

浙江省自然科学基金
资助项目研究计划书

立项编号 LY15H280011

项目名称: 铁皮枫斗颗粒有效成分治疗慢性萎缩性胃炎的分子机理实验研究

总资助经费: 8.0 万元

起止年月: 2015 年 1 月 至 2017 年 12 月

项目负责人: 杨锋 电话: 13858088332

电子邮箱: 88082214@163.com

通信地址: 浙江/杭州市/西湖区 . 杭州市天目山路 132 号

邮政编码: 310007

依托单位: 浙江省中医药研究院

联系人: 赵桂芝 电话: 13906525256

申报日期: 2015-5-6

浙江省自然科学基金委员会

二〇一五年制

填写说明

- 一、收到《浙江省自然科学基金资助项目批准通知》（简称《批准通知》）后，请认真阅读自然科学基金有关项目和经费管理办法，按要求认真填写《浙江省自然科学基金资助项目研究计划书》（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、项目负责人和依托单位应当按照申请书的内容填写、审核资助项目研究计划书，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。
- 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，将作为项目研究计划执行和检查、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、获奖情况，均须按规定标注“浙江省自然科学基金资助项目”和立项编号。
- 五、省自然科学基金的资助经费管理（包括省级财政拨款经费、单位联合资助经费）依照《关于改进加强省级财政科研项目资金管理若干意见》（浙政办发〔2014〕148 号）、《浙江省省级科技研发和成果转化项目经费管理暂行办法》（浙财教〔2012〕357 号）和《关于严肃财经纪律规范科技经费使用和加强监管若干意见》（浙财教〔2012〕29 号）等相关文件的规定执行，非省级财政拨款单位联合资助经费参照以上文件执行。

基本信息

负责人信息	姓 名	杨 锋	性别	男	出生日期	1955-2-18
	电 话	13858088332	E-mail		88082214@163.com	
	证件类型	身份证 18 位	证件号码		330102195502181516	
项目基本信息	项目名称		铁皮枫斗颗粒有效成分治疗慢性萎缩性胃炎的分子机理实验研究			
	项目类别		一般项目		研究属性	应用基础研究
	学科代码		H2814			
	学科代码名称		医学科学部/中药学/中药消化与呼吸药理			
	依托基地名称		浙江省中药新药研发重点实验室			
	预计研究年限		2015 年 1 月 至 2017 年 12 月			
	总资助经费		8.0 万元			
	项目研究目标、内容和意义简介 慢性萎缩性胃炎 (Chronic atrophic gastritis, CAG) 为消化系统常见病, 且为胃癌前病变。西医治疗 CAG 尚无特效疗法, 中医药治疗有一定优势, 但尚无经过系统临床研究证明有效的中药。我们对已上市 20 多年的铁皮枫斗颗粒进行 1000 例用户实名问卷抽查、80 例 CAG 立项临床研究、5 种 CAG 大鼠模型实验和基于国家食品药品监督管理总局药物临床试验批件的 II 期临床研究(批件号: 2013L00528)初步结果, 发现该药品能显著改善 CAG 症状, 包括逆转炎症、胃黏膜萎缩和肠化生。基于此, 本研究采用大鼠 CAG 模型, 以铁皮石斛粗多糖、铁皮石斛非多糖和人参总皂苷为候选目标, 确定有效成分; 然后利用高通量测序技术检测参与 CAG 病变过程, 及有效成分治疗后表达逆转的基因, 着重观察与炎症相关密切相关的 COX-2、NF-κB 和 IL-1 基因, 与胃黏膜萎缩密切相关的 CDX1 和 CDX2 基因, 与肠化生密切相关的 RegIα 和 TFF 基因, 以及与肠化生、胃黏膜萎缩和炎症均密切相关的 PCNA、BCL-2 和 IL-11 基因的表达水平改变, 对筛选出的候选靶基因用 qRT-PCR 和 Western 杂交技术进行验证。本研究将阐明铁皮枫斗颗粒治疗 CAG 的有效成分及分子机理, 为其临床疗效和新药申报提供数据依据, 并有利于促进中医药治疗 CAG 疗效水平的大幅度提高。					

