B-S2-35

小鼠精子与子宫内膜细胞融合及嵌合细胞生物特性研究

阳　军,叶　晔,卢江浩;指导教师:王晓梅
深圳大学 2012 级临床医学

【立论依据】 宫颈癌和子宫内膜癌是我国妇女常见的恶性肿瘤。虽然大量的研究数据表明人乳头状瘤病毒(HPV)感染与宫颈癌的发生密切相关,但仍有许多妇女在未感染 HPV 情况下发生宫颈癌,因此宫颈癌的发病机制迄今为止尚未完全阐明。一些研究发现在妇女体内存在含有 Y 染色体的细胞,这提示精子与女性体细胞相互作用和融合的可能,而与精子融合的体细胞是否会产生恶性特征目前尚不清楚。如果精子与宫颈或子宫内膜的直接接触可导致细胞的融合,而融合细胞可表现恶性特征则提示无保护的性生活具有导致宫颈或子宫内膜癌患病的风险。

【设计思路】 在体外证实小鼠精子对子宫内膜细胞的穿透性,并观察融合后嵌合细胞的生物特性及转归,通过标志性蛋白分析完成对嵌合细胞的干细胞特性或恶性特征的初步鉴定。

【实验内容】 附睾尾和精囊部获得成年雄鼠的精子,精子获能后用特异荧光分子标记精子细胞膜或顶体结构,然后进行精子与原代培养的雌鼠子宫内膜细胞的共培养,根据荧光染料在细胞膜的弥散特征证实精子与子宫内膜细胞的融合。采用流式细胞仪分选嵌合细胞并进行体外的长期培养。取对数生长期的嵌合细胞进行其生物学特性鉴定,包括:增殖能力、干性特征及恶性特征的鉴定。

【材料】 实验动物:SPF 级 KM 小鼠;主要试剂:DMEM 培养基、胎牛血清、胰蛋白酶、荧光染料等;实验仪器:二氧化碳培养箱、超净工作台、恒温水浴箱、倒置显微镜、激光共聚焦荧光显微镜、流式细胞仪等。

【可行性】 精子-体细胞融合已有部分体外研究报道,本研究借鉴了这些研究的实验方法并对具体的实验方案进行了优化。参与本研究的成员前期研究已经证实精子与宫颈癌 Hela 细胞的融合现象并已掌握了进行相关实验的生物学技术。

【创新性】 小鼠精子对子宫内膜细胞穿透性的体外研究目前尚未见相关报道,本研究旨在建立一种新型的精子-子宫内膜细胞融合模型,并将对这一模型的生物特征进行初步的研究。

关键词:精子;嵌合细胞;生物学特性

B-S2-36

TLR7 激动剂偶联 OCT4 对小鼠卵母细胞发育成熟的影响

王曼娜[1],杨燕平[2],鲁明瑞[3],曹子一[1],凌锦春[1];指导教师:王晓梅,靳广毅
1. 深圳大学 2011 级临床医学
2. 深圳大学 2010 级临床医学

【立论依据】 TLR7 激动剂是疫苗研发的理想佐剂,其抗肿瘤的作用表现为多效性,而肿瘤蛋白 OCT4 在生殖肿瘤中高度表达。更有研究表明,肿瘤免疫是以细胞免疫为主,而 TLR 配体与蛋白的偶联能产生更强的 T 细胞免疫效应。因此,本课题选择易合成及改造性强的小分子 TLR7 激动剂作为佐剂,首次将 TLR7 激动剂与 OCT4 蛋白偶联,有关研究已初步证实了偶联疫苗产生强而显著的抗肿瘤活性,具有临床应用价值。但是,OCT4 在生殖细胞中亦高表达,该疫苗是否具有生殖细胞毒性尚需要进一步探明,为后续临床应用提供参考,此方面研究目前尚未见相关报道。

【设计思路】 用腹腔给药的方法研究体内生长发育成熟卵母细胞的超排情况,用液滴培养法研究 3 种试剂对体内发育体外成熟卵母细胞的情况,以及采用液滴包埋培养窦前卵泡模拟体外生长环境研究试剂对其体外发育成

熟情况。

【实验内容】 选取雌性小鼠作为研究对象,分别采用体内超排、卵母细胞体外分段培养成熟技术检测 TLR7、OCT4 以及 TLR7-OCT4 作用后对卵母细胞数目、卵母细胞的成熟率以及体外培养卵泡直径与卵母细胞发育成熟状态的影响。

