



项目批准号	81560105
申请代码	H0317
归口管理部门	
依托单位代码	55000408A1611-0556



81560105 1004297

国家自然科学基金委员会 资助项目计划书

资助类别：地区科学基金项目

亚类说明：

附注说明：

项目名称：calpain2及其抑制蛋白在肝纤维化内质网应激介导的肝细胞凋亡中的作用研究

直接费用：37万元 间接费用：7.4万元

项目资金：44.4万元 执行年限：2016.01-2019.12

负责人：谢汝佳

通讯地址：贵州省贵阳市花溪大学城贵阳医学院病理生理学教研室

邮政编码： 电 话：0851-8416078

电子邮件：592153968@qq.com

依托单位：贵阳医学院

联系人：王欢 电 话：0851-8416078

填表日期：2015年09月01日

国家自然科学基金委员会制

Version: 1.004.297



国家自然科学基金委员会资助项目计划书填报说明

- 一、项目负责人收到《关于国家自然科学基金资助项目批准及有关事项的通知》（以下简称《批准通知》）后，请认真阅读本填报说明，参照国家自然科学基金相关项目管理办法及《国家自然科学基金资助项目资金管理办法》（请查阅国家自然科学基金委员会官方网站首页“政策法规”-“管理办法”栏目），按《批准通知》的要求认真填写和提交《国家自然科学基金委员会资助项目计划书》（以下简称《计划书》）。
- 二、填写《计划书》时要求科学严谨、实事求是、表述清晰、准确。《计划书》经国家自然科学基金委员会相关项目管理部门审核批准后，将作为项目研究计划执行和检查、验收的依据。
- 三、《计划书》各部分填写要求如下：
 - （一）简表：由系统自动生成。
 - （二）摘要及关键词：各类获资助项目都必须填写中、英文摘要及关键词。
 - （三）项目组主要成员：计划书中列出姓名的项目组主要成员由系统自动生成，与申请书原成员保持一致，不可随意调整。如果批准通知中“项目评审意见及修改意见表”中“对研究方案的修改意见”栏目有调整项目组成员相关要求的，待项目开始执行后，按照项目成员变更程序另行办理。
 - （四）资金预算表：按批准资助的直接费用填报资金预算表和预算说明书，其中的劳务费、专家咨询费金额不应高于申请书中相应金额；间接费用及项目总经费由系统自动生成。国家重大科研仪器研制项目还应按照预算评审后批复的直接费用各科目金额填报资金预算表、预算说明书及相应的预算明细表。
 - （五）正文：
 1. 面上项目、青年科学基金项目、地区科学基金项目：如果《批准通知》中没有修改要求的，只需选择“研究内容和研究目标按照申请书执行”即可；如果《批准通知》中“项目评审意见及修改意见表”中“对研究方案的修改意见”栏目明确要求调整研究期限和研究内容等的，须选择“根据研究方案修改意见更改”并填报相关修改内容。
 2. 重点项目、重点国际（地区）合作研究项目、重大项目、国家重大科研仪器研制项目：须选择“根据研究方案修改意见更改”，根据《批准通知》的要求填写研究（研制）内容，不得自行降低、更改研究目标（或仪器研制的技术性能与主要技术指标以及验收技术指标）或缩减研究（研制）内容。此外，还要突出以下几点：
 - （1）研究的难点和在实施过程中可能遇到的问题（或仪器研制风险），拟采用的研究（研制）方案和技术路线；
 - （2）项目主要参与者分工，合作研究单位之间的关系与分工，重大项目还需说明课题之间的关联；
 - （3）详细的年度研究（研制）计划。



3. 国家杰出青年科学基金、优秀青年科学基金和海外及港澳学者合作研究基金项目：须选择“根据研究方案修改意见更改”，按下列提纲撰写：
 - (1) 研究方向；
 - (2) 结合国内外研究现状，说明研究工作的学术思想和科学意义（限两个页面）；
 - (3) 研究内容、研究方案及预期目标（限两个页面）；
 - (4) 年度研究计划；
 - (5) 研究队伍的组成情况。
4. 对于其他类型项目，参照面上项目的方式进行选择和填写。



简表

申请者信息	姓 名	谢汝佳	性 别	女	出生年月	1979年03月	民 族	汉族
	学 位	博士			职称	副教授		
	电 话	0851-8416078		电子邮件	592153968@qq.com			
	传 真			个人网页				
	工 作 单 位	贵阳医学院						
	所 在 院 系 所							
依托单位信息	名 称	贵阳医学院					代码	55000408A1611
	联 系 人	王欢		电子邮件	wanghuan_china@hotmail.com			
	电 话	0851-8416078		网站地址	www.gmc.edu.cn			
合作单位信息	单 位 名 称							代 码
项目基本信息	项 目 名 称	calpain2及其抑制蛋白在肝纤维化内质网应激介导的肝细胞凋亡中的作用研究						
	资 助 类 别	地区科学基金项目			亚 类 说 明			
	附 注 说 明							
	申 请 代 码	H0317:肝纤维化、肝硬化与门脉高压症						
	基 地 类 别							
	执 行 年 限	2016.01-2019.12						
	直 接 费 用	37万元			间 接 费 用	7.4万元		
	项 目 资 金	44.4万元						



