







2019 KUNMING
HSIEN W. & RAY W.

第六届吴宪吴瑞国际学术研讨会 论文集

暨第十一届全国医学生物化学与分子生物学
第八届临床应用生物化学与分子生物学
2019年8月12-15日 中国 昆明

联合学术研讨会

主办单位  医学分子生物学国家重点实验室（中国医学科学院基础医学研究所）
 中国生物化学与分子生物学会 医学生物化学与分子生物学会
临床应用生物化学与分子生物学会

承办单位  中国医学科学院医学生物学研究所
 昆明医科大学
云南省重大传染病疫苗研发重点实验室



**2019 KUNMING
HSIEN W. & RAY W.**

**第六届吴宪吴瑞国际学术研讨会
论文集**

目 录

- 多位点基因打靶与多基因编辑联合干预技术 ----- 唐冬生,严爱芬,朱向星,刘连,冯娟,周宝珠(6)
- LncRNA CRNDE上调ATG4B的分子机制及其促HCC细胞自噬的作用研究**
----- 陈岑曦,孙梁博,李涛,闫小晶,肖翰希,张越婷,连继勤,何凤田(7)
- RNA表观遗传修饰m6A的化学调控** ----- 谢丽君,程靛(8)
- CRISPR/Cas9全基因组文库技术筛选肿瘤细胞增殖和辐射相关基因** ----- 潘冰心,付汉江,郑晓飞(9)
- MicroRNA-590-3p-PPAR γ 通路在ARDS中的作用研究** ----- 朱端,胡建林,胡晨,周向东,戴双双(10)
- STAT3/p53 pathway activation disrupts IFN- β -induced dormancy in tumor-repopulating cells**
----- 吕家迪,程飞冉,刘梦雨,王珍凤,黄波(11)
- Cell softness prevents cytolytic T cell killing of tumor-repopulating cells**
----- 刘玉英,张恬真,李聪,黄波(12)
- Protective effects of miR-122 on high-altitude pulmonary hypertension through regulation
of endogenous CO production** ----- 汤锋,李润乐,廖瑜,格日力(13)
- Hijacking dorsal raphe to improve moods and metabolism via BDNF gene transfer**
----- 修建波,韩荣荣,刘泽玥,刘姝,沈岩,丁玉强,许琪(14)
- Usnic Acid Inhibits Proliferation and Migration Through ATM Mediated DNA Damage Response
in RKO Colorectal Cancer Cell** ----- 吴文兵,苟惠,董婧颖,杨晓龙,赵亚楠,彭恒,陈丹,陈利弘,刘戟(15)
- Metformin mediated microRNA-7 upregulation inhibits growth, migration and invasion of
non-small cell lung cancer A549 cells** ----- 董婧颖,彭恒,杨晓龙,吴文兵,赵亚楠,陈丹,陈利弘,刘戟(16)
- A Novel YAP1/SLC35B4 Regulatory Axis Contributes to Proliferation and Progression
of Gastric Carcinoma** ----- 刘俊,李纪鹏,张瑞(17)
- Methylation of C/EBP α by PRMT1 Inhibits Its Tumor-Suppressive Function in Breast Cancer**
----- 孙文政,张业(18)
- 解旋酶Twinkle两个新型突变位点引发Perrault 综合征的分子机制** ----- 田国帅,张业(19)

- Homocysteine promotes intestinal epithelial barrier dysfunction through DNA hypermethylation in stress-induced IBS rats** ----- 赵云,Liang Zhang,Fang Xie,Xue Wang,Shida Wang,Jing Ma,Lingjia Qian (20)
- lncRNA BC002811慢病毒载体构建及对胃癌HGC-27细胞增殖的影响**
----- 林小聪,张海涛,符伟玉,陈小谊,余华军,兰柳波 (21)
- 氨基酸序列与多肽分子间相互作用:纳米尺度的化学异质性结构对疏水作用的调控机制** -----王晨轩 (22)
- The p53/miRNAs/Ccna2 pathway serves as a novel regulator of cellular senescence: complement of the canonical p53/p21 pathway**
----- 徐舜,吴维佳,黄海姣,黄茹晓,谢罗逸君,苏皓凌,刘爽,袁源,郑慧玲,孙雪荣,熊兴东,刘新光 (23)
- CircG as a competing endogenous RNA participates in the regulation of endothelial cell senescence** ----- 周萌媛,刘东亮,巫伟鹏,闵雪,蔡梦云,徐舜,刘新光,熊兴东 (24)
- RNA m6A甲基化在少突胶质瘤中的作用研究** ----- 马春卉,常梦琪,吕洪义,宋述慧,牛亚梅,佟伟民 (25)
- RNA结合蛋白通过调控关键转录因子的可变剪接影响多能性退出** ----- 王雪,马艳妮,余佳,黄粤 (26)
- GM-CSF敲低及其中和单链抗体分泌的CAR-T细胞的构建** ----- 魏成,陈辉,赵爱,高基民 (27)
- 低质量胶质瘤样本的基因表达分析方法优化** ----- 杨林,常梦琪,王裕,马文斌,牛亚梅,佟伟民 (28)
- Has-miR-196b靶向GATA6调控子宫内膜癌的分子机制研究** ----- 郭珍珍,廖杨优,孙倩男,隋琳琳,孔英 (29)
- 子宫内膜O-GlcNAc糖基化修饰对母胎互作及妊娠的结局影响** ----- 张宏硕,齐佳,李真,孔英 (30)
- OPN在头颈部鳞状细胞癌的作用及其介导增殖、侵袭机制的研究** ----- 于新新,董明,牛卫东,孔英 (31)
- miR-21-5p影响子宫内膜癌细胞增殖、迁移及侵袭机制的研究** ----- 齐佳,张宏硕,王宇飞,孔英 (32)
- O-GlcNAc糖基化修饰影响胚胎发育和子宫容受性建立的研究** ----- 李晓雪,廖杨优,李真,张宏硕,孔英 (33)
- Interference of FE65 RNA expression enhances neurogenesis and spatial working memory following the downregulation of Alzheimer Amyloid Precursor Protein** ----- ShiTao Gong, YaBo Zhao, Ming Zhang (34)

多位点基因打靶与多基因编辑联合干预技术

唐冬生, 严爱芬, 朱向星, 刘连, 冯娟, 周宝珠
佛山科学技术学院医药工程学院

目的: 动物性状特别是多基因性状的改良需要多基因联合干预。针对人类疾病的靶向药物治疗十分有效, 那么针对其靶点的基因干预治疗效果也明显, 因而多基因靶向干预将更加有效。本研究旨在寻找高表达、安全靶位点, 建立高效多基因编辑与联合干预技术。

方法: 寻找高表达、安全靶位点: 将外源基因定点插入到人类细胞的 rDNA 基因间隔序列 (ITS) 和动物体内细胞的 ITS, 检测外源基因的表达稳定性。

建立多位点基因打靶和多基因编辑联合干预技术: 建立以动物 rDNA 基因间 ITS 为靶位点的稳定表达的多位点基因打靶技术, 多位点基因打靶结合锌指核酸酶 (ZFN) 介导的高效基因编辑技术, 结合 CRISPR/Cas9 介导的多基因编辑技术, 结合 TALEN 介导的多基因编辑与多基因联合干预技术, 并对三种基因编辑技术进行比较。

结果: 高表达、安全靶位点: 研究发现插入到 rDNA 基因间隔序列 (ITS) 的外源基因能够随着细胞的分裂稳定遗传给子代细胞, 能够稳定表达, 克服了毒性整合等安全性问题。

