

A-S2-43

CRNDE 靶向调控 miR-186 影响胶质瘤干细胞生物学行为的分子机制

刘啸白,李方方,李东阳,武云昊,吕沐天;指导教师:王 萍,薛一雪

中国医科大学临床医学七年制

【目的】 存在于脑胶质瘤组织中的胶质瘤干细胞(GSCs)与恶性脑胶质瘤的发生、发展和复发密切相关。长链非编码 RNA (lncRNA)的转录和功能失调能够参与肿瘤的发生发展。结直肠癌肿瘤差别表达基因(CRNDE)属于 lncRNA,有报道 CRNDE 在胶质瘤组织中的表达上调。本项目旨在研究 GSCs 中异常表达的 CRNDE 是否影响 GSCs 的生物学行为及相关的分子机制。

【方法】 Real-time PCR 检测 GSCs 和 non-GSCs 中 CRNDE 和 miR-186 的表达水平以及 CRNDE 对 miR-186 的成熟体、初级转录本和前体表达的影响。双荧光素酶报告基因实验验证 CRNDE 与 miR-186 以及 miR-186 与靶基因间存在靶向结合。RIP 和 RNA pull-down 实验检测 CRNDE 与 miR-186 和 Ago2 之间的相互作用。CCK-8 细胞活力检测、流式细胞术、transwell 迁移、侵袭实验验证 CRNDE 和 miR-186 对 GSCs 的增殖、凋亡、迁移和侵袭的影响。建立 GSCs 裸鼠移植瘤模型验证 Lv-shCRNDE 和 Lv-miR-186 单独或联合应用对人 GSCs 裸鼠移植瘤的生长及荷瘤鼠生存时间的影响。

【结果】 GSCs 中 CRNDE 的表达较 non-GSCs 组显著上调;GSCs 中 miR-186 的表达水平较 non-GSCs 组显著下调。沉默 CRNDE 显著抑制了 GSCs 的增殖、凋亡、迁移和侵袭。通过生物信息学软件分析,预测到 CRNDE 与 miR-186 存在结合位点,并通过双荧光素酶报告基因实验证明了 CRNDE 与 miR-186 的结合作用,明确了结合位点。在 GSCs 中,CRNDE 能够结合 Ago2,并与 miR-186 存在相互作用。下调 GSCs 中 CRNDE 的表达能显著上调 miR-186 的成熟体表达,而初级转录本和前体的表达均未见明显变化。过表达 miR-186 显著抑制了与 GSCs 增殖、凋亡、迁移和侵袭相关蛋白 XIAP、noggin、MAPK1 和 PAK7 的表达;沉默 miR-186 则显著上调了上述蛋白的表达。miR-186 能够靶向结合 XIAP、noggin、MAPK1 和 PAK7 基因的 3' 非翻译区。沉默 CRNDE 后通过上调 miR-186 的表达,促进 miR-186 对靶基因 XIAP、Noggin、MAPK1 和 PAK7 的负性调控,抑制了 GSCs 的增殖、凋亡、迁移和侵袭;过表达 CRNDE 结果则与之相反。与 Lv-shCRNDE 和 Lv-miR-186 单用相比,两者联合应用能够显著抑制人 GSCs 裸鼠移植瘤的生长,延长荷瘤鼠生存时间。

【结论】 CRNDE 通过结合并负性调控 miR-186 的表达,减弱 miR-186 对靶基因 XIAP、Noggin、MAPK1、PAK7 的调节,影响 GSCs 的生物学行为。该研究能够为脑胶质瘤的治疗和药物研发提供新策略。

关键词: CRNDE;miR-186;胶质瘤干细胞;增殖;凋亡;迁移;侵袭

A-S2-44

家族性胆固醇血症患者 LDLR 基因新突变位点的鉴定与分析

杨 淇¹,范亮亮²,黄 皓²,郭 帅²,刘宇星²;指导教师:项 荣

1. 中南大学 2012 级临床医学五年制

2. 中南大学 2012 级生物学

【目的】 家族性高胆固醇血症(familial hypercholesterolemia, FH)主要是由于低密度脂蛋白受体(low density lipoprotein receptor, LDLR)基因突变而导致的常染色体显性遗传性疾病,其临床表现为多发黄色瘤、高水平血浆、低密度脂蛋白(LDL-C)、早发性冠心病等。本研究拟通过收集 FH 家系,并对其先证者及家系成员进行相关致病基因(LDLR、前蛋白转化酶枯草杆菌蛋白酶 PCSK9)的检测和分析,明确这些家系的血脂基因型,同时为血脂类疾