【材料】 实验动物:SPF 级 KM 小鼠;主要试剂:TLR7、OCT4、T7-OCT4、α-MEM 培养基、注射用青霉素钠和硫酸链霉素、胎牛血清、矿物油、rLH、FSH、HCG 及 PMSG;实验仪器:二氧化碳培养箱、−80℃超低温冰箱、高压湿热灭菌锅、超净工作台、恒温水浴箱、倒置显微镜、正置显微镜等。

【可行性】 本实验室创立的生殖毒性检测系统现已完善,且各实验用品来源充足,窦前卵泡体外培养技术成熟。

【创新性】 实验材料价值大:OCT4 控制细胞多能性的作用机制目前并未明确。本实验针对 Oct4 的作用特点研究其对女性生殖系统的影响,率先阐明 Oct4 在这一领域的具体作用价值;实验方法先进:率先将生殖工程中的前沿技术——腔前卵泡培养成熟技术应用于本实验的检测与评价中,高度接近人体生殖细胞的环境,该技术可靠性与准确性高;思路新:首次检测 Oct4 基因,腔前卵泡及卵母细胞发育,系统研究细胞毒性的发生过程及机制;意义深:在基因水平研究 TLR 激动剂对生殖系统的影响,从基因水平到具体性状,从微观水平到宏观水平,纵向剖析对生殖系统的具体影响,对生殖细胞的分化、生长、应激有着举足轻重的意义。

关键词:TLR7 激动剂;OCT4;生殖;毒性

B-S2-37

α-突触核蛋白 N 端结构域和电压依赖阴离子通道 1 相互作用的分子机制

张辉林[1],汪志鹏[2];指导教师:杨 慧
1. 首都医科大学 2010 级基础医学
2. 首都医科大学 2011 级基础医学

【立论依据】 帕金森病是主要发生在中老年人群的神经系统退行性变。目前认为与基因、环境和老化相关,三者主要作用于神经细胞线粒体导致其功能障碍。α-突触核蛋白(α-synuclein,α-Syn)是第一个发现的帕金森病致病基因编码的蛋白,是帕金森病病理标志路易体的主要成分。但到目前为止,α-Syn 对细胞线粒体的致病机制尚不十分清楚。我们课题组前期工作首次发现,α-Syn 可定位于线粒体内外膜,过表 α-Syn 可以引起线粒体膜电势下降及细胞色素 C 释放到胞浆诱导凋亡;进一步发现线粒体膜渗透性转换孔(mPTP)开放,而 α-Syn N 端结构域(α-Syn/N)在这个过程中起重要作用。文献报道,α-Syn N 端的 62、63、65 位氨基酸可能是其定位于膜的关键位点。线粒体 mPTP 的外膜孔主要由电压依赖阴离子通道 1(VDAC1)构成,我们预实验发现 VDAC1 和 α-Syn 存在相互作用。那么,α-Syn/N 是否和 VDAC1 发生相互作用,导致 mPTP 开放而引起线粒体介导的凋亡呢? α-Syn/N 的 62、63、65 位氨基酸在这个过程中是否起重要作用呢?

【设计思路】 首先证明 α-Syn/N 和 VDAC1 之间存在相互作用,并过表达 α-Syn/N,剪除 α-Syn/N(α-Syn/delN),检测 mPTP 是否开放以及是否发生线粒体介导的凋亡。而后,构建 α-Syn 的 62、63、65 位氨基酸突变体,检测过表达这些突变体对 mPTP 和线粒体介导的凋亡的影响,以及检测它们是否和 VDAC1 发生相互作用。

【实验内容】 (1)在 HEK293T 细胞中,过表达 α-Syn、α-Syn/N、α-Syn/delN,用免疫共沉淀和免疫细胞化学的方法检测相互作用。(2)构建带 VDAC1 基因的质粒,在 HEK293T 细胞中分别共表达 α-Syn、α-Syn/N、α-Syn/delN 和 VDAC1,用荧光共振能量转移(FRET)的方法检测是否存在直接相互作用,并再通过 GST-pulldown 方法验证。(3)在 HEK293T 细胞中,检测过表达 α-Syn、α-Syn/N、α-Syn/delN 对 mPTP 开放和线粒体介导的凋亡的影响。(4)构建 α-Syn 突变体(Q62A、V63A、N65A),检测过表达这些突变体对 mPTP 开放和线粒体介导的凋亡的影响。