

发放日期	2024.9.20
归档日期	
指导教师(签字)	
第 1 本	共 本

# 苏州大学研究生科研记录本

(自然科学类专业用)



论文题目: 10-HDA对氯化镉所致神经损伤的作用

(探索阶段,具体题目有待确定)

培养单位: 苏州医学院公共卫生学院

专 业: 公共卫生与预防医学

姓 名: 方婕

学 号: 20244247047

指导教师: 常杰

使用起止时间: \_\_\_\_\_

记录起止页码: \_\_\_\_\_

脑取50mg, 32个样, > PBS匀浆(组别: PBS = 1:6)

心取30mg, 32个样

注: SOD检测缓冲液难化, 应提前一天下午从20℃拿到4℃化, 减少等待时间。  
匀浆研磨完(6次), 静置10min, 离心(12000r, 20min), 取上清。

↓  
BCA测各样本浓度。

脑: 14.13 - 23.17 μg/mL

心: 17.86 - 26.93 μg/mL

deepseek推荐稀释比均为: 20。

↓  
取10μL脑上清液, 用190μL SOD检测缓冲液稀释。  
根据说明书配制对应物品, 检测450nm时吸光度。

↓  
失败, 每孔颜色未变化, 查deepseek可知, 样品孔无底或颜色极浅, 说明SOD抑制率接近100%, SOD活性过强, 因此需要稀释20x样本浓度。(空白孔无SOD, 所以O<sub>2</sub>大量产生, 能顺利将NBT-8还原成黄色的甲臞染料, 因此颜色很深)

↓  
总结经验, 进行预实验(小试验):

按 deepseek 推荐, 将20x 样本稀释为 40x、80x、200x、400x。  
(心、脑各取编号1样本20x 稀释液)

	SOD检测缓冲液	20x母液
20x		
40x	10 μL	10 μL
80x	30 μL	10 μL
200x	90 μL	10 μL
400x	95 μL	5 μL

重复以上步骤, 根据96孔板OD值结果, 计算抑制率(适宜30%-70%)。

- 心脏最终稀释比: 80x (抑制率55.06%, 200x为34.83%)
- 脑最终稀释比: 20x (抑制率为48.31%, 40x为30.34%)

总结: 在进行实验前 先用少量样本先做个预实验, 减少对样本、试剂的浪费。(18、19两天结果)

1. 打开电脑 → 打开 skyscan 1174 软件 (软件打开后, 仪器会自动开机)。

→ 点击工具

- \* 仪器侧面左侧底部有开关按钮, 开机需等待 (样本需固定48h以上) 仪器开机前, 检查门是否关好, 关好依据: 右动机子, 门打不开。
- 2. 点击第一个软件, 点击 ⚠️ 预热 8min (等待时间将辐射剂量器拿出, 放仪器旁)
- 3. 选择合适的分辨率 (右下角第一个“Q”), 一般小鼠选 10.3 μm。

4. 校正. Ctrl + Shift + Alt + S, 激活校正选项, options → Acquire Flat-Field References, 每次开机校正一次即可, 第1行小校正(2周内不用), 第2行大校正(超过2周未校正), 点OK。

\* 校正进餐条如果消失, 不一定是校正结束, 可能是卡了, 重新点击 Acquire Flat-Field References, 如果直接走到头或点击显示已结束(或未跳出进餐条), 说明校正完成。此时电压应在50kV左右。

5. 点相机, 若出现花白界面说明可以放样本。(先关射线, 再开门放样本, 点 ⚠️, 50kV)。

6. 放样本(用福尔马林/多聚甲醛固定超48h), 从管中取出骨头(股骨), 纸巾擦干, 用新纸中裹住骨头(包之前用ddH<sub>2</sub>O润湿骨及周围的纸)成条状(膝盖朝上, 大转子朝下), 塞入自制槽内且用双面胶将自制槽粘在底座上(同时检查底座托盘是否松动)。

7. 建属于自己的文件夹, 一个样本一个文件夹。

8. 点击 ⚠️, 再点击拍照键。如果太高看不见样本, 按住左键向下拉(一次不要太大), 双击点OK, 底座下降; 如过低, 按住左键向上拉, 双击点OK, 底座上升, 再点击拍照。(调一次拍一次), 直到调试到合适位置 (尽量竖直, 靠上), 调分辨率放大, 缩小, 再按拍照(一般都用10.3, 不调)。\*包时, 尽量往下放。

9. 调整好按 ⏪, 按 browse 选择自己的文件夹-样本名, 在 editor filter info 处修改滤片厚度为0.5, 点OK, 开始扫描, 需等待20min左右, 此时电脑不要操作其他的, 否则可能会卡。(每0.1拍一张旋转拍摄360°)