病诊断、治疗和临床遗传学的开展提供理论基础。

【方法】 收集 20 个左右 FH 家系先证者及家系成员的血标本,测定所有研究对象的总血脂(TC)、甘油三酯(TG)、LDL-C 以及高密度脂蛋白(HDL-C)含量,记录患者及家系的详实临床数据资料。用 Qiagen 试剂盒从外周血提取基因组 DNA 并鉴定,运用多聚酶链式反应(PCR)结合直接测序方法,检测 LDLR 基因、PCSK9 基因,将核苷酸序列分析结果与 GenBank 比对,运用 MutationTaster、Poluphen-2、SIFT 等软件对突变位点进行预测和鉴定,分析突变所导致的蛋白结构变化及其与血脂表型的相关性。

【结果】 (1) 临床收集了 20 个 FH 家系,每个家系中均存在多个(≥ 3)血浆 TC 和 LDL-C 水平明显增高的患者。(2) 在 13 个家系中检测到 LDLR 基因突变,1 个家系中检测到 PCSK9 基因突变(p. E670G)。(3) LDLR 突变中,1 个是新的缺失突变(c. 2000_2000delG),1 个是新的纯合点突变(p. F202S)。(4) 预测软件预测发现的 LDLR 新突变(c. 2000_2000delG, p. F202S)均为致病突变,Swissmodel 建模显示 c. 2000_2000delG 突变导致 LDLR 蛋白胞内区发生截断,而 p. F202S 突变导致 LDLR 配体结合域发生了改变,且患者血脂异常、黄色瘤等临床表现较其他家系患者更为明显。

【结论】 FH 中 60% 左右为 LDLR 的突变。本研究发现了 2 个新的 LDLR 基因致病突变位点,且基因型和血脂表型密切相关。我们的发现扩充了 LDLR 基因的突变数据库,并为血脂临床遗传学的开展提供了理论支持。

关键词: 血脂异常;低密度脂蛋白受体;基因突变

S-3 病原生物与微生物学,感染与免疫

A-S3-1

抗日本血吸虫单抗识别曼氏血吸虫表面蛋白的研究

朱峰宇,崔士祥;指导教师:沈际佳

安徽医科大学 2011 级生物技术

【目的】 证明本实验室所制备的抗日本血吸虫表面蛋白(Sj29)的单克隆抗体可识别曼氏血吸虫表面蛋白(Sm29),拓宽抗 Sj29 单克隆抗体的用途,为今后研发检测血吸虫病的通用型试剂盒打下基础。

【方法】 通过基因工程技术和分子生物学技术扩增曼氏血吸虫表面蛋白基因(Sm29)并与 T 载体连接,连接产物转化至感受态细胞(大肠埃希菌),挑取单菌落,摇菌,提质粒双酶切鉴定,测序,再将测序正确的 Sm29 基因与真核表达载体 pEGFP-C2 连接,构建重组真核表达质粒,再将该重组质粒转染至真核细胞 COS-1 中表达,荧光显微镜观测转染效率。最后用蛋白质印迹技术和细胞爬片免疫组化两种方法验证抗 Sj29 单克隆抗体和兔日本血吸虫感染血清能否识别 Sm29 蛋白。

【结果】 经酶切后,琼脂糖凝胶电泳鉴定显示,所得的条带的位置及大小均与目的基因的位置及大小相一致,并且目的基因测序结果的相似度为 99%,其中 1% 突变的碱基为无义突变类型,对蛋白的表达没有影响。荧光显微镜下观察转染效率为 30%~40%。用日本血吸虫表面蛋白(Sj29)和曼氏血吸虫表面蛋白(Sm29)分别作为一抗进行蛋白质印迹,其结果显示此株抗 Sj29 单克隆抗体均能识别上述两种蛋白,并且其识别日本血吸虫表面蛋白(Sj29)的位置位于 20 kd 左右,而其识别曼氏血吸虫表面蛋白(Sm29)的位置位于 55 kd 左右,这两种结果均符合预期结果。以抗 Sj29 的单克隆抗体和日本血吸虫感染的兔血清分别为一抗作免疫组化,其结果均呈阳性,其对照组分别以 PBS 和正常兔血清为一抗,结果均呈阴性。说明抗 Sj29 的单抗不仅可以识别 Sm29 蛋白,同时感染兔血清中的抗体也可以识别曼氏血吸虫表面蛋白(Sm29),进一步提高了以后研发检测血吸虫病通用试剂盒的可行性。

【结论】 抗 Sj29 单克隆抗体能识别 Sm29 蛋白,为今后研发检测血吸虫循环抗原的通用型试剂盒打下基础。

关键词: 日本血吸虫;曼氏血吸虫;膜蛋白;免疫诊断;单克隆抗体