

Catalogue

- [1. WKJZJ2124-YuHong..... 2](#)
- [2. LQ20C010005-Lindan Hou9](#)
- [3. LQ19H030009-Yeru Chen..... 18](#)
- [4. LY19H030011-Yuxin.....19](#)

国家卫生健康委员会司(局)便函

国卫科教专项便函〔2020〕235号

国家卫生健康委科教司关于同意国家卫生健康委科学研究基金-浙江省卫生健康重大科技计划 2021 年度立项课题的复函

浙江省卫生健康委科教处:

你处《关于国家卫生健康委科学研究基金-浙江省卫生健康重大科技计划 2021 年度立项课题的报告》收悉。

根据相关管理规定和你处组织专家评审的结果,经研究,我司同意将“基于微流控芯片的呼吸道传染病快速诊断试剂及设备研发”等 14 项重大项目及“肿瘤相关巨噬细胞高表达 VSIG4 介导胰腺导管癌免疫逃逸及其干预策略”等 28 项重点项目列为“国家卫生健康委科学研究基金-浙江省卫生健康重大科技计划”2021 年度立项课题。请按照有关规定加强项目的组织管理,确保研究任务按期完成。

专此函复。

附件:《关于国家卫生健康委科学研究基金-浙江省卫生健康重大科技计划 2021 年度推荐立项课题的报告》

(此页无正文)

国家卫生健康委科教司

2020年10月9日

(信息公开形式：不予公开)

科技教育司

附件

国家卫生健康委科学研究基金——浙江省卫生健康重大科技计划项目 2021 年度立项课题

一、重大项目

编号	课题名称	负责人	承担单位
WKJ-ZJ-2101	基于微流控芯片的呼吸道传染病快速诊断试剂及设备研发	张 威	省人民医院
WKJ-ZJ-2102	基于深度结构特征的新冠肺炎危重症化临床预警体系的建立及应用研究	葛明华	省人民医院
WKJ-ZJ-2103	多通道新型冠状病毒（2019-nCoV）核酸快速检测设备研发	谭蔚泓	省肿瘤医院
WKJ-ZJ-2104	基于“一物一码”新型采样器的生物安全追溯体系建设	程向东	省肿瘤医院
WKJ-ZJ-2105	新型冠状病毒灭活疫苗候选株筛选研究	张严峻	省疾病预防控制中心

WKJ-ZJ-2106	新型冠状病毒肺炎血清流行病学和感染谱研究	陈恩富	省疾病预防控制中心
WKJ-ZJ-2107	快速便携式荧光定量 PCR 仪器及配套新型冠状病毒等呼吸道病原多重诊断试剂的研发及产业化	金大智	杭州医学院
WKJ-ZJ-2108	新型冠状病毒（2019-nCoV）抗原多肽疫苗设计与安全性验证	蒋海萍	浙江大学医学院附属第一医院
WKJ-ZJ-2109	自动化、一站式 COVID-19 检测平台的建立和应用	周建英	浙江大学医学院附属第一医院
WKJ-ZJ-2110	基于 COVID-19 肺损伤的动态监测、预警、质控及肺部影像模块化体系建设	蔡洪流	浙江大学医学院附属第一医院
WKJ-ZJ-2111	重症老年新冠肺炎临床救治新方案及机制的研究	杨益大	浙江大学医学院附属第一医院
WKJ-ZJ-2112	基于人工神经网络新冠肺炎患者器官功能不全早期预警及分层精准治疗的研究	周建仓	浙江大学医学院附属邵逸夫医院
WKJ-ZJ-2113	新型冠状病毒感染对育龄期患者生殖健康影响及其防治策略研究	汪 辉	浙江大学医学院附属妇产科医院
WKJ-ZJ-2114	氯己定促进肠杆菌科细菌间碳青霉烯耐药基因传播机制及光芬顿技术干预应用研究	周铁丽	温州医科大学附属第一医院

二、重点项目

编号	课题名称	负责人	承担单位
----	------	-----	------

WKJ-ZJ-2115	肿瘤相关巨噬细胞高表达 VSIG4 介导胰腺导管腺癌免疫逃逸及其干预策略	黄 萍	省人民医院
WKJ-ZJ-2116	乳腺癌 OTUD1 表达水平与化疗疗效和预后的相关性分析及治疗方法研究	孟旭莉	省人民医院
WKJ-ZJ-2117	基于 ddPCR 技术的外周血中细菌 cfDNA 检测方法的建立及在食管-胃交界腺癌早期诊断中的应用	凌志强	省肿瘤医院
WKJ-ZJ-2118	基于超短程治疗的耐利福平肺结核防治关键技术集成及示范应用	陈 彬	省疾病预防控制中心
WKJ-ZJ-2119	新发和重要血源性寄生虫病多通道快检试剂盒研发与应用	阮 卫	省疾病预防控制中心
WKJ-ZJ-2120	FGF21/LPO 通路对肝移植术后早期移植物功能损伤的调控机制及干预研究	卫 强	浙江大学医学院
WKJ-ZJ-2121	提升急性主动脉夹层救治水平关键技术的研究及应用	董爱强	浙江大学医学院
WKJ-ZJ-2122	基于外周血的肺癌免疫治疗新型预测性标志物探索研究	王苹莉	浙江大学医学院附属第二医院
WKJ-ZJ-2123	基于 CBDT 理论的综合医院功能化重大公共卫生事件救援模型构建与应用	封秀琴	浙江大学医学院附属第二医院
WKJ-ZJ-2124	“星状神经节阻滞”对重症胰腺炎炎症反应影响的研究	虞 洪	浙江大学医学院附属邵逸夫医院
WKJ-ZJ-2125	荧光显影导航下子宫恶性肿瘤淋巴结精准识别及选择性切除的临床价值	杨建华	浙江大学医学院附属邵逸夫医院

WKJ-ZJ-2126	产时宫外胎儿手术（EXIT）技术探索和体系创建研究	罗 琼	浙江大学医学院附属妇产科医院
WKJ-ZJ-2127	复发性胎儿畸形遗传学病因及诊断策略研究	董旻岳	浙江大学医学院附属妇产科医院
WKJ-ZJ-2128	基于胶体金纳米管免疫层析技术探讨 Annexin A2 自身抗体在儿童免疫性肾病综合征诊疗中的应用	叶 青	浙江大学医学院附属儿童医院
WKJ-ZJ-2129	基于可穿戴设备的闭环警报系统在癫痫发作监测管理中的研发与应用	方嘉佳	浙江大学医学院附属第四医院
WKJ-ZJ-2130	温敏型肝素泊洛沙姆-FGF20 水凝胶对缺血性脑卒中的治疗作用研究	林 丽	温州医科大学
WKJ-ZJ-2131	基于细胞外囊泡的重症急性胰腺炎相关肺损伤分子诊断技术开发与应用研究	熊响清	温州医科大学附属第一医院
WKJ-ZJ-2132	肿瘤来源的外泌体去除对肺癌免疫治疗影响的研究及清除模块的原型开发	谢聪颖	温州医科大学附属第二医院
WKJ-ZJ-2133	2 型固有淋巴细胞在哮喘特异性免疫治疗中的作用及机制研究	张维溪	温州医科大学附属第二医院
WKJ-ZJ-2134	基于新型上转换纳米复合材料传感器阵列的圆锥角膜泪液标志物的检测及分析研究	黄锦海	温州医科大学附属眼视光医院
WKJ-ZJ-2135	弱视患者视功能可塑性：基于视网膜-视觉中枢结构及功能关联性研究	赵云娥	温州医科大学附属眼视光医院
WKJ-ZJ-2136	胆管支架联合胰管支架主动早期干预治疗胰腺癌相关并发症的有效性研究	张筱凤	杭州市第一人民医院

WKJ-ZJ-2137	凋亡抑制型纳米探针构建及对动脉粥样硬化斑块可视化治疗新技术研究	何文明	宁波大学医学院附属医院
WKJ-ZJ-2138	医防整合重大传染病人工智能预警及多点触发监控系统	陈 栋	温州市中心医院

浙江省基础公益研究计划

项目计划书

立项编号 LQ20C010005

项目名称: 乙肝病毒 X 蛋白 (HBx) 通过抑制病毒聚合酶 (Pol) 泛素化降解进而促进 HBV 复制的研究

计划类别: 省自然科学基金

项目类别: 探索项目 Q

项目负责人: 侯丽丹 电话:

电子邮箱: houlidan@zju.edu.cn

通信地址: 浙江省/杭州市/江干区 庆春东路 3 号

邮政编码: 310016

依托单位: 浙江大学

联系人: 陈曦 电话:

申报日期: 2019-12-4

浙江省科学技术厅
浙江省自然科学基金委员会
二〇一九年制

填写说明

- 一、收到《浙江省基础公益研究计划项目立项通知》后，请认真阅读省基础公益研究计划有关项目和经费管理办法，按要求认真填写《浙江省基础公益研究计划项目计划书》（简称《计划书》）。填写《计划书》时要求科学严谨、实事求是、表述清晰、准确，并认真阅读本填报说明。
- 二、项目负责人应当按照申请书的内容填写《计划书》，除根据确定的资助额度对项目经费预算进行适当调整外，不得对申请书的其他内容进行变更。依托单位应对《计划书》内容进行审核。
- 三、《计划书》经项目负责人和依托单位签字盖章，并经省自然科学基金委员会办公室审核批准后，将作为项目执行、检查、验收的依据。
- 四、资助项目的有关研究成果，包括论文、专著、专利、获奖等情况，均须按规定标注“浙江省基础公益研究计划项目”（属于省自然科学基金的可标注“浙江省自然科学基金项目”）和立项编号。
- 五、省基础公益研究计划的项目经费管理（包括省级财政拨款经费、联合资助经费、自筹经费）依照省财政关于科技项目的有关经费管理要求执行，非省级财政拨款单位联合资助经费参照执行。

基本信息

负责人信息	姓 名	侯丽丹	性别	女	出生日期	
	电 话		E-mail		houlidan@zju.edu.cn	
	证件类型	身份证 18 位	证件号码			
项目基本信息	项目名称	乙肝病毒 X 蛋白 (HBx) 通过抑制病毒聚合酶 (Pol) 泛素化降解进而促进 HBV 复制的研究				
	英文名称	Promotion of hepatitis b virus replication by HBx-blocked proteasomal degradation of the viral polymerase and its mechanistic studies				
	计划类别	省自然科学基金	项目类别	探索项目 Q		
	项目研究阶段	基础研究				
	国家自然科学基金学科代码	C010803				
	国家自然科学基金学科代码名称	生命科学部/微生物学/病毒学/人类病毒学				
	国家标准学科分类与代码	1806499				
	国家标准学科分类与代码名称	生物学/病毒学/病毒学其他学科				
	预计研究年限	2020 年 1 月 至 2022 年 12 月				
	项目总经费	9.0 万元	其中省财政资助经费	9.00 万元		
中文关键词	乙型肝炎病毒; 病毒聚合酶; HBx; CRL4 泛素连接酶; 泛素化					
英文关键词	HBV; viral polymerase; HBx; CRL4; ubiquitination					
中文摘要	项目研究内容与目标: 根据世界卫生组织 2017 年最新报告显示, 全球范围内大约有 2.57 亿乙型肝炎病毒 (HBV) 慢性感染的病人, 这些病人的病程会进一步恶化, 发展为诸如肝硬化、肝癌等重大疾病, 并且恶化的风险极大。研究表明, HBV 表达的调节蛋白 HBx 通过劫持 CRL4-DDB1 E3 泛素连接酶, 靶向 SMC5/6 进行泛素化降解, 以抵消宿主对病毒转录水平的控制。而课题组前期的研究表明 CRL4-DDB1 可以通过底物接头蛋白 Cdt2 招募乙肝病毒聚合酶蛋白进行泛素化降解, 从而导致病毒含量的提高。课题组还发现乙肝病毒的 HBx 蛋白可以抑制 Pol 泛素化并且上调 HBV 的病毒复制, 并且这一调节与 HBx-DDB1 的结合有关, 其机制有待进一步阐明。在此基础上, 课题组提出假说: HBx 通过与 CRL4 接头蛋白 Cdt2 竞争性结合 DDB1, 捕获 CRL4-DDB1, 抑制了 CRL4 与 Pol 的相互作用, 从而降低 Pol 的泛素化水平, 稳定 HBV 的病毒复制。我们的研究将为病毒-宿主相互作用提供一个新机制, 将会揭示宿主细胞内 CRL4 泛素连接酶在病毒-宿主相互作用中的重要作用, 进而为下一步的 HBV 的研究和治疗提供新的思路。					

项目组成员

编号	姓名	成员类别	出生日期	性别	单位名称	电话
1	侯丽丹	负责人		女	浙江大学	
2						
3						
4						
5						
6						
7						

项目经费

项目总经费 9.00 万元，其中省财政资助经费 9.00 万元（第一批财政拨款 9.00 万元，第二批财政拨款 0.00 万元），联合资助经费 0.00 万元，自筹经费 0 万元。

科研经费	名称	项目总经费预算 (万元)
直接费用	1、设备费	0.00
	2、材料费	5.00
	3、测试化验加工费	0.20
	4、燃料动力费	0.00
	5、差旅费、会议费、合作、协作研究与交流费	0.00
	6、出版/文献/信息传播/知识产权事务费	0.10
	7、人员劳务费	1.00
	8、专家咨询费	0.00
间接费用	9、间接费用	2.70

需增添的仪器及设备：

名称	规格型号	数量	单价	金额(万)	资金来源	用途说明
----	------	----	----	-------	------	------

研究计划

2020 年度

研究内容: 根据已有的实验结果, 为了进一步确认 CRL4Cdt2 在肝脏中调控 HBV 的复制情况, 通过小鼠尾静脉高压注射 CRISPR-Cas9 质粒, 特异性敲除 CRL4Cdt2 组分, 检测肝脏内 HBV 的复制情况。在肝癌细胞系中, 分别在 WT 和 SMC5/6 敲低的细胞系中验证 HBx 对 HBV-Pol mRNA 和蛋白水平的调控, 同时, 确认 HBx 对 Pol 泛素化水平的调控。利用 compHBV 系统, 同时检测 HBV-Pol 的蛋白水平和 HBV 的复制情况, 以此确认 HBx 是否可以通过调控 Pol 的水平调控 HBV 的复制。

