

B-S1-54

DSS 对血管性痴呆大鼠 PSD95 表达及功能的影响

刘 津,赵真涵,罗兴达,李玉磊,邱 平;指导教师:刘瑞珍,黄志华

赣南医学院

【立论依据】 血管性痴呆(VD)是一种由于脑血液循环障碍,进而使神经元损伤出现认知功能缺损的综合征,目前尚缺乏疗效肯定的手段。突触后致密蛋白-95(PSD95)在 NMDAR 和突触膜表面蛋白(如 nNOS)之间起连接作用,对兴奋性信号转导进行整合。NMDAR 参与了海马突触可塑性诱导及学习和记忆机制。在慢性脑缺血早期,PSD95 过表达介导了谷氨酸兴奋毒性对神经元的损伤;缺血晚期 PSD95 表达过低,则出现 LTP 诱导障碍及学习和记忆能力下降。本课题组预实验结果表明,DSS 可提高局灶性脑缺血(MCAO)再灌注损伤及 2VO 大鼠学习记忆能力;另外,DSS 可降低 MCAO 再灌注 24 h 后大鼠皮层 PSD95 水平。

【设计思路】 本设计拟采用大鼠双侧颈总动脉结扎(2VO)慢性脑缺血模型,通过检测脑缺血不同时间点 PSD95 mRNA 和蛋白水平、PSD95 与 NMDAR 不同亚型的相互作用,探讨 DSS 改善 VD 大鼠学习记忆的可能机制。

【实验内容】 (1)大鼠 2VO 模型的制备;(2)水迷宫实验;(3)尼氏染色观察海马 CA1 区神经元丢失情况;(4)Real-time PCR 及蛋白质印迹方法观察海马组织 PSD95 的 mRNA 和蛋白水平变化;(5)免疫共沉淀方法检测 PSD95 与 GluN2A 及 GluN2B 的相互作用。

【材料】 220~250 g SD 大鼠、抗体、PCR 及尼氏染色试剂盒等。

【可行性】 (1)理论:文献及前期结果支持 DSS 通过调节 PSD95 蛋白表达及其与 NMDAR 的相互作用改善学习记忆的假设;(2)模型:2VO 模型为建立 VD 的有效模型 (3)设施:实验室具备相关实验仪器 (4)操作:学生掌握实验相关操作技术。

【创新性】 本项目从临床问题出发,在前期研究的基础上,创新性地从调控 PSD95 表达及功能的角度研究 DSS 对血管性痴呆大鼠学习记忆功能的改善作用及机制。本研究可为缺血性脑血管病的新药开发以及临床治疗提供理论和实验依据。

关键词: 血管性痴呆;DSS;PSD95;NMDAR;学习记忆

S-2 生物化学和分子生物学,细胞生物学,基础免疫学,遗传学

B-S2-1

DNA 微条形码技术在降解检材种属鉴定中的应用及法医学意义

吴德鹏¹,王羽佳²,王雪霏¹;指导教师:丁 梅

1. 中国医科大学 2010 级临床医学

2. 中国医科大学 2010 级法医学

【立题依据】 标准 DNA 条形码技术是基于 COI 基因序列分析而建立的一种物种鉴定方法,但由于目的基因扩增片段长达 645bp,在法医物证降解检材中的应用受到限制。因此,本研究拟建立 DNA 微条形码技术,以解决法医物证特殊检材种属鉴定的难题。

