

B-S2-39

LDL 诱导 RAW264.7 细胞前后与神经节苷脂结合的蛋白质向脂质筏的转位

吴 露,周莉娜;指导教师:武军驻

武汉大学基础医学院 2010 级临床医学八年制

【立论依据】 氧化修饰的低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, Ox-LDL)在促进动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)的发生和发展中起着关键性的作用。广泛存在于食品中的反式脂肪酸,能促进 LDL 的氧化修饰最终导致 AS,有实验提示,反式脂肪酸是通过细胞膜上的脂质筏引起后续导致 AS 的各种反应,因此抗氧化治疗的维生素 E 等药物不能有效地阻止 AS 的发生。目前阻止体内 LDL 被氧化成为治疗 AS 的焦点,于是探究氧化 LDL 的分子机制变得至关重要。神经节苷脂(ganglioside, GM1)作为脂质筏的标志分子,已有研究显示其与 LDL 的氧化及分布密切相关,而与其与 LDL 氧化的识别机制以及氧化环境的建立尚有待研究。

【设计思路】 本项目通过分析 LDL 诱导 RAW264.7 细胞前后,与神经节苷脂 GM1 特异结合的蛋白质向脂质筏的转位,从而找出介导 LDL 在微环境中进行氧化修饰的相关蛋白质因子。

【实验内容】 (1)细胞诱导和脂质筏分离:实验组,巨噬细胞 RAW264.7 与 LDL 共培养 15 min;对照组,无 LDL 刺激;密度梯度离心分离脂质筏,非标记定量蛋白质组学鉴定产生的氧化应激相关蛋白。(2)细胞蛋白—GM1 共沉淀:①收集巨噬细胞 RAW264.7 蛋白;②脂质体制备:实验组,制备原料加有 GM1;对照组:原料不含 GM1;③蛋白质-GM1 结合:将收集的蛋白和制备的脂质体孵育结合,收集产物;④通过 SDS-PAGE,质谱分析等找出与 GM1 特异结合的蛋白质分子。(3)蛋白质印迹法验证分析:分析步骤 1 和步骤 2 得到的共有蛋白,分别与 LDL 刺激细胞后分离的脂质筏成分以及与 GM1 特异结合的蛋白质进行蛋白质印迹法验证。

【材料】 RAW264.7 细胞(武汉大学基础医学院);LDL(Pro Spec-Tany 公司);GM1(Sigma 公司)。

【可行性】 预实验初步证实了 LDL 的氧化与脂质筏的形成有关;而且细胞膜“脂质筏”结构的主要组成成分糖鞘脂之一 GM1 参与了 LDL 的氧化,激光共聚焦显示 GM1 与 LDL 在 RAW264.7 细胞上的分布密切相关。

【创新性】 该项目首次证实了 LDL 与氧化微环境-脂质筏的形成有关,并寻找介导氧化的相关分子,从而进一步确认 LDL 氧化的具体机制。

关键词: 动脉粥样硬化;低密度脂蛋白;GM1;RAW264.7;脂质筏

B-S2-40

TGF- α 对角膜内皮细胞的保护作用及机理研究

刘昭麟,吴洁丽;指导教师:李 程,刘祖国

厦门大学 2011 级临床医学

【立论依据】 成人角膜内皮细胞缺乏增殖能力,损伤后只能由邻近细胞的扩大移行来填补缺损区,当损伤至一定程度时,可导致视力下降直至失明。经本课题组研究首次发现 TGF- α 既可促进角膜内皮细胞增殖,又可维持其正常功能,提示 TGF- α 可用于角膜内皮损伤类疾病的治疗。

【设计思路】 阐明 TGF- α 角膜内皮保护作用的机制,并以此为基础治疗角膜内皮损伤类疾病。

【实验内容】 (1) TGF- α 角膜内皮保护作用的机制研究:以原代培养的大鼠角膜内皮细胞制造划痕损伤模型,通过蛋白质印迹实验、免疫荧光染色、实时定量 PCR、流式细胞术等方法,①检测 TGF- α 受体 EGFR 表达量及其循环途径的改变;②检测其与 EGFR 结合后下游信号通路的激活;③检测角膜内皮细胞周期时相及相关周期蛋白的变化。(2) TGF- α 角膜内皮保护剂体内疗效评价:以超声乳化机建立角膜内皮细胞损伤动物模型,通过不同剂