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	每年工作时间 (月)
1	杨 锋	负责人	1955-2-18	男	浙江省中医药研究院	13858088332	8
2	吴人照	主要成员	1964-9-25	男	浙江省中医药研究院	13325819096	6
3	陈璇	主要成员	1984-3-9	女	浙江省中医药研究院	13221803910	6
4	童晔玲	主要成员	1981-3-24	女	浙江省中医药研究院	13634199986	4
5	任泽明	主要成员	1983-1-3	男	浙江省中医药研究院	15858265433	4
6	杨芳亮	非主要成员	1979-1-3	男	浙江天皇药业有限公司	0571-88858168	4
7	何晓燕	非主要成员	1990-10-4	女	浙江省中医药大学	0571-88849082	8

项目经费

总资助经费 8.0 万元, 其中省财政资助经费 8.0 万元(第一批财政拨款 8.0 万元, 第二批财政拨款 0.0 万元), 单位联合资助经费 0.0 万元。

科研经费	名称	总资助经费 预算(万元)	备注(计算依据与说明)
直接费用	1、设备费	0.00	无
	2、材料费	4.80	大鼠购买、饲养和病理检测费, 2.7万; 购买MNNG, 1.0万; 购买qRT-PCR、Western杂交、RNA提取和反转等实验所需试剂和耗材, 共1.1万。
	3、测试化验加工费	1.50	高通量测序费用0.5万/样品, 3个样品, 需1.5万。
	4、燃料动力费	0.00	无
	5、差旅费	0.50	拟派遣1人参加学术会议1次, 注册费及食宿费补贴共0.30万; 往返差旅费0.20万, 预算共0.50万。
	6、会议费	0.00	无
	7、合作、协作研究与交流费	0.00	无
	8、出版/文献/信息传播/知识产权事务费	0.60	用于论文发表版面费, 按0.3万/篇计, 2篇论文共0.6万。
	9、人员劳务费	0.20	用于直接参加项目研究的研究生的劳务费用。
	10、专家咨询费	0.00	无
间接费用	11、管理费	0.20	按实分摊科研成本。
	12、激励支出	0.20	用于支付本课题组在职人员的绩效津贴。

研究计划

2015 年度

研究内容: 1) 提取分离铁皮石斛粗多糖、铁皮石斛非多糖和西洋参总皂苷;
2) 铁皮枫斗颗粒及候选有效成分治疗 CAG 药效学实验;
3) 大鼠胃黏膜样本收集;

研究目标: 1) 确定铁皮石斛粗多糖、铁皮石斛非多糖和西洋参总皂苷 3 类主要成分各自的疗效水平, 明确其中的主要有效成分;

2) 收集大鼠胃黏膜样本, 为高通量测序 (RNA-Seq)、qRT-PCR 和 Western 杂交实验准备样本。

2016 年度

研究内容: 1) 上述实验样本中总 RNA 和蛋白质的提取;
2) RNA-Seq 技术和生物信息学技术检测样本间差异表达基因。

研究目标: 1) 提取充足且高质量的总 RNA 和蛋白质, 为 RNA-Seq、qRT-PCR 和 Western 杂交等实验做准备;

2) 获得参与 CAG 病变过程的基因, 及其中受到本药品治疗后表达逆转的基因, 着重观察与肠化生、胃黏膜萎缩和炎症相关基因的表达变化;

2017 年度

研究内容: 1) qRT-PCR 和 Western 杂交技术检测候选靶基因的表达水平;
2) 整理数据, 撰写论文;
3) 项目结题。

研究目标: 1) 对候选靶基因在 mRNA 和蛋白质水平进行验证;

2) 论文发表;

3) 项目结题。

预期研究成果

SCI(SSCI)收录	1	EI 收录	0	其他发表论文	1		
发明专利	0	转入国家项目	0	获得省部级以上科技奖励	0	专著	0

预期研究成果说明:

- (1) 确定铁皮枫斗颗粒治疗 CAG 的有效成分;
- (2) 明确铁皮枫斗颗粒治疗 CAG 的分子机制;
- (3) 研究结果发表论文 2 篇, 其中 SCI 论文 1 篇。
- (4) 充分利用本研究结果, 以及在完成铁皮枫斗颗粒治疗气阴两虚证型 CAG 的 II 期和 III 期临床研究的基础上, 力争获得本药品治疗气阴两虚证型 CAG 的国家 CFDA 中药 6 类注册生产批件 (增加适应症批件)。
- (5) 本课题不存在新配方的药学、药物毒性的风险, 课题获得成功后的成果所能取得的社会经济效益与新配方相同。本研究领域 CAG 为对人类健康危害较大的常见高发病, 属于难治性疾病, 也是中医药疗效优势病种, 预期结果有较大社会和市场应用价值。
- (6) 本研究利用 RNA-Seq 技术比较 CAG 造模前后表达发生改变的基因, 可能获得与 CAG 相关的新的基因, 有利于更充分认识 CAG 的发病机理; 并利用该技术检测治疗后表达水平逆转的基因, 有利于丰富对 CAG 康复机理的认知, 而西医则由于治疗 CAG 无特效疗法的局限, 无法开展 CAG 康复机理相关研究。本课题研究还有望以相关分子改变为指标, 指导和促进中医药治疗 CAG 疗效水平的大幅度提高。本课题也为其他类似中成药的开发提供参考。

签字和盖章页

我接受浙江省自然科学基金的资助,将按照项目申请书、批准通知和计划书负责实施本项目,严格遵守浙江省自然科学基金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):

杨锋
2015年5月21日

我单位同意承担上述浙江省自然科学基金项目,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,严格遵守浙江省自然科学基金相关项目和经费管理规定,并督促实施。

依托单位(公章):



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

项目计划书

立项编号	LGF19H280008		
项目名称:	铁皮枫斗颗粒上调 Ech1 影响线粒体功能逆转萎缩性胃炎伴上皮内瘤变及机制研究		
计划类别:	公益研究计划		
项目类别:	社会发展		
项目负责人:	任泽明	电话:	15858265433
电子邮箱:	rchao007@163. com		
通信地址:	浙江省/杭州市/西湖区 . 天目山路 132 号		
邮政编码:	310007		
依托单位:	浙江省中医药研究院		
联 系 人:	赵桂芝	电话:	13906525256
申报日期:	2018-12-3		

浙江省科学技术厅
浙江省自然科学基金委员会
二〇一八年制

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	任泽明	性别	男	出生日期	1983-1-3
	电 话	15858265433	E-mail		rchao007@163.com	
	证件类型	身份证 18 位	证件号码		371324198301034975	
项目基本信息	项目名称	铁皮枫斗颗粒上调 Ech1 影响线粒体功能逆转萎缩性胃炎伴上皮内瘤变及机制研究				
	英文名称	Study on the effect of Granule Dendrobii leading Ech1 upregulation on mitochondrial function to reverse atrophic gastritis with intraepithelial neoplasia and its mechanism				
	计划类别	公益研究计划	项目类别	社会发展		
	项目研究阶段	应用研究				
	国家自然科学基金学科代码	H2814				
	国家自然科学基金学科代码名称	医学科学部/中药学/中药消化与呼吸药理				
	国家标准学科分类与代码	3604015				
	国家标准学科分类与代码名称	中医学与中药学/中药学/中药药理学				
	依托一流学科/省重点实验室	无				
	预计研究年限	2019 年 1 月 至 2021 年 12 月				
	项目总经费	10.0 万元	其中省财政资助经费	10.00 万元		
	中文关键词	铁皮枫斗颗粒; 烯酯酰辅酶 A 水合酶 1; 线粒体; 慢性萎缩性胃炎; 上皮内瘤变				
	英文关键词	Granule Dendrobii; Ech1; mitochondrial function; atrophic gastritis; intraepithelial neoplasia				
中文摘要	项目研究内容: 我们前期动物实验和临床研究发现, 铁皮枫斗颗粒 (GD) 对慢性萎缩性胃炎 (CAG) 疗效显著。在省基金高通量测序及基因验证分析基础上, 发现烯酯酰辅酶 A 水合酶 1 (Ech1) 的改变与慢性萎缩性胃炎伴上皮内瘤变密切相关, 但具体机制未见相关报道。本研究拟采用人胃黏膜上皮细胞 GES-1 构建上皮内瘤变模型, 同时复制大鼠 CAG 癌前病变模型, 探讨铁皮枫斗颗粒作用于 Ech1 影响线粒体功能, 降低线粒体 DNA 微卫星不稳定, 减少活性氧 (ROS) 的产生, 并稳定线粒体膜电位, 抑制线粒体凋亡途径, 改善胃粘膜, 逆转萎缩性胃炎伴上皮内瘤变。通过本研究, 从细胞和整体水平探索 Ech1 是否为胃癌前病变的作用靶点, 可否用来作为诊断或治疗的生物标志物。					

