

A-S4-2

抑制白血病细胞活性的 miRNA 的发现及作用机制研究

卜一凡;指导教师:杨宝学
北京大学医学部 2010 级临床医学

【目的】 白血病是一类造血系统恶性肿瘤,严重威胁人类健康。临床上可使用“注射用核糖核酸Ⅱ”对白血病患者进行辅助治疗。该药是一种提取自牛胰腺的小分子 RNA 和多肽的混合物,但作用机制不清。本研究目的是通过 miRNA 芯片及生物信息学筛选,发现“注射用核糖核酸Ⅱ”中可能存在的具有抑制白血病细胞活性的 miRNA,并研究其作用机制。

【方法】 应用 microarray 技术分析“注射用核糖核酸Ⅱ”药物中含有的人源 miRNA。利用生物信息学技术和相关数据库预测其靶基因。通过 Gene Ontology 对靶基因进行功能富集。利用 DAVID 数据库进行 KEGG 信号转导通路富集分析进一步筛选出候选 miRNA。利用 CCK-8 细胞活性检测试剂盒确定所选 miRNA 对白血病细胞生长的抑制作用。蛋白质印迹技术检测其相关靶蛋白的表达水平。用人外周血单个核细胞分离液分离 CML 及 AML 患者外周血白细胞并进行原代培养。CCK-8 细胞活性检测试剂盒确定所筛选的 miRNA 对白血病原代细胞生长的抑制作用。

【结果】 应用 microarray 技术,从“注射用核糖核酸Ⅱ”药物中共检出 23 个人源 miRNA。利用 PicTar、miRanda 和 TargetScanS 等数据库进行靶基因预测,筛选出了 5 个 miRNA:miR-320a、let-7b、miR-Ⅱ、miR-494 和 miR-335。利用 Cytoscape 软件及其插件 BiNGO 对上述 miRNA 的靶基因进行了功能富集分析。DAVID 工具进行了 KEGG 信号通路富集分析,最终选择了 miR-Ⅱ 进行进一步研究。miR-Ⅱ 靶基因大多富集于转录因子调控、细胞凋亡、细胞增殖等信号通路。疾病信号通路主要富集于以慢性髓系白血病、急性髓系白血病、胰腺癌为代表的多种癌症,在各条信号通路中主要负责调控 RAS、CyclinD、TGF-β 等重要分子的表达。3 种白血病细胞系(L1210、MEL 和 K562)体外实验显示,直接给予人工合成的 miR-Ⅱ mimics 自 50 nmol/L 起就可抑制白血病细胞活性,抑制率最高可达 70%左右(300 nmol/L)且具有明显的剂量依赖效应。miR-Ⅱ 对两种胰腺癌细胞系(PANC-1、AsPC-1)和一种正常细胞系(MDCK)无显著细胞毒性。AML(2 位)、CML(1 位)患者原代白血病细胞体外实验中,miR-Ⅱ 具有一定的抑制白血病细胞活性的趋势。

【结论】 我们从 microarray 筛选获得的 23 种 miRNA 中,利用生物信息学方法确定出 1 种人源 miRNA:miR-Ⅱ,体外实验证实 miR-Ⅱ 对多种白血病细胞系具有显著抑制作用,但对胰腺癌细胞系和正常细胞无明显细胞毒性。实验结果表明 miR-Ⅱ 对原代白血病细胞具有一定的抑制细胞活性的趋势,具体作用机制有待进一步研究。本研究对治疗白血病 miRNA 的研发具有重要意义。

关键词: 白血病;miRNA;生物信息学

A-S4-3

细胞表面 α2,6-唾液酸在肝癌细胞粘附中的作用及机制研究

韦安稳,武 强,朱晓玲;指导教师:汪淑晶
大连医科大学 2011 级临床医学

【目的】 分析比较细胞表面不同连接方式的唾液酸在小鼠肝癌高淋巴道转移细胞株 Hca-F 和低淋巴道转移细胞株 Hca-P 中的表达,并研究差异性表达的 α2,6-唾液酸在肝癌细胞淋巴结黏附行为中的作用及分子机制。

【方法】 利用免疫细胞化学、流式细胞技术,分析肝癌细胞表面不同连接方式的唾液酸在 Hca-F 和 Hca-P 中的表达差异;通过 RNA 干扰技术干预差异表达的唾液酸转移酶,并使用 RT-PCR、蛋白质印迹及 Lectin-blot 方法

