



申请代码	H0307
受理部门	
收件日期	
受理编号	8177030774



国家自然科学基金 申 请 书

(2017 版)

资助类别：	面上项目		
亚类说明：			
附注说明：	常规面上项目		
项目名称：	PDIA3-STAT3脂筏上调CTSS调控DC活化致IBS内脏高敏感的研究		
申 请 人：	吕宾	电 话：	0571-87032028
依托单位：	浙江中医药大学		
通讯地址：	杭州市上城区邮电路54号		
邮政编码：	310006	单位电话：	0571-86613536
电子邮箱：	lvbin@medmail.com.cn		
申报日期：	2017年03月01日		

国家自然科学基金委员会



基本信息

申请人信息	姓名	吕宾	性别	男	出生年月	1963年10月	民族	汉族
	学位	硕士	职称	教授	每年工作时间（月）		6	
	电话	0571-87032028		电子邮箱		lvbin@medmail.com.cn		
	传真	0571-87077785		国别或地区				
	个人通讯地址	杭州市上城区邮电路54号						
	工作单位	浙江中医药大学/第一临床医学院						
	主要研究领域							
依托单位信息	名称	浙江中医药大学						
	联系人	邵科钉	电子邮箱		knail@163.com			
	电话	0571-86613536	网站地址		http://www.zjtcn.net			
合作研究单位信息	单位名称							
项目基本信息	项目名称	PDIA3-STAT3脂筏上调CTSS调控DC活化致IBS内脏高敏感的研究						
	英文名称	PDIA3-STAT3 lipid raft mediated immune activation of dendritic cell induce visceral hypersensitivity of IBS by CTSS upregulation						
	资助类别	面上项目				亚类说明		
	附注说明	常规面上项目						
	申请代码	H0307. 消化道动力异常及功能性胃肠病						
	基地类别							
	研究期限	2018年01月01日 -- 2021年12月31日				研究方向：肠易激综合征/内脏高敏感		
	申请直接费用	60.9100万元						
中文关键词	肠易激综合征；树突状细胞；蛋白质二硫键异构酶A3；组织蛋白酶S；信号转导与转录激活因子3							
英文关键词	Irritable bowel syndrome; dendritic cell; protein disulfide isomerase A3; cathepsin S; Signal transduction and transcriptional activation factor 3							



中文摘要	<p>内脏高敏感是肠易激综合征（IBS）核心机制，其产生原因未清楚阐明。我们前期研究提示肠道树突状细胞（DC）活化在IBS内脏高敏感的发生中发挥关键作用，同时，研究发现并验证PDIA3在介导DC活化中发挥了关键作用。已有研究提示PDIA3可以通过阻拦PY-STAT3入核而负向调控STAT3通路，而STAT3通路失活可导致CTSS上调表达，与DC的激活有关。因此，我们认为，提示IBS大鼠肠道DC细胞膜上可能存在PDIA3-STAT3脂筏，其可通过抑制STAT3通路上调CTSS表达，从而介导DC表面MHCII类分子抗原提呈。本研究通过细胞及动物水平研究，明确PDIA3通过抑制PY-STAT3入核介导DC活化在IBS中的重要作用，并进一步阐明STAT3通路通过上调CTSS表达调控肠道DC表达MHCII类分子的机制。通过本研究将进一步完善肠道免疫调控异常的机制研究并为寻求临床治疗的新靶点提供依据。</p>
英文摘要	<p>The main pathophysiological feature of irritable bowel syndrome (IBS) is visceral hypersensitivity, the mechanisms of which, however, still remain unknown. Our previous work found that immune activation of dendritic cell (DC) may play a critical part in the generation of visceral hypersensitivity of IBS, meanwhile. Research suggests that PDIA3 may regulate signaling by sequestering activated STAT3, while STAT3 pathway is related to the activation of DC. Thus, we hypothesized that CRF pathway may mediate the increased expression of PDIA3 in the cell membrane of DC, which regulate signaling by sequestering activated STAT3 and lead to the immune activation of DC, which may play a critical part in the generation of visceral hypersensitivity of IBS. In this study, first, by using the IBS rats as the research subjects as well as the isolated colonic DC in IBS rats, we try to clarify that the PDIA3 could sequester activated STAT3, lead to the immune activation of DC, which lead to the generation of visceral hypersensitivity of IBS. Therefore, our study aim to further improve the mechanisms of stress related immune abnormality in IBS, and the final results of our research might provide new insights for the pathophysiology of IBS and clinical treatment.</p>



项目组主要参与者（注：项目组主要参与者不包括项目申请人）

编号	姓名	出生年月	性别	职 称	学 位	单位名称	电话	电子邮箱	证件号码	每年工作 时间（月）
1	李蒙	1986-10-20	女	医师	博士	浙江中医药大学	13646874687	lemon20050928@163.com	330483198610200321	6
2	王曦	1982-09-25	女	助理研究员	博士	浙江中医药大学	13575704488	jessieklarke@163.com	210102198209256626	5
3	郭梦舟	1990-12-02	女	医师	硕士	浙江中医药大学	13516805975	gmz1202@163.com	430725199012020065	6
4	徐丽	1989-11-25	女	医师	硕士	浙江中医药大学	15168232815	798075005@qq.com	33020619891125344X	6
5	胡玥	1989-09-06	女	博士生	硕士	浙江中医药大学	15158190238	jiuyueqingxuan@163.com	330521198909060227	6
6	王爽爽	1993-10-17	女	硕士生	学士	浙江中医药大学	15068755147	245769648@qq.com	332624199310170041	6
7	何承海	1990-08-20	男	硕士生	学士	浙江中医药大学	15869128481	422624607@qq.com	330521199008200012	6

总人数	高级	中级	初级	博士后	博士生	硕士生
8	1	1	3		1	2



国家自然科学基金项目资金预算表

项目编号: 8177030774

项目负责人: 吕宾

金额单位: 万元

序号	科目名称	金额	备注
	(1)	(2)	(3)
1	一、直接费用	60.9100	
2	1、设备费	0.0000	
3	(1)设备购置费	0.0000	
4	(2)设备试制费	0.0000	
5	(3)设备改造与租赁费	0.0000	
6	2、材料费	37.19	动物购买及饲养、试剂费、消耗品
7	3、测试化验加工费	11.40	shRNA序列合成、病毒包装等
8	4、燃料动力费	0.0000	
9	5、差旅/会议/国际合作与交流费	0.0000	
10	6、出版/文献/信息传播/知识产权事务费	8.00	文章版面费、审稿费等
11	7、劳务费	4.32	直接参与项目研究的研究生劳务费用
12	8、专家咨询费	0.0000	
13	9、其他支出	0.0000	
14	二、自筹资金来源	0.0000	



预算说明书（定额补助）

NSFC 2017



(请按《国家自然科学基金项目资金预算表编制说明》中的要求，对各项支出的主要用途和测算理由及合作研

究外拨资金、单价 ≥ 10 万元的设备费等内容进行详细说明，可根据需要另加附页。)

本项目所需设备已经具备，无需购置 10 万元以上资产及设备，科研经费主要用于购买实验所需材料。

直接费用 60.91 万元)

1. 材料费：37.19 万元

(1)动物购买及饲养 2.15 万元:

购买及运输平均单价：SD 孕鼠 250 元/只；饲养平均单价：离乳前 3/窝/天，离乳后幼鼠 1 元/只/天，平均饲养周期：SD 孕鼠 15 天，SD 幼鼠 84 天。本课题使用 SD 孕鼠约 30 只，离乳后处死，需要 $30 \times (250 \text{ 元/只} + 3 \text{ 元/窝/天} \times 7)$ 共计 0.81 万元；本课题使用 SD 幼鼠约 160 只，需要 $160 \times (1 \text{ 元/只/天} \times 84)$ 共计 1.34 万元；总计 2.15 万元。

(2)试剂费 33.54 万元；

-细胞培养试剂，总计 2.34 万元

RPMI1640 等常规细胞培养基 (Gibco 公司)：细胞培养用，500ml/瓶，其中 RPMI1640 约 250 元/瓶，需要约 6 瓶，共计 0.15 万元；胎牛血清 (美国 Invitrogen 公司) 细胞培养用，500ml/瓶，7000 元/瓶，需要 3 瓶，共计 2.10 万元；细胞培养板/瓶用于细胞的分离培养等，细胞培养板/瓶平均约 10 元/个，共需 90 个，计 0.09 万元。

-细胞因子检测和细胞分离试剂等，总计 13.80 万元

细胞因子 IL-4、IL-9、IL-6、TNF- α (eBioscience 公司) 检测用试剂盒：平均 7000 元/个，每种试剂盒需要 2 个/种，共计 5.6 万元；大鼠 CD103 免疫分离磁珠 (德国美天旎公司)，平均 6000/个，约需 4 个，共计 2.4 万元；

CD103、MHCII、CD4、CD8 等流式细胞术用染色抗体 (eBioscience 公司)，平均 5000 元/个，需 10 个，共计 5.00 万元；酪氨酸磷酸酶抑制剂原钒酸钠、CTSS 特异性抑制剂 LHV (Sigma, Santa Cruz Biotechnology 公司等)，3000 元/个，约需 2 个，共计 0.60 万元；异硫氰酸荧光素-葡聚糖 (Sigma 公司)，1000 元/个，约需 2 个，



-分子生物学试剂，总计 14.40 万元

蛋白纯化相关试剂，western 实验抗体 PDIA3、PY-STAT3、STAT3（Sigma，Santa Cruz Biotechnology 公司等），平均 5000 元/种，需 7 个，共计 3.50 万元；亚细胞蛋白质组抽提试剂盒（Novagen 公司），平均 5000 元/种，需 6 个，共计 3.00 万元；EMSA 试剂盒（PIERCE 公司），平均 5000 元/种，需 2 个，共计 1.00 万元；免疫荧光染色抗体 OX62、PDIA3、STAT3、PY-STAT3（美国 Invitrogen 公司），平均 6000/个，需 4 个，共计 2.40 万；交联免疫沉淀技术试剂盒（Thermo Scientific 公司），平均 5000/个，需 3 个，共计 1.50 万；Li-p10 降解实验相关试剂（Sigma，Santa Cruz Biotechnology 公司等）约 3.00 万元。

-其它试剂 3.00 万。

包括：western 实验、免疫荧光、免疫组化等所需二抗约 3.00 万元。

(3)消耗品 1.50 万元

包括：PCR 管，离心管，移液管，枪头，注射器，冻存管，磁珠分选柱等 1.00 万元，液氮等 0.50 万元。

2. 测试化验加工费：11.40 万元

shRNA 序列合成、病毒包装等 10.00 万元；激光共聚焦显微镜观察，每小时 200 元，约 6 小时，计 1.20 万元；流式细胞检测，每小时 100 元，约 20 小时，计 0.2 万元。

3. 出版/文献/信息传播/知识产权事务费：8.00 万元

按照每篇文章版面费、审稿费平均 1.00 万元计，共计发表 SCI 文章 2 篇，总计 2.00 万元，在国内核心期刊发表文章按每篇文章版面费、审稿费平均 1.00 万元计，共计发表文章 4 篇，总计 4.00 万元；其他文献检索、查新、打印费用等 2.00 万元。

4. 劳务费：4.32 万元，

直接参与项目研究的研究生劳务费用，共有 2 名硕士研究生参加本课题，按照四年支付费用，每人每月 500 元，共计支付 500 元/月×6 个月×4 年×2 人=2.40 万元；有 1 名博士研究生参加本课题，按照四年支付费用，每人每月 800 元，共计支付 800



NSFC 2017



报告正文

参照以下提纲撰写，要求内容翔实、清晰，层次分明，标题突出。请勿删除或改动下述提纲标题及括号中的文字。

（一）立项依据与研究内容（4000-8000 字）：

1. 项目的立项依据（研究意义、国内外研究现状及发展动态分析，需结合科学研究发展趋势来论述科学意义；或结合国民经济和社会发展中迫切需要解决的关键科技问题来论述其应用前景。附主要参考文献目录）；

肠易激综合征（irritable bowel syndrome, IBS）是最常见的功能性胃肠病，全球范围内 IBS 发病率为3.3%-31.6%，目前亚洲国家 IBS 发病率已达9.6%^[1]。本课题组前期流行病学调查结果显示，浙江省高校大学生 IBS 患病率达6.9%^[2]（Chin J Intern Med, 2012）。临床上 IBS 患者症状常反复发作，严重影响患者的生活质量，占用大量医疗资源，一直是消化内科领域的临床难点和研究热点之一。

内脏高敏感是 IBS 症状产生的核心机制，近年来，肠黏膜免疫功能异常在 IBS 内脏高敏感中的作用逐渐受到重视，研究发现，IBS 患者肠黏膜中各种免疫细胞，如 T/B 淋巴细胞、肥大细胞等数量明显增多^[3-4]；同时，IBS 患者局部肠黏膜及循环中存在促炎（IL-6、IL-8、IL-1 β 、TNF- α ）及抑炎因子（IL-10）表达失衡^[5-6]，多种炎症因子可以直接作用于肠神经系统而引起 IBS 内脏高敏感^[7-9]。由此可见，对引起肠黏膜免疫功能异常的原因及机制的深入探讨，有望为 IBS 内脏高敏感免疫调控机制的研究提供依据，并为 IBS 临床诊治提供科学依据。

