

【结果】 高浓度血清条件培养基能诱导 BMSC 增殖与分化。与对照组相比较,诱导后 BMSC 表达的 Insulin、和 PDX-1 mRNA 随血清浓度升高变化而显著性上调($P<0.05$);Nestin mRNA 随血清浓度升高变化而显著性下调($P<0.05$)。免疫荧光检测显示,与 1 周刺激诱导时间相比较,BMSC 表达 Insulin 和 PDX-1 蛋白在 2 周时表达显著性增强;Nestin 蛋白在 2 周时显著性下降。

【结论】 高浓度血清条件培养基能促进大鼠 BMSC 表达胰岛相关基因 Insulin、PDX-1 和 Nestin,并随着刺激诱导时间延长而发生不同的调节变化,提示 BMSC 能在不同微环境条件刺激下向胰岛样细胞(胰岛 β 样细胞)分化,为糖尿病治疗采用干细胞途径提供资料。

关键词: BMSC; beta 细胞; Insulin; PDX-1; Nestin; 糖尿病

A-S2-14

自然流产小鼠母胎界面 SOCS 蛋白表达及寿胎丸对其干预作用

谷旭宇¹, 张卫¹, 林政桦¹, 陈佳芳²; 指导教师: 刘慧萍, 李玲

1. 湖南中医药大学 2011 级临床医学
2. 湖南中医药大学 2012 级中医七年制

【目的】 探讨寿胎丸对反复自然流产小鼠母胎界面 SOCS1 和 SOCS3 蛋白表达的影响,研究其治疗反复自然流产的分子生物学机制。

【方法】 设立正常妊娠组与自然流产模型组,并将自然流产模型小鼠随机分为 4 组,分别为模型组、寿胎丸低剂量组、寿胎丸中剂量组、寿胎丸高剂量组。应用免疫组化法和蛋白质印迹法分别检测孕 14 d 后各组蜕膜与胎盘组织 SOCS1 和 SOCS3 蛋白的表达。

【结果】 与模型组比较,寿胎丸低、中、高剂量组均可降低反复自然流产小鼠母胎界面 SOCS1 蛋白的表达,差异具有统计学意义($P<0.01$),与正常妊娠组比较,差异无统计学意义($P>0.05$);寿胎丸中、高剂量组可升高反复自然流产小鼠母胎界面 SOCS3 蛋白的表达,差异具有统计学意义($P<0.01$),高剂量组与正常妊娠组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。

【结论】 寿胎丸可能通过降低小鼠母胎界面 SOCS1 蛋白表达及提高 SOCS3 蛋白表达,进而调控 Th1 细胞向 Th2 方向分化,以达到治疗反复自然流产的目的。

关键词: 寿胎丸; 反复自然流产; 母胎界面; SOCS

A-S2-15

中国汉族人群特有的 LRRK2 基因 R1628P 多态性突变在帕金森病中的致病性及机理研究

汪佳晨, 王正刚, 李舒羽; 指导教师: 田波

华中科技大学同济医学院 2012 级临床医学五年制

【目的】 LRRK2 基因的多个单核苷酸多态性(SNP)位点与帕金森病(PD)密切相关,且具有明显的人种特异性,如 G2019S 只高发于白种人,亚洲人鲜见;而 G2385R 仅发现于亚洲人种。本研究对特发于中国汉族人的 R1628P 在汉族人群中的特异性分布、不同亚群中的危险性及其在 PD 发病中的分子机理进行深入研究。

【方法】 统计学方法:文献筛选搜索全部 R1628P 和 PD 临床随机对照研究;应用 Revman 5.0 及 Stata 软件,对 R1628P 突变在汉族及非汉族人群中的分布情况及不同汉族人亚群的危险性进行荟萃分析。(1)生物信息学方

法:应用 PhosphoSNP 2.0、Scansite 3 及 GPS 2.1 软件对 R1628P 位点进行分析,预测 R1628P 突变导致其相邻 S1627 位点成为与 PD 发病密切相关的 CDK5 磷酸化靶点的可能性。(2)细胞与分子生物学方法:野生型 LRRK2 和 R1628P 突变体,单独或与 CDK5 联合转染至细胞,免疫沉淀 LRRK2 蛋白,观察 LRRK2 与 CDK5 结合能力,并应用体外激酶实验检测 LRRK2 激酶活性;再将其质粒转染至原代培养神经元中,应用单细胞计数检测 H_2O_2 处理后神经元死亡情况。

