

密级: ____

重庆市自然科学基金计划 项目任务书

项目名称	Hyper IL-6 和 HGF 双基因重组腺病毒及促慢加急性肝衰竭大鼠肝细胞增殖的研究
承担单位	重庆医科大学 (签章)
项目负责人	杨春
通讯地址	重庆市渝中区医学院路 1 号
联系电话	13212369713
组织部门	重庆医科大学
起止年限	2012-09-10 至 2015-09-09

重庆市科学技术委员会

二〇一一年一月制

填写说明

1. 本任务书系重庆市科委为市级自然科学基金计划项目而编制, 甲方为重庆市科委, 乙方为项目承担单位。
2. 本任务书经重庆市科委审核批准后, 作为项目计划执行和结题的依据。
3. 项目组主要成员本人应在任务书上亲自签名以示同意合作。项目组中具有高级专业技术职务的主要成员未经重庆市科委批准, 不得自行调整。
4. 任务书统一用 A4 纸打印, 于左侧装订成册。

一、项目的主要研究内容(具体内容以申请书为准)

(1) Hyper-IL-6 联合 hHGF 重组腺病毒的构建及表达、转染效率测定:

Hyper-IL-6 联合 hHGF 基因, 利用 vector NTI 软件找到最佳酶切位点, 以合适的限制性内切酶双酶切后, 插入带有罕见酶切位点穿梭质粒中, 可分别获得 hHGF、Hyper-IL-6 及 HIL-6 联合 hHGF 的重组穿梭质粒。用 I-CeuI, PI-SceI 酶切重组穿梭质粒, 与腺病毒载体 Adv5 连接, 获得携带目的基因重组腺病毒分别命名为 Adv5-hHGF、Adv5-HIL-6、hHGF-Adv5-HIL-6, 再分离, 纯化, 测定重组腺病毒转导效率。

(2) Hyper-IL-6 联合 hHGF 重组腺病毒体外转染对肝细胞的增殖促进作用及肝细胞合成功能的影响:

将重组腺病毒 Adv5-hHGF、Adv5-HIL-6、hHGF-Adv5-HIL-6、Adv5 各三个浓度 (MOI=100, 50, 25) 分别转染人胎肝细胞株 L-02, 观察肝细胞增殖数的变化, 绘制肝细胞生长曲线, 行 FCM 细胞周期分析, 肝细胞的 Albumin 和 Fibrinogen 合成功能检测, 以进一步观察 Hyper-IL-6 联合 hHGF 双基因重组腺病毒后的促肝细胞增殖作用以及对白蛋白的合成功能是否强于 Hyper-IL-6 或 hHGF 单基因重组腺病毒。

(3) Hyper-IL-6 联合 hHGF 重组腺病毒对实验性肝衰竭的保护作用:

i. 建立慢加急性肝衰竭大鼠实验模型,

雌性 Wistar 清洁级大鼠 65 只, 体重 120~150 g, 予 20% 人血清白蛋白 (Human Serum Albumin, HSA) 致敏后, 予以尾静脉攻击注射 HSA 2.5~4 mg, 每周 2 次, 共注射 6 周, 随机分为模型组 50 只和对照组 15 只, 模型组大鼠腹腔注射 D-氨基半乳糖 (D-Gal) 400 mg/kg+脂多糖 (LPS) 100 μ g/kg, 对照组大鼠予等体积生理盐水腹腔注射。

ii. 动物模型建立好后, 取 80 只健康 Wistar 大鼠, 随机分为 4 组, 每组 15 只, 按上述确定的方法制备大鼠慢加急性肝衰竭模型。造型后 12h, 24h, 48h, 72h 及 7d 分别经尾静脉给予最佳剂量的 HhGF (1 组: 转染 HGF 的腺病毒组)、HIL-6 (2 组: 转染 HIL-6 的腺病毒组)、hHGF-Adv5-HIL-6 重组腺病毒 (3 组: 同时转染 HGF 和 HIL-6 的腺病毒组) 或生理盐水 (4 组)。

观察 4 组大鼠术后精神状况和食欲变化和 14 天后的生存率, 肝功能, 分别于第 1 天、第 3 天、第 7 天、第 14 天取肝右叶固定部位肝组织予中性福尔马林固定, 石蜡包埋。

