

B-S4-29

PAK6 与 HDAC6 的相互结合诱导的细胞自噬在前列腺癌增殖中的作用

李婷婷; 指导教师: 刘 彤, 李 丰

中国医科大学四年级生物科学与生物技术

【立论依据】 前列腺癌 (prostate cancer, PCa) 是男性恶性肿瘤的第一杀手。近期研究表明细胞自噬作为双刃剑在前列腺癌、乳腺癌等肿瘤的生理与病理过程中发挥重要的作用, 但目前细胞自噬如何调控前列腺癌的机制尚无报道。p21 活化激酶-6 (p21-activated kinase 6, PAK6) 是丝/苏氨酸蛋白激酶 PAK 家族的一员, 通过磷酸化雄激素受体与肿瘤 E3 连接酶而泛素化降解雄激素受体, 从而负向调节前列腺肿瘤的生长。HDAC6 是 II 类组蛋白脱乙酰化酶的一个成员, 通过调节底物乙酰化水平促进肿瘤的生长与转化。已有文献报道, PAK6 在前列腺癌中呈高表达, 而 HDAC6 具有促进自噬小体形成的作用。我们前期的研究结果发现, PAK6 可通过结合 HDAC6 从而诱导细胞发生自噬, 且临床标本的免疫荧光结果显示 PAK6 与 HDAC6 共定位于细胞质中, 且恶性前列腺癌中的共定位明显高于正常前列腺组织, 提示两者在前列腺癌中发挥重要作用。因此本实验旨在探讨 PAK6 与 HDAC6 相互结合诱导的细胞自噬在前列腺癌中的发挥的生物学功能及调节机制。

【设计思路】 应用体内外结合实验研究二者在细胞内的相互作用。电镜及蛋白质印迹技术检测 PAK6 与 HDAC6 与细胞自噬的关系, 及 PAK6 与 HDAC6 诱导的细胞自噬在前列腺癌中的生物学功能。免疫组化检测二者在前列腺癌临床标本中表达的相关性。

【实验内容】 (1) 体外 GST-pull down 实验证实 PAK6 与 HDAC6 直接结合。(2) 共转染 HDAC6 和 PAK6 到工具细胞 HEK293 中, 免疫共沉淀检测二者在细胞内结合。(3) 成功构建过表达和沉默 PAK6 细胞系, 利用 MTT, 细胞计数及蛋白质印迹实验揭示 PAK6 与 HDAC6 诱导的细胞自噬在前列腺癌中的生物学功能。(4) 免疫组化分析前列腺癌组织临床标本中 PAK6 与 HDAC6 表达的相关性。

【材料】 前列腺癌及工具细胞系, 相应抗体, ECL 发光试剂及仪器, 共聚焦激光显微镜。

【可行性】 所在实验室为教育部医学细胞生物学重点实验室。前期实验成功证明 PAK6 和 HDAC6 的结合及共定位关系, 本人已熟练掌握了后续实验涉及的相关技术。

【创新性】 本研究首次发现 PAK6 和 HDAC6 在前列腺癌中的共定位表达变化及二者的相互作用, 阐明 PAK6 通过 HDAC6 促进细胞自噬, 为寻找前列腺癌的预警分子提供理论基础。

关键词: PAK6; HDAC6; 细胞自噬; 前列腺癌

B-S4-30

17-AAG 抑制 piRNA-PIWI 通路对神经母细胞瘤“干性”影响的研究

陈 取¹, 吴德鹏², 朱琳飞², 梁熠成², 李玮珊², 胡溢哲³; 指导教师: 田晓红, 柏树林

1. 中国医科大学 2009 级临床医学七年制

2. 中国医科大学 2010 级临床医学七年制

3. 中国医科大学 2011 级临床医学七年制

【理论依据】 piRNA 是细胞内三大非编码 RNA (noncoding RNA) 之一, 参与到干细胞干细胞“干性”的维持之中, 同时与 PIWI 蛋白组成 piRNA-PIWI 通路, 在大量不同类型的肿瘤细胞中高表达。类比 miRNA 领域取得的研

究成果,例如组织工程学应用、抗肿瘤靶点等,探讨 piRNA-PIWI 通路是否具备相同的应用与靶点价值是本实验设计的核心所在。

【设计思路】 热休克蛋白 90(hot shock protein 90)参与了 piRNA 负载到 PIWI 蛋白的关键过程,通过使用其抑制剂 17-AAG 能够间接的抑制 piRNA-PIWI 通路,同时以神经母细胞瘤的肿瘤干细胞为实验对象,探讨抑制 piRNA-PIWI 通路对于肿瘤干细胞“干性”的影响

