

A-S2-32

模拟日光 UVB 辐射经 DNA 甲基化诱导人皮肤 HaCaT 细胞恶性转化

田琦,董新航,张英超,陈园婧;指导教师:韩彦弢,阎春玲

青岛大学医学院 2011 级临床医学五年制

【目的】 建立模拟日光 UVB 辐射诱导的人 HaCaT 细胞恶性转化的模型,从 P16 和 RASSF1A 基因甲基化和 GADD45 α 、DNMTs 蛋白表达的角度,研究模拟日光 UVB 辐射诱导的人 HaCaT 细胞恶性转化的分子机制。

【方法】 CCK8 法确定模拟日光 UVB 辐射诱导的 HaCaT 细胞恶性转化的单次辐射剂量;Gimsa 染色从细胞形态角度初步确立模拟日光 UVB 辐射诱导的 HaCaT 细胞恶性转化的终点;软琼脂克隆形成实验、明胶酶谱法检测 MMP-9 蛋白酶的分泌确立 UVB 辐射诱导人 HaCaT 细胞恶性转化模型的成功建立。实验设计分为 2 组:正常对照组、模拟日光 UVB 模型组。RT-PCR 检测甲基转移酶 DNMTs(DNMT1、DNMT3a、DNMT3b)mRNA 的经时表达;蛋白质印迹法检测 GADD45 α 、DNMT3b、P16 及 RASSF1A 蛋白经时表达。高分辨率溶解曲线(MS-HRM)检测 P16、RASSF1A 基因甲基化程度的经时改变。收集每 4 次辐射后的结果进行讨论。

【结果】 UVB 单次辐射剂量 10 mJ/cm² × 20 次,成功建立模拟日光 UVB 辐射诱导的人 HaCaT 细胞恶性转化模型;首次通过 (DNMT1、DNMT3a、DNMT3b)mRNA 的经时表达证实模拟日光 UVB 辐射诱导的人 HaCaT 细胞中 DNMT1 和 DNMT3a 的表达量与 UVB 辐射前相比无统计学差异,而 DNMT3b 的 mRNA 和蛋白的表达与辐射前相比随辐射次数增加逐渐升高,辐射 20 次后其表达量达到高峰($P < 0.05$);GADD45 α 蛋白的经时变化显示 UVB 辐射 4 次时即可检测到其表达量达到高峰,随后其表达量随辐射次数增加逐渐下降,辐射 20 次后其蛋白表达达到低谷($P < 0.05$);P16 和 RASSF1A 蛋白的经时变化显示随 UVB 辐射次数增加其蛋白表达量逐渐下降,UVB 辐射 20 次后 P16 和 RASSF1A 蛋白表达达到低谷($P < 0.05$)。

【结论】 在国际上首次建立模拟日光 UVB 辐射诱导的人 HaCaT 细胞恶性转化模型,揭示 P16 和 RASSF1A 基因的高甲基化与 HaCaT 细胞恶性转化密切相关,并且是 DNMT3b 和 GADD45 α 参与调控 P16 和 RASSF1A 基因的高甲基化,而不是 DNMT1 和 DNMT3a。

关键词: 紫外线 B;恶性转化;GADD45 α ;DNA 甲基化;DNMTs

A-S2-33

人胚胎干细胞诱导分化角膜内皮细胞

孙琳;指导教师:吴欣怡

山东大学 2010 级临床医学八年制

【目的】 体外模拟角膜内皮细胞(corneal endothelial cell, CEC)的发育过程,利用生长因子和细胞外基质构建微环境,制备适当的条件培养基诱导人胚胎干细胞(human embryonic stem cell, hESC)分化为 CEC。

【方法】 用丝裂霉素 C 处理胚鼠成纤维细胞(mouse embryonic fibroblasts, MEFs),接种于明胶预包被培养皿内做饲养层细胞。hESCs 接种于 MEFs 饲养层,传代并免疫荧光鉴定。分割 hESCs 克隆团块,用拟胚体(embryonic bodies, EBs)培养基悬浮培养形成球形的 EBs。用丝裂霉素 C 处理角膜基质细胞,接种于明胶预包被培养皿内做饲养层细胞。EBs 接种于膜基质细胞饲养层,将 SV-40 转染的人晶状体上皮细胞接种于 transwell 小室与 EBs 共培养,EBs 逐渐分化形成类角膜内皮细胞。环钻钻取新鲜猪眼球中央角膜片,脱细胞处理后,机械切取脱细胞猪角膜基质(acellular porcine cornea matrix, APCM),即获得 APCM 支架。倒置显微镜下剖切 APCM 后板层,甘油脱水。将 hESCs 来源的类角膜内皮细胞接种于 APCM 后弹力层表面构建 CEC 植片,培养 7 d。

