

A-S2-5

糖基因 ST8SIA 家族在人慢性粒细胞白血病多药耐药中的作用

李宏帅¹, 张轶男¹, 潘 璆¹, 斯艳君¹, 陈丽惠¹, 季淑婷²; 指导教师: 贾 莉

1. 大连医科大学 2011 级医学检验

2. 大连医科大学 2012 级医学检验

【目的】 通过研究糖基因 ST8SIA 家族在人慢性粒细胞白血病(CML)细胞株 KCL22 及其耐阿霉素细胞株 KCL22/ADR、CML 患者骨髓单个核细胞(BMMC)中表达的差异,明确糖基因 ST8SIA 家族与人 CML 多药耐药的相关性,为白血病耐药提供新的治疗策略和靶点。

【方法】 采用质谱技术检测 KCL22 及 KCL22/ADR 细胞表面 N-糖链的组成差异;采用 real-time PCR 和蛋白质印迹法检测 ST8SIA 家族在人 CML 及其耐药细胞株、CML 患者(28 例)及 CML 耐药患者(48 例)BMMC 中的表达;通过 RNA 干扰技术特异性下调差异表达的糖基因,检测干扰前后 CML 细胞在体内、体外对化疗药物的敏感性、PI3K/Akt 信号通路的激活情况及 P-gp、MRP1 的表达情况;特异性 PI3K/Akt 信号通路抑制剂 LY294002 和 Akt shRNA 分别作用于 KCL22/ADR 细胞,检测抑制前后该细胞体内、体外对化疗药物的敏感性。

【结果】 KCL22 和 KCL22/ADR 细胞膜表面 N-糖链的组成、唾液酸具有显著差异;ST8SIA4 和 ST8SIA6 在人 CML 及其耐药细胞株、CML 患者 BMMC 中表达具有显著差异;特异性下调 ST8SIA4 或 ST8SIA6 的表达,改变 KCL22/ADR 和 KCL22 细胞体内、体外的药物敏感性、PI3K/Akt 信号通路分子和 P-gp、MRP1 表达;KCL22/ADR 细胞经 LY294002 和 Akt shRNA 分别作用后,PI3K/Akt 主要信号通路分子表达水平降低,同时该细胞的药物敏感性也增强($P < 0.05$)。

【结论】 人 CML 细胞株及 CML 患者 BMMC 中 ST8SIA 家族的表达具有显著差异,这些特征性改变与 CML 多药耐药具有相关性;CML 多药耐药性可能是通过 ST8SIA4、ST8SIA6 介导 PI3K/Akt 信号通路调控 P-gp、MRP1 的表达改变实现的。

关键词: 糖基因;ST8SIA 家族;多药耐药;PI3K/Akt 信号通路

A-S2-6

年龄相关性血清外泌体 microRNA let-7e、mir-101-3p 及 mir-107 在阿尔兹海默病发生中的作用及其机制研究

张鸣科¹, 徐 辰²; 指导教师: 王 越

1. 第二军医大学 2012 级临床医学五年制

2. 第二军医大学 2011 级研究生

【目的】 通过系统性筛选阿尔兹海默病(AD)患者发生相关的血清外泌体相关 microRNA 及其靶基因的相关研究,提示 AD 新的发病机制,并为 AD 的早期诊断和病程预测提供新的候选指标。

【方法】 通过高通量测序芯片数据比对 AD 患者和正常人的脑脊液和血清中的 miRNA 表达谱,获取在 AD 患者的脑脊液和血清中共同下调的一组 miRNA;同时通过生物信息学预测靶向 AD 的相关致病基因 APP、PSEN1、PSEN2 等的 miRNA,取两组共有的 miRNA let-7e、mir-101-3p、mir-107 作为候选基因。通过荧光素酶报告基因实验验证这一组 miRNA 对靶基因的抑制作用,及在人神经母细胞瘤细胞株 SHSY5Y 中转入 miRNA 的抑制剂检测细胞凋亡以验证 miRNA 的功能。通过外泌体富集试剂盒富集 AD 患者、正常人血清、人神经母细胞瘤细胞株 SHSY5Y 培养基中的外泌体,通过 real-time qPCR 检测上述 miRNAs 表达量及其随年龄变化情况。最后利用不同年龄段小鼠动物模型,通过地高辛荧光标记探针进行海马区 miRNAs 的原位杂交分析和小鼠血清外泌体

