

## A-S2-32

# 模拟日光 UVB 辐射经 DNA 甲基化诱导人皮肤 HaCaT 细胞恶性转化

田琦,董新航,张英超,陈园婧;指导教师:韩彦弢,阎春玲

青岛大学医学院 2011 级临床医学五年制

**【目的】** 建立模拟日光 UVB 辐射诱导的人 HaCaT 细胞恶性转化的模型,从 P16 和 RASSF1A 基因甲基化和 GADD45 $\alpha$ 、DNMTs 蛋白表达的角度,研究模拟日光 UVB 辐射诱导的人 HaCaT 细胞恶性转化的分子机制。

**【方法】** CCK8 法确定模拟日光 UVB 辐射诱导的 HaCaT 细胞恶性转化的单次辐射剂量;Gimsa 染色从细胞形态角度初步确立模拟日光 UVB 辐射诱导的 HaCaT 细胞恶性转化的终点;软琼脂克隆形成实验、明胶酶谱法检测 MMP-9 蛋白酶的分泌确立 UVB 辐射诱导人 HaCaT 细胞恶性转化模型的成功建立。实验设计分为 2 组:正常对照组、模拟日光 UVB 模型组。RT-PCR 检测甲基转移酶 DNMTs(DNMT1、DNMT3a、DNMT3b)mRNA 的经时表达;蛋白质印迹法检测 GADD45 $\alpha$ 、DNMT3b、P16 及 RASSF1A 蛋白经时表达。高分辨率溶解曲线(MS-HRM)检测 P16、RASSF1A 基因甲基化程度的经时改变。收集每 4 次辐射后的结果进行讨论。

**【结果】** UVB 单次辐射剂量 10 mJ/cm<sup>2</sup> × 20 次,成功建立模拟日光 UVB 辐射诱导的人 HaCaT 细胞恶性转化模型;首次通过 (DNMT1、DNMT3a、DNMT3b)mRNA 的经时表达证实模拟日光 UVB 辐射诱导的人 HaCaT 细胞中 DNMT1 和 DNMT3a 的表达量与 UVB 辐射前相比无统计学差异,而 DNMT3b 的 mRNA 和蛋白的表达与辐射前相比随辐射次数增加逐渐升高,辐射 20 次后其表达量达到高峰( $P < 0.05$ );GADD45 $\alpha$  蛋白的经时变化显示 UVB 辐射 4 次时即可检测到其表达量达到高峰,随后其表达量随辐射次数增加逐渐下降,辐射 20 次后其蛋白表达达到低谷( $P < 0.05$ );P16 和 RASSF1A 蛋白的经时变化显示随 UVB 辐射次数增加其蛋白表达量逐渐下降,UVB 辐射 20 次后 P16 和 RASSF1A 蛋白表达达到低谷( $P < 0.05$ )。

**【结论】** 在国际上首次建立模拟日光 UVB 辐射诱导的人 HaCaT 细胞恶性转化模型,揭示 P16 和 RASSF1A 基因的高甲基化与 HaCaT 细胞恶性转化密切相关,并且是 DNMT3b 和 GADD45 $\alpha$  参与调控 P16 和 RASSF1A 基因的高甲基化,而不是 DNMT1 和 DNMT3a。

**关键词:** 紫外线 B;恶性转化;GADD45 $\alpha$ ;DNA 甲基化;DNMTs

## A-S2-33

# 人胚胎干细胞诱导分化角膜内皮细胞

孙琳;指导教师:吴欣怡

山东大学 2010 级临床医学八年制

**【目的】** 体外模拟角膜内皮细胞(corneal endothelial cell, CEC)的发育过程,利用生长因子和细胞外基质构建微环境,制备适当的条件培养基诱导人胚胎干细胞(human embryonic stem cell, hESC)分化为 CEC。

**【方法】** 用丝裂霉素 C 处理胚鼠成纤维细胞(mouse embryonic fibroblasts, MEFs),接种于明胶预包被培养皿内做饲养层细胞。hESCs 接种于 MEFs 饲养层,传代并免疫荧光鉴定。分割 hESCs 克隆团块,用拟胚体(embryonic bodies, EBs)培养基悬浮培养形成球形的 EBs。用丝裂霉素 C 处理角膜基质细胞,接种于明胶预包被培养皿内做饲养层细胞。EBs 接种于膜基质细胞饲养层,将 SV-40 转染的人晶状体上皮细胞接种于 transwell 小室与 EBs 共培养,EBs 逐渐分化形成类角膜内皮细胞。环钻钻取新鲜猪眼球中央角膜片,脱细胞处理后,机械切取脱细胞猪角膜基质(acellular porcine cornea matrix, APCM),即获得 APCM 支架。倒置显微镜下剖切 APCM 后板层,甘油脱水。将 hESCs 来源的类角膜内皮细胞接种于 APCM 后弹力层表面构建 CEC 植片,培养 7 d。