

B-S1-4

神经病理性痛小鼠模型中线粒体解偶联蛋白 4 参与启动脊髓背角神经元线粒体自我保护的机制研究

郭保霖¹, 吴亦琳², 罗世城³; 指导教师: 王亚云

1. 第四军医大学 2010 级临床医学
2. 第四军医大学 2011 级临床医学
3. 第四军医大学 2011 级航空航天临床医学

【立论依据】 神经病理性疼痛发病率高但治疗手段匮乏。最新研究揭示线粒体可能通过调控突触可塑性参与慢性痛发生发展过程,但其具体机制仍不清楚。本小组前期基于坐骨神经选择性损伤(SNI)模型小鼠,利用线粒体成像结合免疫荧光技术发现,线粒体在痛起初期未见明显改变,但在维持期数量增加,且外形由短棒状改变为簇状;生化检测发现,线粒体氧化应激产物在慢性痛发生后持续增加,线粒体膜电位($\Delta\Psi_m$)在慢性痛起始和维持阶段呈双向改变;利用行为药理学方法发现,鞘内注射腺相关病毒携带过表达线粒体解偶联蛋白 4(UCP4)质粒能明显缓解小鼠痛行为。以上结果提示:线粒体参与慢性痛发生发展过程;UCP4 可能通过开启线粒体自我保护机制而发挥镇痛作用。

【设计思路】 本设计基于预实验结果进一步利用转基因动物及病毒载体等,从形态学、电生理学等方面进一步探讨 UCP4 在慢性痛状态下开启线粒体自我保护的调控机制,为镇痛新药研发提供靶点。

【实验内容】 (1) SNI 模型建立,并鞘内注射 RNAi, overexpressing 及空病毒载体,进行线粒体功能学检测(HP, MDA, ROS 含量、 $\Delta\Psi_m$ 改变等),明确 UCP4 表达干预后线粒体功能改变。(2) 结合线粒体示踪剂及免疫组化方法,明确 UCP4 表达干预后线粒体动力学分布以及亚细胞形态的改变。(3) 利用全细胞电压膜片钳记录方法,分别在 GAD67-GFP(GABA 能神经元) knock-in 小鼠及 Fos-GFP(Fos 神经元) knock-in 小鼠上,记录病毒干预后脊髓背角 I-IV 层神经元微小兴奋性突触后电流(mEPSCs)和微小抑制性突触后电流(mIPSCs),结合激动剂和拮抗剂,明确 UCP4 作用的突触类型及神经元性质。

【材料】 8 周 C57BL/6 小鼠、GAD67-GFP knock-in 小鼠及 Fos-GFP knock-in 小鼠,腺相关病毒载体,相关方法所需材料。

【可行性】 预实验结果明确,具备实验条件,腺相关病毒包装成功,转基因小鼠已获得,实验周期短。

【创新性】 本设计从临床实际问题出发,基于前期研究成果,创新性提出 UCP4 是启动线粒体自我保护机制发挥镇痛效应的重要分子。实验设计上利用腺相关病毒载体干预 UCP4 水平,从多角度进行机制探究。

关键词: 线粒体;解偶联蛋白;神经病理性痛

B-S1-5

中枢 P 物质对慢性咳嗽豚鼠模型咳嗽敏感性的神经调控机制

顾大川, 孙乐家, 景 丹, 张伟韬; 指导教师: 董 榕

东南大学 2010 级临床医学

【立论依据】 慢性咳嗽是严重困扰人类健康的顽症,临床调查显示大部分慢性咳嗽患者的咳嗽阈值明显降低,这种咳嗽敏感性的增高可能是慢性咳嗽患者症状持续存在的基础。在慢性咳嗽发生时,由 P 物质(substance P, SP)等神经源性炎性介质所介导的气道神经源性炎症可使咳嗽感受器数量增加,导致咳嗽敏感性增高,但其机制尚未完成阐明。

【设计思路】 鉴于在咳嗽敏感性增高时延髓相关核团内 SP 的表达量增高,我们提出假说认为延髓相关核团

及其所表达的 SP 可能在咳嗽敏感性增高中发挥重要作用。因此,我们将借助于慢性咳嗽豚鼠模型,明确相关核团对咳嗽敏感性的调控作用,并探究核团内 SP 对咳嗽敏感性的作用及其途径,为慢性咳嗽发病机制的研究提供新的解释。

