



项目批准号	82160370
申请代码	H1602
归口管理部门	
依托单位代码	56300308A1735-2838



821603701035378

国家自然科学基金 资助项目计划书 (预算制项目)

资助类别: 地区科学基金项目

亚类说明:

附注说明:

项目名称: 肠道菌群通过LPS/TLR-4信号通路增强高氧诱导的肠损伤的分子机制研究

直接费用: 34万元 执行年限: 2022.01-2025.12

负责人: 邢周雄

通讯地址: 贵州省遵义市新蒲新区学府西路6号

邮政编码: 563000 电话: 15597760160

电子邮件: xingzhouxiong111@126.com

依托单位: 遵义医科大学

联系人: 孔宁静 电话: 0851-28609676

填表日期: 2021年10月16日

国家自然科学基金委员会制

Version: 1.035.378

国家自然科学基金资助项目计划书填报说明 （预算制项目）

- 一、项目负责人收到《国家自然科学基金资助项目批准通知》（以下简称《批准通知》）后，请认真阅读本填报说明，参照国家自然科学基金相关项目管理办法和新修订的《国家自然科学基金资助项目资金管理办法》（以下简称《资金管理办法》，请查阅国家自然科学基金委员会官方网站首页“政策法规”栏目），按《批准通知》的要求认真填写和提交《国家自然科学基金资助项目计划书》（以下简称《计划书》）。
- 二、填写《计划书》时要科学严谨、实事求是、表述清晰、准确。《计划书》经国家自然科学基金委员会相关项目管理部门审核批准后，将作为项目研究计划执行、检查和验收的依据。
- 三、《计划书》各部分填写要求如下：
 - （一）简表：由系统自动生成。
 - （二）摘要及关键词：各类获资助项目都应当填写中、英文摘要及关键词。
 - （三）项目组主要成员：计划书中列出姓名的项目组主要成员由系统自动生成，与申请书原成员保持一致，不可随意调整。如果《批准通知》所附“项目评审意见及修改意见表”中“修改意见”栏目有调整项目组成员相关要求的，待项目开始执行后，按照项目成员变更程序另行办理。
 - （四）资金预算表：根据批准的项目资助额度，按规定调整项目预算，并按照《国家自然科学基金项目计划书预算表编制说明》填报资金预算表和预算说明书。
 - （五）正文：
 1. 面上项目、地区科学基金项目：如果《批准通知》所附“项目评审意见及修改意见表”中“修改意见”栏目没有修改要求的，只需选择“研究内容和研究目标按照申请书执行”即可；如果《批准通知》中上述栏目明确要求调整研究期限或研究内容等的，须选择“根据研究方案修改意见更改”并填报相关修改内容。
 2. 重点项目、重点国际（地区）合作研究项目、重大项目、国家重大科研仪器研制项目、原创探索计划项目：须选择“根据研究方案修改意见更改”，根据《批准通知》的要求填写研究（研制）内容，不得自行降低、更改研究目标（或仪器研制的技术性能与主要技术指标、验收技术指标等）或缩减研究（研制）内容。此外，还要突出以下几点：
 - （1）研究的难点和在实施过程中可能遇到的问题（或仪器研制风险），拟采用的研究（研制）方案和技术路线；
 - （2）项目主要参与者分工，合作研究单位（如有）之间的关系与分工，重大项目还需说明课题之间的关联；
 - （3）详细的年度研究（研制）计划。
 3. 创新研究群体项目：须选择“根据研究方案修改意见更改”，按下列提纲撰写：
 - （1）研究方向；

- (2) 结合国内外研究现状，说明研究工作的学术思想和科学意义（限两个页面）；
 - (3) 研究内容、研究方案及预期目标（限两个页面）；
 - (4) 年度研究计划；
 - (5) 研究队伍的组成情况。
4. 基础科学中心项目：须选择“根据研究方案修改意见更改”，根据《批准通知》的要求和现场考察专家组的意见和建议，进一步完善并细化研究计划，按下列提纲撰写：
- (1) 五年拟开展的研究工作（包括主要研究方向、关键科学问题与研究内容）；
 - (2) 研究方案（包括骨干成员之间的分工及合作方式、学科交叉融合研究计划等）；
 - (3) 年度研究计划；
 - (4) 五年预期目标和可能取得的重大突破等；
 - (5) 研究队伍的组成情况。
5. 对于其他类型项目，参照面上项目的方式进行选择和填写。

简表

项目负责人信息	姓名	邢周雄	性别	男	出生年月	1985年12月	民族	汉族	
	学位	博士			职称	主治医师			
	是否在站博士后	否			电子邮件	xingzhouxiong111@126.com			
	电话	15597760160			个人网页				
	工作单位	遵义医科大学							
	所在院系所	附属医院							
依托单位信息	名称	遵义医科大学					代码	56300308A1735	
	联系人	孔宁静			电子邮件	zmckyc@163.com			
	电话	0851-28609676			网站地址	http://kyc.zmc.edu.cn/			
合作单位信息	单位名称								
项目基本信息	项目名称	肠道菌群通过LPS/TLR-4信号通路增强高氧诱导的肠损伤的分子机制研究							
	资助类别	地区科学基金项目				亚类说明			
	附注说明								
	申请代码	H1602:器官功能衰竭与支持							
	基地类别								
	执行年限	2022.01-2025.12							
	直接费用	34万元							

项目摘要

中文摘要:

氧疗广泛应用于危重患者, 并且常常使患者暴露于高氧。高氧可以引起多器官损伤, 并且增加患者的死亡率。肠道和肠道菌群对重症疾病发挥重要的调节作用。我们前期研究发现高氧可以同时诱导肠道菌群紊乱和肠损伤; 还发现LPS/TLR-4通路的激活参与高氧诱导的肠损伤。肠道和肠道菌群存在紧密的交互作用。我们进一步研究发现肠道菌群增强了高氧诱导的肠损伤; 并且初步研究发现LPS/TLR-4通路的激活参与肠道菌群增强高氧诱导的肠损伤。本项目, 我们首先在临床和动物水平用宏基因组-代谢组学联合分析鉴定出高氧诱导肠道菌群紊乱产生的特征性细菌和特征性代谢产物。并进一步通过选择性菌群/单菌移植和LPS干预等模型研究特征性细菌和LPS通过LPS/TLR-4通路增强高氧诱导的肠损伤的分子机制。最后, 我们研究了益生菌减轻高氧诱导的肠损伤的分子机制。本研究开辟了新的领域: 高氧-肠道菌群-肠损伤, 并具有重要临床意义。

Abstract:

Oxygen therapy is widely used in critically ill patients and usually exposes patients to hyperoxia. Hyperoxia leads to multiple organ injury and results in an increased mortality in patients. Gut and gut microbiota play an important role in modulating critical illness. Our previous study has indicated that hyperoxia induces gut dysbiosis and gut injury at the same time; and the activation of LPS / TLR-4 pathway is involved in the gut injury induced by hyperoxia. There is an intensive cross-talk between gut and gut microbiota. Our further study has found that gut microbiota enhances the gut injury induced by hyperoxia; and preliminary study has found that the activation of LPS / TLR-4 pathway is involved in the intestinal flora enhancing intestinal injury induced by hyperoxia. In this project, we first use metagenomic and metabolomic analyses to identify the characteristic bacteria and its corresponding characteristic metabolites in gut dysbiosis provoked by hyperoxia in both human and animal studies. Furthermore, we investigate the molecular mechanism that the characteristic bacteria and LPS enhance the gut injury induced by hyperoxia via LPS/TLR-4 pathway with selective microbiota transplantation (SMT) / mono-colonization transplantation models, LPS intervention models and so on. Finally, we explore the molecular mechanism of probiotics alleviating gut injury induced by hyperoxia. Our study opens up a new field: Hyperoxia-gut microbiota-gut injury, and it is of clinical importance.

关键词(用分号分开): 肠道菌群; 肠损伤; 高氧; 脂多糖; Toll样受体

Keywords(用分号分开): Gut microbiota; Gut injury; Hyperoxia; Lipopolysaccharide; Toll-like receptor

项目组主要成员

编号	姓名	出生年月	性别	职称	学位	单位名称	电话	证件号码	项目分工	每年工作时间 (月)				
1	邢周雄	1985.12	男	主治医师	博士	遵义医科大学	15597760160	42112719851202055X	项目负责人	8				
2	何毅怀	1979.11	男	副主任医师	硕士	遵义医科大学	13885219059	450802197911204330	粪菌移植、抗生素清除、病理学检测和益生菌干预	8				
3	穆茂媛	1989.08	女	医师	硕士	遵义医科大学	18786899203	522101198908263225	高氧造模, 数据统计	8				
4	张文	1989.09	男	主治医师	硕士	遵义医科大学	18300923084	522426198909105978	细胞培养、电镜、TUNEL、Elisa	8				
5	李运航	1996.02	男	硕士生	学士	遵义医科大学	15820572244	52018119960225083X	细胞培养、Western Blot、粪菌移植	10				
6	王宇	1995.01	女	硕士生	学士	遵义医科大学	15885655464	522121199501122420	高氧造模、PCR、细胞培养	10				
7	伍琳琳	1996.04	女	硕士生	学士	遵义医科大学	15386622822	510703199604050227	招募患者、氧疗干预和收集患者标本	10				
8	金灿	1994.06	女	硕士生	学士	遵义医科大学	0851-28927965	522122199406181648	数据分析、流式细胞检测和细胞活力检测	10				
总人数			高级		中级		初级		博士后		博士生		硕士生	
8			1		2		1						4	

国家自然科学基金预算制项目预算表

项目批准号：82160370

项目负责人：邢周雄

金额单位：万元

序号	科目名称	金额
1	一、基金资助项目直接费用合计	34.0000
2	1、设备费	0.0000
3	其中：设备购置费	0.0000
4	2、业务费	30.0000
5	3、劳务费	4.0000
6	二、其他来源资金	0.0000
7	三、合计	34.0000

注：请按照项目研究实际需要合理填写各科目预算金额。

预算说明书

（请按照《国家自然科学基金项目计划书预算表编制说明》等的有关要求，按照政策相符性、目标相关性和经济合理性原则，实事求是编制项目预算。填报时，直接费用应按设备费、业务费、劳务费三个类别填报，每个类别结合科研任务按支出用途进行说明。填报时，对单价 ≥ 50 万元的设备详细说明，对单价 < 50 万元的设备费用分类说明，对合作研究单位资质及资金外拨情况、自筹资金进行必要说明。）

一、项目直接费用：

（一）、设备费： 0.00 万元

（二）、业务费： 30.00万元

1、材料费： 11.20 万元

（1）SPF级小鼠（6000元）和无菌小鼠（6000元）：共计12000元

（2）无菌饲料、灭菌注射水、无菌垫料、氧源、钠石灰和干燥剂等：共计10000元

（3）离心管、注射器、无菌手套、细胞生长因子、麻醉药、手术器材、各种Western Blot检测试剂盒、菌种鉴定试剂盒、凋亡TUNEL试剂盒、TNF- α 试剂盒、白蛋白试剂盒、D-乳酸试剂盒等费用：共计50000元

（4）GSDMD、CHOP、TLR-4和GRP78等各种蛋白抗体（单价1000 \times 14种=14000元）、4-PBA试剂（单价1000元 \times 2瓶=2000元）、LPS抑制剂（单价1000元 \times 2瓶=2000元）以及TLR-4各种引物（单价250元 \times 8种=2000元）等费用：共计20000元

（5）各种进口抗生素（单价1250元 \times 4种=5000元）、益生菌菌种（单价2500元 \times 2种=5000元）、LPS（单价2500元 \times 2瓶=5000元）、培养基（单价250元 \times 20套=5000元）等费用：共计20000元

2、测试化验加工费： 16.00 万元

（1）细菌16S DNA 测序、细菌宏基因组测序、细菌非靶标代谢组学测序、肠道转录组学分析等费用：平均每个组学分析22500元 \times 4种组学 = 90000元

（2）ELISA检测白蛋白、LPS和TNF- α （单价100元 \times 100次=10000元）、PCR（单价100元 \times 100次=10000元）、流式细胞术（单价100元 \times 100次=10000元）、Western Blot检测各种蛋白（单价50元 \times 200次=10000元）、电镜检测细胞损伤（单价100元 \times 100次=10000元）等费用：共计50000元

（3）光镜检测肠病理损伤及细胞形态（单价100元 \times 50次=5000元）、荧光显微镜检测TUNEL（单价200元 \times 50次=10000元）、MTT法检测细胞活力（单价100元 \times 50次=5000元）等费用：共计20000元

3、差旅/会议/国际合作与交流费： 1.00 万元

本项目中实施过程中参与本项目相关的国内学术会议，包含机票、住宿和注册费等费用：

预计2500元 \times 1 人 \times 4 年=10000元

4、出版/文献/信息传播/知识产权事务费： 1.80 万元

发表SCI论文3篇版面费等费用：单价6000元 \times 3篇= 18000元

（三）、劳务费： 4.00万元

主要用于参与项目的4名研究生劳务费：250 元/月 \times 10 月 \times 4 人 \times 4 年=40000元



报告正文

研究内容和研究目标按照申请书执行。

国家自然科学基金项目负责人、依托单位承诺书

国家自然科学基金项目负责人承诺书

本人郑重承诺：我接受国家自然科学基金的资助，严格遵守中共中央办公厅、国务院办公厅《关于进一步加强科研诚信建设的若干意见》《关于进一步弘扬科学家精神加强作风和学风建设的意见》等规定，及国家自然科学基金委员会关于资助项目管理、项目资金管理等各项规章制度，在《计划书》填写及项目执行过程中：