树突状细胞（dendritic cell, DC）是主要的专职抗原提呈细胞（APC）。肠道 DC 主要分布在 Peyer's 集合淋巴小结（PP 结）、肠黏膜固有层及黏膜上皮层肠相关淋巴组织，其可以捕获来源于肠腔的致病菌或外来抗原，同时自身发生成熟转化，并迁徙至局部肠系膜淋巴结，提呈给 CD4⁺或 CD8⁺T 淋巴细胞，在介导肠黏膜免疫调控中发挥重要作用。本课题组经过数年来的探索性研究积累，在国家自然科学基金（2011 年，编号 81170348）及浙江省自然科学基金（2012 年，编号 Z12H030001）资助下，已经证实肠道 DC 活化后刺激 T 淋巴



细胞分泌细胞因子是导致 IBS 内脏高敏感反应重要的机制之一，更令我们感兴趣的是，研究首次发现并验证了蛋白质二硫键异构酶 A3 (protein disulfide isomerase A3, PDIA3) 在介导 DC 活化中发挥了关键作用^[10,11,12]：我们采用 PDIA3 基因沉默技术，通过体内外研究证实 PDIA3 可以介导 DC 激活 T 淋巴细胞，上调相关细胞因子引起肠道炎症，从而促进 IBS 内脏高敏感形成。因此，本课题拟在前期研究的基础上，进一步开展研究对 PDIA3 引起 DC 活化的具体机制进行探讨。

PDIA3，又称ERp57，是蛋白质二硫键异构酶家族的一员。一般认为，PDIA3主要位于内质网中，以分子伴侣形式参与新生蛋白质加工处理及质量监控。已有研究发现，除了内质网中，PDIA3亦可以分布于细胞表面及细胞膜蛋白复合物中，作为膜PDIA3，其同样参与了多种信号通路的活化^[13-14]。本研究团队前期已应用蛋白质组学筛选出应激IBS大鼠肠道差异蛋白PDIA3^[15]，并明确其介导肠道DC促T淋巴细胞活化中的关键作用^[11]，在此基础上，课题组进一步采用荧光双染标记肠道DC细胞及PDIA3，结果发现，IBS大鼠肠道DC表达PDIA3显著上调，且在细胞膜上表达尤为明显（详见工作基础），不同于PDIA3在内质网中的作用，细胞膜PDIA3的表达是否参与介导不同生物学效应？其高表达是否在DC免疫调控中发挥作用？这些问题值得进一步研究。

PDIA3可以与信号转导与转录激活因子3（STAT3）或其磷酸化形式（PY-STAT3）联合形成脂筏结构分布于胞质膜脂质双分子层中^[16-17]。STAT3是信号转导与转录激活因子家族中重要的成员，在接受各种细胞外信号刺激后，其结构域中酪氨酸位点发生磷酸化（PY-STAT3）并入核，与特定DNA片段结合，调控靶基因转录，参与细胞的增值、分化及凋亡。但是，在“脂筏”结构中，与PDIA3结合的PY-STAT3将失去DNA结合位点，只有脱离脂筏结构，后者才可以入核并产生后续生物学效应，因此，脂筏结构中PDIA3可能通过阻拦PY-STAT3入核，对STAT3通路产生负向调控作用^[18]。然而，迄今为止，细胞膜PDIA3-STAT3脂筏结构的相关研究较少，其是否参与介导DC活化及其在IBS发病中的作用尚是国内外研究空白。在前期研究中，我们采用荧光双染技术观察IBS大鼠肠道DC中PY-STAT3的分布，结果发现，PY-STAT3主要分布在对照组DC胞质中，而在IBS大鼠中，PY-STAT3多聚集在DC细胞膜中，在胞质中的分



布明显减少（详见工作基础），这提示，**IBS大鼠肠道DC细胞膜上可能同样存在PDIA3-STAT3脂筏结构，而脂筏结构中PDIA3上调表达可通过抑制PY-STAT3的入核，引起STAT3通路失活。**

现已明确，STAT3通路对于DC具有负向调控作用^[19]。STAT3不仅可以抑制TLR促发的DC相关炎症因子的释放，还对DC促CD4+T淋巴细胞增值能力有抑制作用^[20,21]，进一步研究证实，STAT3基因敲除DC表面高表达MHCII类分子^[22]，提示STAT3对DC促CD4+T淋巴细胞增值能力的影响与调控其表面MHCII类分子的表达密切相关。在前期研究中，课题组发现IBS大鼠肠道DC表面MHCII类分子表达明显上调，且其刺激CD4+T淋巴细胞活化能力明显增强（详见工作基础），鉴于PDIA3-STAT3脂筏结构对PY-STAT3入核的抑制作用，我们推测，**IBS肠道DC上调表达MHCII类分子可能与STAT3通路失活密切相关。**

MHCII类分子在DC宿主防御免疫及获得性免疫中发挥重要作用，MHCII类分子的 α 链和 β 链在内质网中折叠并组装成异二聚体后立即与恒定链（li链）相结合，并转移至溶酶体/核内体中形成MHCII-li聚合体，在DC成熟分化的过程中，li链裂解成CLIP，后者进一步释放暴露肽结合槽，从而使外源性抗原肽与MHCII类分子相结合，并进一步移行至胞膜上活化CD4+T淋巴细胞。因此，li链的有效裂解是MHCII类分子抗原提呈功能实现的前提。组织蛋白酶S（CTSS）广泛分布于DC溶酶体中，是保证li链有效裂解及MHCII类分子抗原提呈的关键酶，现已证明，STAT3通路对CTSS活性具有双向调控作用，其可导致CTSS表达失衡引起细胞内MHCII聚合体的降解，从而下调DC表面MHCII类分子表达^[23,24]。在前期工作中，我们运用蛋白质组学技术筛选IBS大鼠肠道差异蛋白，结果发现，与对照组相比，**IBS大鼠肠道高表达CTSS^[15]（Proteomics, 2010）。**这一重要结果为探求STAT3通路介导肠道DC活化的机制研究提供切入点，明确**STAT3通路是否通过上调CTSS表达，从而引起肠道DC胞膜上调表达MHCII类分子是阐述内脏高敏感免疫调控机制的关键，目前相关研究罕见。**

综合国内外相关领域的前沿研究成果及我们的前期工作基础，我们建立以下假说：**肠道DC细胞膜存在PDIA3-STAT3脂筏结构，PDIA3上调可抑制PY-STAT3入核引起STAT3通路失活，后者通过上调CTSS表达，调控MHCII类**



分子提呈 T 淋巴细胞活化，进一步通过引起肠道低度炎症参与 IBS 内脏高敏感的产生。在本项目中，我们需要解决以下3个关键问题：1) 内脏高敏感大鼠肠道 DC 细胞膜是否存在 PDIA3-STAT3脂筏结构及其表达情况；2) PDIA3是否能通过脂筏结构，抑制 STAT3通路，从而参与 DC 免疫调控异常；3) STAT3通路失活是否通过上调 CTSS 表达，调控 MHCII 类分子提呈 T 淋巴细胞活化，从而参与 IBS 内脏高敏感的产生。

因此，本研究采用分子生物学、细胞生物学等手段，拟在先前研究基础上进一步阐明肠道 DC 异常免疫调控在 IBS 内脏高敏感发病中的作用，并探讨其可能的机制。明确 PDIA3通过 PDIA3-STAT3脂筏结构抑制 STAT3通路介导 DC 免疫活化在 IBS 内脏高敏感中的重要作用，并进一步阐明 STAT3通路通过上调 CTSS 表达调控肠道 DC 表达 MHCII 类分子。通过本研究将进一步完善 IBS 肠道免疫调控异常的机制研究并为寻求临床治疗的新靶点提供依据。

参考文献:

1. Sperber AD, Dumitrascu D, Fukudo S, et al. The global prevalence of IBS in adults remains elusive due to the heterogeneity of studies: a Rome Foundation working team literature review. Gut, 2016. [Epub ahead of print]
2. **Chu L, Zhou H, Lu B (吕宾 通讯作者), et al. An epidemiological study of functional bowel disorders in Zhejiang college students and its relationship with psychological factors. Chin J Intern Med, 2012, 51:429-432.**
3. Chadwick VS, Chen W, Shu D, et al. Activation of the mucosal immune system in irritable bowel syndrome. Gastroenterology, 2002,122:1778-1783.
4. Zhang L, Song J, Hou X. Mast Cells and Irritable Bowel Syndrome: From the Bench to the Bedside. J Neurogastroenterol Motil, 2016,22:181-92.
5. Bashashati M, Rezaei N, Shafieyoun A, et al. Cytokine imbalance in irritable bowel syndrome: a systematic review and meta-analysis. Neurogastroenterol Motil, 2014,26: 1036-1048.
6. Belmonte L, Beutheu Youmba S, Bertiaux-Vandaële N, et al. Role of toll like receptors in irritable bowel syndrome: differential mucosal immune activation



- according to the disease subtype. PLoS One, 2012, 7:e42777.
7. Hughes PA, Zola H, Penttila IA, et al. Immune activation in irritable bowel syndrome: can neuroimmune interactions explain symptoms? Am J Gastroenterol, 2013, 108:1066-74.
 8. Greenwood-Van Meerveld B, Moloney RD, Johnson AC, et al. Mechanisms of stress-induced visceral pain: implications in irritable bowel syndrome. Neuroendocrinol, 2016;28.
 9. Mohammadi R, Hosseini-Safa A, Ehsani Ardakani MJ, et al. The relationship between intestinal parasites and some immune-mediated intestinal conditions. Gastroenterol Hepatol Bed Bench, 2015, 8:123-31.
 10. Li M, Zhang L, Lu B (吕宾 通讯作者), et al. Role of dendritic cell-mediated abnormal immune response in visceral hypersensitivity. Int J Clin Exp Med, 2015, 8:13243-50.
 11. Zhuang Z, Zhang L, Wang X, Tao L, Lv B (吕宾 通讯作者). PDIA3 gene induces visceral hypersensitivity in rats with irritable bowel syndrome through the dendritic cell-mediated activation of T cells. PeerJ, 2016, 4:e2644.
 12. Meng L, Lu Z, Xiaoteng W, Yue H, Bin L (吕宾 通讯作者), Lina M, Zhe C. Corticotropin-releasing Factor Changes the Phenotype and Function of Dendritic Cells in Mouse Mesenteric Lymph Nodes. J Neurogastroenterol Motil. 2015, 21:571-80.
 13. Doroudi M, Chen J, Boyan BD, et al. New insights on membrane mediated effects of 1 α ,25-dihydroxy vitamin D3 signaling in the musculoskeletal system. Steroids, 2014, 81:81-7.
 14. Pacello F, D'Orazio M, Battistoni A. An ERp57-mediated disulphide exchange promotes the interaction between Burkholderia cenocepacia and epithelial respiratory cells. Sci Rep, 2016, 16, 6:21140.
 15. Ding Y, Lu B (吕宾 通讯作者), Chen D, et al. Proteomic analysis of colonic mucosa in a rat model of irritable bowel syndrome. Proteomics, 2010,



10:620–2630.

16. Sehgal PB, Guo GG, Shah M, et al. Cytokine signaling: STATS in plasma membrane rafts. *J Biol Chem*, 2002,277:12067-74.
17. Sehgal PB. Plasma membrane rafts and chaperones in cytokine/STAT signaling. *Acta Biochimica Polonica*, 2003, 50:583-94.
18. Guo GG, Patel K, Kumar V, et al. Association of the chaperone glucose-regulated protein 58 (GRP58/ER-60/ERp57) with Stat3 in cytosol and plasma membrane complexes. *J Interferon Cytokine Res*, 2002,22:555-63.
19. Li HS, Watowich SS. Diversification of dendritic cell subsets: Emerging roles for STAT proteins. *JAKSTAT*, 2013;2:e25112.
20. Cheng JT, Deng YN, Yi HM, et al. Hepatic carcinoma-associated fibroblasts induce IDO-producing regulatory dendritic cells through IL-6-mediated STAT3 activation. *Oncogenesis*, 2016,5:e198.
21. Alonzi T, Newton IP, Bryce PJ, et al. Induced somatic inactivation of STAT3 in mice triggers the development of a fulminant form of enterocolitis. *Cytokine*, 2004,26:45-56.
22. Assi H, Espinosa J, Suprise S, Sofroniew M, Doherty R, Zamler D, Lowenstein PR, Castro MG. Assessing the role of STAT3 in DC differentiation and autologous DC immunotherapy in mouse models of GBM. *PLoS One*, 2014,9:e96318.
23. Chan LL, Cheung BK, Li JC, et al. A role for STAT3 and cathepsin S in IL-10 down-regulation of IFN-gamma-induced MHC class II molecule on primary human blood macrophages. *J Leukoc Biol*, 2010,88:303-11.
24. Kitamura H, Kamon H, Sawa S, et al. IL-6-STAT3 controls intracellular MHC class II alpha beta dimer level through cathepsin S activity in dendritic cells. *Immunity*, 2005,23:491-502.