检测其干扰效果;利用细胞黏附实验和凝集素阻断实验,检测干扰前后、阻断前后 Hca-F 细胞黏附能力的变化;利用 FAK 信号通路特异性抑制剂,探讨 $\alpha 2,6$ -唾液酸介导肝癌细胞黏附行为的分子机制。

【结果】 $\alpha 2,6$ -唾液酸在小鼠肝癌高、低转移细胞株中表达具有显著差异,而 $\alpha 2,3$ -唾液酸的表达无显著差异;当通过 RNA 干扰技术特异性使 Hca-F 细胞中 ST6Gal-I 表达下调时,其细胞表面 $\alpha 2,6$ -唾液酸表达减少,削弱 Hca-F 细胞对淋巴结的黏附能力降低。此外,ST6Gal-I 表达下调可抑制 p-FAK 及下游 p-paxillin 蛋白分子的表达。

【结论】 细胞表面 $\alpha 2,6$ -唾液酸可通过 FAK 信号转导通路正性介导肝癌细胞的黏附行为,为肝癌的治疗提供新的靶点。

关键词:唾液酸;唾液酸转移酶;肝癌;FAK;淋巴结黏附

A-S4-4

DMSO 处理的 Hepa1-6 细胞诱导小鼠建立肝癌特异性免疫及其机制研究

蒋政宇;指导教师:朱海英
第二军医大学 2011 级麻醉学

【实验背景】 肿瘤疫苗在近几年的飞速发展为临床的肿瘤生物治疗提供了新的思路。我们在前期研究中,偶然发现了 DMSO 处理 Hepa1-6 细胞不但能抑制细胞的增殖,而且将经过 DMSO 处理小鼠肝癌细胞 Hepa1-6 (D-hep 细胞)接种于 C57BL/6J 小鼠皮下后,肿瘤出现先生长后消退的现象,而且在消退小鼠皮下再次接种 Hepa1-6 时,无肿瘤形成。这一现象提示,经过 DMSO 处理后的 Hepa1-6 细胞可以诱导小鼠建立肿瘤特异性免疫,用 DMSO 处理肿瘤细胞可能可以成为制备肿瘤活疫苗的新方法。国内外尚无关于该方法的相关报道。

【实验目的】 证实经 DMSO 处理后的 Hepa1-6 细胞可以诱导小鼠建立肿瘤特异性免疫,并对其相关机制作初步探讨。

【实验方法及结果】 (1)在 C57 小鼠和 NOD/SCID 小鼠皮下分别接种 Hepa1-6 和 D-hep 细胞,证实了 D-hep 细胞在 C57 小鼠皮下先成瘤再消退,而在 NOD/SCID 小鼠皮下肿瘤则持续生长的特性,证明 D-Hep 细胞成瘤特性的改变是由于小鼠免疫系统的参与导致的。(2)在肿瘤消退过程中,以及消退后再次接种 Hepa1-6 后的数个时间点,脾脏细胞中 CD4 和 CD8 阳性的 central memory T 细胞和 effective memory T 细胞比例有明显的上升,同时 NKT 细胞在早期也有明显上升,血清 IFN- γ 检测也显示上升曲线与流式检测结果一致。我们还观察到接种 Hepa1-6 后,相比于野生型 C57 小鼠,接种了 D-hep 细胞的小鼠(D-hep 小鼠)Treg 细胞比例上升缓慢。(3)将接种了 D-hep 小鼠和野生型 C57 小鼠脾脏细胞取出,利用 CFSE 标记脾脏细胞,与 Hepa1-6 细胞和 Hepa1-6 细胞裂解液共培养,发现 CFSE 荧光强度有多峰表现;同时,利用 CCK-8 法检测共培养后的肿瘤细胞活力,发现 D-hep 小鼠组的肿瘤细胞增殖活力明显下降。(4)对 D-hep 细胞和 Hepa1-6 细胞的表达谱芯片进行分析发现,变化数量最多,最为明显的是趋化因子和趋化因子受体一类基因,特别是其中 CCL17 的上升表达,提示了 D-hep 细胞可能通过募集和激活 NKT 细胞和 naïve CTL 细胞增强了抗原提成和免疫识别能力。

【实验结论】 本研究证明了经过 DMSO 处理的 Hepa1-6 细胞具有诱导小鼠建立针对 Hepa1-6 细胞的肿瘤特异性免疫的能力,并阐明了在抗肿瘤免疫过程中,主要由 NKT 细胞和 CD8 阳性 effective memory T 细胞双重介导。本研究在国际上首次发现了基于 DMSO 的一种新的制备肿瘤疫苗的方法,为临床的肿瘤生物治疗提供了新的思路,具有潜在的临床治疗应用价值。