

A-S4-22

肝刺激因子表达下调通过 ERK 促进肝癌细胞转移的研究

宋晓雯¹, 王子健¹, 李一鹏²; 指导教师: 董凌月, 安 威

1. 首都医科大学 2012 级临床医学七年制
2. 首都医科大学 2009 级基础医学五年制

【目的】 肝刺激因子(hepatic stimulator substance, HSS)能促进肝细胞增殖、抑制肝细胞凋亡,是细胞内重要的存活因子。本课题组前期研究发现多种促癌因素可下调肝癌细胞中 HSS 的表达,其表达水平的降低可以促进肝癌细胞发生转移侵袭,但相关机制尚不明了。研究表明细胞的上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)参与肝癌转移,因此本研究旨在阐明 HSS 表达降低与 EMT 的关系并探究其中的分子机制。

【方法】 利用实验室已经构建好的稳定低表达 HSS 的 HepG2 细胞(shRNA)和稳定高表达 HSS 的 HepG2 细胞(HSS)作为研究对象,首先应用蛋白质印迹方法检测不同细胞的上皮细胞分子标志物(如 E-cadherin 和 ZO-1)和间质细胞分子标志物(例如 vimentin、fibronectin)表达的变化,确定 HSS 表达改变与 EMT 的关系;选择在 EMT 中发挥重要作用的激酶磷酸化抗体,利用蛋白质印迹的方法,筛选参与 HSS 表达下调诱导 EMT 发生的激酶,并应用特定激酶抑制剂,通过 Transwell 转移和侵袭实验,检测细胞迁移侵袭能力的改变,进一步确定候选激酶的作用;最后运用脾注射肝转移实验分析 HSS 表达下降与裸鼠生存率的关系。

【结果】 蛋白质印迹结果显示 shRNA 细胞的间质细胞分子标志物表达明显增高,上皮细胞分子标志物表达明显降低,说明 HSS 表达降低后肝癌细胞发生 EMT。AKT 和细胞外信号调节激酶(extracellular signal regulated kinase, ERK)在 EMT 的发生过程中具有重要作用,蛋白质印迹结果显示 shRNA 细胞中 AKT 磷酸化水平没有明显改变,但 ERK 的磷酸化水平明显增高;使用不同浓度的 ERK 抑制剂 PD98059 后进行 trans-well 迁移和侵袭实验,结果显示 shRNA 细胞无论迁出小孔还是穿过铺有基质胶的小孔的数目都明显减少,而且随着抑制剂浓度的增加,发生迁移侵袭的细胞数目随之减少,具有剂量依赖性,说明 ERK 在 HSS 表达降低诱导的 EMT 过程中具有关键的作用。脾注射 shRNA 细胞 4 周后,裸鼠体重明显下降,腹部变黑并明显增大,不足 9 周全部死亡,而注射 HSS 细胞后,裸鼠体重下降不明显,10 周后才开始出现死亡,说明 HSS 表达降低后促进细胞的迁移侵袭使裸鼠生存时间明显缩短。

【结论】 肝刺激因子表达降低激活 ERK,诱导肝癌细胞发生上皮-间质转化从而促进肝癌的转移。

关键词: 肝刺激因子;上皮-间质转化;ERK;迁移

A-S4-23

泰山银杏外种皮多糖对食管癌细胞增殖和凋亡的影响

宋 悦, 玄 燕, 亓 雪, 唐同心, 程自强, 何 放; 指导教师: 蒋汉明

泰山医学院 2009 级临床医学

【目的】 探讨泰山银杏外种皮多糖(Ginkgo biloba exocarp polysaccharides, GBEP)对体外培养的食管癌细胞增殖和凋亡的影响及其作用机制。

【方法】 通过沸水浸提,有机溶剂沉淀,并通过 seavage 法除去蛋白,获得 GBEP。利用 MTT 法检测不同浓度的 GBEP 对食管癌细胞 EC-9706 增殖的影响;流式细胞术检测细胞周期的分布;Annexin-V/PI 双染分析凋亡率;蛋白质印迹法检测与细胞周期及细胞凋亡相关的蛋白表达变化。

