

## B-S1-7

## 胎球蛋白 B 上调致糖尿病缺血/再灌注心肌易损性增加及机制

王炜中, 司超龙, 田彪, 熊凯文; 指导教师: 张海锋, 付锋

第四军医大学 2011 级航空航天临床医学

**【立论依据】** 糖尿病患者缺血性心脏病(IHD)的发病率及心肌损伤程度明显高于正常人群,亟需探寻有效防治措施。胎球蛋白 B(Fet-B)是由肝细胞和心肌细胞合成并分泌的糖蛋白。我们预实验发现,2 型糖尿病小鼠心肌 Fet-B 的表达较正常小鼠高出 4.84 倍,且能与心肌胰岛素受体结合,诱导胰岛素下游 PI3K-Akt 通路受损、葡萄糖转运子 4 转位减少,提示心肌 Fet-B 表达增加可能与心肌胰岛素敏感性受损有关。此外,转录调节因子 FoxO1 在糖尿病状态下表达增加,然而其与 Fet-B 高表达的关系尚不清楚。

**【设计思路】** 本课题拟在预实验基础上,在整体和细胞水平,运用药理学方法和基因干预手段研究:2 型糖尿病心肌 FoxO1/Fet-B 表达增加可否通过诱导胰岛素抵抗、从而使缺血/再灌注(I/R)损伤加重,并进一步探讨其机制。

**【实验内容】** (1)研究糖尿病心肌 Fet-B 表达变化、并分析其与心肌胰岛素抵抗的关系:检测糖尿病小鼠血浆和心肌 Fet-B 水平,给或不给胰岛素,检测胰岛素下游信号;检测心肌 FoxO1 水平;分离小鼠心肌细胞,分别用 siRNA 和腺病毒转染下调和上调 FoxO1,检测 Fet-B 变化。(2)验证糖尿病心肌 I/R 损伤加重,分析其与 Fet-B 表达变化的关系:构建 ob/ob 小鼠心肌 I/R 模型,检测心肌损伤,分析其与 Fet-B 表达变化的关系。(3)基因水平验证 FoxO1/Fet-B 表达与 I/R 心肌损伤有关:构建 Fet-B 敲除小鼠 I/R 模型,给或不给胰岛素,检测心功能及心肌损伤、胰岛素下游信号;再给予 Fet-B,检测是否加重心肌 I/R 损伤和心肌胰岛素抵抗。

**【材料】** WT 小鼠、ob/ob 小鼠、Fet-B 敲除小鼠、心肌 I/R 模型的手术器械、细胞培养所需试剂、细胞凋亡检测试剂盒、有关信号分子的抗体、siRNA 和腺病毒、RT-PCR 及蛋白质印迹仪器等。

**【可行性】** 本实验设计立足于前期预实验结果之上,所需实验技术均为常规技术,实验室具备所需仪器,动物与试剂均购到,可行性较好。

**【创新性】** Fet-B 在糖尿病及心脏方面的研究在国内外均无论文发表。我们首先提出 2 型糖尿病心肌 FoxO1/Fet-B 表达增加可诱导心肌胰岛素抵抗,进而导致 I/R 心肌损伤加重的新机制,并得到预实验的支持,期望为临床防治糖尿病 IHD 提供新靶点。

**关键词:** Fetuin-B; FoxO1; 糖尿病; 心肌缺血/再灌注损伤; 心肌胰岛素抵抗

## B-S1-8

## 抑制 SIRT2 介导的心肌程序性坏死改善衰老心肌的缺血耐受

李晨<sup>1</sup>, 杨铮<sup>2</sup>; 指导教师: 马恒

1. 第四军医大学 2010 级临床医学

2. 第四军医大学 2011 级临床医学

**【立论依据】** 衰老心肌对缺血/再灌注(I/R)损伤的耐受能力显著降低。并且,坏死是 I/R 心肌死亡最主要的病理途径,但以往认为心肌坏死不可调控。最新发现 SIRT2 介导的 RIP1 去乙酰化是触发程序性坏死(Necroptosis)这一可调控性细胞坏死的关键机制。

