

B-S2-28

同型半胱氨酸经 PRMTs 调控 E2F1 差异甲基化介导内皮细胞凋亡和平滑肌细胞增殖的作用机制研究

郝 灿¹, 范文庭², 张 辉²; 指导教师: 杨晓玲, 田 珏, 姜怡邓

1. 宁夏医科大学 2012 级生物技术

2. 宁夏医科大学 2010 级临床检验

【立论依据】 动脉粥样硬化(AS)是以退行性和增生性病变为特征的复杂性疾病,高同型半胱氨酸血症(HHcy)是其独立危险因素。内皮细胞(ECs)和血管平滑肌细胞(VSMCs)是 HHcy 致 AS 形成的基本细胞类型,但两者的病理变化却截然相反:ECs 主要表现为凋亡、损伤和功能障碍;而 VSMCs 则主要表现为增殖、基质合成和分泌亢进;有研究提示 E2F1 可因修饰位点不同而分别调控细胞的凋亡和增殖,是决定细胞增殖或凋亡的“开关”,但其在 Hcy 致 ECs 凋亡和 VSMCs 增殖并存中的具体作用未见报道。

【设计思路】 E2F1 是既能促增殖亦能促凋亡的关键靶基因, Hcy 经 PRMTs 修饰 E2F1 不同位点导致血管 ECs 凋亡和 VSMCs 增殖并存从而引起 As。

【实验内容】 复制 HHcy AS 模型,验证模型是否成功;分析血管组织中 ECs 凋亡和 VSMCs 增殖的变化,并在体外培养 ECs 和 VSMCs 上验证;检测 E2F1 在血管和两种细胞中的表达,在 HHcy 致 ApoE^{-/-} 鼠 AS 模型和 ECs/VSMCs 共培养的基础上确定 E2F1 在 Hcy 致 ECs 凋亡和 VSMCs 增殖并存中的作用。分别在 ECs 和 VSMCs 及共培养的细胞内过表达和沉默 PRMTs,检测 E2F1 修饰后产物的变化,并以流式细胞术等观察 ECs 凋亡和 VSMCs 增殖情况,探讨不同细胞类型中 E2F1 精氨酸甲基化的作用及调控机制。

【材料】 ApoE^{-/-} 鼠;核酸提取试剂盒;细胞培养系统;限制性内切酶;DNA 甲基化试剂盒;PCR 试剂盒;PCR 仪;高速冷冻离心机;恒温摇床紫外凝胶成像系统;琼脂糖电泳系统等。

【可行性】 本课题经导师组老师仔细论证并完成了一部分实验,证实研究方案具有较高的可行性;本课题依托我校心脑血管疾病实验室,该室主要从事表观遗传学修饰在 Hcy 致 AS 作用机制研究,研究经验丰富,实验技术成熟稳定,具备本课题所需的平台和设备;课题组成员作为生物技术班的学生,已在实验室工作了一年时间,为本课题的顺利实施提供保障。

【创新性】 首次揭示以“Hcy 经 PRMTs 调控 E2F1 精氨酸甲基化修饰致 ECs 凋亡和 VSMCs 增殖中的潜在差异”为核心的基因表达调控通路。

关键词: 同型半胱氨酸;PRMTs;内皮细胞凋亡;平滑肌细胞增殖;共培养

B-S2-29

阻断 STAT3 调控 Th17/Treg 平衡抑制免疫性肝损伤的实验研究

李晨雨¹, 王十锦², 张婧雯¹, 王 丽², 李廷翠¹, 王建伟¹; 指导教师: 张 蓓

1. 青岛大学 2011 级临床医学;

2. 青岛大学 2010 级临床医学

【立论依据】 肝病临床难治,关键在于免疫应答不力。肝损伤程度与免疫调控密切相关,近年来发现的 Th17/Treg 细胞失衡,可参与多种疾病的发生发展,但在肝损伤的研究甚少。调节 Th17 增殖和功能的关键是转录激活因子 STAT3。研究发现,一种去乙酰酶抑制剂 LBH589 可以阻断 STAT3,引起 Th17/Treg 细胞变化。

【设计思路】 本实验拟建立免疫性肝损伤模型,从细胞、蛋白、基因水平对 Th17、Treg 细胞数量及功能进行评估,探究 Th17/Treg 细胞失衡与肝损伤的相关性及机制。并采用 LBH589 分别从体内、体外观测免疫调控效果。