研究目标: 1. 验证在肝脏中, CRL4Cdt2 对 HBV-Pol 的泛素化调控。

2. 明确 HBx 对 HBV-Pol 的泛素化水平是否有调控, 且是否对 HBV 病毒复制调控。

2021 年度

研究内容: 通过 HBx 和 HBx 的 DDB1 结合缺失突变体 HBx R96E, 确认 HBx 发挥功能是否与 DDB1 的结合有关。并通过在细胞内敲低 CRL4Cdt2 进一步确认 HBx 对 HBV-Pol 的泛素化水平和蛋白水平的影响。通过进一步细胞内检测 HBx, Pol 和 CRL4Cdt2 之间相互作用, 已确认 HBx 是通过怎样作用抑制 Pol 的泛素化和蛋白降解。同时, 确定 HBV-Pol 与 DDB1/Cdt2 相互作用的结合位点。并通过构建 Pol 的 Cdt2 结合缺失突变体, 进一步确认 Pol 受到 HBx 的调控是否是通过 CRL4Cdt2 E3 泛素连接酶。项目数据中期整理、分析、总结及汇报。

研究目标: 1. 明确 HBx 对 HBV-Pol 的调控是否通过 CRL4 E3 泛素连接酶。

2. 明确 HBx 调控 HBV-Pol 泛素化的分子机制。

2022 年度

研究内容: 根据已有的 compHBV 系统构建 Pol 与 Cdt2 结合缺失的系统 (compHBV-), 分别在细胞和小鼠中验证 HBx 对 HBV-Pol 的蛋白水平和 HBV 复制的调控。数据整理、分析、总结、撰写论文及投稿; 成果申报及结题。

研究目标: 1. 根据明确的分子机制, 明确在 HBx 在 HBV 复制中由于调控 Pol 的泛素化而产生的作用。

2. 根据已有的数据进行整理、分析和总结, 撰写论文并投稿。

3. 完成课题结题。

预期研究成果:

1. 证实病毒表达的 HBx 通过结合 CRL4 E3 泛素连接酶抑制 HBV-Pol 泛素化的分子机制。
2. 阐明病毒表达的 HBx 对抗宿主抑制 HBV 复制的新机制。
3. 发表论文 2 篇, 其中 SCI 论文 1 篇。
4. 培养研究生 1-2 名。

研究年限期间预期发表的主要期刊论文 2 篇:

S(S)CI 收录	1	EI 收录	0	其他发表论文	1
-----------	---	-------	---	--------	---

研究年限期间预期完成的其他成果 0 项:

授权的发明专利	0	专著	0
---------	---	----	---

签字和盖章页

我接受浙江省基础公益研究计划的资助，将按照项目申请书、批准通知和计划书负责实施本项目，严格遵守浙江省基础公益研究计划相关项目和经费管理规定，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。

项目负责人（签字）：

年 月 日

我单位同意承担上述浙江省基础公益研究计划项目，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，严格遵守浙江省基础公益研究计划相关项目和经费管理规定，并督促实施。

依托单位（公章）：

年 月 日

浙江省自然科学基金委员会办公室审批意见：

同意。

浙江省自然科学基金委员会办公室

年 月 日

浙江省基础公益研究计划项目批准通知

陈叶如同志：

根据浙江省自然科学基金相关管理规定，浙江省自然科学基金委员会会同相关部门决定资助您申请的以下项目：

项目批准号	LQ19H030009		依托单位	浙江大学	
项目名称	Nrf2/ARE 信号通路介导线粒体自噬在炎症性肠病中的作用和机制研究				
项目负责人	陈叶如		证件号码	[REDACTED]	
项目类别	省自然科学基金/青年基金项目		研究期限	2019 年 1 月 至 2021 年 12 月	
总经费 (万元)	9.00	省财政资助经费 (万元)	9.00	联合资助经费 (万元)	0.00
序号	其他主要成员	证件号码	性别	单位名称	
1	罗丰	[REDACTED]	女	浙江大学/医学院	
2	吕小翠	[REDACTED]	女	浙江大学/医学院	
3	王永杰	[REDACTED]	男	浙江大学/医学院	
4	赵西宝	[REDACTED]	男	浙江大学基础医学院	
5	贾代茹	[REDACTED]	女	浙江大学附属邵逸夫医院	
6					

浙江省自然科学基金委员会办公室

2018年11月30日



浙江省基础公益研究专项项目验收材料

项目批准号:	LY19H030011		
项目名称:	蛛网膜下腔阻滞调节肠道微生态在炎症性肠病中的作用及机制研究		
专项类别:	省自然科学基金		
项目类别:	探索一般		
资助金额:	9.00 万元		
起止年月:	2019-01 至 2021-12		
项目负责人:	俞欣	电话:	18588888888
依托单位:	浙江大学		
电子邮箱:	xinxin_yu@hotmail.com		
通讯地址:	庆春东路 3 号		
邮政编码:	310006		

浙江省基础公益研究计划项目验收材料(2022年度)

依托单位已审核

依托单位已审核

依托单位已审核

依托单位已审核

浙江省科学技术厅
浙江省自然科学基金委员会办公室

2022 年制

依托单位已审核

依托单位已审核

依托单位已审核

依托单位已审核

研究工作总结摘要：

炎症性肠病（IBD）是一种多因素疾病，目前依旧缺乏根治性治疗。神经系统和肠道微生物群之间的双向交互作用参与 IBD 发生发展。然而，其机制尚不清楚。本研究旨在通过蛛网膜下腔阻滞实现区域交感神经阻滞探索其对 DSS 诱导的小鼠结肠炎的影响。我们有趣地发现，蛛网膜下腔阻滞可以通过调节肠道微生物群、肠道免疫功能和维持肠道屏障来减轻肠道炎症。这为 IBD 患者的临床治疗提供了新的见解。

关键词：腰麻；炎症性肠病；肠道菌群；肠道炎症；肠道免疫

【期刊论文】			
文章名称	Lipocalin-2 alleviates LPS-induced inflammation through alteration of macrophage properties		
刊物名称	Journal of Inflammation Research		
期刊类别	SCI (SSCI) 期刊论文	学科领域	生命科学部/动物学/实验动物学/模式动物
ISBN 码或卷(期)	14	影响因子	6.92
起始页码	4189-4203	DOI	10.2147/JIR.S328916
出版日期	2021-09-26	被引用次数	
完成人	俞欣		

资助项目研究成果目录

获奖 (项)	国家最高科学技术奖	国家自然科学奖	国家科技进步奖	国家发明奖	
	0	0	0	0	
	何梁何利基金奖获得者	省科学技术重大贡献奖	省部级技术发明奖	省部级自然科学奖	
	0	0	0	0	
	省部级科学技术进步奖	其他省部级科技奖	其他奖		
	0	0	0		
论文 (篇)	SCI (SSCI)	EI	国内一级学术期刊	国内核心期刊论文	其他论文
	1	0	0	0	0
专著 (篇)	原创		编著		
	0		0		
专利及其他	发明		实用新型		
	0		0		
会议论文	国际大会	国际分组报告或展示	国内大会	国内报告或展示	

浙江省基础公益研究计划项目验收材料(2022年度)

(篇)	0	0	0	0
人才培养 (人)	博士后		博士生	硕士生
	0		1	1
	研究期限内项目组成员晋升职称数			1
	其中 40 岁以下晋升职称的项目组成员			1
转入计划	为政府部门提供决策参考份数		0 份	经济效益 0 万元

资助项目统计数据表

资金开支归类情况

项目总资助经费 9 万元，其中财政资助经费 9 万元，联合资助经费 0

经费开支科目		预算数 (万元)			支出数 (万元)		计算依据和说明
		调整前	调整后	其中：财政经费	金额	其中：财政经费	
直接经费							
1	设备费	0	0	0	0	0	
2	材料费	1.7	2.3648	2.3648	2.358965	2.358965	
3	测试化验加工费	2.9	2.7352	2.7352	2.7352	2.7352	
4	燃料动力费	0	0	0	0	0	
5	会议/差旅/国际合作交流费	0.4	0	0	0	0	
6	出版/文献/信息传播/知识产权事务费	0.5	0	0	0	0	
7	劳务费	0.8	1.2	1.2	1.2	1.2	
8	专家咨询费	0	0	0	0	0	
9	其他支出	0	0	0	0	0	
间接经费							
1	间接经费	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	
	合计	9	9	9	8.994165	8.994165	

万元，自筹经费 0 万元。开支经费 8.994165 万元，结余经费

0.005835 万元。

项目负责人

财务部门

项目负责人承诺：

我所承担的项目（项目批准编号：LY19H030011 项目名称：蛛网膜下腔阻滞调节肠道微生物在炎症性肠病中的作用及机制研究）验收材料内容填写实事求是，数据详实。在今后的研究工作中，如有与本项目相关的成果，将标注“浙江省自然科学基金资助”，并在省自然科学基金委员会网络信息系统上持续补充。

项目负责人（签字）：

年 月 日

依托单位审核意见： 题验收。	同意结
依 年	托单位（公 章） 月 日
省自然科学基金委办公室审核意见：	
验收专家综合评价：	
浙江省自然科学基金委员会办公室 年 月 日	

（签字）（签章）年 月 日 年 月 日签字盖章页

(科技报告编号) 是否公开公开

研究工作总结（科技报告）

报告名称：蛛网膜下腔阻滞调节肠道微生态在炎症性肠病中

作用及机 俞欣

制研究报

告作者：浙江大学

编制单位：编制 2021-12-28

时间：

浙江省自然科学基金

基金（一般项目）

蛛网膜下腔阻滞调控肠道微生态在炎症性肠病
中的作用及机制研究

（项目编号：LY19H030011）

科技报告

项目负责人：俞欣

依托单位已审核

依托单位已审核

依托单位已审核

依托单位已审核

项目承担单位： 浙江大学 研究

2019 年 01 月-2021 年 12 月

期限：

二零二一年十二月

依托单位已审核

依托单位已审核

依托单位已审核

目 录

引言.....1

1. 研究背景和意
义.....1

2. 前期研究基
础.....4

3. 研究范围和目
标.....7

4. 研究思
路.....8

5. 研究方
案.....8 技术总结

报告.....10 试

验材料.....10

1.1 试验动
物.....10

1.2 试验主要试
剂.....10

1.3 试验主要仪

依托单位已审核

依托单位已审核

依托单位已审核

依托单位已审核

依托单位已审核

依托单位已审核

依托单位已审核

依托单位已审核

依托单位已审核

依托单位已审核

器.....	10
设计.....	12
2.1 试验动物.....	12
2.2 试验设计.....	12
2.3 样品的采集与制备.....	13
试验方法.....	14
3.1 蛛网膜下腔注射利多卡因方法.....	14
3.2 炎症性肠病（IBD）模型的建立.....	14
3.3 数据处理与统计分析.....	18
4.1 蛛网膜下腔阻滞有效缓解 DSS 诱导的炎症性肠病.....	18
4.2 蛛网膜下腔阻滞有效缓解 DSS 激活的肠道炎症反应.....	19
4.3 蛛网膜下腔阻滞具有肠屏障保护功能.....	21
4.4 蛛网膜下腔阻滞对 IBD 小鼠模型肠道菌群的影响.....	21
4.5 蛛网膜下腔利多卡因阻滞组小鼠共饲养减轻 DSS 诱导的结肠炎.....	22
4.6 蛛网膜下腔利多卡因阻滞组小鼠粪便微生物群移植减轻 DSS 诱导的结肠炎.....	23
4.7 蛛网膜下腔利多卡因阻滞组降低 IBD 小鼠去甲肾上腺素水平.....	24
结 论.....	

依托单位已审核

依托单位已审核

依托单位已审核

依托单位已审核

依托单位已审核

依托单位已审核

依托单位已审核

依托单位已审核

1 参考

文献.....2

附录 A 主要成果情

况..... 4

依托单位已审核

依托单位已审核

依托单位已审核

依托单位已审核

依托单位已审核

依托单位已审核

依托单位已审核

依托单位已审核

依托单位已审核

依托单位已审核

依托单位已审核

依托单位已审核

依托单位已审核

依托单位已审核

依托单位已审核

依托单位已审核

依托单位已审核

依托单位已审核

依托单位已审核

依托单位已审核

引言

1. 研究背景和意义

炎症性肠病(Inflammatory bowel disease, IBD)是一种涉及肠道菌群改变、遗传、免疫等多种因素的慢性肠道炎症病变,主要包括溃疡性结肠炎(Ulcerative colitis, UC)和克罗恩病(Crohn's disease, CD)。近年来,国内 IBD 的发病率一直呈上升趋势,但是由于其发病机制尚未完成清楚,迄今为止,仍没有特异性针对 IBD 的有效治疗手段,使其难以彻底治愈,严重影响了生命健康。随着肠道微生物基因组学的开展,人们对肠道微生物这一“被遗忘的器官”有了深刻的认识。大量研究证实肠道菌群失调和肠道上皮屏障功能受损引起的天然和获得性免疫反应失控是导致 IBD 发生发展重要的因素。目前的一些治疗手段如使用抗菌药物,调节饮食,植入益生菌,使用微生物代谢产物或免疫球蛋白等,大多是通过协调肠道微生物与宿主的相互作用来影响肠道屏障功能,调节机体免疫应答反应。因此调节肠道菌群紊乱,恢复宿主与肠道微生物之间的稳态已成为治疗 IBD 的新方向。

正常人体肠道中含有超过 1000 种以上的微生物,人类消化道直接与其和谐共生,构成肠道的微生物屏障,参与多种生理病理过程。稳定的微生物是健康的标志,而菌群失调会引起多种急性和慢性疾病。研究证实 IBD 患者的肠道菌群构成及代谢较正常人群发生了明显变化:致病菌拟杆菌和厚壁菌增多,而益生菌变形菌和放线菌减少;同时菌群多样性减少,稳定性降低。同时研究发现约有三分之一的 CD 病患者大肠埃希菌增加,而这些具有粘膜侵袭性的菌株能穿过粘膜屏障,侵入肠上皮细胞,刺激机体分泌大量炎症因子,加重疾病的发生和发展。申请人前期研究也有类似发现,与健康人群相比,活动性 IBD 患者大肠杆菌和拟杆菌增加,而双歧杆菌和普拉梭菌明显减少。以上研究均提示了肠道微生态失衡导致病菌过度生长,从而损伤肠道黏膜,使不易通过正常肠道组织的肠道细菌、毒素、食物等抗原成分吸收增加,同时致病菌分泌多种神经递质和炎症因子,激发一系列抗原特异性免疫反应,导致机体免疫失衡。而补充益生菌可以

