

B-S1-26

Nesfatin-1 对帕金森病模型多巴胺能神经元的保护作用及其机制研究

谭 圳; 指导教师: 徐华敏

青岛大学 2011 级临床医学五年制

【立论依据】 帕金森病(PD)是一种严重危害中老年人健康的神经退行性疾病,但至今尚无有效的药物或方法能阻止或逆转 PD 的病情发展。Nesfatin-1 是 2006 年发现的,由 82 个氨基酸组成的能够抑制摄食的脑肠肽。研究发现 nesfatin-1 可通过抗凋亡及抗炎机制发挥神经保护作用,但是 nesfatin-1 能否对多巴胺(DA)能神经元发挥保护作用尚不清楚。本室前期研究证实 nesfatin-1 能够改变 DA 能神经元的放电频率,因此,本研究拟在鱼藤酮制备的 PD 模型上,观察 nesfatin-1 对 DA 能神经元的保护作用,并探讨其机制。

【设计思路】 鱼藤酮是一种制备 PD 模型的环境毒素,是线粒体复合物 I 的特异性抑制剂,通过损伤线粒体途径导致细胞凋亡。因此本实验拟在鱼藤酮诱导的 PD 细胞和大鼠模型上,观察 nesfatin-1 对鱼藤酮诱导的线粒体功能损伤及其介导的细胞凋亡的影响,并进一步研究其分子机制,阐明 nesfatin-1 可能通过 Gs-cAMP-PKA 通路影响 Bad 蛋白的磷酸化水平从而发挥其保护线粒体及抗凋亡的作用。

【实验内容】 在鱼藤酮制备的 PD 细胞模型上,应用 MTT 法、流式细胞仪技术、激光共聚焦显微镜等方法,检测 nesfatin-1 对鱼藤酮所致的细胞存活率、线粒体复合物 I 的活性、线粒体跨膜电位差、活性氧、PKA 蛋白水平、Bad 蛋白磷酸化、线粒体细胞色素 C 的释放、caspase-3 活性及细胞凋亡形态学变化的影响。此外,在鱼藤酮制备的 PD 大鼠模型上,应用免疫组织化学、蛋白质印迹、TUNEL 染色等方法进一步研究 nesfatin-1 对黑质 DA 能神经元的保护作用。

【材料】 MTT、罗丹明 123、H2DCFDA、PKA 抗体、磷酸化 Bad 蛋白抗体、TH 抗体(Sigma 公司),细胞色素 C 单克隆抗体(Clontech 公司),Caspase-3 抗体凋亡试剂盒(BD 公司),Hoechst33258(Beyotime 公司),TUNEL 试剂盒(Roche 公司)。

【可行性】 前期研究已证实 500 nmol/L 鱼藤酮处理 MES23.5 细胞 24 h 后,细胞存活率降低,线粒体跨膜电位差降低,nesfatin-1 预孵育能拮抗鱼藤酮诱发的改变。实验所在学科为国家生理学重点(培育)学科,具备完成实验所需实验技术和设备。

【创新性】 证实 nesfatin-1 对 DA 能神经元的损伤具有保护作用,并阐明了介导的细胞信号转导通路和分子机制,为研制新的预防和治疗 PD 的药物提供一定的实验依据。

关键词: 帕金森病;多巴胺能细胞;Nesfatin-1;线粒体;凋亡

B-S1-27

TRPC 通道在阿尔茨海默病(AD)大鼠的蛋白表达及其功能研究

李 想¹,李俊波²,杨昕睿³,王煜晔³;指导教师:张丽艳

1. 沈阳医学院 2011 级临床医学

2. 沈阳医学院 2010 级临床医学

3. 沈阳医学院 2012 级临床医学

【立论依据】 阿尔茨海默病(Alzheimer's Disease, AD)也称老年痴呆症,是发生在老年人的一种中枢神经系

统退行性疾病。临床表现为进行性记忆力丧失、认知功能减退以及人格改变。AD 的发病病因和机制至今尚不清楚。瞬时受体电位阳离子通道(TRPC)是一类非选择性 Ca^{2+} 通道,广泛表达于平滑肌细胞、内皮细胞和中枢神经系统,主要维持细胞内、ER 和线粒体的 Ca^{2+} 水平。在神经系统,主要参与神经增殖和退行性变。单核苷酸多态性(SNP)研究表明,TRPC4 通道参与到阿尔茨海默病的发病中,但目前 TRPC 通道在阿尔茨海默病动物模型神经组织中的表达和功能机制尚不清楚。

