

项目编号: 2018C018

南方医科大学南方医院

院长基金
项目申请（任务）书

项目名称: 臭氧通过 IL-10-JAK/STAT 正反馈环路促进组织再生的机制研究

申请（资助）类别: 青年项目

负责人: 郝珂楠 手机: 15625061310

E-Mail : 691376241@qq.com

所在科室: 介入二病区（江高院区）

工作电话: 020-62781160

填表日期: 2018-12-26

南方医科大学南方医院科研处

二〇一七年制

一、简表

申请者信息	姓名	郝珂楠		性别	女		出生年月	1987.02		民族	汉	
	学位	硕士研究生		职称	医师		主要研究领域	介入和臭氧治疗				
	工作电话	020-62781160					手机	15625061310				
	电子邮箱	691376241@qq.com										
项目基本信息	项目名称	臭氧通过 IL-10-JAK/STAT 正反馈环路促进组织再生的机制研究										
	研究领域	4	1. 生物技术 2. 预防医学 3. 临床医学 4. 基础医学 5. 药学 6. 中医与中西医结合 7. 其它									
	研究类别	1	1. 基础研究 2. 应用研究 3. 开发研究 4. 其它									
	关键词	臭氧；组织再生；免疫；中性粒细胞；白介素										
	申请（资助）类别	1	1. 青年项目 2. 面上项目 3. 重点项目 4. 专项项目									
	起止时间	2019.01-2021.12					申请（资助）经费（单位：万元）			3		
其他项目组成员	姓名	年龄	职称/职务	所在科室	项目中的分工				签名			
	何晓峰	55 岁	主任医师	介入科	项目指导				何晓峰			
	李新民	53 岁	副主任医师	介入科	基础实验				李新民			
	冯建宇	51 岁	副主任护师	介入科	臭氧水监测				冯建宇			
	唐水英	39 岁	主治医师	介入科	基础实验				唐水英			
	谢华宁	23 岁	技师	介入科	臭氧机管理及文献查新				谢华宁			
	李锦程	23 岁	研究生	介入科	实验数据分析				李锦程			
主要内容及预期目标	临床实践证实臭氧对组织损伤后再生有促进作用，但其分子机制尚缺乏明确阐述。我们前期通过实验成功建立了臭氧作用于斑马鱼的动物模型，验证了臭氧可以促进斑马鱼尾鳍切除后的再生，探讨了该促进作用与臭氧调节中性粒细胞数量及 IL-10、STAT3、TNF-α 等炎症因子相关。本项目拟进行：①应用 QPCR、Western Blot、流式细胞技术及转基因荧光斑马鱼、共聚焦显微镜进行臭氧对上述细胞及因子的生物学作用的验证；②探讨臭氧通过调节中性粒细胞上调 LPC 激活巨噬细胞；③应用相应基因抑制技术及因子抑制剂进一步证实臭氧通过上述调节网络促进组织再生；④根据上述实验结果，证实臭氧促进组织再生，为臭氧治疗各种创伤提供理论支持。											

说明：1.简表中有标明数字的项目在表格中填入相应数字
2.简表中无标明数字的项目直接填入所要求的内容（不得超过 300 字）

二、立题依据

1. 本研究的目的意义，国内外同类研究工作的现状与存在的问题：

一、研究意义

临床工作中，各种创面愈合是医生较为关注的问题，其中糖尿病足溃疡的治疗尤为突出。随着糖尿病患者越来越多，糖尿病足患者数量也逐渐增多。根据统计，每年全世界有不低于400万的糖尿病患者受到糖尿病足（足部溃疡）的折磨，在这些人群中，又有超过80%的患者因为溃疡延迟愈合和坏疽选择截肢，严重影响了糖尿病患者的生存质量。此外，糖尿病足治疗花费较高，治疗周期长，效果差，对患者而言，足部溃疡的治疗往往是昂贵且漫长的“抗战”，这使得糖尿病足治疗成为了多数糖尿病患者家庭甚至整个医疗卫生体系、社会的重要负担，寻找促进糖尿病足溃疡愈合的治疗方法成为了亟待解决的问题。

臭氧是由3个氧分子构成的极不稳定的气体，其较氧气易溶于水。临床实践证明，对于不同创伤，如擦伤、挫裂伤、烧伤^[1]、切刺伤、烫伤、砸伤、宫颈糜烂、糖尿病引起的难治性溃疡及坏疽性脓皮病，臭氧水冲洗治疗对促进创面愈合均有较好效果^[2, 3]。此外，对于牙周组织损伤^[4]、放射治疗产生的放射性损伤^[5, 6]、下肢静脉曲张^[7]、阿霉素^[8]及麻风^[9]引起的皮肤损伤等，臭氧治疗亦可促进相应的组织再生。因此，臭氧治疗对于糖尿病足患者足部溃疡再生的促进作用有待进一步验证，其机制也需要我们进行深入的探讨。

二、国内外研究现状

1、臭氧可以促进各种创伤后的组织再生。

臭氧应用于医学初始于二十世纪初，最开始在一战期间为伤员治疗坏疽。经过多年的临床实践，臭氧治疗已广泛用于椎间盘突出症、病毒性肝炎、关节疼痛、创伤愈合、外周动脉疾病、糖尿病足、口腔疾病等辅助治疗，并取得很好的疗效，最初的创面治疗方面也取得了进展。多项研究证实臭氧可促进组织再生。对于二度烧伤病人，相较于最新的透明质酸治疗，臭氧油在促进创面愈合、抑制创面黑色素沉着方面有明显优势，但在改善红斑、紧张、瘙痒和烧灼感方面并无明显差别^[10]；一例由于骨筋膜室综合症导致的下肢骨骼及皮肤创面愈合困难的患者，经过臭氧治疗后得以治愈^[11]。临床肿瘤放射治疗中，总会出现放疗区域皮肤损伤或周围软组织损伤，臭氧的腹腔注射可以预防及缓解这些损伤；如前列腺癌患者放疗后的出血性肠炎，臭氧局部喷洒就显著的缓解了肠道炎症，减轻的患者的出血症状^[12]。

臭氧相关的动物实验也证实，臭氧处理能提高鼠移植皮瓣的成活率^[13]。在部分切除肝脏的小鼠及犬胰腺炎模型上，臭氧治疗可以加快坏死组织清除，减轻组织炎症，促进胰腺炎的恢复^[14, 15]。而在我们前期斑马鱼尾鳍再生的实验中，也证实了臭氧加速尾鳍切除后的再生^[16]。值得注意的是，对于门齿拔除及先天颅骨缺陷的 Wistar 大鼠的白鼠，臭氧腹腔注气可以促进成骨细胞增殖及骨钙素阳性细胞数，增加骨小梁数量，促进了新骨生成^[17-19]。

2、臭氧促进组织再生的机制目前尚未阐述清楚。

对于臭氧促进再生的作用，推测其原理除抗菌外，作用机制还可能为：①臭氧能促进毛细血管开放和功能修复、提高红细胞携氧能力。②诱导细胞羟基脱氧鸟苷（8-OHdG）及血红素氧合酶-1（HO-1）的生成，激活机体氧化与抗氧化反应^[20]。③激活免疫性细胞，刺激干扰素、白介素、肿瘤坏死因子、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子等细胞因子释放，可以提高局部免疫功能^[21]。④刺激局部表皮生长因子 EGF 表达增多，TNF- α 表达减少，加速组织细胞再生。⑤增加细胞血小板衍生生长因子(PDGF)、转化生长因子- β (TGF- β)、血管内皮生长因子(VEGF)、细胞周期蛋白 D1(cyclin D1)表达增加，从而加速创面愈合^[22]。以上臭氧治疗疾病的所有结论均处于初步的研究阶段，对于臭氧治疗的机制并未有系统规范的研究，世界上也缺乏臭氧治疗的基础实验研究。

3、炎症在组织再生过程中起到重要的调节作用。

目前,炎症因子的作用越来越被人们重视,近期的实验表明,多种炎症因子参与了人体各种病理生理反应,其中亦包含组织损伤后的再生,如:IL-4可以促进肝脏组织损伤后的再生^[23],肾周细胞通过旁分泌炎症因子促进受损的肾小管上皮及肾小球足细胞再生^[24];而给予抑制剂或抗炎药物则会抑制组织损伤后的再生^[25]。长期的临床实践即研究发现,糖尿病足溃疡病变中的持续性炎症浸润可能是创面的延迟愈合的主要原因,因此,局部溃疡的炎症调控,成为了糖尿病足治疗的主要方向。

4、臭氧促进了组织创面中性粒细胞的聚集。

中性粒细胞是一种多核白细胞,来源于骨髓,具趋化作用、吞噬作用和杀菌作用,是人体血液中主要的免疫细胞,它们巡视并保护宿主免受病原体和其他有害试剂的伤害,是急性炎症反应的主要参与者。作为先天性免疫应答的第一批维护者之一,中性粒细胞对感染或有害物质产生快速而强劲的反应。它们是首先到达炎症部位的白细胞,通过多种机制消除病原体。实验数据和临床研究表明,中性粒细胞对于感染的消除是至关重要的,血液中中性粒细胞的减少会导致严重的免疫缺陷。

斑马鱼作为新兴的动物模型,已经成为实验动物模型中的新宠,其具有以下优缺点:生命周期比较短,低维护成本,空间要求小,繁衍后代数量庞大。此外,透明的斑马鱼携带荧光蛋白,使其成为实时监控特定细胞动向的优质实验动物。这些功能使研究人员观察和跟踪特定的细胞和基因表达。此外,免疫系统在生物进化过程中高度保守,即低等动物的免疫反应与高等动物基本相同^[26]。因此,转基因斑马鱼是一个合适监控活体免疫细胞增值、迁移及凋亡的动物模型^[27]。

Tg(mpo:GFP)转基因斑马鱼在中性粒细胞髓过氧化物酶启动子位置接入绿色荧光蛋白,使其可以在荧光显微镜下观察到斑马鱼体内中性粒细胞的数量及迁徙情况。我们应用该品系斑马鱼进行了尾鳍切除后活体中性粒细胞迁移观察。实验结果显示尾鳍切除后,臭氧处理可以增加创面中性粒细胞数量,证实臭氧促进了中性粒细胞的聚集,这也许是臭氧调节组织再生的重要方式^[21]。但臭氧是否可以同时促进中性粒细胞的凋亡,还有待后续实验继续探讨。

5、中性粒细胞的凋亡促进巨噬细胞分泌 IL-10 促进组织再生。

目前认为,中性粒细胞可能通过以下三种机制修复受损组织:①通过识别吞噬损伤部位的组织碎片促进组织再生,但其具体机制仍在探讨。②成熟的中性粒细胞可以迅速释放存储在其细胞核和细胞颗粒中的生长因子及促血管生成因子,因此直接有助于受损组织的再生。③中性粒细胞促进组织修复最重要的机制是:中性粒细胞发生凋亡并向组织中释放溶血磷脂酰胆碱(LPC),LPC吸引巨噬细胞吞噬清除中性粒细胞^[28],而该清除过程启动了巨噬细胞释放转化生长因子-β(TGF-β)和白细胞介素-10(IL-10),进而抑制局部组织慢性炎症的持续,并促进组织再生^[29]。因此,中性粒细胞聚集及凋亡具有加速组织修复的重要作用。