调节肠黏膜免疫以及干扰炎症反应来减轻 IBD 的症状。

因此，维持肠道微生物的稳态，维护肠道微生物屏障、机械屏障和免疫屏障对 IBD 的治疗具有重要的意义。

肠道微生物的影响不仅仅局限于肠道，还可以通过肠道神经和中枢神经之间形成的双向交互系统-肠脑轴作用于大脑，从而对全身的代谢和行为产生影响。反过来，神经系统也通

过信号分子释放到肠道细胞影响肠道微生物群。已有研究证实外科手

术创伤引起去甲

肾上腺素(NE)进入肠腔后可引起铜绿假单胞菌的增殖导致脓毒血症。同时 NE 不仅增加大肠杆菌和其他革兰阴性菌的水平，还会可促进大肠杆菌粘附肠壁的能力，增加其毒力因子 K99 菌毛粘附素的表达以及激活鼠伤寒沙门氏菌毒力相关因子表达，从而促进细菌生长，并使机体对这些细菌易感。我们由此猜测下调中枢神经递质能够改善菌群组成。胸段硬膜外交感阻滞术能显著下调血浆儿茶酚胺浓度。也有研究报道发现炎症性肠病大鼠行胸段硬膜外交感神经阻滞能增加小肠灌注，减轻白细胞粘附改善微循环灌注，并且降低其死亡率。硬膜外麻醉局部交感阻滞是否通过下调儿茶酚胺浓度改善了肠道炎症?通过改善菌群还是免疫调节?目前尚不明确。为此，我们进行了以下预实验，对 DSS 引起的 IBD 小鼠提前行蛛网膜下腔交感阻滞，从小鼠的体重变化，大肠长度和炎症因子水平均显示，蛛网膜下腔注射利多卡因可以改善由 DSS 引起的炎症性肠病。并且小鼠肠道菌群种类和丰度更接近正常小鼠。DSS 组小鼠的致病菌丰度增多，而行蛛网膜下腔阻滞后可以缓解这一情况。同时相比于正常小鼠，小鼠蛛网膜下腔交感阻滞血液 NE 水平下降。预实验结果提示蛛网膜下腔部分交感神经阻滞可能通过下调血浆 NE 水平，从而调节肠道菌群，缓解炎症性肠病。基于此，申请人拟进一步通过蛛网膜下腔交

感阻滞小鼠粪便移植到 DSS 诱导的小鼠大肠中，观察小鼠大肠的炎症情况，进一步证实部分交感阻滞后通过改善肠道菌群的和谐共生，缓解 IBD。

正常的肠道黏膜屏障组成除了菌群组成的生物屏障，还包括机械屏障和免疫屏障。肠上皮细胞间紧密连接是构成肠机械屏障最重要的结构，对维持其完整性和发挥正常功能起重要作用。紧密连接是一个由多种蛋白及分子组成，具有多种功能的复合体，包括 claudin 蛋白，闭锁蛋白(occluding)，ZO 蛋白，连接黏附分子(JAM)等结构蛋白及各类连接蛋白。定植于肠道上皮层的益生菌可通过调节紧密连接蛋白和黏附连接蛋白，提高机械屏障的完整性。

如乳杆菌可以阻止大肠杆菌感染导致 claudin-1，JAM-1 和 ZO-1 的分散和紧密连接的弱化。

乳酸菌，双歧杆菌，唾液链球菌和嗜热芽孢杆菌可以预防由梭状芽孢杆菌引起 Occludin，

ZO-1 和 ZO-2 从外侧紧密连接细胞上分离，导致致病性的炎症性肠病。这些前期的研究均提示了肠道稳定的微生态对维持肠道黏膜屏障，免疫功能具有重要意义。最近的报道指出胸段硬膜外交感阻滞肠道内皮粘附分子以及 iNOS 的表达降低，促进紧密连接蛋白的表达，保护肠道黏膜屏障[14]。我们推测，蛛网膜下腔阻滞通过下调血浆 NE 浓度，不仅能改善肠道菌群组成，增加益生菌间接保护肠道机械屏障，还能促进紧密连接蛋白的表

达，直接保护肠道的机械屏障。

肠道微生态的稳定同时对肠内免疫系

统有着重要的作用。肠道免疫系统通过识别入侵

细菌的免疫原性和保持对肠道共生菌和食物抗原的耐受性精确地保持着肠道稳态。肠道稳态被打破所导致的肠道免疫紊乱在 IBD 的发生发展中起着重要作用，其中 Th1、Th2、Th17 等各种效应性细胞亚

群参与炎症反应，而调节性 T 细胞(regulatory T cell, Treg)可负向调节上述各种效应性 T 细胞的炎症反应。越来越多的研究表明 Tregs 缺乏或功能障碍可导致 IBD 的发生发展。CD 患者 Tregs 的表达显著减少，并且 Tregs 的数量在疾病活动期下降尤为明显，疾病缓解期则上升。Tregs 一方面可以迁移到炎症部位，在抗原提呈细胞的作用下激活从而抑制 CD4+T 及杀伤性 T 细胞的作用，另一方面可以通过分泌 TGF-B、IL-10 等因子及表达 CTLA-4 等分子发挥抑制免疫细胞的功能。因此，增加 IBD 患者 Tregs 的表达，对 IBD 的治疗有重要的意义。Foxp3 是控制 Tregs 发育和发展的关键转录因子之一，实验表明，在体内诱导初始 T 细胞表达 Foxp3 后可以出现 Treg 样的免疫抑制作用，Foxp3 是控制免疫抑制分子表达的关键因素。研究证实 NE 能在 mRNA 和蛋白水平上直接和精确调节体内 CD4+CD25+Treg 细胞 Foxp3 的表达。机体 NE 水平可能是影响 Tregs 数量的关键因素，NE 水平降低，能够增加 Tregs 的分化与表达，保护肠道的免疫屏障。由此推测通过蛛网膜下腔部分交感神经阻滞可以通过下调 NE 水平，增加 CD4+CD25+Treg 细胞 Foxp3 的表达，保护肠道免疫屏障。此外，肠道微生物本身和 Tregs 之间也存在互相作用，IBD 患者中重建某些肠道菌群可以纠正 Tregs 的失调和增值，而一些肠道共生菌如乳酸杆菌、双歧杆菌等能诱导肠道淋巴结产生 Tregs。在大鼠模型中也发现脆弱拟杆菌和梭状芽胞杆菌能诱导 Tregs 在结肠中的表达，表明肠道菌群失调在黏膜免疫反应及炎症的持续和放大效应中发挥重要作用通过蛛网膜下腔部分交感神经阻滞调节肠道菌群，调控 Tregs 表达具有肠道免疫调节作用。

基于以上研究背景和预实验结果，我们提出假设，蛛网膜下腔阻滞通过降低去甲肾上腺素释放可调控肠道主要菌群的组成和迁移，并且对肠道黏膜屏障的完整性和免疫屏障的功能

性具有保护作用。我们将采用 DSS 小鼠模型模拟炎症性肠病，观察蛛网膜下腔阻滞交感神经后肠道炎症的发展和变化;探索交感神经阻滞下调 NE 水平对肠道菌群组成和迁移的调控,对肠道上皮屏障功能的影响;以及调节肠道免疫功能的可能相关机制。

申请人拟进一步通过蛛网膜下腔交感阻滞小鼠粪便移植到 DSS 诱导的小鼠中，观察小鼠大肠的炎症改变，肠道菌群和谐共生情况。并在人体 IBD 样本中，进一步验证蛛网膜下腔阻滞通过降低机体

NE 缓解炎症性肠病。本研究聚焦肠脑轴，通过蛛网膜下腔交感阻滞来调节肠道菌群，保护肠道机械屏障和免疫免疫，为有效治疗炎症性肠病开拓新思路。

1、 本团队已建立小鼠炎症性肠病模型，并在此模型上研究了蛛网膜下腔交感阻滞对炎症性肠病小鼠体重和大肠长度变化。初步揭示了蛛网膜下腔利多卡因注射能增加炎症性肠炎小鼠体重和大肠长度（图 1）。有效下调炎症因子 IL-6 和 TNF- α 水平（图 2）。大肠炎症明显好转

图3)。

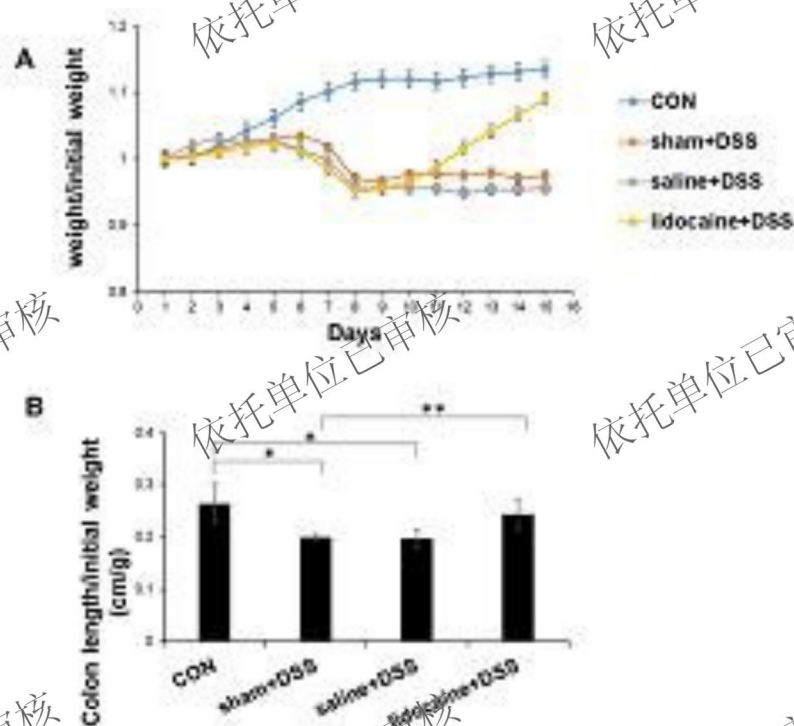


图 1

C57Bl/6 小鼠蛛网膜下腔给药后，用 DSS 诱导炎症性肠病，统计小鼠体重和大肠长度

。 A 为开始给药 DSS 后，小鼠体重变化。B 为小鼠大肠长度变化。*p<0.05，**p<0.01。CON 组 n=4; sham+DSS 组 n=4; saline 组 n=3; lidocaine 组 n=7。

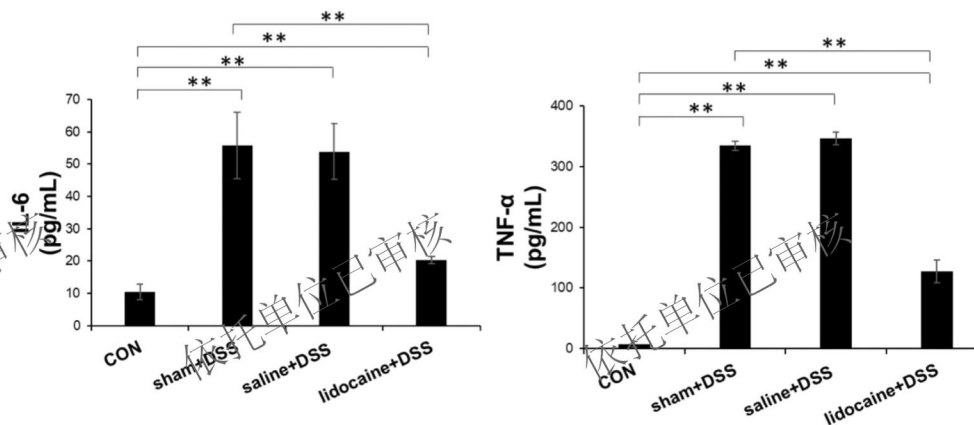


图 2 C57bl/6 小鼠蛛网膜下腔给药后，用 DSS 诱导炎症性肠病，检测炎症因子 IL-6 和 TNF-α 水平。* $p < 0.05$ ，** $p < 0.01$ 。CON 组 $n=4$ ；sham+DSS 组 $n=4$ ；saline 组 $n=3$ ；lidocaine

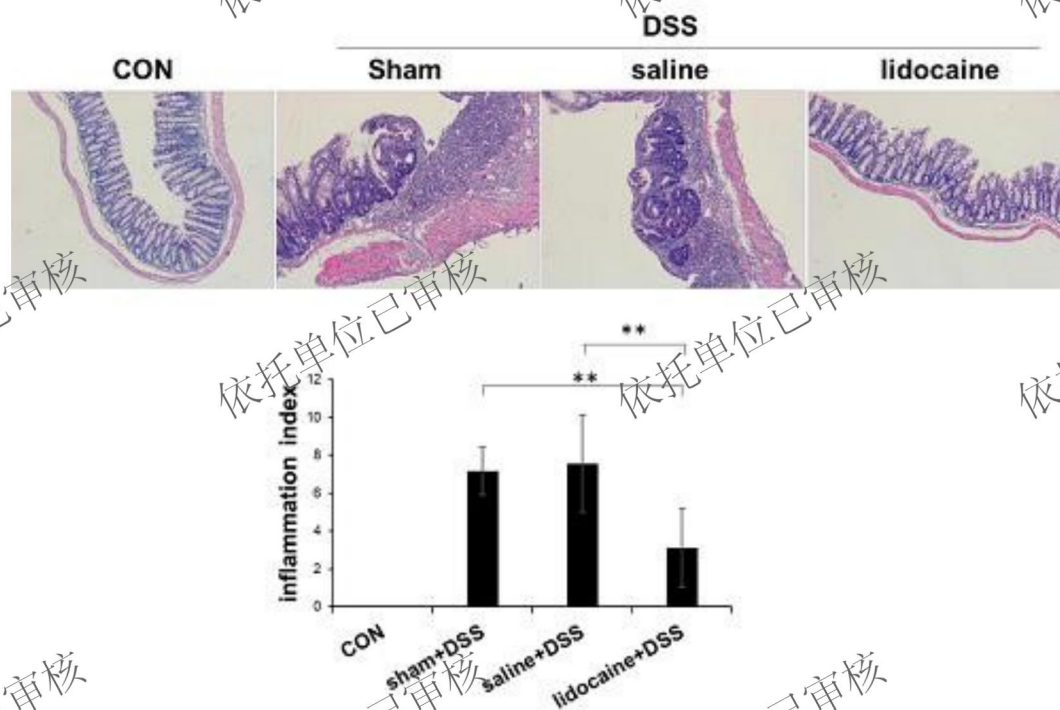


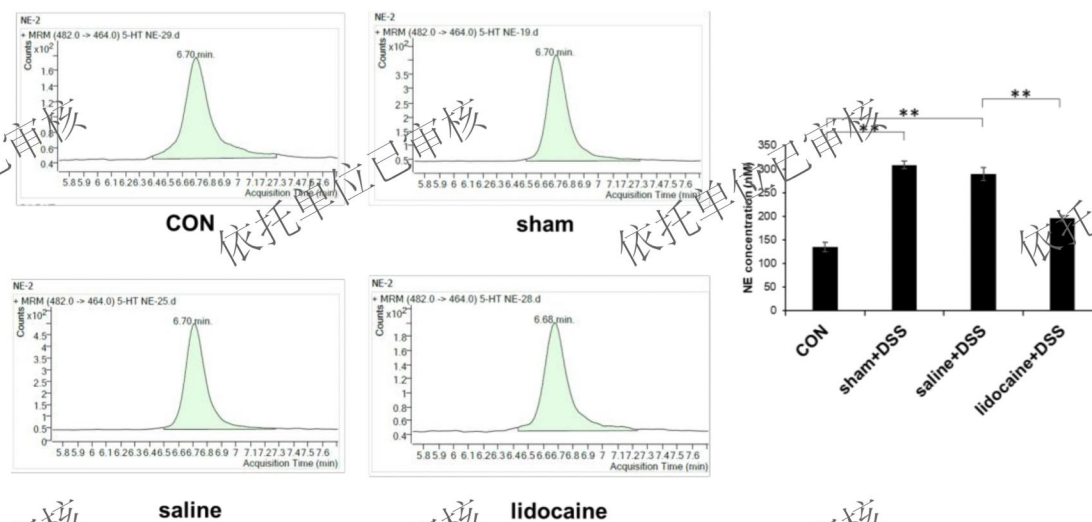
图 3 C57bl/6 小鼠蛛网膜下腔给药后，用 DSS 诱导炎症性肠病，对大肠组织做 HE 染色，并做炎症打分。