	项目研究目标: 细胞实验: 明确 GD 能否通过上调 Ech1 减少活性氧的产生, 减轻线粒体的损伤; 培养人正常胃黏膜细胞 GES-1, 诱导上皮内瘤变模型, 用慢病毒质粒载体转染上调 Ech1 后, 观察线粒体功能; 检测线粒体膜电位、微卫星不稳定情况和 ROS; 检测 Ech1、Caspase-9、Bcl-2 和 Bax 的 mRNA 及蛋白表达情况。 动物实验: 求证 GD 是否通过上调 Ech1 治疗慢性萎缩性胃炎伴上皮内瘤变: 利用亚硝基胍 (MNNG) 诱导的大鼠 CAG 模型, 观察高中低剂量组 GD 对 CAG 伴上皮内瘤变病理表现的影响, 和对 Ech1、Caspase-9、Bcl-2 和 Bax 的 mRNA 及蛋白表达水平的影响。
英文摘要	项目研究内容: In our previous animal experiments and clinical studies, we found that the positive effect of Granule Dendrobii on chronic atrophic gastritis is remarkable. Based on the deep-sequencing and gene validation analysis funded by the government, it was found that the change of Ech1 was closely related to chronic atrophic gastritis with intraepithelial neoplasia, but the specific mechanism has not been reported. In this study, we intend to construct the intraepithelial neoplasia model with human gastric epithelial cells GES-1, and meanwhile, replicate the model of CAG precancerous lesion in rats. In addition, the effect of Granule Dendrobii leading Ech1 upregulation on mitochondrial function is also intended to be investigated, including the decrease of mitochondrial DNA microsatellite instability, reduction of the reactive oxygen species production, stability of the mitochondrial membrane potential, mitochondrial apoptosis inhibition pathways, improvement on gastric mucosa, and reverse effect on atrophic gastritis with intraepithelial neoplasia. Through this study, we can explore whether Ech1 is a target for gastric precancerous lesions from cell to whole level, and whether it can be used as a biomarker for diagnosis or treatment.

项目研究目标:

In vitro experiment: To confirm whether GD can reduce the production of reactive oxygen species and mitigate mitochondrial damage by raising level of Ech1; To construct the intraepithelial neoplasia model with human gastric epithelial cells GES-1. The mitochondrial function will be monitored after transfection with vector plasmid up-regulating Ech1; Mitochondrial membrane potential, microsatellite instability and ROS will be measured; The expressions of mRNA and protein in Ech1, Caspase-9, Bcl-2 and Bax will be analyzed.

In vivo experiment: To verify whether GD can be effective in the treatment of chronic atrophic gastritis with intraepithelial neoplasia by increasing Ech1: CAG model induced by nitroguanidine (MNNG) will be used to observe the effects of GD on pathology of intraepithelial neoplasia in different dose groups and the effects on the expression of mRNA and protein in Ech1, Caspase-9, Bcl-2 and Bax.

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	每年工作时间(月)
1	任泽明	负责人	1983-1-3	男	浙江省中医药研究院	15858265433	8
2	吴人照	会员成员	1964-9-25	男	浙江省中医药研究院	13325819096	6
3	马凤岐	会员成员	1987-1-15	男	浙江省中医药研究院	15658854180	6
4	陈思思	会员成员	1993-10-15	女	浙江省中医药研究院	15951076193	6
5	赵文慧	非会员成员	1992-4-4	女	浙江省中医药研究院	0571-88849082	8
6	薛晓敏	非会员成员	1989-12-8	男	浙江省中医药研究院	0571-88849082	8
7							

项目经费

项目总经费 10.00 万元,其中省财政资助经费 10.00 万元(第一批财政拨款 10.00 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	6.00
	3、测试化验加工费	1.00
	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	0.50
	6、出版/文献/信息传播/知识产权事务费	1.20
	7、人员劳务费	0.80
	8、专家咨询费	0.00
间接费用	9、间接费用	0.50