（一）按照《批准通知》《国家自然科学基金资助项目计划书填报说明》的要求填写《计划书》，未自行降低、更改目标任务或约定要求，或缩减研究（研制）内容；

（二）树立“红线”意识，严格履行科研合同义务，按照《计划书》负责实施本项目（批准号：82160370），切实保证研究工作时间，按时报送有关材料，及时报告重大情况变动，不违规将科研任务转包、分包他人，不以项目实施周期外或不相关成果充抵交差；

（三）遵守科研诚信、科研伦理规范和学术道德，认真开展研究工作，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，反对无实质学术贡献者“挂名”，不在成果署名、知识产权归属等方面侵占他人合法权益，并如实报告本人及团队成员发生的违背科研诚信要求的任何行为；

（四）尊重科研规律，弘扬科学家精神，严谨求实，追求卓越，反对浮夸浮躁、投机取巧，不人为夸大学术或技术价值，不传播未经科学验证的现象和观点；

（五）将项目资金全部用于与本项目研究工作相关的支出，并结合科研活动需要，科学合理安排项目资金支出进度。

如违背上述承诺，本人愿接受国家自然科学基金委员会和相关部门做出的各项处理决定。

项目负责人（签字）：
邢志刚

2021年10月25日

依托单位科研管理部门：



负责人（签章）：何芋岐

2021年11月2日

依托单位财务管理部门：



负责人（签章）：周林

2021年11月2日

国家自然科学基金项目依托单位承诺书

我单位同意承担上述国家自然科学基金项目，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，严格遵守国家自然科学基金委员会有关资助项目管理、项目资金管理和科研诚信管理等各项规定，并督促实施。



依托单位（公章）

2021年11月3日

国家自然科学基金资助项目签批审核表

科学处审查意见：

同意按计划执行

负责人（签章）：
年 月 日

2021年 12月 13日

科学部审查意见：

同意科学处意见

负责人（签章）：
年 月 日

2021年 12月 13日

本栏目由自然科学基金委填写

填 报 说 明

一、填写申请书前，请先认真阅读本填报说明。申请书各项内容，要实事求是、逐条认真填写。表达要明确、严谨、字迹要清晰易辨。外来语要同时用原文和中文表达。第一次出现的缩写词，须写出全称。

二、申请书用 A4 纸双面打印，于左侧装订成册。各栏空格不够时，请自行加页加行。一式三份（均为原件），由所在单位或市（州）卫生健康局签署意见盖章后，报贵州省卫生健康委科教处。

三、申报项目的项目负责人和主要成员当年只允许申报 1 个项目。

四、封面上的“申报学科”由申报者填写，根据科研申报系统中“申报学科”的内容分类填写。

五、在读研究生、已离、退休的卫生科技人员不得作为申请者提出申请，但可作为项目组成员参加研究。

六、本申请书与卫生健康委下达的立项通知同时作为立项依据。

七、本科研基金研究周期原则上为两年。起始时间为项目立项次月开始，项目终止时间为完成年度的 12 月。

一、项目申报简要信息

研 究 项 目	名 称	中文	未折叠蛋白反应-肝细胞核因子 1α信号串扰影响肝损伤重症化的机制研究							
		英文	Study on the mechanisms of unfolded protein response-hepatocyte nuclear factor 1α signal crosstalk on the severity of liver injury							
	申报单位	遵义医科大学附属医院				申请金额	2 (万元)			
	申报学科	传染病	拟完成的成果形式 (论著或专著)			论著				
	申报年度	2020 年	实施年限			2020 年 07 月-2022 年 12 月				
申 请 者	姓 名	何毅怀	性别	男	出生年月	1979 年 11 月				
			身份证号	4508021979112043 30	民族	汉族				
	职 称	主治医师	学历	研究生	专业	传染内科				
	所 在 单 位	名 称	遵义医科大学附属医院			系、所、 科室	感染科			
性 质		事业单位	申请者电话		13885219059					
详细地址		贵州省遵义市大连路 149 号			E-mail	993565989@qq.com				
项 目 组	总人数	高级	中级	初级	博士后	博士生	硕士生	参加单位数		
	5	1	2	1			1	1		
	主要成员 (不含申请者)	姓名	身份证号	性别	年龄	专业技术 职务	专业	工作单位	项目中的 分工	签字
		罗亚文	522101197 105043224	女	49	主任医师	传染内科	遵义医科大学 附属医院	指导实 验	罗亚文
		杨方万	522121198 208043219	男	38	主治医师	传染内科	遵义医科大学 附属医院	具体实 施	杨方万
程其娇		522724198 912080226	女	31	医师	传染内科	遵义医科大学 附属医院	具体实 施	程其娇	
李霞	511521199 211286346	女	28	研究生	传染内科	遵义医科大学 附属医院	具体实 施	李霞		

研究内容和意义	摘要	<p>肝损伤重症化与多种因素有关，如合并细菌感染，其机制之一是持续、大量的肝细胞死亡。未折叠蛋白反应、肝细胞核因子 1α（hepatocyte nuclear factor 1 alpha, HNF1α）均对肝细胞的生存及功能有重要影响。我们前期研究发现：在急性肝损伤中，肝内未折叠蛋白反应与 HNF1α串扰调节；脂多糖可改变其串扰调节模式，加重肝细胞凋亡及程序性坏死。由此推断：肝细胞未折叠蛋白反应与 HNF1α信号相互串扰，通过调节肝细胞凋亡及程序性坏死，影响肝损伤重症化。具体作用机制尚不详。故基于通过提高肝细胞抗损伤能力，减轻细胞凋亡及程序性坏死以预防、阻止肝损伤重症化的目的，拟：通过小鼠模型及细胞模型，首先探讨肝细胞未折叠蛋白反应与 HNF1α信号相互调节机制，及其对肝细胞凋亡、程序性坏死、肝损伤的影响；其次探讨未折叠蛋白反应与 HNF1α信号串扰调节模式分别在脂多糖干预（部分模拟革兰氏阴性细菌感染）中的变化，及其对肝细胞凋亡、程序性坏死及肝损伤的影响。旨在研究未折叠蛋白反应-HNF1α信号串扰影响肝损伤重症化的机制及临床意义。</p>			
	主题词	<table border="1"> <tr> <td>中文</td> <td>肝细胞核因子 1α；未折叠蛋白反应；核因子κB；程序性坏死；肝损伤重症化</td> </tr> <tr> <td>英文</td> <td>hepatocyte nuclear factor 1 alpha; unfolded protein response; nuclear factor kappa B; necroptosis; severity of liver injury</td> </tr> </table>	中文	肝细胞核因子 1 α ；未折叠蛋白反应；核因子 κ B；程序性坏死；肝损伤重症化	英文
中文	肝细胞核因子 1 α ；未折叠蛋白反应；核因子 κ B；程序性坏死；肝损伤重症化				
英文	hepatocyte nuclear factor 1 alpha; unfolded protein response; nuclear factor kappa B; necroptosis; severity of liver injury				

- 注：1. 此表必须逐项认真填写，采用国家公布的标准简化汉字。
2. 项目名称能确切反映研究内容，最多不超过二十五个汉字（包括标点符号）。
3. 申报学科填写要和扉页相对应。
4. 申请金额以万元为单位，用阿拉伯数字表示，注意小数点。（申请金额原则上不超过5万元）
5. 专业指长期从事技术岗位和研究的专业，最多不超过十个汉字。
6. 参加单位数指研究项目组主要成员所在单位数，包括主持单位和合作单位（合作者所在单位），以阿拉伯数字表示。
7. 项目组主要成员指每年参加研究工作四个月以上、在项目组内起主要作用的人员，最多填写7人，要求本人签章。
8. 摘要500字以下（不含标点符号）。
9. 主题词数量不多于五个，主题词之间用分号分开。

二、立项依据

项目的研究意义,国内外研究现状及发展趋势分析,主要参考文献及出处:

肝脏是体内最大的生物代谢器官,由于解剖位置和功能特殊性,是外源性物质、病毒、内源性代谢产物及多种疾病常侵袭的靶器官,导致肝脏细胞受到破坏,引起肝脏功能异常,即肝损伤^[1]。常见的病因有:肝炎病毒、酒精、药物、代谢异常、自身免疫、缺血缺氧等^[2]。肝损伤进展为肝衰竭等重症肝病与多种因素有关^[3],如合并细菌感染、高载量乙型肝炎病毒感染^[4],其机制之一是持续、大量肝细胞死亡。重症肝病在我国常见,病死率70%以上,严重影响我国人民身体健康及社会经济发展。

1. 肝细胞凋亡及程序性坏死影响肝损伤重症化

肝细胞是维持肝脏功能和形态的主要细胞。肝细胞损伤是各种肝脏病变的共同病理生理基础,是肝功能异常的主要原因。肝细胞损伤的速度、程度和数量以及再生和修复状态是肝病进展及严重程度的内在决定因素。肝细胞不可逆性损伤将导致肝细胞死亡,反复活动性肝细胞损伤可加速重症化进展^[5]。肝细胞死亡表现为:肝细胞坏死(necrosis)、凋亡(apoptosis)、程序性坏死(necroptosis)及自噬(autophagy)等多种形式^[6,7]。肝细胞坏死、凋亡和程序性坏死在多种肝脏疾病的发生发展中相互联系、相互影响,甚至相互转化。凋亡是由死亡信号、线粒体氧化应激或内质网应激介导的细胞程序性死亡,以caspase家族激活及凋亡小体形成为特点^[8]。程序性坏死是一种与坏死有相似的形态学改变,与凋亡有相似的调控机制的细胞死亡方式,受炎症信号调控,肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor alpha, TNF- α)/肿瘤坏死因子受体1(tumor necrosis factor receptor, TNFR1)信号通路是其经典的激活信号通路,以受体相互作用蛋白3(receptor-interacting protein 3, RIP3)、混合系激酶区域样(mixed lineage kinase domain-like pseudokinase, MLKL)磷酸化激活为特点^[9,10]。肝损伤的病因、诱因及肝细胞的抗损伤能力共同决定肝细胞损伤、死亡,影响肝损伤重症化。因此,在针对肝损伤病因及诱因治疗的同时,提高肝细胞抗损伤能力,减少肝细胞死亡,促进损伤修复是减缓、阻止肝损伤重症化的重要策略。

2. 未折叠蛋白反应整合多种信号,并以多种作用机制参与肝病的发病过程

内质网应激 (endoplasmic reticulum stress) 是一种细胞防御机制, 在各种损伤因素引起内质网稳态失衡, 使内质网腔内未折叠蛋白、错误折叠蛋白聚集, 或在钙离子浓度改变时诱发^[11]。最近研究发现内质网应激在许多肝脏疾病的发病中发挥了重要作用^[12, 13]。我们前期研究发现内质网应激独立于 TNF- α /TNFR1 信号通路介导肝细胞程序性坏死^[14]。

内质网应激表现为 3 种反应类型: 未折叠或错误折叠的蛋白质在内质网蓄积引起的未折叠蛋白反应 (unfolded protein response) ^[15]; 正确折叠的蛋白在内质网过度蓄积, 激活核因子 κ B (nuclear factor kappa B, NF- κ B) 引发的内质网超负荷反应 (endoplasmic reticulum overload response) ^[16]; 胆固醇缺乏引发的胆固醇调节级联反应^[17]。内质网应激不能维持细胞内环境稳态将激活凋亡信号进而触发内质网应激相关凋亡^[18]。

未折叠蛋白反应由需肌醇酶 1 (inositol requiring enzyme 1, IRE1)、活化转录因子 6 alpha (activating transcription factor 6, ATF6 α) 和蛋白激酶 R 样内质网激酶 (protein kinase R-like ER kinase, PERK) 协同介导^[19]。当内质网处于应激状态时, 大量未折叠或错误折叠的蛋白堆积于内质网腔中, 与 3 种跨膜感应蛋白竞争结合葡萄糖调节蛋白 78 (glucose-regulated protein 78, GRP78), 致使 IRE1、PERK 及 ATF6 α 等通路激活, 促进下游信号及相关基因的表达^[20, 21]。

IRE1 具有丝-苏氨酸激酶和核酸内切酶的活性^[22]。IRE1 通过其内切酶活性作用于编码 X 盒结合蛋白 1 (X-box binding protein-1, XBP1) 转录因子的 mRNA 上, 通过剪切掉一段有 26 个碱基的内含子, 产生的 mRNA 发生框移突变后能够翻译成为具有转录活性的剪接型 XBP1 (spliced XBP1, XBP1s)。XBP1s 与 ATF6 α 协同激活下游一系列未折叠蛋白反应基因的转录^[23]。

ATF6 α 激活后在高尔基体中被加工剪切, 进入细胞核, 促进启动子中含有内质网应激反应元件 (ERSE-I, ERSE-II)、未折叠蛋白反应元件 (UPRE) 和 cAMP 响应元件 (CRE) 的基因转录, 上调 ER 相关降解蛋白的表达, 提升细胞清除和降解折叠错误蛋白的能力^[24]。ATF6 α 和 XBP1 是未折叠蛋白反应激活的转录组的主要调节因子^[25]。