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 。CON 组 $n=4$; sham+DSS 组 $n=4$; saline 组 $n=3$;

lidocaine 组 $n=7$

2、 高效液相色谱-质谱联用检测四组小鼠血液中肾上腺素 (NE) 的水平。结果显示, 各组小鼠均能在 6.7min 左右出峰;通过标准曲线可以得到 NE 浓度可知, 在给药利多卡因组(第四组), 小鼠的 NE 水平相比于第二组小鼠(sham+DSS)降低, 并且存在统计学差异。

(图 4)。



C57bl/6 小鼠蛛网膜下腔给药后, 用 DSS 诱导炎症性肠病, 收集血液样本并处理后, 用 HPLC-MC 检测 NE 浓度。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 。CON 组 $n=4$; sham+DSS 组 $n=4$; saline 组 $n=3$; lidocaine 组 $n=7$ 。

3、 收集第一组(CON), 第三组(saline+DSS)和第四组 (lidocaine+DSS)的小鼠粪便, 提取肠道微生物的基因组 DNA, 设计并合成引物接头, PCR 扩增和纯化, Illumina PE250 文库制备和高通量测序。结果显示, 三组小鼠的肠道微生物的种类和丰度都产生了变化, 而图 5B 的 PCoA 分析显示, 三组肠道微生物样本组内相似度较高, 而组间存在较大差异 (图 5)。利多卡因小鼠肠道微生物种群中丰度水平上升 (图 6)。

依托单位已审核

依托单位已审核

依托单位已审核

依托单位已审核

依托单位已审核

依托单位已审核

依托单位已审核

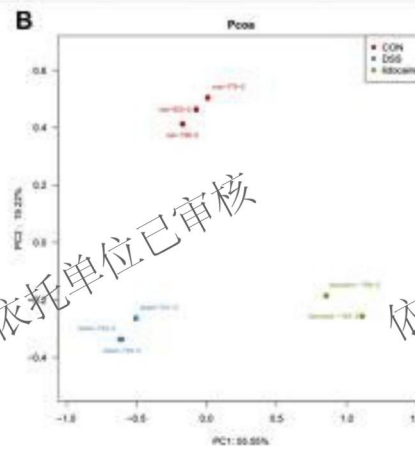
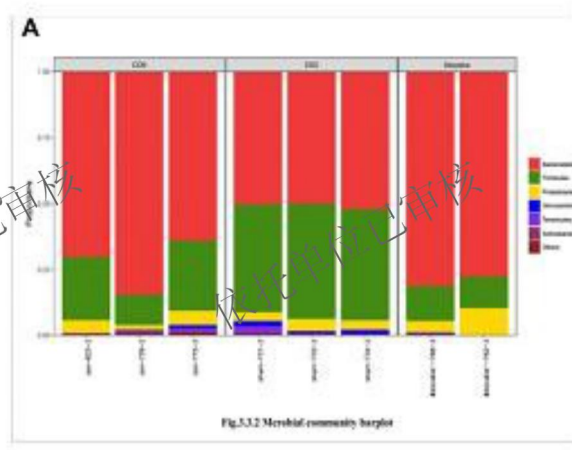


图 5 C57bl/6 小鼠提前蛛网膜下腔给药后，用 DSS 诱导炎症性肠病，收集小鼠粪便，基于 16s rRNA 微生物种群分析。A 为肠道微生物群落丰度柱状图; B 为肠道微生物 PCoA 分析。

依托单位已审核

依托单位已审核

依托单位已审核

依托单位已审核

依托单位已审核

依托单位已审核



图 6 在 DSS 诱导的炎症性肠病中，利多卡因给药后，丰度影响显著的肠道微生物种群

3. 研究范围和目标

依托单位已审核

依托单位已审核

依托单位已审核

依托单位已审核

依托单位已审核

依托单位已审核

依托单位已审核

1、研究范围

1) 蛛网膜下腔交感阻滞对小鼠炎症性肠病的作用研究

✧ 小鼠炎症性肠病模型的建立

✧ 蛛网膜下腔阻滞对炎症性肠炎小鼠体重、肠道炎症的影响

✧ 蛛网膜下腔阻滞对炎症性肠炎小鼠炎症因子的影响

✧ 蛛网膜下腔阻滞对炎症性肠病小鼠 Tregs 细胞的影响

✧ 蛛网膜下腔阻滞对炎症性肠病小鼠肠道菌群的影响

2) 蛛网膜下腔阻滞对小鼠炎症性肠病的相关机制

✧ 从蛛网膜下腔阻滞改变炎症性肠炎小鼠菌群组成和丰度探讨肠道菌群是炎症性肠病的重要发病机制之一

✧ 从蛛网膜下腔阻滞改变肾上腺素水平探讨交感神经系统影响炎症性肠病的发生发展

2、研究目标

1) 系统阐述炎症性肠病的病理生理和目前治疗的现状

2) 明确交感神经阻滞在炎症性肠病中通过肠道菌群的变化，在 IBD 发生发展中的作用

3) 发表 SCI 论文 1-2 篇

4. 研究思路

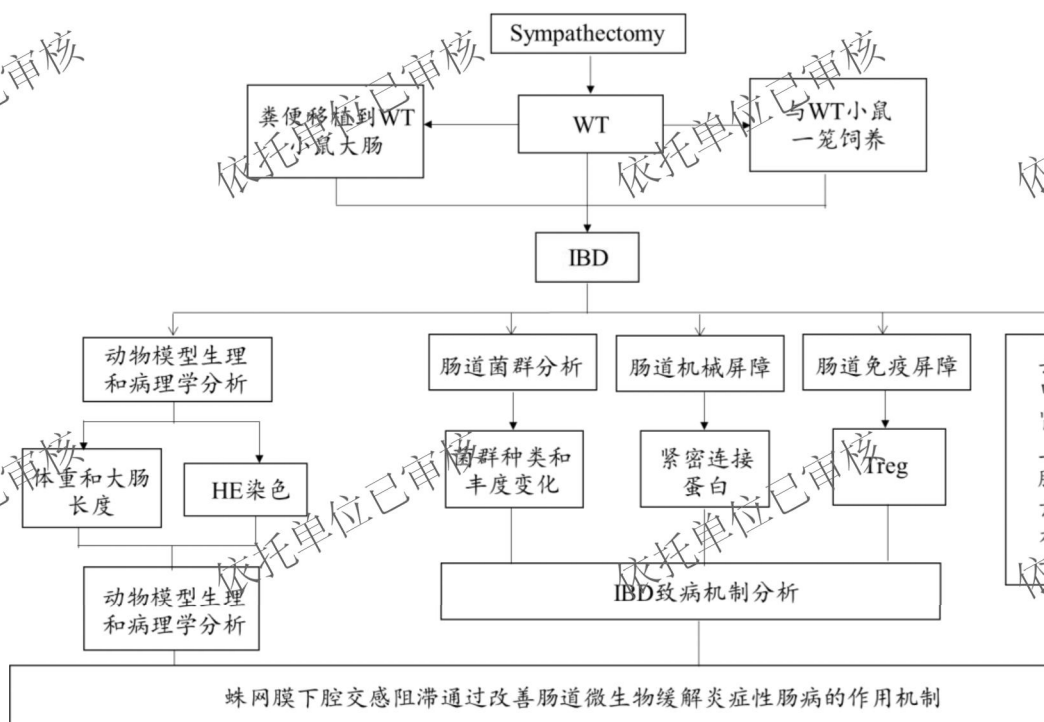


图 7
技术

本研
路线

究的
图

5. 研究方案

究方

案

1、IBD 动物模型建立^{[1][2]}

(1)小鼠体重跟踪检测，小鼠小肠和结肠长度测量^{[1][2]}

(2)HE 染色观察结肠组织形态学，肠道隐窝细胞和潘式细胞计数，炎症指数监测等。

2、蛛网膜下腔阻滞对 IBD 发生发展的影响

(1)蛛网膜下腔阻滞对肠道微生态的影响:检测肠道主要菌群的组成和丰度改变。

(2)蛛网膜下腔阻滞对肠道上皮屏障功能的影响:检测肠道通透性，肠粘膜 claudin-1 和 occluding 的完整性，肠壁组织 iNOS 表达水平。

(3)蛛网膜下腔阻滞对肠道免疫屏障功
影响：检测 Tregs 水平，肠壁粘膜

能的

CD4+/CD25+/Foxp3+ Tregs，细胞因
平。

子水

3、粪移植和同笼饲养后对 IBD 影

响

(1)IBD 小鼠炎症指标的检测

(2)小鼠肠道上皮屏障功能的检测

(3)小鼠肠道免疫屏障功能的检测[16]

技术总结报告

试验材料

1.1 试验动物

8 周龄 C57/BL6J 雄性小鼠均购于上海斯莱克动物实验中心，动物实验均遵循实验动物福利操作技术规范。

1.2 试验主要试剂

1.2.1 炎症性肠病模型建立相关试剂

葡聚

糖硫

酸钠

(SIGMA, 美国), 盐酸利多卡因注射液(卓峰制药有限公司, 中国), 5 氨基水杨酸
(都莱生物, 中国)。

1.2.2 肠道渗透性检测相关试剂

FITC-dextran (新介生物, 中国),
0.9 %氯化钠。

1.2.3 外周血单核细胞检测 CD4+/CD25+/Foxp3+Tregs 相关试剂

Transcription Factor Buffer Set (Fix/Perm Buffer, Perm wash)、Stain Buffer FBS、 Ms CD4
FITC RM 4-5、Ms CD25 PE PC61、Lysing Buffer 10×Concentrate (BD Pharmingen, 美国),
ANTI-MOUSE/RAT FOXP3 (ebioscience, 美国)。

1.2.4 ELISA 检测血浆中炎性因子相关试剂

小鼠白介素 6 (IL-6)、白介素 1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) ELISA 试剂盒(江苏酶标生物科技有限公司, 中国), 细胞毒性 T

淋巴细胞相关蛋白 4 (CTLA-4) ELISA 试剂盒(博士德生物, 中国)。

1.2.5 HE 染色相关试剂

无水乙醇、二甲苯、中性树胶(国药集团化学试剂有限公司), 苏木素染液、促蓝液、伊

1.2.6 结肠扫描电镜检查相关试剂

红染液(华安生物, 杭州)。

2.5%戊二醛、乙醇、0.1 M pH 7.0 磷酸溶液缓冲液(国药集团化学试剂有限公司, 中国),
1% 锇酸溶液(SPI-CHEM, 美国)。

1.3 试验主要仪器

1.3.1 炎症性肠病模型建立相关仪器小鼠剃毛机(3303, 博睿达, 中国), 胰岛素注射器
(舒锐, BD, 美国)。

1.3.2

肠道

渗透

器

性检

测相

关仪

多功能酶标仪（Multifunctional microplate reader SpectraMax M5，Molecular Devices，美国），

96孔板（3603，Corning costar，美国）。

1.3.3 外周血单核细胞检测 CD4+/CD25+/Foxp3+Tregs 相关仪器

多式流式细胞仪（LSRFortessa，BD，美国），低温高速离心机（Eppendorf-5417R，Eppendorf，德国）。

1.3.4 ELISA 检测血浆中炎性因子相关仪器

多功能酶标仪（Multifunctional microplate reader SpectraMax M5，Molecular Devices，美国），生化培养箱（SHP-100，三发，中国）。

1.3.5 HE 染色相关仪器脱水机（EXCELSIOR AS，Thermo，美国），包埋机（EG1150H，上海徕卡仪器有限公司，中国），病理切片机（RM2235，上海徕卡仪器有限公司，中国），冻台（HI1210，上海徕卡仪器有限公司，中国），组织摊片机（HI1210，上海徕卡仪器有限公司，中国），烤箱

（XMTD-8222，上海精宏仪器有限公司，中国），载玻片及盖玻片（10212432C，江苏世泰实验器材有限公司，中国），倒置荧光显微镜（Leica DM IL LED FLUO，上海徕卡仪器有限公司，中国），成像系统（Leica DFC450C，上海徕卡仪器有限公司，中国）。

1.3.6 结肠扫描电镜检查相关仪器

临界点干燥仪（HCP-2，Hitachi，日本），扫描电镜（SU-8010，Hitachi，日本）。

1.3.7 结肠透射电镜检查相关仪器超薄切片机（EM UC7，LEICA，德国），透射电镜（H-7650，Hitachi，日本）。

计

2.1 试验动物

选取 50 只 8 周龄 C57/BL6J 雄性小鼠，均购于上海斯莱克动物实验中心，动物实验均遵循实验动物福利操作技术规范。分笼饲养于相对湿度 48%-80%，温度 $24\pm5^{\circ}\text{C}$ 的 12 小时昼夜光照节律的房间，提供自由饮水。随机分成 5 组，每组 10 只，实验总共 4 周，第一、二周为麻醉期，第三周为造模期，最后一周为观察期，观察 7 天后处死小鼠。在整个实验期间各组小鼠分别做不同的处理。

2.2 试验设计

饲养一周后，开始正式试验，在整个实验期间各组小鼠分别做不同的处理（图 2-1 和表 2-1）。

- (1) 正常组 (CON)：整个实验阶段，该组小鼠饲料和饮水正常供应，不做任何处理。
- (2) 造模组 (saline+DSS)：在麻醉期，造模组小鼠蛛网膜下腔每隔一天注射生理盐水，饲料和饮水正常供应；造模期间，该组小鼠饲料正常，饮用水为 2% DSS 水溶液，随后撤去 DSS 换成正常饮用水再观察一周。
- (3) 利多卡因组 (lidocaine+DSS)：在麻醉期，利多卡因组小鼠蛛网膜下腔每隔一天注射 2% (0.8 ug/uL) lidocaine，饲料和饮水正常供应；造模期间，该组小鼠饲料正常，饮用水为 2% DSS 水溶液，随后撤去 DSS 换成正常饮用水再观察一周。
- (4) 5-氨基水杨酸组 (5-ASA+DSS)：在麻醉期，利多卡因组小鼠每天灌胃 (200 mg/kg) 5-ASA，饲料和饮水正常供应；造模期间，该组小鼠饲料正常，饮用水为 2% DSS 水溶液，随后撤去 DSS 换成正常饮用水再观察一周。