2. 项目的研究内容、研究目标，以及拟解决的关键科学问题
(此部分为重点阐述内容);



2.1 研究目标

- ① 明确 DC 细胞膜 PDIA3-STAT3 脂筏的存在及其在内脏高敏感大鼠肠道 DC 中的表达情况；
- ② 揭示 PDIA3 高表达通过脂筏抑制 STAT3 通路，介导肠道 DC 活化，从而导致 IBS 内脏高敏感的机制；
- ③ 阐明 STAT3 通路抑制引起 CTSS 表达上调，通过调控 MHCII 类分子，介导 DC 外源性抗原提呈功能的机制。

2.2 研究内容

2.2.1 明确 DC 细胞膜 PDIA3-STAT3 脂筏的存在及其在内脏高敏感大鼠肠道 DC 中的表达情况

以母幼分离方式建立应激 IBS 大鼠模型，计数大鼠排便颗粒及观察大便性状，AWR 检测内脏高敏感。分离纯化大鼠肠系膜淋巴结 DC (MLNDC)，观察 PDIA3 及 PY-STAT3 的细胞定位及共表达情况；检测 MLNDC 细胞膜、细胞质及细胞核 PDIA3、PY-STAT3 及 STAT3 的表达，PDIA3 与 STAT3/PY-STAT3 的结合情况，及 STAT3 特异性 DNA 结合位点活性；酪氨酸磷酸酶抑制剂原钒酸钠 (SOV) 预处理对 MLNDC 细胞膜 PY-STAT3 表达及其特异性 DNA 结合位点活性的影响。

2.2.2 PDIA3高表达通过脂筏抑制 STAT3通路在调控 IBS 内脏高敏感大鼠肠道 DC 活化中的机制研究

以母幼分离方式建立应激 IBS 大鼠模型，构建 PDIA3shRNA 慢病毒转染模型大鼠，了解 PDIA3表达下调对 DC 细胞膜 PDIA3-STAT3脂筏的影响、胞内 STAT3通路活化情况、DC 活化情况及内脏高敏感变化；分离纯化各组大鼠 MLNDC，观察 PDIA3及 PY-STAT3的共表达及细胞定位，分别检测 MLNDC 细胞膜、细胞质及细胞核内 PY-STAT3及 STAT3的表达，观察各组分 PDIA3与 PY-STAT3的结合情况及 STAT3特异性 DNA 结合位点活性进行检测；检测 DC 表面 MHCII 类分子表达及 DC 吞噬能力，以脾脏 CD4⁺ T 细胞为靶细胞，采用混合淋巴细胞反应 (MLR) 检测 DC 促 T 细胞活化情况，用 ELISA 试剂盒检测相关细胞因子的表达水平。



分离纯化正常大鼠 MLNDC 并予体外培养，构建 STAT3 过表达慢病毒转染 MLNDC，予以重组大鼠 PDIA3 干预，检测 DC 表面 MHCII 类分子表达及 DC 吞噬能力，以脾脏 CD4⁺ T 细胞为靶细胞，采用混合淋巴细胞反应（MLR）检测 DC 促 T 细胞活化情况，用 ELISA 试剂盒检测相关细胞因子的表达水平。

2.2.3 STAT3 通路负调控 CTSS 表达在增强 DC 外源性抗原提呈功能中的机制研究

分离纯化正常大鼠 MLNDC 并予体外培养，采用 CTSS 特异性抑制剂 LHV 预处理，构建 STAT3shRNA 慢病毒转染 MLNDC，取干预后 DC 匀浆离心去除细胞核，梯度离心获取 DC 细胞膜及细胞质，检测细胞膜及细胞质中 MHCII 类分子的表达及 Li 链降解情况；检测 DC 吞噬能力及 DC 促 CD4⁺T 细胞活化情况，用 ELISA 试剂盒检测共培养中相关细胞因子的表达水平。

2.3 拟解决的关键科学问题

IBS 内脏高敏感的产生机制尚不明确，临床上缺乏有效的诊治手段。阐明其具体机制将为该病临床有效诊治提供线索和依据。通过本项目的研究，希望解决以下关键科学问题：

- ① 内脏高敏感大鼠肠道 DC 细胞膜是否存在 PDIA3-STAT3 脂筏结构及其表达情况；
- ② PDIA3 是否通过脂筏抑制 STAT3 通路，从而介导 DC 活化，参与 IBS 内脏高敏感的产生；
- ③ STAT3 通路失活是否通过上调 CTSS 表达，调控 DC 外源性抗原提呈能力。

3. 拟采取的研究方案及可行性分析（包括研究方法、技术路线、实验手段、关键技术等说明）；

3.1 研究方案

3.1.1 明确 DC 细胞膜 PDIA3-STAT3 脂筏的存在及其在内脏高敏感大鼠肠道 DC 中的表达情况

采用母幼分离方式建立应激 IBS 大鼠模型：选取 8 只 SD 大鼠孕鼠，待孕鼠分娩后，剔除雌幼鼠，以孕鼠为单位平均分成 2 组，模型组自出生后第 2 天



起，每日上午与母鼠分离 3 小时（8:00-11:00），持续 14 天，对照组不予任何处理，与母鼠同笼，两组大鼠持续喂养至 8 周龄，确保大鼠健康及避开各种伤害性刺激。8 周龄后，采用国际通用的大鼠腹部收缩反射(AWR)评分标准验证模型。具体方法如下：将大鼠于清醒状态，不限制其活动情况下将 8F 带气囊导尿管外涂石蜡油后经肛门插入，气囊末端距肛缘 1cm。导尿管肛门外部分以棉线固定鼠尾根部。30min 后大鼠适应环境呈安静状态，扩张球囊使球囊内压力逐渐升高，观察腹部抬离桌面（AWR=3）时的气囊压力，由非实验者记录 AWR=3 时的球囊压力，共进行 3 次，每次持续 30s，间隔 3 min，取平均压力值。大鼠腹部收缩反射(AWR)评分标准：0 分：大鼠对结肠扩张无行为学反应；1 分：结肠扩张时身体静止不动，头部运动减少；2 分：结肠扩张时腹肌收缩，但腹部未抬离桌面；3 分：结肠扩张时腹肌收缩并抬离桌面；4 分：结肠扩张时骨盆抬起，身体呈弓形。

- a. 计数大鼠排便颗粒并观察大便性状；
- b. 采用磁珠分选技术分离纯化大鼠 MLNDC，免疫荧光染色法观察 PDIA3 及 PY-STAT3 在肠道 DC 中的细胞定位及共表达情况；
- c. 将各组 MLNDC 匀浆离心去除细胞核，梯度离心获取 DC 细胞膜细胞质及细胞核，交联免疫沉淀技术检测各组 PDIA3、STAT3 及 PY-STAT3 的表达及 PDIA3 与 STAT3/PY-STAT3 的结合情况；
- d. 采用 EMSA 试验对 MLNDC 各组 STAT3 特异性 DNA 结合位点活性进行检测。
- e. 原代培养各组 MLNDC，酪氨酸磷酸酶抑制剂原钒酸钠（1mM）预处理 4h，采用 Western blot 检测细胞膜 PY-STAT3、STAT3 的表达，EMSA 检测 PY-STAT3 特异性 DNA 结合位点活性进行检测；

3.1.2 PDIA3 高表达通过脂筏抑制 STAT3 通路在调控 IBS 内脏高敏感大鼠肠道 DC 活化中的机制研究

① 以母幼分离方式建立应激 IBS 大鼠模型，构建 PDIA3shRNA 慢病毒转染模型大鼠，了解 PDIA3 表达下调 DC 细胞膜 PDIA3-STAT3 脂筏的影响、胞内 STAT3 通路活化情况、DC 活化情况及内脏高敏感变化。



- a. 计数大鼠排便颗粒并观察大便性状；
- b. AWR 检查各组大鼠内脏高敏感情况；
- c. 分离纯化各组大鼠 MLNDC，免疫荧光染色法观察 PDIA3及 PY-STAT3的细胞定位及共表达情况；
- d. 将各组 MLNDC 匀浆离心去除细胞核，梯度离心获取 DC 细胞膜细胞质及细胞核，交联免疫沉淀技术检测各组分 PDIA3、STAT3 及 PY-STAT3 的表达及 PDIA3 与 STAT3/PY-STAT3 的结合情况；
- e. 采用 EMSA 试验对 MLNDC 各组分 STAT3 特异性 DNA 结合位点活性进行检测；
- f. 流式细胞术检测 MLNDC 表面 MHCII 类分子的表达；
- g. 采用异硫氰酸荧光素-葡聚糖(FITC-Dextran)检测 DC 吞噬能力；
- h. 分离大鼠脾脏 CD4+T 细胞细胞，分别与 MLNDC 于体外共培养，检测 DC 促 CD4+T 淋巴细胞增殖情况；
- i. ELISA 法检测 MLNDC 与 CD4+T 淋巴细胞共培养上清 IL-4、IL-9、IL-6、TNF- α 的表达。

② 分离纯化正常大鼠 MLNDC 并予体外培养，构建 STAT3过表达慢病毒转染 MLNDC，予以重组大鼠 PDIA3干预，检测 DC 表面 MHCII 类分子表达及 DC 吞噬能力，以脾脏 CD4+ T 细胞为靶细胞，采用混合淋巴细胞反应（MLR）检测 DC 促 T 细胞活化情况，用 ELISA 试剂盒检测相关细胞因子的表达水平。

- a. 流式抗体 MHCII、CD103 联合标记 MLNDC，检测表面 MHCII 的表达；
- b. 采用异硫氰酸荧光素-葡聚糖(FITC-Dextran)检测 DC 吞噬能力；
- c. 以脾脏 CD4+T 细胞为靶细胞，MLR 检测 DC 促 T 细胞活化情况；
- d. 用 ELISA 试剂盒检测共培养上清 IL-4、IL-9、IL-6、TNF- α 的表达水平。

3.1.3 STAT3通路负调控 CTSS 表达在增强 DC 外源性抗原提呈功能中的机制研究

分离纯化正常大鼠 MLNDC 并予体外培养，采用 CTSS 特异性抑制剂 LHV

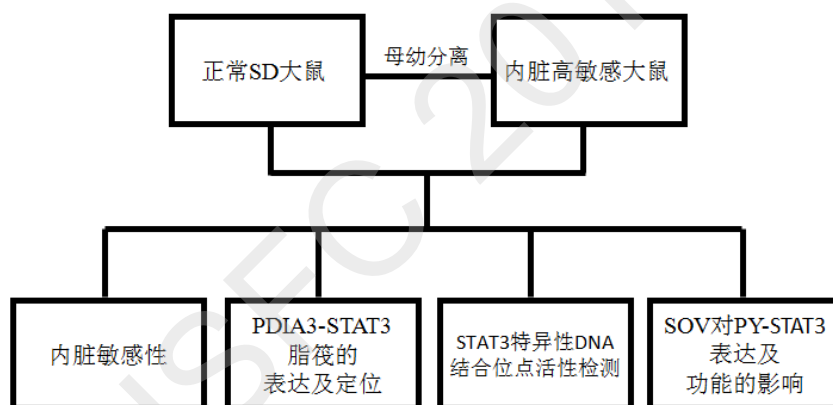


预处理, 构建 STAT3shRNA 慢病毒转染 MLNDC。

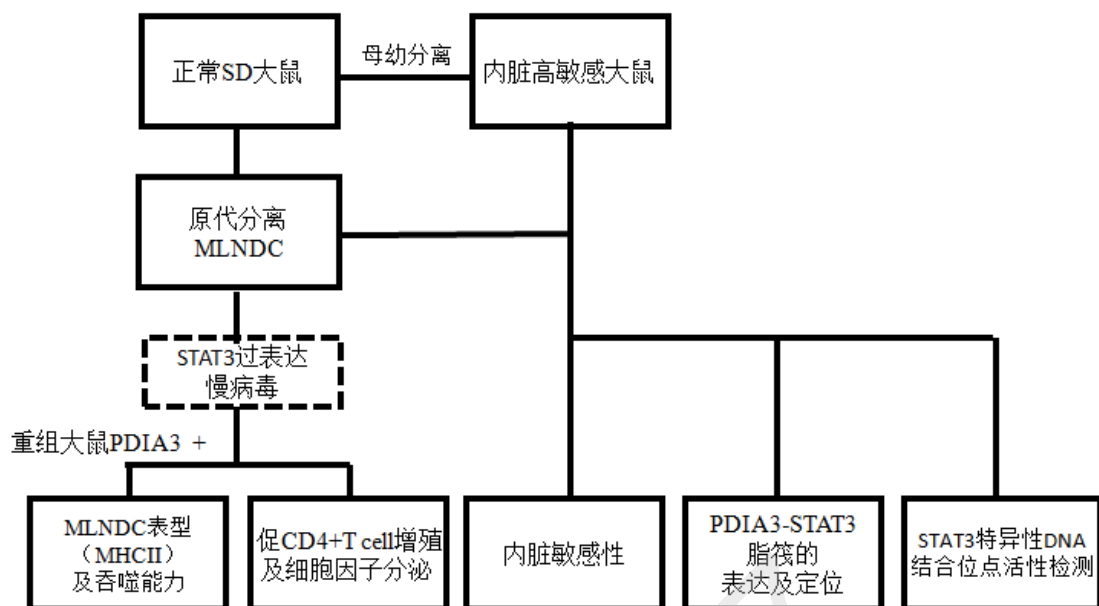
- 取干预后 MLNDC 匀浆离心去除细胞核, 梯度离心获取 DC 细胞膜及细胞质, Western blot 检测细胞膜及细胞质中 MHCII 类分子的表达;
- 采用 Li-p10降解实验观察 MLNDC 各组分 Li 链降解情况;
- 采用异硫氰酸荧光素-葡聚糖(FITC-Dextran)检测 DC 吞噬能力;
- 以脾脏 CD4⁺T 细胞为靶细胞, MLR 检测 DC 促 T 细胞活化情况;
- 用 ELISA 试剂盒检测共培养上清 IL-4、IL-9、IL-6、TNF- α 的表达水平。

