

B-S2-3

PTRF 介导骨髓间充质干细胞衰老在骨质疏松中的作用及其分子机制

陈兆煜<sup>1</sup>,周高适<sup>2</sup>,陶诗婉<sup>2</sup>,陈雪莹<sup>3</sup>,陈光宇<sup>2</sup>,葛庆舒<sup>4</sup>;指导教师:谈 智

- 1. 中山大学医学院 2010 级临床医学五年制
- 2. 中山大学医学院 2011 级临床医学五年制
- 3. 中山大学医学院 2012 级临床医学五年制
- 4. 中山大学医学院 2009 级临床医学八年制

**【立论依据及设计思路】** 临床上衰老所致的骨质疏松症(OP)没有好的治疗办法,以“干细胞”作为种子细胞的治疗策略为其提供了新的方法。骨髓间充质干细胞(BMSCs)自身衰老可影响其向成骨细胞分化,是衰老所致 OP 的重要因素。但何种机制参与调控 BMSCs 衰老仍不明确。新近研究表明聚合酶 I 转录释放因子(PTRF)介导细胞衰老,但目前暂未见 PTRF 在 BMSCs 衰老中作用的报道,我们预实验结果显示 PTRF 在老龄 SD 大鼠来源的 BMSCs 表达偏高。因此提出假说:PTRF 可能介导 BMSCs 衰老在 OP 中发挥重要的作用,调控 PTRF 的表达可以通过延缓 BSMCs 衰老从而抑制 OP。为此提出设计思路:(1)明确 BMSCs 衰老与 PTRF 有关;(2)证明 PTRF 介导 BMSCs 衰老影响成骨分化;(3)在动物模型上验证,输入上调或下调 PTRF 表达的 BMSCs 可促进或抑制 OP。

**【实验内容】** (1)对幼龄及老龄 SD 大鼠来源 BMSCs 进行鉴定,比较其 PTRF 和衰老标志物 p21、p53 表达以及成骨分化能力;(2)上调或下调 PTRF 对 BMSCs 衰老及成骨分化的影响;(3)探讨 PTRF 是否通过影响成骨分化相关蛋白碱性磷酸酶(ALP)、骨钙素(OPN)的表达从而导致成骨分化异常;(4)在老年性骨质疏松 SD 大鼠模型上,在体输入上调或下调 PTRF 的 BMSCs,验证其对衰老所致 OP 的影响。

**【材料】** 动物:幼龄 SD 大鼠(5 周)、老龄 SD 大鼠(32 周)、雌性 SD 大鼠(10 周);抗体:CD29、CD34、CD44、CD45(用于 BMSCs 鉴定);PTRF;ALP、OPN 等成骨分化相关蛋白抗体;引物:(PTRF、P21、P53);转染相关:PTRF siRNA(慢病毒)、表达载体;培养相关:成骨培养基;成骨染色试剂:茜素红 S。

**【可行性】** (1)我们预实验结果显示 PTRF 在幼龄和老龄 SD 大鼠来源 BMSCs 表达存在差异,并且与成骨分化相关。因此本项目的提出具有坚实的实验基础,理论上可行;(2)课题组成员都参与过学校暑期及业余学生科研项目,具有相关实验基础,技术上可行;(3)指导教师从事 PTRF 相关研究,可提供很好的支持,试剂及设备上可行。

**【创新性】** 老年化是当今中国社会面临的严重问题,本项目结合干细胞转化研究新进展,从 PTRF 介导 BM-SCs 衰老影响成骨分化入手,为临床上治疗老年性 OP 提供一种新的安全有效的靶点。

**关键词:**骨质疏松症(OP);骨髓间充质干细胞(BMSCs);聚合酶 I 转录释放因子(PTRF);衰老

B-S2-4

TRPM2 在机械性创伤引发单核细胞 TNF-α 过量产生中的作用及其机制

刘 畅<sup>1</sup>,马 硕<sup>2</sup>,任佳梦<sup>1</sup>,孙佳玉<sup>1</sup>,李新桃<sup>3</sup>;指导教师:李树壮

- 1. 大连医科大学 2011 级临床医学五年制
- 2. 大连医科大学 2010 级临床医学七年制
- 3. 大连医科大学 2011 级临床医学七年制

**【立论依据】** 车祸、地震等造成的机械性创伤(MT),可以造成心脑等重要器官的继发性损伤。前期的研究

表明,MT 引发的  $\text{TNF-}\alpha$  过量产生是导致继发性心肌损伤的关键环节,然而其机制却不清楚。TRPM2 是非选择性阳离子通道,在氧化应激情况下开放。由于单核细胞是产生  $\text{TNF-}\alpha$  的主要细胞,故本课题以 TRPM2 为切入点,研究 MT 引发单核细胞  $\text{TNF-}\alpha$  过量产生的机制。

**【设计思路】** 依次解决下述三个问题:(1)TRPM2 在 MT 引发单核细胞  $\text{TNF-}\alpha$  过量产生中是否发挥重要的作用?(2)TRPM2 在 MT 引发  $\text{TNF-}\alpha$  过量产生中的作用机制,主要观察通过 TRPM2 通道的开放是否与 UCP2 有关?(3)通过该通道内流的钙离子,是否通过  $\text{ErK/NF-}\kappa\text{B}$  通路介导  $\text{TNF-}\alpha$  的过量产生?