整个实验阶段，小鼠自由采食，自由饮水。从灌胃 DSS 开始每天称量各组小鼠体重和采食量，观察便血情况。

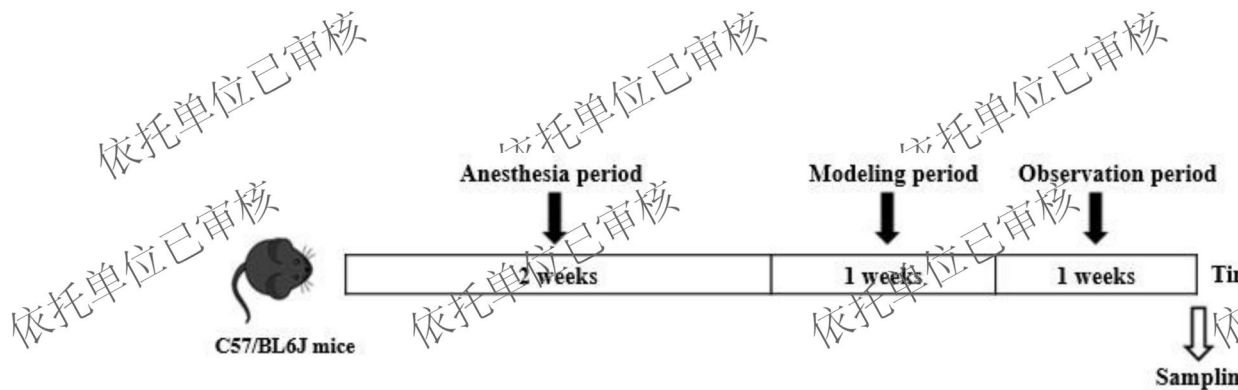


图 2-1 实验时间安排

	麻醉期	造模期	观察期
CON	饲料和饮水正常		
saline+DSS	蛛网膜下腔每隔一天注射生理盐水	饲料正常， 2% DSS 自由饮用	饲料和饮水正 常
lidocaine+DSS	蛛网膜下腔每隔一天注射 lidocaine		
5-ASA+DSS	每天灌胃 5-ASA		

表	2-1	实验
分组	表	
图	2-2-1	试验
设计	示意	图

2.3 样品的采集与制备

2.3.1 样品采集

对小鼠采用摘除眼球采血，随后采用颈椎脱臼法处死小鼠。采集小鼠结肠样本，置于液氮中，置于-80℃保存。

2.3.2 全血制备

小鼠眼球摘除后，收集血样于抗凝管中，用于调节性 T 细胞的流式检测。

2.3.3 血清制备

小鼠眼球摘除后，收集血样于促凝管中，常温静置 2 h 后，12000 rpm 离心 5 min，小心吸取上清并转移至 1.5 mL 离心管，置于-80℃保存，用于肠道渗透性因子检测。检测及 ELISA 炎症因子。

2.3.4 组织切片制备

切取部分结肠组织，置于 4 %多聚甲醛溶液中固定过夜，石蜡包埋，用于 HE 染色观察结肠组织形态学。

2.3.5 电镜样品制备

切取部分结肠组织，置于 2.5 %戊二醛溶液中固定过夜，用于扫描电镜及透射电镜的观察。

试验方法

3.1 蛛网膜下腔注射利多卡因方法

小鼠用异氟烷气体麻醉后，将其俯卧平台，在腰椎段剃毛，给针时有中空感，将 125 μL 0.8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 利多卡因垂直注射于蛛网膜下腔，随后缝合伤口。（蛛网膜下腔: 蛛网膜下腔是在脊髓的蛛网膜和软脊膜之间有一宽大的间隙。腰部最大，富含脑脊液，腰椎穿刺术一般在第 3~4 或第 4~5 腰椎间进行，此处不可能伤至脊髓，长的马尾神经根游动于脑脊液内，也不易刺伤，是腰穿的安全部位）。

3.2 炎症性肠病（IBD）模型的建立

五组试验小鼠，除 CON 组外，其余四组都需要进行 DSS 诱导的炎症性肠病模型的建立。在实验过程的第三周，配置 2 %的 DSS 水溶液，给予四组小鼠，让其自由饮用 7 天后，撤去 DSS 水溶液，改为蒸馏水饮用 7 天。从灌胃 DSS 开始每天称量各组小鼠体重和采食量，观察便血情况。

3.2.1 疾病活动指数（disease activity index, DAI）评分

实验过程中每日称量体重并计算体重下降率，观察血便情况及大便性状。按参考文献方法^[1]给每只小鼠进行 DAI 评分。实验过程中同时观察小鼠进食、饮水和活动情况等。

表 2-2 DAI 评分标准

评分	体重下降（%）	肉眼血便	大便性状
0	0	正常	正常
1	0.1-5	少量	松散
2	5-10	多见血液	轻度腹泻
3	> 10	全部	腹泻

Table 2-2 Standard of DAI

3.2.2 结肠组织病理学观察及评分

结肠组织委托杭州华安生物科技有限公司做切片并

HE 染色。

- (1) 取材：新鲜组织固定于 4 %多聚甲醛 24 h 以上。将组织从固定液取出在通风橱内用手手术刀将目的部位组织修平整，将修切好的组织放入写有对应编号的脱水盒内；
- (2) 脱水：将脱水盒放进吊篮里于脱水机内依次梯度酒精进行脱水。75 %酒精 2 h，85 % 酒精 2 h，90 %酒精 2 h，95 %酒精 1 h，无水乙醇 I 1 h，无水乙醇 II 1 h，二甲苯 I 45 min，二甲苯 II 45 min，蜡 I 1 h，蜡 II 1 h，蜡 III 1 h；
- (3) 包埋：将浸好蜡的组织于包埋机内进行包埋。先将融化的蜡放入不锈钢包埋模具，待蜡凝固之前将组织从脱水盒内取出按照包埋面的要求放入不锈

钢包埋模具。于冻台冷却，蜡凝固后将蜡块从不锈钢包埋模具中取出并修整蜡块；

(4) 将修整好的蜡块置于石蜡切片机上切片，片厚 4 μ m。切片漂浮于摊片机 45℃ 温水上将组织展平，用载玻片将组织捞起，并放进 65℃ 烘箱内烤片；

(5) 石蜡切片脱蜡至水：依次将切片放入二甲苯 I 20 min，二甲苯 II 20 min，无水乙醇 I 10 min，无水乙醇 II 10 min，95 %酒精 5 min，90 %酒精 5 min，80 %酒精 5 min，70 %酒精 5 min，蒸馏水洗；

(6) 苏木素染细胞核：切片入冰冻苏木素染 3-8 min，自来水洗，促蓝液促蓝，流水冲洗。

(7) 伊红染细胞质：切片入伊红染液中染色 1-3 min。

(8) 脱水封片：将切片依次放入 95 %酒精 I 5min，95%酒精 II 5 min，无水乙醇 I 5min，无水乙醇 II 5 min，二甲苯 I 5 min，二甲苯 II 5 min 中脱水透明，将切片从二甲苯拿出来稍晾干，中性树脂封片。

(9) 显微镜观察组织形态学，并采用 Fedorak^[2]组织学积分标准进行组织学评分（表 2-3）

表 2-3 组织学损伤评分标准

Table 2-3 Criteria for histological damage score

评分	炎症	病变深度	隐窝破坏	病变范围
0	无	无	无	/
1	轻度	粘膜下层	基底 1/3 隐窝破坏	1%-25%
2	重度	肌层	基底 2/3 隐窝破坏	26%-50%
3	-	浆膜层	仅有完整表面上皮	51%-75%
4	-	/	全部隐窝和上皮被破坏	76%-100%

3.2.3 扫描电镜观察小鼠结肠表面结构

(1) 样品在 2.5 %戊二醛溶液中，4℃固定过夜；

(2) 倒掉固定液，用 0.1 M，pH 7.0 的磷酸缓冲液漂洗样品三次，每次 15 min；

(3) 用 1 %的锇酸溶液固定样品 1-2 h；

(4) 小心取出钨酸废液，用 0.1 M, pH 7.0 的磷酸缓冲液漂洗样品三次，每次 15 min；

(5) 用梯度浓度（包括 30 %，50 %，70 %，80 %，90 %和 95 %

六种浓度）的乙醇溶液对样品进行脱水处理，每种浓度处理 15 min，再用 100 %的乙醇处理一次，20 min，最后，再换新的 100 %乙醇，样品放置在 100 %乙醇里；

(6) 临界点干燥。在临界点干燥仪中进行干燥；

(7) 镀膜，观察。处理好的样品在扫描电镜中观察。

3.2.4 透射电镜观察结肠上皮细胞超微结构

(1) 样品在 2.5 %戊二醛溶液中，4 °C固定过夜；

(2) 倒掉固定液，用 0.1 M, pH 7.0 的磷酸缓冲液漂洗样品三次，每次 15 min；

(3) 用 1 %的钨酸溶液固定样品 1-2 h；

(4) 小心取出钨酸废液，用 0.1 M, pH 7.0 的磷酸缓冲液漂洗样品三次，每次 15 min；

(5) 用梯度浓度（包括 30 %，50 %，70 %，80 %，90 %和 95 %六种浓度）的乙醇溶液对样品进行脱水处理，每种浓度处理 15 min，再用 100 %的乙醇处理一次，20 min，最后过度到纯丙酮处理 20 min；

(6) 用 Spurr 包埋剂与丙酮的混合液（V/V=1/1）处理样品 1 h；

(7) 用 Spurr 包埋剂与丙酮的混合液（V/V=3/1）处理样品 3 h；

(8) 室温下，纯包埋剂处理样品过夜；

(9) 将经过渗透处理的样品包埋起来，70 °C加热过夜，即得到包埋好的样品；

(10) 样品在超薄切片机中切片，获得 70-90 nm 的切片；

(11) 切片经柠檬酸铅溶液和醋酸双氧铀 50 %乙醇饱和溶液各染色 5-10 min；

(12) 在透射电镜中观察。

3.2.5 肠道渗透性检测

(1) 各组小鼠在处死前禁食，以 0.6 mg/g FITC-dextran 灌胃 4 h 后采血并分离血清；

(2) 将 FITC-dextran 制备成不同浓度的标准品，分别为 0，0.02，

0.04, 0.06, 0.08, 0.1,

0.12, 0.14 mg/mL。随后各吸取 50 μ L 加入黑色平底 96 孔板中, 每个标准品做三个重复;

(2) 将待测样品稀释 10 倍后, 各吸取 50 μ L 加入黑色平底 96 孔板中, 每个标准品做三个重复;

(3) 将标准品和待测样品在 490 nm 波长下比色, 记录吸光值;

(4) 以标准品 FITC-dextran 浓度 (mg/mL) 为横坐标, 吸光值为纵坐标, 绘出标准曲线;

(5) 根据所测样品的吸光值, 在标准曲线上即可查得相应的 FITC-dextran 浓度 (mg/mL), 乘以样品稀释倍数即为样品中 FITC-dextran 实际浓度 (mg/mL)。小鼠

血清中 FITC-dextran 的荧光强度与其肠道的通透性呈正相关。

3.2.6 血清中炎症因子的测定

采用 ELISA 试剂盒对制备好的血清样品进行 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 和 CTLA-4 细胞因子水平的检测。将血浆和标准品加样到用目的细胞

因子抗体包被了的酶标板上, 每个标准品和血浆样本至少做三孔。根据试剂盒流程, 用酶标仪测定 OD 值, 并计算血浆标本中炎症相关因子的浓度。

(1) 标准品稀释: 150 μ L 的原倍标准品加入 150 μ L 标准品稀释液得到 5 号标准品; 150

μ L 的 5 号标准品加入 150 μ L 标准品稀释液得到 4 号标准品;

150 μ L 的 4 号标准品加入 150 μ L 标准品稀释液得到 3 号标准

品; 150 μ L 的 3 号标准品加入 150 μ L 标准品稀释液得到 2 号

标准品; 150 μ L 的 2 号标准品加入 150 μ L 标准品稀释液得到

1 号标准品;

(2) 加样: 分别设空白孔 (空白对照孔不加样品及酶标试剂, 其余各步操作相同)、标准孔、待测样品孔。在酶标包被板上标准品准确加样 50 μ L, 待测样品孔中先加样品稀释液 40 μ L, 然后再加待测样品 10 μ L (样品最终稀释度为 5 倍)。加样将样

品加于酶标板孔底部, 尽量不触及孔壁, 轻轻晃动混匀;

(3) 温育: 用封板膜封板后置 37 $^{\circ}$ C 温育 30 min;

(4) 配液: 将 30 倍浓缩洗涤液用蒸馏水 30 倍稀释后备用;

(5) 洗涤: 小心揭掉封板膜, 弃去液体, 甩干, 每孔加满洗涤液,

静置 30 s 后弃去，如此重复 5 次，拍干；

(6) 加酶：每孔加入酶标试剂 50 μ L，空白孔除外。

(7) 温育：操作同步骤 (3)；

(8) 洗涤：操作同步骤 (5)；

(9) 显色：每孔先加入显色剂 A 50 μ L，再加入显色剂 B 50 μ L，

轻轻震荡混匀，37 $^{\circ}$ C 避光显色 10 min；

(10) 终止：每孔加终止液 50 μ L，终止反应（此时蓝色立转黄色）；

(11) 测定：以空白孔调零，450 nm 波长依序测量各孔的吸光度（OD 值）。测定应在加终止液后 15 min 以内进行。

3.2.7 外周血单核细胞检测 CD4⁺/CD25⁺/Foxp3⁺Tregs

(1) 将 CON 组全血分为五组，分别为 blank 组、CD4 组、CD25 组、Foxp3 组、ALL 组，用于确定与荧光素匹配的检测通道，每组先加入 100 μ L 全血，随后 CD4 组及 ALL 组加入

1 μ g CD4 抗体，CD25 组及 ALL 组加入 1 μ g CD25 抗体；

(2) 命名三个 ALL 组，并分别加入 DSS 组、lidocaine+DSS 组、5-ASA+DSS 组 100 μ L 全血，随后各个 ALL 组加入 1 μ g CD4 抗体及 1 μ g CD25 抗体；