10. 拍完后最小后, 打开对应文件夹, 除第一张不要用外, 其余任选一张拖入第二个软件 (NRecon), 等图片出现。

11. 点击右上角 output → Not yet 将 New value 设为0.11(固定参数), 点OK, 勾选右侧 Use ROI, 其他不动。

12. 点击 start, 拖动横线(上下)三部分, 点 preview, 确保骨头部分都在框正中央(不在拖住框框住), 三个都拖好后点下方 start.
13. 结束后直接关闭软件. 打开文件夹 "8w\_Rec", 除第一张不要以外, 任选一张图拖入至第 4 软件 (DataViewer), 点 (Not for ...), Ctrl + 鼠标左键将图像摆正. 1: 垂直摆放; 2: 展示清晰四孔板 ; 3: 水平摆放.
  - 点 Actions → Save → Transaxial (X-Y) images as a dataset → yes → OK, 新建一个 tra 文件夹保存.
14. 关闭软件后. 打开 "tra" 文件夹, 除第一张不要以外, 任选一张清晰完整的图拖至第 4 个软件 (CTAn), 点 (show or hide profile bar), 再点右下框内倒数第二个键 (shadow projection), 点 OK. 点弹出框第二个键 (send image into ...) → 点右边拖动条, 从顶部开始, 自上而下扫, 直至看到四孔完全消失 → 往下 100 层不分析 → 设 top, 再往下 100 层, 设 bottom.
15. 点下一个流程键 (Regions of interest preview), 开始圈出相应内腔范围 (松质骨) 检查有未超出范围 (颜色改变), 可微调或重画, 点 → Interpolated. 往上看是否圈都在范围内, 圈小/圈大可在相应位置重画一个 (第一次画可直接画). 确认完毕.
16. 点下一个键 (Binary selection preview), 设参数  $\square$  (S: 68, P: 120), 点击 Bone mineral density (BMD) → 点 from dataset → 看  $\left\langle \begin{matrix} \text{mean (total)} \\ \text{mean} \end{matrix} \right\rangle \rightarrow S$  点 Save histogram (第二个键 ) 保存. 建立新文件夹 "jieguo", 点再再建立 "s", 点
17. 点 creat 3D model (第四个键) → save
18. 点下一个流程键 (Morphometry preview) → 3D analysis (第三个键) → save. save 2D analysis results. (文件夹中共有 4 个保存内容). 将右上角分析框 (除第 4 个外), 右键 "remove...", 开始分析皮质骨, 区别点:
  - ① 层数往下 300 层不分析 → 设 top, 再往下 100 层, 设 bottom.
  - ② 圈 "苹果" 法, , 拖动检查.
  - ③ 参数 120, 新建文件夹 "p", 看 mean 结果, 其余步骤聚相同.
19. 关闭软件后, 打开 "tra" 文件夹, 拖动任一张至第 5 个软件 (CTvox) < 第 4 张除外 >, 选 BONE. Shift 调框拍切面, ctrl 直接移走框, "ctrl + C" 可以取消框. 调在侧对比度可以调亮度, 拖动框可以切面. (右键拖着转动)
20. Actions → Save image 保存为 BMP 或 jpg 格式.

整理 con 组和 cd 75 mg/kg 两组数据结果 (前者 n=10, 后者 n=14).

统计指标: BMD, BV/TV, BS/BV, BS/TV.

- ① BMD: 骨矿物质密度 — 单位面积或体积内的骨矿盐含量 (反映骨量)  
统计结果: 染毒组 BMD 显著降低, 提示骨矿物质流失, 骨密度下降.
- ② BV/TV: 骨小梁表面积 — 3D 骨量占总体积的百分比 (直接反映 3 维空间中的骨量).  
统计结果: 染毒组 BV/TV 升高 (有统计意义), 提示骨结构被破坏, 孔洞增多, 表面积相对增大.
- ③ BS/TV: 骨表面积密度 — 单位总体积内的 3D 骨表面积 (综合反映骨代谢和结构转换)  
统计结果: 差异无统计学意义. 提示骨髓与骨髓交界的 "总界面面积" 没有发生改变.

BV/TV ↓, BS/BV ↑, BMD ↓, BS/TV Δ  
→ 辐射毒性导致一种 "骨量减少但结构复杂性保持不变" 的骨流失模式.

进一步分析其他形态学参数: Tb.Th, Tb.N, Tb.Sp.