**【实验内容】** (1)在培养的单核细胞液中,分别使用 TRPM2 通道阻断剂、 $\text{Ca}^{2+}$  清除剂、相关溶剂和基因沉默技术,观察在培养液中添加创伤动物血浆(TP)引发的培养液中  $\text{TNF-}\alpha$  浓度的变化;(2)使用 TRPM2 基因敲除鼠,观察 MT 造成的动物血浆中  $\text{TNF-}\alpha$  浓度变化;(3)使用膜片钳和检测细胞内钙变化,从功能上观察在单核细胞上的 TRPM2 通道,是否参与 TP 引起的钙离子内流;(4)动物实验,观察 MT 后,UCP2 的蛋白表达是否增强;使用 UCP2 抑制剂,观察 MT 后血浆  $\text{TNF-}\alpha$  产生量的变化;(5)膜片钳观察,使用 UCP2 抑制剂,观察是否可抑制 TP 引起的单核细胞 TRPM2 通道开放和细胞内钙上升;(6)单核细胞培养,使用 TRPM2 阻断剂和 siRNA 基因沉默 TRPM2,观察培养液中添加 TP 后,对  $\text{ErK}$  的表达、 $\text{NF-}\kappa\text{B}$  的表达和核内移情况;(7)动物实验,观察 TRPM2 基因敲除鼠和对照鼠,创伤后  $\text{ErK}$  的表达、 $\text{NF-}\kappa\text{B}$  的表达和核内移情况。

**【材料】** 使用雄性成年 C57B16/J 小鼠和 TRPM2 基因敲除鼠。

**【可行性】** (1)申请人所在实验室具有完成上述实验的全部实验仪器,本课题组实验技术成熟,人员配备较好。(2)实验所用 TRPM2 基因敲除鼠可以从日本国立自然科学研究机构获得。

**【创新性】** (1)以 TRPM2 为靶点,研究其在 MT 引发  $\text{TNF-}\alpha$  过量产生中的作用。(2)研究 TRPM2 通道与 UCP2 的关系。(3)观察 TRPM2 通道是否通过  $\text{ErK/NF-}\kappa\text{B}$  通路介导 MT 引发的  $\text{TNF-}\alpha$  过量产生。

**关键词:** TRPM2;创伤;单核细胞;肿瘤坏死因子- $\alpha$

## B-S2-5

# 基于干细胞趋化特性的微流控芯片富集分选少突前体细胞的实验研究

郝 壮<sup>1</sup>,全弘宇<sup>2</sup>,马 腾<sup>1</sup>,赵柏雄<sup>3</sup>;指导教师:李红丽

1. 第三军医大学 2011 级临床医学
2. 第三军医大学 2010 级生物医学工程
3. 第三军医大学 2010 级临床医学

**【立论依据】** 微流控芯片(microfluidic chip)是将微通道、微泵、微储液池集成一体,通过气液压等操纵细胞运动的实验室芯片,近年在细胞分选与免疫分析等方面显示出具有高灵敏度、设备微型化等优势。目前体外快速分离获取高纯度高活性的少突胶质前体细胞(OPCs)一直是难题。基质细胞衍生因子 1(SDF-1)及其受体已证实广泛分布在多种干细胞中,高表达 SDF-1 对神经干细胞(NSC)具有显著的趋化吸引效应,是驱动 NSC 迁移的一类关键因子。先前对 NSC 分化研究提示,钙敏感受体( $\text{CaSR}$ ,与甲状旁腺素(PTH)特异亲和)在 OPCs 中表达量远大于神经元和星形胶质细胞,过表达  $\text{CaSR}$  的 NSCs 分化为少突胶质细胞的比例增加; $\text{CaSR}$  敲除小鼠表现出严重的白质发育障碍。提示  $\text{CaSR}$  在 NSC 定向少突胶质细胞分化中扮演重要作用。

**【设计思路】** 本研究利用 SDF-1 对 NSC 趋化吸引的动力效应结合 OPCs 与 PTH 高特异亲和性,构建含高浓度 SDF-1 和 PTH 的半透膜流动腔和对应收集池的微流控芯片。近膜区可富集 OPCs 并进而收集分选出高纯度 OPCs。

**【实验内容】** (1)采用胚胎或新生大鼠脑组织制备细胞悬液。(2)以聚二甲基硅氧烷(PDMS)为微流控芯片基础材料,设计含半透膜分隔的两套管道系统及对应收集池。一侧灌注 SDF-1 和 PTH 液,一侧为受微压力驱动