

# 潍坊医学院附属医院 博士启动基金任务书

项目名称: miR-541-3p/GPX4 调控黑素细胞铁死亡在紫外线辐射诱发白癜风中的作用

项目编号: 2021BKQ01

项目负责人: 曲燕

项目依托科室: 皮肤科

联系人: 曲燕

联系电话: 13562611315

电子邮箱: wfmcqy@163.com

潍坊医学院附属医院

2021 年制

一、基本信息

|                      |      |                                          |            |                  |     |
|----------------------|------|------------------------------------------|------------|------------------|-----|
| 项目基本信息               | 项目名称 | miR-541-3p/GPX4 调控黑素细胞铁死亡在紫外线辐射诱发白癜风中的作用 |            |                  |     |
|                      | 项目编号 |                                          |            |                  |     |
|                      | 项目类别 | 博士启动基金                                   | 资助金额       | 60.0 万元          |     |
|                      | 立项年度 | 2021 年                                   | 起止年月       | 2022. 1-2026. 12 |     |
|                      | 所属学科 | 皮肤科                                      | 专业领域       | 白癜风              |     |
| 项目负责人信息              | 姓 名  | 曲燕                                       | 性 别        | 女                |     |
|                      | 出生年月 | 1982 年 3 月                               | 学 位        | 博士               |     |
|                      | 职 称  | 副主任医师                                    | 电 话        | 13562611315      |     |
|                      | 传 真  | 05363081201                              | 电子邮箱       | wfmcqy@163. com  |     |
|                      | 所在科室 | 皮肤科                                      |            |                  |     |
| 项目组成员（不含负责人，不超过 6 人） |      |                                          |            |                  |     |
| 姓 名                  | 工作部门 | 职 称                                      | 项目分工       | 每年工作<br>时间（月）    | 签 名 |
| 孟慧娟                  | 皮肤科  | 主治医师                                     | 临床资料的收集与分析 | 9 月              |     |
| 牛长英                  | 皮肤科  | 主治医师                                     | 动物实验       | 9 月              |     |
| 王帅                   | 皮肤科  | 主治医师                                     | 形态学实验      | 9 月              |     |
|                      |      |                                          |            |                  |     |

二、经费预算

| 资助总金额<br>(万元) | 其中（分年度） |        |        |        |        |
|---------------|---------|--------|--------|--------|--------|
|               | 2022 年  | 2023 年 | 2024 年 | 2025 年 | 2026 年 |
|               | 20      | 10     | 10     | 10     | 10     |

|                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>院内基金项目经费预算实行“包干制”和信用承诺制，项目经费实行定额包干资助，赋予项目负责人经费支配权，签订任务书无需编写经费预算。项目负责人作为第一责任人，签署科研诚信承诺书，代表研究团队承诺弘扬科学家精神，遵守科研伦理道德和科研诚信要求，按照科研项目绩效目标和任务书开展科学研究工作；承诺项目经费全部用于与本项目研究工作相关的支出，不截留、挪用、侵占和虚假套取，不用于与科学研究无关的支出。</p> <p style="text-align: right;">项目负责人（签字）：<br/>年 月 日</p> |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

三、主要内容

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>研究内容简介（摘要）</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| <p>白癜风是临床上常见的一种常见的损容性皮肤病，其发病机制尚未完全阐明，但黑素细胞的异常损毁和死亡处于发病的核心地位。许多研究表明，紫外线辐射可诱发或加重白癜风。本研究在前期研究工作中发现，经紫外线辐射后的黑素细胞增殖明显受阻而铁死亡明显增加，经测序后发现紫外线辐射导致了黑素细胞中 miR-541-3p 及 GPX4 的表达水平发生了改变，由此提出观点：紫外线辐射通过调控 miR-541-3p/GPX4 来诱导黑素细胞铁死亡，参与了白癜风的发病过程。本研究将采用黑素细胞 PIG1 和 PIG3 及白癜风小鼠模型为研究材料和对象，通过细胞及分子生物学各项技术和方法，对黑素细胞程序性铁死亡在白癜风发病中的作用展开深入研究。</p> |