项目摘要

中文摘要(500字以内):

慢性肝病在我国发病率很高,特别是慢性肝炎迁延不愈所致肝纤维化在临床上非常常见。目前有关肝纤维化发病机制的研究认为除HSC活化外,肝细胞凋亡过度也是肝纤维化发生的机制之一。既往研究认为细胞凋亡主要由死亡受体和线粒体依赖的凋亡通路介导,而近年的研究发现内质网应激(ERS)也可介导细胞凋亡过程,并与肝纤维化的发生有一定的联系。目前,关于ERS介导细胞凋亡过程中关键信号分子caspase12活化的机制尚不清楚,推测可能与钙蛋白酶calpain2对caspase12的水解有关。由于caspase12是ERS介导凋亡的特异性信号通路,因此深入探讨caspase12的活化机制对于阐明ERS介导的凋亡信号通路以及为临床治疗寻找新的靶点具有重要意义。

关键词: 肝纤维化; 钙蛋白酶2; 钙蛋白酶抑制蛋白; 内质网应激; 细胞凋亡

Abstract(limited to 4000 words):

The prevalence of chronic liver disease in our country is very high, especially liver fibrosis induced by uncurable chronic hepatitis is very common in clinic. The researches on the pathogenesis of hepatic fibrosis recognize that extracellular matrix(ECM) deposition result from activation of hepatic stellate cell (HSC) is a key step in the development of liver fibrosis, but information from experimental systems also demonstrates that hepatocyte apoptosis is also sufficient to cause hepatic fibrogenesis. We have known that cell apoptosis can be initiated either by death receptor pathway or by mitochondrial-dependent apoptosis pathway, but current information continues to imply a direct link between endoplasmic reticulum stress (ERS) and cell apoptosis. Now, the activation mechanism of caspase12, a key signaling molecule in ERS-mediated apoptosis, is largely unknown. Calpain2 are a family of Ca^{2+} -dependent intracellular cysteine proteases, current studies suggested that calpain2 may be associated with the cleavage of caspase12. Because caspase12 pathway is a specific signaling pathway of ERS-mediated apoptosis, so to research the mechanism of caspase12 activation is very important, it may provide a new target for anti-fibrosis therapy. Our study tries to provide evidence for the important role of calpain2 in caspase12 activation at the ERS-mediated apoptosis during the liver fibrosis.

Keywords: hepatic fibrosis; calpain2; calpastatin; endoplasmic reticulum stress; apoptosis



项目组主要成员

编号	姓名	出生年月	性别	职称	学位	单位名称	电话	证件号码	项目分工	每年工作时间(月)
1	谢汝佳	1979.03	女	副教授	博士	贵阳医学院	0851-8416078	520112197903191720	项目负责人	8
2	杨勤	1964.03	女	教授	博士	贵阳医学院	13985013402	520103196403162842	项目指导	8
3	韩冰	1979.12	男	副教授	博士	贵阳医学院	13985101656	522701197912032217	项目实施	8
4	杨婷	1981.04	女	讲师	硕士	贵阳医学院	13985541853	520103198104192821	项目实施	8
5	沈雪	1987.03	女	硕士生	学士	贵阳医学院	15985137303	410502198703162528	项目实施	10
6	田甜	1989.07	女	硕士生	学士	贵阳医学院	15085970402	522725198907016621	项目实施	10
7	赵舒祺	1990.06	女	硕士生	学士	贵阳医学院	13246806586	650102199006180728	项目实施	10
8	薛启祥	1981.11	男	硕士生	其他	贵阳医学院	14785489531	370882198111285212	项目实施	10
9	刘幸	1988.12	女	硕士生	其他	贵阳医学院	15285647279	412822198812092462	项目实施	10
总人数		高级		中级		初级		博士后	博士生	硕士生
9		3		1						5