IL-10是一种多效的抗炎性细胞因子,其可由巨噬细胞产生,并受到创面局部中性粒细胞的调控。IL-10对包括树突状细胞在内的多种免疫细胞有广泛的生物学效应。我们前期的实验证实,在创伤修复后期的慢性炎症期,臭氧促进了IL-10的表达。因此我们猜测,臭氧通过激活中性粒细胞调节巨噬细胞中IL-10的表达,抑制了相关炎症反应,进而可以达到促进组织再生的目的。

6、炎症抑制因子 IL-10 通过调节 JAK/STAT 通路抑制炎症促进组织再生。

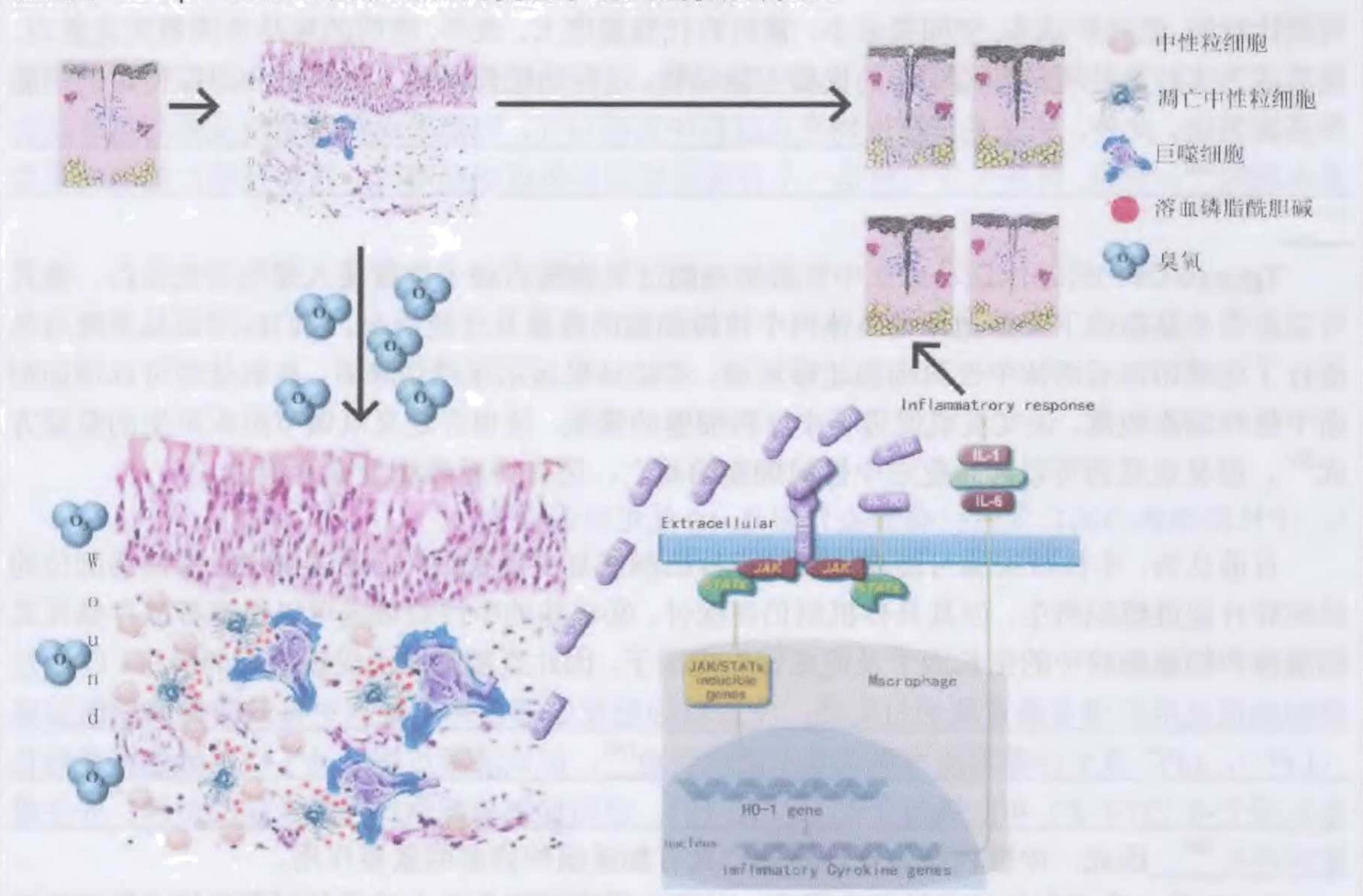
IL-10信号传递目前了解最多的是JAK/STAT途径。STAT3是人巨噬细胞中IL-10抗炎反应的主导性介质,起中枢作用。IL-10通过与细胞膜上IL-10受体结合激活JAK/STAT通路,并受到该通路的正反馈调控。有实验证实,在STAT3剔除的动物模型中,巨噬细胞不表达IL-10^[30]。因此我们检测了臭氧对于STAT3的作用。结果显示,臭氧在慢性炎症中促进了STAT3的表达,该结果提示IL-10可能参与了臭氧调控STAT3表达,即臭氧通过IL-10激活JAK/STAT通路,JAK/STAT通路又作用于IL-10,但这一推断仍需要通过IL-10抑制实验进行进一步的证

实。

激活的 JAK/STAT 通路可以抑制炎症因子 IL-1 β 、TNF- α 的表达，这可能在再生过程中起到重要的调节作用。根据文献报道，IL-1 β 、TNF- α 对于组织创伤再生的调节并非单一，再生早期的 IL-1 β 、TNF- α 高表达促进再生，而再生晚期持续的 IL-1 β 、TNF- α 高表达则抑制再生^[24]。因此认为炎症因子 IL-1 β 、TNF- α 的调节与组织再生有密不可分的关系。我们通过前期实验，证实了臭氧在再生早期促进了 IL-1 β 、TNF- α 的表达，而在再生晚期则抑制了 IL-1 β 、TNF- α 的表达，该结果提示臭氧根据组织再生的需要调节了 IL-1 β 、TNF- α 的表达。

在接下来的研究中，我们将继续探讨臭氧对于中性粒细胞凋亡、巨噬细胞激活、JAK/STAT 通路激活的作用，并通过敲除 STAT3 来阻断 JAK/STAT 通路，验证臭氧通过 IL-10 调控 JAK/STAT 对 IL-1 β 、TNF- α 的抑制，从而促进组织再生作用。

综上，我们提出了本项目的科学假说（如下图）：①我们证实了臭氧对于组织再生有促进作用，且该作用依赖于臭氧的持续作用；②臭氧促进中性粒细胞向创面迁移和凋亡，增加 LPC 的表达，激活巨噬细胞，上调了 IL-10 的表达；④IL-10 调控 JAK/STAT 通路中，抑制体内炎症因子 IL-1 β 、TNF- α 的表达从而促进了组织创伤后再生。



模式图：臭氧通过 IL-10-JAK/STAT 正反馈环路促进组织再生的机制研究（灰色区域为本项目暂不研究内容）。

总之，通过本项目的后续深入研究，我们可以进一步了解臭氧通过调节中性粒细胞、巨噬细胞及 IL-10-JAK/STAT 正反馈网络促进组织再生的机制，为临床应用臭氧治疗糖尿病足溃疡提供理论基础。

三、主要参考文献目录

1. Campanati A, De Blasio S, Giuliano A, Ganzetti G, Giuliadori K, Pecora T, Consales V, Minnetti I, Offidani A. Topical ozonated oil versus hyaluronic gel for the treatment of partial- to full-thickness second-degree burns: A prospective, comparative, single-blind, non-randomised, controlled clinical trial. Burns 2013;39(6):1178-1183.
2. Mutluoglu M, Karabacak E, Karagoz H, Uzun G, Ay H. Topical ozone and chronic wounds: improper use of therapeutic tools may delay wound healing. N Am J Med Sci 2012;4(11):615-616.

3. Wainstein J, Feldbrin Z, Boaz M, Harman-Boehm I. Efficacy of ozone-oxygen therapy for the treatment of diabetic foot ulcers. *Diabetes Technol Ther* 2011;13(12):1255-1260.
4. Gupta G, Mansi B. Ozone therapy in periodontics. *J Med Life* 2012;5(1):59-67.
5. Velikaya VV, Gribova OV, Musabaeva LI, Startseva Z, Simonov KA, Aleinik AN, Lisin VA. [Ozone therapy for radiation reactions and skin lesions after neutron therapy in patients with malignant tumors]. *Vopr Onkol* 2015;61(4):571-574.
6. Clavo B, Santana-Rodriguez N, Llontop P, Gutierrez D, Ceballos D, Mendez C, Rovira G, Suarez G, Rey-Baltar D, Garcia-Cabrera L, Martinez-Sanchez G, Fiuza D. Ozone Therapy in the Management of Persistent Radiation-Induced Rectal Bleeding in Prostate Cancer Patients. *Evid Based Complement Alternat Med* 2015;2015(480369).
7. Solovastu LG, Stincanu A, De Ascentii A, Cappare G, Mattana P, Vata D. Randomized, controlled study of innovative spray formulation containing ozonated oil and alpha-bisabolol in the topical treatment of chronic venous leg ulcers. *Adv Skin Wound Care* 2015;28(9):406-409.
8. Kesik V, Yuksel R, Yigit N, Saldır M, Karabacak E, Erdem G, Babacan O, Gulgun M, Korkmazer N, Bayrak Z. Ozone Ameliorates Doxorubicine-Induced Skin Necrosis - results from an animal model. *Int J Low Extrem Wounds* 2016;15(3):248-254.
9. Reis FJ, Correia H, Nagen R, Gomes MK. The Use of Ozone in High Frequency Device to Treat Hand Ulcers in Leprosy: a Case Study. *Trop Med Health* 2015;43(3):195-199.
10. Campanati A, De Blasio S, Giuliano A, Ganzetti G, Giuliadori K, Pecora T, Consales V, Minnetti I, Offidani A. Topical ozonated oil versus hyaluronic gel for the treatment of partial- to full-thickness second-degree burns: A prospective, comparative, single-blind, non-randomised, controlled clinical trial. *Burns* 2013;39(6):1178-1183.
11. Shah P, Shyam AK, Shah S. Adjuvant combined ozone therapy for extensive wound over tibia. *Indian J Orthop* 2011;45(4):376-379.
12. Clavo B, Santana-Rodriguez N, Llontop P, Gutierrez D, Ceballos D, Mendez C, Rovira G, Suarez G, Rey-Baltar D, Garcia-Cabrera L, Martinez-Sanchez G, Fiuza D. Ozone Therapy in the Management of Persistent Radiation-Induced Rectal Bleeding in Prostate Cancer Patients. *Evid Based Complement Alternat Med* 2015;2015(480369).
13. Oksuz M, Yuce S, Kocak OF, Canbaz Y, Ragbetli MC, Mercantepe T. Effects of ozone pretreatment on viability of random pattern skin flaps in rats. *J Plast Surg Hand Surg* 2015;1-6.
14. Gultekin FA, Cakmak GK, Turkcü UO, Yurdakan G, Demir FE, Comert M. Effects of ozone oxidative preconditioning on liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *J Invest Surg* 2013;26(5):242-252.
15. Zhakiev BS, Zhumabaeva AN, Kaliev AA, Kazbekova GA. [Application of direct electric current and intravenous ozone therapy in the complex treatment of destructive forms of acute pancreatitis in experiment]. *Eksp Klin Gastroenterol* 2013;7):32-37.
16. Hao K, Li Y, Feng J, Zhang W, Zhang Y, Ma N, Zeng Q, Pang H, Wang C, Xiao L, He X. Ozone promotes regeneration by regulating the inflammatory response in zebrafish. *Int Immunopharmacol* 2015;28(1):369-375.
17. Erdemci F, Gunaydin Y, Sencimen M, Bassorgun I, Ozler M, Oter S, Gulses A, Gunal A, Sezgin S, Bayar GR, Dogan N, Gider IK. Histomorphometric evaluation of the effect of systemic and topical ozone on alveolar bone healing following tooth extraction in rats. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2014;43(6):777-783.
18. Ozdemir H, Toker H, Balci H, Ozer H. Effect of ozone therapy on autogenous bone graft healing