★. 制作病理切片, 光学显微镜下观察不同时间每组肝组织损伤的动态变化。

★. 增殖细胞核抗原 (PCNA) 的动态变化

予 PCNA 单克隆抗体作免疫组化染色, 计算 PCNA 指数 (PCN-LI)。每张切片于高倍镜下任选 10 数个连续视野借助于网格计数器计数 1000 个细胞, $PCNA-LI = PCNA \text{ 阳性细胞} / \text{肝细胞总数} \times 100\%$ 。

★. TUNEL 法检测肝细胞的凋亡的动态变化

★. RT-PCR 方法检测肝组织中肝细胞生长因子及相关基因表达

二、研究目标。

在已构建的 Hyper-IL-6 重组慢病毒的基础上, 采用腺病毒载体平台,

Hyper-IL-6 联合 hHGF 以分子克隆的方法重组腺病毒载体, 观察 Hyper-IL-6 与 hHGF 这两个基因相互序贯协同作用, 进一步促进肝细胞增殖、修复、加强肝细胞的合成功能以及其对实验性肝衰竭的保护作用, 从而进一步开拓细胞因子、基因治疗肝衰竭的前景, 为肝衰竭的治疗提供可靠的实验室依据。

三、项目提供成果的形式和内容

1、发表论文(2)篇, 其中 EI 收录(0)篇, SCI 收录(1)篇, 发表论文应单独标注: 重庆市自然科学基金项目(cstc2012jjA10052)资助;

2、出版专著(0)部;

3、申请发明专利(0)项, 获权发明专利(0)项;

4、获省部级称号(0)个, 荣誉称号(0)个;

5、培养研究生(2)名;

6、其他: _____。

三、甲方为乙方提供本项目研究经费 5 万, 在签约后一次拨付; 乙方自筹或匹配经费 0 万。

四、项目主要研究人员

主要研究人员(含项目负责人): (须如实填写, 以便检查核实)						
姓名	学历	职称	工作单位	项目中的分工	每年工作时间(月)	签名
杨春	本科	副高	重庆医科大学	课题负责人, 负责课题设计、组织实施、实验数据收集整理、技术指导和统计等工作		
秦波	研究生	高级	重庆医科大学	重组腺病毒的构建	4	

项目编号: cstc2012jjA10052 项目名称: Hyper IL-6 和 HGF 双基因重组腺病毒及促慢加急性肝衰竭大鼠
肝细胞增殖的研究

周向阳	研究生	高级	美国费城 Wistar 研究所	技术指导	3	
朱卫民	研究生	副高	重庆医科大学	细胞培养	6	
卢曦	研究生	初级	重庆医科大学	体外实验	6	
龚学艳	研究生	其他	重庆医科大学	动物实验	7	

五、其他条款

- 1、甲方中途无故撤销或不履行任务书, 所拨经费不得追回。
- 2、乙方因某种原因致使计划无法执行, 而要求中止任务书, 应视不同情况, 部分、全部退还所拨经费; 如乙方没有提出中止任务书的要求, 甲方根据调查情况有权提出中止任务的处理意见, 甚至收回全部经费。
- 3、项目执行过程中, 由于乙方的原因造成的经费超支, 由乙方自行解决。
- 4、乙方申报成果、专利、发表论文时需注明由重庆市科委自然科学基金计划资助项目字样 (英文标注为 "Supported by Natural Science Foundation Project of CQ CSTC")。乙方因实施本任务书项目而引起的各种知识产权纠纷由乙方负全部责任。
- 5、乙方在项目实施过程中应建立相应的规章制度, 加强安全管理, 确保人员及设备安全, 并对科研安全工作负全部责任。
- 6、项目完成后, 乙方应向甲方提出结题申请, 并根据甲方要求进行项目结题后, 该任务书项目才能作为正式完成。

六、任务书签订各方

甲方: 重庆市科委代表 能力建设与基础研究处 处长 黄昕 (签章)

项目管理人 范亮 (签章)



乙方: 单位负责人 雷寒 (签章)

项目负责人 杨春 (签章)

帐户名: 重庆医科大学

帐号: 108805388999

开户银行: 中国银行重庆九龙坡支行转袁家岗支行

(单位签章)

二〇一 年 月 日