建立了多位点基因打靶和多基因编辑联合干预技术: 建立了以 ITS 为靶位点的多位点基因打靶技术, 打靶效率从 10^{-6} 提高到 15%, 结合锌指核酸酶 (ZFN) 介导的基因编辑技术效率提升到 23%, 结合 CRISPR/Cas9 介导的多基因编辑技术效率再提高到 65%, 结合 TALEN 介导的多基因编辑与多基因干预技术效率又提高到 78%, 基因干预效果得到明显提高。

结论: ITS 为基因定点插入的理想位点, 外源基因稳定表达, 克服了毒性整合等安全性问题。ZFN、CRISPR/Cas9、TALEN 介导多基因编辑大大提高了基因定点插入的效率和基因干预效果。

关键词: 多位点, 基因打靶、ZFN、CRISPR/Cas9、TALEN

基金项目: 国家自然科学基金 (81272552)、国家科技重大专项 (2014ZX0801012B)、广东省重点领域研发计划 (2018B020203003)、佛山市科技创新项目计划 (2017AG100111)

* 通讯作者邮箱: tangdsh@fosu.edu.cn, 16607573839

LncRNA CRNDE 上调 ATG4B 的分子机制及其促 HCC 细胞自噬的作用研究

陈岑曦, 孙梁博, 李涛, 闫小晶, 肖翰希, 张越婷, 连继勤, 何凤田
陆军军医大学基础医学院

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 严重威胁人类健康。索拉非尼是首个被批准用于治疗 HCC 的靶向药物, 其虽有较好疗效, 但容易产生耐药。细胞自噬是肿瘤耐药的重要机制之一, 自噬相关蛋白 ATG4B 在其中发挥了关键作用, 因此, 靶向调节 ATG4B 及自噬对于提高 HCC 细胞对索拉非尼的敏感性具有重要意义。已有报道显示, 参与调控 ATG4B 的分子包括酶类、转录因子及其结合蛋白、microRNA、siRNA 及一些化合物等, 而关于长非编码 RNA (lncRNA) 是否参与调控 ATG4B, 目前尚不清楚。近年研究表明, lncRNA CRNDE 可通过调控多条信号通路促进 HCC 细胞的生长与转移, 但其是否参与调控 ATG4B, 目前未见报道。在本研究中, 我们发现, CRNDE 可通过上调 ATG4B 而促进 HCC 细胞自噬, 而 CRNDE 升高 ATG4B 是通过增加 ATG4B mRNA 的稳定性而实现的。进一步研究发现, miR-543 可直接靶向下调 ATG4B, 而 CRNDE 则可通过抑制 miR-543 而升高 ATG4B 的水平, 进而促进 HCC 细胞自噬。药物敏感实验发现, 抑制“CRNDE-ATG4B-自噬”通路可增强 HCC 细胞对索拉非尼的敏感性, 提示该通路可能是增敏索拉非尼抗 HCC 的新靶点。(本研究受 NSFCNSFC31671464、81872024 和 81572375 及重庆市课题 cstc2017jcyjBX0079 资助。通讯作者: 何凤田, hefengtian66@aliyun.com; 连继勤, lianjiqin@sina.com)。

关键词: 长非编码 RNA; CRNDE; ATG4B; 肝细胞癌; 索拉非尼

RNA 表观遗传修饰 m6A 的化学调控

谢丽君, 程靓
中国科学院化学研究所

N6-甲基腺嘌呤 (m6A) 是高等生物 mRNA 和 lncRNAs 上最为普遍的修饰之一, 在基因表达调控中起着重要的作用, 其表达含量的异常与人类疾病或癌症密切相关。通过基因敲除下调相应的甲基化酶、去甲基化酶, 或者筛选能够选择性抑制去甲基化酶的小分子, 在一定程度上可以干预细胞内 m6A 的含量。而发展能够直接作用于 m6A 核苷的化学转化体系, 可以实现在细胞甚至活体水平对 m6A 的原位调控, 具有重要的应用价值, 但相关研究尚属空白。我们 2017 年报道了首例在蓝光照射下, 维生素 B2 选择性促进核苷水平的 m6A 去甲基化研究。实验结果表明, 维生素 B2 作为有效的光催化剂可以将可见光的能量转移到 m6A 上, 通过选择性地激发、活化和氧化 N6- 位的甲基, 经历一系列的氧化中间体 N-羟甲基腺苷 (hm6A)、N-甲酰基腺苷 (f6A)、N-甲酸基腺苷 (ca6A) 最终得到去甲基产物, 从而为后续在细胞水平调控 m6A 的含量奠定了基础 (Chem. Commun. 2017, 53, 10734; 中国专利, 授权公告号: CN 106967068 B, 2019 年 1 月 11 日)。最近, 我们首次成功地实现了化学小分子对 RNA 表观遗传修饰的直接干预——利用化学小分子核黄素单核苷酸 (FMN) 实现了活细胞水平上的 m6A 去甲基化。研究表明, FMN 作为人工去甲基化酶 (Artificial Demethylase), 在氧气的参与下能够有效地作用于核苷、寡核苷酸以及 HeLa 细胞中的 m6A。对照实验表明, FMN 的作用方式是特异性地直接氧化 N6-甲基取代的腺苷 (m6A、m6,6A), 而不是作为甲基化酶的抑制剂或去甲基化酶的激动剂进行调控。此外, FMN 的细胞毒性极小, 在当前的实验条件下, HeLa 细胞活力没有明显的下降。进一步的实验表明, 在甲基化酶 (METTL3) 过表达的细胞中 (293T-pMETTL3), FMN 依然可以有效地降低 m6A 的表达水平。以上结果表明 FMN 及其衍生物可以作为靶向 m6A 修饰的新型小分子抑制剂进行开发, 对深入研究 m6A 的生物学功能、m6A 的测序定位以及治疗由 m6A 过表达引起的生理疾病以及提供了候选化合物 (Angew. Chem. Int. Ed. 2019, 58, 5028)。

CRISPR/Cas9 全基因组文库技术筛选肿瘤细胞增殖和辐射相关基因

潘冰心^{1,2}, 付汉江¹, 郑晓飞¹

1. 军事科学院军事医学研究院辐射医学研究所, 放射生物学北京市重点实验室
2. 安徽医科大学研究生院

CRISPR/Cas9 全基因组文库筛选技术为基因功能研究提供了有力工具。为深入研究肿瘤细胞增殖新功能基因以及细胞辐射损伤修复新机制, 本研究通过在 HCT 116 细胞感染基因组范围的 CRISPR 敲除文库, GeCKO 慢病毒文库, 在全基因组范围筛选与 HCT 116 细胞增殖相关基因; 通过在 HCT 116 细胞感染 GeCKO 慢病毒文库后, 对细胞进行辐射损伤处理, 以筛选出与细胞辐射损伤修复相关基因。通过采用 Illumina 测序平台对各组样品基因组 DNA 进行高通量测序, 并进行数据分析。成功运用 CRISPR/Cas9 敲除文库技术对 HCT116 细胞进行全基因组文库敲除, 筛选得到一批与细胞增殖、辐射损伤修复相关的 mRNA 基因和非编码 RNA 基因, 为进一步阐释这些基因在肿瘤细胞增殖以及抗辐射中的作用奠定了基础。

MicroRNA-590-3p-PPAR γ 通路在 ARDS 中的作用研究

朱端¹, 胡建林¹, 胡晨², 周向东¹, 戴双双³

1. 陆军军医大学第一附属医院 (西南医院)