3.2技术路线

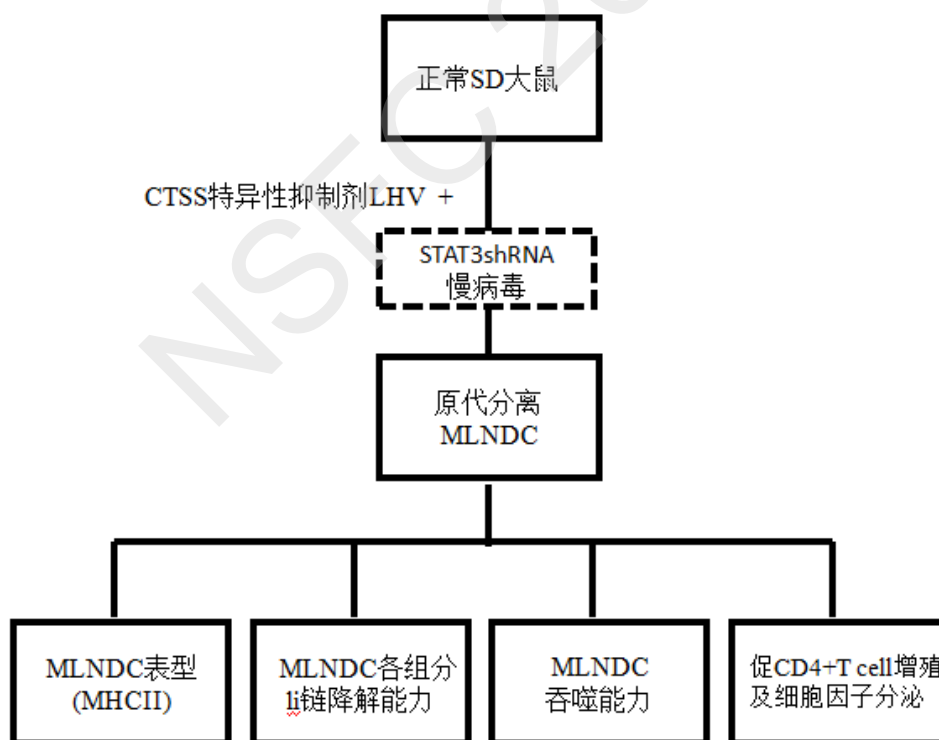
3.2.1 明确 DC 细胞膜 PDIA3-STAT3脂筏的存在及其在内脏高敏感大鼠肠道 DC 中的表达情况



3.2.2 PDIA3高表达通过脂筏抑制 STAT3通路在调控 IBS 内脏高敏感大鼠肠道 DC 活化中的机制研究



3.2.3 STAT3通路负调控 CTSS 表达在增强 DC 外源性抗原提呈功能中的机制研究



3.3 关键技术说明

原代分选大鼠 MLNDC 易污染、且分离技术要求较高，我们课题组前期已开始有关 MLNDC 的系列研究，经过反复实验摸索最优分离方法，目前采用磁珠分选技术稳定分离纯度在 75-85%，基于此分选技术的研究成果已多次发表在



国外期刊 (Int J Clin Exp Med. 2015; J Neurogastroenterol Motil, 2015; PeerJ, 2016), 目前项目负责人本人及课题组成员已熟练掌握该分选技术。

3.4 可行性分析

3.4.1 立题依据充分:

此次申请项目的理论假设主要来源于: a) **临床实践的热点和难点问题**。IBS 是常见功能性疾病, 内脏高敏感是其核心机制, 但是其具体发病机制尚不清楚。b) **申请者的前期研究成果**。申请者前期在浙江省自然科学基金 (Y2080864)、国家自然科学基金 (81170348) 资助下已完成 IBS 肠道 DC 异常免疫调控的系列研究, 明确肠道 DC 活化后刺激 T 淋巴细胞分泌细胞因子是导致 IBS 内脏高敏感反应重要的机制之一, 并且, 研究首次发现并验证 PDIA3 在介导 DC 活化中发挥了关键作用 (相关研究发表在 Chin J Dig; J Neurogastroenterol Motil; Peer J)。c) **现有预实验结果**。课题组采用荧光双染标记肠道 DC 细胞, 结果发现, IBS 大鼠肠道 DC 细胞膜表达 PDIA3 及 PY-STAT3 显著上调, 胞质中的分布明显减少。此外, 前期工作中, 我们运用蛋白质组学技术筛选 IBS 大鼠肠道差异蛋白, 结果发现, 与对照组相比, IBS 大鼠肠道高表达 CTSS (Proteomics, 2010)。而 STAT3 通路可导致 CTSS 表达失衡引起 DC 表面 MHCII 类分子下调表达, 提示 IBS 大鼠肠道 DC 细胞膜上可能存在 PDIA3-STAT3 脂筏结构, 其可通过抑制 STAT3 通路上调 CTSS 表达, 从而介导 DC 表面 MHCII 类分子抗原提呈 CD4⁺T 淋巴细胞免疫应答活化, 从而在 IBS 内脏高敏感中发挥作用。

理论假设的合理性保证了申请项目有具体、明确的研究目标, 具有可操作性。

3.4.2 具有成熟的技术平台:

本研究组成员长期研究胃肠动力障碍性疾病, 长期追踪肠易激综合征的前沿学术研究。研究组成员具有丰富的分子生物学理论知识, 熟练掌握包括原代细胞分离技术、RNA 干扰、慢病毒载体构建、Western 印迹、细胞培养、动物实验技术以及各类分子生物学技术, 具有较强的细胞信息通路和生物信息学等



分析能力。研究组部分成员负责了本项目前期研究工作，为本项目的实施和完成奠定了技术基础。

3.4.3 实验仪器和设备齐全：

所在单位浙江中医药大学附属第一医院消化科是国家卫计委临床重点专科、国家中管局重点学科。本研究依托的消化道疾病病理生理实验室为浙江省重点实验室，具有成熟的生物化学与细胞生物学的工作平台。配备细胞培养室、PCR 仪、凝胶电泳系统、荧光显微镜、激光共聚焦显微镜、酶联免疫检测仪、流式细胞仪等基础设施。浙江中医药大学动物研究中心/比较医学研究中心为国家中医药管理局实验动物学三级实验室、浙江省医学实验动物学重点学科建设单位、浙江省中医药实验动物学重点学科，包括具有标准化的动物实验饲养设施 1750M² 和免疫缺陷转基因动物实验室、比较医学实验室 550M²，持有实验动物屏障环境使用许可证。

4. 本项目的特色与创新之处；

4.1 立题具有原始创新性：

- a) 首次提出 DC 细胞膜存在 PDIA3-STAT3 脂筏结构，其可能参与介导 IBS 内脏高敏感肠道 DC 免疫调控异常；
- b) 首次提出 PDIA3 可能通过脂筏抑制 STAT3 通路，从而在内脏高敏感大鼠肠道 DC 活化中的作用；
- c) 首次提出 CTSS 是 STAT3 通路调控 DC 表面 MHCII 类分子提呈 T 淋巴细胞活化的关键蛋白。

4.2 本项目特色：

本项目理论假设直接起源于临床实践中的热点和难点问题，即：IBS 患者临床上症状反复发作，严重影响患者的生活质量，占用大量医疗资源，但是治疗手段缺乏，内脏高敏感是其核心机制，但是具体产生机制未明。本项目在前期系列研究的基础上，以 PDIA3 引起 DC 活化的机制研究为切入点，深入研究 PDIA3 通过 PDIA3-STAT3 脂筏结构抑制 STAT3 通路，上调 CTSS 从而介导 DC 表面 MHCII 类分子抗原提呈，最终参与内脏高敏感产生的详尽机制，研究结果有望为阐明和最终解决上述临床热点和难点问题提供新思路。



5. 年度研究计划及预期研究结果（包括拟组织的重要学术交流活动、国际合作与交流计划等）。

5.1 年度研究计划

2018.01-2018.12: 以母幼分离方式建立应激 IBS 大鼠模型，计数大鼠排便颗粒及观察大便性状，评价检测内脏高敏感，分离纯化 MLNDC，检测 PDIA3 与 STAT3 及 PY-STAT3 的细胞定位、共表达情况；PDIA3-STAT3 脂筏在 MLNDC 各组分的表达情况及其中 STAT3 特异性 DNA 结合位点活性；观察酪氨酸磷酸酶抑制剂预处理对 MLNDC 细胞膜 PY-STAT3 表达及其特异性 DNA 结合位点活性的影响。

2019.01-2019.12: 构建 PDIA3shRNA 慢病毒转染 IBS 模型大鼠，了解 PDIA3 表达下调 DC 细胞膜 PDIA3-STAT3 脂筏的影响、胞内 STAT3 通路活化情况、DC 活化情况及内脏高敏感变化。

2020.01-2020.12: 分离纯化正常大鼠 MLNDC 并予体外培养，构建 STAT3 过表达慢病毒转染 MLNDC，予以重组大鼠 PDIA3 干预，检测 DC 表型变化及功能。对部分研究结果进行数据统计、总结及论文撰写工作。

2021.01-2021.12: 分离纯化正常大鼠 MLNDC 并予体外培养，采用 CTSS 特异性抑制剂 LHV 预处理，构建 STAT3shRNA 慢病毒转染 MLNDC，检测细胞膜及细胞质中 MHCII 类分子的表达，观察 Li 链降解情况；检测 DC 吞噬能力功能。最后 3 个月完成课题总结、论文撰写和成果申报工作。

5.2 预期研究结果

- ① 明确 DC 细胞膜 PDIA3-STAT3 脂筏的存在及其在内脏高敏感大鼠肠道 DC 中的表达情况；揭示 PDIA3 高表达通过脂筏抑制 STAT3 通路在内脏高敏感大鼠肠道 DC 活化中的作用；进一步阐明 STAT3 通路抑制后通过上调 CTSS 表达，调控 DC 表面 MHCII 类分子提呈 T 淋巴细胞活化的机制；
- ② 发表论文 5-6 篇，其中国内核心期刊论文 3-4 篇，SCI 论文 2 篇；
- ③ 参加国际会议 1-2 次；
- ④ 培养博士生 2 名和硕士生 2 名。

（二）研究基础与工作条件



1. 研究基础（与本项目相关的研究工作积累和已取得的研究工作成绩）；

前期与本项目相关的研究工作积累：

近年本课题研究人员从事 IBS 临床研究及肠道 DC 异常免疫调控在 IBS 内脏高敏感中的作用研究，并取得主要创新性成果如下：

已获得的创新成果（一）：首次对浙江省内 1870 位高校大学生进行抽样调查研究，结果发现 IBS 患病率达 6.9%，该研究为我省内特殊人群 IBS 的发病率提供了临床数据。该研究结果于 2014 年被 SCI 收录，发表在《World J Gastroenterol》。

已获得的创新成果（二）：首次发现内脏高敏感大鼠肠黏膜 DC 数量增多，肠系膜淋巴结 DC 免疫应答异常能刺激 CD4⁺T 细胞产生细胞因子 IL-4，通过活化肥大细胞参与 IBS 内脏高敏感的产生。该研究结果于 2015 年被 SCI 收录，发表在《Int J Clin Exp Med》。

已获得的创新成果（三）：首次发现并于体内外研究证实 PDIA3 可以介导 DC 激活 T 淋巴细胞，上调相关细胞因子引起肠道炎症，从而促进 IBS 内脏高敏感形成。该研究结果于 2015 年及 2016 年被 SCI 收录，分别发表在《J Neurogastroenterol Motil》及《Peer J》。

已取得的预实验研究结果：

- 1、肠易激综合征大鼠结肠组织的蛋白质组学研究，发现肠易激综合征大鼠结肠组织的差异蛋白 PDIA3 及 CTSS，并验证 IBS 大鼠肠道 PDIA3 及 CTSS 表达均显著升高。

