

表明,MT 引发的 TNF- $\alpha$  过量产生是导致继发性心肌损伤的关键环节,然而其机制却不清楚。TRPM2 是非选择性阳离子通道,在氧化应激情况下开放。由于单核细胞是产生 TNF- $\alpha$  的主要细胞,故本课题以 TRPM2 为切入点,研究 MT 引发单核细胞 TNF- $\alpha$  过量产生的机制。

**【设计思路】** 依次解决下述三个问题:(1)TRPM2 在 MT 引发单核细胞 TNF- $\alpha$  过量产生中是否发挥重要的作用?(2)TRPM2 在 MT 引发 TNF- $\alpha$  过量产生中的作用机制,主要观察通过 TRPM2 通道的开放是否与 UCP2 有关?(3)通过该通道内流的钙离子,是否通过 ErK/NF- $\kappa$ B 通路介导 TNF- $\alpha$  的过量产生?

**【实验内容】** (1)在培养的单核细胞液中,分别使用 TRPM2 通道阻断剂、Ca<sup>2+</sup> 清除剂、相关溶剂和基因沉默技术,观察在培养液中添加创伤动物血浆(TP)引发的培养液中 TNF- $\alpha$  浓度的变化;(2)使用 TRPM2 基因敲除鼠,观察 MT 造成的动物血浆中 TNF- $\alpha$  浓度变化;(3)使用膜片钳和检测细胞内钙变化,从功能上观察在单核细胞上的 TRPM2 通道,是否参与 TP 引起的钙离子内流;(4)动物实验,观察 MT 后,UCP2 的蛋白表达是否增强;使用 UCP2 抑制剂,观察 MT 后血浆 TNF- $\alpha$  产生量的变化;(5)膜片钳观察,使用 UCP2 抑制剂,观察是否可抑制 TP 引起的单核细胞 TRPM2 通道开放和细胞内钙上升;(6)单核细胞培养,使用 TRPM2 阻断剂和 siRNA 基因沉默 TRPM2,观察培养液中添加 TP 后,对 ErK 的表达、NF- $\kappa$ B 的表达和核内移情况;(7)动物实验,观察 TRPM2 基因敲除鼠和对照鼠,创伤后 ErK 的表达、NF- $\kappa$ B 的表达和核内移情况。

**【材料】** 使用雄性成年 C57B16/J 小鼠和 TRPM2 基因敲除鼠。

**【可行性】** (1)申请人所在实验室具有完成上述实验的全部实验仪器,本课题组实验技术成熟,人员配备较好。(2)实验所用 TRPM2 基因敲除鼠可以从日本国立自然科学研究机构获得。

**【创新性】** (1)以 TRPM2 为靶点,研究其在 MT 引发 TNF- $\alpha$  过量产生中的作用。(2)研究 TRPM2 通道与 UCP2 的关系。(3)观察 TRPM2 通道是否通过 ErK/NF- $\kappa$ B 通路介导 MT 引发的 TNF- $\alpha$  过量产生。

**关键词:** TRPM2;创伤;单核细胞;肿瘤坏死因子- $\alpha$

## B-S2-5

# 基于干细胞趋化特性的微流控芯片富集分选少突前体细胞的实验研究

郝 壮<sup>1</sup>,全弘宇<sup>2</sup>,马 腾<sup>1</sup>,赵柏雄<sup>3</sup>;指导教师:李红丽

1. 第三军医大学 2011 级临床医学
2. 第三军医大学 2010 级生物医学工程
3. 第三军医大学 2010 级临床医学

**【立论依据】** 微流控芯片(microfluidic chip)是将微通道、微泵、微储液池集成一体,通过气液压等操纵细胞运动的实验室芯片,近年在细胞分选与免疫分析等方面显示出具有高灵敏度、设备微型化等优势。目前体外快速分离获取高纯度高活性的少突胶质前体细胞(OPCs)一直是难题。基质细胞衍生因子 1(SDF-1)及其受体已证实广泛分布在多种干细胞中,高表达 SDF-1 对神经干细胞(NSC)具有显著的趋化吸引效应,是驱动 NSC 迁移的一类关键因子。先前对 NSC 分化研究提示,钙敏感受体(CaSR,与甲状旁腺素(PTH)特异亲和)在 OPCs 中表达量远大于神经元和星形胶质细胞,过表达 CaSR 的 NSCs 分化为少突胶质细胞的比例增加;CaSR 敲除小鼠表现出严重的白质发育障碍。提示 CaSR 在 NSC 定向少突胶质细胞分化中扮演重要作用。

**【设计思路】** 本研究利用 SDF-1 对 NSC 趋化吸引的动力效应结合 OPCs 与 PTH 高特异亲和性,构建含高浓度 SDF-1 和 PTH 的半透膜流动腔和对应收集池的微流控芯片。近膜区可富集 OPCs 并进而收集分选出高纯度 OPCs。