【实验内容】 (1)构建胃食管反流慢性咳嗽(gastroesophageal reflux cough;GERC)豚鼠模型,评价咳嗽敏感性的改变;(2)观察延髓脑区相关核团活动性的改变,明确与咳嗽敏感性相关的神经核团;(3)损毁、抑制或兴奋 GERC 豚鼠候选相关核团,观察干预前后咳嗽敏感性的改变,明确相关核团的调控作用;(4)观察 GERC 豚鼠相关核团内神经递质 SP 表达量的改变;(5)干预 GERC 豚鼠相关核团内 SP 含量,观察干预前后咳嗽敏感性的改变,进而明确中枢 SP 对咳嗽敏感性的调控作用;(6)利用逆行神经束路追踪术,结合追踪剂—假狂犬病毒与中枢 SP 免疫荧光双标技术,明确中枢相关核团内 SP 调控咳嗽敏感性的神经作用途径。

【材料】 白化 Hartly 豚鼠;兔抗 c-fos 抗体、小鼠抗 SP 抗体、兔抗 PRV 抗体及染色剂;Olympus 荧光显微镜、冰冻切片机、脑立体定位仪、7.0T 磁共振成像仪、Poworlab 生物信号采集系统等。

【可行性】 已经成功构建 GERC 豚鼠模型,并通过预实验初步明确延髓内脏带等相关核团与咳嗽敏感性的关系和核团内 SP 对咳嗽敏感性的作用,以及相关核团与气道的神经通路。研究进展初步表明中枢 SP 确实在咳嗽敏感性增高中具有重要的调控功能。本实验以国家呼吸疾病重点实验室开放课题为依托,借助东南大学医学院神经科学研究所开展,研究者已掌握研究所需各项技术。

【创新性】 目前研究认为咳嗽敏感性的增高主要是外周气道神经源性炎症诱发咳嗽感受器的重构性改变而引起的,但国内外关于中枢对咳嗽敏感性影响的研究甚少。本实验将明确中枢延髓脑区相关核团内 SP 对咳嗽敏感性的神经调控机制,为临床诊疗慢性咳嗽提供重要的理论基础。

关键词:咳嗽敏感性;慢性咳嗽;中枢 SP;神经调控机制

B-S1-6

在冰片辅助下透明质酸对阿尔茨海默症的作用

林梦婷,杨清勇;指导教师:吴吉文

福建医科大学 2011 级临床医学七年制

摘要:阿尔茨海默症(AD),又叫老年性痴呆,是一种中枢神经系统变性病,起病隐袭,病程呈慢性进行性,是老年期痴呆最常见的一种类型。主要表现为渐进性记忆障碍、认知功能障碍、人格改变及语言障碍等神经精神症状,严重影响社交、职业与生活功能。本实验旨在探索治疗 AD 的新方法。用 $AlCl_3$ 处理小鼠,可诱发细胞损伤、神经纤维缠结等 AD 症状,从而构建出 AD 模型。冰片经吸收到达血脑屏障后,具有减少内皮细胞紧密连接,从而促进药物通过血脑屏障的作用。透明质酸(HA)可通过反应清除体内自由基并减少自由基形成。于是,我们把能提高血脑屏障通透性的冰片和不容易通过血脑屏障但对脑组织有营养作用的透明质酸结合联用。先利用水迷宫在 50 只雄性小鼠里筛选出 45 只较聪明小鼠,随机等分成 3 组,每个小组每天灌胃适量冰片,直至实验结束。加 HA 的 AD 组(I)和 AD 组(II)每天灌胃适量 $AlCl_3$ 溶液,持续 40 d,对照组(III)每天灌胃等量蒸馏水,持续 40 d,后用水迷宫验证 AD 模型。验证模型成功后,(I)组每天灌胃适量 HA 溶液,持续 25 d,(II)和(III)组每天灌胃等量蒸馏水,持续 25 d,最后用行为学(水迷宫方法)、生化指标(TBA 法、SOD 检测、AchE 和 ChAT 活性检测、Ach 检测等)、组织学(H-E 染色和 Gallyas-Braak 银染色法)、电镜(观察小鼠脑的矢状冷冻切片海马区域甘丙肽的表达)及免疫组化(Tau 蛋白和 β -淀粉样蛋白检测)等方法检测。若各项检测指标都能达到预期结果则能成功证明冰片和透明质酸的联合应用能够对阿尔茨海默症产生一定的治疗效果。

关键词:阿尔茨海默症;冰片;透明质酸