PERK 激活能磷酸化真核翻译起始因子 2 α (eukaryotic translational initiation factor 2

alpha, eIF2 α) 的丝氨酸 Ser51 位点, 使其作为 eIF2B 的竞争抑制剂, 抑制细胞整体的蛋白翻译水平, 从而减轻内质网的负担^[14]。同时, eIF2 α 可以选择性启动活化转录因子 4 (acting transcription factor 4, ATF4) 等的表达, ATF4 可进一步诱导 GRP78、生长停滞和 DNA 损伤诱导基因 34 (growth arrest and DNA damage-inducible gene 34, GADD34)、C/EBP 同源蛋白 (C/EBP homoiogous protein, CHOP) 等的表达。GADD34 与蛋白磷酸酶 1 (protein phosphatase 1, PP1) 形成复合物, 促进磷酸化的 eIF2 α 去磷酸化, 恢复蛋白质的合成^[26, 27]。

未折叠蛋白反应和 NF- κ B 信号之间同样存在相互作用^[28]。NF- κ B 是由 Rel 蛋白家族的 5 个成员, 即 Rel (cRel)、p65 (RelA, NF- κ B3)、RelB 和 p50 (NF- κ B1)、p52 (NF- κ B2) 组成的同源或异源二聚体。NF- κ B 的抑制分子 I κ B 通过其 C 末端特定的锚蛋白重复序列与 NF- κ B 结合, 并阻止 NF- κ B 向细胞核内转移。在静息细胞中, NF- κ B 与 I κ B 结合, 以无活性的形式存在于胞浆中。当受到激活信号刺激后, I κ B 激酶复合体 (I κ B kinase, IKK) 使 I κ B 发生磷酸化而失活, I κ B 与 NF- κ B 解离, 游离的 NF- κ B 迅速移位到细胞核, 与特异性 κ B 序列结合, 诱导下游分子的转录。转录因子 NF- κ B 的阻断可导致凋亡增加, 提示存在 NF- κ B 依赖的抗凋亡基因的激活。在脂多糖, TNF- α 刺激下, 肝细胞凋亡抑制蛋白 2 呈 NF- κ B 依赖性表达上调, 抗凋亡基因 Bcl-2 家族成员 A1/BFL-1、促凋亡基因 Bak、Bid 表达均呈 NF- κ B 依赖性表达上调^[29]。NF- κ B 活化同时启动下游促凋亡和抗凋亡基因的表达, 损伤和修复程序同时启动, 但其中的调控机制不清楚。活化的 IRE1 通过与肿瘤坏死因子受体相关因子-2 (TNF receptor-associated factors 2, TRAF2) 结合, 募集 IKK 至内质网附近, 形成 IRE1-TRAF2-IKK 复合物, 使 I κ B 失活, 导致 NF- κ B 活化。PERK 信号通路活化抑制 I κ B 的翻译促使 NF- κ B 入核增加。此外, 活化的 PERK 还能引起一种名为 Tribble 同源蛋白 3 (tribbles homolog 3, TRIB3) 的应激相关蛋白过表达, 后者可以明显增强 NF- κ B 活化。磷酸化的 IRE1 与 TRAF2 和凋亡信号调节激酶 (apoptosis signal-regulating kinase, ASK1) 结合能直接活化 c-Jun 氨基末端酶 JNK, 介导细胞凋亡^[30]。eIF2 α 磷酸化可激活 NF- κ B, 其通过 microRNA-30c-2 诱导 XBP1s mRNA 水平的下调^[31]。我们前期也发现, 内质网应激通过激活 NF- κ B 信号增加多药耐药蛋白

2 (multidrug-resistance protein 2, MRP2) 表达, MRP2 的上调通过负反馈调节内质网应激, 减轻急性肝损伤^[32]。

3. 肝细胞核因子 1 α 精确调控和维持肝脏功能

肝细胞核因子 1 (hepatocyte nuclear factor 1, HNF1), 是参与 II 相代谢酶表达的主要肝富集转录因子之一^[33]。HNF1 是由 HNF1 α 和 HNF1 β 异源或同源二聚体组成的转录调节子, 两者具有相同的 DNA 结合域, 能够以异二聚体形式结合于 GTTAATNATTAAC 的反向回文序列。HNF1 α 在肝中表达, 生物活性较 HNF1 β 高, 与肝细胞表型建成严格平行, 编码产物参与糖代谢、解毒和血浆蛋白合成的生理过程。在肝脏中有许多重要特异基因, 如与解毒、糖及脂代谢相关基因的启动子区具有相应的顺式 HNF1 作用元件, 如 α 、 β -纤维蛋白基因、葡萄糖-6-磷酸酶、载脂蛋白 H (apolipoprotein H, APOH)、 α 1-抗胰蛋白酶以及白蛋白的活化转录因子、人 CYP1A2 基因、大鼠的 CYP2E1 基因、FXR 等^[34]。在肝脏调节 UGT 的转录因子中 HNF1 α 最为重要。基因敲除的 hnf1 α -/- 小鼠除生长迟缓外, 还出现多种代谢紊乱的症状, 如有典型的糖尿病症状、氨基酸代谢紊乱、胆汁酸运输失调、肝脏内胆汁酸和胆固醇生成增加、HDL-胆固醇代谢紊乱^[35]。肝脏发生急性炎症时, HNF1 α 可通过促进 C-反应蛋白的表达参与肝脏急性炎症反应的调节及修复^[36]。

4. 细菌感染与肝损伤重症化

细菌感染是诱发肝损伤进展为肝衰竭、并发肝病相关并发症以及高死亡的重要原因之一, 同时也常常是重症肝病病程中免疫功能紊乱进展的结果。其中以革兰氏阴性菌感染最为常见。脂多糖 (lipopolysaccharide) 是革兰氏阴性细菌细胞壁外壁的组成成分, 由多糖 O 抗原、核心多糖和类脂 A (lipid A) 组成。肠道是革兰氏阴性杆菌最丰富的场所, 在细菌繁殖过程、细菌死亡或裂解时才会释放脂多糖, 所产生的脂多糖经吸收首先到达肝脏。肝脏作为机体重要解毒器官, 是清除脂多糖最活跃场所, 也是免疫损伤常见靶器官^[37]。脂多糖不但可加重肝硬化、酒精性肝损伤, 明显增强四氯化碳和乙醇等肝毒性物质的肝毒性, 且单独脂多糖亦可导致肝损伤, 是革兰氏阴性细菌感染促进肝损伤进展的重要因素^[38, 39]。细菌感染如何影响肝损伤重症化的机制不详。

5. 前期研究提示肝细胞未折叠蛋白反应与 HNF1 α 信号串扰调控, 可能影响肝损伤的重症化

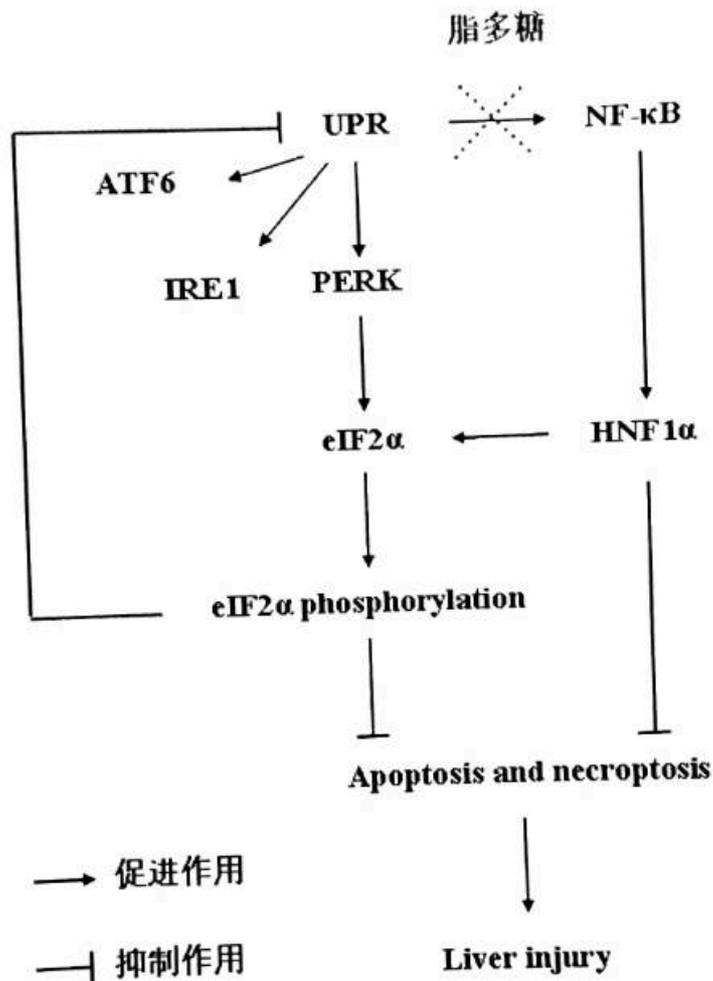
我们围绕肝细胞未折叠蛋白反应与 HNF1 α 信号串扰调控影响肝损伤重症化的主题, 前期进行三方面预实验: ①未折叠蛋白反应与 HNF1 α 信号: 内质网应激可通过不同的机制调控多种功能蛋白表达: 通过激活 ATF4、ATF6 α 、XBP1、NF- κ B 转录因子可在基因转录水平上调应激相关蛋白表达; 通过激活 IRE1核酸内切酶、及磷酸化 eIF2 α 在基因转录水平下调蛋白表达; 通过激活内质网应激相关降解促进错误折叠或未折叠蛋白降解。前期研究发现, 内质网应激在基因转录水平及蛋白翻译水平以不同的机制调控多种信号蛋白表达: 内质网应激通过 ATF6 α 信号在基因转录水平及通过 eIF2 ϵ 信号在蛋白翻译水平增强白介素6受体 gp130表达 (部分结果在投递中, SCI); 内质网应激在体外下调促肝细胞生长因子受体 c-Met^[40]; 内质网应激通过激活 NF- κ B 信号上调胆红素膜转运蛋白 MRP2表达^[32]。HNF1 α 是 MRP2的上游蛋白, 内质网应激可能通过激活 NF- κ B 信号上调 HNF1 α 表达。本研究预实验发现: 未折叠蛋白反应上调急性肝损伤肝内 HNF1 α 及 p-NF- κ B p65表达; 下调肝内 p-NF- κ B p65表达引起急性肝损伤肝内 HNF1 α 表达下调。初步提示: 未折叠蛋白反应通过激活 NF- κ B 信号上调急性肝损伤肝内 HNF1 α 表达。

②HNF1 α 调控未折叠蛋白反应: 预实验发现: 在急性肝损伤小鼠, 靶向敲减 HNF1 α 表达加重肝细胞凋亡、程序性坏死及肝损伤。进一步研究发现 HNF1 α 敲减通过下调 eIF2 α 表达, 减弱 eIF2 α /ATF4信号传递。提示: 敲减 HNF1 α 通过下调急性肝损伤肝内 eIF2 α 表达加重内质网应激、细胞凋亡、程序性坏死, 可能参与肝损伤重症化的过程。

③脂多糖影响未折叠蛋白反应-HNF1 α 串扰调节。预实验发现: 脂多糖通过减少四氯化碳诱导的肝内 NF- κ B p65表达, 减少 p-NF- κ B p65、HNF1 α 表达, 加重肝细胞凋亡及程序性坏死。提示: 细菌感染可能通过影响未折叠蛋白反应-HNF1 α 信号串扰调节模式促进肝损伤重症化。(相关实验结果详见“四、研究基础”部分)

由此推断: 肝细胞未折叠蛋白反应与 HNF1 α 信号串扰调节, 通过调节肝细胞凋亡及程序性坏死, 影响肝损伤重症化 (详见假说模式图)。具体作用机制不详。故基于通过提高肝细胞抗损伤能力, 减轻细胞凋亡及程序性坏死以预防、阻止肝损伤重症化的目

的，拟：通过小鼠模型及细胞模型，首先探讨肝细胞未折叠蛋白反应与 HNF1 α 信号相互调节机制，及其对肝细胞凋亡、程序性坏死、肝损伤的影响；其次探讨未折叠蛋白反应与 HNF1 α 信号串扰调节模式在脂多糖干预（模拟革兰氏阴性细菌感染）中的变化，及其对肝细胞凋亡、程序性坏死及肝损伤的影响。旨在研究未折叠蛋白反应-HNF1 α 信号串扰影响肝损伤重症化的机制及临床意义。



未折叠蛋白反应-HNF1 α 信号串扰影响肝损伤重症化的作用假说模式图

参考文献：

1. Bedossa P: Pathology of non-alcoholic fatty liver disease. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* 2017, 37 Suppl 1:85-89.
2. Collaborators GBDC: The global, regional, and national burden of cirrhosis by cause in 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease

- Study 2017. *The lancet Gastroenterology & hepatology* 2020, **5**(3):245-266.
3. Brahma M, Liu S, Wahed AS, Yim C, Hansen BE, Khalili M, Terrault NA, Lok AS, Ghany M, Wang J *et al*: Alcohol, tobacco and coffee consumption and liver disease severity among individuals with Chronic Hepatitis B infection in North America. *Annals of hepatology* 2020.
 4. Wei X, Yu H, Zhao P, Xie L, Li L, Zhang J: Serum regucalcin is a useful indicator of liver injury severity in patients with hepatitis B virus-related liver diseases. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas* 2019, **52**(10):e8845.
 5. Goto T, Itoh M, Suganami T, Kanai S, Shirakawa I, Sakai T, Asakawa M, Yoneyama T, Kai T, Ogawa Y: Obeticholic acid protects against hepatocyte death and liver fibrosis in a murine model of nonalcoholic steatohepatitis. *Scientific reports* 2018, **8**(1):8157.
 6. Schwabe RF, Luedde T: Apoptosis and necroptosis in the liver: a matter of life and death. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology* 2018, **15**(12):738-752.
 7. Ma SM, Mao Q, Yi L, Zhao MQ, Chen JD: Apoptosis, Autophagy, and Pyroptosis: Immune Escape Strategies for Persistent Infection and Pathogenesis of Classical Swine Fever Virus. *Pathogens* 2019, **8**(4).
 8. Zhao XC, Livingston MJ, Liang XL, Dong Z: Cell Apoptosis and Autophagy in Renal Fibrosis. *Advances in experimental medicine and biology* 2019, **1165**:557-584.
 9. Fauster A, Rebsamen M, Willmann KL, Cesar-Razquin A, Girardi E, Bigenzahn JW, Schischlik F, Scorzoni S, Bruckner M, Konecka J *et al*: Systematic genetic mapping of necroptosis identifies SLC39A7 as modulator of death receptor trafficking. *Cell death and differentiation* 2019, **26**(6):1138-1155.
 10. Grootjans S, Vanden Berghe T, Vandenabeele P: Initiation and execution mechanisms of necroptosis: an overview. *Cell death and differentiation* 2017, **24**(7):1184-1195.
 11. Lai E, Teodoro T, Volchuk A: Endoplasmic reticulum stress: signaling the unfolded protein response. *Physiology* 2007, **22**(3):193-201.
 12. Maiers JL, Malhi H: Endoplasmic Reticulum Stress in Metabolic Liver Diseases and Hepatic Fibrosis. *Seminars in liver disease* 2019, **39**(2):235-248.
 13. Lukas J, Pospech J, Oppermann C, Hund C, Iwanov K, Pantoom S, Petters J, Frech M, Seemann S, Thiel FG *et al*: Role of endoplasmic reticulum stress and protein misfolding in disorders of the liver and pancreas. *Advances in medical sciences* 2019, **64**(2):315-323.
 14. Tian RD, Chen YQ, He YH, Tang YJ, Chen GM, Yang FW, Li Y, Huang WG, Chen H, Liu X *et al*: Phosphorylation of eIF2alpha mitigates endoplasmic reticulum stress and hepatocyte necroptosis in acute liver injury. *Annals of hepatology* 2020, **19**(1):79-87.
 15. Walter P, Ron D: The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science (New York, NY)* 2011, **334**(6059):1081-1086.
 16. Li S, Ye L, Yu X, Xu B, Li K, Zhu X, Liu H, Wu X, Kong L: Hepatitis C virus NS4B induces unfolded protein response and endoplasmic reticulum overload response-dependent NF-kappaB activation. *Virology* 2009, **391**(2):257-264.
 17. Song MJ, Malhi H: The unfolded protein response and hepatic lipid metabolism in non alcoholic fatty liver disease. *Pharmacology & therapeutics* 2019, **203**:107401.
 18. Bian M, He J, Jin H, Lian N, Shao J, Guo Q, Wang S, Zhang F, Zheng S: Oroxylin A induces apoptosis of activated hepatic stellate cells through endoplasmic reticulum stress. *Apoptosis : an*

- international journal on programmed cell death* 2019, **24**(11-12):905-920.
19. Kapoor A, Sanyal AJ: **Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response.** *Clinics in liver disease* 2009, **13**(4):581-590.
 20. Hughes A, Oxford AE, Tawara K, Jorcyk CL, Oxford JT: **Endoplasmic Reticulum Stress and Unfolded Protein Response in Cartilage Pathophysiology; Contributing Factors to Apoptosis and Osteoarthritis.** *International journal of molecular sciences* 2017, **18**(3).
 21. Hetz C: **The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond.** *Nature reviews Molecular cell biology* 2012, **13**(2):89-102.
 22. Bae D, Moore KA, Mella JM, Hayashi SY, Hollien J: **Degradation of Blos1 mRNA by IRE1 repositions lysosomes and protects cells from stress.** *The Journal of cell biology* 2019, **218**(4):1118-1127.
 23. Erffelinck ML, Goossens A: **Review: Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation (ERAD)-Dependent Control of (Tri)terpenoid Metabolism in Plants.** *Planta medica* 2018, **84**(12-13):874-880.
 24. Hillary RF, FitzGerald U: **A lifetime of stress: ATF6 in development and homeostasis.** *Journal of biomedical science* 2018, **25**(1):48.
 25. Shi W, Chen Z, Li L, Liu H, Zhang R, Cheng Q, Xu D, Wu L: **Unravel the molecular mechanism of XBPI in regulating the biology of cancer cells.** *Journal of Cancer* 2019, **10**(9):2035-2046.
 26. Starr CR, Gorbatyuk MS: **Delineating the role of eIF2alpha in retinal degeneration.** *Cell death & disease* 2019, **10**(6):409.
 27. Ghadge GD, Sonobe Y, Camarena A, Drigotas C, Rigo F, Ling KK, Roos RP: **Knockdown of GADD34 in neonatal mutant SOD1 mice ameliorates ALS.** *Neurobiology of disease* 2019, **136**:104702.
 28. Walter F, Schmid J, Dussmann H, Concannon CG, Prehn JH: **Imaging of single cell responses to ER stress indicates that the relative dynamics of IRE1/XBPI and PERK/ATF4 signalling rather than a switch between signalling branches determine cell survival.** *Cell death and differentiation* 2015, **22**(9):1502-1516.
 29. Bava SV, Puliappadamba VT, Deepti A, Nair A, Karunakaran D, Anto RJ: **Sensitization of taxol-induced apoptosis by curcumin involves down-regulation of nuclear factor-kappa B and the serine/threonine kinase Akt and is independent of tubulin polymerization.** *The Journal of biological chemistry* 2018, **293**(31):12283.
 30. Lee WS, Jeong JH, Lee EG, Choi Y, Kim JH, Kim HR, Yoo WH: **Tacrolimus regulates endoplasmic reticulum stress-mediated osteoclastogenesis and inflammation: In vitro and collagen-induced arthritis mouse model.** *Cell biology international* 2018, **42**(4):393-402.
 31. Byrd AE, Aragon IV, Brewer JW: **MicroRNA-30c-2* limits expression of proadaptive factor XBPI in the unfolded protein response.** *The Journal of cell biology* 2012, **196**(6):689-698.
 32. Huang WG, Wang J, Liu YJ, Wang HX, Zhou SZ, Chen H, Yang FW, Li Y, Yi Y, He YH: **Endoplasmic reticulum stress increases multidrug-resistance protein 2 expression and mitigates acute liver injury.** *Current molecular medicine* 2020.
 33. Begum S: **Hepatic Nuclear Factor 1 Alpha (HNF-1alpha) In Human Physiology and Molecular Medicine.** *Current molecular pharmacology* 2020, **13**(1):50-56.
 34. Pontoglio M: **Hepatocyte nuclear factor 1, a transcription factor at the crossroads of glucose**

- homeostasis. *Journal of the American Society of Nephrology* : JASN 2000, **11 Suppl 16**:S140-143.
35. Ramirez J, Mirkov S, Zhang W, Chen P, Das S, Liu W, Ratain MJ, Innocenti F: **Hepatocyte nuclear factor-1 alpha is associated with UGT1A1, UGT1A9 and UGT2B7 mRNA expression in human liver.** *The pharmacogenomics journal* 2008, **8(2)**:152-161.
36. Lau HH, Ng NHJ, Loo LSW, Jasmen JB, Teo AKK: **The molecular functions of hepatocyte nuclear factors - In and beyond the liver.** *Journal of hepatology* 2018, **68(5)**:1033-1048.
37. Nolan JP: **The role of intestinal endotoxin in liver injury: a long and evolving history.** *Hepatology* 2010, **52(5)**:1829-1835.
38. Soares JB, Pimentel-Nunes P, Roncon-Albuquerque R, Leite-Moreira A: **The role of lipopolysaccharide/toll-like receptor 4 signaling in chronic liver diseases.** *Hepatology international* 2010, **4(4)**:659-672.
39. Schaffert CS, Duryee MJ, Hunter CD, Hamilton BC, 3rd, DeVeney AL, Huerter MM, Klassen LW, Thiele GM: **Alcohol metabolites and lipopolysaccharide: roles in the development and/or progression of alcoholic liver disease.** *World journal of gastroenterology* 2009, **15(10)**:1209-1218.
40. He Y, Long J, Zhong W, Fu Y, Li Y, Lin S: **Sustained endoplasmic reticulum stress inhibits hepatocyte proliferation via downregulation of c-Met expression.** *Molecular and cellular biochemistry* 2014, **389(1-2)**:151-158.

三、研究方案

1. 研究内容和研究目标，拟解决的关键问题：

(1) 研究内容：

1) 通过小鼠模型及肝细胞模型，探讨未折叠蛋白反应对 HNF1 α 表达的影响、机制，及在肝损伤重症化中的作用

本部分拟阐明在急性肝损伤中，未折叠蛋白反应通过激活 NF- κ B 信号上调 HNF1 α 表达，反馈减轻肝细胞凋亡、程序性坏死及肝损伤。

动物实验

分别通过四氯化碳（肝损伤小鼠模型常用的诱导剂）、衣霉素（通过影响内质网内糖基化，诱导内质网应激）诱导小鼠急性肝损伤，检测实验小鼠不同时间节点肝损伤、肝细胞凋亡、程序性坏死、未折叠蛋白反应、HNF1 α 表达、NF- κ B 信号的变化，初步探讨未折叠蛋白反应对肝损伤中肝内 HNF1 α 表达的影响，及在肝损伤中的作用。

通过 RNA 干扰技术，预干扰模型小鼠肝内未折叠蛋白反应关键信号蛋白（ATF6 α 、IRE1、PERK）及 NF- κ B p65 表达（因相关信号蛋白表达在肝损伤中均表现为上调，且除 ATF6 α 外功能活性均以磷酸化形式存在，故本部分主要采用敲减预干预），检测肝损伤、肝细胞凋亡、程序性坏死、未折叠蛋白反应、HNF1 α 表达及 NF- κ B 信号变化，探讨未折叠蛋白反应影响急性肝损伤肝内 HNF1 α 表达的机制，及在肝损伤中的作用。

细胞实验

通过毒胡萝卜素（通过影响钙平衡，诱导内质网应激）、衣霉素诱导人正常肝细胞株 L02 细胞发生未折叠蛋白反应，检测不同时间节点未折叠蛋白反应、HNF1 α 表达、NF- κ B 信号、细胞凋亡及程序性坏死的变化，进一步探讨未折叠蛋白反应对肝细胞 HNF1 α 表达、细胞凋亡及程序性坏死的影响。

通过 RNA 干扰技术, 干扰模型细胞中未折叠蛋白反应关键信号蛋白 (ATF6 α 、IRE1、PERK) 及 NF- κ B p65 表达, 检测未折叠蛋白反应、HNF1 α 表达、NF- κ B 信号、细胞凋亡及程序性坏死的变化, 重点探讨肝细胞未折叠蛋白反应影响 HNF1 α 表达的机制。

2) 通过 shRNA 干扰技术, 探讨 HNF1 α 表达对肝内未折叠蛋白反应的影响、机制, 及在肝损伤重症化中的意义

本部分拟阐明在急性肝损伤中, HNF1 α 通过上调 eIF2 α 表达, 反馈减轻未折叠蛋白反应、肝细胞凋亡、及程序性坏死、肝损伤。

动物实验

通过尾静脉注射重组 8 型腺相关病毒 (表达 HNF1 α shRNA; 由于前期研究发现信号蛋白在肝损伤中主要表现为上调, 故本部分主要通过 shRNA 干扰其表达) 预转染 4-6 周, 分别肝脏靶向敲减模型小鼠肝内 HNF1 α 表达, 检测不同时间节点肝内 HNF1 α 表达、未折叠蛋白反应、肝细胞凋亡、程序性坏死、肝损伤的变化, 探讨 HNF1 α 表达对未折叠蛋白反应、肝细胞凋亡、程序性坏死、肝损伤的影响, 及在肝损伤重症化中的意义。

通过重组 8 型腺相关病毒介导 (表达 eIF2 α shRNA; 前期预实验已发现: 肝内敲减 HNF1 α 引起 eIF2 α 表达下调, 且 eIF2 α 激活需磷酸化, 故本部分主要通过 shRNA 干扰其表达), 敲减模型小鼠肝内 eIF2 α 表达, 检测不同时间节点肝内肝损伤、肝细胞凋亡、程序性坏死、未折叠蛋白反应的变化, 探讨 HNF1 α 影响未折叠蛋白反应的机制, 及其对肝细胞凋亡、程序性坏死及肝损伤的影响。

细胞实验

通过携带 HNF1 α shRNA 的质粒预干预 48-72 小时, 分别敲减毒胡萝卜素、衣霉素诱导的肝细胞 HNF1 α 表达, 检测不同时间节点 HNF1 α 表达、未折叠蛋白反应、肝细胞凋亡、程序性坏死的变化, 探讨 HNF1 α 表达对未折叠蛋白反应、肝细胞凋亡及程序性坏死的影响。

