

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、 $\alpha$ -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、 $-80^{\circ}\text{C}$  超低温冰箱、高压湿热灭菌锅、超净工作台、恒温水箱、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

## $\alpha$ -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<sup>1</sup>,汪志鹏<sup>2</sup>;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。 $\alpha$ -突触核蛋白( $\alpha$ -synuclein,  $\alpha$ -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, $\alpha$ -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, $\alpha$ -Syn 可定位于线粒体内外膜,过表  $\alpha$ -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  $\alpha$ -Syn N 端结构域( $\alpha$ -Syn/N)在这个过程中起重要作用。文献报道, $\alpha$ -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  $\alpha$ -Syn 存在相互作用。那么, $\alpha$ -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?  $\alpha$ -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  $\alpha$ -Syn/N 和 VDAC1 之间存在相互作用,并过表达  $\alpha$ -Syn/N,剪除  $\alpha$ -Syn/N( $\alpha$ -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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -Syn、 $\alpha$ -Syn/N、 $\alpha$ -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  $\alpha$ -Syn、 $\alpha$ -Syn/N、 $\alpha$ -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  $\alpha$ -Syn、 $\alpha$ -Syn/N、 $\alpha$ -Syn/delN 对 mPTP 开放和线粒体介导的凋亡的影响。(4)构建  $\alpha$ -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。

(5)检测这些突变体和 VDAC1 之间是否存在相互作用,方法同前。

**【材料】** HEK293T 细胞,表达  $\alpha$ -Syn, $\alpha$ -Syn/N, $\alpha$ -Syn/delN,Q62A,V63A,N65A 的质粒,线粒体提取试剂盒,JC-1 荧光探针(检测线粒体膜电势),mPTP 检测试剂盒。

**【可行性】** 我们的前期工作提示: $\alpha$ -Syn/N 导致 mPTP 开放; $\alpha$ -Syn 和 mPTP 外膜的孔的组成蛋白 VDAC1 之间存在相互作用;并且我们已经成功构建了过表达  $\alpha$ -Syn, $\alpha$ -Syn/N, $\alpha$ -Syn/delN 的细胞模型;以及  $\alpha$ -Syn 突变体(Q62A,V63A,N65A);并掌握了后续实验的全部方法。

**【创新性】** 目前关于  $\alpha$ -Syn/N 与 mPTP 相关蛋白 VDAC1 的研究未见报道,本研究尝试揭示  $\alpha$ -Syn 与线粒体膜孔蛋白之间的确切关系,对进一步明确  $\alpha$ -Syn 引起线粒体介导凋亡的分子机制、明确帕金森病的致病机制具有重要意义,进而为帕金森病治疗的新靶点探讨提供线索。

**关键词:**  $\alpha$ -突触核蛋白、帕金森病、 $\alpha$ -Syn

## B-S2-38

# p66<sup>S</sup>hc-线粒体信号通路在氧化低密度脂蛋白诱导的巨噬细胞凋亡中的作用

张春铎;指导教师:司艳红  
泰山医学院 2011 级临床医学

**【立论依据】** 氧化低密度脂蛋白(oxLDL)可经线粒体途径诱导巨噬细胞凋亡并影响动脉粥样硬化斑块稳定性,但具体的分子机制尚未阐明。近有研究显示:在人内皮细胞,oxLDL 可通过激活蛋白激酶 C- $\beta$ (PKC $\beta$ )与 c-Jun 氨基末端激酶(JNK)从而使衔接蛋白 p66<sup>S</sup>hc 发生磷酸化;另有文献报道,磷酸化的 p66<sup>S</sup>hc 可转位到线粒体引起线粒体损伤。本实验旨在探讨 p66<sup>S</sup>hc-线粒体信号通路在 oxLDL 诱导的人巨噬细胞凋亡中的作用。

**【设计思路】** 本实验分两部分:第一部分拟证明 oxLDL 可促进巨噬细胞中 p66<sup>S</sup>hc 的磷酸化及线粒体转位;第二部分拟证明 p66<sup>S</sup>hc 磷酸化及转位在 oxLDL 诱导的线粒体损伤、线粒体凋亡途径中起重要作用。

**【实验内容】** 采用序列超速离心法分离健康人新鲜血浆 LDL,继而用 CuSO<sub>4</sub> 氧化制备 oxLDL;体外培养 THP-1 细胞(人外周血单核细胞)并用佛波酯诱导为巨噬细胞,蛋白质印迹法检测 oxLDL 对 p66<sup>S</sup>hc 及胞浆和线粒体中磷酸化 p66<sup>S</sup>hc(Ser36)蛋白表达的影响;而后将细胞分为对照组、oxLDL 组及 oxLDL+SiRNAp66<sup>S</sup>hc 组,用流式细胞仪及荧光显微镜检测线粒体膜电位、线粒体内超氧阴离子及细胞凋亡的变化,蛋白质印迹法检测线粒体凋亡途径相关蛋白的表达。

**【材料】** 采用含 10%FBS 的高糖 1640 培养液培养细胞;采用 Rhodamine 123 染色检测线粒体膜电位,MitoSOX Red 试剂盒染色检测线粒体内超氧阴离子,AnnexinV FITC 试剂盒双染检测细胞凋亡;采用 p66<sup>S</sup>hc、phospho-p66<sup>S</sup>hc(Ser36)、细胞色素 C、caspase-9 等抗体检测相关蛋白的表达。

**【可行性】** 我们前期预实验结果显示 oxLDL 可加速 p66<sup>S</sup>hc 磷酸化和线粒体损伤,且两者呈正相关,为该假说的成立提供了有力证据;实验负责人跟随导师进行科研工作两年,已熟练掌握相关实验技术;本实验承担单位泰山医学院动脉粥样硬化研究所具备实验所需全部仪器设备,实验条件完善。

**【创新性】** 本实验首次研究 p66<sup>S</sup>hc 在 oxLDL 诱导的人巨噬细胞线粒体凋亡中的作用,可进一步阐明 p66<sup>S</sup>hc 与 AS 发生发展的关系,从而为 AS 的防治锁定新靶点。

**关键词:** p66<sup>S</sup>hc;巨噬细胞;动脉粥样硬化