以樟脑丸特殊气味作为条件刺激、结直肠扩张结合经典的肢体束缚作为非条件刺激建立大鼠 IBS 模型。应用差异荧光双向凝胶电泳技术进行 IBS 大鼠差异蛋白筛选，并对筛选出的差异蛋白质应用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术鉴定出 13 个特异蛋白，其中 8 个蛋白在 IBS 大鼠结肠黏膜组织中表达上调，5 个下调（图 1），应用 Gene Ontology 软件对差异蛋白进行功能分类，发现蛋白二硫化物异构酶 A3 (PDIA3) 及半胱氨酸组织蛋白酶 S (CTSS) 为主要差异蛋白（表 1）。

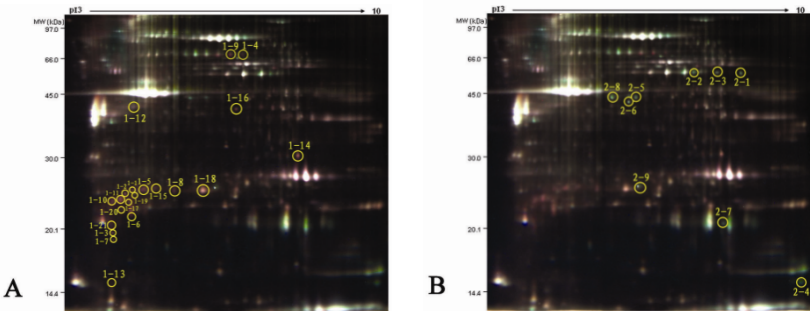


图1 IBS大鼠结肠黏膜组织蛋白样品的荧光差异双向凝胶电泳图谱
A图 示IBS组明显上调的蛋白点；B图 示IBS组明显下调的蛋白点

表 1 IBS 和空白对照组大鼠结肠黏膜组织间差异蛋白质鉴定结果

编号	IPI 号	蛋白质名称	IBS/C 比值	相对分子质量	蛋白质得分	蛋白质功能
1-1	00389571	CK8	+2.44	53 985	372	维持胃肠道柱状上皮细胞结构
1-4	00324741	PDIA3	+1.94	57 043	102	催化蛋白质中二硫键重组
1-5	00210357	hnRNPF	+1.86	45 700	105	异质性胞核糖核蛋白的组成部分
1-6	00389571	CK8	+1.86	53 985	226	维持胃肠道柱状上皮细胞结构
1-8	00231260	Prdx6	+1.67	24 803	308	参与细胞中氧化还原反应调控
1-9	00324741	PDIA3	+1.66	57 043	438	催化蛋白质中二硫键重组
1-10	00389571	CK8	+1.64	53 985	139	维持胃肠道柱状上皮细胞结构
1-11	00188304	GLO1	+1.63	20 806	117	催化多种芳香基和脂肪基团的 α -酮基酯向 α -羟基酯转化
1-13	00211216	eIF5A	+1.56	16 821	256	凋亡相关蛋白
1-14	00331856	CBR1	+1.52	30 558	350	参与还原各种膜基化合物
1-15	00210228	CTSS	+1.49	36 809	137	溶酶体蛋白酶
1-18	00231260	Prdx6	+1.47	24 803	717	参与细胞中氧化还原反应调控
1-19	00389571	CK8	+1.45	53 985	449	维持胃肠道柱状上皮细胞结构
1-21	00389571	CK8	+1.44	53 985	355	维持胃肠道柱状上皮细胞结构
2-2	00464815	ENO1	-1.51	47 098	644	参与糖酵解、细胞生长调控、低氧耐受性和过敏反应等
2-4	00231196	TAGLN	-1.59	22 588	252	肌动蛋白横联蛋白
2-6	00369142	Serpin B5	-1.67	42 257	298	肿瘤抑制因子
2-8	00194087	ACTC1	-2.05	41 991	262	参与不同类型的细胞运动
2-9	00215107	RPSA	-2.16	32 803	177	在细胞黏附到基底膜和随之激活的信号通路中发挥作用

注：IBS：肠易激综合征；IPI：国际蛋白质索引；IBS/C 比值：IBS 与空白对照组结肠黏膜组织差异蛋白点蛋白表达量比值，IBS 组表达上调用“+”表示，表达下调用“-”表示。

我们用蛋白质印迹检测结果发现IBS大鼠结肠黏膜组织中PDIA3蛋白表达量为对照组的1.61倍（图2）：IBS大鼠结肠黏膜组织蛋白电泳结果显示，以GAPDH作为内参，与正常组织比较 (B) PDIA3 在结肠黏膜组织表达升高，应用ImageQuant TL v2008 软件分析信号灰度值，将两者与GAPDH的比值作为相对灰度值，再与正常组织灰度值比较，各比值见图最下方。数据均以平均值±标注差表示 (n=8)。p<0.05 表示有统计学意义。

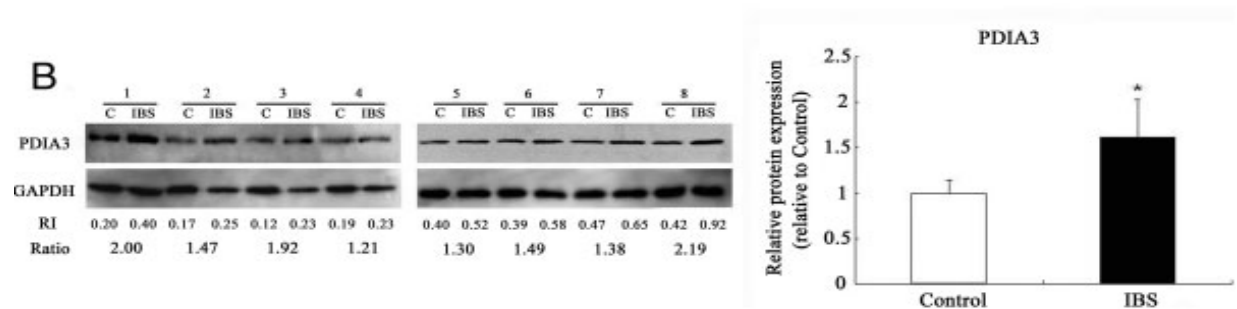


图2 IBS大鼠结肠黏膜组织PDIA3表达的Western 印迹检测图谱

CTSS基因编码的CTSS蛋白也称作半胱氨酸组织蛋白酶S (Cathepsin S)。CTSS主要表达于抗原提呈细胞：如DC、巨噬细胞和B细胞等，通过MHC II 类分子调控抗原提呈细胞向CD4+T细胞提呈抗原。我们采用Western blot方法检测大鼠肠道DC中CTSS的蛋白表达水平，发现CTSS蛋白在IBS大鼠肠道DC中的表达明显高于对照组 (0.45 ± 0.13 VS 0.12 ± 0.18 , $p < 0.05$)。(图4)。

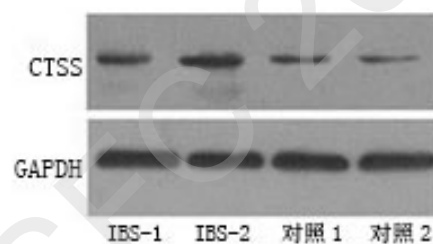


图3 IBS 大鼠肠道 DC 的 CTSS 表达

2、以母幼分离构建应激IBS大鼠，发现模型组MLNDC表达MHC II 类分子上调，且其促进CD4+ T淋巴细胞增殖能力增强。

免疫磁珠分选各组大鼠肠道DC，提取总蛋白，Western 印迹法检测肠道DC 的MHC II 类分子蛋白的表达，结果显示，与对照组相比，IBS 大鼠肠道DC 的MHC II 类分子表达明显升高 (0.41 ± 0.21 VS 0.15 ± 0.17 , $p < 0.05$)。(图4)。将MLNDC与CFSE标记脾脏单个核细胞混合培养，标记CD4+T淋巴细胞，流式检测DC促T淋巴细胞增殖情况，结果发现IBS大鼠肠道DC可以显著促进CD4+ T淋巴细胞增殖 (图5)

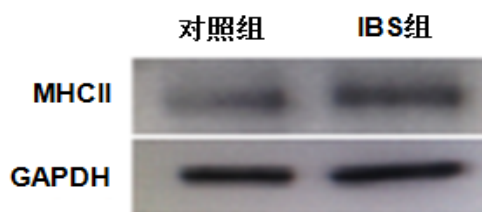


图4 IBS大鼠肠道DC的MHC II类分子表达

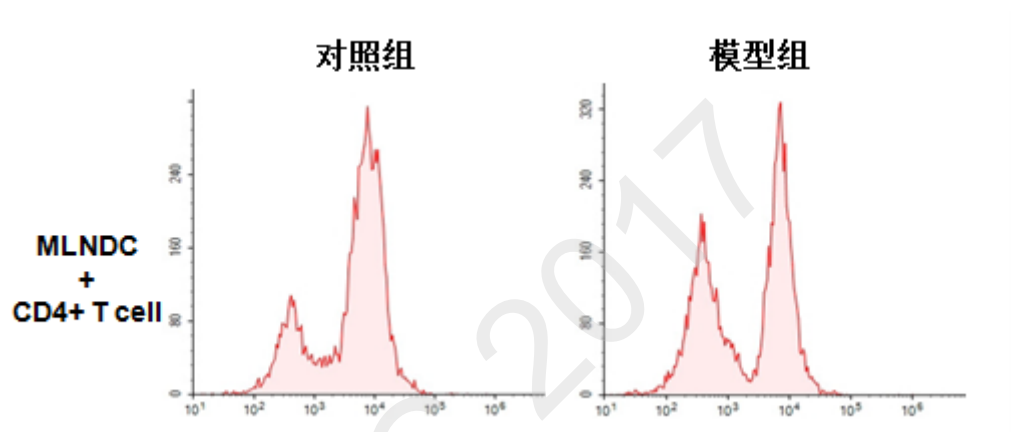
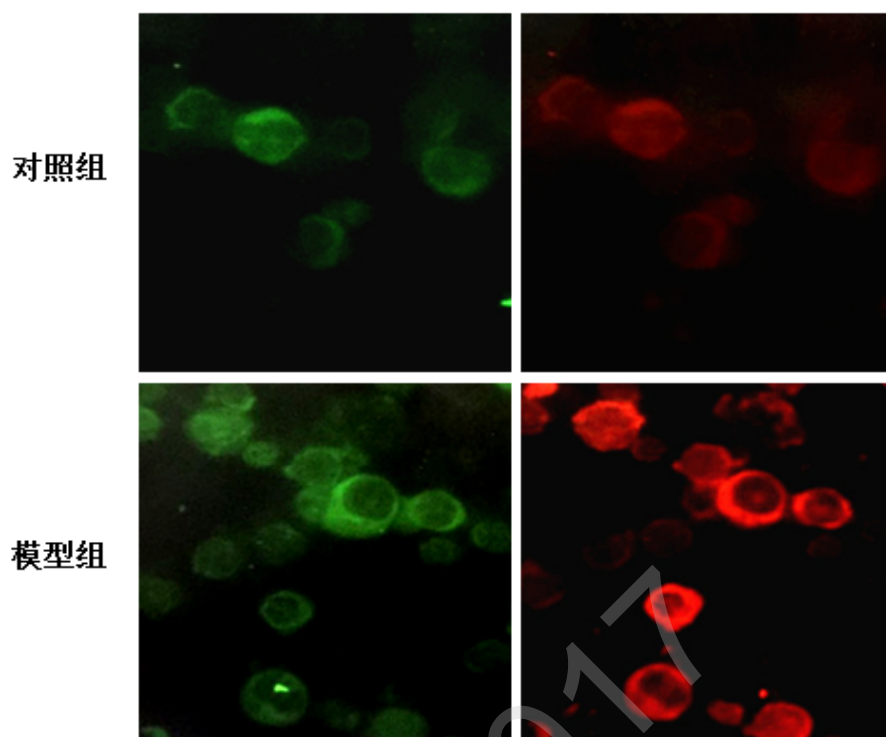