通过质粒介导, 敲减模型肝细胞 eIF2 α 表达, 检测不同时间节点未折叠蛋白反

应、肝细胞凋亡、程序性坏死的变化，重点探讨 HNF1 α 影响未折叠蛋白反应的机制。

3) 通过脂多糖部分模拟革兰氏阴性菌感染，探讨其对未折叠蛋白反应-HNF1 α 信号串扰调节及肝损伤的影响

本部分拟阐明脂多糖可改变未折叠蛋白反应-HNF1 α 信号串扰调节模式，即通过影响 NF- κ B-HNF1 α 信号传导，抑制未折叠蛋白反应上调 HNF1 α 表达，显著加剧肝细胞凋亡、程序性坏死，及加重肝损伤。

动物实验

分别通过四氯化碳、衣霉素诱导小鼠急性肝损伤，分组予腹腔注射脂多糖（10 mg/50 ml PBS, 0.5 mg/kg；在生理条件下不引起实验小鼠肝损伤）进行后干预模拟合并革兰阴性菌感染，检测模型小鼠肝内未折叠蛋白反应、HNF1 α 表达、NF- κ B 信号、肝细胞凋亡、程序性坏死、肝损伤变化，探讨脂多糖对未折叠蛋白反应-HNF1 α 串扰调节的影响及机制，及其在肝损伤重症化中的意义。

细胞实验

分别通过胡萝卜素、衣霉素诱导 L02 细胞内质网应激，并分组予脂多糖进行后干预，检测模型细胞未折叠蛋白反应、HNF1 α 表达、NF- κ B 信号、肝细胞凋亡、程序性坏死的变化，进一步探讨脂多糖影响未折叠蛋白反应-HNF1 α 串扰调节的机制、及其对细胞凋亡及程序性坏死的影响。

(2) 研究目标:

基于提高肝细胞抗损伤能力，减轻肝细胞凋亡及程序性坏死以减缓、阻止肝损伤重症化的目的，研究未折叠蛋白反应-HNF1 α 信号串扰影响肝损伤重症化的机制及临床意义，故：

1) 通过肝损伤小鼠模型及肝细胞模型，探讨未折叠蛋白反应对肝内 HNF1 α 表达的影响、机制，及其在肝损伤重症化中的作用；拟阐明在急性肝损伤中，未折叠蛋白反应通过激活 NF- κ B 信号上调 HNF1 α 表达，反馈减轻肝损伤。

2) 通过 shRNA 干扰技术，探讨肝损伤重症化中 HNF1 α 表达对肝内未折叠蛋白

反应的影响、机制及意义；拟阐明在急性肝损伤中，HNF1 α 表达通过上调 eIF2 α 表达，反馈减轻未折叠蛋白反应、肝损伤。

3) 通过脂多糖部分模拟革兰氏阴性菌感染，探讨其对未折叠蛋白反应-HNF1 α 信号串扰调节及肝损伤的影响；拟阐明脂多糖可改变未折叠蛋白反应-HNF1 α 信号串扰调节模式，即通过影响未折叠蛋白反应-NF- κ B-HNF1 α 信号传导，抑制未折叠蛋白反应上调 HNF1 α 表达，显著加剧肝细胞凋亡及程序性坏死，促进肝损伤重症化。

(3) 拟解决的关键科学问题：

肝损伤的病因及肝细胞的抗损伤能力共同决定肝细胞损伤、死亡，影响肝损伤重症化。提高肝细胞抗损伤能力，减少细胞死亡是预防、阻止肝损伤重症化的重要策略。本课题拟解决的关键科学问题是研究未折叠蛋白反应-HNF1 α 信号串扰影响肝损伤重症化的机制及临床意义，以提高肝细胞抗损伤能力，减轻细胞凋亡及程序性坏死，预防、阻止肝损伤重症化。

2. 研究思路、方法、技术路线、实验方案及可行性分析：

研究思路、方法及方案

1) 通过小鼠模型及肝细胞模型，探讨未折叠蛋白反应对 HNF1 α 表达的影响、机制，及在肝损伤重症化中的作用

动物实验

① 实验动物使用 SPF 级雄性 BALB/c 小鼠，分别予四氯化碳、衣霉素腹腔注射实验小鼠，检测实验小鼠不同时间节点（12、24、48、72 小时）肝损伤（统计小鼠死亡率、血清生化学指标、HE 染色观察肝脏病理形态学改变）变化，确定成功建立急性肝损伤小鼠模型。

四氯化碳诱导小鼠急性肝损伤：随机分为：模型组：四氯化碳与橄榄油按体积比为 1:4 的比例混合，0.22 μ m 滤菌器滤菌，4-8 $^{\circ}$ C 保存，5 mL/kg，腹腔注射，给药 1 次，注射前禁饮禁食 6 小时；对照组：橄榄油，0.22 μ m 滤菌器滤菌，4-8 $^{\circ}$ C 保存，5 mL/kg，腹腔注射，给药 1 次。每个时间节点每组 12 只小鼠。

衣霉素诱导小鼠急性肝损伤：随机分为：模型组：2 mg 衣霉素先溶于 50 μ L DMSO，再溶于 5 mL 的 PBS 中，2 mg/kg（5 mL/kg），腹腔注射，给药 1 次，注射前禁饮禁食 6 小时；对照组：50 μ L DMSO 溶于 5 mL 的 PBS 中，5 mL/kg，腹腔注射，给药 1 次。每个时间节点每组 12 只小鼠。

② 检测实验小鼠肝内肝细胞凋亡（Western blot 检测 CHOP、cleaved caspase-3、TUNEL 法染色）、程序性坏死（Western blot 检测 p-RIP3 及 p-MLKL，免疫组化测 p-MLKL）、未折叠蛋白反应（Western blot 测 p-PERK、p-eIF2 α 、eIF2 α 、ATF4、ATF6 α 、p-IRE1、GRP78）、HNF1 α 、NF- κ B p65 和 p-NF- κ B p65 表达（Western blot、免疫组化测蛋白表达、qPCR 测 mRNA 表达）的变化，初步探讨未折叠蛋白反应对肝损伤中肝内 HNF1 α 表达的影响，及在肝损伤中的作用。

③ 通过 RNA 干扰技术，预干扰模型小鼠肝内未折叠蛋白反应关键信号蛋白（ATF6 α 、IRE1、PERK）及 NF- κ B p65 表达，检测肝细胞凋亡（Western blot 检测

CHOP、cleaved caspase-3、TUNEL 法染色)、程序性坏死 (Western blot 检测 p-RIP3 及 p-MLKL, 免疫组化测 p-MLKL)、未折叠蛋白反应 (Western blot 测 p-PERK、p-eIF2 α 、eIF2 α 、ATF6 α 、p-IRE1、GRP78), 及 HNF1 α 表达 (Western blot、免疫组化测蛋白表达、qPCR 测 mRNA 表达) 的变化, 探讨未折叠蛋白反应影响急性肝损伤肝内 HNF1 α 表达的机制, 及在肝损伤中的作用。

通过尾静脉注射重组 8 型腺相关病毒, 每只小鼠每次注射 $1-2 \times 10^{10}$ viral genome copies (溶于 0.1 mL PBS 中); 预干预 4-8 周后, 开始四氯化碳、衣霉素建模, 并检测实验小鼠的相关指标。

基因干扰或过表达均通过 Western blot 检测目标蛋白表达及 PCR 检测目标基因 mRNA 表达确定预干预是否成功。(见技术路线 1A)

细胞实验

④通过毒胡萝卜素、衣霉素诱导 L02 细胞发生未折叠蛋白反应, 检测不同时间节点 (12、24、48 小时) 细胞凋亡 (Western blot 检测 CHOP、cleaved caspase-3 表达, 流式细胞法检测细胞凋亡率)、程序性坏死 (Western blot 测 p-RIP3、p-MLKL 表达)、未折叠蛋白反应 (Western blot 测 p-PERK、p-eIF2 α 、eIF2 α 、ATF4、ATF6 α 、p-IRE1、XBP1s、GRP78)、HNF1 α 及 p-NF- κ B p65 表达 (Western blot 测蛋白表达、qPCR 测 mRNA 表达; p-NF- κ B p65 不查 PCR) 的变化, 观察模型细胞未折叠蛋白反应、HNF1 α 表达、NF- κ B 信号的变化。

注: 毒胡萝卜素, 溶于 DMSO, 使用浓度为 0.5-2 μ mol/L; 衣霉素, 溶于 DMSO 为溶剂, 使用浓度为 0.5-2 mg/L。

⑤通过 RNA 干扰技术, 预干扰模型细胞中未折叠蛋白反应关键信号 (ATF6 α 、IRE1、PERK) 及 p-NF- κ B p65 表达, 检测细胞凋亡、程序性坏死、未折叠蛋白反应, HNF1 α 及 p-NF- κ B p65 表达, 重点探讨未折叠蛋白反应影响 HNF1 α 表达的机制。

质粒预干预 48-72 小时, 开始毒胡萝卜素、衣霉素诱导建模, 并检测 12、24、48 小时实验细胞相关指标。(见技术路线 1B)

2) 通过 shRNA 干扰技术, 探讨 HNF1 α 表达对肝内未折叠蛋白反应的影响、机制, 及在肝损伤重症化中的意义

动物实验

通过尾静脉注射重组 8 型腺相关病毒 (表达 HNF1 α shRNA、eIF2 α shRNA) 预转染, 分别敲减肝损伤模型小鼠肝内 HNF1 α 、eIF2 α 表达, 检测: 实验小鼠不同时间节点 (24、48 小时) HNF1 α 表达 (Western blot 测蛋白表达、qPCR 测 mRNA 表达)、未折叠蛋白反应 (Western blot 测 p-PERK、p-eIF2 α 、eIF2 α 、ATF4、ATF6 α 、p-IRE1、GRP78)、肝损伤 (统计小鼠死亡率、血清生化学指标、HE 染色观察肝脏病理形态学)、肝细胞凋亡 (Western blot 检测 CHOP、cleaved caspase-3 表达, TUNEL 染色法检测凋亡率), 及程序性坏死 (Western blot 测 p-RIP3、p-MLKL 表达, 免疫组化测 p-MLKL 表达) 的变化, 探讨肝内 HNF1 α 表达对未折叠蛋白反应的影响、机制及在肝损伤重症化中意义。(见技术路线 2A)

细胞实验

分别通过携带 HNF1 α shRNA、eIF2 α shRNA 的质粒预转染模型肝细胞, 敲减 HNF1 α 、eIF2 α 表达, 检测不同时间节点 (24、48 小时) HNF1 α 表达 (Western blot 测蛋白表达、qPCR 测 mRNA 表达)、未折叠蛋白反应 (Western blot 测 p-PERK、p-eIF2 α 、eIF2 α 、ATF4、ATF6 α 、p-IRE1、GRP78)、肝细胞凋亡 (Western blot 检测 CHOP、cleaved caspase-3 表达, 流式细胞法检测细胞凋亡率) 及程序性坏死 (Western blot 测 p-RIP3、p-MLKL 表达) 的变化, 探讨 HNF1 α 表达对未折叠蛋白反应、肝细胞凋亡及程序性坏死的影响及机制。(见技术路线 2B)

3) 通过脂多糖部分模拟革兰氏阴性菌感染, 探讨其对未折叠蛋白反应-HNF1 α 信号串扰调节及肝损伤的影响

动物实验

分别通过四氯化碳、衣霉素诱导小鼠急性肝损伤, 分组腹腔注射脂多糖 (0.5 mg/kg, 在生理条件下不引起实验小鼠肝损伤) 进行后干预 (完成建模后 6 小时注射脂多糖), 检测实验小鼠不同时间节点 (24、48 小时) 肝内未折叠蛋白反应 (p-PERK、p-eIF2 α 、eIF2 α 、ATF6 α 、p-IRE1、GRP78)、HNF1 α 、NF- κ B p65 及 p-NF- κ B p65 表达 (Western blot 测蛋白表达、qPCR 测 mRNA 表达; p-NF- κ B p65 不查 PCR)、肝细胞凋亡 (Western blot 检测 CHOP、cleaved caspase-3、TUNEL 法染色)、程序性坏死 (Western blot 检测 p-RIP3 及 p-MLKL, 免疫组化测 p-MLKL)、肝损伤 (血清生化学指标、HE 染色观察肝脏病理形态学) 变化, 探讨脂多糖对未折叠蛋白反应-HNF1 α 串扰调节的影响, 及在肝损伤重症化中的意义。(见技术路线 3A)

细胞实验

分别通过胡萝卜素、衣霉素诱导 L02 细胞内质网应激, 并分组予脂多糖进行后干预, 检测不同时间节点 (24、48 小时) 未折叠蛋白反应 (p-PERK、p-eIF2 α 、eIF2 α 、ATF6 α 、p-IRE1、GRP78)、HNF1 α 、NF- κ B p65 及 p-NF- κ B p65 表达 (Western blot 测蛋白表达、qPCR 测 mRNA 表达; p-NF- κ B p65 不查 PCR)、肝细胞凋亡 (Western blot 检测 CHOP、cleaved caspase-3 表达, 流式细胞法检测细胞凋亡率)、程序性坏死 (Western blot 测 p-RIP3、p-MLKL 表达) 的变化, 进一步探讨脂多糖对未折叠蛋白反应-HNF1 α 串扰调节的影响、及其对细胞凋亡及程序性坏死的影响。(见技术路线 3B)