【实验内容】 以小儿最常见的颅外实体瘤神经母细胞为实验对象:(1)神经母细胞瘤干细胞的富集:使用依托泊苷处理肿瘤细胞,进行肿瘤干细胞的富集。(2)实验对象的分组:①维甲酸组作为对照组;②17-AAG 组;③ RNAi-PIWIL2 组。(3)实验检测指标:①PIWIL2 mRNA 的检测;②细胞干性的评价:检测相关基因 OCT4、SOX2、C-MYC 与 N-MYC 基因的表达,甲基化相关酶(DNMT1、DNMT3)的表达,同时进行形态学观察、细胞凋亡以及细胞周期的监测。③piRNA-PIW 通路功能的检测:检测代表性的转座子 Line-1、IAP 的表达,以及 PIWIL2 蛋白的表达。

【材料】 神经母细胞瘤细胞系 IMR-32、SK-N-SH、SH-SY5Y;HSP90 抑制剂 17-AAG。

【可行性】 本实验室已在神经母细胞瘤的相关研究中取得研究成果,发表 SCI 论文,同时本实验的参与团队在校学习期间深入实验室研究过程之中,掌握了一定的实验技能。

【创新性】 探讨使用 piRNA-PIWI 通路的间接抑制剂 17-AAG,从而研究抑制该通路对于神经母细胞瘤干细胞“干性”所造成的影响,为研究靶向抑制 piRNA-PIWI 通路作为抗肿瘤治疗新靶点奠定理论基础,同时亦为未来开发基于 piRNA 的组织工程学重编程细胞的新靶点进行前瞻性研究。

关键词: piRNA;PIWI;肿瘤干细胞;17-AAG

B-S4-31

MyoD 对癌症骨骼肌转移的抑制作用研究

蔡长景,吴梓依,沈栖霞,杨文倩,张淑军;指导教师:刘 持

中南大学 2011 级临床医学五年制

【立论依据】 国内外研究表明:(1)骨骼肌,淋巴管分布广泛,血供丰富,但未有癌症转移到骨骼内生长。(2) MyoD 是骨骼肌成肌调节因子,有以下作用:让某些细胞转化为骨骼肌细胞。人工合成高亲和力的 MyoD,可与分化抑制因子 ID 结合,抑制癌细胞增殖。预实验结果显示:骨骼肌细胞因子作用:(1)抑制癌细胞增殖;(2)使癌细胞的生长形态变为梭状或细长状。

【设计思路】 猜想:MyoD 是抑制癌细胞转移到骨骼肌内生长的内源性细胞因子。体外实验:(1)骨骼肌细胞与癌细胞共培养探索骨骼肌细胞对癌细胞的影响。(2)在癌细胞培养基中添加 MyoD 探索 MyoD 对癌细胞增殖及迁移能力的影响。(3)构建 siRNA 靶向沉默 MyoD 骨骼肌细胞株与癌细胞共培养探索其它细胞因子对癌细胞增殖的影响。体内实验:构建裸鼠肿瘤模型,肿瘤部位注射 MyoD MyoD 是内源性抑制肿瘤生长的因子。若实验假设不成立,则寻找新的细胞因子,进行新的探索。

【实验内容】 实验组:(1)在癌细胞培养基中添加 MyoD。(2)骨骼肌细胞、siRNA 靶向沉默骨骼肌细胞与癌细胞共培养 24 h。(3)构建裸鼠肿瘤模型,往肿瘤部位注射骨骼肌细胞培养上清液、MyoD。对照组:(1)在癌细胞培养基中添加 DMEM。(2)癌细胞与癌细胞共培养 24h。(3)构建裸鼠肿瘤模型,往肿瘤部位注射生理盐水。BrdU 测细胞增殖率,流式、WB 测蛋白表达,电镜、光学显微镜下观察细胞生长形态以及超微结构,称量体重等观察肿瘤生长。

【材料】 人骨骼肌细胞,人乳腺癌细胞(淋巴转移),人肝癌细胞(血道转移),人鼻咽癌细胞(高转移率),裸鼠。实验采用空隙为 0.4 μm 的 Transwell 嵌入式培养板。

【可行性】 本实验理论基础牢固、前期研究充足,实验设计切合实际。