- in calvarial defects: a histologic and histometric study in rats. *J Periodontal Res* 2013,48(6):722-726.
19. Alan H, Vardi N, Ozgur C, Acar AH, Yolcu U, Dogan DO. Comparison of the Effects of Low-Level Laser Therapy and Ozone Therapy on Bone Healing. *J Craniofac Surg* 2015,26(5):e396-e400.
 20. Sunil VR, Patel-Vayas K, Shen J, Laskin JD, Laskin DL. Classical and alternative macrophage activation in the lung following ozone-induced oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol* 2012,263(2):195-202.
 21. Han K, Kim JH. Transarterial chemoembolization in hepatocellular carcinoma treatment: Barcelona clinic liver cancer staging system. *World J Gastroenterol* 2015,21(36):10327-10335.
 22. Valacchi G, Lim Y, Belmonte G, Miracco C, Zanardi I, Bocci V, Travagli V. Ozonated sesame oil enhances cutaneous wound healing in SKH1 mice. *Wound Repair Regen* 2011,19(1):107-115.
 23. Goh YP, Henderson NC, Heredia JE, Red EA, Odegaard JI, Lehwald N, Nguyen KD, Sheppard D, Mukundan L, Locksley RM, Chawla A. Eosinophils secrete IL-4 to facilitate liver regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013,110(24):9914-9919.
 24. Anders HJ. Immune system modulation of kidney regeneration--mechanisms and implications. *Nat Rev Nephrol* 2014,10(6):347-358.
 25. Mescher AL, Neff AW, King MW. Inflammation and immunity in organ regeneration. *Dev Comp Immunol* 2017,66(98-110).
 26. Matsuda S, Fujita T, Kajiya M, Kashiwai K, Takeda K, Shiba H, Kurihara H. Brain-derived neurotrophic factor prevents the endothelial barrier dysfunction induced by interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α . *J Periodontal Res* 2015,50(4):444-451.
 27. Anders HJ. Immune system modulation of kidney regeneration--mechanisms and implications. *Nat Rev Nephrol* 2014,10(6):347-358.
 28. Lauber K, Bohn E, Krober SM, Xiao YJ, Blumenthal SG, Lindemann RK, Marini P, Wiedig C, Zobywalski A, Baksh S, Xu Y, Autenrieth IB, Schulze-Osthoff K, Belka C, Stuhler G, Wesselborg S. Apoptotic cells induce migration of phagocytes via caspase-3-mediated release of a lipid attraction signal. *Cell* 2003,113(6):717-730.
 29. Soehnlein O, Lindbom L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol* 2010,10(6):427-439.
 30. Anders HJ. Immune system modulation of kidney regeneration--mechanisms and implications. *Nat Rev Nephrol* 2014,10(6):347-358.

三、研究方案

1. 主要研究内容、最终目标和拟解决的关键问题或关键技术指标:

一、研究内容:

1、验证臭氧通过调节中性粒细胞聚集及凋亡促进组织再生。

(1) 建立斑马鱼尾鳍再生模型 (以下简称斑马鱼)。将 5dpf (受精后第 5 天) 斑马鱼幼鱼尾鳍切除, 分别给予不同浓度臭氧水并观察尾鳍再生情况。(已完成)

(2) 验证臭氧促进中性粒细胞的聚集。给予 AB-wide (野生型) 斑马鱼及 Tg(mpo:GFP)转基因斑马鱼 (绿色荧光标记中性粒细胞, 南方医科大学斑马鱼实验室提供) 臭氧水及系统水处理, 应用苏丹黑 B 染色及荧光显微镜, 观察记录特定时间点创面中性粒细胞数量并进行比较。(已部分完成)

(3) 探讨臭氧对干细胞向中性粒细胞分化的影响, 进一步证实臭氧对中性粒细胞聚集的促进作用。在进行上述实验的同时记录斑马鱼全身中性粒细胞数量并计算创面中性粒细胞数与全身中性粒细胞数量的比率, 进一步证实创面中性粒细胞增多为臭氧促进中性粒细胞迁移的结果。

(4) 探讨臭氧对中性粒细胞凋亡的调节作用。给予 AB-wide 斑马鱼臭氧水及系统水处理, 应用流式细胞仪检测中性粒细胞的凋亡, 探讨臭氧对创伤组织中中性粒细胞凋亡的影响。

2、探讨臭氧通过调控中性粒细胞释放 LPC 增加巨噬细胞分泌 IL-10 从而促进组织再生。

(1) 探讨臭氧对 LPC 的调控及对组织再生的影响。

给予 AB-wide 斑马鱼臭氧水及系统水处理, 应用 qRT-PCR、Western Blot 技术检测 LPC 的表达, 探讨臭氧对 LPC 的影响。(已部分完成)

给予 AB-wide 斑马鱼臭氧水, 系统水+ PLD (溶血磷脂酶 D, LPC 抑制剂)、系统水、系统水+ PLD 处理, 在显微镜下观察斑马鱼尾鳍生长情况并进行比较。

(2) 探讨臭氧通过调控 LPC 的表达影响巨噬细胞的激活及 IL-10 的表达。

给予 AB-wide 及 Tg(zlyz: EGFP)转基因斑马鱼 (绿色荧光标记巨噬细胞, 南方医科大学斑马鱼实验室提供) 臭氧水及系统水处理, 应用免疫细胞化学方法、流式细胞仪检测及荧光显微镜观察巨噬细胞的激活聚集, 探讨臭氧对创伤组织巨噬细胞激活的影响。

给予 Tg(zlyz: EGFP)转基因斑马鱼臭氧水, 臭氧水+ PLD、系统水、系统水+ PLD 处理, 在荧光显微镜下观察巨噬细胞的迁移, 记录尾鳍巨噬细胞的数量, 探讨臭氧通过 LPC 影响巨噬细胞对中性粒细胞的吞噬作用。

应用 Tg(corola:GFP;lyz:Dsred)双荧光标记斑马鱼 (绿色荧光标记巨噬细胞, 红色荧光标记中性粒细胞, 由南方医科大学斑马鱼实验室提供), 给予臭氧水, 臭氧水+ PLD、系统水、系统水+ PLD 处理, 利用荧光显微镜动态观察尾鳍切除后斑马鱼体内中性粒细胞及巨噬细胞的迁移运动。

给予 AB-wide 及上述转基因斑马鱼臭氧水, 系统水+ PLD、系统水、系统水+ PLD 处理, 在通过中性红染色及共聚焦显微镜观察斑马鱼创面巨噬细胞聚集情况。

(3) 验证臭氧对 IL-10 表达的影响并探讨其机制。

应用 qRT-PCR、Western Blot 技术验证臭氧在慢性炎症期促进 IL-10 表达。给予 AB-wide 斑马鱼臭氧水, 臭氧水+ PLD、系统水、系统水+ PLD 处理后, 应用 qRT-PCR、Western Blot 技术检测 IL-10 表达, 验证臭氧通过中性粒细胞-PLC-巨噬细胞调控影响 IL-10 表达。(已部分完成)

3、探讨臭氧激活 JAK/STAT 通路促进组织再生及其机制。

(1) 验证臭氧通过调控 IL-10 激活 JAK/STAT 通路。

给予 AB-wide 斑马鱼臭氧水及系统水处理, 应用 qRT-PCR、Western Blot 技术验证 STAT3

的表达,证实臭氧对 JAK/STAT 通路具有激活作用。给与 IL-10 抑制剂处理后,分别给予臭氧水及系统水,应用 qRT-PCR、Western Blot 技术检测 STAT3 的表达,验证臭氧通过调控 IL-10 表达激活了 JAK/STAT 通路。(已部分完成)

(2) 探讨臭氧通过调节 PLC-巨噬细胞激活 JAK/STAT 通路。

给予 AB-wide 斑马鱼臭氧水+PLD、系统水、系统水+PLD 处理,应用 qRT-PCR、Western Blot 技术检测 STAT3 的表达,验证臭氧通过调控 PLC 刺激巨噬细胞释放 IL-10 从而激活了 JAK/STAT 通路。

4、探讨臭氧通过 JAK/STAT 通路调节 IL-1 β 、TNF- α 的分泌从而促进组织再生。

应用 qRT-PCR、Western Blot 技术验证臭氧在慢性炎症期抑制 IL-1 β 、TNF- α 表达。给予 AB-wide 斑马鱼及 IL-10 抑制斑马鱼臭氧水,臭氧水+JSI-124、系统水、系统水+JSI-124 处理后,应用 qRT-PCR、Western Blot 技术检测 IL-1 β 、TNF- α 表达,验证臭氧通过上述网络调节 IL-1 β 、TNF- α 的表达。(已部分完成)

5、探讨臭氧通过调节 IL-10-JAK/STAT-IL-1 β /TNF- α 表达促进组织再生。

给予 AB-wide 斑马鱼及 IL-10 抑制斑马鱼臭氧水,臭氧水+JSI-124、臭氧水+rhuIL-1Ra (重组人 IL-1Ra, IL-1R 拮抗剂)/依那西普 (TNF- α 抑制剂)、系统水、系统水+JSI-124 处理后,系统水+rhuIL-1Ra/依那西普并分别在显微镜下观察测量尾鳍生长情况,统计分析后探讨 IL-10、JAK/STAT 及 IL-1 β 、TNF- α 在臭氧促进组织再生中的作用。

二、研究目标:

(1) 应用各类斑马鱼模型,验证臭氧促进组织再生。

(2) 应用 Tg(mpo:GFP)、Tg(zlyz:EGFP)、Tg(corola:GFP;lyz:Dsred)等转基因斑马鱼、免疫细胞化学方法及流式细胞仪检测技术,观察臭氧对中性粒细胞及巨噬细胞的影响。

