

## B-S2-18

# 去乙酰化酶 SIRT1 调控 PFOA 诱导小鼠肝损伤的作用及机制研究

陶恩威,余张萍,张 蒙;指导教师:张大雷

南昌大学 2012 级临床专业

**【立论依据】** 流行病学调查发现,全氟辛酸(PFOA)和人类多种疾病密切相关。我们前期研究发现 PFOA 可通过氧化应激、炎症反应和诱导凋亡引起小鼠肝脏毒性损伤。去乙酰化酶 SIRT1 在细胞应激反应中具有关键作用,可引起多种转录因子去乙酰化,从而促进细胞存活,抑制凋亡。因此,我们提出:“SIRT1 的去乙酰化修饰可能对 PFOA 诱导的小鼠肝损伤起保护作用”。

**【设计思路】** 在前期研究的基础上,探讨 PFOA 肝脏毒性与 SIRT1 表达和反应活性的相关性;利用 SIRT1 激活剂以及 SIRT1 抑制剂观察 SIRT1 信号通路对 PFOA 诱导的肝脏毒性损伤的调控作用;通过检测 P53、NF- $\kappa$ B p65 和 FOXO3a 的表达和乙酰化水平,分析 SIRT1 系统调控 PFOA 肝脏毒性的分子机制,是否与 SIRT1 对 P53、NF- $\kappa$ B p65 和 FOXO3a 的去乙酰化修饰有关。

**【实验内容】** (1)Real-time PCR 和蛋白质印迹方法检测 SIRT1 的表达,免疫共沉淀法检测 SIRT1 的反应活性,对比正常对照和 PFOA 染毒小鼠,明确 PFOA 肝脏毒性与 SIRT1 的相关性;(2) PFOA 染毒小鼠给予 SIRT1 激活剂 SIRT1720 以及 SIRT1 抑制剂尼克酰胺,石蜡切片 HE 染色观察肝组织病理学改变;全自动生化分析仪检测 ALT、AST、ALP 及 LDH 的血清水平;酶联免疫分析 IL-6、COX-2 及 CRP 的肝组织水平;免疫组化检测 DNA 氧化损伤标志物 8-OHdG 的产生;比色法检测 MDA 生成及 SOD、CAT 和 GSH-PX 的活性;TUNEL 染色法观察细胞凋亡;real-time PCR 和蛋白质印迹方法检测 Bcl-2、Bax、Fas、FasL 等凋亡相关基因的表达,明确 SIRT1 通路的激活或抑制对 PFOA 诱导肝脏损伤的调控作用;(3)应用乙酰化赖氨酸抗体通过蛋白质印迹方法检测 P53、NF- $\kappa$ B p65 和 FOXO3a 的乙酰化水平,分析 SIRT1 是否通过对 P53、NF- $\kappa$ B p65 和 FOXO3a 的去乙酰化修饰调控 PFOA 诱导的肝脏毒性损伤。

**【材料】** 本项目以小鼠为实验动物,实验仪器包括实时荧光定量 PCR 仪、全自动 DNA 扩增仪、紫外可见分光光度计、石蜡切片机、高速低温离心机、蛋白电泳系统、电转仪、全自动生化分析仪等。

**【可行性】** 本项目充分分析了国内外研究现状和发展前景,并取得了较好的前期研究基础。

**【创新性】** SIRT1 对 PFOA 肝脏毒性的调控作用尚未见报道,本实验项目研究 SIRT1 对 PFOA 诱导肝损伤的保护作用及其分子机制,为预防和治疗全氟化合物引起的肝脏损伤寻找新靶点。

**关键词:**全氟辛酸;SIRT1;肝损伤;去乙酰化

## B-S2-19

# CVB3 非结构蛋白 3A 与 TMED4 相互作用对细胞凋亡的研究

方 舒<sup>1</sup>,何冰清<sup>2</sup>;指导教师:黄孝天

1. 南昌大学第二临床医学院 2011 级临床医学

2. 南昌大学药学院 2012 级药学

**【立论依据】** CVB3 属于小 RNA 病毒科肠道病毒属,能引起包括病毒性心肌炎、无菌性脑膜炎、胰腺炎等多种严重的疾病;目前,CVB3 感染引起病毒性心肌病我们尚无特效药物用于临床治疗,也没有合适的疫苗用于预防。3A 是 CVB3 主要的非结构蛋白,参与形成病毒复制复合体的骨架蛋白及抑制内质网至高尔基体的物质转运,但其如何与宿主细胞内蛋白相互作用以及对宿主的致病机制仍不清楚。本课题的前期工作中,以 CVB3 病毒 3A