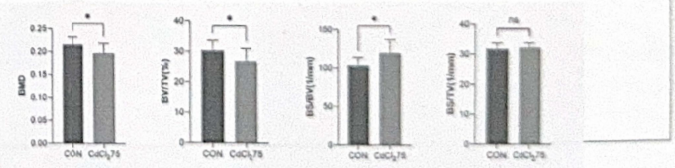
2. 进一步解释以上结果:

- ① Tb.Th: 骨小梁厚度 — 显著降低.
- ② Tb.N: 骨小梁数量 — 差异无统计学意义.
- ③ Tb.Sp: 骨小梁分离度 — 无统计学意义 (直接反映骨小梁之间的 "空间" 是密还是疏).

Tb.Th ↓, Tb.N Δ, Tb.Sp. Δ  
→ 骨小梁均匀变薄, 但骨小梁整体网络结构尚未发生坍塌和断裂.

结论: 在本研究设定的高剂量辐射条件下, 辐射对骨骼的毒性作用主要表现为导致骨小梁网络的断裂和数量减少. 这是一种早期或特定模式的骨微结构损伤. 其特征是骨量丢失 (BV/TV ↓, BMD ↓) 和骨材质地退化 (BS/BV ↑, Tb.Th ↓), 但骨骼的宏观架构 (Tb.N, Tb.Sp, BS/TV) 暂时得以维持. → 易骨折 (符合 "痛痛病" 特征)

补充结果图:



注: 学习并掌握骨扫描仪的使用, 并且用在了我们的研究中. 很完整! 但希望把结果真实数据除电子版外也补充在这里.

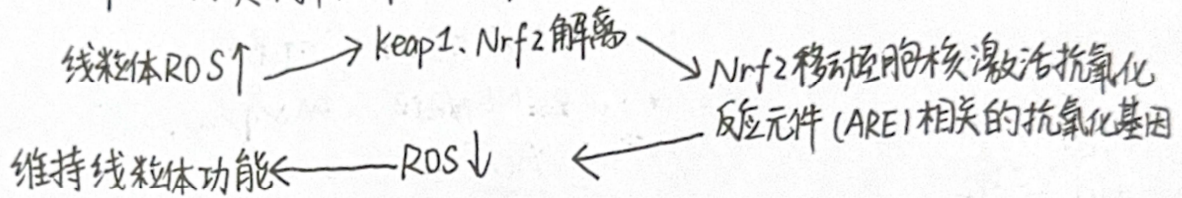
# 氧化 (Oxidation)

(一) 厚朴酚促进线粒体-过氧化物酶体功能障碍, 并通过隧道纳米管转移诱导肺癌细胞的氧化凋亡. (2025.6)

1. 厚朴酚激活 oxidative stress, 通过隧道纳米管促进受损线粒体和过氧化物酶体的细胞间运输. 线粒体融合的增加 → 可能致线粒体功能障碍 → 促进功能失调的过氧化物酶体在受体细胞中的积累, ROS ↑.  
→ 反过来, 使 oxidative stress 增强, 抑制肿瘤进展.

\* NRF2: 调节抗氧化基因的关键转录因子.

Keap1: 反馈调节 Nrf2 稳定性.



2. NRF2-ARE 下游抗氧化酶的表达, SOD2, HO-1, GPX1.

3. 透射电镜观察到 5 个级别的线粒体损伤:

1级: 线粒体拉伸.

2级: 线粒体弯曲成 U 形.

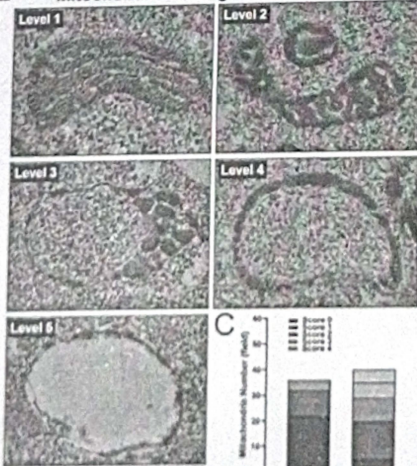
3级: U 形线粒体尖端相遇, 细胞器融合成环状结构, 压缩线粒体膜并居中.

4级: 环的内、外两部分解体.

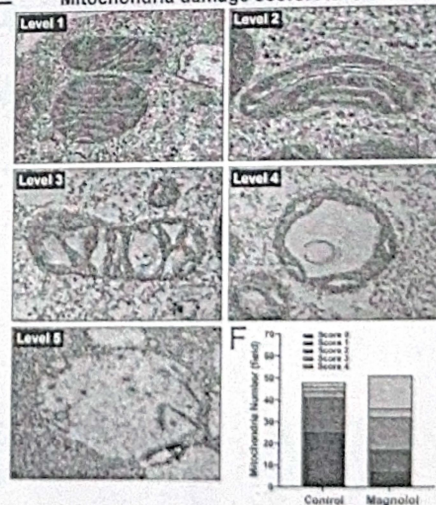
5级: 空泡化.