(3) 通过 qRT-PCR、Western Blot 技术检测 PLC、IL-10、STAT3、IL-1 β 、TNF- α 表达水平,并应用 IL-10 抑制斑马鱼、PLD、JSI-124、rhuIL-1Ra、依那西普等药物抑制上述蛋白活性再进行检测,探讨臭氧对于上述蛋白及上述蛋白相互间的调节作用。

(4) 应用 PLD、JSI-124、rhuIL-1Ra、依那西普等药物抑制 PLC、IL-10、STAT3、IL-1 β 、TNF- α 活性,探讨 IL-10-JAK/STAT 正反馈环路中关键蛋白或蛋白受体在臭氧促进组织再生中起到的作用,从而探寻臭氧促进组织再生的机制。

三、拟解决的关键科学问题:

①臭氧对于创面中性粒细胞的增加,是促进了中性粒细胞的产生还是单纯促进中性粒细胞的迁移?②臭氧促进了中性粒细胞的迁移,对创面中性粒细胞的凋亡是否也有促进作用?③巨噬细胞的激活是否依赖于 LPC 表达的增加?④IL-10 是否为臭氧激活 JAK/STAT 的关键调节因子?⑤STAT3 是否为臭氧调节 IL-1 β 、TNF- α 表达的关键因子?⑥IL-10-JAK/STAT 正反馈环路是否为臭氧促进组织再生作用的关键调节中心?我们将通过本项目探讨解答以上问题。

2. 拟采取的研究方法、步骤、技术路线及可行性分析:

一、研究方法:

1、验证臭氧可以促进组织再生。

(1) 建立斑马鱼尾鳍再生模型 (以下简称斑马鱼):

实验所需的野生型 AB-wide 及 Tg(mpo:GFP)、Tg(zlyz:EGFP)、Tg(corola:GFP;lyz:Dsred) 双荧光标记转基因斑马鱼均由广东省人类疾病及药物斑马鱼模型重点实验室提供。斑马鱼根据 Westerfield 提供的标准饲养方式饲养。

成鱼饲养温度保持 28.5℃, 光照-黑暗比例为 14-10。系统水 pH 维持 7.2 - 7.6, 盐分 0.03% - 0.04%。将 3 个月的成年斑马鱼以雄鱼和雌鱼以 3:2 的比例置于带有漏网的小鱼缸内, 以挡板置于漏网上方阻隔雄鱼和雌鱼, 过夜。清晨 9 时抽离挡板, 半小时后于漏网下方可收集鱼卵。收集所得鱼卵置于洁净培养皿中, 放置于 28.5℃ 恒温温箱中孵育。由于臭氧为强氧化性气体, 饲育鱼卵所用的 Egg water 由系统水+亚甲蓝溶液配制而成, 亚甲蓝是一种抑菌的还原性物质, 可被臭氧氧化, 其反应产物不明。所以实验用斑马鱼均不可接触 Egg water, 收集到的鱼卵以纯净新鲜系统水饲养。需要在荧光显微镜下观察的斑马鱼于受精后 12h 内向培养皿中加入 0.003% 1-phenyl-2-thiourea (PTU) (Sigma) 以抑制斑马鱼黑色素生成。将 72-hpf 幼鱼在体视显微镜下用 1ml 注射器针头沿体节末端垂直体长轴切除幼鱼尾鳍并观察尾鳍生长, 建立斑马鱼尾鳍切除再生模型。

(2) 臭氧水的配制及实验安全浓度的测定:

臭氧水直接由臭氧气体持续注入系统水中五分钟所得 (高氧液体制备仪, 前沿医学)。水中离子影响臭氧稳定性加速臭氧降解, 但纯净的 dd H₂O 对于幼鱼生长及生存影响较大, 仍选择含有离子的系统水为臭氧水的配制用水。

将新鲜配制的臭氧水与系统水按照 1:0、2:1、1:1、1:2、1:3、1:4 的比例配制成臭氧水工作液, 用臭氧水浓度测定试剂盒 (DPD 臭氧测定试剂盒, 陆恒生物) 半定量各比例臭氧水浓度。

将 72-hpf AB-wide 幼鱼分为六个组, 分别给予浓度为上述比例配制好的臭氧水处理, 于体式显微镜下每五分钟记录各组幼鱼死亡数量, 持续记录 1h。再将 72-hpf AB-wide 幼鱼分为六个组, 分别给予浓度为上述比例配制好的臭氧水处理 10 分钟后, 分别孵育在 1ml 浓度为 5μg/mL 的吖啶橙中染色半小时, 再用 PBST 清洗三次后置于载玻片上应用荧光显微镜观察幼鱼全身细胞凋亡情况。

(3) 观察比较尾鳍切除后生长, 验证臭氧促进组织再生:

将 72-hpf AB-wide 型斑马鱼幼鱼随机分为 a、b、c 三组, 分别给予系统水、单次臭氧水 (仅给予一次臭氧水) 及多次臭氧水 (每 12h 更换新鲜臭氧水) 处理, 监测水中臭氧浓度变化。于尾鳍切除后 0h、24h、48h、72h、120h (-hpa, 尾鳍切除后 X 小时), 在显微镜下测量 a、b、c 三组幼鱼尾鳍生长长度并进行比较。

2、探讨臭氧调节中性粒细胞聚集及凋亡。

(1) 验证臭氧促进中性粒细胞的聚集。

①苏丹黑 B 染色:

苏丹黑 B 备用液配制: 取苏丹黑 B 粉剂 0.6 g 溶于 200 ml 纯酒精中, 用磁力搅拌器搅拌, 待充分溶解, 滤纸过滤, 4℃ 保存备用。缓冲液: 苯酚 16 g 加 100%乙醇 30ml, 磷酸氢二钠 0.3 g 加蒸馏水 100 ml, 将两份溶液混合。(3) 染色液: 以苏丹黑 B 备用液 30 ml, 缓冲液 20 ml, 两液混合后过滤配成。

将 72-hpf AB-wide 斑马鱼幼鱼尾鳍切除后分为两组, 分别给予臭氧水及系统水处理, 于 0.5、1、2、3-hpa 取幼鱼进行多聚甲醛 (PFA) 固定过夜, 用 PBST 冲洗幼鱼后, 取配置好的苏丹黑 B 染色液染色 1 h, 再用 70%乙醇冲洗, 每 15 min 观察 1 次, 直到信号清晰可见。

观察记录全身及尾鳍创面中性粒细胞数量并进行比较。

②共聚焦显微镜观察活体中性粒细胞迁移：将 72-hpf Tg(mpo:GFP)斑马鱼幼鱼，随机分为两组，分别给予系统水及臭氧水处理。于 0.5、1、2、3-hpa 在共聚焦显微镜下观察记录迁移到尾鳍切口的中性粒细胞数量并进行比较。

(2) 探讨臭氧对干细胞向中性粒细胞分化的影响。

将 72-hpf Tg(mpo:GFP)斑马鱼幼鱼，尾鳍切除后随机分为两组，分别给予系统水及臭氧水处理。于 0.5、1、2、3-hpa 在共聚焦显微镜下观察记录幼鱼全身及创面中性粒细胞数量，统计分析迁移中性粒细胞的比率。

在进行上述实验的同时记录斑马鱼全身中性粒细胞数量并计算创面中性粒细胞数与全身中性粒细胞数量的比率，进一步证实创面中性粒细胞增多为臭氧促进中性粒细胞迁移的结果。

(3) 应用流式细胞仪检测技术探讨臭氧对中性粒细胞凋亡的调节作用。

将 72-hpf AB-wide 斑马鱼幼鱼尾鳍切除后分为两组，分别给予臭氧水及系统水处理，于 0.5、1、2、3-hpa 留取幼鱼标本，用 I 型胶原酶消化，并采用组织中性粒细胞分离试剂盒(上海易佰聚生物)分离中性粒细胞。所有粒细胞收集后，再经 200g 离心和洗涤 2 次，悬于无血清 DMEM 中。采用 Annexin-V/PI 双染方法进行流式细胞仪检测。调整细胞浓度至 1×10^6 mL，取 500 μ L 悬浮液 $300 \times g$ 、4℃ 离心 5min，弃上清；用预冷的 PBS 洗涤细胞 2 次，每次均在 $300 \times g$ 、4℃ 离心 5min，弃上清；加入 100 μ L Binding Buffer 重悬细胞；加入 5 μ L Annexin-V-FITC 和 5 μ L PI Staining Solution 轻轻混匀；避光，室温反应 10 min；加入 400 μ L Binding Buffer 混匀，样品在 1h 内采用流式细胞仪检测。流式细胞仪双通道检测 1×10^4 个细胞。Annexin-V 阳性为凋亡早期细胞，PI 阳性为坏死细胞，Annexin-V 和 PI 双阳性为晚期凋亡坏死细胞。计算细胞凋亡百分率，探讨臭氧对创伤组织中性粒细胞凋亡的影响。

3、探讨臭氧通过调控中性粒细胞释放 LPC 增加巨噬细胞分泌 IL-10 从而促进组织再生。

(1) 探讨臭氧对 LPC 的调控及对组织再生的影响。

(i) 应用 qRT-PCR 检测 LPC 的基因表达。

取 72-hpf AB-wide 斑马鱼幼鱼，切除尾鳍并随机分为两组，分别给予系统水及多次臭氧水处理，每 12h 更换一次对应的液体。于 0、6、12、24、48、72-hpa 留取标本，每个时间点取 30 条幼鱼，用系统水清洗 3 次后充分吸干多余水分。加入 RNA 抽提试剂 Trizol 裂解，经异丙醇沉淀和 75% 的酒精洗涤，初步提取组织总 RNA，然后用 DNaseI 处理，除去 RNA 中混有的基因组 DNA，重新纯化 RNA。RNA 逆转录按 PrimeScript 逆转录试剂盒 (Takara) 说明书操作，Real-time PCR 按 Real-Time PCR 试剂 SYBR Premix Ex Taq™ (Takara) 试剂盒说明书操作，qRT-PCR 仪采用 Light Cycler Nano (Roche)。

(ii) 应用 Western Blot 检测 LPC 蛋白表达。

取 72-hpf AB-wide 幼鱼，切除幼鱼尾鳍后随机分为两组，分别给予系统水及多次臭氧水处理。每 12h 更换一次对应的液体，于 0、6、12、24、48、72-hpa 留取标本。加入蛋白酶抑制剂后用冷 TBS 洗涤 2-3 次置于匀浆器内。加入 10 倍组织体积总样品缓冲液在冰上彻底冷却并将细胞裂解。裂解液置于离心机中以 $12000 \times g$ 转速离心 5min，收集上清，即为总蛋白溶液。采用 Bradford 方法测定蛋白浓度后进行 SDS-PAGE 电泳 (北京六一的电泳设备，武汉谷歌生物科技有限公司的 SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒) 并转膜。将转好的膜于室温下脱色摇床上用 5% 的脱脂牛奶 (0.5% TBST 配)，封闭 1h。稀释一抗 (TBST 溶解的 5% 脱脂牛奶，磷酸化蛋白使用 TBST 溶解的 5% BSA)，4℃ 过夜并用 TBST 在室温下脱色摇床上洗三次，每次 5min。再将二抗用 TBST 稀释 3000 倍，室温下孵育 30min 后，用 TBST 在室温下脱色摇床上洗三次，每次 5min。将 A、B 发光剂在离心管中等体积混合，将膜蛋白面朝上与此混合液充分接触，1-2min 后，去尽残液，包好，放入暗匣中曝光。最后用显影、定影试剂进行显影和定影。根据不同的光强度调整曝光条件。将胶片进行扫描存档，Alpha 软件处理系统分析目标带的光密