技术路线

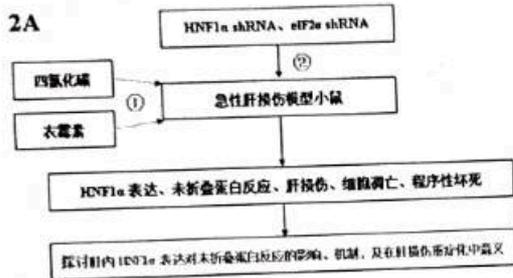
1A



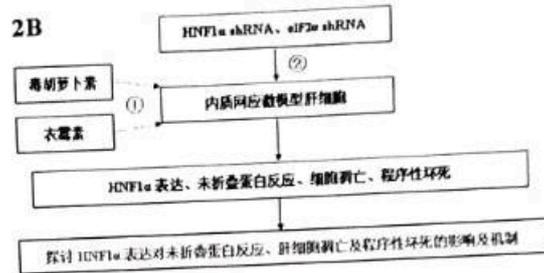
1B



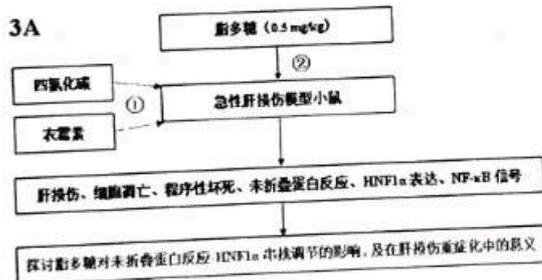
2A



2B



3A



3B



可行性分析

1) 探讨未折叠蛋白反应对肝内 HNF1 α 表达的影响、机制，及在肝损伤重症化中的作用

本部分的关键是研究未折叠蛋白反应影响肝内 HNF1 α 表达的机制。内质网应激可通过不同的机制调控多种功能蛋白表达：通过激活 ATF4、ATF6 α 、XBP1、NF- κ B 等转录因子可在基因转录水平上调应激相关蛋白表达；通过激活 IRE1 核酸内切酶、及磷酸化 eIF2 α 在基因转录水平下调蛋白表达；通过激活内质网应激相关降解促进错误折叠或未折叠蛋白降解。前期研究发现，内质网应激在基因转录水平及蛋白翻译水平以不同的机制调控多种信号蛋白表达：内质网应激通过 ATF6 α 信号在基因转录水平及通过 eIF2 α 信号在蛋白翻译水平增强白介素6受体 gp130 表达（部分结果在投递中，SCI）；内质网应激在体外下调促肝细胞生长因子受体 c-Met（Y. He, et al. Mol Cell Biochem. 2014, 389: 151-158）；内质网应激通过激活 NF- κ B 信号上调胆红素膜转运蛋白 MRP2 表达（Huang WG, et al. Curr Mol Med. 2020, Jan 23）。HNF1 α 是 MRP2 的上游信号蛋白，内质网应激可能通过激活 NF- κ B 信号上调信号 HNF1 α 表达。本研究预实验发现：未折叠蛋白反应上调急性肝损伤肝内 HNF1 α 及 p-NF- κ B 表达；下调 p-NF- κ B 表达引起急性肝损伤肝内 HNF1 α 表达下调。初步提示：未折叠蛋白反应通过激活 NF- κ B 信号上调急性肝损伤肝内 HNF1 α 。故前期研究为顺利完成本部分研究做了充分的准备，确保课题顺利完成。

2) 探讨 HNF1 α 表达对肝内未折叠蛋白反应的、机制，及在肝损伤重症化中的意义

本部分的关键是研究 HNF1 α 影响未折叠蛋白反应的机制。前期我们预实验发现：在急性肝损伤小鼠，HNF1 α 敲减加重肝细胞凋亡、程序性坏死及肝损伤。进一步研究发现 HNF1 α 敲减引起 eIF2 α 表达下调，减弱 eIF2 α /ATF4 信号传递。提示：敲减 HNF1 α 通过下调急性肝损伤肝内 eIF2 α 表达加重内质网应激、细胞凋亡、程序性坏死，参与肝损伤重症化的过程。预实验已进行本分部关键机制的探讨，并初步验证了研究的可行性。

3) 通过脂多糖干预部分模拟革兰氏细菌感染, 探讨其对未折叠蛋白反应-HNF1 α 信号串扰调节及肝损伤的影响

合并细菌感染是肝损伤重症化的危险因素。预实验发现: 脂多糖 (0.5mg/kg, 对正常小鼠不引起肝损伤) 减少四氯化碳诱导的肝内 NF- κ B p65 表达, 减少 p-NF- κ B p65HNF1 α 表达, 加重肝细胞凋亡及程序性坏死。提示: 影响未折叠蛋白反应-HNF1 α 信号串扰调节模式可能是合并细菌感染促进肝损伤重症化的机制之一。本部分基于临床特点及预实验提出, 是综合前两部分的研究内容论证未折叠蛋白反应-HNF1 α 信号串扰影响肝损伤重症化的机制, 有较好的可行性。

3.本项目的特色和创新之处:

(1) 从未折叠蛋白反应影响 HNF1 α 表达的角度, 探讨肝损伤重症化的机制

HNF1 α 是重要的肝富集转录因子, 影响其表达将可能影响肝脏特有功能。在肝损伤中, 未折叠蛋白反应对 HNF1 α 表达的影响尚不清楚。我们前期预实验发现未折叠蛋白反应上调肝内 HNF1 α 蛋白表达, 但具体机制可能与 NF- κ B 信号激活有关。本部分研究拟探讨未折叠蛋白反应通过激活 NF- κ B 信号上调 HNF1 α 表达, 反馈减轻肝细胞凋亡、程序性坏死、肝损伤, 即从未折叠蛋白反应影响 HNF1 α 表达的角度, 探讨肝损伤重症化的机制。为本研究的一个特色与创新之处。

(2) 从肝内 HNF1 α 表达调控未折叠蛋白反应的角度, 探讨其在肝损伤重症化中的机制

未折叠蛋白反应接受多种信号调控。我们预实验发现: 在急性肝损伤小鼠, 敲减肝内 HNF1 α 表达通过下调 eIF2 α , 减弱 eIF2 α /ATF4 信号活性, 加重肝损伤。提示: 肝内 HNF1 α 通过上调 eIF2 α 表达, 减轻内质网应激、肝细胞凋亡、程序性坏死, 进而反馈减轻肝损伤, 即引起 HNF1 α 表达下调的因素可能是促进肝损伤重症化原因之一。故本部分拟从肝内 HNF1 α 表达调控未折叠蛋白反应的角度, 探讨其在肝损伤重症化中的机制, 为本研究的第二个特色与创新之处。

(3) 通过脂多糖部分模拟革兰氏阴性菌感染, 探讨其对未折叠蛋白反应-HNF1 α 信号串扰调节及肝损伤的影响

合并细菌感染是肝损伤重症化的危险因素。本部分基于临床, 通过脂多糖干预, 探讨未折叠蛋白反应-HNF1 α 信号串扰调节模式变化, 其对细胞凋亡及程序性坏死的影响。拟初步阐明脂多糖通过改变未折叠蛋白反应-HNF1 α 信号串扰调节模式, 即通过下调 NF- κ B 表达, 抑制未折叠蛋白反应对 HNF1 α 表达的上调作用, 显著加剧肝细胞凋亡及程序性坏死。本部分是综合前两部分的研究内容论证未折叠蛋白反应-HNF1 α 信号串扰影响肝损伤重症化的机制, 为本研究的第三个特色与创新之处。

4. 研究进度计划：

2020年07月01日-2020年12月31日：

通过肝损伤小鼠模型及内质网应激肝细胞模型，探讨未折叠蛋白反应对肝内HNF1 α 表达的影响、机制，及在肝损伤重症化中的作用。

2021年01月01日-2021年06月30日：

通过 shRNA 干扰技术，探讨 HNF1 α 表达对肝内未折叠蛋白反应的影响、机制，及在肝损伤重症化中的意义。

2021年07月01日-2022年06月30日：

通过脂多糖干预部分模拟革兰氏阴性菌感染，探讨其对未折叠蛋白反应-HNF1 α 信号串扰调节及肝损伤的影响。

2022年07月01日-2022年12月31日：

数据分析、总结、补充实验。

5. 预期研究成果：

(1) 初步阐明未折叠蛋白反应-HNF1 α 信号串扰影响肝损伤重症化的机制及临床意义；

(2) 完成研究报告 1 份；

(3) 发表 SCI 论文 1 篇；

(4) 培养硕士研究生 1 人。

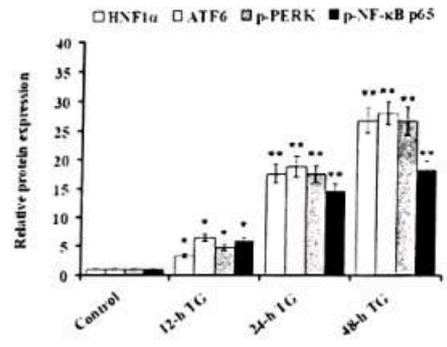
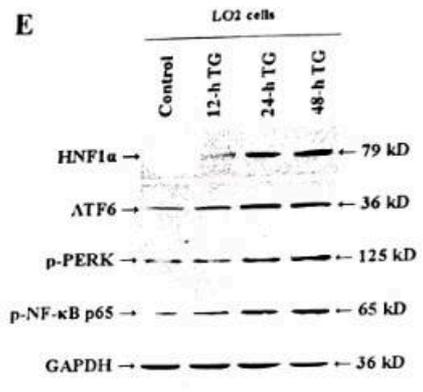
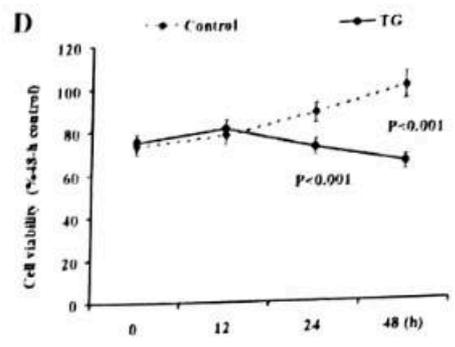
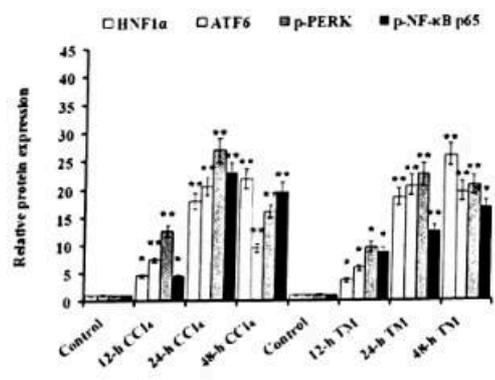
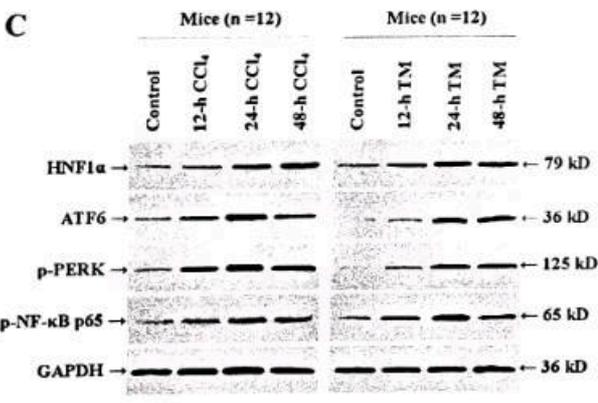
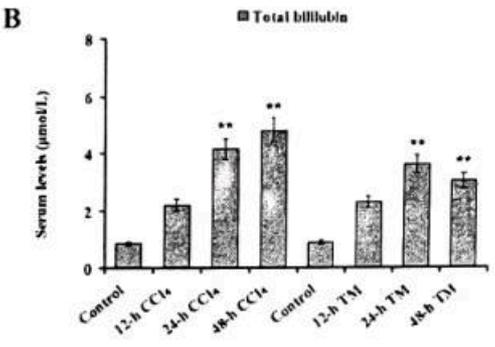
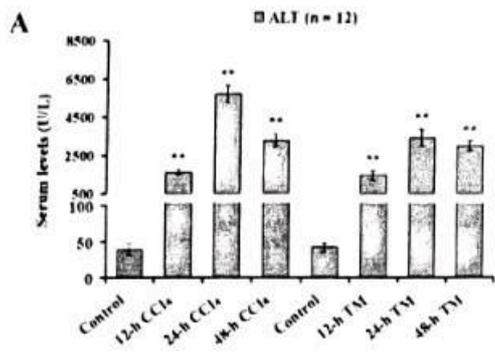
四、研究基础

