

仍知之甚少。

【设计思路】 本项目拟利用肝细胞生长因子(HGF)诱导大鼠肝前体细胞 WB-F344 向肝实质细胞分化的细胞模型,观察 miR-382 在肝前体细胞 WB-F344 分化进程中的表达变化,并从功能学和分子标志物两方面检测该 microRNA 分子对肝卵圆细胞分化的作用,并通过寻找该 microRNA 分子的靶基因初步明确 miR-382 调控肝干细胞分化的分子机制。

【实验内容】 (1)建立 HGF 诱导大鼠肝上皮样干细胞 WB-F344 肝向分化的细胞模型,并通过糖原染色和肝分化标志物的检测证实该模型的有效性。(2)通过 qPCR 的方法检测 miR-382 在整个诱导分化进程中的表达变化。(3)从功能学指标和分子标志物指标两方面检测 miR-382 过表达或者低表达对 WB-F344 细胞分化的影响。(4)miR-382 通过靶向抑制候选靶基因 Ezh2 的表达提高肝干细胞的分化能力。

【材料】 大鼠肝前体细胞 WB-F344,肝细胞生长因子 HGF,Trizol 试剂,Lipofectamine 2000 转染试剂,MiR-382 mimics 等等。

【可行性】 (1)项目组成员均系统学习了细胞生物学和分子生物学的知识和实验操作技能,对科研有浓厚的兴趣,并已加入指导教师课题组进行科研项目训练。(2)项目指导教师承担的浙江省教育厅课题(Y201330031)包含肝干细胞定向分化的研究,积累了丰富的肝实质细胞诱导分化经验。

【创新性】 (1)本项目首次研究 miR-382 在肝干细胞分化中的作用,该研究有助于我们认识 miR-382 的功能。(2)本项目首次提出 miR-382 通过调控表观遗传修饰酶 Ezh2 的表达影响染色质修饰状态并参与肝干细胞分化的作用机制,本实验数据将丰富我们对肝干细胞分化过程中表观遗传修饰的认识,具有一定的理论意义。

关键词: Dlk1-Dio3 microRNA 簇;miR-382;WB-F344;肝卵圆细胞分化

B-S2-16

诱导脂肪干细胞分化对原发性肾上腺皮质功能减退症的治疗

谢昀晖¹,罗宫薇²,李萌²;指导教师:杨蓓

1. 南昌大学 2013 级临床医学
2. 南昌大学 2013 级医学影像学

【立论依据】 原发性肾上腺皮质功能减退症是临床上一类内分泌疾病,主要是由于双侧肾上腺绝大部分或全部被毁,从而导致体内出现肾上腺皮质激素分泌不足而产生的临床表现。故其现阶段治疗以肾上腺皮质激素替代治疗为主。但长期激素替代治疗难以达到合理的剂量,且激素替代治疗不但在应激反应中无效,还可能存在副作用和潜在的风险。而通过干细胞技术诱导属于成体干细胞的脂肪干细胞(ASCs)向肾上腺皮质细胞分化并移植来恢复自身的分泌肾上腺皮质激素能力,既可解决激素替代疗法的剂量问题,又可弥补肾上腺细胞移植存在的供体来源及免疫排斥的不足,也能应对其它干细胞移植带来的较难获得、伦理及安全性等问题。

【设计思路】 本研究通过改变培养条件,加入视黄酸、ACTH、低钾、血管紧张素、肾上腺组织上清液诱导 ASCs 表达合成类固醇激素的关键酶 P450_{sc}、CYP11B 等和表达 ACTHR 情况,探讨产生有功能的 ASCs 来源的肾上腺皮质样细胞方法,判断是否产生有功能的肾上腺皮质样细胞,并将其移植至切除肾上腺大鼠模型肾包膜下,观察其生存情况和产生肾上腺皮质激素的能力。

【实验内容】 观察诱导液对 ASCs 增殖、分化、形成肾上腺皮质样细胞的影响,及特异标志表达情况。测定诱导后培养液中皮质酮、醛固酮浓度及其变化情况,判断是否产生有功能的肾上腺皮质样细胞。观察诱导分化的 ASCs,搭载在明胶海绵上移植入切除肾上腺的大鼠模型肾包膜下,宿主大鼠的生存情况,测定血液中皮质酮、醛固酮的浓度,并取移植物切片观察。