2. 陆军特色医学中心呼吸内科

3. 陆军军医大学基础医学院生物化学与分子生物学教研室

急性呼吸窘迫综合征 (acute respiratory distress syndrome, ARDS) 是全身严重炎症反应波及肺部所导致的急性呼吸功能不全的危重症, 其病理生理特点为弥漫性肺泡毛细血管及肺泡上皮损伤, 肺容积减少, 肺顺应性降低, 通气 / 血流比例失调, 临床表现为单纯给氧难以纠正的低氧血症。过度炎症反应是 ARDS 的关键病理过程, 巨噬细胞密切参与其中, 如何调控巨噬细胞炎症网络以实现抑制 ARDS 过度炎症反应是基础与临床共同关注的焦点。microRNA-590-3p 和 PPAR γ 均被报道具有重要的炎症调控作用, 但两者在 ARDS 中的作用及相互联系却不清楚。我们在小鼠 ARDS 模型中发现肺组织中 microRNA-590-3p 和 PPAR γ 与正常小鼠比较具有显著差异: microRNA-590-3p 表达明显升高 (3.08 ± 0.97 , $P < 0.05$); PPAR γ 在 mRNA 水平 (0.60 ± 0.23 , $P < 0.05$) 及蛋白水平表达 (0.71 ± 0.12 , $P < 0.05$) 均明显降低, 且两者表达呈负相关 ($r = -0.76$, $P < 0.05$)。在体外 LPS 诱导建立小鼠巨噬细胞 RAW264.7 ARDS 细胞模型中, 该结果也得到印证。这提示两者可能相互关联共同参与巨噬细胞的功能调控进而影响 ARDS 炎症进程。生物信息学分析提示: PPAR γ 3'-UTR 有 microRNA-590-3p 潜在的结合位点。借助荧光素酶报告基因检测证实 microRNA-590-3p 确实能与 PPAR γ 3'-UTR 端结合而调控 PPAR γ 表达。以上结果表明 PPAR γ 是 microRNA-590-3p 的又一靶基因, 通过调控巨噬细胞中 microRNA-590-3p-PPAR γ 通路将有可能对 ARDS 的炎症反应发挥调节作用, 进而影响 ARDS 发生发展进程。(该研究受国家自然科学基金 No.81670070 资助)。

STAT3/p53 pathway activation disrupts IFN- β -induced dormancy in tumor-repopulating cells

吕家迪, 程飞冉, 刘梦雨, 王珍凤, 黄波
中国医学科学院基础学院

Dynamic interaction with the immune system profoundly regulates tumor cell dormancy. However, it is unclear how immunological cues trigger cancer cell-intrinsic signaling pathways for entering into dormancy. Here, we show that IFN- β treatment induced tumor-repopulating cells (TRC) to enter dormancy through an IDO/Kyn/AhR/p27-dependent pathway. Strategies to block this metabolic circuitry did not relieve dormancy, but led to apoptosis of dormant TRCs in murine and human melanoma models. Specifically, blocking AhR redirected IFN- β signaling to STAT3 phosphorylation through both tyrosine and serine sites, which subsequently facilitated STAT3 nuclear translocation and subsequent binding to the p53 promoter in the nucleus. Upregulation of p53 in turn disrupted the pentose phosphate pathway, leading to excessive ROS production and dormant TRC death. Additionally, in melanoma patients, high expression of IFN- β correlated with tumor cell dormancy. Identification of this mechanism for controlling TRC dormancy by IFN- β provides deeper insights into cancer-immune interaction and potential new cancer immunotherapeutic modalities.

Cell softness prevents cytolytic T cell killing of tumor-repopulating cells

刘玉英, 张恬真, 李聪, 黄波
中国医学科学院基础医学研究所

Biomechanics is a fundamental feature of a cell. Whether and how such mechanical feature affects immune evasion of tumor cells remains an enigma. Here we show that although cytotoxic T lymphocytes (CTL) can effectively destroy stiff differentiated tumor cells but fail to kill tumor-repopulating cells (TRC), whose softness effectively impedes the pore formation process by perforin released from CTLs. Mechanistically, perforin interacting with nonmuscle myosin heavy chain 9 transmits forces to fewer F-actins in soft TRCs, thus inducing a weak contractile force which is inappropriate for pore formation by perforin. Stiffening soft TRCs confers perforin the drilling ability, leading to CTLs killing the TRCs, thus achieving a better tumor immunotherapeutic outcome. More importantly, overcoming the mechanical softness also enhances the killing of human TRCs by human CTLs. These findings provide mechanics-based immunotherapeutic strategies with potential clinical applications.

Protective effects of miR-122 on high-altitude pulmonary hypertension through regulation of endogenous CO production

汤锋, 李润乐, 廖瑜, 格日力
青海大学

Hypoxia induced pulmonary hypertension is believed to be the primary cause of high-altitude pulmonary edema (HAPE) in individuals who ascend quickly from low altitudes to altitudes above 2500 m. The purpose of this study was to investigate the effects of miR-122 on pulmonary hypertension in HAPE patients and a hypoxic rat model. The miR-122 and CO concentrations were significantly lower in HAPE patients. In hypoxic rats, the CO concentration was higher in the miR-122 mimic group, but reversed by administration of either an HO-1 antagonist or miR-122 inhibitor. Pulmonary artery pressure was decreased by miR-122 mimic but reversed by HO-1 antagonist. miR-122 expression was correlated with increased HO-1 expression in liver and pulmonary artery tissues. Bach1 expression was down regulated by treatment with miR-122 mimic and up regulated by treatment with a miR-122 inhibitor. Our study provides new insights into the role of miR-122 and the HO-1/CO pathway in hypoxia induced pulmonary artery hypertension.

Hijacking dorsal raphe to improve moods and metabolism via BDNF gene transfer

修建波^{1,2}, 韩荣荣^{1,2}, 刘泽玥^{1,2}, 刘姝^{1,2}, 沈岩^{1,2}, 丁玉强³, 许琪^{1,2}

1. 中国医学科学院基础医学研究所

2. 中国医学科学院神经科学中心

3. 复旦大学

Moods and metabolism modulate each other. High comorbidity of depression and metabolic disorders like obesity and diabetes poses a great challenge to treat such condition. Here we reported the therapeutic efficacy of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) by gene transfer in the dorsal raphe nucleus (DRN) in a chronic unpredictable mild stress model of depression (CUMS) and models of obesity and diabetes. In CUMS, BDNF-expressing mice displayed antidepressant- and anxiolytic-like behaviors, which are associated with augmented serotonergic activity. Both in the diet-induced obesity model (DIO) and in db/db mice, BDNF ameliorated obesity and diabetes, which may be mediated by enhanced sympathetic activity, not involving DRN serotonin. Chronic activation of DRN neurons via chemogenetic tools produced similar effects as BDNF in DIO mice. These results established the DRN as a key nexus in regulating moods and metabolism, which can be exploited to combat comorbid depression and metabolic disorders via BDNF gene transfer.

Usnic Acid Inhibits Proliferation and Migration Through ATM Mediated DNA Damage Response in RKO Colorectal Cancer Cell

吴文兵^{1,2}, 苟惠³, 董婧颖¹, 杨晓龙¹, 赵亚楠¹, 彭恒¹, 陈丹¹, 陈利弘¹, 刘戟¹

1. 四川大学

2. 西南医科大学

3. 西南医科大学附属医院

Usnic acid (UA), also known as lichenol, has been reported to have inhibitory effects on a variety of cancer cells, but its specific mechanism remained to be elucidated. Tumor chemotherapy drugs, especially DNA damage chemotherapeutic drugs target Chromosomal DNA, but their spontaneous and acquired drug resistance are also an urgent problem to be solved. Therefore, drug combination research has become the focus of researchers. Here, we evaluated the tumor suppressing molecular mechanism of UA in colorectal cancer cells RKO from the perspective of ATM-mediated DNA damage signaling pathway through H₂O₂ simulating DNA damage chemotherapeutic drugs. We found that UA can up-regulate ATM via miR-18a to activate DNA damage signaling pathway and inhibit proliferation and migration of RKO cells in a concentration-dependent manner. At the same time, DNA damage responses including cell cycle, autophagy, apoptosis and ROS levels are also regulated by UA respectively. Therefore, UA combined with DNA damage chemotherapeutic drugs may be an effective treatment for cancer.