1. 与本项目有关的研究工作积累和已取得的研究工作成绩：

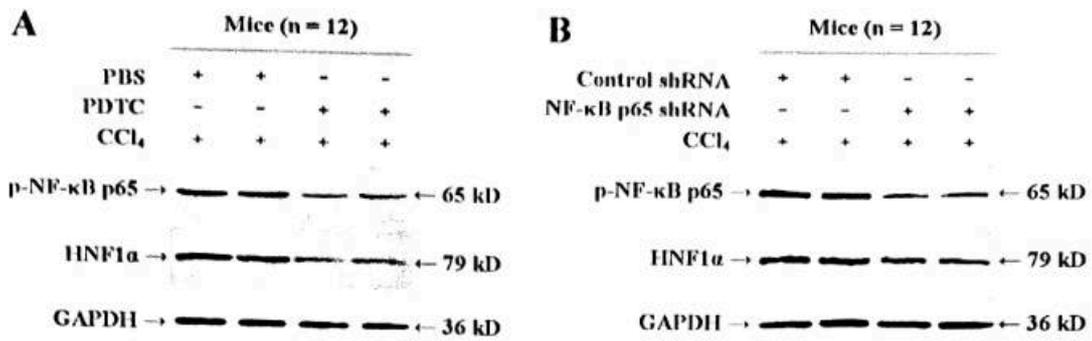
申请人及其所在的课题组从事未折叠蛋白反应与肝病相关的基础与临床研究10余年, 有较好的研究基础, 本课题中实验所涉及的关键技术均已在课题组中开展, 为本课题研究的开展奠定坚实技术基础。申请人已完成国家自然科学基金1项及贵州省省级课题1项。正在主持贵州省省级支撑项目基金1项。近5年以通讯作者发表SCI论文4篇。

围绕本课题, 本团队前期已进行三方面研究:

(1) 未折叠蛋白反应调控 HNF1 α 表达: 前期研究发现, 内质网应激在基因转录水平及蛋白翻译水平以不同的机制调控多种信号蛋白表达: 内质网应激通过 ATF6信号在基因转录水平及通过 eIF2 ϵ 信号在蛋白翻译水平增强白介素6受体 gp130表达 (部分结果在投递中, SCI); 内质网应激在体外下调促肝细胞生长因子受体 c-Met (Y. He, et al. Mol Cell Biochem. 2014, 389: 151-158); 内质网应激通过激活 NF- κ B 信号上调胆红素膜转运蛋白 MRP2表达 (Huang WG, et al. Curr Mol Med. 2020, Jan 23)。本研究预实验发现: 未折叠蛋白反应上调急性肝损伤肝内 HNF1 α 及 p-NF- κ B 表达 (前期研究1A); 下调 p-NF- κ B p65表达引起急性肝损伤肝内 HNF1 α 表达下调 (前期研究1B)。初步提示: 未折叠蛋白反应通过激活 NF- κ B 信号上调急性肝损伤肝内 HNF1 α 。

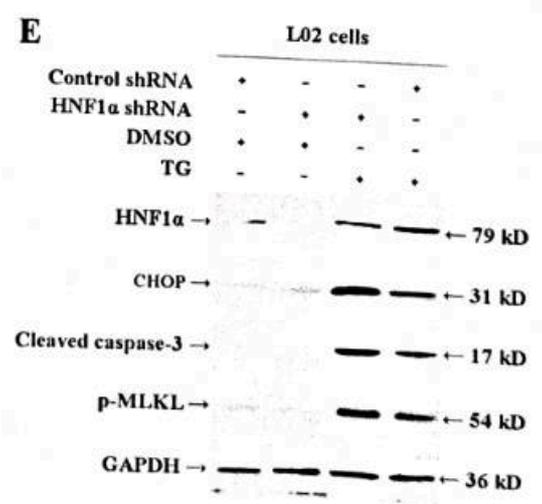
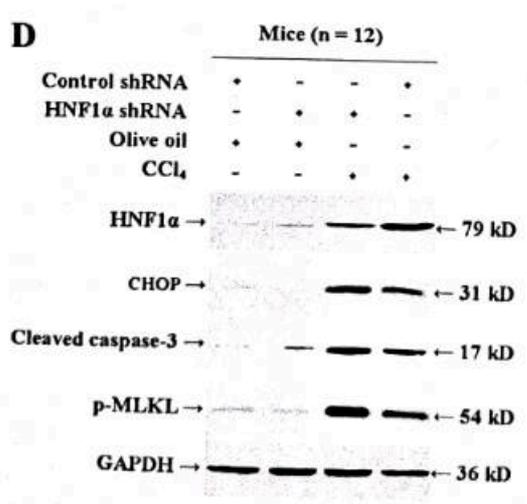
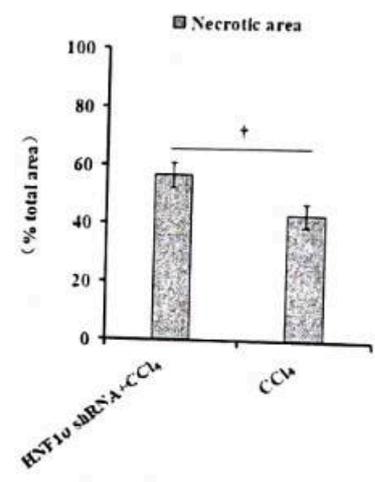
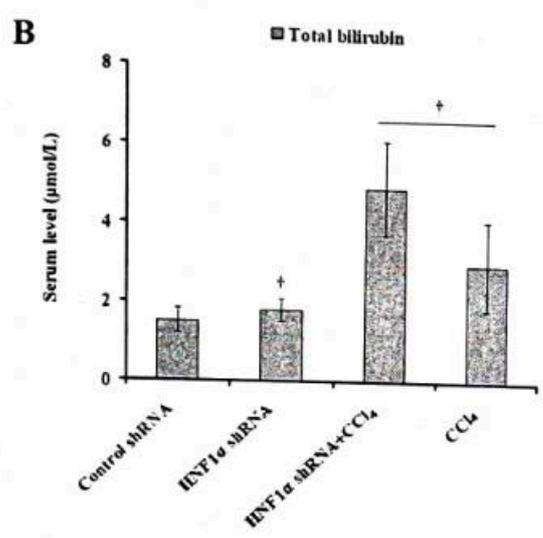
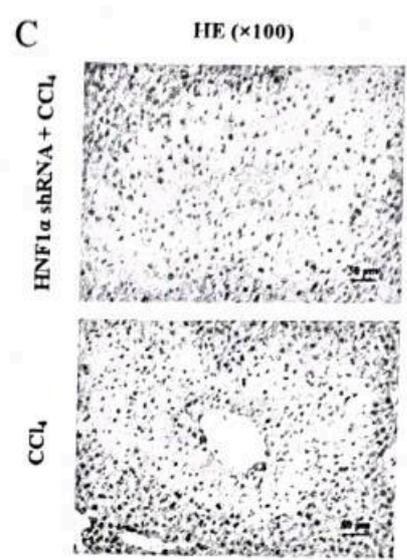
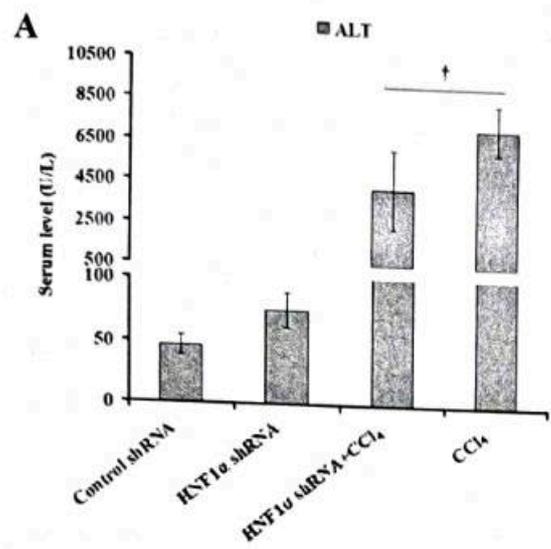


前期研究1A 未折叠蛋白反应上调急性肝损伤肝内 HNF1α及 NF-κB 表达



前期研究1B 下调 p-NF-κB p65表达引起急性肝损伤肝内 HNF1α表达下调

(2) HNF1α调控未折叠蛋白反应：预实验发现：在急性肝损伤小鼠，HNF1α敲减加重肝细胞内质网应激、凋亡、程序性坏死及肝损伤（前期研究2A）。进一步研究发现 HNF1α敲减引起 eIF2α表达下调，减弱 eIF2α/ATF4信号传递（前期研究2B）。提示：敲减 HNF1α通过下调急性肝损伤肝内 eIF2α表达，影响 eIF2α/ATF4信号传递，加重内质网应激，进而加剧细胞凋亡、程序性坏死，促进肝损伤重症化的过程。



前期研究2A HNF1 α 下调加重急性肝损伤肝内内质网应激、肝细胞凋亡及程序性坏死

2. 已具备的实验条件和资料,尚缺少的实验条件和资料及解决的途径:

遵义医科大学附属医院为省直属三级甲等综合医院,是贵州省区域医疗中心之一。医院具有较强的科研实力,拥有国家临床研究中心分中心1个、省重点实验室2个、省高校特色重点实验室和工程研究中心4个、省临床医学研究中心3个、省“2011协同创新中心”2个、省人才基地2个、省科技创新人才团队13个和省高等学校科技创新人才团队5个。近几年又制订了一系列大力扶持科研发展的政策、投入大量经费改善科研条件,近三年,参与和主持了多项包括国家“十一五科技支撑计划”,国家自然科学基金,国家自然科学基金重大专项,贵州省科技厅重大专项,中药现代化新药开发等科研项目。

遵义医科大学附属医院感染科目前具有开展细胞培养、PCR、Western blot 等实验的技术和条件,目前已组成人员结构合理、具有良好科研素质和创新精神、勤奋刻苦、精力充沛的科研团队。先后承担并完成了国家自然科学基金、贵州省省长基金、贵州省重大国际合作项目、贵州省社会发展重大课题。其中承担国家自然科学基金4项、已结题3项,科研水平得到了明显提高。获贵州省科技进步二等奖两次、三等奖一次。

遵义医科大学附属医院的感染科实验室、全科实验室和细胞工程重点实验室,以及遵义医科大学中心实验室具有开展细胞培养、流式细胞仪、定量 PCR、Western blot、酶联免疫等研究条件,在不用添加新设备的情况下可保证本研究顺利完成。

3. 申请者和项目组主要成员研究工作简历，与本项目有关的研究工作积累和已取得的研究成绩；近期发表与本项目有关的主要成果、论著目录、获得学术奖励情况及在本项目中承担的任务：

申请者研究工作简历

何毅怀，遵义医科大学，附属医院，感染科，主治医师，硕士生导师。主要研究方向：重症肝病的发病机制及诊疗。目前已主持并结题 1 项国家自然科学基金课题及 1 项省级基金课题。以第一作者或通讯作者发表 SCI 论文 5 篇。

教育经历：

2009-09 至 2012-06 遵义医学院，传染内科，硕士，导师：林世德

2000-09 至 2005-06 遵义医学院，临床医学，学士

科研与学术工作经历：

(1) 2019-01 至现在 遵义医科大学，附属医院，感染科，主治医师

(2) 2015-01 至 2018-12 遵义医学院，附属医院，感染科，主治医师

(3) 2012-08 至 2014-12 遵义医学院，附属医院，感染科，医师

(4) 2005-08 至 2009-08 昭通市永善县人民医院，外科及内科，医师

主持或参加科研项目（课题）情况（按时间倒序排序）：

(1) 贵州省科技厅，科技支撑计划项目，黔科合支撑[2019]2803 号，肝细胞内质网应激差异性反应对肝损伤重症化的影响及机制研究，2019-01 至 2021-12，40 万元，在研，主持。

(2) 贵州省科技厅，联合资金，黔科合 LH 字[2017]7093 号，PERK/eIF2 α 通路在小鼠急性肝衰竭中的作用及机制，8 万，201709-202008，已提前结题，主持：何毅怀。

(3) 国家自然科学基金委员会，地区基金项目，81560110，内质网应激在急性肝衰竭小鼠肝再生中的作用探讨，37 万，2016-01 至 2019-12，已结题，主持。

代表性研究成果和学术奖励情况

代表性论著（#：并列第一作者；*通讯作者）

(1) Yong-Jing Tang#, Huan Chen#, Yu Yi, Gui-Mei Chen, Fang-Wan Yang, Ying Li, Ren-Dong Tian, Wen-Ge Huang, Qi-Jiao Cheng, **Yi-Huai He***; Inhibition of eIF2 α dephosphorylation protects hepatocytes from apoptosis by alleviating ER stress in acute liver injury, *BioMed Research International*, 2626090.v2,(于 2020 年 4 月 28 日已接收)

(2) Wen-Ge Huang#; Jun Wang#; Yu-Juan Liu; Hong-Xia Wang; Si-Zhen Zhou; Huan Chen; Fang-Wan Yang; Ying Li; Yu Yi; **Yi-Huai He***; Endoplasmic reticulum stress increases multidrug-resistance protein 2 expression and mitigates acute liver injury, *Current Molecular Medicine*, 2020, Jan 23.

(3) Guimei Chen#; Xuemei Yang#; **Yihuai He***; Yongjing Tang; Rendong Tian; Wenge Huang; Huan Chen; Fangwan Yang; Ying Li; Shide Lin; Inhibiting alpha subunit of eukaryotic initiation factor 2 dephosphorylation protects injured hepatocytes and reduces hepatocyte proliferation in acute liver injury, *croatian medical journal*, 2019, 60(6): 532-544.

(4) Ren-Dong Tian#; Yi-Qun Chen#; **Yi-Huai He***; Yong-Jing Tang; Gui-Mei Chen; Fang-Wan Yang; Ying Li; Wen-Ge Huang; Huan Chen; Xia Liu; Shi-De; Phosphorylation of eIF2 α mitigates endoplasmic reticulum stress and hepatocyte necroptosis in acute liver injury, *Annals of Hepatology*, 2019, 19(1): 79-87.

