

GJIC。

【材料】 PC12 细胞;NGF;Cx43 真核表达质粒;Cx43 引物和抗体;CBX;NES 单克隆抗体;FITC-IgG。

【可行性】 本研究前期研究工作通过形态学观察及 Image 软件测量显示在一定范围内,NGF 量的增加可以有效提高 PC12 细胞的分化水平,课题组成员熟练掌握相关实验的方法和技术;研究室能提供相关的仪器和材料。实验思路清晰,实验过程明确。

【创新性】 本研究应用 NGF 诱导 PC12 细胞分化模型,探究 Cx43 形成的 GJIC 在 NGF 诱导 PC12 细胞分化过程中的作用,从而为神经损伤和修复提供新的研究依据和调控靶点。

关键词: Cx43;GJIC;NGF;分化;PC12 细胞

B-S2-13

CDK5 介导的 AMPK 磷酸化对 3T3-L1 前脂肪细胞增殖及分化的影响

袁志鹏¹,曾茂君¹,黎梅¹,周元武¹,包昌红¹,唐媛²,李爽³;指导教师:李先辉

1. 吉首大学 2011 级临床医学
2. 吉首大学 2012 级临床医学
3. 吉首大学 2013 级临床医学

【立论依据】 AMPK 是细胞及整体能量稳态的调控器。代谢综合征状态下,机体组织广泛存在 AMPK 活性下降,但 AMPK 如何失活仍存许多疑问。因此,弄清楚 AMPK 的失活机制对阐明代谢综合征的发病机制具有重要意义。

【设计思路】 有研究表明 CDK5 在肥胖小鼠脂肪组织中异常激活,AMPK α 2 的活性显著降低。同时,AMPK α 2 345 和 529 位丝氨酸满足 Cdk5 的底物一般都具有特定 S/TPXK/R 序列的条件。据此推测:活化的 CDK5 能够磷酸化 AMPK α 2 345 和 529 位丝氨酸,进而抑制 AMPK α 2 的活性,参与代谢综合征的发病。本课题拟在 3T3-L1 前脂肪细胞上研究 Cdk5 介导的 AMPK α 2 蛋白磷酸化的作用,为代谢综合征和糖尿病的治疗提供新的思路。

【实验内容】 应用 lipofectamine2000 转染技术构建 Cdk5 siRNA 基因的脂肪细胞系 3T3-L1-Cdk5 siRNA 实验组及其阴性对照组细胞系 3T-L1- Mock siRNA(Mock siRNA 为空 siRNA 转染),实验分为 3T3-L1-Cdk5 siRNA 组,3T-L1- Mock siRNA 组和 3T-L1 组,以 AIMV 无血清培养基培养 3T3-L1 细胞,使其自然增殖,于增殖第 3 天起用 TNF- α 作用于增殖中的 3T3-L1 细胞,之后每 24 小时以 MTT 法观察细胞增殖情况;采用含胰岛素、地塞米松与 IBMX 的分化培养基诱导分化 3T3-L1 细胞,于诱导分化第 8 天起用 TNF- α 作用于分化中的 3T3-L1 细胞,此后每 3 天以油红 O 染色并染料提取的半定量方法及细胞内甘油三酯测定的方法了解细胞内脂质含量;采用细胞 Cdk5/P35 和 AMPK α 2 激酶活性定量检测试剂盒检测 3T3-L1 细胞中 Cdk5 和 AMPK α 2 的活性,蛋白质印迹的方法检测 3T3-L1 细胞 AMPK α 2^{S345}、AMPK α 2^{S529} 及 AMPK α 2^{S345}、^{S529} 磷酸化水平。从而观察 CDK5 介导的 AMPK 磷酸化对 3T3-L1 前脂肪细胞增殖及分化的影响。

【材料】 3T3-L1 前脂肪细胞,AIM-V medium,DMEM/F12 培养基,Cdk5 siRNA,AMPK α 2 激酶活性定量检测试剂盒,油红 O,CO2 细胞恒温培养箱。

【可行性】 Cdk5 是脯氨酸引导的丝/苏氨酸蛋白酶,特异性磷酸化其底物蛋白的丝氨酸和苏氨酸位点。其磷酸化底物一般都有特定的 S/TPXK/R 序列。而人、大鼠和小鼠 AMPK α 2 蛋白序列的自动抑制区 345 位丝氨酸和亚单元结合区域 529 位丝氨酸有共同的序列 YLASSPPSGS 和 TGSTLSSVSP,满足 Cdk5 的底物一般都具有特定的 S/TPXK/R 序列的条件,实验假设理论上具有可行性。