图5 流式检测各组大鼠 MLNDC 促 CD4+T 淋巴细胞增殖情况

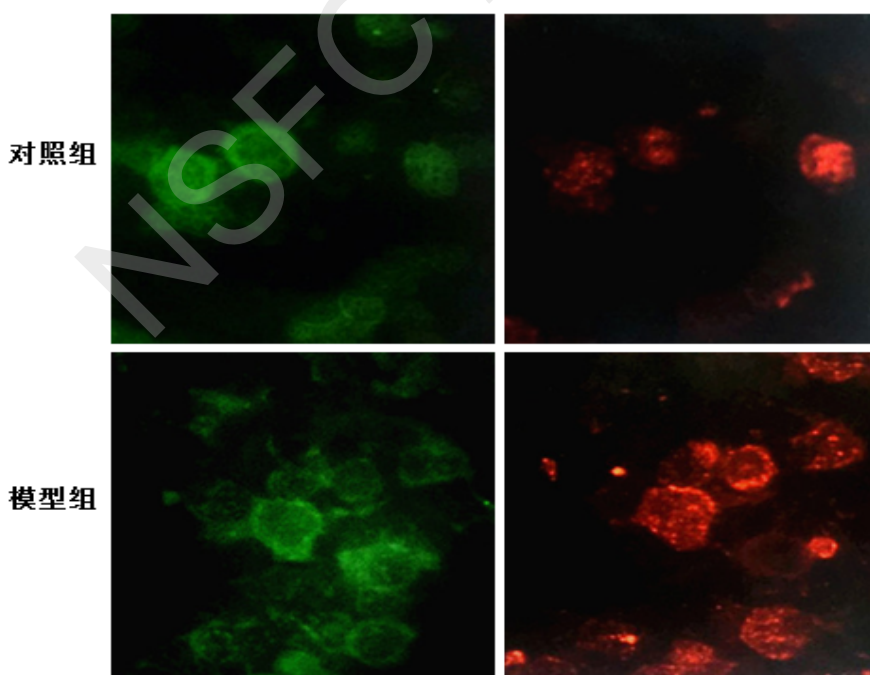
3、以母幼分离构建应激IBS大鼠，发现PDIA3及PY-STAT3主要分布在模型组大鼠MLNDC细胞膜。

免疫磁珠分选肠道DC，荧光双染标记DC细胞及PDIA3或PY-PDIA3，结果发现IBS大鼠肠道DC表达PDIA3荧光强度显著升高，且以细胞膜高表达为主（图6）；此外，对照组大鼠DC中，PY-STAT3主要分布在胞质及细胞核中，而IBS大鼠DC中PY-STAT3主要分布在细胞膜中，而胞质及细胞核内表达减少（图7）。



绿色：CD103+；红色：PDIA3+

图 6 应激 IBS 大鼠模型中结肠 DC 表达 PDIA3 情况



绿色：CD103+；红色：PDIA3+

图 7 应激 IBS 大鼠模型中结肠 DC 表达 PY-STAT3 情况

2. 工作条件（包括已具备的实验条件，尚缺少的实验条件和拟解决的途径，包括利用国家实验室、国家重点实验室和部门重点实



实验室等研究基地的计划与落实情况);

本课题组所在单位是国家卫计委临床重点专科和国家中管局重点学科。本研究依托的实验室为浙江省重点实验室、国家中医药三级实验室，具有成熟的生物化学与细胞生物学的工作平台。配备细胞培养室、荧光定量 PCR 仪、凝胶电泳系统、低温超速离心机、CO₂ 培养箱、冰箱、倒置显微镜、激光共聚焦显微镜、DNA 测序仪、核酸定量仪等基础设施。所在单位动物研究中心/比较医学研究中心为国家中医药管理局实验动物学三级实验室、浙江省医学实验动物学重点学科建设单位、浙江省中医药实验动物学重点学科，包括具有标准化的动物实验饲养设施 1750M² 和免疫缺陷转基因动物实验室、比较医学实验室 550M²，持有实验动物屏障环境使用许可证。

3. 正在承担的与本项目相关的科研项目情况（申请人和项目组主要参与者正在承担的与本项目相关的科研项目情况，包括国家自然科学基金的项目和国家其他科技计划项目，要注明项目的名称和编号、经费来源、起止年月、与本项目的关系及负责的内容等);

1. 应激通过 CRF 上调 CK8 介导肠上皮通透性改变在肠易激综合征发病中的作用研究，项目编号：81470814，经费：73 万元，2015/01-2018/12，国家自然科学基金面上项目，为该项目负责人，统筹负责该项目实验安排、数据统计分析等，该项目为课题组肠易激症状机制研究的另一个分支，与本研究内容无重复。

4. 完成国家自然科学基金项目情况（对申请人负责的前一个已结题科学基金项目（项目名称及批准号）完成情况、后续研究进展及与本申请项目的关系加以详细说明。另附该已结题项目研究工作总结摘要（限 500 字）和相关成果的详细目录）。

完成国家自然科学基金项目

申请者负责的前一个已结题国家自然科学基金面上项目：PDIA3 介导树突状细胞异常免疫应答促进肠易激综合征形成及其机制研究

(81170348, 2012/01-2015/12)。该系列研究通过体内外研究，首次揭示 PDIA3 通过介导肠道 DC 异常免疫应答在 IBS 内脏高敏感产生中具有重要作用，此结果有助于深入理解 IBS 与肠道 DC 免疫调控的关系，PDIA3 基因日后有望作为 IBS 诊治的一个可选择性的新靶点。项目任务书中的研究计划未做原则性调整，



时间进度也基本符合任务书的进度安排。研究基本获得了预期的研究数据（详见下文）。在实验技术方面有了较多的积累。目前已发表标注该基金资助的 SCI 论文和中文核心期刊论文共 13 篇。该研究与本次申请项目在内容上没有重叠。本次申请的项目是在与该项目共同理论基础上的拓展研究。

已结题项目研究工作总结摘要

肠易激综合征（IBS）发病机制尚不明确，临床上缺乏有效的诊治手段，树突状细胞（DC）在 IBS 发病中的作用逐渐受到重视。我们前期研究发现蛋白二硫化物异构酶 A3（PDIA3）在 IBS 发病过程中表现出差异性上调，提示其极可能在 IBS 的发生发展中发挥重要作用。因此我们推测，PDIA3 可能通过促进内源性抗原提呈，诱导 DC 促 T 淋巴细胞免疫过度，通过介导 MC 活化，从而导致 IBS 内脏高敏感的发病。

该研究首次通过入组 IBS 患者及建立应激 IBS 大鼠模型，并通过原代分离 MLNDC，构建 PDIA3 低表达细胞及动物模型，运用流式细胞术、免疫组化、ELISA、PCR、Western Blot、投射电镜等技术，在细胞分子、蛋白及基因水平等方面对 PDIA3 与 IBS 肠道 DC 免疫的关系及其机制展开一系列研究，结果发现 PDIA3 可能通过介导 DC 激活 T 淋巴细胞，上调相关细胞因子分泌水平，后者通过引起肥大细胞活化，导致肠黏膜异常免疫应答，促进 IBS 内脏高敏感形成。

本系列研究首次揭示 PDIA3 通过介导肠道 DC 异常免疫应答在 IBS 内脏高敏感产生中具有重要作用。本课题共培养硕博研究生 4 名，其中 2 名研究生毕业课题获浙江中医药大学校级优秀毕业论文。本研究相关成果在国内外核心期刊上共发表相关论文 13 篇，其中 SCI 收录 4 篇。

成果目录

学术论文发表

- [1] Li M, Zhang L, Lu B, Chen Z, Chu L, Meng L, Fan Y. Role of dendritic cell-mediated abnormal immune response in visceral hypersensitivity. *Int J Clin Exp Med*. 2015,8(8):13243-50.
- [2] Meng L, Lu Z, Xiaoteng W, Yue H, Bin L, Lina M, Zhe C. Corticotropin-releasing Factor Changes the Phenotype and Function of Dendritic Cells in



- Mouse Mesenteric Lymph Nodes. J Neurogastroenterol Motil. 2015;21(4):571-80.
- [3] Zhao-Meng Zhuang, Xiao-Teng Wang, Lu Zhang, Li-Yuan Tao, Bin Lv. The effect of PDIA3 gene knockout on the mucosal immune function in IBS rats. Int J Clin Med 2015; 8 (5) 6866-6877.
- [4] Meng Li, Bin Lu, Li Chu, et al. Prevalence and characteristics of dyspepsia among college students in Zhejiang Province. World J Gastroenterol 2014; 20(13): 3649-3654.
- [5] 李蒙,胡玥,王霄腾,吕宾,张梦,陈超英. ERK1/2 通路对内脏高敏感大鼠肠道树突状细胞表面 MHC-II 分子表达的影响, 中华医学杂志, 2015, 95(48): 3930-3934.
- [6] 李蒙,张璐,吕宾,孟立娜,陈喆,钜莉. 树突细胞异常免疫应答在大鼠内脏高敏感形成中的作用, 中华医学杂志, 2013, 93(36): 2904-2908.
- [7] 李蒙,吕宾,钜莉,张璐. 腹泻要方对内脏高敏感大鼠肠道肥大细胞及细胞因子表达的影响. 中国中西医结合杂志, 2014, 34(9): 1146-1150.
- [8] 胡玥,李蒙,吕宾,王曦,陈超英,张梦. 内源性 CRF 对小鼠肠系膜淋巴结树突状细胞的生物表型的影响. 中华微生物学和病理学杂志. 2015, 35(9): 678-683.
- [9] 陶丽媛,吕宾,李蒙,庄肇朦. 直肠扩张联合肢体束缚诱导大鼠内脏高敏感模型的持续性. 中国比较医学杂志, 2013, 23(10): 21-25.
- [10] 庄肇朦,王霄腾,吕宾. 乙酸联合束缚应激对大鼠内脏敏感性及其肠道肥大细胞状态的影响. 中国比较医学杂志. 2014, 24 (10) : 73-77.
- [11] 胡玥,吕宾,李蒙. 温度刺激与肠易激综合征的研究进展, 中华消化杂志. 2014, 34 (10) : 713-715.
- [12] 胡玥,陶丽媛,吕宾. 树突状细胞和肥大细胞对肠易激综合征作用的研究进展. 中华消化杂志. 2015, 35(7): 500-502.
- [13] 胡玥, 陶丽媛, 吕宾. 蛋白质二硫键异构酶 A3-疾病治疗的新靶点. 中国病理生理杂志. 2015. 31 (6) : 1145-1149

专利申请



- [1] 吕宾, 李蒙, 胡玥. 一种治疗腹泻型肠易激综合征的药物组合物 (申请号: CN201410198937.4), 公开, 实质审查。

国内外会议交流

国外会议交流:

- [1] 2013 年 3 月: Asian Neurogastroenterology and Motility Association (ANMA)会议, 《Dendritic cell-mediated abnormal immune response induce the visceral hypersensitivity in a rat model of irritable bowel syndrome》壁报交流, 并以论文集收录。
- [2] 2015 年 2 月: Asian Neurogastroenterology and Motility Association (ANMA)会议, 《Corticotropin-releasing factor changes the phenotype and function of mouse mesenteric lymph nodes dendritic cells (MLNDCs)》、《Characteristics of mouse mesenteric lymph nodes dendritic cells and their ability to secrete Corticotropin releasing factor》壁报交流, 并以论文集收录。
- [3] 2015 年 10 月: United European Gastroenterology Week(UEGW)会议, 《Corticotropin-releasing factor changes the phenotype of mesenteric lymph nodes dendritic cells by regulation ERK1/2 signal pathway in IBS》壁报交流, 并以论文集收录。
- [4] 2013 年 11 月: United European Gastroenterology Week(UEGW)会议, 《Dendritic cells in the colon of rats with visceral hypersensitivity express high level of Protein disulfide isomerase A3》壁报交流, 并以论文集收录。
- [5] 2015 年 5 月: Digestive Disease Week (DDW)会议, 《Corticotropin-releasing factor changes the phenotype and function of mouse mesenteric lymph nodes dendritic cells (MLNDCs)》壁报交流, 并以论文集收录。

国内会议交流:

- [1] 2013 年 11 月: 第六届浙江省消化病学术大会 (义乌), 课题研究“内



脏高敏感大鼠肠道 DC 高表达 PDIA3” 以论文集收录。

- [2] 2013 年 6 月：第二十五届全国中西医结合消化系统疾病学术会议（江西南昌），课题研究结果“树突状细胞介导肥大细胞活化促进大鼠内脏高敏感形成”做大会青年论坛汇报交流，并以论文集收录。
- [3] 2013 年 8 月：世界中医药学会联合会消化病专业委员会第四届消化病国际学术大会（河南郑州），课题研究“内脏高敏感大鼠肠道 DC 高表达 PDIA3” 以论文集收录。
- [4] 2013 年 9 月：世界消化病大会（上海），课题研究“树突状细胞介导肥大细胞活化促进大鼠内脏高敏感形成” 壁报交流，并以论文集收录。
- [5] 2013 年 11 月：第六届浙江省消化病学术大会，课题研究“内脏高敏感大鼠肠道 DC 高表达 PDIA3”，以论文集收录。

5. 获奖情况

- [1] 课题研究“树突状细胞介导肥大细胞活化促进大鼠内脏高敏感形成”获第二十五届全国中西医结合消化系统疾病学术会议青年学术论坛二等奖。
- [2] 课题研究“Corticotropin-releasing factor changes the phenotype and function of mouse mesenteric lymph nodes dendritic cells (MLNDCs)”获第十四次全国消化系学术会议上获青年英文论文比赛优秀论文奖。

（三）其他需要说明的问题

1. 申请人同年申请不同类型的国家自然科学基金项目情况（列明同年申请的其他项目的项目类型、项目名称信息，并说明与本项目之间的区别与联系）。

无

2. 具有高级专业技术职务（职称）的申请人或者主要参与者是否存在同年申请或者参与申请国家自然科学基金项目的单位不一致的情况；如存在上述情况，列明所涉及人员的姓名，申请或参与申请的其他项目的项目类型、项目名称、单位名称、上述人员在该项目中是申请人还是参与者，并说明单位不一致原因。