度值。

(iii) 探讨臭氧调控 LPC。

取 72-hpf AB-wide 幼鱼，切除幼鱼尾鳍后随机分为两组，分别给予臭氧水，臭氧水+ PLD、系统水、系统水+ PLD 处理，每 12h 更换一次对应的液体，于 0、6、12、24、48、72、120-hpa 在显微镜下观察并测量斑马鱼尾鳍生长情况并进行比较。

(2) 应用转基因斑马鱼及 PLD 探讨臭氧通过调控 LPC 的表达影响巨噬细胞的分泌 IL-10。

(i) 应用中性红染色探讨臭氧通过调控 LPC 促进巨噬细胞的激活。

将中性红染液（购自 Sigma）以 1: 800 稀释，配成 2.5 μ g/ml 的工作液。取 72-hpf AB-wide 幼鱼，切除尾鳍后随机分为 4 组放入六孔板中，分别给予臭氧水，臭氧水+ PLD、系统水、系统水+ PLD 处理。5h 后应用系统水洗涤斑马鱼幼鱼 3 次并吸干水分，加入中性红染液 28.5 $^{\circ}$ C 避光染色 8 h 后在显微镜下观察记录巨噬细胞激活情况。

(ii) 应用转基因斑马鱼探讨臭氧通过调控 LPC 促进巨噬细胞的激活。

取 72-hpf Tg(zlyz:EGFP)转基因斑马鱼幼鱼，切除尾鳍后给予臭氧水，臭氧水+ PLD、系统水、系统水+ PLD 处理，在荧光显微镜下实时动态观察巨噬细胞的迁移，并每半小时记录尾鳍巨噬细胞的数量，探讨臭氧通过 LPC 影响巨噬细胞的激活。再取 72-hpf Tg(corola:GFP;lyz:Dsred)转基因斑马鱼幼鱼，切除尾鳍后给予臭氧水及系统水处理，利用共聚焦显微镜动态观察斑马鱼体内中性粒细胞及巨噬细胞的迁移运动。

(iii) 验证臭氧对 IL-10 表达的影响并探讨其机制。取 72-hpf AB-wide 幼鱼，切除尾鳍后随机分为 4 组，给予臭氧水，臭氧水+ PLD、系统水、系统水+ PLD 处理后，每 12h 更换一次对应的液体，分别于 0、6、12、24、48、72-hpa 留取标本，应用 qRT-PCR、Western Blot 技术检测 IL-10 的基因及蛋白表达。

4、探讨臭氧激活 JAK/STAT 通路促进组织再生及其机制。

(1) 验证臭氧通过调控 IL-10 激活 JAK/STAT 通路。

取 72-hpf AB-wide 幼鱼，切除尾鳍后随机分为 2 组，分别给予臭氧水及系统水，每 12h 更换一次对应的液体，于 0、6、12、24、48、72-hpa 留取标本，应用 qRT-PCR、Western Blot 技术验证臭氧促进 STAT3 的表达，验证臭氧对 JAK/STAT 通路具有激活作用。

应用 72-hpf IL-10 抑制斑马鱼，切除尾鳍后随机分为 2 组，给予臭氧水、系统水处理，每 12h 更换一次对应的液体，于 0、6、12、24、48、72-hpa 留取标本应用 qRT-PCR、Western Blot 技术检测 STAT3 的表达，验证臭氧通过调控 IL-10 的表达激活了 JAK/STAT 通路。

(2) 探讨臭氧通过调节中性粒细胞-巨噬细胞激活 JAK/STAT 通路。取 72-hpf AB-wide 幼鱼，切除尾鳍后随机分为 4 组，分别给予臭氧水、臭氧水+PLD、系统水、系统水+PLD 处理，每 12h 更换一次对应的液体，于 0、6、12、24、48、72-hpa 留取标本，应用 qRT-PCR、Western Blot 技术检测 STAT3 的表达，验证臭氧通过调控 PLC 刺激巨噬细胞释放 IL-10 从而激活了 JAK/STAT 通路。

(3) 探讨臭氧激活 JAK/STAT 通路对组织再生的影响。取 72-hpf AB-wide 幼鱼，切除尾鳍后随机分为 4 组，分别给予臭氧水、臭氧水+ JSI-124（STAT3、JAK 双重抑制剂）、系统水、系统水+ JSI-124 处理，每 12h 更换一次对应的液体，并分别于 0、6、12、24、48、72 及 120-hpa 在显微镜下观察测量并记录斑马鱼尾鳍生长情况并进行比较。

5、探讨臭氧通过 JAK/STAT 通路调节 IL-1 β 、TNF- α 的分泌从而促进组织再生。

(1) 验证臭氧对 IL-1 β 、TNF- α 表达的调节作用。

取 72-hpf AB-wide 及 IL-10 抑制幼鱼，切除尾鳍后随机分为 4 组，分别给予臭氧水、臭氧水+ JSI-124、系统水、系统水+ JSI-124 处理后，每 12h 更换一次对应的液体，并分别于 0、6、12、24、48、72 及 120-hpa 留取标本，应用 qRT-PCR、Western Blot 技术检测 IL-1 β 、TNF- α 表达，验证臭氧通过上述网络调节 IL-1 β 、TNF- α 的表达。（已部分完成）

(2) 探讨臭氧调节 IL-1 β 、TNF- α 表达促进组织再生。

取 72-hpf AB-wide 及 IL-10 抑制幼鱼，切除尾鳍后随机分为 4 组，分别给予臭氧水，臭氧水+JSI-124、臭氧水+ rhuIL-1Ra (重组人 IL-1Ra, IL-1R 拮抗剂)/依那西普 (TNF- α 抑制剂)、系统水、系统水+JSI-124、系统水+ rhuIL-1Ra 处理后，在显微镜下观察测量尾鳍生长情况，统计分析后探讨 IL-10、JAK/STAT 及 IL-1 β 、TNF- α 在臭氧促进组织再生中的作用。

二、技术路线图



3. 本研究的主要攻关点或研究特色及创新之处（与国内外同类研究比较）：

一、本实验的特色：

（1）臭氧治疗是临床医学中新兴的治疗手段，在临床中对糖尿病足溃疡创面愈合有良好的疗效，本实验为上述作用提供了理论依据。

（2）斑马鱼与小鼠比可提供更直观的实验观察；与细胞比则具有整体优势；利用斑马鱼独特的生物学优势，如转基因斑马鱼更可以直观观察验证细胞在体内的迁移更有利于实验进行。

二、本项目的创新：

（1）原始创新：①本实验在世界范围内首次以斑马鱼为实验动物模型进行臭氧相关实验，成功建立了臭氧促进组织再生的斑马鱼模型；②在该模型中验证了臭氧促进中性粒细胞迁移及凋亡，激活巨噬细胞进行吞噬并释放 IL-10 从而抑制局部炎症，促进组织创伤后再生；

（2）二次创新：①在临床工作中我们发现臭氧可以促进组织再生，因此我们应用了斑马鱼模型验证了该作用；②根据文献报道炎症对于组织再生有重要作用，选取 IL-10 激活 JAK/STAT 通路抑制 IL-1 β 、TNF- α 网络，探讨了臭氧可以通过调节炎症细胞及因子促进组织再生，为臭氧的

4. 研究工作的预期结果和验收形式:

- (1) 阐明臭氧促进组织再生的作用;
- (2) 明确臭氧促进中性粒细胞的迁移及凋亡, 诱导表达 LPC 激活巨噬细胞, 探讨臭氧在组织再生中的生物学功能, 并探讨其作用机制;
- (3) 明确臭氧激活了 IL-10-JAK/STAT 正反馈环路, 抑制局部炎症促进组织再生, 为臭氧治疗的机制探讨增添新的理论基础;
- (4) 在国际上有一定影响力的学术刊物上发表论著 1 篇, 国内论著 1 篇;
- (5) 通过本项目的实施, 申请后续基金。

5. 总体进度安排和年度计划指标:

2019.01—2019.12

- (1) 斑马鱼的饲养及购买相应的试剂和实验用品;
- (2) 通过 AB-wide 斑马鱼及转基因斑马鱼验证臭氧促进中性粒细胞向创面的迁移, 并激活巨噬细胞。
- (3) 通过 qRT-PCR、Western blot 检测臭氧对中性粒细胞凋亡及 LPC 表达的调节;
- (4) 将上述实验结果结合临床随访资料进行统计学分析, 阐明臭氧是否可以通过调控中性粒细胞向创面的迁移并凋亡, 增加 LPC 的表达。

2020.01—2020.12

- (1) 通过中性红染色及转基因斑马鱼探讨臭氧对巨噬细胞的激活;
- (2) 应用 qRT-PCR、Western blot 检测臭氧对免疫相关因子 IL-10、STAT3、IL-1 β 、TNF- α 表达的影响;

2021.01—2021.12

- (1) 应用 LPC 及 IL-10、STAT3、IL-1 β 、TNF- α 的抑制剂, qRT-PCR、Western blot 检测下游基因表达的改变, 验证臭氧对上述炎症通路的调控作用。
- (2) 应用 LPC 及 IL-10、STAT3、IL-1 β 、TNF- α 的抑制剂, 在 AB-wide 斑马鱼尾鳍切除模型中观察臭氧对尾鳍再生的作用, 探讨臭氧对组织再生的作用依赖于上述因子。
- (3) 查漏补缺, 资料总结, 撰写论文及结题报告, 进行成果鉴定。

四、研究工作基础

1. 与本研究有关的研究工作积累和已取得的研究工作成绩：

2000 年导师何晓峰教授首次引入臭氧治疗，并以试验犬为动物模型，观察臭氧对髓核超微结构的影响，证实了臭氧能损害髓核内的细胞和组织结构的功能，最终导致髓核内水份丧失，髓核体积明显减小，是治疗腰椎间盘突出症的新手段 [中华放射学杂志, 2002, (4):366-369]。之后的十余年我们一直致力于臭氧临床应用的研究。2014 年，我们进行了臭氧促进组织再生的临床实验观察，给予难愈性肠痿的患者臭氧水加压冲洗窦道治疗。结果可见，各种难以愈合的肠痿患者，在接受臭氧治疗后，感染率明显下降，1 月左右均达到窦道愈合的治愈效果。[实用医学杂志, 2014,30(10):1569-1572]