【设计思路】 设计分别扩增不同近缘动物 COI 基因的通用引物,构建相应的复合扩增体系,并从种属特异性、林敏性、稳定性、案件适应性等方面进行验证。

【实验内容】 DNA 提取及处理:有机溶剂法提取实验样本的基因组 DNA;制备 DNA<200bp 的降解检材和

两种动物 DNA 不同比例混合的混合检材。引物设计与合成:设计 4 对种属特异性引物和 1 对无种属特异性的 ND3 引物,并合成 COI 基因的标准引物。PCR 扩增:①以 10 种动物基因组 DNA 为模板,分别用自行设计的 4 对引物进行扩增,以检验引物种属特异性;②以 10 种动物不同浓度基因组 DNA 为模板,分别用对应种属特异性的引物进行扩增,以检验引物扩增效能;③以降解检材基因组 DNA 为模板,分别用自行设计引物和标准引物进行扩增,以评估引物应用价值。PCR 复合扩增:在确定自行设计引物特异性、扩增灵敏度的基础上,通过调整引物量和退火温度构建含有 5 对引物的复合扩增体系,并用于单一样本和混合样本基因组 DNA 的扩增。扩增产物检测:用聚丙烯凝胶电泳结合银染的方法检测各种动物模板 DNA 的扩增效果,以判定引物的扩增特异性和灵敏度,及降解检材和混合检材的扩增效果;用循环测序的方法获得各扩增产物的碱基序列,并通过 BLAST 软件与 DNA 数据库比对及遗传距离分析,判定检材的种属来源。

【实验材料】 常见家禽(鸡、鸭、鹅、鹌鹑、鸽子)和常见家畜(水牛、黄牛、山羊、绵羊、马、驴、犬)共 7 科 18 种动物及人类血液样本各 5 例。

【可行性】 (1)不同种属动物 COI 基因序列可从相应 DNA 数据库获得;(2)熟练掌握引物设计的操作方法和 PCR 技术;(3)具备本研究所需的各种仪器、设备和试剂。

【创新性】 为法医物证降解检材的种属鉴定提供一种有效的方法。

B-S2-2

胃肠道激素 ghrelin/nesfatin 对棕色脂肪细胞分化的影响

王岳鑫,陈佳琰,张新宇;指导教师:李 茵

北京大学医学部 2011 级临床医学

【立项依据】 Ghrelin 和 nesfatin 是两种主要由胃粘膜 X/A 样细胞分泌的激素,对于全身的能量代谢有重要的调控作用,其作用基本上是相互拮抗的。例如,给予 ghrelin 后,动物摄食、体重增加,白色脂肪组织中脂质沉积增加,胰岛素敏感性下降,而 nesfatin 的作用却是相反的。因此 ghrelin 和 nesfatin 的平衡对于代谢综合征的改善有重大意义。人体内的脂肪组织分为两种,不同于以储能为主要功能的白色脂肪组织,棕色脂肪组织与非颤栗性产热有关,其活性受多种因素的调节。棕色脂肪细胞特异性表达解偶联蛋白 1(UCP1),使得能量以热能的形式释放出去而不是转化为 ATP。近年来的研究表明,成年人的身体中依然存在棕色脂肪组织,并且其活性与肥胖成负相关,表明棕色脂肪组织可能对能量代谢有重要的调节作用。在能量代谢的调控过程中,ghrelin 和 nesfatin 可能对棕色脂肪组织的功能有着调控作用。

【设计思路】 研究主要采用体外实验的方法,培养分离的乳鼠原代前棕色脂肪细胞,诱导分化,在分化过程中的不同时间给予一定剂量的 ghrelin 或 nesfatin 的刺激,然后观察激素对于细胞分化的影响。

【实验内容】 分离出生两天内的乳鼠原代前棕色脂肪细胞,分化并给予激素刺激,一定时间后收细胞提取 RNA 和蛋白进行 RT-PCR、蛋白质印迹、Co-IP 检测,测定线粒体功能、拷贝数等实验,同时进行 HE、Oil red 染色等,从而在分子水平上和形态学上检验激素对棕色脂肪细胞分化的影响。

【材料】 C57 小鼠,ghrelin 和 nesfatin 多肽,多种抗体、引物、试剂等。

【可行性】 Ghrelin 和 nesfatin 已经被证实对多个与能量代谢相关的靶器官的功能有调控作用,并且与肥胖的形成和肥胖后一系列的代谢改变有关。而肥胖的过程中,棕色脂肪组织的活性明显下降。最近有研究表明 ghrelin 受体敲除后,棕色脂肪组织中 UCP1 的表达量上升;寒冷刺激下,被激活的 nesfatin⁺ 神经元与调控棕色脂肪组织活性的神经元存在共定位,说明两种激素可能与棕色脂肪组织的功能相关。

【创新性】 本研究探索胃肠道激素对棕色脂肪细胞功能的影响,把胃肠道和棕色脂肪组织有机的联系在了一起,为解决代谢综合征提供了一条新思路。

关键词: 棕色脂肪细胞;分化;ghrelin;nesfatin