Metformin mediated microRNA-7 upregulation inhibits growth, migration and invasion of non-small cell lung cancer A549 cells

董婧颖, 彭恒, 杨晓龙, 吴文兵, 赵亚楠, 陈丹, 陈利弘, 刘戟
四川大学

Metformin, a medication widely used in the treatment of type 2 diabetes mellitus. miR-7 is one of significant microRNAs in non-small cell lung cancer (NSCLC). Metformin has an inhibitory effect on lung cancer as well as regulates the expression of certain microRNAs, but there is no report related metformin with miR-7 in lung cancer. Thus, we used qPCR to measure miR-7 expression in NSCLC A549 cells with different concentrations of metformin treatment. We used CCK8, cell scratch assay, and transwell to test A549 cells' growth, migration, and invasion. Using western blot to measure the level of relevant proteins in A549s. we found that miR-7 was dramatically upregulated by metformin. Both of metformin and miR-7 mimic reduced A549 cells' growth, migration, and invasion. Western blot indicated that metformin down-regulated the level of p-NF- κ B p65, p-Erk1/2, p-AKT, and p-mTOR protein in a dose-dependence, and miR-7 mimic had the same function. Our discovery revealed that metformin, via increasing the content of miR-7 mediated by AMPK, regulates the AKT/mTOR, MAPK/Erk, and NF- κ B signal pathways, thereby suppresses A549 cells' growth, migration, and invasion.

A Novel YAP1/SLC35B4 Regulatory Axis Contributes to Proliferation and Progression of Gastric Carcinoma

刘俊¹, 李纪鹏², 张瑞¹

1. 中国人民解放军空军军医大学
2. 中国人民解放军空军军医大学第一附属医院

SLC35B4, a nucleotide sugar transporter (NST), is capable of transporting UDP-xylose and UDP-GlcNAc from the cytoplasm to the lumen of the endoplasmic reticulum and Golgi. Aplays a pivotal role in glycosylation of biological macromolecules. However, its functional roles and regulatory mechanisms in malignant diseases remain unknown. Here, we demonstrated that SLC35B4 is directly transactivated by YAP1-TEADs complex in gastric cancer. And it is essential for survival and proliferation in GC cells and nude mice models. SLC35B4 expression is markedly higher in GC tissues compared with control noncancerous tissues. Immunohistochemistry revealed that SLC35B4 expression is positively correlated with YAP1 expression in human GC tissues, and this correlation is also confirmed in the GC TCGA dataset. Collectively, our findings defined SLC35B4 as an important downstream oncogenic target of YAP1, suggesting that dysregulated signaling of a novel YAP1/SLC35B4 axis promotes gastric cancer development and progression, and this axis could be a potential candidate for prognosis and therapeutics in gastric cancer.

Methylation of C/EBP α by PRMT1 Inhibits Its Tumor-Suppressive Function in Breast Cancer

孙文政, 张业

中国医学科学院基础医学研究所

Protein arginine methyltransferases have been shown to play oncogenic roles in a variety of cancers, little is known about the role of arginine methylation in regulating the antiproliferation activity of C/EBP α . Here, we report that the protein arginine methyltransferase 1 (PRMT1) is overexpressed in human breast cancer and that elevated PRMT1 correlates with cancer malignancy. RNA-sequencing analysis revealed that knockdown of PRMT1 in breast cancer cells is accompanied by a decrease in the expression of cyclin D1. Furthermore, tandem affinity purification followed by mass spectrometry identified PRMT1 as a component of the C/EBP α complex. C/EBP α associated with and was methylated by PRMT1 at three arginine residues (R35, R156, and R165). PRMT1-dependent methylation of C/EBP α promoted the expression of cyclin D1 by blocking the interaction between C/EBP α and its corepressor HDAC3, which resulted in rapid growth of tumor cells. Inhibition of PRMT1 significantly impeded the growth of cancer cells from patients with triple-negative breast cancer. This evidence that PRMT1 mediates C/EBP α methylation shows potential therapeutic target in breast cancer.

解旋酶 Twinkle 两个新型突变位点引发 Perrault 综合征的分子机制

田国帅^{1,2,3}, 张业^{1,2,3}

1. 北京协和医学院基础学院
2. 中国医学科学院基础医学研究所
3. 医学分子生物学国家重点实验室

Twinkle 蛋白在真核细胞核内表达, 随后依靠 N 端线粒体定位肽段进入线粒体内发挥解旋酶功能。Twinkle 可与聚合酶 γ 及单链 DNA 结合蛋白共同形成复制体保证线粒体 DNA 的完整性并参与线粒体 DNA 的复制和转录过程。Twinkle 蛋白的突变能引发诸如进行性眼外肌麻痹 (PEO)、婴儿期脊髓小脑性共济失调 (IOSCA) 和 Perrault 综合征等多种伴有神经系统部位损伤的疾病。Perrault 综合征常伴有进行性呼吸障碍、双耳进行性感音神经性耳聋等症状, 女性患者常伴有卵巢发育不良症状。我们的合作者发现了一例由于 Twinkle 两个新型杂合突变位点导致 Perrault 综合征的临床案例。因而我们在 HEK-293T 细胞中分别过表达携带有 Twinkle 野生型和突变型的编码序列, 并在蛋白和 mRNA 水平上检测 Twinkle 的表达变化, 同时检测线粒体基因 tRNA^{Leu(UUR)} 的 mRNA 表达变化程度, 以便研究这两个复合杂合突变位点引发 Perrault 综合征的分子机制。

在真核细胞 HEK-293T 中过表达野生型和突变型 Twinkle 均可在蛋白和 mRNA 水平上检测到 Twinkle 的升高。过表达突变型 Twinkle 会导致 tRNA^{Leu(UUR)} mRNA 的减少, 野生型 Twinkle 的过表达会导致 tRNA^{Leu(UUR)} mRNA 的显著增多。原核纯化过程中发现直接表达 Twinkle 编码区和标签序列会导致目的蛋白的不可溶, 因而在两段序列间添加了一段过渡序列以提高目的蛋白的溶解度, 以便深入开展原核纯化实验和下一步解旋酶酶活性测定工作。基于上述结果, 我们推测 Twinkle 两个新型杂合突变位点可能会降低线粒体 DNA 的转录水平, 进而引发伴有神经系统多部位损伤的 Perrault 综合征。

Homocysteine promotes intestinal epithelial barrier dysfunction through DNA hypermethylation in stress-induced IBS rats

赵云 ,Liang Zhang,Fang Xie,Xue Wang,Shida Wang,Jing Ma,Lingjia Qian
Institute of Military Cognitive and Brain Sciences, Academy of Military Medical
Sciences

Our previous data demonstrated that plasma Hcy was related to breakdown of epithelial tight junction and increased intestinal paracellular permeability in IBS rats, but the mechanisms underlying remain still unclear. Results showed that the SAM/SAH ratio, global DNA methylation and DNMTs activity all were significantly increased in IBS. Moreover, Claudin-1 mRNA and protein expression were decreased, accompanied by the increase of DNA methylation in claudin-1 promoter region. The above damaging effects could be alleviated by folate, Vitamin B₆ and B₁₂ supplementation, which is a clinical therapeutic strategy for HHcy. Besides, the data revealed that it reversed the decrease of Claudin-1 transcription induced by Hcy in IBS rats after Decitabine treatment with intraperitoneal injection. Meanwhile, DNA hypermethylation of claudin-1 promoter and the severity of IBS symptoms including visceral hyperalgesia and stress-induced increase in colonic motility were also ameliorated. Taken together, Hcy-dependent aberrant of DNA methylation is involved in the regulation of Claudin-1, and it may be beneficial in finding a new target for IBS treatment.