**【实验内容】** (1)采用胚胎或新生大鼠脑组织制备细胞悬液。(2)以聚二甲基硅氧烷(PDMS)为微流控芯片基础材料,设计含半透膜分隔的两套管道系统及对应收集池。一侧灌注 SDF-1 和 PTH 液,一侧为受微压力驱动

的混合细胞悬液通过池,依据 SDF-1 和 PTH 在半透膜区域形成的趋化动力,使具有干细胞特性又高表达 CaSR 的 OPCs 逐步靠近半透膜流动,通过独立出样口收集细胞。(3)细胞活性与纯度鉴定。通过 Transwell 细胞迁移分析细胞活性功能;将分选细胞、以及分选细胞加入 OPCs 分化液培养 0、1、3 d 后细胞进行免疫染色鉴定类型。

**【材料】** 实验动物、微流控芯片板、SDF-1、PTH、神经细胞各表型鉴定用抗体。

**【可行性】** 微流控芯片初样已设计成型,细胞培养预实验已有效可行。

**【创新性】** 利用高表达 CaSR 的 OPCs 对 SDF-1 和 PTH 具有趋化性特征,设计独特的微流控芯片集合板,在微压力驱动下实现对 OPCs 有效快速的招募富集与分选。理论上保持了分选细胞活性与功能属性。本研究为微流控芯片在生物医学中应用即高效快速纯化 OPCs 开拓了新思路,为 OPCs 功能的深入研究提供实验依据。

**关键词:** 微流控芯片;少突胶质前体细胞(OPCs);钙感受受体(CaSR);干细胞趋化特性;富集分选

## B-S2-6

# PPAR $\gamma$ 通过结合脂肪因子 Vaspin 基因启动子促进其表达

汪星朦,伍秋宁,彭孟圆;指导教师:李 希

复旦大学上海医学院 2009 级临床医学八年制

**【立论依据】** 内脏脂肪组织丝氨酸蛋白酶抑制剂 Vaspin 是 2005 年首次从自发性 T2DM 肥胖大鼠脂肪组织中分离得到的一种 cDNA 片段,人体内脏脂肪组织中也有表达,在代谢性疾病中起代偿作用。PPAR $\gamma$  与脂肪细胞分化和胰岛素抵抗关系密切,PPAR $\gamma$  激动剂罗格列酮能使体外培养的 3T3-L1 前体脂肪细胞 Vaspin mRNA 的表达上调。因此提出假设,PPAR $\gamma$  与 Vaspin 基因启动子上的某一基因片段结合从而发挥促进 Vaspin 表达的作用。

**【设计思路】** 首先测定 3T3-L1 前体脂肪细胞诱导分化过程中 PPAR $\gamma$  与 Vaspin 的蛋白表达谱,比较两者是否有相同变化趋势。然后构建 Vaspin 启动子-PGL3(含荧光报告基因)质粒和 PPAR $\gamma$ -pcDNA3.1(+ )质粒,转入 293 细胞,检测 PPAR $\gamma$  是否使报告基因表达。再用启动子截短试验、结合位点的核苷酸点突变结合 Gel mobility shift 和荧光报告试验确定与 Vaspin 启动子结合的位点。

**【实验内容】** 首先在 3T3-L1 细胞诱导分化过程的第 0、2、4、6、8 天,用蛋白质印迹法测定 PPAR $\gamma$  与 Vaspin 的蛋白表达谱。再 PCR 扩增小鼠 Vaspin 启动子-1200bp 的 DNA 序列,用 Cloning 方法构建 Vaspin 启动子-PGL3 质粒和 PPAR $\gamma$ -pcDNA3.1(+ )真核载体,转染入 293 细胞中,检测 PPAR $\gamma$  能否使报告基因表达,再分别加入 PPAR $\gamma$  激动剂和抑制剂,检测报告基因表达是否增加和减少。再用启动子截短试验,确定 PPAR $\gamma$  与 Vaspin 启动子结合的位置区间。最后利用结合位点的核苷酸点突变结合 Gel mobility shift 和荧光报告试验确定 PPAR $\gamma$  与 Vaspin 启动子结合的位点。

**【材料】** 3T3-L1 细胞,293 细胞,小鼠全基因,PGL3 质粒,pcDNA3.1(+ )质粒,PPAR $\gamma$  激动剂,PPAR $\gamma$  抑制剂。

**【可行性】** 文献提示 PPAR $\gamma$  可能对 Vaspin 的表达起促进作用。实验平台为复旦大学分子医学教育部重点实验室,设备优良齐全。所需的各项实验技术和材料均已得到成熟广泛的应用。指导教师在脂肪细胞分化中的基因转录调控方面研究经验丰富,课题组成员具备优良的基础医学知识水平和实验操作水平。

**【创新性】** 目前国内外无任何研究证实 PPAR $\gamma$  对 Vaspin 的表达有直接促进作用,也无相关机制的报道。本实验成果不仅是 Vaspin 表达机制的新发现,还是对 PPAR $\gamma$  功能的新补充,能够为 2 型糖尿病和肥胖等代谢性疾病的预测和治疗提供新靶点。

**关键词:** Vaspin; PPAR $\gamma$ ; 2 型糖尿病;肥胖;代谢性疾病