

一种全身性代谢性骨病。骨质疏松严重威胁人类健康,且发病率呈逐年上升趋势,目前全世界约有 2 亿多骨质疏松症患者。目前临床上治疗骨质疏松的化学合成药物存在毒性大、价格昂贵等问题,而天然中草药及其制剂则可以克服上述缺点。淫羊藿(Herba Epimidii)是目前临床上治疗骨质疏松的常用中药,已有研究显示其主要成分淫羊藿甙(Icariine, ICA)具有促成骨分化功能,但具体机制不详。microRNA (miRNA)是一类长度约为 20~25 nt、在基因转录后水平发挥调控作用的小分子非编码 RNA,它几乎参与生物所有的生理病理过程。作为重要的生物调节分子,miRNA 是否参与了 ICA 促成骨分化过程呢?关于 ICA 促成骨分化的分子机制的研究,可以为临床上提高淫羊藿治疗骨质疏松的效果提供理论和实验依据。

【设计思路】 首先确定 ICA 促进小鼠前成骨细胞 MC3T3-E1 分化的合适的时间和剂量,然后进行差异 miRNAs 筛选并选取部分差异 miRNAs 进行验证,最后挑选 miR-27a 进行深入研究。

【实验内容】 (1)ICA 处理时间和剂量的确定:用 MTT、real-time PCR 确定 ICA 促 MC3T3-E1 分化的合适的时间和剂量。(2)差异 miRNAs 的筛选:将 5 μ M ICA 处理 48 h 的 MC3T3-E1 RNA 及对照进行 miRNA 测序和分析。(3)差异 miRNAs 的验证:挑选 15 个差异 miRNAs 用 Real-time PCR 进行验证(已完成),并从中挑选 miR-27a 进行深入研究。(4)miR-27a 在 ICA 促成骨分化中的作用及机制:① miR-27a 靶基因的预测:运用 miRWalk 在线工具预测 miR-27a 的靶基因。② Osterix 是 miR-27a 靶基因的验证:A. 构建含有 Osterix 3'UTR 以及 miR-27a 结合位点突变的荧光素酶报告质粒;B. 将 miR-27a 的 mimic 或对照和构建的荧光素酶报告质粒共转染 HEK 293 T 细胞,检测并比较荧光素酶活性;C. 将 miR-27a 的 mimic 或对照转染 MC3T3-E1 细胞,确定 miR-27a 对 Osterix mRNA 和蛋白表达的影响。③ miR-27a 在 ICA 促成骨分化中的作用:将 miR-27a 的 mimic、inhibitor 和对照分别转染 MC3T3-E1 细胞,再用 ICA 处理,然后分别用 Real-time PCR 和碱性磷酸酶染色确定 miR-27a 在 ICA 促成骨细胞分化中的作用。

【材料】 HEK 293-T、MC3T3-E1 细胞;pGL3-promoter 荧光素酶报告基因载体、Real-time PCR 用引物及试剂,蛋白质印迹用试剂及抗体;碱性磷酸酶染色用试剂。

【可行性】 我们具备本课题实施所需要的研究材料包括试剂和仪器;课题设计所用的方法均为指导教师课题组常用的方法;本课题已顺利实施,我们目前已完成了 ICA 处理时间和剂量的确定、差异 miRNAs 的筛选和鉴定、miR-27a 靶基因的预测。以上实验的实施和结果的获得表明本课题在理论和技术上均可行。

【创新性】 (1)首次证明 miRNAs 参与 ICA 促成骨细胞分化过程;(2)首次证明 miR-27a 在 ICA 促成骨细胞分化中起重要作用。研究结果将进一步阐明 ICA 促成骨细胞分化的分子机制,从而提高淫羊藿的临床治疗效果提供理论和实验依据。

关键词:淫羊藿甙;成骨细胞;分化;microRNA

B-S2-23

氯化钆对胰岛素原剪切的影响

王宏伟,冯勤超,王 妮;指导教师:陈园园

南京医科大学 2012 级临床医学七年制

【立论依据】 胰岛素是维持机体糖代谢平衡的最重要的激素。在胰岛 β 细胞中,胰岛素原需要经过激素原转化酶(PC3 和 PC2)的剪切才能生成真正具有降低血糖作用的胰岛素。因此,激素原转化酶对胰岛素的成熟具有决定作用。众多研究表明,糖尿病患者和动物胰岛中激素原转化酶的含量显著不足。而我们的前期实验提示,稀土化合物氯化钆($GdCl_3$)能够增加激素原转化酶的表达量,从而促进胰岛素原的剪切成熟。