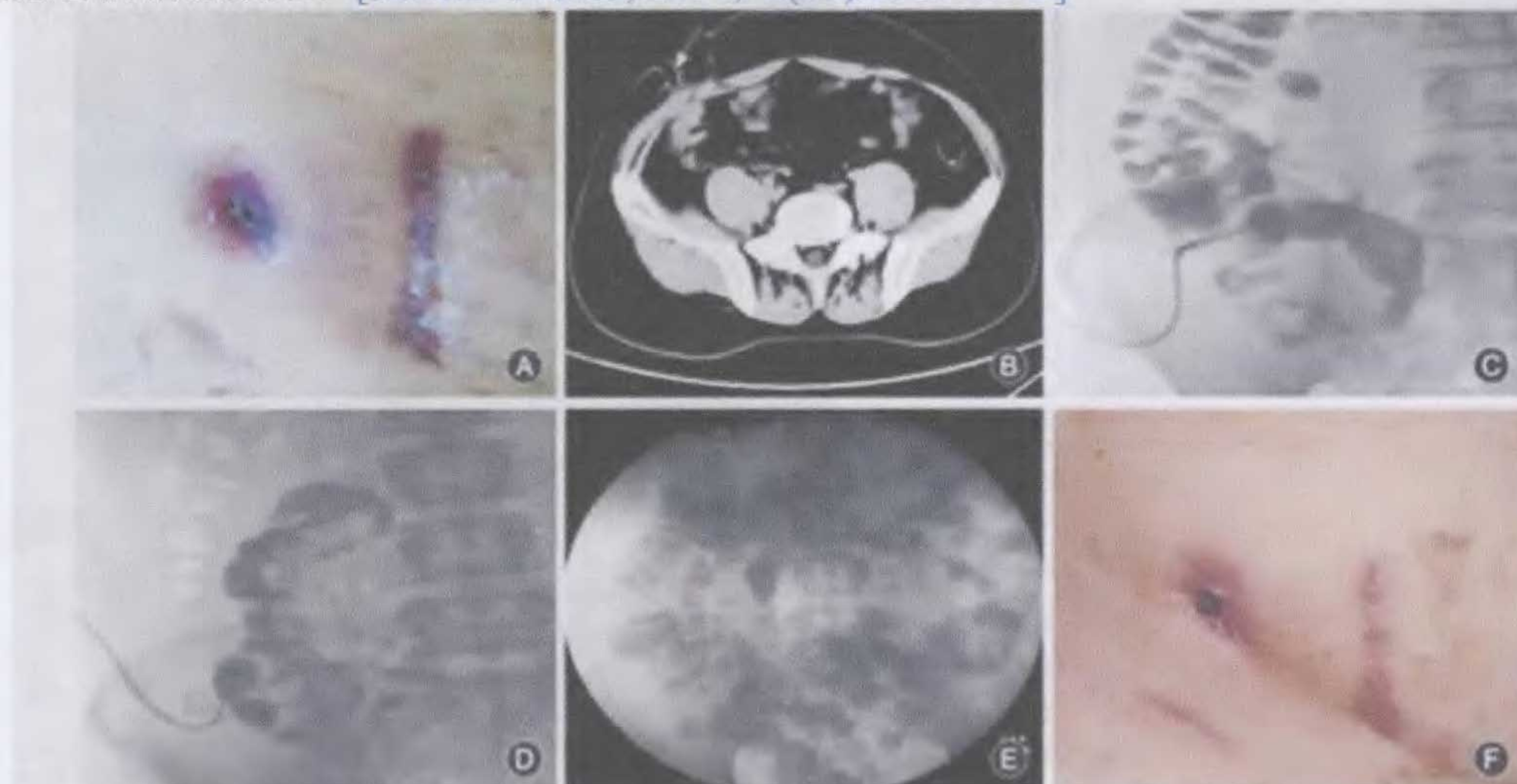


图 1.A-B.患者因阑尾炎术后继发肠外痿 1 年入院。右下腹皮肤破溃及窦道形成；C.透视下窦道置管造影，见升结肠及部分小肠显影；D.臭氧治疗 1 周后透视下窦道置管造影，见痿口明显缩小；E-F.臭氧治疗 2 周后肠道造影未见窦道显影，见皮肤患者痊愈出院。

除用于肠痿治疗外，我们还将臭氧水应用于糖尿病足溃疡的治疗。通过对 19 例糖尿病足患者的臭氧局部熏蒸治疗及随访，我们发现，应用臭氧水治疗的患者，创面均未出现任何微生物感染，且愈合速度较常规消毒快。

2015 年，应用斑马鱼为动物模型，我们发现了臭氧可通过调节免疫细胞及因子促进组织再生。而且与其他免疫调节药物不同的是，臭氧可以根据正常组织的需要对免疫系统进行相关的调节，有些时候臭氧对于同一因子(如 $\text{TNF-}\alpha$ 、 IL-10 、 $\text{IL-1}\beta$)的表达可以根据组织需要进行双向调节 [International Immunopharmacology, 2015, 28 (1):369-375.]。

首次以斑马鱼为实验动物进行臭氧相关研究，建立臭氧作用于斑马鱼尾鳍再生的动物模型。

(1) 臭氧水实验安全浓度测定：

不同浓度臭氧水中幼鱼生存时间不同 (图 2.A)。实验测得臭氧水安全浓度为 0.1mg/L 。当臭氧水浓度大于 0.1mg/L 时，幼鱼生存时间随浓度降低而增加，；当臭氧水浓度 $\leq 0.1\text{mg/L}$ 时，幼鱼生存时间不受臭氧水浓度影响，且每 12 小时更换新鲜臭氧水不会对幼鱼造成累积性损伤，生存率无差别。

吖啶橙染色：臭氧为强氧化剂，溶于水后会造成斑马鱼幼鱼全身组织器官的损伤。不同浓度臭氧水对于斑马鱼幼鱼损伤不同 (图 2.C)。结果见臭氧水浓度越高，斑马鱼幼鱼全身损

伤越严重。当臭氧水浓度为 0.2mg/L 时，臭氧水对于幼鱼循环系统及尾鳍有轻微损伤，对其生存无影响。当臭氧水浓度低于 0.1mg/L，对斑马鱼幼鱼无损伤。由以上实验结果可确定 0.1mg/L 为实验用臭氧水浓度。

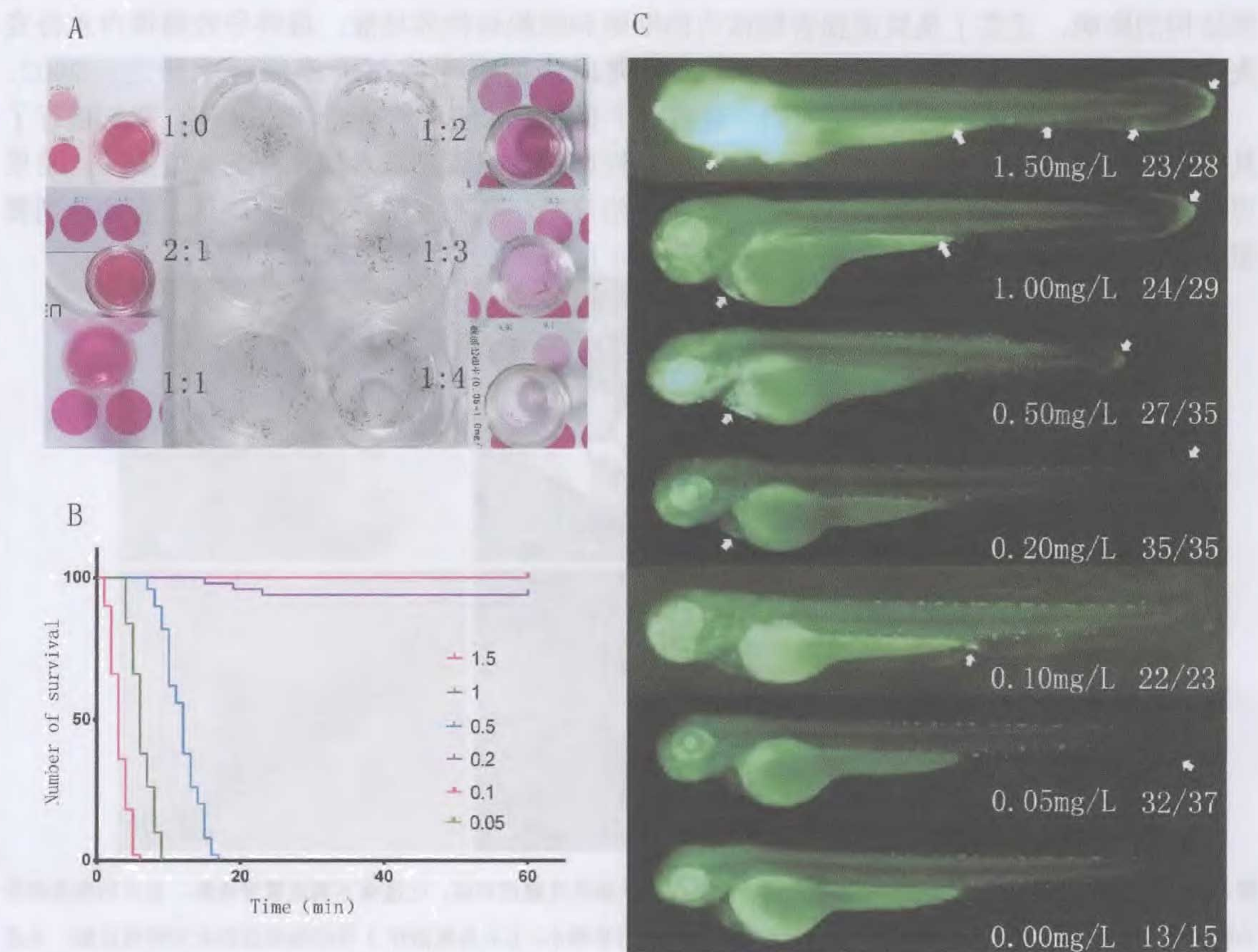


图 2.A、臭氧水浓度测定,浓度为 1.5、1.0、0.5、0.2、0.1、0.05mg/L。B、不同浓度臭氧水处理后 72-hpf 斑马鱼幼鱼生存曲线；C、不同浓度臭氧水处理后 72-hpf 斑马鱼吖啶橙染色，绿色荧光为凋亡信号，白色箭头指出全身凋亡最严重的创伤。

(2) 臭氧促进斑马鱼幼鱼尾鳍损伤后的再生。

在显微镜下观察记录 a,b,c 三组幼鱼尾鳍切除后生长情况（图 2.B）。尾鳍切除后 24 小时之内，a 组未出现明显再生修复，bc 两组再生修复已开始；尾鳍切除后 48h 内，bc 两组尾鳍生长长度均大于 A 组；尾鳍切除后 72 小时，c 组尾鳍已基本完成轮廓及鳍条再生，而 ab 两组尾鳍在切除后 120h 才完成再生。而 ab 两组幼鱼在尾鳍切除后 48h 尾鳍生长长度有差别（ $P < 0.01$ ），该差别在尾鳍切除后 72 小时消失。ac 两组幼鱼从尾鳍切除后 24 小时开始，尾鳍生长长度一直有差别（ $P < 0.0001$ ），差别持续到 72 小时以后。监测臭氧水浓度发现，b 组斑马鱼在 36h 后接触到的臭氧浓度几乎为 0，而 c 组斑马鱼持续接触臭氧（图 2.E-F）。

