

受体方面,对分型与吞噬能力之间的关系却少有研究。本实验通过对不同微环境中的巨噬细胞进行研究,探索其吞噬能力的差异与分型的关系,期望能从一个新的角度来阐述微环境对巨噬细胞杀菌能力的影响,为临床防治感染提供全新的思路与方向。

关键词: M1/M2 型巨噬细胞; LPS; 微环境; 吞噬

B-S2-21

晚期糖基化终产物诱导内皮细胞通透性增高的机制

张伟金¹, 周晓燕², 吴洁³, 徐静³; 指导教师: 黄巧冰, 郭晓华

1. 南方医科大学 2010 级临床八年制
2. 南方医科大学 2012 级病理生理学硕士研究生
3. 南方医科大学 2011 级临床八年制

【立论依据】 晚期糖基化终产物(advanced glycation end products, AGEs)可通过 $[Ca^{2+}]$ 通道诱导细胞凋亡,而 AGEs 是否也能通过该通道诱导内皮细胞通透性增高尚不清楚,若我们能够证实,将对于糖尿病防治及其并发症的控制具有重大指导意义。

【设计思路】 用 EGTA 抑制外钙内流,研究 $[Ca^{2+}]$ 在 AGEs 介导的肌动蛋白骨架的改变,通透性的增高以及 moesin 磷酸化中所起的作用。

【实验内容】 探讨 AGEs 介导肌动蛋白丝 F-actin 改变的剂量和时间效应;证实 EGTA 对 AGEs 介导内皮细胞骨架肌动蛋白改变的抑制作用;探讨 AGEs 引起内皮细胞通透性增高的时间和剂量效应;证实 AGEs 介导内皮细胞通透性的改变是 $[Ca^{2+}]$ 依赖性的;探讨 AGEs 引起 moesin 蛋白磷酸化的时间和剂量效应;验证 AGEs 引起 moesin 蛋白磷酸化是 $[Ca^{2+}]$ 依赖性的。

【材料】 激光共聚焦显微镜,跨上皮细胞电阻检测仪,倒置显微镜,垂直电泳仪,Transwell 培养皿,低温离心机, Petri Dish 培养皿, HUVECS 细胞株,胰蛋白酶, Moesin 抗体及磷酸化 Moesin 抗体,罗丹明-鬼笔环肽,胎牛血清,磷酸盐缓冲液, 0.5% TritonX-100, 4% 多聚甲醛固定液, FITC 标记的右旋糖干, EGTA 标准溶液, 细胞裂解液, 封闭缓冲液, Tris 盐缓冲液, TBST 缓冲液, 电泳加样缓冲液, Tris 溶液。

【可行性】 本项目假设有类似文献支持,有一定的理论基础。本研究团队近年来一直在休克微循环实验室从事 AGEs 和内皮细胞通透性方面的工作。经过多次试验,已掌握一定的技术手段和研究数据。我们的预实验结果已经显示 AGEs 刺激脐静脉内皮细胞呈浓度和时间效应,且 EGTA 能有效地抑制了 AGEs 在第 8 小时诱导的通透性的增高。

【创新性】 本研究将首次阐述 AGEs 是否依赖于 $[Ca^{2+}]$ 导致内皮细胞通透性的增高,目前国内外还未有论文涉及此话题,研究结果将进一步揭示 AGEs 在糖尿病并发症、动脉粥样硬化相关疾病的机制。

关键词: 晚期糖基化终产物; 细胞骨架; 通透性; $[Ca^{2+}]$

B-S2-22

淫羊藿甙促成骨细胞分化的分子机制研究

水一方¹, 王欢², 吴宗方²; 指导教师: 马长艳

1. 南京医科大学 2011 级生物技术
2. 南京医科大学 2011 级临床医学七年制

【立论依据】 骨质疏松症是以骨量减少和骨的微观结构退化为特征,导致骨的脆性增加以致易于发生骨折的

一种全身性代谢性骨病。骨质疏松严重威胁人类健康,且发病率呈逐年上升趋势,目前全世界约有 2 亿多骨质疏松症患者。目前临床上治疗骨质疏松的化学合成药物存在毒性大、价格昂贵等问题,而天然中草药及其制剂则可以克服上述缺点。淫羊藿(Herba Epimidii)是目前临床上治疗骨质疏松的常用中药,已有研究显示其主要成分淫羊藿甙(Icariine, ICA)具有促成骨分化功能,但具体机制不详。microRNA (miRNA)是一类长度约为 20~25 nt、在基因转录后水平发挥调控作用的小分子非编码 RNA,它几乎参与生物所有的生理病理过程。作为重要的生物调节分子,miRNA 是否参与了 ICA 促成骨分化过程呢?关于 ICA 促成骨分化的分子机制的研究,可以为临床上提高淫羊藿治疗骨质疏松的效果提供理论和实验依据。