lncRNA BC002811 慢病毒载体构建及对胃癌 HGC-27 细胞增殖的影响

林小聪, 张海涛, 符伟玉, 陈小谊, 余华军, 兰柳波
广东医科大学

目的: 构建长链非编码 RNA (lncRNA) BC002811 慢病毒表达载体, 并探讨稳定表达 BC002811 对胃癌 HGC-27 细胞增殖的影响。

方法: 将 PCR 法扩增得到的 BC002811 全基因序列, 与 pLVX-EGFP-IRES-neo 载体连接, 经酶切鉴定和测序验证后, 与辅助包装质粒共转染 HEK293T 细胞, 包装成重组慢病毒颗粒, 再感染 HGC-27 细胞, 经有限稀释法筛选出稳定表达 BC002811 的细胞克隆并扩大培养。qPCR 法分析 BC002811 的表达水平, MTS 法检测细胞增殖能力。

结果: 双酶切和测序结果表明 BC002811 重组慢病毒载体构建成功, 经 HEK293T 细胞包装后, 测定其病毒滴度为 2.2×10^{11} TU/L。将此病毒感染 HGC-27 细胞, 显示可有效提高 BC002811 的表达水平 ($P < 0.05$)。MTS 法检测结果显示, 与对照组相比, BC002811 组的 HGC-27 细胞增殖能力增强 ($P < 0.05$)。

结论: 成功构建了 BC002811 重组慢病毒载体, 该载体能稳定感染 HGC-27 细胞, 使 BC002811 过表达并提高细胞的增殖能力。

氨基酸序列与多肽分子间相互作用：纳米尺度的化学异质性结构对疏水作用的调控机制

王晨轩

中国医学科学院基础医学研究所

疏水作用是非极性分子或表面之间，由界面水分子介导的吸引力。疏水作用为诸多自组装和分子识别过程提供了重要的驱动力，如受体 - 配体结合，蛋白质折叠和脂质组装。尽管已有理论模拟的方法尝试预测界面化学异质性对疏水作用的影响，但缺乏实验数据支持。为深入了解纳米尺度的化学异质性结构对疏水作用的调控规律，我们探讨了两种非离子极性官能团（氨基与酰氨）对临近的非极性结构域产生的疏水作用的影响效应。设计并合成了具有两亲性 14-螺旋二级折叠结构的 β -多肽。每个多肽折叠体具有由沿 14-螺旋一侧排列的六个环己基侧基组成的非极性结构域。多肽折叠体另一侧由三个极性氨基酸 β^3 -高赖氨酸（K）和 / 或 β^3 -高谷氨酰胺（Q）残基构成。该极性侧基阵列的变化包括了单一的 β^3 -hLys（GA-KKK）和 β^3 -hLys/ β^3 -hGln 的混合物（例如 GA-QKK 和 GA-QQK）。溶液中原子力显微技术（AFM）的单分子测量使我们量化极性侧基化学结构对 β -肽非极性结构域产生的疏水作用的影响。在 pH 10.5 时，K 侧基质子化程度低，单分子力学测量揭示 GA-KKK 介导的疏水作用为 0.61 ± 0.04 nN，GA-QKK 为 0.54 ± 0.01 nN，GA-QQK 为 0 ± 0.01 nN。该发现表明以酰氨（Q 侧基）取代氨基（K 侧基）减弱了由六个环己基侧基产生的疏水作用。我们的结果表明，与氨基相比，酰氨基团更强烈地干扰非极性表面附近的界面水分子动力学组装结构，削弱疏水作用。我们将这种行为归因于两个极性基团与水分子形成氢键能力（酰氨 > 氨基）的差异，如相对水合自由能。观察结果表明，近端非离子型极性基团对邻近的非极性结构域产生的疏水相互作用具有显著的调控效应。化学异质性表面由水分子介导的分子间相互作用的非加性，是原子水平分析生物大分子间相互作用时需要考虑的一个重要因素。

The p53/miRNAs/Ccna2 pathway serves as a novel regulator of cellular senescence: complement of the canonical p53/p21 pathway

徐舜, 吴维佳, 黄海姣, 黄茹晓, 谢罗逸君, 苏皓凌, 刘爽,
袁源, 郑慧玲, 孙雪荣, 熊兴东, 刘新光
广东医科大学

Among the multiple molecular mechanisms, miRNAs have increasingly been implicated in the regulation of aging process. However, the contribution of miRNAs to aging process and the underlying mechanisms remain elusive. We herein performed high throughput analysis, and unveiled that various p53 responsive miRNAs, including miR-124, miR-34 and miR-29, were up-regulated in aging mouse. Further investigation unraveled that similar as miR-34a and miR-29, miR-124 significantly promoted cellular senescence. Fascinatingly, among the down-regulated mRNAs, *Ccna2* stood out as a common target of several p53 responsive miRNAs, which functioned as the antagonist of p21. Silencing of *Ccna2* remarkably triggered the cellular senescence, while *Ccna2* overexpression delayed cellular senescence and significantly reversed the senescence-induction effect of miR-124 and miR-29. Moreover, overexpression of p53 responsive miRNAs or knock-down of *Ccna2* evidently accelerated the cellular senescence in the absence of p21. Taken together, our data suggested that the p53/miRNAs/*Ccna2* pathway might serve as a novel senescence modulator independent of p53/p21 pathway.

CircG as a competing endogenous RNA participates in the regulation of endothelial cell senescence

周萌媛, 刘东亮, 巫伟鹏, 闵雪, 蔡梦云, 徐舜, 刘新光, 熊兴东
广东医科大学

Endothelial cell senescence can cause vascular dysfunction and contributes to the development of age-related vascular diseases. However, the functional role of circRNAs on endothelial cell senescence is still unknown. Here, we identified circG as a circular RNA showing markedly reduced levels in senescent endothelial cells. circG silencing in young endothelial cells effectively promotes a robust senescence phenotype, including increase in the numbers of the senescence-associated β -galactosidase-positive cells, decrease of cell proliferation, and suppressed in vitro and in vivo angiogenesis. By contrast, overexpression of circG showed an opposite effects. Mechanistic studies revealed that circG interacted with miR-146a, which was involved in the regulation of vascular function and atherosclerosis. These results reveal an important role of circG on endothelial cell senescence and provide a fresh perspective on circRNAs in age-related vascular diseases.

RNA m⁶A 甲基化在少突胶质瘤中的作用研究

马春卉¹, 常梦琪¹, 吕洪义², 宋述慧², 牛亚梅¹, 佟伟民¹

1. 中国医学科学院基础医学研究所, 北京, 100005

2. 中国科学院北京基因组研究所, 北京, 100101

N⁶-甲基腺嘌呤 (m⁶A) 是 mRNA 上含量最丰富的一种可逆性化学修饰, 在其甲基化酶、去甲基化酶和结合蛋白的介导下参与了多种生理和病理调控过程。研究发现异柠檬酸酶 IDH 突变会抑制 m⁶A 去甲基化酶 FTO 的活性, 使白血病细胞中 m⁶A 水平升高。除此之外, IDH 突变和胶质瘤的发生发展也关系密切。胶质瘤是一种最常见的原发性颅内肿瘤, 目前研究发现有 IDH 突变的少突胶质瘤患者预后较为良好。然而目前关于这一现象背后的分子机制及 m⁶A 在这类少突胶质瘤中的功能尚不清楚。