【设计思路】 本项目采用寡聚型 $A\beta$ 早期 AD 大鼠模型,对 TRPC 家族通道在神经系统的表达进行分析,给予 TRPC 通道激活剂和阻断剂,观察分离神经细胞的钙代谢变化及 AD 大鼠的行为学改变,探讨 TRPC 通道在 AD 发病过程中的作用。

【实验内容】 (1)大鼠海马区注射 $A\beta$ 寡聚体构建早期的阿尔茨海默病模型;Morris 水迷宫检测大鼠的神经元损伤和学习记忆功能障碍及病理学改变。(2)分离海马区的神经元细胞,利用 RT-PCR 和蛋白质印迹法检测 TRPC 家族通道在神经组织中的表达。(3)分离海马区的神经元细胞,给予 TRPC 通道的激活剂和阻断剂,利用激光扫描共聚焦显微镜技术,检测神经细胞的胞内钙离子浓度变化。(4)给予在体 AD 大鼠模型 TRPC 通道的激活剂和阻断剂,观察大鼠的行为学改变。

【材料】 Morris 水迷宫设备、激光扫描共聚焦显微镜。

【可行性】 研究室拥有本实验所需的设备和大鼠 AD 模型制备技术。学生拥有基本的分子生物学实验技能。

【创新性】 目前 TRPC 通道在阿尔茨海默病动物模型神经组织中的表达及其功能机制尚不清楚,未见有相关报道;试验结果可以为以 TRPC 通道为靶点的阿尔茨海默病的药物治疗提供理论基础。

关键词: 阿尔茨海默病;TRPC 通道;神经系统退行性变

B-S1-28

Exendin-4 对 AD 样学习记忆减退的保护作用及其机制的研究

金多晨¹, 唐文芳¹, 张建宇¹, 孙浩², 郑晨²;指导教师:邓艳秋

1. 天津医科大学 2011 级临床七年制

2. 天津医科大学病理生理学教研室

【立论依据】 阿尔茨海默病(Alzheimer's disease AD)是一种慢性神经退行性疾病。异常过度磷酸化的细胞骨架蛋白 Tau 和神经丝(NFs)是早期病理改变,与胰岛素信号的失调存在密切关系。艾塞那肽 Exendin-4 是哺乳动物胰高血糖素样肽-1(glucagon-like peptide 1, GLP-1)受体的有效激活剂,能够增加葡萄糖的利用和代谢,与脑内 GLP-1R 结合后有神经保护作用。

【设计思路】 采用胰岛素抵抗的 AD 动物模型,研究艾塞那肽对 AD 样认知、记忆减退和神经纤维退行性变的影响;检测动物的学习记忆能力、胰岛素信号分子、NF 的糖基化和磷酸化、突触素的表达水平,进一步阐明胰岛素信号和神经纤维退行性变的关系和可能的机制。

【实验内容】 (1)实验分组:本实验采用 PS1/APP/Tau 三转基因鼠($3\times Tg-AD$)和 c57BL6 小鼠(野生鼠),每种小鼠分 4 组:①、②组高糖高脂饲料饲养 8 周,腹腔注射 STZ 一次建立 II 型糖尿病模型;③、④组腹腔注射生理盐水。①、③组皮下注射 Exendin-4,给药治疗 8 周,②、④组不给药,等量注射生理盐水 8 周。(2)Morris 水迷宫实验检测小鼠学习记忆能力。(3)处死小鼠,迅速取脑,左半脑置于 10%中性甲醛固定,病理切片用于免疫组织化学荧光。右半脑组织裂解匀浆,蛋白质印迹技术检测小鼠脑组织相关蛋白的改变。ELISA 检测各组小鼠脑内 $A\beta_{40}$ 和 42 的沉积。

【材料】 动物:PS1/APP/Tau 三转基因鼠($3\times Tg-AD$)、c57BL6 小鼠(野生鼠);试剂:链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)、艾塞那肽(Exendin-4)

【可行性】 本团队前期 Exendin-4 对人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞的保护性实验,提示 Exendin-4 的保护作用,给我们后期动物实验打下的基础。