【设计思路】 糖尿病小鼠经氯化钆治疗后,检测小鼠血清中胰岛素与胰岛素原的含量,以及胰岛中激素原转化酶的表达量。

【实验内容】 以高脂喂养的 C57BL/6J 糖尿病小鼠作为研究对象,随机分为两组,分别腹腔注射氯化钆(治疗

组)和生理盐水(对照组)。注射 4 周后,抽取治疗组和对照组小鼠的血清,通过酶联免疫吸附试验(ELISA)检测胰岛素原和胰岛素的含量,进而分析胰岛素的剪切成熟情况。同时,分离提纯两组小鼠的胰岛,通过实时定量 PCR 和 Western 方法检测胰岛中激素原转化酶(PC3 和 PC2)表达量的变化。

【材料】 C57BL/6J 小鼠,高脂饲料,胰岛素原 ELISA 试剂盒,胰岛素 ELISA 试剂盒,PC3 和 PC2 的引物及抗体。

【可行性】 该实验所需要的多项实验技术,如糖尿病小鼠模型的建立、小鼠胰岛的分离纯化、胰岛素及胰岛素原的检测等方法,均已成熟。设计实施该实验的团队,已经具备了一定的生理学、生物化学、分子生物学和细胞学等基础知识,并且参与过多项动物及分子生物学实验,在实验的基础操作方面已十分熟练,具备参加科研的基础知识和动手能力。同时,团队成员做事踏实认真,并能独立查阅国内外文献,具有较强的解决问题、设计实验的能力。此外,该团队的指导教师长期从事糖尿病治疗的相关研究,能够对该课题的实施进行必要的指导。

【创新性】 氯化钆对糖尿病的治疗作用鲜有报道,且作用机制尚未阐明。氯化钆对胰岛素的作用效果及机制尚无任何报道,本实验属首次。

关键词: 氯化钆;胰岛素;激素原转化酶

B-S2-24

二甲双胍通过 DEC1 改善 2 型糖尿病小鼠脂代谢紊乱

储栋宝,魏渝莹,梁佳凤;指导教师:杨 俭

南京医科大学 2012 级临床医学

【立论依据】 2 型糖尿病(T2D)因胰岛素分泌相对不足或靶细胞对胰岛素敏感性降低,表现高糖和高胰岛素并存的代谢病。常与肥胖、高血压、高血脂等共同发生发展。近年发现二甲双胍(metformin, M)不仅可下调血糖,改善胰岛素耐量,且具有抗炎、改善脂代谢的作用,但其中机制仍不清楚。转录因子 DEC1 与多种细胞功能如细胞的增殖和分化、自身免疫性疾病以及应激反应密切相关。新近发现:DEC1 能与核受体(PXR/CAR/LXR/PPAR)的伴侣核受体 RXR α 结合,抑制代谢性核受体作用,Knockdown 内源性 DEC1 后,明显增加 LXR 靶基因的表达, LXR 在调节代谢脂类发挥重要作用,提示 DEC1 参与了体内物质代谢和能量代谢。本实验室发现,高糖和高胰岛素均能显著诱导小鼠脂肪和肝细胞 DEC1 表达,同时诱导脂质合成酶表达而抑制脂质分解酶表达;动物实验也显示在 T2D 小鼠脂肪和肝脏组织 DEC1 表达显著增加,给予二甲双胍能下调 DEC1 表达,并改善脂质代谢紊乱。因此提出二甲双胍通过 DEC1 改善 T2D 小鼠脂代谢紊乱的假设。

【设计思路】 在整体和离体水平研究并阐明二甲双胍通过 DEC1 改善 T2D 小鼠脂代谢紊乱。

【实验内容】 研究二甲双胍对 T2D 小鼠肝脏、脂肪组织和原代小鼠肝细胞脂质代谢紊乱的作用和机制。

【材料】 雄性 C57 小鼠分为对照组(C)、2 型糖尿病组(T2D)和二甲双胍治疗组(T2D+M)3 组,C 组普通饮食,T2D 组和 T2D+M 组高脂饮食,第 8 周的第 1 天,腹腔注射 30 mg/kg 的链佐菌素,C 组给予等体积溶剂 1 次,第 9 周的第 1 天,T2D+M 组连续给予二甲双胍 20 mg/(kg·d)灌胃 4 周,T2D 给予等体积 NS。第 13 周第 1 天处死小鼠。称重,取肝脏组织用油红 O 染色观察肝脏中性脂肪积累;提取肝脏和小肠 S9 成分,测定肝脏甘油三酯和总胆固醇含量;用蛋白质印迹法测定小鼠肝脏 SREBP1c、ACC1 和 FAS 以及 Ces1d、Ces1e 的蛋白表达水平。同时,培养原代小鼠肝细胞,在离体水平研究二甲双胍对小鼠肝细胞在高糖和高胰岛素脂质代谢的作用及其机制。

【可行性】 立项依据充分,前期结果支持,实验室有良好的经费和技术支持和保障。

【创新性】 首次提出以 DEC1 为靶标治疗 2 型糖尿病脂质代谢紊乱。

关键词: 2 型糖尿病;二甲双胍;DEC1;脂代谢紊乱