本研究首先利用 GEPIA 数据库分析了低级别胶质瘤中 m⁶A 相关基因在 RNA 水平上的表达变化, 发现肿瘤中甲基化酶 METTL3、METTL14 和 WTAP、去甲基化酶 FTO 和 ALKBH5 的 RNA 表达均升高, 其中 METTL14 和 FTO 的升高具有显著差异。其次, 以 IDH 突变的低级别少突胶质瘤临床样本为实验对象, 利用免疫组化方法检测了其中 m⁶A 相关酶的表达, 发现肿瘤中 METTL3 和 METTL14 表达升高。以上结果提示 RNA m⁶A 甲基化在少突胶质瘤发生发展过程中可能发挥了一定的调控作用。为进一步探究 RNA m⁶A 甲基化在少突胶质瘤中发挥的作用, 我们对 2 例正常对照样本和 2 例少突胶质瘤样本进行了 m⁶A-seq 分析, 从中分别鉴定出 7111、6864、9812 和 10462 个含有 m⁶A 甲基化的 RNA。其中, 大多数 RNA 在肿瘤和对照样本中均有 m⁶A 修饰, 但另有 1678 个 RNA 仅在肿瘤样本中检测到 m⁶A 甲基化修饰, 而仅在正常对照中检测到 m⁶A 甲基化修饰的 RNA 数量则只有 64 个。进一步通过功能富集分析, 发现具有肿瘤特异性 RNA 甲基化的基因主要富集在细胞迁移、蛋白代谢、血管生成等癌症相关通路, 提示这些基因可能通过 RNA 甲基化参与少突胶质瘤的发生发展。

综上所述, 本研究通过绘制少突胶质瘤中的 RNA m⁶A 甲基化谱, 鉴定了与肿瘤发生发展相关的异常甲基化 RNA, 并初步探究了 m⁶A 水平变化的上游机制。今后将进一步阐明 RNA m⁶A 甲基化在少突胶质瘤中发挥的作用, 预期从表观转录组学角度和单基因水平探究 IDH 突变的少突胶质瘤患者预后良好的原因, 为临床诊断、治疗提供参考和新思路。

RNA 结合蛋白通过调控关键转录因子的可变剪接影响多能性退出

王雪, 马艳妮, 余佳, 黄粤
中国医学科学院基础医学研究所

哺乳动物胚胎干细胞 (embryonic stem cell, ESC) 在体外具有无限增殖的能力, 并在适当的培养条件下可以诱导分化成所有类型成体细胞。目前, 对于 ESC 是如何退出多能性走向分化的还有待深入探究。近年来, 多种新型 RNA 分子的发现和功能的解析大大扩展了人们的认识, 这也使得众多 RNA 结合蛋白 (RNA binding protein, RBP) 的新功能研究成为必然。RBP 在多种细胞生物学过程中发挥着重要作用, 但对于 RBP 是如何调控 ESC “多能性退出” 的了解的还较少。本研究中, 我们首先对已有的小鼠 ESC RBP 数据库和已发表的 “多能性退出” 相关的功能性遗传筛选数据进行了生物信息学分析, 获得了几十个可能参与 ESC 退出多能性的候选 RBPs。随后, 我们利用 CRISPR/Cas9 系统在小鼠 ESC 中对这些候选 RBPs 进行了逐一敲除, 并通过体外不定向分化实验对这些突变克隆的 “多能性退出” 能力进行了检测。我们发现一些 RBP 的缺失会导致 ESC 表现出明显的分化缺陷, 例如: Rbm34、hnRNPLL 和 Rbpms 等。进而对 hnRNPLL 的作用机制深入研究, 在拟胚体形成过程中不同时间点的样品进行了 RNA-seq 分析显示在分化过程中 RNA 的可变剪接 (alternative splicing, AS) 呈现出了随时间而变化的趋势; 结合 RIP-seq 的数据我们发现, 在分化过程中, 当 hnRNPLL 缺失后 Bptf 和 Tbx3 的长转录本表达水平不能正常下降; 当我们同时敲除这两个长转录本时, 因缺失 hnRNPLL 而产生的分化缺陷表型得到了回复, 这些结果表明 hnRNPLL 可以调控这两个基因转录本的可变剪接, 通过促进 Bptf 和 Tbx3 外显子跳跃促进 ESC 退出多能性, 进而在 ESC 多能性退出过程中发挥重要作用。

GM-CSF 敲低及其中和单链抗体分泌的 CAR-T 细胞的构建

魏成, 陈辉, 赵爱, 高基民
温州医科大学

CAR-T 治疗恶性血液系统疾病显现出惊人的效果, 但该疗法的应用却受到其相关毒副反应的限制, 主要包括细胞因子释放综合征和神经毒性。最新研究表明: 因单核细胞和巨噬细胞参与了 CAR-T 细胞治疗后细胞因子释放综合征和神经毒性的发生发展, 通过 Lenzilumab 抗体中和 GM-CSF 或 GM-CSF 基因敲除可消除细胞因子释放综合征和神经毒性的发生, 且可显著增强 CAR-T 细胞功能。我们利用 RNA 干扰技术高效敲低 CAR-T 细胞内 GM-CSF 表达 (抑制效率可达 90%)、合并分泌表达中和 GM-CSF 的 anti-GM-CSF scFv, 从而预防或减缓细胞因子释放综合征和神经毒性的发生发展, 提高 CAR-T 疗法的整体安全性。此外, 我们发现: 若编码 microRNA 的核苷酸序列位于慢病毒载体 EF1 α 启动子的下游, 则因干扰了 293T 细胞内源性 microRNA 的转运和加工、导致慢病毒包装滴度显著下降; 但将编码 microRNA 的核苷酸序列插入在 EF1 α 启动子的内含子内, 则对慢病毒包装滴度无显著影响。

低质量胶质瘤样本的基因表达分析方法优化

杨林¹, 常梦琪¹, 王裕², 马文斌², 牛亚梅¹, 佟伟民¹

1. 中国医学科学院基础医学研究所, 北京, 100005

2. 中国医学科学院北京协和医院, 北京, 100730

胶质瘤是发源于神经胶质细胞的一种最常见的颅内恶性肿瘤。WHO 在 2007 年根据肿瘤恶性程度将其分为 I、II、III、IV 级。然而, 目前对于不同级别胶质瘤的进化过程及发病机制很多尚未明了。

我们有幸收集到了一例特殊的多发胶质瘤临床样本, 患者的多个部位出现了从低级别到高级别的不同类型的胶质瘤: 位于桥脑的低级别胶质瘤, 位于海绵窦和颞叶的高级别胶质母细胞瘤。用多发胶质瘤样本研究胶质瘤的发展可有效排除肿瘤研究中的一大障碍——个体差异。我们利用病人正常及肿瘤组织样本进行了 RNA-seq 测序, 在利用经典的方法分析不同级别胶质瘤以及正常样本之间的差异表达基因时, 发现用不同工具分析得到的差异基因集合重合度不高, 展现出较低的可信度。由于质控分析结果提示样本在 RNA 3' 端有较为严重的降解, 我们推测这对基因表达值的计算会产生较大影响, 于是进一步优化分析方法。我们针对每个样本分别利用 RSeQC 工具计算出其降解程度的估计值, 并且使用 edgeR 工具将该值添加到广义线性模型中以对基因表达进行校正, 然后再进行不同状态样本间的差异表达基因分析。在最终的分析结果中发现两种肿瘤样本与正常样本之间均存在较多数目的差异基因, 而虽然同为胶质母细胞瘤、海绵窦与颞叶两个位置的肿瘤之间也存在较大的表达差异, 说明其具有较大的肿瘤异质性。与校正前的分析结果相比, 对降解程度进行校正后的分析过滤掉了更多的假阳性差异基因, 灵敏度更高, 结果更具可信度。由于临床样本获取过程中难免存在样本已降解的情况, 为此本研究中摸索的 RNA 表达校正的方法对于准确地分析、比较临床标本之间基因表达有一定的参考与借鉴价值。