## 研究内容及实验方案

### 一、研究内容

1、紫外线辐射诱发黑素细胞铁死亡：采用人白癜风黑素细胞株 PIG3 和正常人黑素细胞株 PIG1 为研究材料，在实验室中给予一定强度的紫外线（UV）辐射，通过 RNA-seq 检测细胞中差异表达的 RNA，并通过 real-time PCR 和 western blot 等技术进行验证，并通过流式细胞术等对铁死亡相关的指标进行检测，旨在证明紫外线辐射可导致人皮肤黑素细胞发生铁死亡。

2、miR-541-3p 靶向 GPX4 参与紫外线辐射诱导的黑素细胞铁死亡：经生物信息学预测，miR-541-3p 可与 GPX4 mRNA 靶向结合，导致 GPX4 的表达沉默。本项目将在黑素细胞中证实 miR-541-3p 对 GPX4 mRNA 的调控作用，并采用 miR-541-30 mimics 和 inhibitors 探究紫外线辐射通过 miR-541-3p 靶向 GPX4 参与紫外线辐射诱导的黑素细胞铁死亡。

3、黑素细胞铁死亡是白癜风重要的发病机制：目前关于白癜风的发病机制尚未完全阐明，黑素细胞的异常损毁和死亡是发病的关键和核心。铁死亡是新近发现的一种细胞死亡方式，且与氧化应激密切相关。本研究将利用细胞株和小鼠白癜风动物模型，探究黑素细胞铁死亡在白癜风发病中的作用。

### 二、实验方案

1、紫外线辐射对人黑素细胞增殖、铁死亡的影响

①体外培养健康人皮肤黑素细胞 PIG1 和人白癜风黑素细胞 PIG3；

②给予一定剂量的紫外线辐射；

③CCK-8 法检测细胞增殖，并绘制生长曲线；

④透射电镜观察细胞中线粒体形态；

⑤使用 PGSK 探针标记细胞中的铁，C11-BODIPY 标记细胞中的 ROS，流式细胞术和激光共聚焦显微镜检测和观察，分析细胞中铁含量及 ROS 的分布；

⑥real-time PCR 技术检测 miR-541-3p 在紫外线辐射后细胞中的表达；

⑦real-time PCR 和 western blot 技术检测紫外线辐射后细胞中铁死亡相关的谷胱甘肽过氧化物酶 4（GPX4）、铁蛋白重链 1（FTH1）、前列腺素内过氧化物合酶 2（PTGS2）、长链脂酰辅酶 A 合成酶 4(ACSL4)mRNA 和蛋白质的表达。

2、荧光素酶报告基因技术研究 miR-541-3p 靶向 GPX4 调控黑素细胞铁死亡

①采用生物信息学软件预测 miR-541-3p 与 GPX4 mRNA 互作；

②构建报告质粒：将 GPX4 的 miR-541-3p 结合位点突变(pMIR-REPORT Luciferase-GPX4-3' UTR(MT))和野生型(pMIR-REPORT Luciferase-GPX4-3' UTR(WT))序列插入到报告质粒中，测序验证；③转染：脂质体转染法分别将野生型或突变型双报告载体与 miR-541-3p mimics 共转染入 PIG3 细胞中；

④双报告基因检测：质粒共转染 48h 后，去除培养液、漂洗、裂解细胞。取上清液加入预先混好的 LARII 工作液，立即在化学发光仪上检测荧光强度。再加入预先制备好的反应终止液 Stop & Glo Reagent,立即在化学发光仪上检测荧光强度；

⑤每组实验设计 3 个平行组，每个平行组重复 3 次实验，记录荧光强度，进行统计分析。

3、紫外线辐射通过 miR-541-3p 靶向 GPX4 调控黑素细胞铁死亡

①构建 miR-541-3p 高表达载体，并转入 PIG1 和 PIG3 细胞，real-time PCR 技术检测 miR-541-3p 的表达水平，real-time PCR 和 western blot 技术检测 GPX4 mRNA 和蛋白的表达水平；