【结果】 GBEP 显著抑制 EC-9706 细胞的增殖,并呈时间、剂量依赖性。其半数抑制浓度(IC₅₀)为 138.9 μg/mL。细胞周期分析结果表明,GBEP 处理后 G1 期细胞比例由 52.25%增加至 69.76%,蛋白质印迹结果显示细胞周期蛋白 D1 的表达呈浓度依赖性下降。说明 GBEP 诱导 EC-9706 细胞 G1 期阻滞。流式细胞术分析结果表明,

GBEP 诱导的 EC-9706 细胞凋亡随剂量和作用时间增加而增加。同时 GBEP 抑制抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达,增加促凋亡蛋白 Bax 的表达,促进 caspase3 的激活和 PARP 的剪切。

【结论】 泰山银杏外种皮多糖抑制食管癌细胞的增殖,诱导细胞 G1 期阻滞,并激活内源性细胞凋亡。

关键词: 银杏外种皮多糖;食管癌;细胞凋亡

A-S4-24

灭活仙台病毒 Tianjin 株诱导人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 凋亡作用及其机制的研究

韩寒¹,申天宇²,李飞³,王顺达²,李莹¹;指导教师:石立莹

1. 天津医科大学 2011 级临床七年制
2. 天津医科大学 2010 级临床五年制
3. 天津医科大学 2010 级临床七年制

【目的】 研究紫外线灭活复制缺陷的仙台病毒 Tianjin 株致人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 凋亡作用及其机制。

【方法】 首先制备并鉴定紫外线灭活仙台病毒 Tianjin 株,然后用不同剂量灭活病毒感染 MDA-MB-231 细胞,24 h 后,MTT 法检测灭活病毒对 MDA-MB-231 细胞增殖的影响;Hoechst 染色及 Annexin V-FITC/PI 标记流式细胞仪检测 MDA-MB-231 细胞凋亡情况;JC-10 染色流式细胞仪检测 MDA-MB-231 细胞线粒体膜电位变化;分光光度法测定 MDA-MB-231 细胞内 caspase-9、-8 和 -3 活性;蛋白质印迹法检测 MDA-MB-231 细胞中 Bcl-2、Bax、Cyt c、caspase-9、Fas、FasL、caspase-8 和 caspase-3 蛋白表达水平。

【结果】 MTT 检测显示灭活 Tianjin 株能够抑制 MDA-MB-231 细胞增殖,且呈剂量依赖性;Hoechst 染色发现灭活病毒感染的 MDA-MB-231 细胞有明显形态学改变,细胞核呈致密浓染或碎块状致密浓染;Annexin V-FITC/PI 标记流式细胞仪检测显示灭活病毒组细胞凋亡率呈剂量依赖性升高,JC-10 染色流式细胞仪分析显示灭活病毒组细胞线粒体膜电位呈剂量依赖性降低,且与对照组比较均有统计学差异($P < 0.01$);caspase 活性检测显示灭活病毒组 caspase-9、-8 和 -3 活性均呈剂量依赖性升高,与对照组比较有统计学差异($P < 0.01$);蛋白质印迹结果显示高剂量灭活病毒组(MOI 80)Bcl-2 表达下调,Bax、Cyt C、Fas、FasL、活化 caspase-9、-8 和 -3 表达上调。

【结论】 灭活仙台病毒 Tianjin 株能够诱导人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞发生剂量依赖性凋亡,其机制与线粒体内源性途径和死亡受体外源性途径密切相关。

关键词: 仙台病毒 Tianjin 株;人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞;凋亡;线粒体途径;死亡受体途径

A-S4-25

趋化因子 CXCL14 在结肠癌组织中的表达及其细胞效应分析

张杰诚¹,姚一琳²,阮辉飞¹,林敏敏³;指导教师:林刻智

1. 温州医科大学 2011 年级临床医学
2. 温州医科大学 2012 年级口腔医学
3. 温州医科大学 2013 年级临床医学

【目的】 分析 CXCL14 趋化因子配体 14(chemokine CXC ligand 14, CXCL14)在结肠癌组织中的表达及其临床意义,并探讨其过表达对结肠癌细胞增殖、细胞周期的影响。

【方法】 采用实时荧光定量 PCR、免疫组化检测 40 例结肠癌及癌旁正常组织中(距肿瘤边缘 2 cm 处)CX-