研究计划

2019 年度

研究内容: (1) 观察铁皮枫斗颗粒含药血清对细胞增殖、线粒体膜电位及活性氧的影响;
(2) 研究 Ech1 高表达对细胞线粒体功能的影响;
(3) 分析各组 Ech1、Caspase-9、Bcl-2 及 Bax 基因和蛋白的表达差异;

研究目标: (1) 完成铁皮枫斗颗粒含药血清对细胞增殖、线粒体膜电位及活性氧影响检测;
(2) 完成研究 Ech1 高表达对细胞线粒体功能的影响;
(3) 完成各组 Ech1、Caspase-9、Bcl-2 及 Bax 基因和蛋白表达差异检测和分析;

通过以上指标的检测,在细胞水平上,明确铁皮枫斗颗粒是否通过作用 Ech1 来影响线粒体功能,减少活性氧的产生,并改变线粒体膜电位,抑制线粒体凋亡途径,逆转萎缩性胃炎伴上皮内瘤变。

2020 年度

研究内容: (1) 复制大鼠萎缩性胃炎模型;
(2) 铁皮枫斗颗粒对慢性萎缩性胃炎伴上皮内瘤变的影响研究;
(3) 动物胃组织病理检测,确定各种上皮内瘤变情况等;
(4) 检测各组 Ech1、Caspase-9、Bcl-2 及 Bax 基因和蛋白的表达差异;

研究目标: (1) 复制大鼠萎缩性胃炎模型;
(2) 完成铁皮枫斗颗粒对慢性萎缩性胃炎伴上皮内瘤变的影响研究;
(3) 完成动物胃组织病理检测,确定各种上皮内瘤变情况等;
(4) 完成各组 Ech1、Caspase-9、Bcl-2 及 Bax 基因和蛋白表达差异检测和分析;
通过以上研究,在整体水平上,明确铁皮枫斗颗粒是否通过作用 Ech1 来改善胃粘膜,逆转萎缩性胃炎伴上皮内瘤变。

2021 年度

研究内容: (1) 实验数据的汇总、分析、总结工作;
(2) 论文撰写投稿等;
(3) 项目结题。

研究目标: (1) 完成实验数据的汇总、分析、总结工作;
(2) 撰写学术论文 2 篇并投稿;
(3) 完成项目结题。

预期研究成果:

(1) 明确 GD 通过上调 Ech1 表达, 减少 ROS 产生, 稳定线粒体膜电位, 减少线粒体 DNA 突变, 抑制线粒体凋亡途径, 改善胃粘膜, 逆转上皮内瘤变, 初步阐明 GD 改善 CAG 伴上皮内瘤变的作用机理。

(2) 发表研究论文 2 篇, 其中 SCI 论文 1 篇。

(3) 培养硕士研究生 2 名。

在本课题研究基础上, 以细胞实验为初步筛选手段, 通过细胞药理、血清药物化学方法, 明确 GD 入血成分中, 对造模后细胞繁殖功能恢复较好, 上调 (回调) Ech1 表达较显著, 疗效贡献较大的入血成分; 通过现代药物学方法富集这类入血成分, 采用相同实验方法, 验证富集后具有较高含量的这类入血成分对恢复造模后细胞繁殖功能、上调 (回调) Ech1 表达作用, 相比富集前含药血清作用提高; 将该成分提取纯化或者人工合成, 再通过动物实验, 发现新的富集后药物的作用增强、疗效突破, 以期形成新的疗效好的药物全新品种。

研究年限期间预期完成的成果 2 项:

论著							
S(S)CI 收录	1	EI 收录	0	其他发表论文	1	专著	0
授权专利							
发明专利			0	实用新型专利	0	软件著作权数	0
参与制定完成的标准数							
国际	0	国家	0	行业	0	地方	0
推广应用情况							
新产品	0	新工艺	0	新技术	0	新品种	0
环境治理情况							
能耗			0	排放	0	水	0
土壤			0	空气	0	固废	0
人才培养情况							
研究期限内项目组成员晋升职称人数			1	研究期限内参与本项目的毕业研究生人数			1
社会公益情况							
对公共卫生起到明显作用			0	对食品安全起到明显作用			0
对社会治理起到明显作用			0	对防灾减灾起到明显作用			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):

何泽明
2019年1月7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):

2019年1月8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