国家自然科学基金项目资金预算表（定额补助）

项目名称： calpain2及其抑制蛋白在肝纤维化内质网应激介导的肝细胞凋亡中的作用研究

项目负责人：谢汝佳

金额单位：万元

序号	科目名称	金额	备注
	(1)	(2)	(3)
1	一、项目资金支出	44.4000	/
2	（一）直接费用	37.0000	
3	1、设备费	0.0000	
4	（1）设备购置费	0.0000	
5	（2）设备试制费	0.0000	
6	（3）设备改造与租赁费	0.0000	
7	2、材料费	25.9600	购置抗体、细胞培养试剂、细胞凋亡检测试剂
8	3、测试化验加工费	3.0400	病理切片费；电镜检测费；血清生化指标检测
9	4、燃料动力费	0.0000	
10	5、差旅费	2.8000	参加国内学术会议约7人次
11	6、会议费	0.0000	
12	7、国际合作与交流费	0.0000	
13	8、出版/文献/信息传播/知识产权事务费	2.2000	论文发表版面费等
14	9、劳务费	3.0000	直接参加项目研究的研究生、博士后的劳务费
15	10、专家咨询费	0.0000	
16	11、其他支出	0.0000	
17	（二）间接费用	7.4000	
18	其中：绩效支出	1.8500	
19	二、自筹资金	0.0000	



预算说明书

(请对各项支出的主要用途和测算理由及合作研究外拨资金等内容进行详细说明, 可根据需要另加附页。)

1、仪器设备费: 无。

2、材料费: 25.96 万

(1) 购置各类一抗及二抗 (约 3.75 万): 用于免疫组织化学检测 (总计 60 个样本、8 个指标)、Western Blot (总计 60 个样本、8 个指标)、细胞免疫荧光检测 (总计 40 个样本、8 个指标) 及免疫共沉淀, 是本研究必须的实验试剂。其中单个指标的免疫组织化学检测约需抗体 100 μ l, 单个指标的 Western Blot 检测约需抗体 100 μ l, 单个指标的细胞免疫荧光检测约需抗体 100 μ l, 免疫共沉淀约需抗体 100 μ l。

(2) 荧光实时定量 PCR 试剂及耗材 (约 4.43 万): 用于 GRP78, Caspase3, Caspase12, Calpain2, Calpastatin mRNA 水平的检测。(总计 60 个样本, 每个样本设内参 β -actin, 同时每孔设 3 个副孔, 重复 3 次实验, 预计检测量为 $60 \times 2 \times 3 \times 3 = 1080$ 孔)

(3) 细胞培养试剂及耗材 (约 4.63 万): 用于体外肝细胞的培养。体外培养细胞用于细胞免疫荧光、Western Blot、荧光实时定量 PCR、RNA 干扰等实验。

(4) Western Blot 检测试剂及耗材 (约 1.94 万): Western Blot 制胶、转膜、化学发光等试剂及耗材。(总计 60 个样本, 8 个指标, 每个指标重复 3 次)

(5) siRNA 及转染试剂 (约 3.44 万): 用于 RNA 干扰实验。(实验分 4 组, 每组 5 个样本, 重复 3 次)

(6) 免疫荧光检测试剂 (约 1.44 万): 用于细胞免疫荧光检测的试剂。(实验分 4 组, 每组设 3 个副孔, 重复 3 次; 检测 8 个指标; 预计检测量 $4 \times 3 \times 3 \times 8 = 288$)

(7) 流式细胞仪检测试剂 (约 1.52 万): 用于体外培养肝细胞的凋亡检测。(实验分 4 组, 每组 5 个样本, 重复 3 次)

(8) TUNEL 检测试剂 (约 0.48 万): 用于肝脏组织切片细胞凋亡检测。(总计 60 个样本)

(9) Fluo-3 AM Ca^{2+} 荧光探针 (约 1.75 万): 用于胞浆内游离 Ca^{2+} 检测。(预计体内、体外实验共检测 100 样本)

(10) ER-tracker 内质网荧光染料 (约 1.28 万): 用于体外培养肝细胞的内质网免疫荧光染色。(实验分 4 组, 每组 5 个样本, 重复 3 次)

(11) 实验动物、饲料 (约 1.30 万): 大鼠 50 元/只, 总计 60 只; 饲料 25 元/斤, 约需 400 斤饲料。

名称	主要用途	单价 (元)	数量	总金额 (万)
GRP78 抗体 (100 μ l/支)	免疫组化、Western Blot、细胞免疫荧光	1300	3	0.39
Caspase3 抗体 (100 μ l/支)	免疫组化、Western Blot、细胞免疫荧光	1200	3	0.36
Caspase12 抗体 (100 μ l/支)	免疫组化、Western Blot、细胞免疫荧光、免疫共沉淀	1400	4	0.56
Calpain2 抗体 (100 μ l/支)	免疫组化、Western Blot、细胞免疫荧光、免疫共沉淀	1200	4	0.48



预算说明书

(请对各项支出的主要用途和测算理由及合作研究外拨资金等内容进行详细说明, 可根据需要另加附页。)