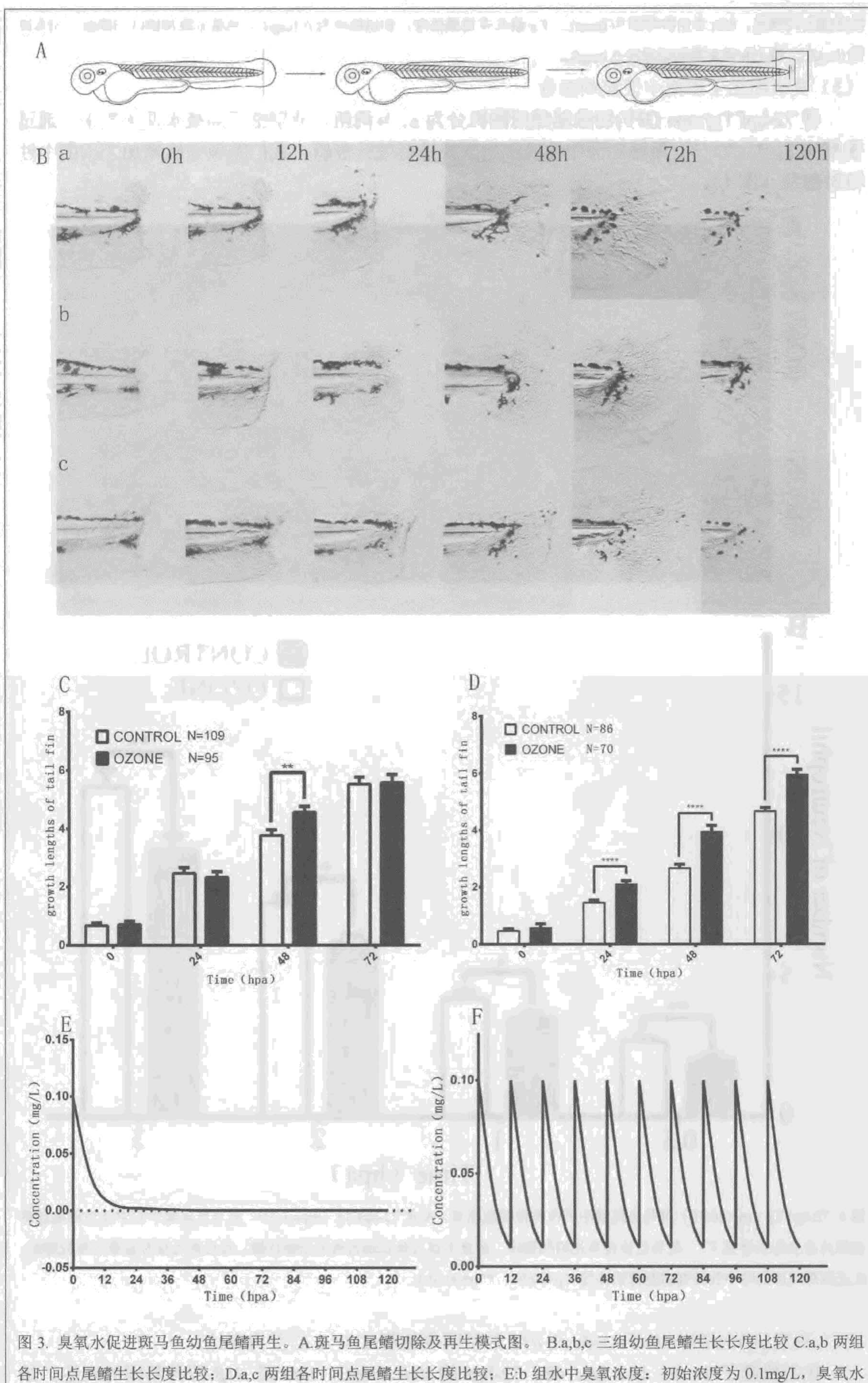


图 3. 臭氧水促进斑马鱼幼鱼尾鳍再生。A. 斑马鱼尾鳍切除及再生模式图。B.a,b,c 三组幼鱼尾鳍生长长度比较 C.a,b 两组各时间点尾鳍生长长度比较；D.a,c 两组各时间点尾鳍生长长度比较；E:b 组水中臭氧浓度：初始浓度为 0.1mg/L，臭氧水

浓度随时间降低, 48h 左右浓度降为 0mg/L。F.c 组水中臭氧浓度: 初始浓度为 0.1mg/L, 臭氧水浓度随时间降低, 但未降至 0mg/L, 每 12h 恢复到初始浓度 0.1mg/L。

(3) 臭氧增加了创面中性粒细胞数。

将 72-hpf Tg(mpo:GFP) 切除尾鳍后随机分为 a、b 两组, 分别给予系统水及臭氧水, 通过观察 0.5、1、2、3h 尾鳍创面中性粒细胞数并进行统计分析, 我们发现臭氧增加了创面中性粒细胞数 (图 4)。

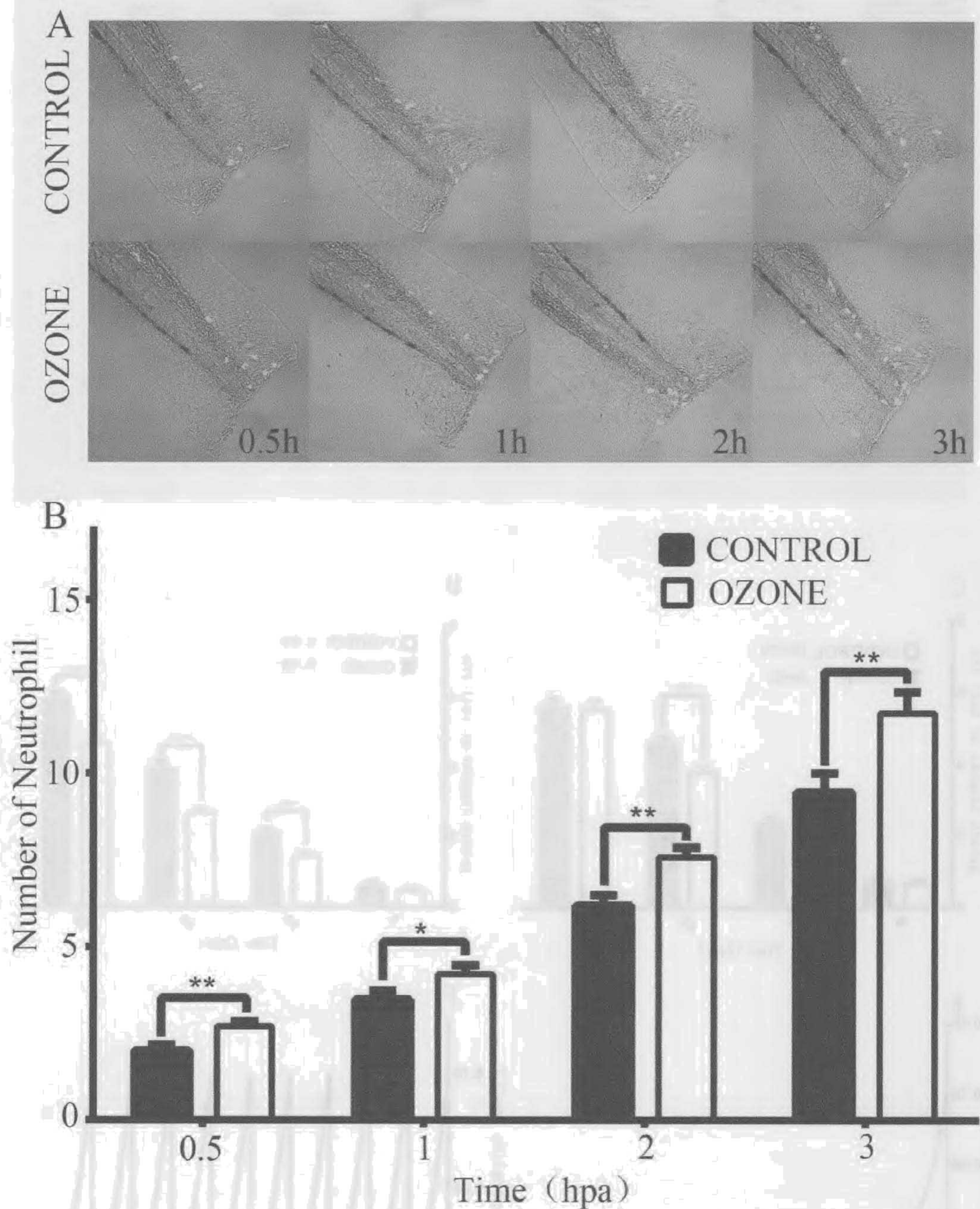


图 4. 72-hpf Tg (mpo:GFP) 斑马鱼尾鳍中的中性粒细胞迁移。A. 在 72-hpf Tg (mpo:GFP) 斑马鱼尾鳍中的中性粒细胞迁移的照片在共焦显微镜下。斑马鱼体是半透明的组织。垂直于斑马鱼长轴的线是切割边缘。绿色荧光信号是嗜中性粒细胞。B. 迁移至尾部的嗜中性粒细胞数量的比较 ($p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$)。

