

课题任务书合同编号：遵市科合社字（2018）187号 密级：公开

遵义市科技计划 课题任务书

课题名称： Rgl 联合 hAD-MSCs 改善 D-gal 诱导 POF
生殖功能及其机制的探讨

课题承担单位： 遵义市第一人民医院

课题负责人： 何连利

起止年限： 2018 年 11 月至 2021 年 11 月

遵义市科学技术局制

二〇〇八年六月

科技计划课题信息表

课题合同编号		遵市科合社字(2018)187号							
课题名称		Rg1联合hAD-MSCs改善D-gal诱导POF生殖功能及其机制的探讨							
密 级		(4)1 绝密 2 机密 3 秘密 4 公开				申报项目类型	博士启动专项		
课题承担单位	名称	遵义市第一人民医院							
	单位所在地	遵义市汇川区(县市区)							
	通讯地址	遵义市汇川区凤凰北路98号				邮编	563000		
	单位性质	(1)1. 大专院校 2. 科研院所 3. 国有企业 4. 民营企业 5. 行政事业单位 6. 其它							
	所属县市区科技局或上级行政主管部门及负责人	遵义市科技局 刘永孚							
其它主要参加单位	序号	单位名称							
		无							
课题负责人	姓 名	何连利	性 别	(2)1. 男 2. 女	出生年	1980年			
	学 历	(1)1. 研究生 2. 大学 3. 大专 4. 中专 5. 其它							
	职 称	(1)1. 高级 2. 中级 3. 初级 4. 其他							
	E-mail	1744122878@qq.com							
	手 机		传 真	28933352					
课题组人数	7	高级	2	中级	4	初级	1	其他	0
起始时间	2018年11月			终止时间	2021年11月				
课题活动类型	(1)1. 应用基础研究 2. 应用研究与开发 3. 产业化研究与开发 4 其它								
所属技术领域	(7)1. 信息 2. 光机电一体化 3. 材料 4. 农业 5. 能源或资源 6. 生态环境 7. 生物医药 8. 社会事业 9. 其它								
课题创新类型	(3)1. 原始创新 2. 集成创新 3. 引进消化吸收再创新								
主要研究内容 (300字以内)	卵巢早衰(POF)导致育龄期女性闭经不孕和一些更年期症状。目前POF的治疗方法不能改善生殖功能。人羊膜间充质干细胞(hAD-MSCs)具有自我复制能力、多向分化潜能及较强的免疫调节能力,在延缓POF的治疗方面有良好的应用前景。人参皂苷Rg1(Rg1)作为hAD-MSCs的诱导剂可以促进hAD-MSCs特化为生殖干细胞,为hAD-MSCs在卵巢的植活及增殖分化。卵巢提供良好的微环境。本项目采用在Rg1干预下,卵巢颗粒细胞Fshr为靶点,在体外观察其对hAD-MSCs向D-半乳糖(D-gal)损伤的卵巢颗粒细胞的保护作用,体内观察其对hAD-MSCs的增殖分化、归巢及协同治疗效果,并探讨其在D-gal诱导POF修复中的作用与机制。这有望为提高干细胞归巢和治疗POF探索新的途径、药物及作用靶点。								
预期成果形式	(6)1. 专利 2. 新技术 3. 新工艺 4. 新产品(含农业新品种、计算机软件)5. 新材料 6. 其他								
预期取得专利	(3)1. 国外发明专利 2. 国内发明专利 3. 其它								
预期经济效益及社会效益	可以为POF的临床治疗寻找新的治疗途径,使用人羊膜间充质细胞为原料,可以节约成本,利用传统中药与现在的先进技术相结合,能创造较好的经济效益。								
经费投入	总经费	4.0万元			联合资金拨款	4.0万元			

一、课题主要研究内容:

- 1、Rgl 对 D-gal 诱导 POF 小鼠卵巢颗粒细胞 Fshr 表达的影响和 hAD-MSCs 增殖分化, 迁移归巢能力的影响。
- 2、Rgl 对 hAD-MSCs 移植 POF 小鼠颗粒细胞 Fshr 表达水平和 hAD-MSCs 的植活、增殖分化, 迁移归巢能力的影响。
- 3、经 Rgl 预处理 hAD-MSCs 移植 D-galPOF 后颗粒细胞 Fshr 表达水平和 hAD-MSCs 的植活、增殖分化、迁移归巢能力的影响。
- 4、检测处理后小鼠卵巢的病理改变和生殖功能的变化并探讨其作用机制。

二、课题须完成的目标任务:

- 1、明确 Rgl 是否为颗粒细胞 Fshr 的调节剂。以 Fshr 为靶点, 阐明 Rgl 在 hAD-MSCs 移植治疗前后干预对 D-gal POF 小鼠生殖功能的作用与有关分子机制。
- 2、明确 Rgl 对 hAD-MSCs 增殖、分化、迁移归巢能力的影响和作用机制。
- 3、明确 Rgl、hAD-MSCs 或是两者联合对 D-gal POF 小鼠颗粒细胞 Fshr 的调节作用及对生殖功能的恢复作用, 为临床治疗 POF 提供有力的理论基础和实验依据。

三、课题须攻克的技术关键(拟解决的主要技术问题、难点及创新点):

目前我们在临床工作中发现, 随着生活压力、工作压力越来越大, 生活和医疗环境的改变, POF 的发病率越来越高, POF 会出现闭经, 高促性腺激素及低雌激素综合症, 更年期的症状, 不孕, 给妇女带来了很大的危害。但是临床还没有能逆转 POF 的治疗方法, 对于不孕的患者, 只有采用赠卵的方式。目前临床上用于治疗该疾病的药物为激素替代, 但是由于激素治疗时间长, 疗效不确切。

并可能带来很多副作用,如增加了患乳腺癌、卵巢癌、子宫内膜癌及冠心病的风险。为此,我们急切需要寻找一种切实有效的治疗方法。在了解正常和 D-gal 诱导 POF 小鼠模型颗粒细胞、hAD-MSCs 移植后中 Fshr 表达情况与功能基础之上,明确 Rgl 对 hAD-MSCs 移植 D-gal 小鼠模型卵巢修复功能的影响,以 Fshr 为靶点,阐明 Rgl 可能涉及的作用机制,为进一步将 Rgl 用于临床 POF 干细胞移植奠定理论基础和提供实验依据。

准确了解 D-gal 诱导 POF 模型及 hAD-MSCs 移植后中 Fshr 表达或活性变化与 POF 患者生殖功能修复中干细胞生物学特性与功能及卵巢微环境的动态变化,有利于准确理解 hAD-MSCs 的动态变化规律,也将为更好地把握移植和药物治疗时机提供重要理论指导。

四、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)

技术指标:

明确 hAD-MSCs 对 POF 的治疗效果及作用靶点。

提交研究报告 1 份。

发表 SCI 文章或北大核心期刊 1 篇。

培养硕士研究生 1 名, 晋升副高 2 名。

四、研究开发方向及技术路线

1、人羊膜间充质干细胞的分离、培养: 取剖宫产的羊膜组织, 无菌条件下, 采用机械法将羊膜从胎盘组织上剥离, 用 PBS 液反复冲洗数次以清除残留血迹, 将羊膜剪成碎片, 用含 0.02% EDTA 的 0.05% 胰蛋白酶消化 4 次, 加入 0.075mg/ml DNase I 加上 0.75mg/ml 的胶原酶, 置 37 度, 2000 转/min 旋转消化约 2h 至组织基本消化完, 300 目钢网过滤, 收集细胞滤液, 1500 转/min, 离心 10min, 细胞沉淀重新悬浮于培养基中, 置于培养箱中培养, 3 天换新的培养基。

2、人羊膜间充质干细胞的鉴定: 采用流式细胞仪检测人羊膜间充质干细胞表面标志性分子。取达到 80% 融合后的第三代细胞, 用 0.125% 胰蛋白酶消化, PBS 洗涤 2 遍, 用 PBS 制成浓度 2×10^5 /L 的悬液, 经 300 目的尼龙网过滤, 用流式细胞仪检测阳性细胞数和阴性细胞数。

3、体外实验分组: 分 6 组, 每组均选取有动情周期的 6-8 周龄 C57 雌性小鼠 10-15 只, D-gal, $200\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}/\text{d}$, 颈背部皮下注射 6 周建立 POF 模型, 模型建立后, 按颗粒细胞的制备方法制备颗粒细胞, 颗粒细胞中加入 Rg1, 了解 Rg1 对颗粒细胞 Fshr 的表达情况, 将颗粒细胞与 hAD-MSCs 共培养, hAD-MSCs 对颗粒细胞 Fshr 的表达情况, 及 Rg1 加入后 hAD-MSCs 对衰老颗粒细胞增殖能力, 颗粒细胞 Fshr 表达情况的影响。

分为衰老组, 衰老组+Rg1, hAD-MSCs+衰老组 (接触性共培养), hAD-MSCs+衰老组 (非接触性共培养), hAD-MSCs+衰老组 (接触性共培养)+Rg1, hAD-MSCs+衰老组 (非接触性共培养)+Rg1。

间接共培养: 采用培养孔中置入细胞嵌盒, 培养孔内为衰老的颗粒细胞, 细胞嵌盒内为 hAD-MSCs 1×10^4 /6ul, 细胞分泌的因子可以自由通过嵌盒底部的透明膜自由交换。

直接共培养: 将 1×10^4 /6ul hAD-MSCs 与衰老组颗粒细胞直接共培养。

颗粒细胞的制备: 10% 水合氯醛麻醉后处死, 无菌条件下取出双侧卵巢, 去除卵巢周围的组织及包膜, 并用预冷的 Hank's 液清洗 3 次。将卵巢移入无血清 DMEM/F-12 培养液中, 用 1 mL 一次性注射器针头刺破卵泡, 释放颗粒细

胞,加入0.25%胰酶1 mL,用吸管反复吹打悬液数次,使颗粒细胞团块分离。加入3 mL 37℃消化10分钟(其间每隔3分钟振荡或吹打1次)。加入3 mL DMEM/F-12 培养液(20% 胎牛血清,100 μ /mL 青霉素,0.1 mg/mL 链霉素)终止胰酶消化,并静置10分钟,取悬液加入离心管,离心(1000 rpm, 10 分钟),弃上清,加入5 mL Hank's 液,吹散细胞后再离心。弃上清,加入1 mL DMEM/F-12 培养液(20% 胎牛血清,100 μ /mL 青霉素,0.1 mg/mL 链霉素)后吹打,血球计数板计数,调整细胞悬液浓度至适宜浓度,在37℃,5% CO₂ 温箱中培养。

检测内容:将经处理的颗粒细胞进行的增殖,凋亡流式细胞仪细胞标志,荧光显微镜细胞形态分析 CCK8 绘制颗粒细胞的生长曲线 hAD-MSCs 细胞增殖动力学 hAD-MSCs 的迁移,粘附能力分析 WB 测定颗粒细胞上 Fshr 的表达 PCR 测定颗粒细胞 Fshr 基因的表达。

4、体内实验:分为盐溶液组,衰老组,Rgl 延缓衰老组,Rgl 治疗衰老组,hAD-MSCs 尾静脉移植组,hAD-MSCs 卵巢移植组,Rgl 延缓衰老组+hAD-MSCs 尾静脉移植,Rgl 延缓衰老组+hAD-MSCs 卵巢移植组,Rgl 治疗衰老组+hAD-MSCs 尾静脉移植,Rgl 治疗衰老组+hAD-MSCs 卵巢移植,每组选取有动情周期的 C57 雌性小鼠10只。

①体重及性周期的监测:每天测定各组小鼠的体重和做阴道脱落细胞检测并记录,了解小鼠全身情况及性周期的变化情况。

②测定大鼠的激素变化:药物处理后,取眼眶血,采用放射免疫法测定血清 LH、E₂、FSH、AMH、D-gal 水平,了解性激素在注射药物过程中的动态变化。

③卵巢子宫脏器系数测定:每组30只,麻醉取,脱颈法处死小鼠,取出子宫,双侧卵巢称取脏器湿重,计算脏器体重系数,脏器体重系数 = 脏器湿重(mg) / 体重(g) × 100%。取出主要脏器(肝脏、肺、脾脏、肾脏)作 HE 染色了解脏器结构的变化。

④卵泡计数:卵巢组织石蜡切片,HE 染色,然后在镜下计数初级、次级及窦状卵泡,闭锁卵泡及黄体数。

⑤卵巢组织抗氧化酶与氧化产物含量测定：取各组大鼠卵巢组织制备10%的组织匀浆，提取上清液，Bradford法测定组织蛋白质含量，酶标仪检测T-SOD、MDA、GSH-px的蛋白浓度

⑥卵巢组织炎症指标的测定：测定卵巢的IL-1 β 、IL-6和TNF- α 炎症指标的变化

⑦卵巢组织免疫组化检测：了解次级卵泡及窦卵泡上Fshr在颗粒细胞上的表达情况，并用计算机图像分析系统显示Fshr在颗粒细胞上的表达强度。

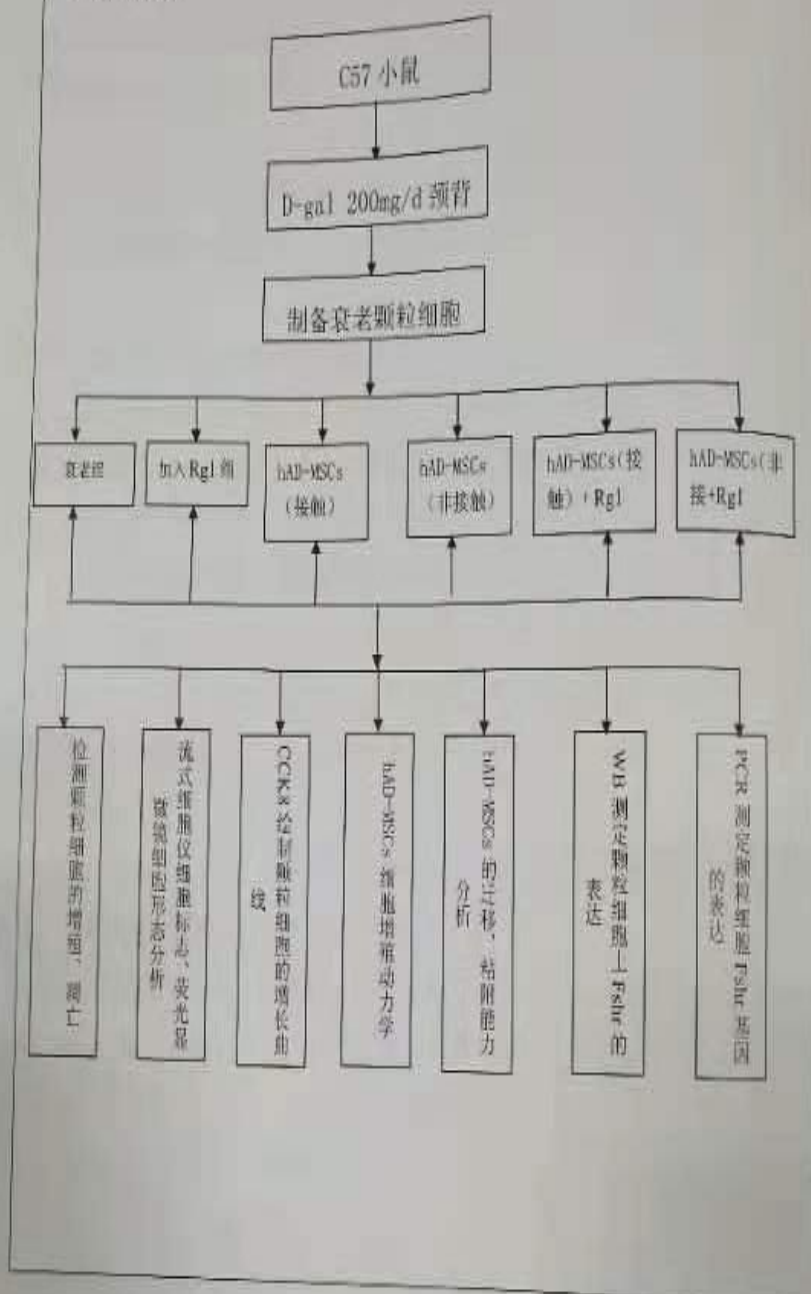
⑧电镜观察卵巢的超微结构。

⑨卵巢上衰老蛋白及基因的检测：western blotting和PCR检测P53-p21-p19,bax,bcl2表达。

⑩每组选取5只雌鼠与雄鼠进行交配实验（比例为2:1），记录每经繁殖的幼鼠的体重、个数、有无死产、小鼠畸形发生的情况，交配完成后麻醉下处死雌鼠，取眼眶血测定性激素水平，取出主要脏器和卵巢、子宫进行HE检测。

技术路线

一、体外试验



六、课题的年度计划及年度考核指标

2018 年 11 月-12 月	再次对课题进行设计，人员进行分工，调试仪器
2019 年 1 月-12 月	完成体外实验的建模
2020 年 1 月-12 月	完成体外实验的检测
2021 年 1 月-11 月	<ol style="list-style-type: none">1、数据处理，总结分析，补充完善2、撰写论文，发表论文3、审核和申报成果