【材料】 实验动物为 SD 大鼠,其它实验材料主要有 qPCR、免疫细胞化学及蛋白质印迹等实验方法相关材料。

【可行性】 本研究指导教师有所需研究方法的经验,已建立 ASCs 的分离、培养、扩增方法。并且本研究室具有完备的与本研究项目有关的设备和条件,故在技术上和人力上可确保本项目的完成。

【创新性】 对于肾上腺皮质功能减退症的治疗,细胞移植法比传统激素替代法更安全,效果更好。与肾上腺细胞移植相比,本研究可以解决后者存在的供体来源及免疫排斥的问题。而与采用其它干细胞转分化移植相比,ASCs 具有分化能力强、安全、易采集、无伦理问题等优点。

关键词: 全反式维甲酸;脂肪干细胞;肾上腺皮质功能减退症

B-S2-17

寻找胸腺干细胞——胸腺小体的潜在功能

郑越;指导教师:潘泽政

南昌大学 2012 级临床医学

【立论依据】 最新发现,Aire 极有可能也是一种多能干细胞标记基因; Aire⁺的胸腺髓质上皮细胞(mTEC)很可能是一类多潜能的前体细胞,尚无明确的实验证据;豚鼠胸腺组织体外培养能新形成“胸腺小体”,不再被其特异性抗体 KL1 标记,仍能被 KL4 标记,但其他抗原,如 Aire 的表达情况未知;提示从 mTEC 分化到成熟 HC 中间可能还有不成熟的过渡态。

【设计思路】 发现问题:胸腺小体(HC)功能尚不清楚。提出问题:高度分化的 HC 能否去分化?大胆假设:HC 就像干细胞的贮藏库,某种条件下能去分化,表现干性,成为胸腺干细胞甚至多能干细胞的源泉;胸腺只有 mTEC 表达 Aire,HC 不表达 Aire,让不表达 Aire 的 HC 表达 Aire,能否实现分化逆转,诱导多能性?

【实验内容】 手术分离豚鼠胸腺,建立 2 种体外培养体系。体系 A:组织块培养法体外重现“胸腺小体”,K5 和 K8、KL4 和 BrdU、Aire、Involucrin 双标记免疫荧光组织化学比对 HE 染色切片联合定位,鉴定新形成的“胸腺小体”;体系 B:KL1 包被免疫磁珠纯化胸腺小体上皮细胞(HCEC),饲养层 3T3 细胞体外培养 HCEC,构建豚鼠 Aire 基因真核表达载体重组质粒导入 HCEC,RT-PCR 检测豚鼠 HCEC 有无目的基因 Aire、胸腺上皮祖细胞(TEPC)标志基因 K5、K8 及干细胞标志基因 Oct4、Nanog、Sox2、Lin28 等表达。

【材料】 豚鼠,超净工作台,手术器械,切片机,倒置显微镜,离心、电泳、MACS 分选设备,PCR 体系,紫外产品,培养瓶 & 皿 & 基,明胶,血球计数板,pH 计,分光光度计,电子天平,冰箱,摇床,培养箱,恒温水浴锅,液氮罐,移液器,质粒载体,工具酶,DH5 α ,LipofectamineTM2000,3T3,丝裂霉素 C,胰蛋白酶,FBS,缓冲液,H.E 试剂,一抗,荧光二抗等

【可行性】 依托南昌大学医学实验教学中心,省医科院闵卫平院长支持,创新实验项目基金保障;2 位导师分别从事不同学科领域,经验丰富;团队更有留德免疫学博士张瑜娟加盟助力。

【创新性】 首次报道胸腺小体的分离、纯化、体外培养及诱导去分化(中心环节、技术难点);胸腺小体功能谜题;多能干细胞假说;胸腺干细胞移植,重建 T 细胞库,先天性或 AIDS 等免疫缺陷病治疗希望。

关键词: 胸腺;上皮;干细胞;Aire;豚鼠;胸腺小体;功能;去分化;KL1;KL4;免疫磁珠;分离;纯化;饲养层 3T3;培养;质粒;真核表达载体;免疫组化;多能性