为诱饵,运用酵母双杂交系统从人心脏 cDNA 文库中筛出了多个阳性克隆, TMED4 是 7 个阳性蛋白之一。相关文献报道, TMED4 在细胞的凋亡中起促进作用,而 TMED4 表达的沉默,不仅可以促进 HSP70 的表达,也提高了 HSP70 和 Apaf-1 的结合能力,从而对细胞的凋亡起到了抑制作用。

**【设计思路】** 3A 是否在细胞凋亡中有作用;进一步论证 3A 与 TMED4 存在相互作用;是否是 3A 和 TMED4 的相互作用影响了细胞凋亡。

**【实验内容】** Annexin V 法分别检测 pBudCE4.1-3A+brefeldin A、pBudCE4.1+brefeldin A 比较两组细胞的凋亡情况;COIP、激光共聚焦显微镜观察进一步论证 3A 与 TMED4 存在相互作用及共定位;动物感染 CVB3 后蛋白质印迹法检测 TMED4 的表达;Annexin V 法及蛋白质印迹等实验分别对 pBudCE4.1-3A+shTMED4、pBudCE4.1-3A+Cont. shRNA 两组细胞的凋亡情况和 HSP70、caspase-3 的表达情况进行检测和分析。Annexin V 法及蛋白质印迹等实验中每一实验组及对照组均采取多组平行实验分别按 0、6、12、18、24、30、36、42 h 等不同时间进行相关实验操作。

**【材料】** 成年 BALB/c 小鼠, TurboFect, brefeldin A, TMED4 Antibody, HSP70 Antibody, caspase-3 Antibody, TMED4 shRNA Plasmid 等。

**【可行性】** 本课题理论依据充足可行;课题所采用的各项技术已较熟练的掌握;课题所需器材完备,资金充足。

**【创新性】** 本课题的前期研究基础具有原创性且实验设计方案均为本组成员独立完成;TMED4 是一个新发现且研究尚不足的蛋白,我们的研究成果必然会丰富 TMED4 在细胞内的功能且关于 CVB3 3A 与 TMED4 的相互作用对细胞结构和功能影响机制的研究在国际上属于首次。

**关键词:** CVB3 3A; TMED4; 相互作用; 细胞凋亡; HSP70; caspase-3

B-S2-20

## 微环境对巨噬细胞杀菌能力的影响

雷 山, 王嘉琦, 李 雪, 钟巧法; 指导教师: 刘靖华

南方医科大学 2011 级医学实验技术

**【立论依据】** 根据活化状态及功能,巨噬细胞主要分为 M1 型巨噬细胞、M2 型巨噬细胞。不同组织中的巨噬细胞具有不同的膜表面抗原及受体,对于来源于同一种组织不同区域的巨噬细胞,其表型也具有明显的差异性,这证实了局部微环境对巨噬细胞表型的影响。本课题组的前期工作发现,经腹腔注射 LPS 的小鼠腹腔巨噬细胞与体外 LPS 处理的腹腔巨噬细胞在形态及吞噬杀菌能力上存在明显差异,提示微环境对巨噬细胞的吞噬能力有显著影响。

**【设计思路】** 巨噬细胞吞噬功能差异与亚细胞结构之间的联系;巨噬细胞吞噬功能差异与其分型之间的联系;微环境与巨噬细胞分型及吞噬能力之间的联系。

**【实验内容】** 分别取未进行预处理、在体和离体 LPS 预处理后腹腔巨噬细胞进行形态学比较和亚细胞结构观察,检测吞噬和杀菌能力,并用抗体标记其表面分子,利用流式细胞仪,检测吞噬能力与分型之间的关系;分别用 LPS/IFN- $\gamma$  和 IL-4 诱导出 M1 型、M2 型巨噬细胞,观察细胞形态并检测其吞菌和杀菌能力;分别取正常小鼠和腹腔注射 LPS 预处理 24 h 小鼠的腹腔灌洗液、体外经 LPS 预处理后腹腔巨噬细胞培养液上清进行细胞因子检测。

**【材料】** 6~8 周的 C57 小鼠;流式细胞仪、荧光倒置显微镜、标准细胞间及相关细胞培养等仪器设备;IL-4、LPS、胞培养基等试剂。

**【可行性】** 本实验设计思路清晰,逻辑性强,实验方法成熟。所在实验室拥有流式细胞仪等相应的仪器设备,具备完成实验的所有条件;前期已有一定实验结果,为实验的实施打下良好的基础

**【创新性】** 巨噬细胞的分型是最近炎症免疫相关研究的热点。现阶段对其分型的研究多集中在表面抗原与