无

3. 具有高级专业技术职务（职称）的申请人或者主要参与者是否存在与正在承担的国家自然科学基金项目的单位不一致的情况；如存在上述情况，列明所涉及人员的姓名，正在承担项目的批准号、项目类型、项目名称、单位名称、起止年月，并说明单位不一致原因。

无

4. 其他。

无

NSFC 2017



吕宾 简历

浙江中医药大学，第一临床医学院，教授

教育经历（从大学本科开始，按时间倒序排序；请列出攻读研究生学位阶段导师姓名）：

1. 1996/9 - 1999/7， 浙江大学， 内科学， 硕士， 导师：黄怀德
2. 1979/9 - 1984/7， 温州医学院， 临床医学， 学士， 导师：

科研与学术工作经历（按时间倒序排序；如为在站博士后研究人员或曾进入博士后流动站（或工作站）从事研究，请列出合作导师姓名）：

1. 1984/8-至今，浙江中医药大学，附属第一医院，教授

曾使用其他证件信息（申请人应使用唯一身份证件申请项目，曾经使用其他身份证件作为申请人或主要参与者获得过项目资助的，应当在此列明）：

主持或参加科研项目（课题）及人才计划项目情况：

1. 国家自然科学基金面上项目，81470814，应激通过CRF上调CK8介导肠上皮通透性改变在肠易激综合征发病中的作用研究，2015/01-2018/12，73万元，在研，主持
2. 浙江省自然基金重点项目，Z12H030001，CRF及其受体通过调控TLRs触发树突状细胞异常免疫应答促进肠易激综合征形成，2013/01-2015/12，20万元，已结题，主持
3. 国家自然科学基金面上项目，81170348，PDIA3介导树突状细胞异常免疫应答促进肠易激综合征形成及其机制研究，2012/01-2015/12，60万元，已结题，主持
4. 浙江省卫生领军人才，2013年
5. 浙江省151人才（第二层次），2000年

代表性研究成果和学术奖励情况

（请注意：①投稿阶段的论文不要列出；②对期刊论文：应按照论文发表时作者顺序列出全部作者姓名、论文题目、期刊名称、发表年代、卷（期）及起止页码（摘要论文请加说明）；③对会议论文：应按照论文发表时作者顺序列出全部作者姓名、论文题目、会议名称（或会议论文集名称及起止页码）、会议地址、会议时间；④应在论文作者姓名后注明第一/通讯作者情况：所有共同第一作者均加注上标“#”字样，通讯作者及共同通讯作者均加注上标“*”字样，唯一第一作者且非通讯作者无需加注；⑤所有代表性研究成果和学术奖励中本人姓名加粗显示。）

一、期刊论文

1. 通讯作者论文（勿与第一作者论文重复）

(1) 李蒙^(#)，吕宾^(*)，张璐，王霄腾，胡玥，孟立娜，陈喆，Corticotropin-releasing Factor Changes the Phenotype and Function of Dendritic Cells in Mouse Mesenteric Lymph Nodes, J Neurogastroenterol Motil, 2015.01.01, 21 (4) : 574~580

(2) 李蒙^(#)，张璐，吕宾^(*)，陈喆，钜莉，孟立娜，范一宏，Role of dendritic cell-mediated abnormal immune response in visceral hypersensitivity, Int J Clin Exp Med, 2015.01.01, 8 (8) : 13243~13250



(3) 庄肇滕^(#), 王霄腾, 张璐, 陶丽媛, 吕宾^(*), The effect of PDIA3 gene knockout on the mucosal immune function in IBS rats., Int J Clin Med, 2015.01.01, 8 (5) : 6866~6877

(4) 李蒙^(#), 吕宾^(*), 鉏莉, 周鸿, 陈鸣艳, Prevalence and characteristics of dyspepsia among college students in Zhejiang Province, World J Gastroenterol, 2014.01.01, 20 (13) : 3649~3654

(5) 李蒙, 吕宾^(*), 鉏莉, 树突状细胞介导肥大细胞活化促进大鼠内脏高敏感形成, 中华医学杂志, 2013.01.01, 93 (36) : 2904~2908

(6) 李蒙^(#), 胡玥, 王霄腾, 吕宾^(*), 张梦, 陈超英, ERK1/2通路对内脏高敏感大鼠肠道树突状细胞表面MHC-II分子表达的影响, 中华医学杂志, 2015.12.19, 95 (48) : 3930~3934

(7) 胡玥^(#), 李蒙, 吕宾^(*), 王曦, 陈超英, 张梦, 内源性CRF对小鼠肠系膜淋巴结树突状细胞的生物表型的影响, 中华微生物学和病理学杂志, 2015.01.01, 35 (9) : 678~683

(8) 李蒙, 吕宾, 鉏莉, 张璐, 痛泻要方对内脏高敏感大鼠肠道肥大细胞及细胞因子表达的影响, 中国中西医结合杂志, 2014.9.20, (09) : 1130~1134

(9) 庄肇滕, 王霄腾, 吕宾, 乙酸联合束缚应激对大鼠内脏敏感性及肠道肥大细胞状态的影响, 中国比较医学杂志, 2014.10.31, (10) : 73~77+93

(10) 胡玥^(#), 陶丽媛, 吕宾, 蛋白质二硫键异构酶A3——疾病治疗的新靶点, 中国病理生理杂志, 2015.6.01, (06) : 1145~1149

(11) 胡玥^(#), 吕宾^(*), 李蒙, 温度刺激与肠易激综合征的研究进展, 中华消化杂志, 2014.09.01, 34 (10) : 713~715

(12) 胡玥^(#), 陶丽媛, 吕宾^(*), 树突状细胞和肥大细胞对肠易激综合征作用的研究进展, 中华消化杂志, 2015.01.01, 35 (7) : 500~502



除非特殊说明，请勿删除或改动简历模板中蓝色字体的标题及相应说明文字

参与者 简历

李蒙，浙江中医药大学/第一临床医学院，消化内科，住院医师

教育经历（从大学本科开始，按时间倒序排序；请列出攻读研究生学位阶段导师姓名）：

2013/09-2016/06，浙江中医药大学，第一临床医学院，博士，导师：吕宾

2010/09-2013/06，浙江中医药大学，第一临床医学院，硕士，导师：吕宾

2005/09-2010/06，浙江中医药大学，第一临床医学院，学士

科研与学术工作经历（按时间倒序排序；如为在站博士后研究人员或曾进入博士后流动站（或工作站）从事研究，请列出合作导师姓名）：

2016/08-至今，浙江中医药大学/第一临床医学院，消化内科，住院医师

曾使用其他证件信息（申请人应使用唯一身份证件申请项目，曾经使用其他身份证件作为申请人或主要参与者获得过项目资助的，应当在此列明）

无

主持或参加科研项目（课题）及人才计划项目情况（按时间倒序排序）：

1. 国家自然科学基金青年项目，81600426，CRF上调PDIA3介导CD8⁺T淋巴细胞活化在IBS内脏高敏感形成中的作用研究，2017/01-2019/12，17万元，在研，主持
2. 国家自然科学基金面上项目，81470814，应激通过CRF上调CK8介导肠上皮通透性改变在肠易激综合征发病中的作用研究，2015/01-2018/12，73万元，在研，参加
3. 国家自然科学基金面上项目，81170348，PDIA3介导树突状细胞异常免疫应答促进肠易激综合征形成及其机制研究，2012/01-2015/12，60万元，已结题，参加
4. 浙江省自然科学基金重点项目，Z12H030001，CRF及其受体通过调控TLRs触发树突状细胞异常免疫应答促进肠易激综合征形成，2012/01-2015/12，20万元，已结题，参加



代表性研究成果和学术奖励情况（每项均按时间倒序排序）

（请注意：①投稿阶段的论文不要列出；②对期刊论文：应按照论文发表时作者顺序列出全部作者姓名、论文题目、期刊名称、发表年代、卷（期）及起止页码（摘要论文请加以说明）；③对会议论文：应按照论文发表时作者顺序列出全部作者姓名、论文题目、会议名称（或会议论文集名称及起止页码）、会议地址、会议时间；④应在论文作者姓名后注明第一/通讯作者情况：所有共同第一作者均加注上标“#”字样，通讯作者及共同通讯作者均加注上标“*”字样，唯一第一作者且非通讯作者无需加注；⑤所有代表性研究成果和学术奖励中本人姓名加粗显示。）

一、期刊论文（仅不列此项时可删除该标题）

请按如下顺序列出：

1. 第一作者论文（仅不列此项时可删除该标题）

- (1) **李蒙**，胡玥，王霄腾，吕宾*，张梦，陈超英，ERK1/2 通路对内脏高敏感大鼠肠道树突状细胞表面 MHC-II 分子表达的影响，中华医学杂志，2015，95（48）：3930-3934。
- (2) **李蒙**[#]，张璐[#]，吕宾*，陈喆，钜莉，孟立娜，范一宏，Role of dendritic cell-mediated abnormal immune response in visceral hypersensitivity, Int J Clin Exp Med, 2015, 8（8）：13243-13250.
- (3) **李蒙**[#]，张璐[#]，王霄腾，胡玥，吕宾*，孟立娜，陈喆，Corticotropin-releasing Factor Changes the Phenotype and Function of Dendritic Cells in Mouse Mesenteric Lymph Nodes, J Neurogastroenterol Motil, 2015, 21（4）：571-580.
- (4) **李蒙**，吕宾*，钜莉，张璐，痛泻要方对内脏高敏感大鼠肠道肥大细胞及细胞因子表达的影响，中国中西医结合杂志，2014，（09）：1130-1134。
- (5) **李蒙**，吕宾*，钜莉，周鸿，陈鸣艳，Prevalence and characteristics of dyspepsia among college students in Zhejiang Province, World J Gastroenterol, 2014, 20（13）：3649-3654.



(6) **李蒙**, 吕宾*, 肠易激综合征与免疫:从功能性走向器质性?, 胃肠病学, 2013, 18 (11): 697-700。

(7) **李蒙**, 吕宾*, 锄莉, 树突状细胞介导肥大细胞活化促进大鼠内脏高敏感形成, 中华医学杂志, 2013, 93 (36): 2904-2908。

(8) **李蒙**, 陈鸣艳, 吕宾*, 鉏莉, 周鸿, 浙江省高校大学生功能性消化不良流行病学调查及其与心理因素的关系, 中华消化杂志, 2012, 32 (7): 433-436。

2. 通讯作者论文（勿与第一作者论文重复）（仅不列此项时可删除该标题，序号按实际情况编排）

(1) 吕宾*, **李蒙**, 胡玥, 徐毅, 张烁, 蔡利军, Effect of peroral esophageal myotomy for achalasia treatment:A Chinese study, World J Gastroenterol, 2015, 21 (18): 5622-5629.

(2) 胡玥, **李蒙**, 吕宾*, 王曦, 陈超英, 张梦, 内源性 CRF 对小鼠肠系膜淋巴结树突状细胞的生物表型的影响, 中华微生物学和病理学杂志, 2015, 35 (9): 678-683。

(3) 吕宾*, **李蒙**, Helicobacter pylori eradication for preventing gastric cancer, World J Gastroenterol, 2014, 20 (19): 5660-5665.

