

型、剂量的 TGF- α 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- α 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- α 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- α ;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 G₁ 期,通过流式细胞术进行鉴定;(2)在细胞进入 G₁ 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 G₁ 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