名称	主要用途	单价(元)	数量	总金额(万)
Calpastatin 抗体 (100μl/支)	免疫组化、 Western Blot、 细胞免疫荧光	1200	3	0.36
CHOP 抗体 (100μl/支)	免疫组化、 Western Blot、 细胞免疫荧光	1000	3	0.30
GRP94 抗体 (100μl/支)	免疫组化、 Western Blot、 细胞免疫荧光	1200	3	0.36
Talin 抗体 (100μl/支)	免疫组化、 Western Blot、 细胞免疫荧光	1100	3	0.33
β-actin 抗体(100μl/支)	Western Blot	1100	2	0.22
山羊抗大鼠 IgG (100μl/支)	免疫组化、 Western Blot	1300	3	0.39
TRIzol	mRNA 提取	1800	2	0.36
逆转录试剂盒	逆转录	2800	4	1.12
SYBR Premix Ex TaqII	荧光定量 PCR	2500	10	2.50
GRP78, Calpain2, Calpastatin, Caspase12, β-actin 引物	荧光定量 PCR	300	5	0.15
RNase-free Epp 管、PCR 薄壁 管、Tip 头等耗材	荧光定量 PCR	150	20	0.30
DMEM 培养基	细胞培养	200	24	0.48
胎牛血清	细胞培养	2700	10	2.70
0.25% 胰酶	细胞培养	1000	3	0.30
青、链霉素双抗	细胞培养	500	2	0.10
CO ₂ 气瓶	细胞培养	400	10	0.40
细胞培养瓶等耗材	细胞培养	150	30	0.45
DMSO	细胞冻存	1000	2	0.20
丙烯酰胺	Western Blot	500	2	0.10
甲叉双丙烯酰胺	Western Blot	500	2	0.10
Bradford 蛋白定量试剂盒	Western Blot	1000	4	0.40
PVDF 膜	Western Blot	1800	3	0.54
增强化学发光试剂盒	Western Blot	1600	5	0.80



预算说明书

(请对各项支出的主要用途和测算理由及合作研究外拨资金等内容进行详细说明, 可根据需要另加附页。)

名称	主要用途	单价(元)	数量	总金额(万)
Calpain2 siRNA	RNA 干扰	4800	3	1.44
Control siRNA	RNA 干扰	4000	3	1.20
siRNA Transfection Reagent	转染	1000	4	0.40
siRNA Transfection Medium	转染	500	5	0.25
siRNA Dilution Buffer	转染	300	5	0.15
免疫染色固定液	细胞免疫荧光	300	5	0.15
免疫染色洗涤液	细胞免疫荧光	300	5	0.15
免疫染色封闭液	细胞免疫荧光	300	5	0.15
免疫染色一抗稀释液	细胞免疫荧光	300	5	0.15
抗兔 DyLight 549	细胞免疫荧光	2100	2	0.42
抗兔 Alexa Fluor 488	细胞免疫荧光	2100	2	0.42
AnnexinV-FITC 细胞 凋亡检测试剂盒	流式细胞检测	3800	4	1.52
TUNEL 检测试剂	组织切片细胞 凋亡检测	1600	3	0.48
Fluo-3 AM Ca^{2+} 荧光探针	胞浆游离 Ca^{2+} 检测	3500	5	1.75
ER-tracker Red 内质网荧光 染料	内质网染色	3200	4	1.28
Wistar 大鼠	动物模型制备	50	60	0.30
饲料	大鼠喂养	25	400	1.00
总计				25.96

3、测试化验加工费 总计约 3.04 万元

(1) 流式细胞仪检测费用(约 0.60 万): 用于体外培养肝细胞的凋亡检测。50 元/样本, 约 40 个样本, 重复检测 3 次;

(2) 激光共聚焦检测费用(约 0.70 万): 用于胞浆内游离 Ca^{2+} 检测。70 元/样本, 约 100 个样本;

(3) 病理切片费(约 1.20 万): 用于肝组织切片 HE 染色、Masson 染色及免疫组织化学检测。20 元/切片, 60 个组织标本, 每个标本切 10 张切片;

(4) 电镜检测费用(约 0.24 万): 用于肝细胞内质网形态检测。40 元/样本, 约 60 个标本;

(5) 血清生化指标检测费用(约 0.30 万): 用于血清生化指标 ALT、AST 的检测。50 元/样本, 约 60 个标本。



预算说明书

(请对各项支出的主要用途和测算理由及合作研究外拨资金等内容进行详细说明,可根据需要另加附页。)

4、燃料动力费:无。

5、差旅费(约 2.80 万):主要用于参加国内学术会议产生的交通费、住宿费及会务费。参加国内学术会议约 7 人次;机票、住宿及会务费约 4000 元/人次。

6、会议费:无。

7、国际合作与交流费:无。

8、出版物/文献/信息传播费约 2.20 万:主要用于文章发表的版面费。国内核心期刊约 4500 元/篇,总计 3 篇;国外 SCI 收录期刊约 8000 元/篇,总计 1 篇;文献检索费 500 元。

9、劳务费约 3.0 万:直接参加项目研究的研究生的劳务费

沈雪: $10 \text{ 个月} \times 150 \text{ 元/月} \times 4 \text{ 年} = 6000$

田甜: $10 \text{ 个月} \times 150 \text{ 元/月} \times 4 \text{ 年} = 6000$

赵舒祺: $10 \text{ 个月} \times 150 \text{ 元/月} \times 4 \text{ 年} = 6000$

薛启祥: $10 \text{ 个月} \times 150 \text{ 元/月} \times 4 \text{ 年} = 6000$

刘幸: $10 \text{ 个月} \times 150 \text{ 元/月} \times 4 \text{ 年} = 6000$

10、专家咨询费:无。

11、其他支出:无。

项目负责人签字:

科研部门公章:

财务部门公章:



报告正文

根据专家提出的修改意见，将第一部分体内动物实验中细胞凋亡的检测方法改为TUNEL法检测肝组织中肝细胞凋亡，其余研究内容和研究目标按照申请书执行。

TUNEL法检测肝组织中肝细胞凋亡的具体方法：取各组大鼠肝组织石蜡切片常规脱蜡水化，滴加1：200稀释的Proteinase K 37℃消化10 min；滴加配置好的标记液，37℃孵育2 h；滴加封闭液，室温封闭30 min；甩掉封闭液，滴加1：100稀释的生物素化抗地高辛抗体，37℃反应30 min；滴加1：100稀释的SABC-FITC +POD 37℃反应30 min，0.01M TBS洗4次；每个样本随机抽取5个高倍镜下视野，以胞核标记上绿色荧光的细胞作为凋亡的细胞，计算出凋亡细胞占细胞总数的百分率。



国家自然科学基金资助项目签批审核表

	<p>我接受国家自然科学基金的资助，将按照申请书、项目批准意见和计划书负责实施本项目（批准号：81560105），严格遵守国家自然科学基金委员会关于资助项目管理、财务等各项规定，切实保证研究工作时间，认真开展研究工作，按时报送有关材料，及时报告重大情况变动，对资助项目发表的论著和取得的研究成果按规定进行标注。</p> <p>项目负责人（签章）： 年 月 日</p>	<p>我单位同意承担上述国家自然科学基金项目，将保证项目负责人及其研究队伍的稳定和研究项目实施所需的条件，严格遵守国家自然科学基金委员会有关资助项目管理、财务等各项规定，并督促实施。</p> <p>依托单位（公章） 年 月 日</p>					
本栏目由基金委填写	<p>科学处审查意见：</p>						
	<p>建议年度拨款计划（本栏目为自动生成，单位：万元）：</p>						
	年度	总额	第一年	第二年	第三年	第四年	第五年
	金额						
	<p>科学部审查意见：</p> <p>负责人（签章）： 年 月 日</p>						
本栏目主要用于重大项目等	<p>相关局室审核意见：</p> <p>负责人（签章）： 年 月 日</p>						
	<p>委领导审批意见：</p> <p>委领导（签章）： 年 月 日</p>						

课题任务书合同编号：黔科合 LH 字[2014]7074

密级：公开

贵州省科技计划

课题任务书

钙蛋白酶 calpain2 在肝纤维化内质

课题名称：网应激介导的细胞凋亡中的作用及机制研究

课题承担单位：贵阳医学院

课题负责人：谢汝佳

联系电话：13985441220

起止年限：2014-10-15 至 2016-12-31

贵州省科学技术厅

填 写 说 明

1、本任务书系贵州省科学技术厅为组织贵州省科技计划课题研究而设计，任务书甲方为贵州省科学技术厅，乙方为课题承担单位。

2、本任务书一式六份，由贵州省科学技术厅与课题承担单位签订，课题承担单位一份；课题承担单位主管部门或所在地州市科技局各一份；贵州省科技厅三份；贵州省财政厅一份。

3、任务书应用计算机打印填报（A4），字迹要工整清楚。

4、课题任务书合同编号由贵州省科学技术厅统一规定。

5、课题密级由课题承担单位提出建议，贵州省科技厅认定。

贵州省科学技术厅

一、课题的目标、主要研究内容、实施地点及规模

（要解决的主要技术难点和问题，课题研究的创新点、内容、实施地点及规模等）

项目目标：

本研究的主要目标在于通过体内和体外实验，探讨肝纤维化时内质网应激介导肝细胞凋亡的具体机制，试图阐明 calpain2 与内质网应激介导细胞凋亡中关键分子 caspase12 活化之间的相互关系，为内质网应激在肝纤维化发生发展中的机制研究拓展思路，同时也为临床肝纤维化的治疗提供新的药物靶点。