【实验内容】 Wistar 大鼠随机分为两组。尾静脉注射 ConA 建立模型组(CC),PBS 注射建立对照组(HC)。CC 组自第六周始腹腔注射 LBH589(乙组),甲组注射 PBS 至建模结束,血清学肝功能检测及肝脏病理分析确定建模成功。取外周取血检测 TIMP-1、HA 水平。取 PBMC 体外细胞培养,用不同浓度 LBH589 处理(G2、G3),PBS 处理作为对照组(G1),ELISA 检测上清液 IL-17、IL-6 等相关细胞因子的含量。FCM 检测 Th17 细胞和 Treg 细胞频率变化,计算 Th17/Treg 比值;免疫组织化学法检测 Foxp3、ROR γ t 蛋白表达情况;ELISA 法检测外周血 IL-17、IL-6 等相关细胞因子。

【材料】 健康的雄性 wistar 大鼠、流式细胞仪、conA(白色冻干粉)、OLYMPUS400 自动生化仪,免疫组化试剂、ELISA 反应试剂盒、TIMP-1 单克隆抗体试剂盒、DMSO 溶剂、大鼠透明质酸 ELISA 试剂盒、96 孔培养板。

【可行性】 课题思路逻辑、合理、创新,前期预结果良好。具备该课题实施所需的人员素质和实验环境。课题指导教师多年来致力于肝病的免疫学研究,并取得一定成果。所属实验室为山东省十二五重点实验室,国家级实验与教学示范中心,具有完善的实验科研环境。

【创新性】 肝病临床难治,关键在于机制不清。本课题首次提出把各细胞亚群的网络平衡学说应用于疾病的研究,认为肝病的发展演变,关键在于 Th17/Treg 细胞亚群的失衡,为肝病发生发展机制提供了理论依据。并通过阻断 STAT3 免疫调控 Th17/Treg 细胞平衡状态,以期肝脏损害发生改变,从而达到抑制病情的治疗目的,为其临床治疗提供新的线索。

关键词: Th17 细胞; Treg 细胞; STAT3; 肝损伤

B-S2-30

用 Substrate Trapping 对 PP2C 家族未知底物的探究

王闻博¹, 刘宏达², 李康帅³, 屈昌秀⁴, 潘畅⁵; 指导教师: 孙金鹏

1. 山东大学 2010 级临床医学七年制
2. 山东大学 2009 级齐鲁医学班
3. 山东大学 2010 级齐鲁医学班
4. 山东大学 2013 级研究生
5. 山东大学 2006 级齐鲁医学班

【立论依据】 蛋白质磷酸化是细胞信号转导的重要调控机制,由蛋白磷酸酶和蛋白激酶协同调控。人体内由 100 多个酪氨酸磷酸酶和近 40 个丝氨酸/苏氨酸磷酸酶完成大约 2 万 5 千个蛋白的去磷酸化反应,其磷酸酶与底物的作用机制及其选择性是细胞信号转导的核心问题之一。丝氨酸/苏氨酸磷酸酶有十分重要的作用,而许多底物仍然未知,所以我们主要研究此类磷酸酶。PPM1A 是金属离子依赖性蛋白磷酸酶,属于丝氨酸/苏氨酸磷酸酶中的 PP2C 家族,目前已经有人对其进行了一些研究,因此我们将 PPM1A 作为本课题的切入点。

【设计思路】 首先,本课题将对 PPM1A 的催化机制及底物特异性进行研究。然后,基于对 PPM1A 催化机理的阐明,本课题将发明一种全新的底物陷阱技术——substrate trapping,从而为整个 PP2C 磷酸酶家族底物的阐明带来革命性的变化。我们将利用这种新发展的底物陷阱技术,发现重要的 PP2C 磷酸酶家族成员,如 PPM1D 和 PPM1G 的未知底物。Substrate trapping 是一种发现酶的未知底物的新方法。由于酶与底物反应迅速,没有充足的时间捕捉底物的信息,而酶的“陷阱突变体”可以结合底物但不水解底物,即底物亲和力、底物特异性不变,但催化活性降低,从而可以帮助我们找到未知底物。

【实验内容】 (1)构建 PPM1A 的不同突变体,用小分子底物 pNPP 和短肽分别进行酶学分析,找到 trapping mutant;(2)GST pull down 验证找到的突变体的可行性;(3)将 PPM1A 的研究方法推广到 PPM1D 和 PPM1G,进