(3) 步骤 (1) (2) 中的每管样品离心混匀后室温避光 15 min；

(4) 每管样品中加入 2 mL 1 $\times$ Lysing Buffer，离心混匀，室温避光 15 min；

(5) 300g 离心 5 min，弃上清；

(6) 每管样品加入 1 mL PBS 重悬，300g 离心 5 min，弃上清；

(7) 重复上述步骤 (4) (5) (6)；

(8) 每管样品加入 2 mL 固定剂 Fix/Perm Buffer，离心混匀，室温固定 30 min；

(9) 450g 离心 5 min，弃上清；

(10) 每管样品加入 2 mL Perm wash，离心混匀，室温破膜 30 min；

(11) 450g 离心 5 min, 弃上清;

(12) Foxp3 组及四个 ALL 组分别加入终浓度为 0.01 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ Foxp3 抗体 100 μL , 其中

Foxp3 抗体用 1 $\times$ Perm wash 稀释配制, 离心混匀后室温避光 40 min;

(13) 每管样品加入 1 mL PBS 重悬, 300g 离心 5 min, 弃上清;

(14) 重复上述步骤 (13);

(15) 每管充分洗涤后混匀于 300 μL Stain Buffer FBS 溶液中;

(16) 制备好的标本用于流式细胞仪检测。

3.3 数据处理与统计分析

采用 SPSS 16.0 软件中独立样本 T 检验法进行两组数据分析。当 $p < 0.05$ 时, 表示差异显著, 图表中标注为“*”; 当 $p < 0.01$ 时, 表示差异极显著, 图表中标注为“**”。所有结

果均由 GraphPad Prism 5.0 软件制作。

试验结果与讨论

4.1 蛛网膜下腔阻滞有效缓解 DSS 诱导的炎症性肠病

C57BL/6 小鼠饮水中给予 2%DSS 一周, 建立急性结肠炎小鼠模型。分三组, 分别给予结肠炎小鼠蛛网膜下腔利多卡因阻滞、蛛网膜下腔生理盐水注射和口服 5-氨基水杨酸 (5-ASA) (阳性对照组), 直到七天后实验结束。具体实验方案如图 1A 所示。DSS 诱导的结肠炎小鼠表现出 DAI 水平升高, 体重显著减轻, 结肠缩短, 直肠出血, 粪便稠度降低。相反, 蛛网膜下腔利多卡因阻滞或 5-ASA 治疗的结肠炎小鼠在体重 (图 1B)、DAI 评分 (图

1C) 和结肠长度 (图 1D) 方面有明显改善。DSS 处理小鼠结肠组织

的 H&E 染色图像显示出明显的肠损伤, 包括隐窝缺失、刷状缘不连续和管腔增大。蛛网膜下腔利多卡因阻滞明显改善了这些损伤征象, 它通过限制多灶性炎症保护结肠粘膜结构 (图 1E-F)。扫描电镜观察

显示, 结肠炎小鼠微绒毛变短、不均匀, 排列紊乱。有趣的是, 利多卡因蛛网膜下腔阻滞

组的

肠腔

微绒

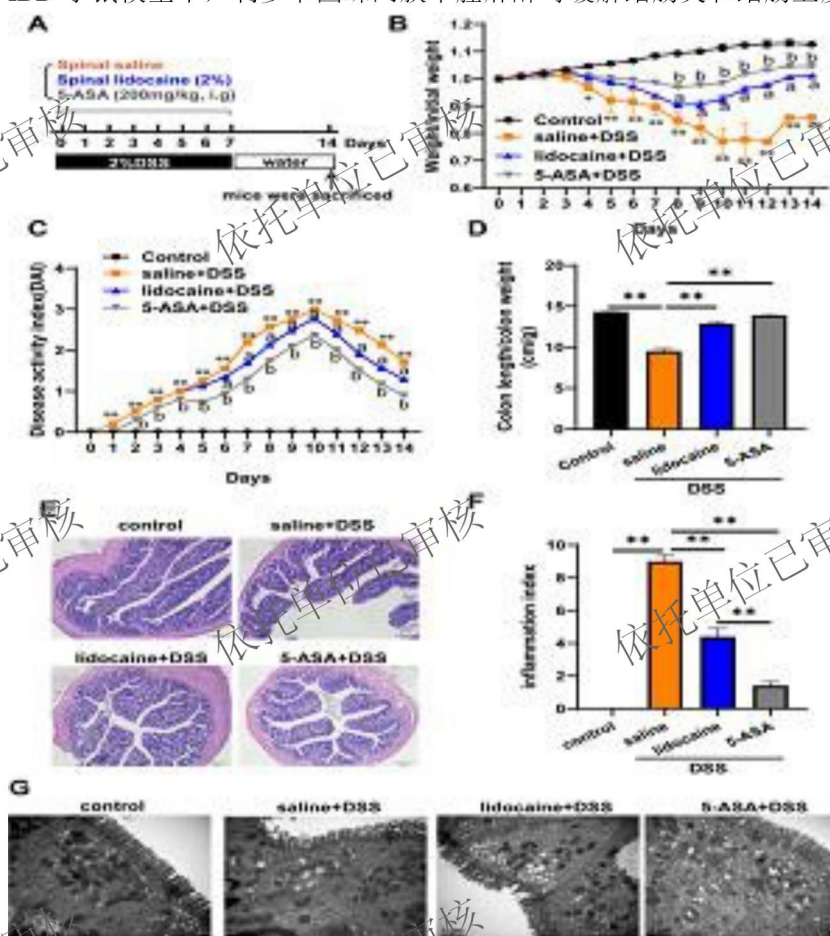
毛比

生理

盐水

组多（图 1G）。综上所述，这些结果表明，在 DSS 诱导的

IBD 小鼠模型中，利多卡因蛛网膜下腔麻醉可缓解结肠炎和结肠上皮损伤的症状。



4.2 蛛网膜下腔阻滞有效缓解 DSS 激活的肠道炎症反应

为了更好地了解蛛网膜下腔阻滞对结肠炎的缓解作用，本实验检测细胞因子和免疫细胞。

在结肠炎小鼠中，ELISA 分析显示血浆中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的水平显著高于对照小鼠

（图 2A-C）。5-ASA 组的细胞因子水平低于蛛网膜下腔生理盐水+DSS 组。有趣的是，利多卡因蛛网膜阻滞显著抑制 DSS 诱导结肠炎小鼠血浆中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的表达（图 2A-C）。同时，通过 qRT-PCR 检测细胞因子的转录水平，结果显示利多卡因蛛网膜阻滞降低了 DSS 诱导结肠炎小鼠的 IL-1 β 、IL-6 和 iNOS 的 mRNA 水平（图 2D、2G、2J）。

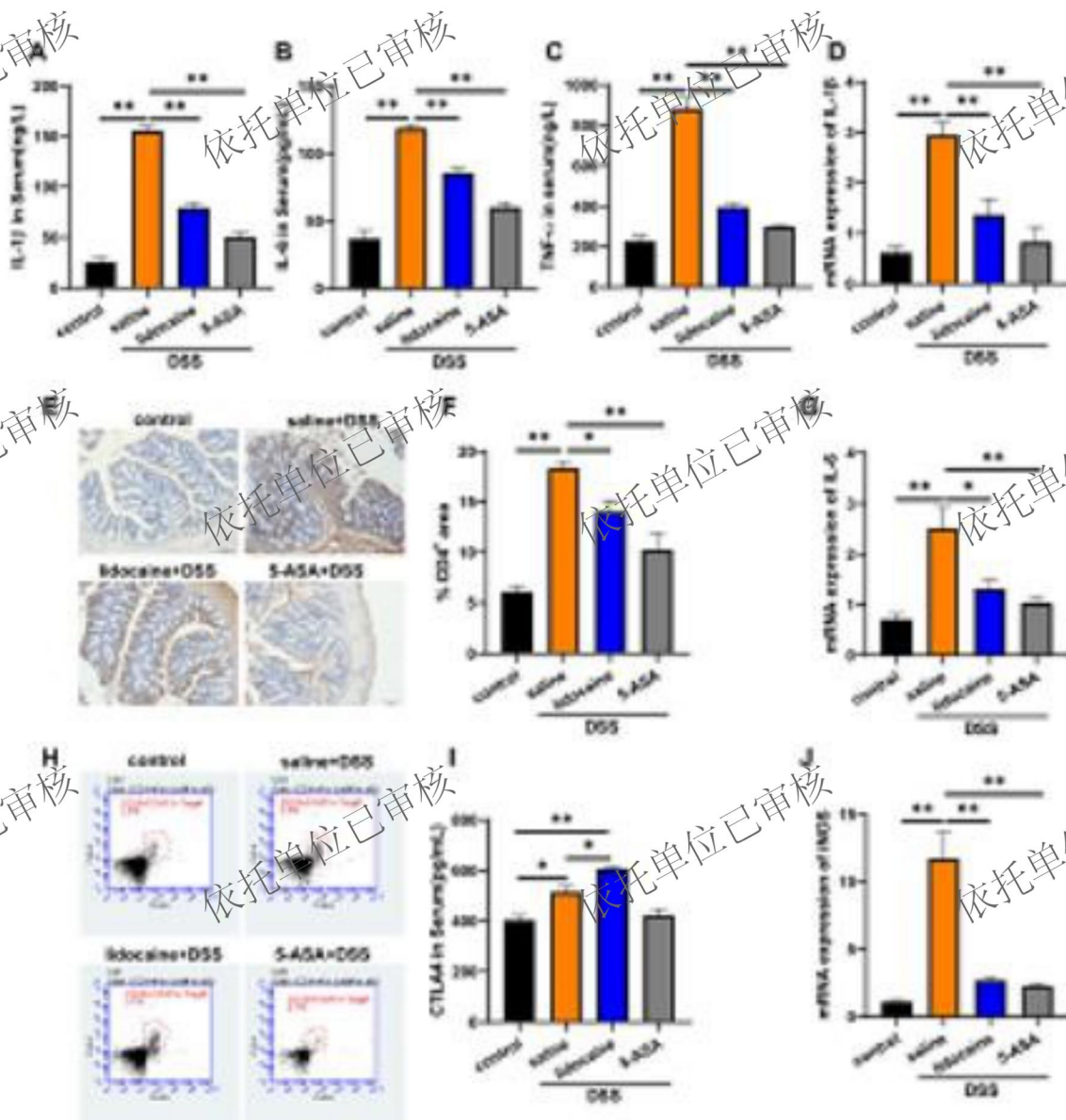
CD4⁺/CD25⁺/FoxP3⁺Tregs 和 CTLA4 细胞在维持肠道免疫中起着重要作用。我们把重点

放在这些免疫细胞上。IHC 分析表明，DSS 诱导的结肠炎中 CD4⁺T

细胞的浸润面积显著增加，利多卡因蛛网膜阻滞或 5-ASA 治疗显著抑

制了

CD4⁺T 细胞的产生（图 2E 和 F）。重要的是，流式细胞术分析显示利多卡因蛛网膜阻滞增加 Treg 细胞表达（图 2H），从而引起 T 淋巴细胞比例的变化。当我们测定血清中 CTLA4 水平时，也获得了类似的结果。利多卡因+DSS 组的 CTLA4 血清水平高于生理盐水+DSS 组（图 2I）。总之，这些数据表明利多卡因蛛网膜阻滞可能下调促炎细胞因子，上调 CTL4 和 CD4⁺/CD25⁺/Foxp3⁺Tregs 水平，有效减轻 DSS 诱导的炎症活动。



4.3 蛛网膜下腔阻滞具有肠屏障保护功能

为了检测肠道屏障功能，我们首先检测了肠道通透性。利多卡因蛛网膜阻滞后，结肠炎小鼠血清中的 FITC 葡聚糖浓度显著降低，表明肠道物理屏障功能增强（图 3A）。细胞间

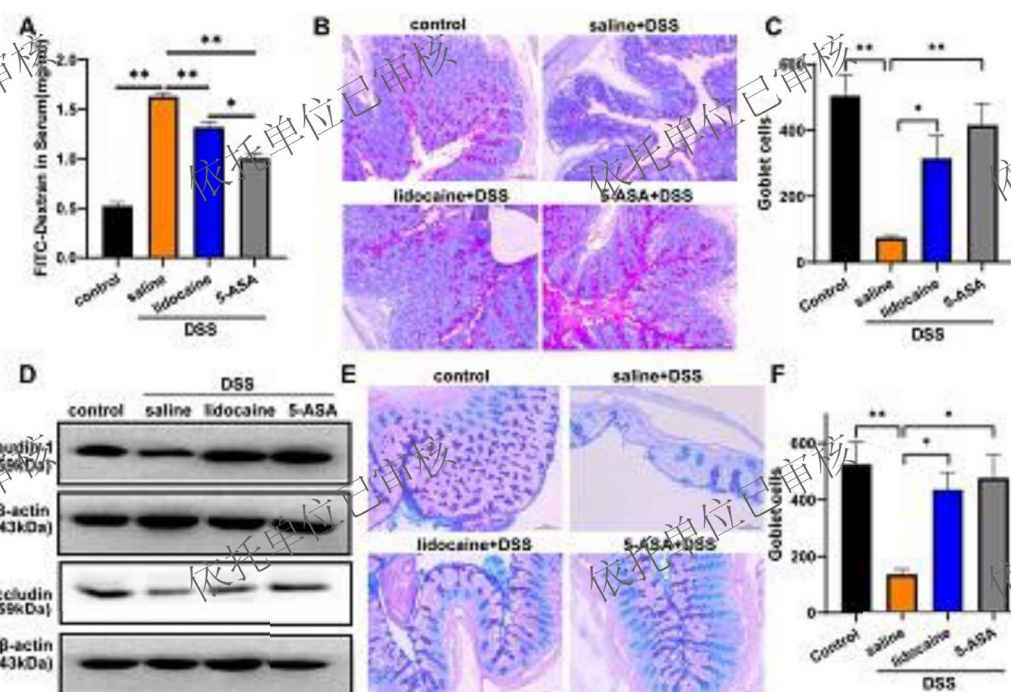
紧密

连接

(TJs) 的完整性是细胞通透性的关键决定因素, 对维持上皮屏障功能非常重要。

Western blot 分析显示, DSS 组中两种具有代表性的 TJ 蛋白 claudin-1 和 occludin 显著低于对照组 (图 3D)。然而, 在阳性对照 5-ASA 组中, 利多卡因蛛网膜下腔阻滞逆转了 claudin-1 和 occludin 的水平。杯状细胞分泌凝胶状粘蛋白, 润滑和保护肠道。AB-PAS 染色显示,

DSS 处理后, 中性 (图 3B 和 C) 和酸性 (图 3E 和 F) 粘蛋白明显减少。利多卡因蛛网膜阻滞显著增加粘蛋白显。总之, 这些结果表明, 在 DSS 诱导的 IBD 小鼠模型中, 利多卡因蛛网膜阻滞可以保护肠屏障功能。