(4) 陶丽媛, 吕宾*, **李蒙**, 庄肇滕, 直肠扩张联合肢体束缚诱导大鼠内脏高敏感模型的持续性, 中国比较医学杂志, 2013, (10): 21-25+4。



除非特殊说明，请勿删除或改动简历模板中蓝色字体的标题及相应说明文字

参与者 简历

王曦，浙江中医药大学/第一临床医学院，中心实验室，助理研究员

教育经历（从大学本科开始，按时间倒序排序；请列出攻读研究生学位阶段导师姓名）：

2008/09-2013/03，浙江大学，基础医学院，博士，导师：杜继曾，陈学群

2005/09-2008/06，辽宁师范大学，生命科学学院，硕士，导师：邹伟

2001/09-2005/06，辽宁师范大学，生命科学学院，学士

科研与学术工作经历（按时间倒序排序；如为在站博士后研究人员或曾进入博士后流动站（或工作站）从事研究，请列出合作导师姓名）：

2013/08-至今，浙江中医药大学/第一临床医学院，中心实验室，助理研究员
曾使用其他证件信息（申请人应使用唯一身份证件申请项目，曾经使用其他身份证件作为申请人或主要参与者获得过项目资助的，应当在此列明）

无

主持或参加科研项目（课题）及人才计划项目情况（按时间倒序排序）：

1. 国家自然科学基金青年基金项目，81600426，CRF上调PDIA3介导CD8+T淋巴细胞活化在IBS内脏高敏感形成中的作用研究，2017/01-2019/12，17万，在研，参加
2. 国家自然科学基金青年基金项目，81600595，ICA69的表达调控对胰岛β细胞能量代谢的影响机制，2017/01-2019/12，17万，在研，参加
3. 国家自然科学基金青年基金项目，81603340，Wnt2-Fzd2-Fyn-STAT3通路在苦蕒内酯P抑制食管鳞癌EMT和转移的作用研究，2017/01-2019/12，18万，在研，参加
4. 浙江省自然科学基金一般项目，LY17H280006，三氧化二砷作用于鞘氨醇激酶SPHK1的机制研究，2017/01-2019/12，8万，在研，参加
5. 国家自然科学基金面上项目，81573760，长链非编码RNA-ncRuPAR介导云母促非甾体抗炎药肠病肠粘膜机械屏障修复机制的研究，2016/01-2019/12，53万，在研，参加



6. 国家自然科学基金青年基金项目, 81503297, IGF1R-RACK1-STAT3通路在苦藜内酯P抗EGFR T790M突变非小细胞肺癌中的作用研究, 2016/01-2018/12, 18万, 在研, 参加
7. 浙江省自然科学基金青年基金项目, LQ16H070003, 糖尿病胰岛 β 细胞中ICA69的甲基化调控及对代谢的影响, 2016/01-2018/12, 5万, 在研, 参加
8. 国家自然科学基金面上项目, 81470814, 应激通过CRF上调CK8介导肠上皮通透性改变在肠易激综合征发病中的作用研究, 2015/01-2018/12, 73万, 在研, 参加。
9. 国家自然科学基金青年基金项目, 81400594, 中枢CRH1型受体表观遗传学改变在肠易激综合征发生中的作用机制研究, 2015/01-2017/12, 23万元, 在研, 主持。
10. 浙江省自然科学基金青年基金项目, LQ14H160014, caveolin-1基因甲基化修饰对胃癌化疗药物抗药性的作用机制研究, 2014/01-2016/12, 5万元, 在研, 主持。
11. 国家自然科学基金面上项目, 81373877, ACE2-Ang(1-7)-Mas信号通路在非甾体抗炎药相关肠病中的作用及云母微化颗粒干预机制研究, 2014/01-2017/12, 70万, 在研, 参加。

代表性研究成果和学术奖励情况（每项均按时间倒序排序）

（请注意：①投稿阶段的论文不要列出；②对期刊论文：应按照论文发表时作者顺序列出全部作者姓名、论文题目、期刊名称、发表年代、卷（期）及起止页码（摘要论文请加以说明）；③对会议论文：应按照论文发表时作者顺序列出全部作者姓名、论文题目、会议名称（或会议论文集名称及起止页码）、会议地址、会议时间；④应在论文作者姓名后注明第一/通讯作者情况：所有共同第一作者均加注上标“#”字样，通讯作者及共同通讯作者均加注上标“*”字样，唯一第一作者且非通讯作者无需加注；⑤所有代表性研究成果和学术奖励中本人姓名加粗显示。）

一、期刊论文（仅不列此项时可删除该标题）

请按如下顺序列出：

1. 第一作者论文（仅不列此项时可删除该标题）

- (1) **Xi Wang**, Fansen Meng, Zongyun Liu, Junming Fan, Xuequn Chen*,



Jizeng Du*, Gestational hypoxia induces sex-differential methylation of *Crhr1* linked to anxiety-like behavior, *Molecular Neurobiology*, 2013, 48(3): 544-555.

- (2) **Xi Wang**, Shuang Feng, Hong Zhang, Yang Wang, Yuying Cui, Zhaoyi Wang, Jing Liu, Wei Zou*, RNA inference-mediated caveolin-1 down-regulation decrease estrogen receptor alpha (ERalpha) signaling in human mammary epithelial cells, *Molecular Biology Reports*, 2011, 38: 761-768.

2. 既非第一作者又非通讯作者论文（仅不列此项时可删除该标题，序号按实际情况编排）

- (1) Yue Hu, Meng Li, Bin Lu*, **Xi Wang**, Chaoying Chen, Meng Zhang, Corticotropin-releasing factor augments LPS-induced immune/inflammatory responses in JAWSII cells, *Immunologic Research*, 2016, 64(2):540-547.
- (2) 胡玥, 李蒙, 吕宾*, **王曦**, 陈超英, 张梦, 内源性 CRF 对小鼠肠系膜淋巴结树突状细胞的生物表型的影响, *中华微生物学和免疫学杂志*, 2015, 35(9): 678~683.
- (3) Junming Fan*, Xuequn Chen*, **Xi Wang**, Ke Hao, Jizeng Du*, Corticotropin-releasing factor receptor type 1 colocalizes with type 2 in corticotropin-releasing factor-containing cellular profiles in rat brain, *Neuro endocrinology letters*, 2014, 35(5): 417-426.
- (4) Junming Fan, **Xi Wang**, Ke Hao, Yuan Yuan, Xuequn Chen*, Jizeng Du*, Upregulation of PVN CRHR1 by gestational intermittent hypoxia selectively triggers a male-specific anxiogenic effect in rat offspring, *Hormones and Behavior*, 2013, 63(1): 25-31.
- (5) Shuang Feng, Yang Wang, Xi Wang, Zhaoyi Wang, Yuying Cui, Jing Liu, Chunhui Zhao, Mei Jin, Wei Zou*, *Caveolin-1* gene silencing promotes the activation of PI3K/AKT dependent on $E\alpha 36$ and the transformation of MCF10A^{CE}, *Science China Life Sciences*, 2010, 53(5): 598-605.



除非特殊说明，请勿删除或改动简历模板中蓝色字体的标题及相应说明文字

参与者简历

郭梦舟，浙江中医药大学，第一临床医学院，消化内科，住院医师

教育经历（从大学本科开始，按时间倒序排序；请列出攻读研究生学位阶段导师姓名）：

1. 2013/09-2016/06, 复旦大学，上海医学院内科学系，硕士，导师：刘天舒

2. 2008/09-2013/06, 南昌大学，第一临床医学院临床医学系，学士

科研与学术工作经历（按时间倒序排序；如为在站博士后研究人员或曾进入博士后流动站（或工作站）从事研究，请列出合作导师姓名）：

1. 2016/08-至今，浙江中医药大学，第一临床医学院，消化内科，住院医师

曾使用其他证件信息（申请人应使用唯一身份证件申请项目，曾经使用其他身份证件作为申请人或主要参与者获得过项目资助的，应当在此列明）

无

主持或参加科研项目（课题）及人才计划项目情况（按时间倒序排序）：

无

代表性研究成果和学术奖励情况（每项均按时间倒序排序）

（请注意：①投稿阶段的论文不要列出；②对期刊论文：应按照论文发表时作者顺序列出全部作者姓名、论文题目、期刊名称、发表年代、卷（期）及起止页码（摘要论文请加以说明）；③对会议论文：应按照论文发表时作者顺序列出全部作者姓名、论文题目、会议名称（或会议论文集名称及起止页码）、会议地址、会议时间；④应在论文作者姓名后注明第一/通讯作者情况：所有共同第一作者均加注上标“#”字样，通讯作者及共同通讯作者均加注上标“*”字样，唯一第一作者且非通讯作者无需加注；⑤所有代表性研究成果和学术奖励中本人姓名加粗显示。）

一、期刊论文（仅不列此项时可删除该标题）

请按如下顺序列出：



1. 第一作者论文（仅不列此项时可删除该标题）

- (1) **Mengzhou Guo**[#], Yiyi Yu[#], Yan Wang, Yuehong Cui, Qian Li, Yi Feng, Wei Li, RongYuan Zhuang, Tianshu Liu^{*}, Low-dosed docetaxel showed equivalent efficacy but improved tolerability compared with oxaliplatin in the S-1-based first-line chemotherapy regimen for metastatic or recurrent gastric adenocarcinoma, Medical Oncology, 2015,32(9):230.
- (2) YiyiYu[#], **Mengzhou Guo**[#], Ye Wei[#], Shan Yu, Hong Li, Yan Wang, Xiaojin Xu, Yuehong Cui, Jiawen Tian, Li Liang, Ke Peng, Tianshu Liu^{*}, FoxO3a confers cetuximab resistance in RAS wild-type metastatic colorectal cancer through c-Myc, Oncotarget, 2016,7(49):80888-80900.
- (3) 郭梦舟, 崔越宏, 刘天舒^{*}, 胃癌发生、发展和治疗相关microRNAs及其作用靶点的研究进展, 胃肠病学, 2014(12):742-745。



除非特殊说明，请勿删除或改动简历模板中蓝色字体的标题及相应说明文字

参与者 简历

徐丽，浙江中医药大学/第一临床医学院，消化内科，住院医师

教育经历（从大学本科开始，按时间倒序排序；请列出攻读研究生学位阶段导师姓名）：

2013/09-2016/06，浙江大学，医学院，硕士，导师：毛建山

2008/09-2013/06，宁波大学，医学院，学士

科研与学术工作经历（按时间倒序排序；如为在站博士后研究人员或曾进入博士后流动站（或工作站）从事研究，请列出合作导师姓名）：

2016/08-至今，浙江中医药大学/第一临床医学院，消化内科，住院医师

曾使用其他证件信息（申请人应使用唯一身份证件申请项目，曾经使用其他身份证件作为申请人或主要参与者获得过项目资助的，应当在此列明）

无

主持或参加科研项目（课题）及人才计划项目情况（按时间倒序排序）：

1. 国家自然科学基金面上项目，81372348，一群新的CD44+CD58+大肠癌干细胞生物学功能及其关键分子调控机制鉴定，2014/01-2017/12，65万元，在研，参加
2. 973项目，2014CB542003，肿瘤异质性的代谢机制，2014/01-2017/12，88万元，在研，参加

代表性研究成果和学术奖励情况（每项均按时间倒序排序）

（请注意：①投稿阶段的论文不要列出；②对期刊论文：应按照论文发表时作者顺序列出全部作者姓名、论文题目、期刊名称、发表年代、卷（期）及起止页码（摘要论文请加以说明）；③对会议论文：应按照论文发表时作者顺序列出全部作者姓名、论文题目、会议名称（或会议论文集名称及起止页码）、会议地址、会议时间；④应在论文作者姓名后注明第一/通讯作者情况：所有共同第一作者均加注上标“#”字样，通讯作者及共同通讯作者均加注上标“*”字样，唯一第一作者且非通讯作者无需加注；⑤所有代表性研究成果和学术奖励中本人姓名加粗显示。）

无



附件信息

序号	附件名称	备注	附件类型
1	目录	附件目录	其他
2	SCI 1	Corticotropin-releasing factor augments LPS-induced immune/inflammatory responses in JAWSII cells	代表性论著
3	SCI 2	Role of dendritic cell-mediated abnormal immune response in visceral hypersensitivity	代表性论著
4	SCI 3	Corticotropin-releasing Factor Changes the Phenotype and Function of Dendritic Cells in Mouse Mesenteric Lymph Nodes	代表性论著
5	SCI 4	Prevalence and characteristics of dyspepsia among college students in Zhejiang Province	代表性论著
6	SCI 5	Proteomic analysis of colonic mucosa in a rat model of irritable bowel syndrome. Proteomics	代表性论著
7	获奖	浙江省中医药科学技术奖一等奖	科技奖励
8	特邀报告	4th Biennial Congress Asian Neurogastroenterology and Motility Association 汇报交流通知书	学术会议大会报告或特邀报告邀请信

**签字和盖章页(此页自动生成, 打印后签字盖章)**

申请人: 吕宾

依托单位: 浙江中医药大学

项目名称: PDIA3-STAT3脂筏上调CTSS调控DC活化致IBS内脏高敏感的研究

资助类别: 面上项目

亚类说明:

附注说明: 常规面上项目

申请人承诺:

我保证申请书内容的真实性。如果获得资助, 我将履行项目负责人职责, 严格遵守国家自然科学基金委员会的有关规定, 切实保证研究工作时间, 认真开展工作, 按时报送有关材料。若填报失实和违反规定, 本人将承担全部责任。

签字:

项目组主要成员承诺:

我保证有关申报内容的真实性。如果获得资助, 我将严格遵守国家自然科学基金委员会的有关规定, 切实保证研究工作时间, 加强合作、信息资源共享, 认真开展工作, 及时向项目负责人报送有关材料。若个人信息失实、执行项目中违反规定, 本人将承担相关责任。

编号	姓名	工作单位名称	证件号码	每年工作时间(月)	签字
1	李蒙	浙江中医药大学	330483198610200321	6	
2	王曦	浙江中医药大学	210102198209256626	5	
3	郭梦舟	浙江中医药大学	430725199012020065	6	
4	徐丽	浙江中医药大学	33020619891125344X	6	
5	胡玥	浙江中医药大学	330521198909060227	6	
6	王爽爽	浙江中医药大学	332624199310170041	6	
7	何承海	浙江中医药大学	330521199008200012	6	
8					
9					

依托单位及合作研究单位承诺:

已按填报说明对申请人的资格和申请书内容进行了审核。申请项目如获资助, 我单位保证对研究计划实施所需要的人力、物力和工作时间等条件给予保障, 严格遵守国家自然科学基金委员会有关规定, 督促项目负责人和项目组成员以及本单位项目管理部门按照国家自然科学基金委员会的规定及时报送有关材料。

依托单位公章

日期:

合作研究单位公章1

日期:

合作研究单位公章2

日期: