

# 浙江省医药卫生科技计划项目

## 合 同 书

计划类别：  
☐ 省部共建计划  
☐ 创新人才支持计划  
☒ 面上项目计划  
☐ 新技术产品研发计划  
☐ 适宜技术培育推广计划

课题名称：  
基于网络药理学研究环氧化酶2抑制剂治疗腺性膀胱炎的作用及分子机制

申 请 者：  
柯莽

申请单位：  
台州医院

联系手机：  
13566869198

申请日期：  
2019-08-02

浙江省卫计委

二〇一二年制



# 一、项目情况

项目名称	基于网络药理学研究环氧化酶2抑制剂治疗腺性膀胱炎的作用及分子机制				
研究类别	基础 研究	已有课 题名称			
		已有课 题级别		已有 课题 年份	
申报学科	临床医学——泌尿科外科学				
开始日期	2020-01	完成日期	2022-12		
项目经费预算（万元）					
总计	向 省 卫 生 计 生 委 申 请	市卫 生局 配套	县卫生局配套	单 位 配 套	其他
6.0	3.0	0.0	0.0	3.0	0.0
专项项目经费开支预算（万元）		项目配套经费开支预算（万元）			
设备费	0.0	设备费		0.0	
材料费	2.05	材料费		2.55	
试验化验加工费	0.0	试验化验加工费		0.0	



燃料动力费	0.0	燃料动力费	0.0
差旅费	0.0	差旅费	0.0
人员劳务费	0.3	人员劳务费	0.3
外拨费用	0.0	外拨费用	0.0
合作、协作研 究与交流费	0.0	合作、协作研 究与交流费	0.0
出版/文献/信息传播知识产权事务 费	0.5	出版/文献/信息传播知识产权事务 费	0.0
会议费	0.0	会议费	0.0
管理费	0.15	管理费	0.15
专家咨询费	0.0	专家咨询费	0.0
其他开支	0.0	其他开支	0.0
合计	3.0	合计	3.0



预计成果			
定量指标			
预期形成的成果适用疾病	腺性膀胱炎		
预期形成的成果适用领域	诊断, 病理, 药物, 随访		
预期成果的临床获益效果	提高生存质量		
是否形成技术标准和诊治方案	是		
技术标准和诊治方案	省内首创新标准方案		
发明专利	实用新型专利	外观设计专利	软件著作权
0	0	0	0
论文数	其中SCI数	著作数	新产品
1	1	0	0
技术标准	培养硕士数	培养博士数	
1	2	0	
定性指标			
预期目标1	系统阐明塞来昔布在CG中的作用靶点在CG组织中的表达情况, 以及与病理分型、复发、上尿路梗阻等临床资料的相关性;		
预期目标2	找出与CG复发和发生上尿路梗阻相关的独立风险因素, 构建列线图模型, 并通过外部数据验证其有效性, 用于预测CG复发、进展, 指导个体化治疗;		
预期目标3	发表高水平论文1篇, 协助培养硕士研究生2名, 形成诊疗方案, 进一步申报省级、国家级课题。		
预期目标4	全面验证塞来昔布治疗CG的作用和分子机制, 明确其作用靶点;		
预期目标5			



## 二、承担单位

第一申请单位				
单位名称	台州医院			
通讯地址	浙江省临海市西门街150号	邮编	317000	
联系电话	057685199620	联系人	朱敏	
合作单位				
序号	单位名称	联系人	联系电话	职责
1				
2				
3				
4				
5				



### 三、项目组成员

负责人					
姓名	柯莽				
出身年月					
职务	主任医师	专业	泌尿科外科学		
学历	硕士	学位	硕士		
工作单位	台州医院				
其他成员					
序号	姓名	出生年月	职称	工作单位	项目分工
1	柯莽		主任医师	台州医院	实验设计、指导
2	朴松哲		主治医师	台州医院	细胞培养, 生物化学实验
3	郑海红	1	副主任医师	台州医院	病理切片判读
4	陈静		助理研究员	台州医院	网络药理学分析
5	张美仙		助理研究员	台州医院	R语言统计学分析
6	莫利才		主治医师	台州医院	IHC染色, 细胞免疫荧光染色
7	洪涛		副主任医师	台州医院	标本收集
8	张显军	1	副主任医师	台州医院	IHC染色
					细胞分离、培



9	陈超前	<div></div>	研究生	台州医院	养, ELISA检测, 流式细胞术
10	周高波	<div></div>	研究生	台州医院	细胞分离、培养, PCR, western blot



#### 四、 计划进度

2019年9月1日-2020年8月31日

(1) 体外培养人原代CG细胞和正常膀胱移行上皮细胞，在细胞水平探索塞来昔布潜在靶点（PTGS1、PTGS2、MAPK14、CCND1、HRH1、PARP1、CDK1和RAF1）在CG细胞和正常膀胱移行上皮细胞中的表达水平。

(2) 检测塞来昔布干预对人原代CG细胞和正常膀胱移行上皮细胞中PTGS1、PTGS2、MAPK14、CCND1、HRH1、PARP1、CDK1和RAF1 mRNA和蛋白表达水平的影响。

(3) 明确塞来昔布与其潜在靶点的调控关系以及对细胞增殖、细胞周期、凋亡等表型的影响。

2020年9月1日-2021年8月31日

(1) 利用CG患者石蜡标本，通过免疫组织化学染色，从组织学水平比较塞来昔布潜在靶点在正常膀胱组织、CG组织及腺性膀胱癌组织中的表达水平；进一步比较上述靶点在不同病理类型CG组织中的表达水平。

(2) 检测塞来昔布潜在靶点在CG组织中的表达水平与CG病理分型和复发、合并上尿路梗阻等临床数据间的相关性。

2021年9月1日-2022年8月31日

(1) 探明塞来昔布潜在作用靶点（PTGS1、PTGS2、MAPK14、CCND1、HRH1、PARP1、CDK1和RAF1）在CG组织中的表达情况及其与CG相关的临床病理资料的相关性，进行统计分析，找出与CG复发和发生上尿路梗阻相关的独立风险因素，分别构建预测CG复发和上尿路梗阻发生风险的列线图模型，并通过外部数据验证模型的有效性。

(2) 整理数据，撰写论文和结题报告，参加国内相关学术会议一次。



## 五、项目基本情况

### 研究内容:

- (1) 网络药理学数和生物信息学数据库分析筛选塞来昔布治疗CG的靶点（已完成）
- (2) 体外培养人CG原代细胞，在细胞水平探索塞来昔布潜在靶点（PTGS1、PTGS2、MAPK14、CCND1、HRH1、PARP1、CDK1和RAF1）在CG尿路上皮细胞中的表达水平，明确塞来昔布与其潜在靶点的调控关系以及通过调控上述因子表达对细胞增殖、细胞周期、凋亡等表型的影响。
- (3) 利用CG患者石蜡标本，通过免疫组织化学染色，从组织学水平进一步探明塞来昔布潜在靶点在正常膀胱组织、CG组织及腺性膀胱癌组织中的表达水平，以及其与CG病理分型和临床数据间的相关性。
- (4) 通过回顾性分析，将与CG相关的临床病理资料变量进行单因素分析及Logistic多因素回归分析，找出与CG复发和发生上尿路梗阻相关的独立风险因素，并构建预测CG复发和发生上尿路梗阻发生风险的列线图模型。探讨并明确塞来昔布潜在靶点在CG患者疾病复发、进展的临床预测意义和靶向治疗的指导意义。



#### 研究方法:

(1) 网络药理学数和生物信息学数据库分析筛选塞来昔布治疗CG的靶点(已完成)

1) 塞来昔布靶点预测, 2) 生物信息学分析。

(2) 体外培养人CG原代细胞, 在细胞水平探索塞来昔布潜在靶点(PTGS1、PTGS2、MAPK14、CCND1、HRH1、PARP1、CDK1和RAF1)在CG尿路上皮细胞中的表达水平, 明确塞来昔布与其潜在靶点的调控关系以及对细胞增殖、细胞周期、凋亡等表型的影响。

1) 原代CG细胞分离及体外培养; 2) 通过细胞免疫荧光染色进行膀胱移行上皮细胞的鉴定; 3) 利用RT-PCR和Western blot在细胞水平检测塞来昔布潜在靶点(PTGS1、PTGS2、MAPK14、CCND1、HRH1、PARP1、CDK1和RAF1)在CG和膀胱移行上皮细胞中的表达水平; 4) 检测塞来昔布对细胞增殖、细胞周期、凋亡、迁移能力等表型的影响, 以及对其预测靶基因表达水平的影响。CCK-8法检测细胞活性, EdU渗入法检测细胞增值能力, 流式细胞仪检测细胞周期和细胞凋亡情况, ELISA法检测Caspases酶活性, Transewell实验检测细胞迁移能力。

(3) 利用CG患者石蜡标本, 通过免疫组织化学染色, 从组织学水平进一步探明塞来昔布潜在靶点在CG组织中的表达水平, 以及与CG病理分型和临床数据间的相关性。

(4) 通过回顾性分析, 将与CG相关的临床病理资料变量进行单因素分析及Logistic多因素回归分析, 找出与CG复发和发生上尿路梗阻相关的独立风险因素, 并构建预测CG复发和发生上尿路梗阻发生风险的列线图模型。探讨并明确塞来昔布潜在靶点在CG患者疾病复发、进展的临床预测意义和靶向治疗的指导意义。



创新点:

(1) 独创性:

迄今为止,关于塞来昔布在人原代CG膀胱细胞中的作用及机制,国内外未见文献报道。但已有的研究成果为这种新治疗策略的提出提供了充分的可能。

(2) 理论上创新:

目前多数学者认为CG的形成和发展是一个渐变的过程、病理类型多、机制复杂,所以对不同病理类型的CG的治疗方法应该有所区别。塞来昔布治疗CG是否存在其他的作用靶点,以及是否对其他病理类型CG同样有效,相关研究目前尚未见报道。我们将研究塞来昔布治疗CG的潜在作用靶点在CG组织表达情况以及与病理类型的相关性,这将有助于开发治疗CG的新方法和筛选适宜人群进行个体化治疗,具有重要的理论价值和潜在的社会效应。这是本课题最重要的创新之处。

(3) 方法上创新:

本项目结合网络药理学、人CG原代细胞及CG组织切片等多学科综合性方法,在分子水平、细胞水平和组织水平研究塞来昔布对CG的作用、分子机制和作用靶点,并进一步探讨并明确塞来昔布作用靶点与CG病理分型和临床数据之间的相关性,找出与CG复发和发生上尿路梗阻相关的独立风险因素,进一步构建列线图模型,并通过外部数据验证其有效性,深入探讨塞来昔布潜在靶点在CG患者疾病复发、进展的临床预测意义和靶向治疗的指导意义。



## 六、 前期工作说明

(1) 利用PubChem数据库获取塞来昔布(美国,辉瑞, C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>S) 3D结构和简化分子现行输入规范表达式(SMILES) (CC1=CC=C(C=C1)C2=CC(=NN2C3=CC=C(C=C3)S(=O)(=O)N)C(F)(F)F), 然后通过Swiss Target Prediction数据库, 获取药物靶点108个。通过GeneCards数据库得到与CG相关基因253个, 通过CTD数据库得到与膀胱炎(包括细菌性和非细菌性膀胱炎)相关基因21964个, 将上述三个基因集绘制韦恩图取交集, 筛选塞来昔布治疗CG可能的潜在靶点共8个: PTGS1、PTGS2、MAPK14、CCND1、HRH1、PARP1、CDK1和RAF1。

(2) 将塞来昔布治疗CG潜在作用靶点输入STRING数据库, 利用Cytoscape软件Genemania插件构建蛋白互作网络。

(3) 通过String数据库和DAVID数据库对塞来昔布治疗CG潜在作用靶点进行富集分析。塞来昔布治疗CG的靶点在生物学过程中主要富集到蛋白质向细胞核定位的正向调控, 细胞对化学刺激的反应, 磷酸盐代谢过程的调节, 对有机氮化合物的反应和对放射线的反应等; 细胞组分中富集到依赖于细胞周期蛋白激酶的全酶复合物; 分子功能中富集到前列腺素内过氧合酶活性、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶活性、蛋白激酶结合、细胞周期蛋白依赖的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶活性和过氧化物酶活性等生物学过程, 涉及多个生物学过程。利用DAVID数据库进行KEGG分析。富集在细胞衰老、VEGF信号通路、催乳激素信号通路、孕酮介导软母细胞成熟、内分泌抵抗、FOXO信号通路、肿瘤MicroRNA信号通路、膀胱癌信号通路等, 表明塞来昔布治疗CG的治疗靶点分布在多个通路中, 从而协调发挥治疗作用。

(4) 回顾性分析自2014年1月1日~2019年7月1日在我院住院手术治疗的CG病例共100例, CG组织标本通过电切手术或组织活检获得。患者平均年龄53.14±12.11岁, 性别男性女性各50例。取HE染色病理切片, 病理分型依据最近由叶章群教授等主张的方法将腺性膀胱炎分为经典型(泌尿上皮型)、肠上皮型、前列腺上皮型和混合型4种组织学类型, 由2位病理科医生分别读片, 不一致的病例请第3位病理科医生重新读片, 取2个一致的结果。IHC发现PTGS1、PTGS2、MAPK14、CCND1、HRH1、PARP1、CDK1和RAF1在组织中均表达。



七、 本课题相关内容的已有研究成果情况

与本项目相关前期工作尚未发表。



## 八、 附件信息

是否有查新检索报告:	<input type="checkbox"/> 是 <input checked="" type="checkbox"/> 否
是否使用实验动物:	<input type="checkbox"/> 是 <input checked="" type="checkbox"/> 否
是否涉及伦理问题:	<input checked="" type="checkbox"/> 是 <input type="checkbox"/> 否
是否涉及实验室生物安全:	<input type="checkbox"/> 是 <input checked="" type="checkbox"/> 否
是否涉及干细胞:	<input type="checkbox"/> 是 <input checked="" type="checkbox"/> 否
是否是临床前新技术研究:	<input checked="" type="checkbox"/> 是 <input type="checkbox"/> 否
是否涉及病毒研究	<input type="checkbox"/> 是 <input type="checkbox"/> 否



## 九、 承诺书

本单位（或个人）承诺：

本申请书中所填写的内容和资料真实、有效，如存在弄虚作假和与事实相违背的内容，由本单位（个人）承担全部责任。

申报单位（盖章）：

项目负责人签字：

2019年10月24日

## 十、 单位审核意见

申报单位意见：

单位（盖章）：

负责人签字：

年 月 日

上级主管部门意见：

单位（盖章）：

负责人签字：

2019年11月5日

## 十一、 省卫计委终审意见

省卫计委审核意见：

同意列入省医药卫生科研面上项目，  
资助经费 3 万元，请单位予以经费配套。

省卫计委（盖章）：

2019年11月19日