

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。

【创新性】 新思路、新分子,从骨骼肌转移癌低发生率出发,寻找内源性的癌症治疗分子或者靶点。

关键词: 骨骼肌;癌症;转移癌;MyoD

B-S4-32

人肝癌乳酸脱氢酶的细胞膜定位和酶学特性研究

谭嘉男,周睿,黄锡泰,周腾龙;指导教师:胡旭初

中山医学院 2010 级临床医学八年制

【立论依据及设计思路】 已有研究表明在人肝癌组织中,间质细胞的线粒体会在癌细胞的驱动下会发生线粒体自噬,只进行糖酵解,且糖酵解相关酶的表达水平显著升高,尤其是间质细胞特异高表达 LDHA(乳酸脱氢酶 A),将糖酵解产物丙酮酸转化成乳酸,排出间质细胞。而排出的乳酸被邻近的肝癌细胞摄取,肝癌细胞特异表达 LDHB,将乳酸转变成丙酮酸。肝癌细胞具有完整的氧化磷酸化过程,能利用间质细胞提供的乳酸,经三羧酸循环、糖异生和脂肪合成,为肿瘤细胞的增殖提供物质和能量。间质细胞的糖酵解和肿瘤细胞的氧化磷酸化之间代谢偶联,是维持肿瘤细胞快速增殖的重要机制。前期实验发现肝癌细胞表达膜型 LDHB,而膜型 LDHB 的功能尚不清楚。本课题拟研究 LDHA 和 LDHB 在人肝癌间质细胞和肝癌细胞中的表达和定位和酶学特征,阐述 LDH 在肝癌组织能量代谢偶联过程中的生化机制,同时评价 LDH 作为人肝癌能量代谢干预靶点的可能性。

【实验内容】 第一部分:人体肝癌组织标本中肝癌细胞和间质细胞线粒体功能和反向 Warburg 效应的检测,利用免疫组化的方法检测线粒体标志物和线粒体自噬标志物及 LDHA 和 LDHB 的表达分布;第二部分:建立肝癌细胞 SMMC-7721 和正常人成纤维细胞的共培养体系;第三部分:检测 LDH 在肝癌细胞及肝癌相关成纤维细胞中的膜定位及表达水平;第四部分:对细胞膜上的 LDH 进行酶活性检测,明确其酶活性和代谢特征;第五部分:在细胞水平上研究 LDH 抗体,抗寄生虫药,单羧酸转运体抑制剂对能量代谢偶联的抑制作用;第六部分:裸鼠模型的抗体和阿苯达唑的抗肿瘤实验。

【材料】 人肝癌 SMMC-7721 细胞株及成纤维细胞株,特异性 LDH 抗体,抗寄生虫药物(吡喹酮,阿苯达唑),免疫组化相关材料,qPCR 相关材料,免疫印迹相关材料,MTT 比色法相关材料。

【可行性】 本实验室已完成了人 LDHA 和 LDHB 的克隆表达和酶学特性研究,已实验证实人肝癌细胞 SMMC-7721 只表达 LDHB,且定位于细胞膜上。

【创新性】 提出肝癌组织中,间质细胞和实质细胞分别表达膜型 LDHA 和 LDHB,不仅负责丙酮酸和乳酸之间的相互转化,而且可能是产物的转运体;抗寄生虫 LDH 的抗体和药物可以抑制人 LDH 的酶活性,抑制肿瘤的生长和转移。

关键词: 肝癌;乳酸脱氢酶;抗寄生虫药