(4) 臭氧调节 *il10*、*stat3*、*tnfa* 及 *il1 β* 的基因表达和 TNF- α 的蛋白表达。

我们检测了 1、6、12、24、48、72-hpf 的 *il10*、*stat3*、*tnfa* 及 *il1 β* 四种基因的表达。结

果证实（图 5），臭氧在再生早期促进了炎症因子的表达，而在再生的后期抑制了炎症因子的表达，完全符合再生过程中对于炎症因子的需求。

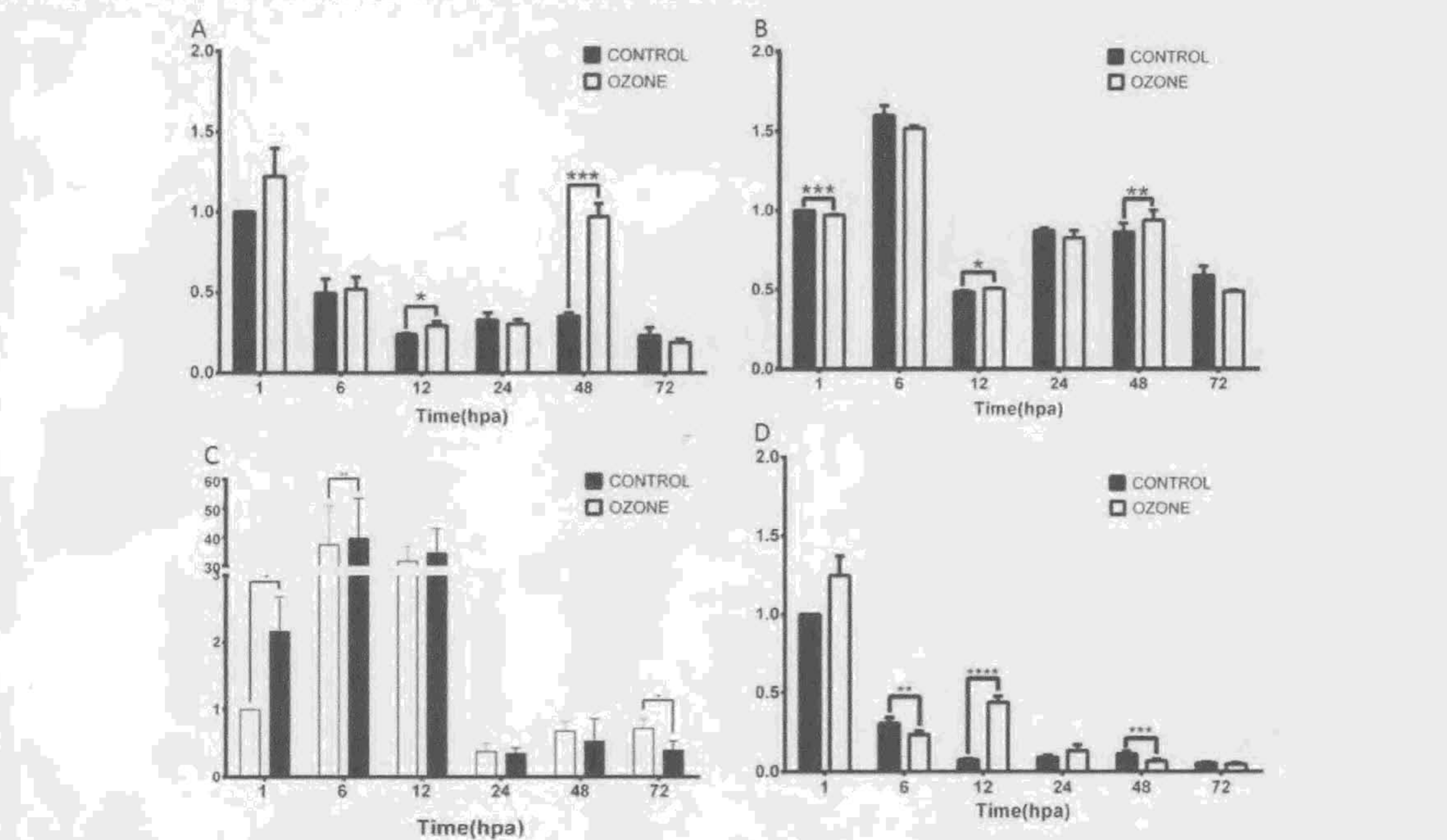


图 5.臭氧调节炎症相关因子 *il10* (A)、*stat3* (B)、*tnfa* (C) 及 *il1β* (D) 的表达。* $p\leq 0.05$, ** $p\leq 0.01$, *** $p\leq 0.001$ 。

接着我们检测了 $\text{TNF-}\alpha$ 的蛋白含量,我们发现其含量变化同 *tnfa* 的变化基本相同 (图 6)。

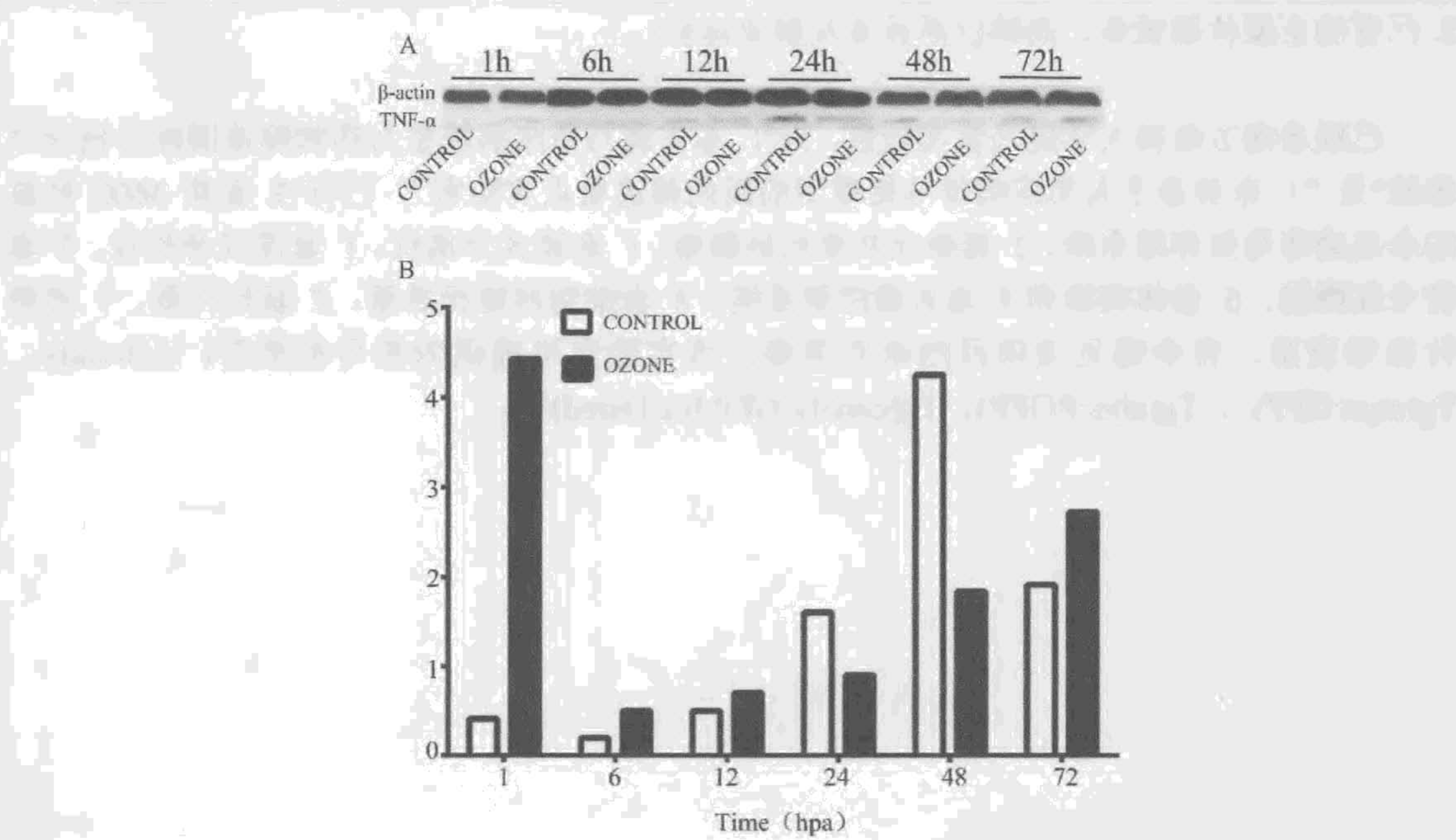


图 6. $\text{TNF-}\alpha$ 表达。A. $\text{TNF-}\alpha$ 的 Western Blot。B. $\text{TNF-}\alpha$ 的 Western Blot 灰度图。

我科以临床实践中的难点、重点问题为基础,开展了大量的科学研究。近年来发表中华系列文章 40 余篇,SCI 文章 10 余篇。撰写介入放射学专著 6 部。参编全国统编教材《介入放射学》。共获各类课题 10 项,包括国家自然科学基金,国家重点攻关课题分题、“九五、十五”国家重点攻关课题分题、广东省重点攻关课题分题、广东省攻关课题和广东省自然科学基金等。获各类奖项 11 项,其中军队二等奖 4 项、军队三等奖 1 项、中华医学奖 (二等奖)

1 项，上海市科技进步一等奖（与上海中山医院协作），第十届广东省自然科学优秀论文 3 等奖一项。培养硕士研究生 30 名，博士研究生 15 名。接受来自全国各地的进修生 52 名。

2. 已有的主要仪器设备、尚缺仪器设备及解决途径:

已联系南方医科大学斑马鱼实验室，为"广东省斑马鱼疾病模型与药物筛选国际科技合作基地"及“广东省基于人类疾病斑马鱼模型的新药筛选重点实验室”，已有 3 套共 3600 鱼缸的全自动斑马鱼养殖系统、2 套激光共聚焦显微镜、1 套流式分选仪、1 套流式分析仪、3 套荧光显微镜、6 套体视镜和 4 套显微注射系统、4 套细胞移植操纵器、2 套拉针器、1 套磨针器等设备，完全满足该项目的研究需要。该实验室可提供的斑马鱼类型：AB-wide、Tg(mpo:GFP)、Tg(zlyz:EGFP)、Tg(corola:GFP;lyz:Dsred)等。

无

4. 项目负责人近三年发表的主要论文、著作等和获得的成果名称及获奖等级等（须标明在其中的排位及总人数）：

第一作者：

臭氧治疗在临床医疗中的新进展. 中华介入放射学电子杂志 2015(03):168-172.

裸支架置入治疗移植肾动脉狭窄的近期疗效. 中华介入放射学电子杂志 2017(02):74-78.

卵巢动脉供血对子宫动脉栓塞术止血效果的影响. 中国介入影像与治疗学 2015(03):143-146.

医用臭氧对斑马鱼幼鱼缺氧性脑损伤的影响. 中国妇幼保健 2015(15):2376-2380.

南方医科大学研究生学院 2013 年元旦晚会 获“最佳表演奖”：

南方医科大学 2015 届“优秀毕业研究生”荣誉称号。

五、经费预算

预算支出项目	金额 (万元)	说 明 (凡有经费预算的需说明用途及计算根据)
一、材料费	1.8	
1. 设备费	0.4	臭氧发生设备及相关检验设备维护
2. 试剂费	1.4	实验试剂及耗材费：包括琼脂糖、氯化钙、氯化钠、酵母提取粉、缓冲液等多种实验试剂和液体、培养皿，细胞培养板、注射器、加样枪头等。
二、测试化验加工费	0.1	
1. PCR 及 Western 加工费	0.1	PCR 检测及 Western 实验加工费
三、出版/文献/信息传播/知识产权事务费	0.5	
1. 论文版面费	0.5	2000 元/篇（国内核心期刊论文） 3000 元/篇（SCI 论文）
四、资源使用费/协作费	0.6	
1. 资源使用费	0.6	实验室租借使用费：300 元/月×20 月 =6000 元
五、其他费用	0	无
合 计	3	

说明：1. 已列出的各项预算支出栏填写该项的预算总金额，并可自行细分为若干条目。
2. 经费开支范围不包括：
（1）办公业务费、耗材费（包括打印、复印、纸张、打印耗材、相片冲印、网络服务、通讯服务等），培训、会务、差旅、交通、物流等相关业务费；
（2）数码产品、信息设备、大型仪器等购置费用；
（3）餐饮费；
（4）劳务费（包括补贴、补助，以及专家咨询、病人补偿等任何形式的劳务性费用）。
3. 各项中若有超过 1000 元的项目，则必须单独列出并进行说明。
4. 可自行增减行，负责人签名需在本页面。

负责人签名：郝珂楠

2018年12月28日

六、审批

科室推荐意见:

同意

科主任签名:

(手书)

2018年 2月 28日

科研处审核意见:

同意

盖章:



2019年 3月 14日

医院审批意见:

同意资助



2019年 3月 14日