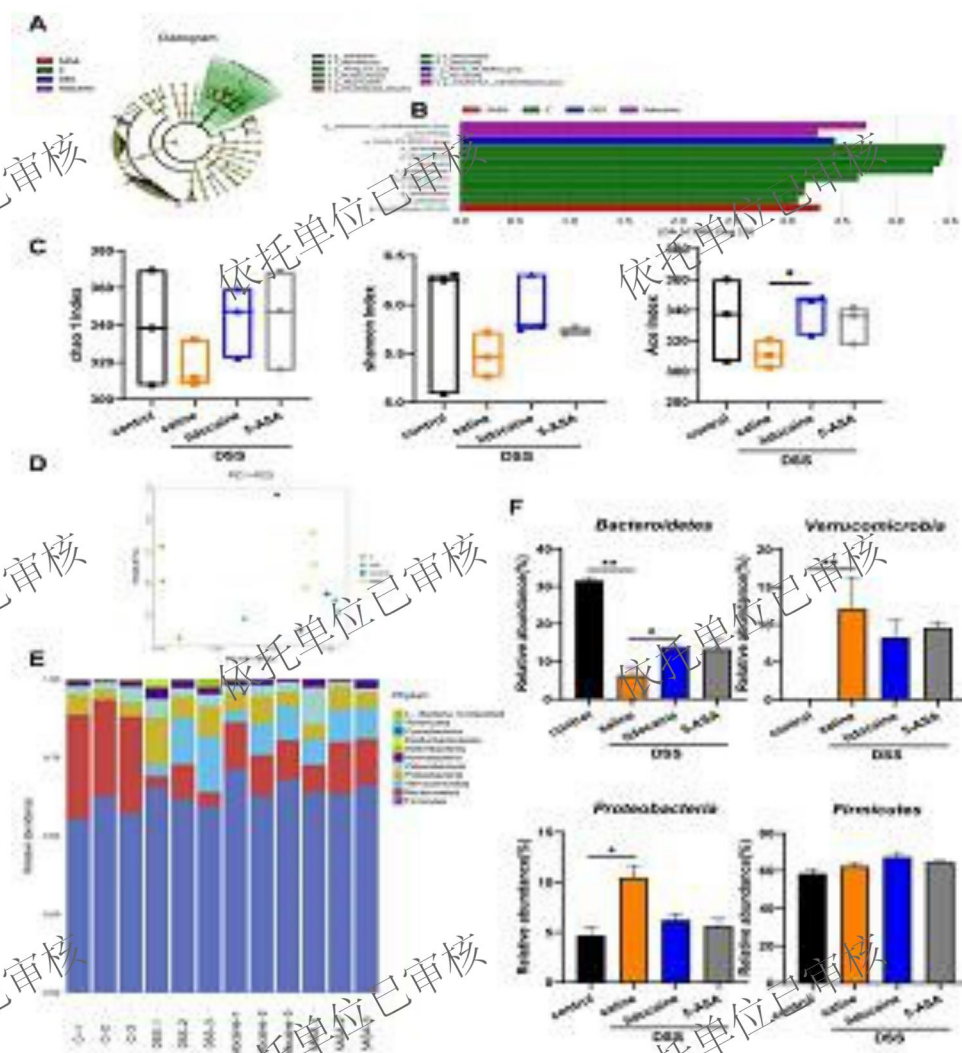
4.4 蛛网膜下腔阻滞对 IBD 小鼠模型肠道菌群的影响

大量 IBD 患者和 IBD 动物模型中发现微生物群组成改变或者失调。

本实验中通过 Illumina MiSeq 测序每只小鼠粪便微生物群。对约 250 bp 的 16S rRNA 基因 v3-v4 区域的约 30000 个成对读数进行分析 (图

4A-B)。PCoA 分析显示在结肠炎期间发生了特定的细菌改变。生理盐水+DSS 组和利多卡因+DSS 组的 α 多样性指标 (Ace 指数) 不尽相同 (图 4C)。有趣的是, 利多卡因蛛网膜下腔阻滞显著挽救了 DSS 抑制的类杆菌的丰度 (图 4D-E)。其他类型的细菌, 包括

菌，也受到利多卡因蛛网膜下腔阻滞影响，尽管差异没有达到统计学意义。总之，这些数据表明，利多卡因蛛网膜下腔阻滞可以改变 IBD 小鼠模型的肠道菌群。



4.5 蛛网膜下腔利多卡因阻滞组小鼠共饲养减轻 DSS 诱导的结肠炎

为了验证蛛网膜下腔阻滞是否通过改善肠道微生物群缓解结肠炎，本实验将 DSS 小鼠和蛛网膜下腔利多卡因阻滞组小鼠共饲养（图 5A）。利用微生物群测序分析，我们比较了共饲养组和非共饲养组的肠道微生物群。图 5D-F 显示，共饲养改变了肠道菌群的相对丰度。 α 多样性指标，包括 Chao1 指数、Shannon 指数和 Ace 指数，没有显著差异（图 5D）。共饲养显著增加了类杆菌的丰度（图 5F），这与蛛网膜下腔阻滞组 IBD 小鼠变化一致。同时，共饲养后 IBD 小鼠的体重和 DAI 均优于 DSS 小

鼠

（图

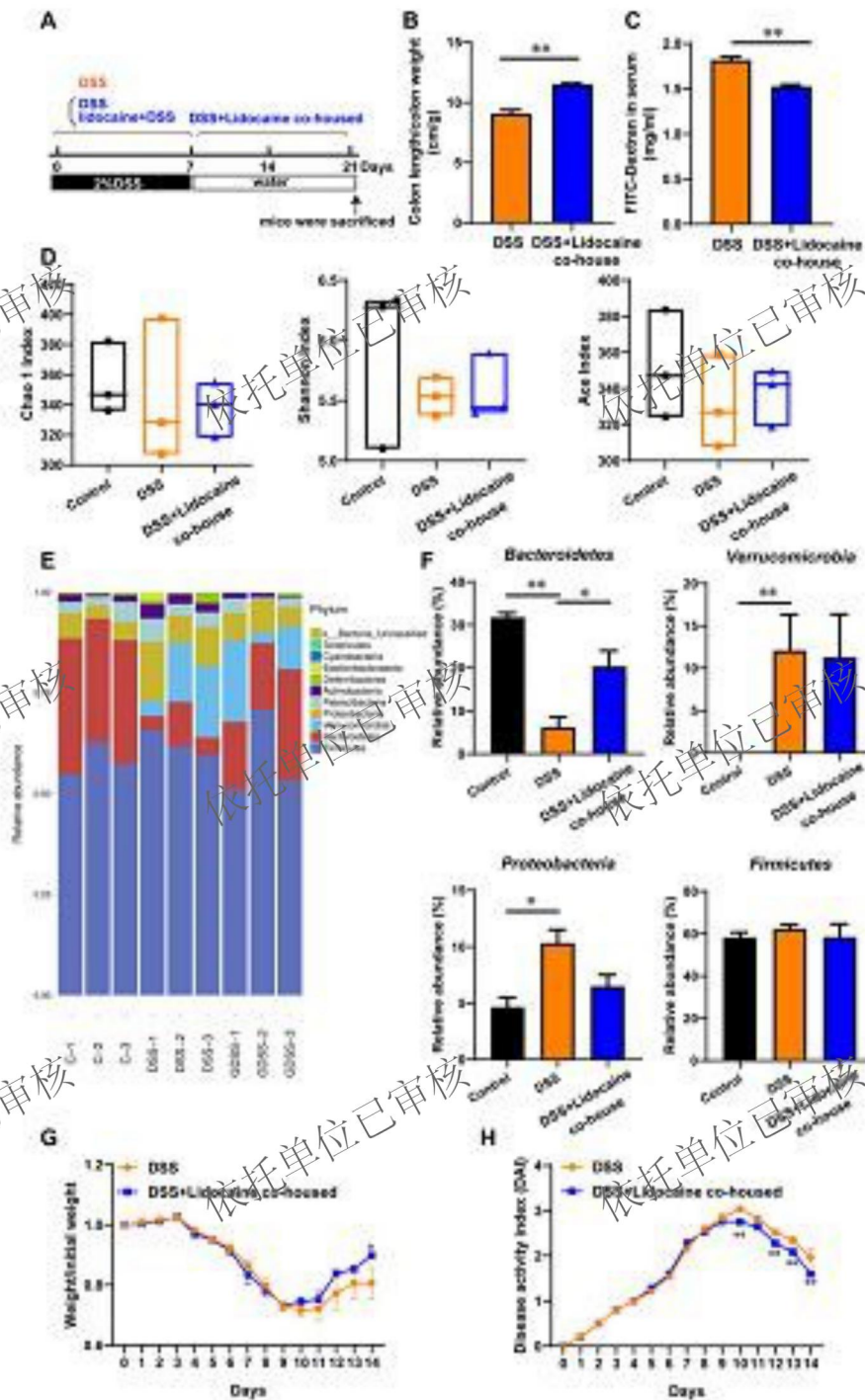
5G-

H)，

并且

共饲

养还能改善 DSS 引起的结肠变短和肠道通透性增加（图 5B 和 5C）。



4.6 蛛网膜下腔利多卡因阻滞组小鼠粪便微生物群移植减轻 DSS 诱导的结肠炎

粪便移植（FMT）通常被认为是一种有效肠道菌群失调的疗法。本实验我们确定蛛网膜下

腔利

多卡

因阻

滞的

肠道

菌群

移植是否对 DSS 诱导的结肠炎有影响（图 6A）。结果发现 FMT 改变了肠道菌群的相对丰度和阿尔法多样性指标。Chao1 指数、Shannon 指数和 Ace 指数，在同居组和非同居组之间存在差异（图 6D）。FMT 显著增加类杆菌的丰度，降低疣状菌的丰度，恢复 DSS 引起的菌群失调（图 6E-F）。同时，FMT 治疗的 DSS 小鼠的体重和 DAI 优于 DSS 小鼠（图 6G-H），这与共饲养治疗的变化一致。FMT 还能减少结肠肿胀，减轻肠道通透性（图 6B-C）。综上所述，这些结果表明，由于肠道微生物群在肠道炎症中起关键作用，蛛网膜下腔利多卡因阻滞能通过调节肠道菌群缓解结肠炎症。

依托单位已审核

依托单位已审核

依托单位已审核

依托单位已审核

依托单位已审核

依托单位已审核

依托单位已审核

依托单位已审核

依托单位已审核

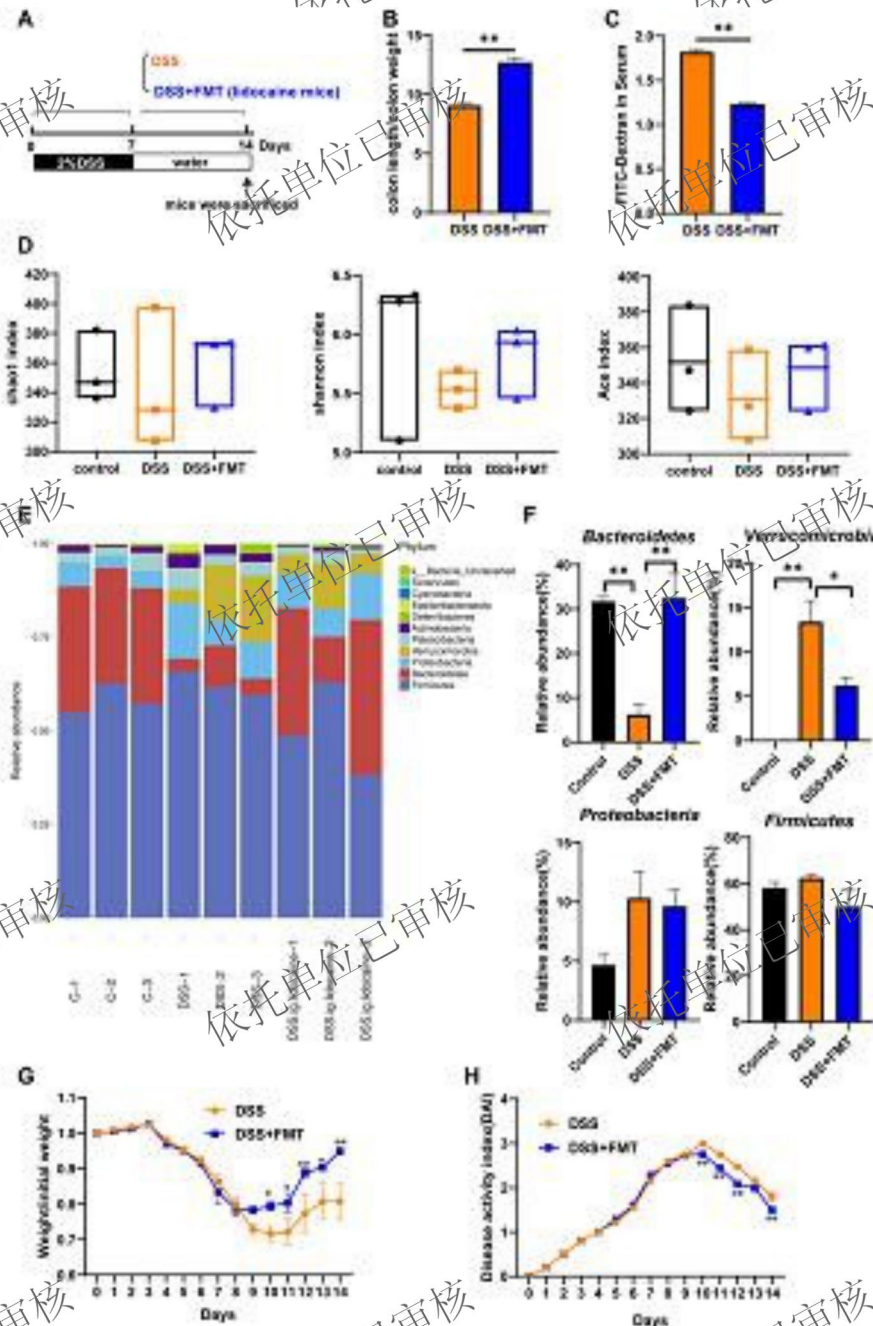
依托单位已审核

依托单位已审核

依托单位已审核

依托单位已审核

依托单位已审核



4.7 蛛网膜下腔利多卡因阻滞降低 IBD 小鼠去甲肾上腺素水平

研究表明交感神经系统主要通过释放去甲肾上腺素对肠道产生抑制作用。为了验证蛛网膜下腔阻滞通过去甲肾上腺素调节肠道微生物群，我们使用 HPLC 检测模型中的去甲肾上腺素水平（图 7A）。结果表明，与对照组相比，生理盐水+DSS 组的去甲肾上腺素水平升高