主要研究内容：

1、建立肝纤维化动物模型，对正常组大鼠及肝纤维化大鼠肝组织中内质网应激标志蛋白 GRP78 在基因及蛋白水平的表达情况进行研究；

2、对正常组大鼠及肝纤维化大鼠肝组织中细胞凋亡情况进行研究；

（1）采用流式细胞仪检测各组大鼠肝组织中肝细胞凋亡的总体情况。

（2）采用免疫组化、western blot及荧光实时定量PCR检测内质网应激介导细胞凋亡过程中关键信号分子caspase12及其下游caspase3在蛋白及基因水平的表达变化；同时采用western blot检测caspase12及caspase3的剪切活化程度，以此来判断肝纤维化时ERS介导细胞凋亡过程中caspase12信号通路是否活化。

3、对正常组大鼠、肝纤维化大鼠肝组织中calpain2在蛋白及基因水平的表达变化进行研究；

4、建立体外内质网应激细胞模型，对各组肝细胞中内质网应激标志蛋白 GRP78在蛋白及基因水平的表达变化进行研究；

5、对体外 DTT 诱导的肝细胞 ERS 时肝细胞的凋亡情况进行研究；

（1）采用流式细胞仪检测各组肝细胞的凋亡情况；

（2）采用免疫荧光及荧光实时定量PCR检测内质网应激介导细胞凋亡过程中关键信号分子caspase12及其下游caspase3在蛋白及基因水平的表达变化；同时采用western blot检测caspase12及caspase3的剪切活化程度。

6、对体外DTT诱导的肝细胞ERS时肝细胞中calpain2的表达水平进行研究；

7、calpain2 siRNA 转染体外培养的肝细胞，观察在calpain2基因沉默的情

况下，使用DTT刺激肝细胞后caspase12活性的改变及对细胞凋亡的影响。

主要技术难点和问题分析：

1、动物模型及内质网应激细胞模型的建立：本课题组已具备较成熟的肝纤维化动物模型建立的方法和条件；对于内质网应激细胞模型的建立需要摸索条件和方法，以确定合适的药物诱导浓度及作用时间。

2、检测指标的技术中流式细胞仪检测、激光共聚焦检测及 RT-PCR 检测设备要求较高，技术复杂，试剂较为昂贵。此外，本次研究中涉及到的 siRNA 技术本课题组在前期研究中未涉及，我们将在充分参考相关文献报道的基础上做好预实验并对实验中遇到的问题及时进行调整，确保获得准确而且理想的实验结果。

创新点：

1、目前，关于 calpain 与肝脏疾病的研究主要集中在肝脏的缺血-再灌注损伤和急性肝损伤方面，关于 calpain2 与肝纤维化的关系除本课题组的前期研究外，目前国内外未见其他相关报道。

2、我们的研究以 ERS 介导凋亡过程中关键分子 caspase12 的活化为出发点，探讨肝纤维化 ERS 时 calpain2 与 caspase12 活化之间的关系，对于阐明肝纤维化时 ERS 介导的细胞凋亡通路具有十分重要的意义，与此相关的研究国内外尚无文献报道。

实验地点及实验规模：

本课题拟在贵阳医学院病理生理学特色重点实验室完成。该实验室所依托的贵阳医学院病理生理学专业是贵州省第一批省属重点学科，2011 年被评为贵州省特色重点学科，也是全省唯一的一个医学博士授予点，拥有全省先进的医学科研设备和较强的科学研究队伍，具备先进的形态学观察与研究的设备和从事细胞培养、分子生物学实验及生化检测等较为完善的实验室条件。实验规模以实验室细胞研究及动物实验为主。

二、课题的考核指标

〔包括①主要技术指标：如形成的专利、新技术、新产品、新装置、论文专著等数量、指标及其水平等；②主要经济指标：如技术及产品应用所形成的市场规模、效益等；③项目实施中形成的示范基地、中试线、生产线及其规模等；④其它应考核的指标〕

考核指标：

- 1、提出肝纤维化的发生发展过程中存在肝细胞内质网应激反应；
- 2、证实肝纤维化时钙蛋白酶Calpain2的表达上调参与了肝纤维化的发生发展过程；
- 3、证实肝细胞内质网应激介导的细胞凋亡是通过 Calpain2 激活 Caspase12 信号通路来实现的；Calpain2 基因沉默能够减少 Caspase12 的活化，并在一定程度上减轻肝细胞的凋亡。
- 4、在国内核心期刊发表论文 2 篇，在 SCI 收录的期刊发表论文 1 篇。