的 miRNAs 检测,验证外周血与脑组织 miRNA 随年龄改变的相关性。

【结果】 在正常人的血清外泌体中发现 let-7e、mir-101-3p、mir-107 成熟体均随年龄发生显著下调,而且在 AD 患者中这组 miRNA 的表达下调更为显著。不同年龄组正常小鼠脑组织和血清外泌体中 miRNA 的表达量同样随着年龄增加而逐步下调。随后发现在 SHSY5Y 细胞中过表达上述 miRNAs 可以导致 APP、PSEN1、PSEN2 表达发生显著下调,进一步的荧光素酶报告基因分析提示这一组 miRNA 可以直接靶向 APP、PSEN1、PSEN2 的 3'UTR 区域导致其翻译抑制。

【结论】 我们发现脑组织中的一组 miRNA 随着年龄的增加逐渐下调,从而解除对 AD 的相关致病基因的转录后抑制,这可能是 AD 发生的新的分子机制并与疾病进程相关。结果还提示神经元细胞可能通过外泌体释放这一组 miRNA,并可以在患者血清中的外泌体中进行检测,因此有望为 AD 患者早期诊断和病程预测提供新的无创性诊断标志物。

关键词: 阿尔兹海默病;外泌体;miRNA;衰老;诊断标记物

A-S2-7

巨噬细胞 PPAR γ 缺陷抑制凋亡细胞吞噬清除致小鼠伤口愈合延迟

时荣臣;指导教师:张志仁
第三军医大学 2012 级生物技术

【目的】 伤口愈合对损伤组织结构重塑和功能恢复至关重要,巨噬细胞在促进伤口愈合中起重要作用,其功能障碍导致伤口愈合延迟,给患者身心和经济造成沉重负担。但伤口愈合中巨噬细胞功能调控机制目前尚不明确,已知过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ)可通过多种机制调控巨噬细胞功能,但在伤口愈合中巨噬细胞是否表达 PPAR γ 、以及可能如何参与伤口愈合过程并不清楚,我们采用巨噬细胞特异 PPAR γ 敲除小鼠进行了研究。

【方法】 Cre-LoxP 重组酶系统构建巨噬细胞特异 PPAR γ 缺陷小鼠,建立小鼠皮肤切创模型,组织学技术检测伤口愈合、炎症细胞浸润和分子表达定位, RT-PCR、蛋白质印迹和 ELISA 法比较相关分子表达高低,流式细胞术检测细胞凋亡和巨噬细胞对凋亡细胞吞噬。

【结果】 伤口愈合过程中巨噬细胞 PPAR γ 表达上调,提示巨噬细胞 PPAR γ 可能影响伤口愈合;巨噬细胞 PPAR γ 缺陷小鼠伤口愈合延迟,肉芽组织生成、胶原沉积和新生血管减少,并且伤口 TNF- α 表达显著升高;抗 TNF- α 抗体(aTNF- α)局部治疗显著改善巨噬细胞 PPAR γ 缺陷小鼠伤口愈合延迟,提示 TNF- α 升高是导致伤口延迟愈合重要原因;巨噬细胞 PPAR γ 缺陷小鼠伤口中,巨噬细胞 TNF- α 表达显著升高,但体外实验表明 PPAR γ 无直接抑制巨噬细胞分泌 TNF- α 功能;进一步体外实验表明巨噬细胞 PPAR γ 缺陷导致其在吞噬凋亡细胞过程中 TNF- α 表达显著增加,并且对凋亡细胞吞噬能力显著下降,同时体内实验发现巨噬细胞 PPAR γ 缺陷小鼠伤口中巨噬细胞吞噬凋亡细胞功能降低,并且局部凋亡细胞聚集;进一步实验发现巨噬细胞 PPAR γ 缺陷小鼠腹腔和伤口巨噬细胞吞噬相关分子表达显著降低;而采用 PPAR γ 激动剂可促进小鼠伤口愈合、降低伤口凋亡细胞聚集和局部 TNF- α 水平。

【结论】 巨噬细胞 PPAR γ 可通过促进伤口凋亡细胞吞噬清除,降低局部 TNF- α 水平,而调控伤口愈合过程。PPAR γ 激动剂可显著促进伤口愈合,PPAR γ 可望成为促伤口愈合的重要靶点。

关键词: 伤口愈合;巨噬细胞;过氧化物酶体增殖物激活受体 γ ;吞噬;肿瘤坏死因子 α ;PPAR γ 激动剂