【结果】 通过荟萃分析,R1628P 在汉族人群及非汉族人群中呈现典型的差异性分布,为中国汉族人群所特有,且 R1628P 在不同汉族人亚群中的致病危险度具有明显差别。(1)生物信息学方法提示 R1628P 突变导致其相邻 S1627 位点成为 CDK5 潜在的磷酸化靶点,是典型的磷酸化相关 SNP 的 Type II(+)位点。(2)细胞与分子生物学方法证实 LRRK2 的 R1628P 位点突变增强 LRRK2 与 CDK5 蛋白的结合能力;与野生型 LRRK2 相比,R1628P 突变体的激酶活性无明显上调,但与 CDK5 共转可显著上调 R1628P 突变体的激酶活性,并且转染 R1628P 突变体的神经元对损伤更敏感;但 CDK5 敲除小鼠神经元中转染野生型及 R1628P 突变体的神经元无差别。

【结论】 本研究证实 LRRK2 基因的 R1628P 多态性在汉族人群及非汉族人群中呈现典型的差异性分布,为中国汉族人群所特有,并在不同汉族人亚群中的致病危险度具有明显差别;R1628P 的致病分子机理为:R1628P 突变导致其相邻 S1627 位点成为 CDK5 潜在的磷酸化靶点,在老年应激导致的 CDK5 活性上调时,R1628P 突变提供 CDK5“二次打击”的靶点,加速 PD 发病。本研究为探索 PD 发病分子机制提供新的研究线索,同时为治疗 PD 提供新的药物靶点。

关键词: R1628P 突变;CDK5;PhosSNP;帕金森病

A-S2-16

突变亨廷顿蛋白通过裂解钙反应性反式激活子 CREST 产生细胞毒性

赵黎明¹,漆艺玮²,丁胜男²,龙雪峰²;指导教师:李和,彭挺

1. 华中科技大学同济医学院 2010 级临床医学八年制

2. 华中科技大学同济医学院 2011 级临床医学八年制

【目的】 亨廷顿病(HD)基因突变后编码的突变亨廷顿蛋白(mHtt)通过干扰神经元的细胞周期,造成神经元死亡;钙反应性反式激活子(CREST)可促进神经元分化发育。本项目研究 mHtt 是否通过影响 CREST 而产生细胞毒性。

【方法】 应用免疫印迹、RT-PCR 检测 HD 转基因小鼠(R6/2 小鼠)和转染表达 mHtt 的小鼠成神经瘤细胞(N2a 细胞)中 CREST 的蛋白和 mRNA 水平,应用生物信息学方法和缺失突变实验分析检测 CREST 中可能酶解位点,应用台盼蓝和 PI 染色检测细胞活力,以无血清培养进行神经细胞分化诱导,以 N2a 细胞突起生长长度反映其分化能力。

【结果】 在 HD 转基因小鼠大脑皮质、纹状体、海马内及转染表达 mHtt 的 N2a 细胞内,CREST 蛋白水平明显降低,但其 mRNA 水平无显著改变,提示 mHtt 不影响 CREST 的转录表达,但可引起 CREST 翻译后水平的改变。在全长 CREST(55 kDa)蛋白水平降低的同时,一个分子量在 35 kDa 左右的 CREST 裂解片段水平显著增加。生物信息学分析发现,CREST 分子中不存在半胱氨酸蛋白酶(caspase)酶切位点,但存在多个可能的钙蛋白酶(calpain)酶切位点。在表达 mHtt 的 N2a 细胞用 calpain 活性抑制剂 calpeptin 处理后,35 kDa-CREST 片段的产生减少,而全长 CREST 水平的降低被抑制。分别用 HA 和 Flag 标签对全长 CREST 蛋白的氨基端和羧基端进行标记,构建了 HA-CREST-flag 质粒,与表达 mHtt 的质粒共转 N2a 细胞后,发现 35 kDa-CREST 片段可以被 Flag 抗体检测到,而不能被 HA 抗体检测到;缺失 132-139aa 的 CREST 在表达 mHtt 的细胞中产生与对照细胞水平相近