【设计思路】 首先确定 ICA 促进小鼠前成骨细胞 MC3T3-E1 分化的合适的时间和剂量,然后进行差异 miRNAs 筛选并选取部分差异 miRNAs 进行验证,最后挑选 miR-27a 进行深入研究。

【实验内容】 (1)ICA 处理时间和剂量的确定:用 MTT、real-time PCR 确定 ICA 促 MC3T3-E1 分化的合适的时间和剂量。(2)差异 miRNAs 的筛选:将 5 μ M ICA 处理 48 h 的 MC3T3-E1 RNA 及对照进行 miRNA 测序和分析。(3)差异 miRNAs 的验证:挑选 15 个差异 miRNAs 用 Real-time PCR 进行验证(已完成),并从中挑选 miR-27a 进行深入研究。(4)miR-27a 在 ICA 促成骨分化中的作用及机制:① miR-27a 靶基因的预测:运用 miRWalk 在线工具预测 miR-27a 的靶基因。② Osterix 是 miR-27a 靶基因的验证:A. 构建含有 Osterix 3'UTR 以及 miR-27a 结合位点突变的荧光素酶报告质粒;B. 将 miR-27a 的 mimic 或对照和构建的荧光素酶报告质粒共转染 HEK 293 T 细胞,检测并比较荧光素酶活性;C. 将 miR-27a 的 mimic 或对照转染 MC3T3-E1 细胞,确定 miR-27a 对 Osterix mRNA 和蛋白表达的影响。③ miR-27a 在 ICA 促成骨分化中的作用:将 miR-27a 的 mimic、inhibitor 和对照分别转染 MC3T3-E1 细胞,再用 ICA 处理,然后分别用 Real-time PCR 和碱性磷酸酶染色确定 miR-27a 在 ICA 促成骨细胞分化中的作用。

【材料】 HEK 293-T、MC3T3-E1 细胞;pGL3-promoter 荧光素酶报告基因载体、Real-time PCR 用引物及试剂,蛋白质印迹用试剂及抗体;碱性磷酸酶染色用试剂。

【可行性】 我们具备本课题实施所需要的研究材料包括试剂和仪器;课题设计所用的方法均为指导教师课题组常用的方法;本课题已顺利实施,我们目前已完成了 ICA 处理时间和剂量的确定、差异 miRNAs 的筛选和鉴定、miR-27a 靶基因的预测。以上实验的实施和结果的获得表明本课题在理论和技术上均可行。

【创新性】 (1)首次证明 miRNAs 参与 ICA 促成骨细胞分化过程;(2)首次证明 miR-27a 在 ICA 促成骨细胞分化中起重要作用。研究结果将进一步阐明 ICA 促成骨细胞分化的分子机制,从而提高淫羊藿的临床治疗效果提供理论和实验依据。

关键词:淫羊藿甙;成骨细胞;分化;microRNA

B-S2-23

氯化钆对胰岛素原剪切的影响

王宏伟,冯勤超,王 妮;指导教师:陈园园

南京医科大学 2012 级临床医学七年制

【立论依据】 胰岛素是维持机体糖代谢平衡的最重要的激素。在胰岛 β 细胞中,胰岛素原需要经过激素原转化酶(PC3 和 PC2)的剪切才能生成真正具有降低血糖作用的胰岛素。因此,激素原转化酶对胰岛素的成熟具有决定作用。众多研究表明,糖尿病患者和动物胰岛中激素原转化酶的含量显著不足。而我们的前期实验提示,稀土化合物氯化钆($GdCl_3$)能够增加激素原转化酶的表达量,从而促进胰岛素原的剪切成熟。

【设计思路】 糖尿病小鼠经氯化钆治疗后,检测小鼠血清中胰岛素与胰岛素原的含量,以及胰岛中激素原转化酶的表达量。

【实验内容】 以高脂喂养的 C57BL/6J 糖尿病小鼠作为研究对象,随机分为两组,分别腹腔注射氯化钆(治疗