【结果】 hESCs 培养 6 d 后可于饲养层上形成类圆形克隆团,在悬浮培养基中悬浮培养形成 EBs。EBs 于角膜基质成纤维细胞饲养层上与人晶状体上皮细胞系共培养,EB 面积逐渐增大,中央部分形态发生变化,形成单层排列的多边形细胞。免疫荧光检测,可表达类角膜内皮细胞标记物 Na^+/K^+ ATPase。类角膜内皮细胞接种于 APCM 支架培养,H-E 染色证实后弹力层表面形成单层类角膜细胞结构。

【结论】 目前已经完成了 hESC、人角膜基质成纤维细胞和人晶状体上皮细胞系的培养。实现了 hESCs 向角膜内皮细胞的诱导分化。完成了 APCM 的制备和鉴定。并成功以 hESC 和 APCM 构建了组织工程角膜内皮植片。植片的功能有待动物实验进一步研究。

关键词: 人胚胎干细胞;角膜内皮细胞;分化

A-S2-34

基于 DBP 的脑血栓患者阿司匹林用药前后蛋白质组学研究

李宗泽¹,李子全²,王苗苗¹,马永琛³;指导教师:刘师莲

1. 山东大学 2010 级临床医学五年制
2. 山东大学 2009 级临床医学五年制
3. 山东大学 2009 级临床医学七年制

【目的】 寻找并鉴定脑血栓患者阿司匹林用药前后差异表达的血浆特异蛋白,探讨阿司匹林与维生素 D 结合蛋白(Vitamin D binding protein, DBP)相互作用进而预防血栓形成的详细机制,筛选与 DBP 清除血栓作用相关的候选蛋白,形成网络级联。

【方法】 于潍坊市益都中心医院获取初发脑血栓患者血浆样本 18 例[男性 9 例,女性 9 例,平均年龄(58.11±7.95)岁]。将 18 例患者随机分为 3 组(性别、年龄相匹配),分别混合 3 组用药前后血浆样本,构建 6 组样品池。针对样品池进行蛋白质提取及定量后,行固相 PH 双向凝胶电泳(2-DE)。运用 ImageMaster 2D Elite 6.0 软件比对用药前后 2-DE 图谱,基于蛋白质点灰度与体积变化,选取差异表达蛋白质点进行基质辅助激光解析电离化飞行时间质谱法(MALDI-TOF/MS)和串联质谱法(MS/MS)分析以鉴定蛋白质,并对差异蛋白应用 IPA(Ingenuity Pathway Analysis)软件构建生物信号网络图谱。运用蛋白质印迹法验证用药前后血浆中 DBP 和肌动蛋白(actin)的表达差异。应用免疫共沉淀法验证 DBP 与 actin 相互作用。

【结果】 针对考马斯亮蓝染色得到的 2-DE 图谱,ImageMaster 2D Elite 6.0 软件共筛选出 1 256 个蛋白点,其中 228 个具有表达量的差异。筛选差异超过 1.5 倍的 30 个蛋白质点进行质谱分析得到 28 项检测结果(比对概率分数大于 55 分的结果有意义),包括 DBP 及与 DBP 作用相关联的 11 种差异蛋白:actin、结合珠蛋白、Fibrinogen gamma chain 等。蛋白质印迹结果发现,DBP 用药后(114.04±16.69)较用药前(66.33±5.61)表达显著上调,actin 则由(185.39±3.09)下调至(99.34±10.65)(两者 P 均 <0.01),与 2-DE 结果相一致。免疫共沉淀结果证实 DBP 与 actin 可直接作用,形成复合物。

【结论】 脑血栓疾病具有发病率高、致残率高、死亡率高的特点,本实验采用临床样本,针对阿司匹林与 DBP 在预防血栓形成作用机制中的争论点,首次在中枢系统发现阿司匹林与 DBP 存在相互作用,使 DBP 表达上调,从而结合血浆 actin 防止其进一步聚合,发挥预防血栓形成的作用,DBP 可作为预防心脑血管血栓性疾病的靶点应用于临床实验与治疗。此外,本实验筛选出 DBP 作用相关蛋白质,通过 IPA 显示 Fibrinogen gamma chain 与 AT-III 作用直接相关,可为阿司匹林预防和治疗血栓形成提供作用靶点。

关键词: 阿司匹林(乙酰水杨酸);脑血栓;DBP;血浆蛋白质组学