结论: 厚朴酚诱导线粒体损伤和功能障碍并抑制线粒体自噬.

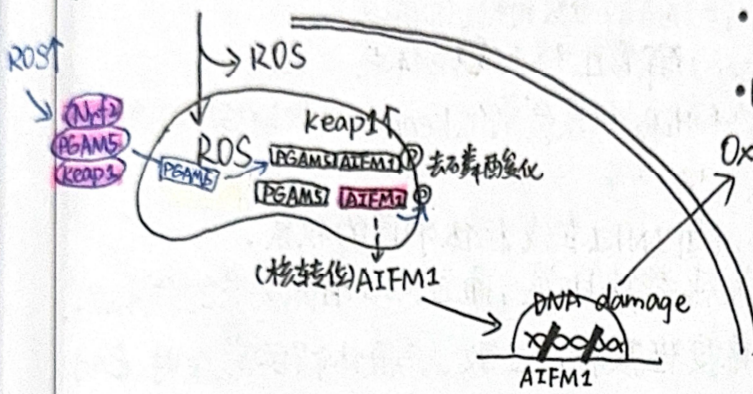
B Mitochondria damage score: H520 cell



E Mitochondria damage score: A549 cell



4. 声厚朴西分



- PGAM5: 适应氧化应激的枢纽, 但断裂影响向线粒体动力学。
- AIFM1: 核转位, 致染色质浓缩和大规模DNA片段化。(标志)
- PGAM5和AIFM1结合: Oxeiptosis的中心事件, 传递细胞死亡信号并促进蛋白质转运到线粒体内膜。
- AIFM1在丝氨酸116位点的去磷酸化是该细胞死亡的关键标志物。

(二) 综述: Oxeiptosis 在疾病机制和治疗机会中的作用 (2025.3)

1. 氧死亡由ROS介导, 不依赖 caspase 的细胞死亡, 有凋亡样特征。
2. 通过 Keap1 稳定 Nrf2 激活细胞保护基因, 并通过 PGAM5 介导的 AIFM1 Ser116 去磷酸化维持细胞稳态, 从而促进细胞完整性。

Caspase 依赖性细胞死亡途径:

- ① 细胞凋亡: 以膜起泡变化为特征的程序性死亡。(Bcl-2, Bax, caspase 家族)
- ② 细胞焦亡: 通过细胞内或细胞外刺激被激活, DNA 损伤, 染色质浓缩, 细胞破裂和细胞肿胀, 细胞表面气泡突起。(IL-1 $\beta$ , IL-18 促炎因子)

不依赖 caspase 的细胞死亡途径:

- ① 自噬: 自我吞噬过程, 细胞内成分降解。自噬体包裹细胞内细胞器, 并受自噬介导蛋白(ATG13, FIP200, ULK1) 的调节。
- ② 坏死: 释放炎症细胞成分的环境因素触发, 由多种如缺氧, 冻伤等病理过程引起。与热休克蛋白, 尿酸, ATP, DNA 和核蛋白释放引起的炎症反应有关。引起炎性小体激活。(IL-1 $\beta$  分泌)。
- ③ 坏死性凋亡: Caspase 在细胞凋亡中活性受到抑制, 会触发坏死介导的细胞死亡途径。该通路通过免疫配体 (Fas, TNF, TRAIL) 介导的 RIPK3 和 MLKL 的激活。
- ④ 铁死亡: 通过 Fenton 反应和 ROS 无限制地积累铁, 形态变化为主, 线粒体收缩伴膜密度增加, 线粒体山脊减少或消失, 但细胞膜完整。细胞内 GSH 耗竭阻止抗氧化基因 Gpx4 激活。
- ⑤ 铁自噬: 调节铁代谢的自噬, 通过 NCOA4 和 FTH1 结合, 促进细胞内铁蛋白分解, 致游离 Fe<sup>2+</sup>, 破坏铁稳态。

3. 氧化应激阶段, Keap1 的正常功能抑制, Nrf2 无法降解, 在细胞中积累, 致 Gpx, GSS, NQO1, HOX1, TxnV 等细胞保护基因反式激活, ROS 过表达, 细胞死亡。

4. ROS 不同水平, 调节 Keap1-Nrf2-PGAM5 结果不同:

- 低水平 ROS 导致 Nrf2 介导的细胞保护基因表达, 而高水平的 ROS 致 AIFM1 去磷酸化, 激活 Oxeiptosis。