPM1D 和 PPM1G,进

行酶学分析、免疫沉淀、质谱分析、GST pull down 验证,从而找到未知底物。

【材料】 大肠杆菌 pNPP 分子筛 PCR 试剂 浓缩柱 酶标板 多肽底物等。

【可行性】 (1)已探索出一种 PPM1A 的突变体,对底物的特异性和亲和力不变,但催化活性很弱。(2)已表达纯化出 PPM1D 和 PPM1G 的部分突变体,并进行了酶学分析。

【创新性】 (1)揭示 PPM1A 最基本的催化机制与酶学特性;(2)首次在丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶家族中提出底物陷阱分子技术,在未来科研与临床应用中拥有广阔的前景。

关键词: 底物陷阱技术;催化机制;PPM1A;PPM1D;PPM1G

B-S2-31

虚拟筛选淋巴酪氨酸磷酸酶抑制剂

王闯博¹,李康帅²,潘畅³;指导教师:于晓

1. 山东大学 2010 级临床医学七年制

2. 山东大学 2010 级齐鲁医学班

3. 山东大学 2006 级齐鲁医学班

【立论依据】 淋巴酪氨酸磷酸酶(LYP)是经典 PTP 家族的非受体成员之一,在免疫细胞的信号调控中发挥关键作用。研究显示,LYP 的单核苷酸多态 C1858T 与多种自身免疫性疾病相关,该单核苷酸多态使 LYP 产生功能增强型的 R620W 突变,因此,发展 LYP 抑制剂是治疗自身免疫性疾病的一种潜在方法。

【设计思路】 我们的目的是快速、高通量地从化合物库中筛选 LYP 抑制剂,进行生化研究,筛选出潜在的抑制剂,并排除假阳性结果、筛选对 LYP 具有选择性的抑制剂,并利用晶体结构分析、构建点突变等方法探究抑制剂与 LYP 作用的分子机制,同时研究抑制剂在体内的作用效果,为加快临床抗自身免疫药物的研究做贡献。

【实验内容】 我们应用了靶点结合基础上的虚拟筛选方法来确定 LYP 的抑制剂,并把筛选方法和酶活测定结合在一起。主要的研究内容如下:(a)运用虚拟筛选方法从化合物库中选择 LYP 的潜在抑制剂。(b)初筛,测定抑制剂浓度为 $10\mu\text{M}$ 时 LYP 对 pNPP 的水解能力,选择使 LYP 活力降低的化合物进一步研究。(c)测定抑制剂的 IC₅₀,排除初筛时的假阳性。(d)测定抑制剂对其他 PTP 的 IC₅₀,检测抑制剂的选择性。(e)测定抑制剂对 LYP 的林-贝双倒数曲线,确定结合方式。(f)将 Jurkat T 细胞与抑制剂孵育,给予 anti-CD3 刺激,检测 TCR 信号通路中 ERK、LCK 的磷酸化水平。

【材料】 大肠杆菌 pNPP 分子筛 PCR 试剂 浓缩柱 酶标板等。

【可行性】 我们根据晶体结构筛选到了 23 种可能的新型抑制剂,其中 9 个在体外酶活实验中对 LYP 蛋白有较好的抑制结果,这些抑制剂的 K_i 均小于 $30\mu\text{mol/L}$ 。其中,抑制效果最好的 4 个(M1、M2、M3 和 M4)抑制剂对其它磷酸酶具有一定的选择性。进一步结果显示这些化合物是 LYP 的竞争性抑制剂,抑制效果最好的是 M1,其 K_i 是 $2.87\mu\text{mol/L}$ 。细胞实验显示 M1 和 M2 能够上调 TCR 介导的信号途径。

【创新性】 (1)利用虚拟筛选的方法筛选 LYP 的抑制剂;(2)通过寻找蛋白磷酸酶的抑制剂来探索自身免疫疾病的治疗靶点。

关键词: 虚拟筛选;LYP;抑制剂