七、项目的承担单位、参加单位及主要研究人员

课题承担单位：遵义市第一人民医院

主要参加单位：无

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
何连利	女	38	副主任 医师	妇产科	60	遵义市第一人民医院

主要研究人员

刘晓云	女	53	主任 医师	妇产科	60	遵义市第一人民医院
李亚军	男	37	副主任 医师	肿瘤科	40	遵义市第一人民医院
郑荣华	女	33	主治 医师	妇产科	60	遵义市第一人民医院
黄 露	女	32	主治 医师	妇产科	60	遵义市第一人民医院
谢 青	女	35	主治 医师	妇产科	60	遵义市第一人民医院
陈代刚	男	38	主治 医师	呼吸内 科	40	遵义市第一人民医院
杨 莹	女	31	住院 医师	妇产科	60	遵义市第一人民医院

八、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	
			总投入	联合资金 拨款
来源预算合计	4.0	支出预算合计	4.0	4.0
一、联合资金拨款	4.0	一、人员费	0.0	0.0
二、国家其它拨款	0.0	其中：课题负责人	0.0	0.0
三、部门拨款	0.0	主要研究人员	0.0	0.0
四、地方拨款	0.0	二、设备费	0.0	0.0
五、单位自筹	0.0	1、购置费	0.0	0.0
六、其它来源	0.0	2、试制费	0.0	0.0
		三、相关业务费	3.8	3.8
		1.材料费	3.4	3.4
		2.燃料及动力费	0.0	0.0
		3.测试及化验费	0.1	0.1
		4.会议差旅费	0.3	0.3
		四、课题管理费	0.2	0.2
		五、其他费用	0.0	0.0

九、任务书签订各方意见

遵义市科学技术局(甲方)

负责人(签字)



课题承担单位(乙方)遵义市第一人民医院

课题负责人(签字)

何连利

财务负责人(盖章)

帐户名: 遵义市第一人民医院

帐号:

开户银行:



2018年11月15日

资金等匹配条件落实保证方

县市区科学技术局或乙方主管部门(丙方)

负责人(签字)

何连利



(公章)

年 月 日