Has-miR-196b 靶向 GATA6 调控子宫内膜癌的分子机制研究

郭珍珍, 廖杨优, 孙倩男, 隋琳琳, 孔英
大连医科大学

子宫内膜癌 (EC) 是最常见的妇科恶性肿瘤, 临床上大多数 EC 患者诊断为晚期阶段, 一旦发生转移或复发, 预后很差。miRNA 是一组长约 21 ~ 25 个核苷酸的非编码 RNA, 与 mRNA 分子的 3' UTR 互补配对导致该 mRNA 分子被降解或翻译抑制。GATA6 属于锌指结构转录因子家族成员之一, 参与胚胎发育、细胞分化、组织特异性基因的调控等作用。本研究旨在探讨 Has-miR-196b 靶向 GATA6 在子宫内膜癌中的作用及其机制。

材料与方法: 收集临床人子宫内膜癌和癌旁组织样本, QPCR 检测组织样本中 miR-196b 和 GATA6 mRNA 水平的表达; Western blot 和 IHC-P 实验检测组织样本中 GATA6 的表达差异。运用生物学软件预测 miR-196b 靶基因, 通过 RT-PCR、western blot 及双荧光素酶报告基因实验验证 miR-196b 与 GATA6 基因的靶向关系; 以人子宫内膜癌细胞为研究模型, 以 miR-196b mimics/Negative Control、miR-196b inhibitor/Negative Control 转染调控细胞 miR-196b 基因表达, CCK8 实验、EdU 增殖实验、流式细胞周期、Transwell 实验检测调控 miR-196b 对细胞增殖、细胞周期、迁移及侵袭的影响。共转染 miR-196b 和 GATA6 分析对细胞增殖、迁移、侵袭的影响。

实验结果: 生物学软件预测结果 miR-196b 与 GATA6 存在靶向关系, 双荧光素酶报告基因实验和 western blot 进一步验证 miR-196b 与 GATA6 的靶向关系。上调 miR-196b 的表达且抑制 / 促进细胞的增殖、细胞周期、迁移及侵袭, 并使 S 期细胞减少 / 增多; 上调 miR-196b, GATA6 的蛋白表达呈下 / 上降趋势。

以上结果初步揭示 miR-196b 与 GATA6 存在靶向关系; miR-196b 通过 GATA6 影响人子宫内膜癌的发生发展。

This work was supported by National Natural Scientific Grants of China (No.31570798)

子宫内膜 O-GlcNAc 糖基化修饰对母胎互作及妊娠的结局影响

张宏硕, 齐佳, 李真, 孔英
大连医科大学

O-连接*N*-乙酰氨基葡萄糖 (*O*-linked *N*-acetylglucosamine, *O*-GlcNAc) 修饰是在 *O*-GlcNAc 转移酶 (OGT) 催化下, 以 *N*-乙酰氨基葡萄糖核苷酸 (UDP-GlcNAc) 为底物将 *N*-乙酰氨基葡萄糖连接在蛋白质 Ser/Thr 羟基上; *O*-连接 *N*-乙酰氨基葡萄糖苷酶 (OGA) 催化 *O*-GlcNAc 从羟基上水解移除。来自机体糖代谢己糖胺合成途径 (HBP) 的 UDP-GlcNAc 是蛋白质、糖类、脂类等生物合成的必须中间物。*O*-GlcNAc 修饰可明确调控多种转录因子的活性, 调控蛋白质互作、蛋白质细胞定位、细胞周期、细胞应答、细胞骨架维持及蛋白质降解等过程。

本实验室前期研究发现子宫内膜 *O*-GlcNAc 糖基化修饰水平升高是由于糖原聚集体介导的 HBP 通路所促发, 同时高水平的 *O*-GlcNAc 糖基化修饰能够通过增加靶蛋白之一的转录因子 Sp1 的 *O*-GlcNAc 糖基化修饰水平以及核内移位, 调控下游蛋白 AQP3 的表达; 而 AQP3 作为水通道蛋白 (Aquaporins, AQP) 家族成员之一, 负责转运水、甘油、尿素等小分子物质, 已有报道发现 AQP3 在肿瘤侵袭过程中发挥促进细胞增殖、迁移和血管生成等重要的作用。我们之前的工作证明了 AQP3 通过与 Ezrin 蛋白的相互作用改变细胞骨架影响细胞形态, 导致 EMT 的发生, 进而参与子宫内膜的侵袭和迁移。

最近, 我们的工作发现 *O*-GlcNAc 糖基化修饰介导的 AQP3 表达能够引起子宫内膜甘油的积累, 而甘油作为糖脂代谢, 以及糖酵解和 TCA 循环的中间物, 必定参与到了子宫内膜的代谢活动中。因此, 可以预见 *O*-GlcNAc 糖基化修饰与糖脂代谢互作模式与信息交流机制之间的联系可能是由作为调控分子之一的 *O*-GlcNAc 糖基化修饰的转录因子 Sp1 和 AQP3 参与的结果。而子宫内膜 *O*-GlcNAc 糖基化修饰对内膜基质结合、降解、内膜蜕膜化、血管重建、EMT 等过程的分子机制需要我们的进一步探究, 以期为促进妇女健康生育、提高出生人口质量提供科技支撑。

This work was supported by National Natural Scientific Grants of China (No.31570798)

OPN 在头颈部鳞状细胞癌的作用及其介导增殖、侵袭机制的研究

于新新, 董明, 牛卫东, 孔英
大连医科大学

头颈部癌 (HNC) 包括起源于鼻窦、鼻腔、口腔、咽、喉等部位的上皮性恶性肿瘤, 病理类型几乎为鳞癌 (HNSCC), HNSCC 患者手术后局部复发和远处转移, 总体预后很差。骨桥蛋白 (OPN) 是一种 N-磷酸化糖蛋白, OPN 高表达与肿瘤晚期转移以及不良预后有关。OPN 可激活多种致癌基因, 调控肿瘤生长、转移和血管生成。本文探讨 OPN 参与 HNSCC 发生和发展中作用机制。

实验方法 收集临床头颈部鳞癌组织标本及癌旁组织, Real-time PCR 和 Western blot 检测 OPN 表达差异。免疫组化检测 OPN 在头颈部鳞癌的表达与定位; 选取口腔鳞状细胞癌 -6 (UM-SCC6) 和鼻咽鳞状细胞癌 -2 (CNE-2) 细胞, 转染 OPN-siRNA 和 Over-OPN 调控细胞 OPN 表达水平, CCK8 实验、集落形成实验及 KI67 实验检测对细胞增殖能力的影响; Western blot 检测调控 OPN 对凋亡相关因子 Capase-3 和 Bcl-2 表达影响; Transwell 小室检测调控细胞 OPN 对细胞侵袭能力的影响, Western blot 检测侵袭相关因子 MMP2 和 MMP9 表达变化。分析不同表达水平的 OPN 对 p38MAPK 信号通路分子表达的影响。

实验结果 Real-time PCR 和 Western blot 显示, 与癌旁组织相比, OPN 在头颈部鳞癌组织中高表达。免疫组化显示头颈部鳞状细胞癌组织中 OPN 表达高于对照组; OPN 蛋白主要位于细胞质, 在细胞膜及组织间隙有少量染色。CCK8、集落形成、KI67 实验、Transwell 小室结果显示, 转染 OPN-siRNA 下调 UM-SCC6 和 CNE-2 细胞 OPN 表达, 能够抑制细胞增殖、抑制细胞侵袭, Capase-3 和 Bcl-2 表达增高, MMP2 和 MMP9 表达降低; 转染 Over-OPN 上调 UM-SCC6 细胞和 CNE-2 细胞 OPN 表达, 能够促进细胞的增殖、侵袭, Western blot 实验结果 MMP2 和 MMP9 表达增高。下调 OPN 表达, p-p38 表达降低; 上调 -OPN 后 p-p38 表达升高。