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>②构建慢病毒载体并感染 PIG1 和 PIG3 细胞，利用慢病毒在细胞内合成一段成熟的 miR-541-3p 互补序列，对 miR-541-3p 进行靶向降解，real-time RCR 技术检测 miR-54103p 的表达水平，real-time PCR 和 western blot 技术检测 GPX4 mRNA 和蛋白的表达水平；</p> <p>③将过表达 miR-541-3p 和低表达 miR-541-3p 的 PIG1 和 PIG3 细胞分别给予一定的紫外线辐射；</p> <p>④real-time PCR 检测 miR-541-3p、GPX4 mRNA 的表达，western blot 检测 GPX4 蛋白的表达；</p> <p>⑤透射电镜观察细胞中线粒体形态；</p> <p>⑥使用 PGSK 探针标记细胞中的铁，C11-BODIPY 标记细胞中的 ROS，流式细胞术和激光共聚焦显微镜检测和观察，分析细胞中铁含量及 ROS 的分布；</p> <p>⑦real-time PCR 和 western blot 技术检测紫外线辐射后细胞中铁死亡相关的 GPX4、FTH1、PTGS2、ACSL4 mRNA 和蛋白质的表达。</p> <p>4、动物试验</p> <p>①白癜风模型复制：饲养 Krt14-Kitl 转基因小鼠，注射 CD8<sup>+</sup>T 细胞，8 周后观察有皮肤白斑的即为白癜风小鼠模型；</p> <p>②给予紫外线辐射小鼠皮肤，诱发白癜风的进展和加重；</p> <p>③取紫外线诱发白癜风的皮肤，制片，电镜观察黑素细胞和线粒体的形态；</p> <p>④检测皮损中 miR-541-3p 和 GPX4 mRNA 和蛋白质的表达水平；</p> <p>⑤腺病毒感染小鼠，降低细胞中 miR-541-3 表达，观察对紫外线诱导铁死亡的影响及白斑面积。</p> | 考核指标                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| <p>1、重要学术贡献（如发表学术论文、出版著作等数量）<br/>发表高质量论著 2-3 篇</p> <p>2、关键核心技术突破<br/>探究白癜风机制，阐明其与铁死亡相关。<br/>申请人及团队学术影响力提升<br/>培养硕士研究生 2-4 人，参与国内学术会议交流研究结果 2 次。</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | <p>研究进度安排</p> <p>2022 年 1 月-2023 年 7 月 体外培养 PIG1 和 PIG3 细胞，摸索条件，给予合适剂量的紫外线辐照，完成铁死亡表型的各种检测（含流式细胞术、电镜、共聚焦显微镜等）；</p> <p>2023 年 8 月-2024 年 4 月 采用荧光素酶报告基因技术，探究黑素细胞中 miR-541-3p 与 GPX4 互作，及其对细胞发生铁死亡的影响；</p> <p>2024 年 5 月-2024 年 12 月 构建 miR-541-3p 高表达载体和低表达腺病毒，转染细胞，对紫外线诱发黑素细胞铁死亡的调控机制展开研究，旨在说明 miR-541-3p/GPX4 参与紫外线诱导的黑素细胞铁死亡；</p> <p>2025 年 1 月-2025 年 12 月 动物实验，包括：动物模型的复制；紫外线辐射诱发白癜风；铁死亡的体内检测；miR-541-3p/GPX4 在体内的表达情况和作用等。</p> <p>2026 年 1 月-2026 年 12 月 查漏补缺，完成各项实验的操作，统计分析数据等。</p> |

|                                                                                               |       |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 本人承诺严格遵守《潍坊医学院科技计划项目管理办法》等有关规定，切实按照项目申请书的内容完成各项目标, 按时报送有关材料，及时报告重大情况，对项目发表的论著和取得的研究成果按规定进行标注。 |       |
| 项目负责人（签字）：                                                                                    | 年 月 日 |
| 我部门承诺严格遵守有关规定，提供研究项目实施所需的条件，并做好督促协调等工作。                                                       |       |
| 所在科室负责人(签章)：                                                                                  | 年 月 日 |
|                                                                                               |       |
| 主管部门（教研部公章）                                                                                   | 年 月 日 |
|                                                                                               |       |
| 医院（公章）                                                                                        | 年 月 日 |