

(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 α -Syn, α -Syn/N, α -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: α -Syn/N 导致 mPTP 开放; α -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 α -Syn, α -Syn/N, α -Syn/delN 的细胞模型;以及 α -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 α -Syn/N 与 mPTP 相关蛋白 VDAC1 的研究未见报道,本研究尝试揭示 α -Syn 与线粒体膜孔蛋白之间的确切关系,对进一步明确 α -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: α -突触核蛋白、帕金森病、 α -Syn

B-S2-38

p66^Shc-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- β (PKC β)与 c-Jun 氨基末端激酶(JNK)从而使衔接蛋白 p66^Shc 发生磷酸化;另有文献报道:磷酸化的 p66^Shc 可转位到线粒体引起线粒体损伤。本实验旨在探讨 p66^Shc-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^Shc 的磷酸化及线粒体转位;第二部分拟证明 p66^Shc 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 CuSO₄ 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^Shc 及胞浆和线粒体中磷酸化 p66^Shc(Ser36)蛋白表达的影响;而后将细胞分为对照组、oxLDL 组及 oxLDL+SiRNAp66^Shc 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^Shc、phospho-p66^Shc(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^Shc 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^Shc 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^Shc 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^Shc;巨噬细胞;动脉粥样硬化