实验结论: OPN 在人头颈部鳞癌组织中表达高于癌旁组织, OPN 能够影响头颈部鳞癌 UM-SCC6 细胞和 CNE-2 细胞的增殖和侵袭。OPN 可能是通过 p38MAPK 信号通路调控 UM-SCC6 细胞和 CNE-2 细胞的增殖和侵袭能力。

miR-21-5p 影响子宫内膜癌细胞增殖、迁移及侵袭机制的研究

齐佳, 张宏硕, 王宇飞, 孔英
大连医科大学

子宫内膜癌是一种来源于子宫内膜的异质性恶性肿瘤, 是妇女最常见的恶性肿瘤之一。微小 RNA (miRNAs) 通过与其靶基因 mRNA 分子 3' - UTR 碱基不完全配对, 导致靶基因 mRNA 降解或抑制 mRNA 翻译来调控基因表达。本研究以 HEC-1A 细胞模拟子宫内膜腺癌, Ishikawa 细胞模拟正常子宫内膜, 探讨了 miR-21-5p 对子宫内膜癌发生发展相关性及其分子作用机制, 探寻 miR-21-5p 靶标分子, 拟期为子宫内膜癌诊治提供新靶点。

结果显示, miR-21-5p 在 HEC-1A 细胞中的表达明显高于 Ishikawa 细胞; 上调 miR-21-5p 能够促进 HEC-1A 细胞的增殖、迁移及侵袭能力; 下调 miR-21-5p 对 HEC-1A 细胞的增殖能力无显著影响, 但是能抑制 HEC-1A 细胞的迁移及侵袭能力; 通过 TargetsCanHuman7.1 预测并筛选出与侵袭转移相关的 miR-21-5p 的靶基因 PITX2、VCL、JAG1 和 FBXO11; 上调 HEC-1A 细胞 miR-21-5p 的表达, 对照组相比, 靶基因 PITX2、VCL、JAG1 和 FBXO11 的 mRNA 显著降低, PITX2 及 VCL 蛋白的表达降低; 相反下调 miR-21-5p 的表达时, 可促进 PITX2 和 VCL 蛋白的表达; 靶基因 3' UTR 区克隆载体、野生型及突变型重组载体测序结果与预测一致; 双荧光素酶结果显示, PITX2、VCL、JAG1 和 FBXO11 是 miR-21-5p 的直接靶基因。

综上所述, 可以得出如下结论: miR-21-5p 在 HEC-1A 中的表达显著高于 Ishikawa 细胞。上调 miR-21-5p 能够促进 Ishikawa 细胞及 HEC-1A 细胞的增殖、迁移及侵袭能力。并证明了 JAG1、FBXO11、VCL 和 PITX2 等基因是 miR-21-5p 的靶基因。miRNA-21 在子宫内膜癌发生、发展过程中的作用为其诊断和治疗提供新的基础。

This work was supported by National Natural Scientific Grants of China (No.31570798)

O-GlcNAc 糖基化修饰影响胚胎发育和子宫容受性建立的研究

李晓雪, 廖杨优, 李真, 张宏硕, 孔英
大连医科大学

胚泡着床是复杂的生理过程, 包括胚泡与子宫内膜上皮细胞的识别、定位、黏附, 进而穿过基底膜植入到子宫内膜。子宫内膜容受性受雌激素、孕激素、细胞因子和生长因子等许多因素共同调节胚胎滋养层细胞与母体子宫内膜细胞间逐步建立密切的细胞间通讯联系。O-GlcNAc 修饰是单个 N-乙酰葡萄糖胺以 O 糖苷键与蛋白质丝氨酸或苏氨酸的羟基氧连接的一种单糖修饰。O-GlcNAc 修饰调节众多蛋白质生物学功能, 参与基因转录、信号转导、代谢调控。O-GlcNAc 修饰基的添加和去除分别是由糖基转移酶 OGT 和糖苷酶 OGA 完成。

实验方法: 本研究以 RL95-2/HEC-1A 细胞模拟高 / 低接受态子宫内膜, 以绒毛膜肿瘤细胞 (JAR) 模拟侵入性胚胎构建体外着床模型, RT-qPCR、Western blot 检测高 / 低接受态子宫内膜 O-GlcNAc 修饰水平。以 OGT 抑制剂 Alloxan 调控 RL95-2 细胞 OGT、以 OGA 抑制剂 PUGNAC 调控 HEC-1A 细胞 OGA 的表达, 分析 O-GlcNAc 修饰变化及高 / 低接受态子宫内膜细胞 EMT 相关分子 MMP2、MMP9、E-cadherin、N-cadherin、Snail 的表达。分析高 / 低接受态子宫内膜细胞增殖、侵袭、迁移能力变化, 监测胚胎 JAR 细胞在 RL95-2/HEC-1A 细胞的黏附率。

实验结果: RL95-2 细胞的 O-GlcNAc 修饰水平高于 HEC-1A 细胞, 以 OGT 抑制剂 Alloxan 下调 RL95-2 细胞 OGT 表达则下降, O-GlcNAc 修饰水平降低, 并下调相关分子 CyclinD1、FoxM1、Bcl-2 的表达, 抑制 RL95-2 细胞增殖、迁移、侵袭及 JAR 细胞在 RL95-2 细胞上的黏附率; 以 OGA 抑制剂 PUGNAC 下调 HEC-1A 细胞中 OGA 表达则 O-GlcNAc 修饰水平提高, 上调相关分子 CyclinD1、FoxM1、Bcl-2 的表达, 促进 HEC-1A 细胞增殖、迁移、侵袭能力, 增加 JAR 细胞在 HEC-1A 上的黏附。调控 RL95-2/HEC-1A 细胞 O-GlcNAc 修饰水平, 影响 MMP2、MMP9、Snail 的表达; 并与上皮间质转化相关。以上结果初步显示 O-GlcNAc 修饰在胚胎发育和子宫内膜容受性建立起重要作用。

Interference of FE65 RNA expression enhances neurogenesis and spatial working memory following the downregulation of Alzheimer Amyloid Precursor Protein

ShiTao Gong¹, YaBo Zhao¹, Ming Zhang^{1*}

1. Yunnan Key Laboratory of Stem Cell and Regenerative Medicine, Institute of Molecular and Clinical Medicine, Kunming Medical University, Kunming 650500

*Corresponding Author: zhangming99@gmail.com

FE65 is highly expressed in the brain to form multi-protein complexes with Alzheimer Amyloid Precursor Protein (APP), AICD and Notch etc. It has been shown that FE65 is involved in the regulation of cell cycle and cell migration. A previous study also reported that Fe65 gene mutation negatively regulates neurogenesis in fetal mouse brain. However, it is unclear whether FE65 loss in adulthood could affect neurogenesis especially in hippocampus, a critical brain region involved in learning and memory. Herein, FE65 siRNA was microinjected into hippocampal SGZ subregion to interfere the expression of FE65 protein in adult C57BL/6 mice. As the result, we found that the knockdown of FE65 expression led to enhanced neurogenesis in hippocampal SGZ subregion, accompanied with decreased expression of APP and TAG1, a functional ligand of APP. Interestingly, both heterozygous and homozygous FE65 mutant mice showed better performance in the T-maze spontaneous alternation task, indicating an improvement of spatial working memory in these mice. These data demonstrate an important role of FE65 in the regulation of Alzheimer's Disease-related molecules to affect brain functions of neuronal network and behavioral cognition.

Keywords: FE65; RNA interference; Neurogenesis; Alzheimer's Disease

Acknowledgment: This work was supported by the National Natural Science Program of China (81360175, 31660273 , M. Z.).



2019 KUNMING
HSIEN W. & RAY W.