**【设计思路】** 本研究以成年和老年组为对比,结合基因和药理学干预,从整体,器官,细胞,分子四个水平进行功能验证,旨在探讨衰老状态下 SIRT2 介导的心肌 Necroptosis 是否是老年心肌缺血损伤加重的新机制。

**【实验内容】** 采用成/老年 C57 小鼠建立整体心肌 I/R(30 min/4 h)模型。分别于基础状态和 I/R 后检测各

组心肌 SIRT2 表达水平及其活性; RIP1 的乙酰化水平。采用免疫共沉淀方法检测 RIP1-RIP3 复合物(necrosome)水平;免疫组化方法检测下游分子 MLKL 的质-膜转位;再灌注后测定心肌梗死面积。采用成年 SIRT2 KO 和 RIP3 KO 小鼠建立心肌 I/R 平行实验,分析 SIRT2 介导的促坏死在心肌缺血易损中的关键作用。进而,采用心肌点注射腺病毒或 siRNA 上调/下调成年和老年心肌 SIRT2 的表达,在整体水平明确衰老状态下心肌 SIRT2 对 I/R 心肌 Necroptosis 以及心肌损伤的影响。运用离体心脏灌流结合 SIRT2 特异阻断剂 AGK2 和 Necroptosis 抑制剂 nec-1,建立成/老年小鼠离体心脏 I/R 模型。在器官水平探讨干预 SIRT2 介导的 Necroptosis 能否抑制衰老心肌死亡。再则,建立体外心肌细胞缺氧/复氧(H/R)模型,使用 AGK2 或 nec-1 处理细胞;采用细胞动缘探测系统观察单心肌细胞收缩舒张功能;流式细胞仪检测 PI 和 Annexin V 双阳性细胞定量检测心肌 Necroptosis 程度与细胞存活率。在细胞水平阐明干预 SIRT2 介导的 Necroptosis 促进衰老心肌存活的分子机制。

**【材料】** 成年(4 个月龄)及老年(22 个月龄)C57 小鼠。

**【可行性】** 老年组 I/R 心肌 SIRT2 活性显著增高, RIP1 乙酰化水平随之降低, necrosome 水平升高, MLKL 细胞质-膜转位增加(均  $P < 0.05$ )。离体灌流实验发现, AGK2 可有效抑制老年 I/R 心肌 SIRT2 活性, 减小老年组心肌损伤。心肌细胞实验显示, 抑制 SIRT2 介导的 Necroptosis 可提高 H/R 后心肌存活率(均  $P < 0.05$ )。现有的实验结果表明本设计切实可行。

**【创新性】** 我们有望首次证实: SIRT2 介导的 Necroptosis 加重是老年心肌缺血易损性增加的重要原因; 针对性的抑制心肌 SIRT2 可显著改善衰老心肌抗 I/R 损伤能力。本研究将为降低老年缺血性心脏病患者的心肌损伤提出新的干预靶点。

**关键词:** 衰老; 缺血再灌注; 程序性坏死; SIRT2

## B-S1-9

# 氯胺酮对 SD 幼鼠未成熟神经细胞 CREB 元件的影响

谢明峰, 翁彦颖, 龚鑫; 指导教师: 刘潜, 徐仙赞

赣南医学院

**【立论依据】** 氯胺酮是常用儿科麻醉药物, 近年, 其临床安全性日益受到关注。大量动物实验提示其对未成熟神经细胞有毒性作用, 但机制尚不清楚。课题组在与哈佛大学合作的前期研究中发现氯胺酮可能通过上调 Cyclin D1 异常启动细胞周期, 导致神经细胞凋亡, 但如何上调 Cyclin D1 尚未知。另有研究显示糖原合成酶激酶-3 (GSK-3) 可能参与氯胺酮诱导的神经细胞凋亡; 已知 GSK-3 $\beta$  可激活环磷腺苷反应元件结合蛋白(cAMP-response element binding protein, CREB), 后者可在转录水平上调 Cyclin D1。那么, 氯胺酮是否可通过 GSK-3 $\beta$ -CREB 通路, 上调 Cyclin D1, 异常启动细胞周期, 从而导致未成熟神经细胞凋亡呢? 如能证实这一推测, 对临床合理使用氯胺酮具有重要参考价值。

**【设计思路】** 作为上述系列研究之一, 本课题主要探讨 CREB 是否参与了氯胺酮对未成熟神经细胞毒性作用, 同时辅以行为学指标探讨氯胺酮对幼鼠短期神经毒性影响, 为后续机制研究奠定基础。在本课题组前期建立的 P7SD 幼鼠模型中, 探讨氯胺酮对未成熟神经细胞 CREB 蛋白环节的影响, 同时辅以行为学指标探讨氯胺酮对幼鼠短期神经毒性作用。

**【实验内容】** (1) 取 P7SD 幼鼠, 腹腔注射等体积不同浓度氯胺酮。(2) 观察氯胺酮对 P7 幼鼠短期神经毒性作用。(3) 分别用免疫组化法和蛋白质印迹法检测皮层及海马 CREB 蛋白表达及磷酸化水平。

**【材料】** P7 幼鼠、氯胺酮和免疫组化及蛋白质印迹实验等相关材料。

**【可行性】** (1) 理论依据充分: 文献及前期研究支持该假设; (2) 实验技术可行: 本课题涉及的动物模型建立, 腹腔注射、皮层及海马的取样、免疫组化、蛋白质印迹等均为成熟技术; (3) 团队稳定: 所在团队人员及方向稳定, 目前承担着国家自然科学基金课题及与哈佛大学合作课题等重大项目, 具备丰富的相关研究经验和基础。