依托单位已审核

依托单位已审核

依托单位已审核

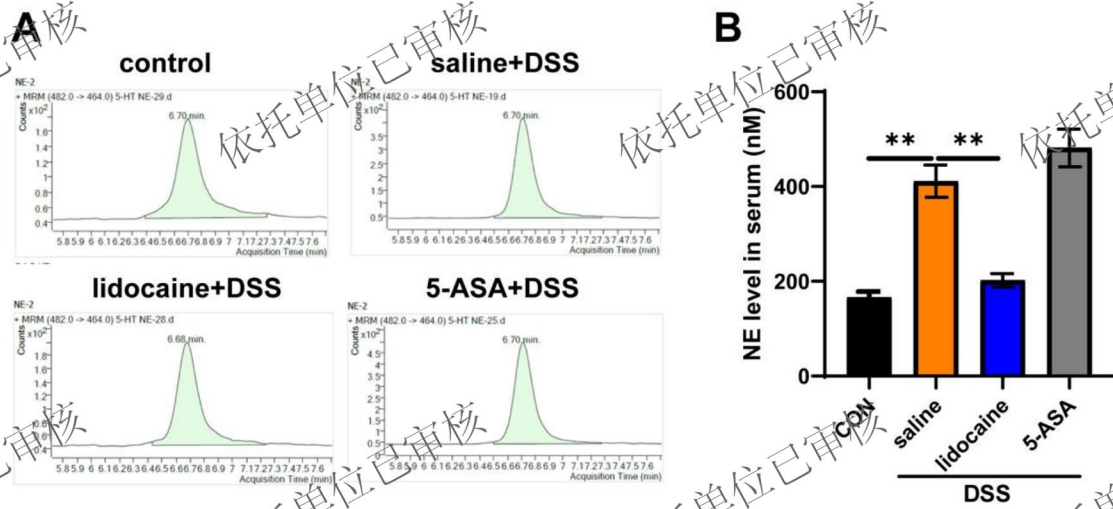
依托单位已审核

(图

7A

和

B)。利多卡因蛛网膜下腔阻滞可降低 DSS 诱导 IBD 小鼠的去甲肾上腺素水平。去甲肾上腺素水平的改变可能是利多卡因蛛网膜下腔阻滞对肠道微生物群影响的潜在机制之一。



结论

1. 成功使用 C57bl/6 小鼠口服 DSS 构建炎症性肠病 (IBD) 小鼠模型，并在此模型上成功实施蛛网膜下腔阻滞。炎症性肠病小鼠出现 DAI 水平升高、体重减轻、结肠变短、直肠出血、粪便稠度降低。结肠组织 HE 染色图像显示隐窝缺失、刷状缘连续性破坏。说明该方法能够在较短时间内肠道炎症性疾病，是一种死亡率低，成模率高的构建 IBD 的方法。
2. 蛛网膜下腔阻滞有效缓解 DSS 激活的肠道炎症反应，相较于对照组，利多卡因蛛网膜下腔阻滞有效下调了 IL-1 β 、IL-6 和 iNOS 的 mRNA 水平，并上调 CTL4 和 CD4+/CD25+/Foxp3+Tregs 水平。
3. 蛛网膜下腔阻滞具有肠道屏障保护功能。细胞间紧密连接 (TJs) 的完整性是细胞通透性的关键决定因素，对维持上皮屏障功能非常重要。Western blot 分析显示，DSS 组中两种具有代表性的 TJ 蛋白 claudin-1 和 occludin 显著低于对照组。利多卡因蛛网膜下腔阻滞逆转了 claudin-1 和 occludin 的水平，显著增加粘蛋白显。
4. 蛛网膜下腔阻滞对 IBD 小鼠模型肠道菌群有影响。PCoA 分析在结肠炎期间发生了特定菌群改变。利多卡因蛛网膜下腔阻滞显著挽救了 DSS 抑制的类杆菌的丰度和其他类型的细菌，包括疣状菌和变形菌。同时共饲养和粪移植试验进一步明确了蛛网膜下腔利多卡因阻滞能改善 DSS 引起的结肠炎症和结肠菌群失调。蛛网膜下腔阻滞体内去甲肾上腺素水平降低可能是影响肠道微生物的机制之一。

参考文献

- [1] J.L. McCarville, A. Caminero, E.F. Verdu, Novel perspectives on therapeutic modulation of the gut microbiota, *Therapeutic advances in gastroenterology*, 9 (2016) 580-593.
- [2] A.D. Kostic, R.J. Xavier, D. Gevers, The microbiome in inflammatory bowel disease: current status and the future ahead, *Gastroenterology*, 146 (2014) 1489-1499.
- [3] J. Li, J. Butcher, D. Mack, A. Stintzi, Functional impacts of the intestinal microbiome in the pathogenesis of inflammatory bowel disease, *Inflammatory bowel diseases*, 21 (2015) 139-153.
- [4] Collins SM, Bercik P. Gut microbiota: Intestinal bacteria influence brain activity in healthy humans. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2013;10:326-327
- [5] Lapaquette, A.L. Glasser, A. Huett, R.J. Xavier, A. Darfeuille-Michaud, Crohn's disease-associated adherent-invasive E. coli are selectively favoured by impaired autophagy to replicate intracellularly, *Cellular microbiology*, 12 (2010) 99-113.
- [6] J.B. Grigg, G.F. Sonnenberg, Host-Microbiota Interactions Shape Local and Systemic Inflammatory Diseases, *Journal of immunology*, 198 (2017) 564-571.
- [7] 杨凤英, 鲁鹏, 蓝晓慧, 傅思武, 益生菌在炎症性肠病治疗中的研究进展, *中国微生物生态学杂志*, 26 (2014) 735-739.
- [8] J. Alverdy, C. Holbrook, F. Rocha, L. Seiden, R.L. Wu, M. Musch, E. Chang, D. Ohman, S. Suh, Gut-derived sepsis occurs when the right pathogen with the right virulence genes meets the right host: evidence for

in vivo virulence expression in *Pseudomonas aeruginosa*, *Annals of surgery*, 232 (2000) 480-489.

- [9] M. Karin, T. Lawrence, V. Nizet, Innate immunity gone awry: linking microbial infections to chronic inflammation and cancer, *Cell*, 124 (2006) 823-835.

[10] R.P. Hoffman, C.A. Sinkey, E. Tsalikian, Effect of local sympathetic blockade on forearm blood flow and glucose uptake during hypoglycemia, *Metabolism: clinical and experimental*, 48 (1999) 1575-1583.

- [11] J. Schaper, R. Ahmed, F.H. Perschel, M. Schafer, H. Habazettl, M. Welte, Thoracic epidural anesthesia attenuates endotoxin-induced impairment of gastrointestinal organ perfusion,

Anesthesiology, 113 (2010) 126-133.

- [12] J. Adolphs, D.K. Schmidt, I. Korsukewitz, B. Kamin, H. Habazettl, M. Schafer, M. Welte, Effects of thoracic epidural anaesthesia on intestinal microvascular perfusion in a rodent model of normotensive endotoxaemia, *Intensive care medicine*, 30 (2004) 2094-2101.

[13] M. Karin, T. Lawrence, V. Nizet, Innate immunity gone awry: linking microbial infections to chronic inflammation and cancer, *Cell*, 124 (2006) 823-835.

[14] J. Adolphs, D.K. Schmidt, I. Korsukewitz, B. Kamin, H. Habazettl, M. Schafer, M. Welte, Effects of thoracic epidural anaesthesia on intestinal microvascular perfusion in a rodent model of normotensive endotoxaemia, *Intensive care medicine*, 30 (2004) 2094-2101.

- [15] X. Han, M.P. Fink, R.L. Delude, Proinflammatory cytokines cause NO*-dependent and -independent changes in expression and localization of tight junction proteins in intestinal epithelial cells, *Shock*, 19 (2003) 229-237.

[16] D. Tromp, D.R. Christie, Acute and Late Bowel Toxicity in

Radiotherapy Patients with

Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review, Clinical oncology, 27 (2015) 536-541.

- [17] D. Geem, A. Harusato, K. Flannigan, T.L. Denning, Harnessing regulatory T cells for the treatment of inflammatory bowel disease, Inflammatory bowel diseases, 21 (2015)

1409-1418.

- [18] T. Wirth, A.M. Westendorf, D. Bloemker, J. Wildmann, H. Engler, S. Mollerus, M. Wadwa,

M.K. Schafer, M. Schedlowski, A. del Rey, The sympathetic nervous system modulates CD4(+)Foxp3(+) regulatory T cells via noradrenaline-dependent apoptosis in model of lymphoproliferative disease, Brain, behavior, and immunity, 38 (2014) 100-110.

- [19] F. Guarner, Prebiotics, probiotics and helminths: the 'natural' solution?, Digestive diseases, 27

(2009) 412-417.

- [20] J.L. Round, S.K. Mazmanian, Inducible Foxp3⁺ regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 107 (2010) 12204-12209.

- [21] M.A. McGuckin, R. Eri, L.A. Simms, T.H. Florin, G. Radford-Smith, Intestinal barrier dysfunction in inflammatory bowel diseases, Inflammatory bowel diseases, 15 (2009) 100-113.

附录 A 主要成果情况

1. 学术论文发表：发表 SCI 论文 2 篇

- (1) Huahua Du, Li Linag, Jiahui Li, Qingqing Xiong, **Xin Yu**, Hong Yu. Lipocalin-2 alleviates LPS- induced inflammation through alteration of macrophage properties. Journal of Inflammation Research 2021;14:4189-4203. (SCI, IF₅: 6.92)
- (2) Hong Yu , Jie Zhao, Yeru Chen, Zihao Huang, Lidan Hou, Bo Shen, and **Xin Yu**. Spinal anesthesia alleviates DSS-induced colitis by modulating the

依托单位已审核

gut

依托单位已审核

依托单位已审核

依托单位已审核

microbiota. Journal of world gastroenterology. Revised. (SCI, IF: 5.8)

依托单位已审核

依托单位已审核

依托单位已审核

依托单位已审核

依托单位已审核

依托单位已审核

依托单位已审核

依托单位已审核

依托单位已审核

依托单位已审核

依托单位已审核

依托单位已审核

依托单位已审核

依托单位已审核

依托单位已审核

依托单位已审核

凭证号科目名称

2019--05--08	2019 5E 3806	491030+N21912JJ	5001.2.1.99902	业务活动费用 / 科研费
2019--05--08	2019 5E 3806	491030+N21912JJ	5001.2.1.99902	业务活动费用 / 科研费
2019--05--08	2019 5E 3806	491030+N21912JJ	4001.2.2.2	财政拨款收入 / 地方财
2019--08--26	2019 8E 12509	491030+N21912ZJ	5001.2.1.3021801	业务活动费用 / 科研费
2019--11--22	201911E 28445	491030+N21912ZJ	5001.2.1.3022701	业务活动费用 / 科研费
2019--12--06	201912E 10329	491030+N21912ZJ	5001.2.1.3022701	业务活动费用 / 科研费

日期

项目号

科目号

4001.2.2.2

2019--05--07	2019 5E 2326	491030+N21912ZJ		财政拨款收入 / 地方财
2019--12--06	201912E 10334	491030+N21912ZJ	5001.2.1.3021801	业务活动费用 / 科研费
2019--12--06	201912E 10365	491030+N21912ZJ	5001.2.1.3021801	业务活动费用 / 科研费
2019--12--06	201912E 10379	491030+N21912ZJ	5001.2.1.3021801	业务活动费用 / 科研费
2019--12--06	201912E 10384	491030+N21912ZJ	5001.2.1.3021801	业务活动费用 / 科研费
2019--12--06	201912E 10387	491030+N21912ZJ	5001.2.1.3021801	业务活动费用 / 科研费
2019--12--06	201912E 10413	491030+N21912ZJ	5001.2.1.3021801	业务活动费用 / 科研费
2019--12--06	201912E 10441	491030+N21912ZJ	5001.2.1.3022701	业务活动费用 / 科研费
2020--04--22	2020 4E 11444	491030+N21912ZJ	5001.2.1.303080301	业务活动费用 / 科研费
2020--04--22	2020 4E 11450	491030+N21912ZJ	5001.2.1.3022604	业务活动费用 / 科研费

2020--05--25	2020 5E 16006	491030+N21912ZJ	5001.2.1.303080301	业务活动费用 / 科研费
2020--05--25	2020 5E 16006	491030+N21912ZJ	5001.2.1.303080201	业务活动费用 / 科研费
2020--06--09	2020 6E 7349	491030+N21912ZJ	5001.2.1.303080301	业务活动费用 / 科研费
2020--06--09	2020 6E 7349	491030+N21912ZJ	5001.2.1.303080201	业务活动费用 / 科研费
2020--06--09	2020 6E 7525	491030+N21912JJ	5001.2.1.3022701	业务活动费用 / 科研费
2020--07--24	2020 7E 18996	491030+N21912ZJ	5001.2.1.3021801	业务活动费用 / 科研费
2020--08--31	2020 8E 18625	491030+N21912ZJ	5001.2.1.3021801	业务活动费用 / 科研费
2020--09--02	2020 9E 1074	491030+N21912ZJ	5001.2.1.3021801	业务活动费用 / 科研费
2020--09--29	2020 9E 32441	491030+N21912ZJ	5001.2.1.3021801	业务活动费用 / 科研费
2020--10--29	202010E 25807	491030+N21912JJ	5001.2.1.3022604	业务活动费用 / 科研费

依托单位已审核

依托单位已审核

依托单位已审核

依托单位已审核

收入授权号

俞欣交学校管理费 0 8100 2019 年浙
俞欣交院所科研成本 0 6750 江大学基础

2019 年浙江大学基础 27000 0 800

杜华华报试剂等 0 17000 400 杜华华 409504

杜华华报测试加工费 0 7050 杜华华 409504

杜华华报测试加工费 0 4302 杜华华 409504

杜 华 华 报
材 料 费 0

摘要 780 支出 核销号 63000 0 经办人 杜 华

409504 杜华华报材料费 0 300 杜华华 409504 杜华华报材料费 0 杜华华 409504 杜华华报材
料费 0 杜华华 409504 杜华华报材料费 0 1963.2 杜华华 409504 杜华华报材料费 0 2022 杜华
华 409504

杜华华报测试加工费 0 16000 杜华华 409504

赵婧等领劳务 0 1600 杜华华 409504

贾莉校外等领科研劳务	0	900	杜华华	409504
赵婧等领科研劳务费	0	3800	杜华华	409504
赵婧等领科研劳务费	0	2400	杜华华	409504

1773.8
70
145
74.45

赵婧等领科研劳务费	0	2400	杜华华	409504
-----------	---	------	-----	--------

赵婧等领科研劳务费 0 900 杜华华 409504 杜华华报测试加工费 0 杜华华 409503 杜华华报材料费 0 杜华华 409504 耗材采购平台报材料费 0 耗材采购 409504 耗材采购平台报材料费 0 耗材采购 409504 耗材采购平台报材料费 0 35 耗材采购 409504 俞欣校外等领科研绩效 0 10376.2 杜华华 409503