贵州省科学技术厅

三、课题的年度计划及年度目标

年度	课题的年度计划及年度目标
2014 年	2014.10-2015.3; 完成肝纤维化动物模型的复制及标本采集; 完成肝组织病理学检查、血清生化指标检测;
2015 年	2015.4-2016.04; 完成肝组织及体外培养的肝细胞中 GRP78, calpain2, caspase12,caspase3 在蛋白及基因水平的表达检测; 完成肝组织及体外培养的肝细胞的凋亡检测; 完成 calpain2 siRNA 的细胞转染及相关指标的检测;
2016 年	2016.05-2016.12; 进行数据的收集整理及统计分析, 撰写学术论文并发表, 结题验收。
年	
年	

四、项目的承担单位、参加单位及主要研究人员

课题承担单位：				主要参加单位：		
贵阳医学院						
项目负责人						
姓 名	性 别	年 龄	职务职称	业务专业	为本项目工 作时间(%)	所在单位
谢汝佳	女	35	副教授	病理生理学	60	贵阳医学院
主要研究人员						
姓 名	性 别	年 龄	职务职称	业务专业	为本项目工 作时间(%)	所在单位
杨勤	女	50	教授	病理生理学	50	贵阳医学院
韩冰	男	35	副教授	病理生理学	60	贵阳医学院
杨婷	女	33	讲师	病理生理学	60	贵阳医学院
沈雪	女	27	研究生	病理生理学	80	贵阳医学院
薛启祥	男	32	研究生	病理生理学	80	贵阳医学院

五、课题的经费预算

单位：万元

经费来源预算					经费支出预算				
科 目		预算数			科 目	预算数	专项经费	自筹经费	
来源预算合计		8.0			支出预算合计	8.0	6.0	2.0	
一、省科技计划拨款	合 计	20	20	20	一、直接费用				
	6.0								
二、国家其它拨款					1、设备费				
三、部门拨款					（1）购置设备费				
四、地方拨款					（2）试制设备费				
五、单位自筹					（3）设备改造与租赁费				
六、其它来源		2.0			2、材料费	4.5	3.5	1.0	
					3、测试化验加工费	1.0	0.5	0.5	
					4、燃料动力费	0.5	0.5		
					5、差旅费	0.5	0.5		
					6、会议费				
					7、国际合作与交流费				
					8、出版/文献/信息传播/ 知识产权事务费	1.0	0.5	0.5	
					9、劳务费	0.5	0.5		
					10、专家咨询费				
					11、其他支出				
					二、间接费用				
					其中：绩效支出				

六、任务书签订各方意见

贵州省科学技术厅（甲方）

（公 章）

负责人（签字）

年 月 日

课题承担单位（乙方）

课题负责人（签字）

（公 章）

财务负责人（盖章）

年 月 日

帐 户 名：

帐 号：

开户银行：

贵州省科学技术厅

资金等匹配条件落实保证方

乙方主管部门或地州市科技局

（公 章）

负责人（签字）

年 月 日

七、共同条款

1、乙方必须按要求编报年度计划执行情况、下一年度经费预算和有关统计报表，及时上报甲方，逾期不报，甲方有权暂停拨款。

2、任务执行过程中，乙方如需调整任务，应向甲方提出变更内容及其理由的申请报告，经甲方审定后实施。未经接到正式批准书以前，双方须按原任务书履行，否则后果由自行调整的一方负责。

3、乙方因某种原因（如：与可行性研究内容有出入、挪用经费、技术措施或某些条件不落实）致使计划无法执行，而要求中止任务，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的要求，甲方可根据调查情况有权提出中止任务。

4、乙方承担任务所需拨经费按国家科技三项费财务管理有关规定的使用范围开支。

5、甲方根据科技三项费经费开支的规定，监督经费的使用情况。凡不符合规定的开支，甲方负责提出调整意见。必要时，有权直接提出调整或撤销意见。

6、任务执行过程中，甲方无故中止任务时，所拨经费、物资不得追回，并承担善后处理所发生的费用。甲方提出变更任务书有关内容时，要与乙方协商达成书面协议。

7、若课题承担单位的上级主管部门或所在地的地州市科技局，承诺课题实施需要的配套资金等条件，须在课题任务书配套条件落实保证方栏加盖公章。

8、任务书正式文本一式六份，甲方三份、乙方一份、乙方主管部门或所在地州市科技局一份，省财政厅一份。

9、本任务书所协议的其它条款如下：

①

②

科技计划项目合同公共信息统计指标表

项目合同编号		黔科合 LH 字[2014]7074													
项目名称		钙蛋白酶 calpain2 在肝纤维化内质网应激介导的细胞凋亡中的作用及机制研究													
密 级		(公开) 1 绝密 2 机密 3 秘密 4 公开								参加单位总数		1 个			
项目 承担 单位	名称	贵阳医学院													
	单位所在地	贵州省贵阳市								是否少数民族地区		(是) 1、是 2、否			
	通讯地址	贵州省贵阳市北京路 9 号										邮编		550004	
	单位性质	() 1、大专院校 2、科研院所 3、企业 4、其它													
	上级行政主管部门	贵州省教育厅													
其它 主要 参加 单位	序号	单位名称													
项目负责人	姓名	谢汝佳				性别 (女) 1、男 2、女		出生年月		1979-03-19					
	民族					是否少数民族		(否) 1、是 2、否							
	学历	() 1、研究生 2、大学 3、大专 4、中专 5、其它													
	学位	() 1、博士 2、硕士 3、学士 4、其它													
	职称	() 1、正高级 2、副高级 3、中级 4、初级 5、其他													
	E-mail	xierujia790319@163.com													
	联系电话	0851-8416078		手机		13985441220		传真							
项目组人数	6	正高级	1	副高级	2	中级	1	初级	0	其他	2	总人年	0		
		博士	3	硕士	1	学士	2	其他	0	高级技工	0				
项目起始时间	2014-10-15				终止时间				2016-12-31						
项目活动类型	(基础研究) 1、基础研究 2、应用基础研究 3、应用开发 4、产业化开发 5、其它														
所属技术领域	(生物、医药) 1、电子信息 2、光机电一体化 3、自动化 4、材料 5、能源 6、交通 7、农业 8、资源 9、环境 10、生物医药 11、社会事业 12、新材料及应用 13、其它														
所属学科	(生命科学) A、数理科学 B、化学科学 C、生命科学 D、地球科学 E、工程与材料科学 F、信息科学 G、管理科学														
项目技术来源	() 1、国内技术 2、国外技术 3、自主开发 4. 引进消化再吸收 5. 产学研结合														
经费投入情况 (经费单位: 万元)	总投入经费				8.000		科技厅合同拨款				6.000				
	国家其他资助 (包括部门匹配)				0		地方政府匹配				0				
	其他科技计划资助				0		单位自筹经费				0				
	银行贷款				0		其他经费				2.000				
经济产出指标	产值 (万元)				0		销售收入 (万元)				0				

	利税总额（万元）					0		利润（万元）			0					
	税收（万元）					0		出口额（万美元）			0					
社会效益产出指标	人均增收（元）		0			人员培训（人次）			0		新增就业人数		0			
科技产出情况	项目完成时技术团队（人）					0		其中高级职称（人）			0					
	论文（篇）						收录情况				专著（部）					
	国际核心期刊	国际一般期刊	国内核心期刊	国内一般刊物	省级核心刊物	省级一般刊物	SCI收录	EI收录	ISTP收录	ISR收录	出版	待出版				
	0	0	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0				
	博士后（人）		0		博士（人）		0		硕士（人）		0		中青年学术带头人（人）		0	
	博士论文（篇）			0			硕士论文（篇）			0						
	专业技术职务由初晋升为中级的人数（人）			0			专业技术职务由中级晋升为高级的人数（人）			0						
	形成研究（咨询）报告（篇）			0			已获专利总项数			0						
	申请发明专利项数				0		获得发明专利项数				0					
	其中国外				0		其中国外				0					
	申请实用新型专利数				0		获得实用新型专利数				0					
	其中国外				0		其中国外				0					
	申请各类标准数				0		获得各类标准数				0					
	其中国外				0		其中国外				0					
	其他知识产权数			计算机软件登记			项数：			0						
							名称：									
				集成电路布图设计			项数：			0						
							名称：									
				生物新品种登记			项数：			0						
							名称：									
				其 他			项数：			0						
							名称：									
	成果获政府最高奖励情况						奖励名称									
							奖励等级									
							授奖单位									
	成果应用情况						首次应用时间									
							应用次数			0						
							应用行业									
成果可推广项数					0		申请奖励数		国家级		省部级		其他			
举办学术交流会			国外		国内				0		0		0			

	(次)	0	0				
	试验基地	0	(个)	中试线	0	(条)	
	示范点(区)	0	(个)	生产线	0	(种)	
	新产品	0	(项)	新材料	0	(种)	
	新技术、新工艺	0	(项)	新成套设备	0	(项)	

科技计划项目合同公共信息统计指标表说明

- 1、带（）的条目，请根据条目后所列选项，请在“（）”内填写相应的数字即可。
- 2、项目组织单位：指课题任务书的甲方单位，按公章的详细名称填写，不要填简称。
- 3、课题承担单位所在地：课题承担单位，指课题任务书的乙方。所在地只填到所在地州市。
- 4、课题承担单位性质，先按所列大类选填数字。
- 5、参加单位总数：包括承担单位、合作单位、协作单位在内的单位总数。
- 6、课题承担单位名称：请按公章的详细名称填写。地址应详细到县（区）、街（路）门牌号。
- 8、课题负责人：请按课题任务书填写。
- 9、课题组人数：包括课题负责人在内的的参加该课题研究工作的所有人员。