

## 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- $\alpha$ 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- $\alpha$  既可促进角膜内皮细胞增殖,又可维持其正常功能,提示 TGF- $\alpha$  可用于角膜内皮损伤类疾病的治疗。

**【设计思路】** 阐明 TGF- $\alpha$  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- $\alpha$  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- $\alpha$  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- $\alpha$  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

型、剂量的 TGF- $\alpha$  进行给药处理,①使用裂隙灯、共聚焦显微镜及内皮细胞计数仪等评估角膜内皮细胞的形态、数量及功能;②以形态学及免疫组化方法检测角膜内皮细胞增殖及功能特异性蛋白表达状况;③以基因芯片的方法检测 TGF- $\alpha$  对受损角膜内皮细胞基因表达谱的改变及影响。

**【可行性】** (1)理论可行性:本项目指导教师和导师组老师是长期从事眼科研究的资深教授,且本项目已进行部分实验,论据充分。(2)技术保障:本课题技术路线合理成熟,相关手段课题组成员在都已熟练掌握并灵活应用。(3)实验设备保障:项目依托单位为厦门大学眼科研究所,是福建省重点研究室,拥有一批先进的实验设备及相关技师可辅助本课题开展。

**【创新性】** (1)本研究首次发现 TGF- $\alpha$  可促进角膜内皮细胞增殖,且维持其功能,其作用及机制的研究将有利于深入了解角膜内皮细胞的再生,并可能获得理论上的突破。(2)有关角膜内皮细胞保护剂的研发尚属空白,国内外均未见报导,本课题将提供新的治疗角膜内皮细胞损伤的途径及药物。

**关键词:** TGF- $\alpha$ ;角膜内皮细胞;增殖;迁移;角膜内皮保护剂

## B-S2-41

# DNA 复制起始的复制压力诱导子代细胞非对称分布的染色体损伤

张慧慧,朱佳宁,陈 悠,杨淑芳,王 晨,章文燕;指导教师:应颂敏

浙江大学 2011 级临床医学

**【立论依据】** 细胞对染色体在有丝分裂后子代中分布的精密调控是生物遗传过程中最基本的特征之一。迄今对染色体在有丝分裂过程中的编程机制尚不清楚。本研究着力于研究 DNA 复制起始位点的复制压力所诱导的 DNA 损伤在子代细胞中的分布信息。

**【设计思路】** 通过对细胞周期的同步化处理,在 DNA 复制起始位点诱导复制压力,再免疫荧光染色观察染色体损伤在下一个细胞周期子细胞中的分布。从 DNA 损伤的角度探讨染色体分布的可能调控机制和生理意义。

**【实验内容】** (1)用去血清方法将大部分细胞同步于细胞周期的 G<sub>1</sub> 期,通过流式细胞术进行鉴定;(2)在细胞进入 G<sub>1</sub> 期后给予血清培养,使细胞同步化开始 DNA 复制,实验组给予 APH(DNA 聚合酶抑制剂)干预,对照组给予不含 APH 的血清。同时加入脱氧核苷酸衍生物 EdU(5-ethynyl-2'-deoxyuridine)参与合成中的 DNA,并可作为后续荧光标记 DNA 复制的起始位置;(3)流式细胞术观察细胞周期进入有丝分裂 M 期和到达下一个细胞周期 G<sub>1</sub> 期所需的时间;(4)分别进行细胞爬片和滴片固定收样,并标染 EdU(DNA 复制起始位置)和 FANCD2(DNA 损伤修复蛋白)。观察各对子细胞中的 DNA 损伤情况,并进行统计分析。观察统计染色体的断裂频率,判断断裂位点与 EdU 染色位点的相对位置关系。

**【材料】** 人 HBE 上皮细胞;FANCD2 抗体(美国 Gibco 公司);APH;EdU;1640 培养基(美国 Gibco 公司)。

**【可行性】** 已完成的前期实验:(1)明确了 DNA 复制起始位点通过抑制 DNA 聚合酶更容易导致染色体损伤;(2)这些 DNA 起始位点的损伤在有丝分裂后的两个子代细胞中呈现明显的非随机、非对称分布,表现为一个子代细胞损伤明显增多,而另一个子细胞基本没有或很少出现损伤。这些前期实验结果与预期结果相符。

**【创新性】** (1)首次在体细胞水平探讨 DNA 复制起始位点的复制压力所诱导的 DNA 损伤在子代细胞中的分布信息;(2)探讨 DNA 复制起始位点在复制压力下与染色体断裂的关系;(3)首次从 DNA 损伤的角度阐释染色体分布的可能调控机制。

**关键词:** DNA 复制;细胞周期;染色体非随机分布;有丝分裂