【创新性】 本课题以 Cdk5 介导 AMPK α 2 磷酸化进而抑制其活性为切入点,探讨对 3T3-L1 前脂肪细胞增殖

及分化的影响,具有一定的创新性。

关键词:Cdk5;3T3-L1 前脂肪细胞;AMPK

B-S2-14

具有抗氧化活性的含硒短肽的研制

田锐¹,孙琦¹,刘进文²,吕美薇²;指导教师:朱贵明,王芳芳,王迪迪

1. 佳木斯大学 2012 级临床医学

2. 佳木斯大学 2013 级临床医学

【立论依据】 硒蛋白是微量元素硒发挥生物学功能的主要形式。人体中硒蛋白在抗氧化、抗肿瘤和调节免疫等方面都具有显著的作用,其中抗氧化活性是多种硒蛋白最核心的生物学功能。研制一种具有潜在应用价值的、类似于硒蛋白的抗氧化活性的含硒短肽具有重要意义。

【设计思路】 选取抗氧化活性最强的硒蛋白如硒蛋白 P、谷胱甘肽过氧化物酶等,设计出 3~5 种含硒代半胱氨酸活性中心的硒蛋白截短型的短肽,根据硒蛋白基因表达的特殊性构建其表达载体及其哺乳动物细胞表达体系,实现此类含硒短肽的准确、高效的翻译,再通过抗氧化检测筛选出具有应用开发价值的短肽。

【实验内容】 (1)用于硒蛋白基因工程表达的哺乳动物细胞株的建立:选择在人类硒蛋白翻译过程中将编码硒代半胱氨酸密码子 TGA 正确解码时起着重要作用的 3 个反式作用因子,即 SECIS 结合蛋白 2(SBP2)、Sec 特异延伸因子(EFSec)和核糖体蛋白 L30(RPL30),将它们的编码基因分别克隆并构建为 1 个三基因表达载体 pcDNA3.1-SBP2/Efsec/RPL30,稳定转染 HepG2 细胞系获得目的基因高表达的单克隆细胞株;(2)利用生物信息学的方法,筛选和设计硒蛋白截短型的短肽,并将其编码基因插入真核表达载体 pcDNA4HisMaxB 获得相应的重组载体;(3)利用各重组载体分别对已建立的转基因细胞株进行稳定转染,使目的基因表达并纯化获得含硒短肽;(4)利用常规的抗氧化检测方法,考察各种含硒短肽体外抗氧化活性,并筛选出最佳者用于后续研究。

【材料】 人肝癌细胞系 HepG2;质粒 pcDNA3.1、pcDNA4HisMaxB;各种基因工程工具酶及常规试剂;细胞培养及转染试剂;抗氧化检测试剂盒等。

【可行性】 硒蛋白复杂的翻译机制已经逐渐阐明,在原核生物细胞中利用反式作用因子提高硒蛋白表达已取得成功,为真核表达提供重要的启示,我们的设计在理论上是可行的;实验室相关技术方法及条件成熟,完全可满足本研究的要求。

【创新性】 具有抗氧化活性的硒蛋白分子量大大限制了其药用价值,我们研究中获得截短型的含硒短肽从而使其具有应用开发价值。此外,应用 3 个反式作用因子构建硒蛋白基因工程表达体系也是本研究的一个创新。

关键词:含硒短肽;硒蛋白;抗氧化活性;基因工程

B-S2-15

MiR-382 促进大鼠肝前体细胞 WB-F344 肝向分化的研究

蔺红梅,孙林峰,李梦华,高婷;指导教师:郑永霞

嘉兴学院 2012 级临床医学

【立论依据】 肝卵圆细胞的定向分化可为肝细胞移植和生物人工肝提供丰富的肝细胞源。阐明肝卵圆细胞分化的分子机制,是实现控制其定向分化的基础和前提。前期研究显示:miR-382 在肝干细胞分化过程中表达上调,提示 miR-382 可能促进肝干细胞的分化过程。然而,目前对于 miR-382 在肝干细胞分化中的作用和分子机制