(5) **Yihuai He**; Long Jun; Weiwei Zhong; Yu Fu; Ling Li; Shide Lin*; Sustained Endoplasmic Reticulum Stress Inhibited Hepatocyte proliferation via Downregulation of c-Met Expression, *Molecular and cellular biochemistry*, 2014, 389(1-2): 151-158.

在本项目中承担的任务

主持项目研究

主要成员研究工作简历（一）

罗亚文，遵义医科大学，附属医院，感染科，主任医师，硕士生导师。

教育经历：

2004-09 至 2007-07，遵义医学院，免疫学，硕士，导师：罗军敏

1988-09 至 1993-06，遵义医学院，临床医学系，学士

科研与学术工作经历：

(1) 2019-01 至现在，遵义医科大学，附属医院，感染科，主任医师

(2) 2009-01 至 2018-12，遵义医学院，附属医院，感染科，主任医师

(3) 2004-01 至 2008-12，遵义医学院，附属医院，感染科，副主任医师

(4) 1999-01 至 2003-12，遵义医学院，附属医院，感染科，主治医师

(5) 1993-07 至 1998-12，遵义医学院，附属医院，感染科，住院医师

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) 遵义市科技局，科技联合基金项目，遵市科合社字（2018）83，转录因子 KLF4 调控巨噬细胞极化与 CHB 患者肝纤维化的关系研究。2018-09 至 2021-08，3.5 万元，在研，主持。

(2) 贵州省科技厅，社会发展科技攻关项目，黔科合 SY 字（2011）3048，抗病毒治疗对 CHB 患者 PD-1/PD-L1 在 Th17、Tregs 和 CD8+CTL 上表达的影响，2011-06 至 2013-06，10 万元，已结题，主持。

(3) 遵义医学院，硕士启动基金，院字（2007）58 号，IP-10 及 CXCR3 水平与慢性乙型病毒性肝炎患者肝脏炎症程度的关系，2008-01 至 2010-12，1 万元，已结题，主持。

代表性论著 (*通讯作者)

(1)胡亚南;单永业;罗亚文;Th17/Treg 比率在慢性乙型肝炎患者外周血的动态变化及意义, *中国免疫学杂志*, 2017, (第7期).

(2)程雪;单永业;罗亚文*;Th17/调节性T淋巴细胞比率在急性乙型肝炎患者外周血的动态变化及其意义, *中华肝脏病杂志*, 2016, 24(5): 100-103.

(3)程雪;单永业;罗亚文*;李佳;辅助性T淋巴细胞17及相关细胞因子在急性乙型肝炎患者外周血中的动态变化及意义, *中华传染病杂志*, 2015, 9(33): 518-521.

(4)冉燕;李佳;罗亚文*;易学东;赵建军;抗结核药物相关性肝损伤患者外周血辅助性T淋巴细胞17/调节性T淋巴细胞比率的变化及其意义, *中华传染病杂志*, 2015, 8(33): 456-459.

论著之外的代表性研究成果和学术奖励

罗亚文(2/13);慢性乙型肝炎相关发病学与临床治疗研究,贵州省人民政府,贵州省科学技术进步奖三等奖, 2011.11(李佳;罗亚文;邱隆敏;林世德;陈应华;龙骏;苏毅;李丽娟;肖寒;陈宇;冉燕;黄梅;杨方万).

在本项目中承担的任务

指导及协助项目研究

主要成员研究工作简历（二）

杨方万，遵义医科大学，附属医院，感染科，主治医师。

教育经历：

2012-09 至 2015-07，遵义医学院，传染内科，硕士，导师：林世德

2002-09 至 2007-07，遵义医学院，临床医学，学士

科研与学术工作经历：

(1) 2019-01 至现在，遵义医科大学，附属医院，感染科，主治医师

(2) 2015-01 至 2018-12，遵义医学院，附属医院，感染科，主治医师

(3) 2010-07 至 2015-12，遵义医学院，附属医院，感染科，医师

主持或参加科研项目（课题）情况（按时间倒序排序）：

(1) 国家自然科学基金委员会，地区科学基金项目，814600124，肝细胞内质网应激对乙型肝炎病毒复制及核苷（酸）类抗病毒药物作用的影响，2015-01 至 2018-12，47 万元，已结题，参加。

(2) 国家自然科学基金委员会，地区科学基金项目，81160067，急性肝衰竭小鼠肝细胞内质网应激及其对肝再生信号传递的影响，2012-01 至 2015-12，46 万元，已结题，参加。

(3) 国家自然科学基金委员会，地区科学基金项目，81560110，内质网应激在急性肝衰竭肝再生障碍中的作用探讨，2016-01 至 2019-12，37 万，已结题，参加。

代表性论著（#：并列第一作者；*通讯作者）

(1) **Yang F[#]**; Fu Y[#]; Li Y; He Y; Mu M; Liu Q; Long J; Lin S^{*}; Prostaglandin E1 protects hepatocytes against endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis via protein kinase A-dependent induction of glucose-regulated protein 78 expression, *World Journal of Gastroenterology*, 2017, 23(40): 7253-7264.

在本项目中承担的任务

具体实验：探讨未折叠蛋白反应对肝内 HNF1 α 表达的影响、机制，及在肝损伤重症化中的作用。

主要成员研究工作简历（三）

程其娇，遵义医科大学，附属医院，感染科，医师

教育经历：

2014-09 至 2017-06 遵义医科大学，消化内科，硕士，导师：陈安海

2009-09 至 2014-06 遵义医学院，珠海校区，临床医学，学士

科研与学术工作经历：

2019-01 至现在 遵义医科大学，附属医院，感染科，医师

2017-10 至 2018-12 遵义医学院，附属医院，感染科，医师

主持或参加科研项目（课题）情况（按时间倒序排序）

国家自然科学基金委员会，地区项目，81860114，肝硬化患者中性粒细胞功能受损与内质网应激的相关性研究，2019-01 至 2022-12，35 万元，在研，参与。

代表性论著（#：并列第一作者；*通讯作者）

(1) QIJIAO CHENG[#]; ANHAI CHEN[#]; QIAN DU¹; RUI XIE¹ and JINGYU XU^{*}; Novel insights into ion channels in cancer stem cells (Review), *International Journal of Oncology*, 2018, 53(4): 151-157.

(2) 程其娇；周本刚；张琳；蒋海涛；陈安海*；国内序贯疗法对比铋剂四联疗法补救根除幽门螺杆菌感染的 Meta 分析，*安徽医药*, 2016, 23(11): 2132-2138.

在本项目中承担的任务

具体实验：探讨 HNF1 α 表达对肝内未折叠蛋白反应的影响、机制，及在肝损伤重症化中的意义。

主要成员研究工作简历（四）

李霞，遵义医科大学，附属医院感染科，2019级在读研究生。

教育经历（按时间倒排序）：

2019/9 – 至今，遵义医科大学，传染内科，在读研究生，导师：林世德/何毅怀

2013/9 – 2018/7，西南医科大学，临床医学，学士

工作经历（科研与学术工作经历，按时间倒序排序）：

2018/7 -2019/7，宜宾市第二人民医院，规培医师

在本项目中承担的任务

具体实验：通过脂多糖干预部分模拟革兰氏细菌感染，探讨其对未折叠蛋白反应-HNF1 α 信号串扰调节及肝损伤的影响。

4. 申请者正在承担的其它研究项目（名称、编号、任务来源、起止年月、负责或参加以及与本申请项目的关系等情况）：

贵州省科技厅，科技支撑计划项目，肝细胞内质网应激差异性反应对肝损伤重症化的影响及机制研究；编号：黔科合支撑[2019]2803号；起止年月：2019-01-01至2021-12-31，40万。

该课题主要探讨肝细胞未折叠蛋白反应差异性反应对肝损伤重症化的影响及机制，已发现肝损伤重症化与 PERK/eIF2 α 信号通路的反馈性抑制作用增强有关。本项目主要任务是探讨未折叠蛋白反应-HNF1 α 信号串扰影响肝损伤重症化的机制及临床意义，是前期研究的深化与延伸。

五、经费预算

单位：万元

分类	投资总额	卫生健康委资助	单位配套	自筹	其他
人民币 (万元)	4	2	2		
支出科目	金 额	计算依据及理由			
论证调研费	0				
分析测试费	1.0	肝功能、肝脏组织病理检查等相关费用、基因沉默或过表达相关加工等相关费用。			
研究材料费	2	实验小鼠及饲料，四氯化碳、衣霉素、4-苯基丁酸等试剂，Western blot 检测、免疫组化、PCR 相关耗材费用。			
图书资料费	0				
论文版面费	1	发表 SCI 论文相关费用。			
学术会议费	0				
评审鉴定费	0				
设备仪器名称	规格型号	数量	金额	用 途	
无					
说明：仪器设备每台单价一千元以上的须逐项填写。					

六、申请者所在单位（包括合作单位）的审查与保证

1. 申请者所在单位学术委员会审查意见（包括：对本项目的意义、特色和创新之处、立论依据、研究方案、经费预算、已具备的工作条件和申请者及项目组主要成员的素质与水平等签署具体意见）

该项目通过研究肝细胞未折叠蛋白反应与 HNF1 α 信号相互调节机制，对肝细胞凋亡、程序坏死、肝损伤的影响，未折叠蛋白反应与 HNF1 α 信号串扰调节模式在脂多糖干预中的变化等，旨在研究未折叠蛋白反应-HNF1 α 信号串扰影响肝损伤重症化的机制及临床意义。项目立题新颖，研究方案合理，技术可行，具有较好的创新性。项目具有较好的前期研究基础，项目申请人具有较好的研究基础，具备完成该项目的能力，具备实验条件，团队成员搭配合理，同意申报。

学术委员会负责人

 余昌胤

日期： 年 月 日

2. 合作单位领导审查意见：

合作单位 1

日期： 年 月 日

合作单位 2

日期： 年 月 日

3. 申请者所在单位领导审查意见与保证

已按填报说明对申请人进行了资格审查，同意学术委员会的审查意见，并保证在项目获得资助后做到以下几点：

(1) 保证对研究计划实施所需的人力、物力和工作时间等条件给予支持。

(2) 保证科研经费及配套资金足额到位，按财务要求使用，并全部用于项目研究。

(3) 需要说明的其它问题。

单位负责人（签章）



 (公章)

日期： 年 月 日

七、申请者所在单位伦理委员会审查意见

研究项目名称	未折叠蛋白反应-肝细胞核因子 1α 信号串扰影响肝损伤重症化的机制研究
研究项目分类	<input checked="" type="checkbox"/> 科研课题 (<input checked="" type="checkbox"/> 基础研究 <input type="checkbox"/> 应用基础研究 <input type="checkbox"/> 临床研究 <input type="checkbox"/> 药学 <input type="checkbox"/> 其他_____) <input type="checkbox"/> 其他_____
研究材料及实验类型	<input type="checkbox"/> 人体标本收集 (<input type="checkbox"/> 血液 <input type="checkbox"/> 尿液 <input type="checkbox"/> 粪便 <input type="checkbox"/> 痰液 <input type="checkbox"/> 其他_____) <input type="checkbox"/> 动物标本收集 (<input type="checkbox"/> 血液 <input type="checkbox"/> 细胞 <input type="checkbox"/> 组织 <input type="checkbox"/> 其他_____) <input checked="" type="checkbox"/> 动物实验 <input type="checkbox"/> 人体实验
审查文件	1、医学伦理审查申请表 <input type="checkbox"/> 2、知情同意书 <input type="checkbox"/> 3、动物伦理审查表 <input checked="" type="checkbox"/> 4、项目申请书 <input checked="" type="checkbox"/> 5、其他文件 <input type="checkbox"/>
伦理审查方式	<input type="checkbox"/> 会议审查 <input type="checkbox"/> 函审 <input checked="" type="checkbox"/> 快速审查
<p>审查结论:</p> <p>经过实验动物伦理委员会审查, 何毅怀同志所申报项目的研究内容和实验方案遵循动物福利和伦理原则, 符合伦理规范要求, 同意申报 2020 年贵州省卫生健康委科学技术基金。</p>	
伦理委员会委员签名:	主任委员/副主任委员签名: 郑洪 100988 申请者所在单位伦理委员会 (盖章)  2020年5月26日
<p>王诺鑫 龙石磊</p>	

八、市（州）卫生健康局或主管部门审核意见

（公章）

单位负责人（签章）

日期： 年 月 日

九、省卫生健康委审批意见

单位负责人（签章）：

日期： 月 日



十、签订协议

省卫生健康委（甲方）：

请按该课题制定的研究内容、研究目的、研究方法、技术路线、研究进度和预期研究结果等，在规定时间内，按时完成课题研究工作和结题工作。

负责人（签章）：

日期： 年 月 日



项目承担单位（乙方）：

单位负责人（签章）

日



日期： 年 月 日



项目负责人（丙方）：

项目负责人签字：

何毅斌

日期： 年 月 日

说明：该协议由省卫生健康委与当年获立项的项目负责人及承担单位签定。

贵州省科技计划项目（课题）

任 务 书

项目名称	NF- κ B/HNF1 α -内质网应激反馈环调控肝细胞凋亡在急性肝损伤进展中的变化特点及作用机制研究			
计划类别	自然科学			
所属学科	临床医学->内科学->传染病学			
技术领域	生物医药			
管理处室	科技项目管理处			
管理单位（甲方）	贵州省科学技术厅			
承担单位（乙方）	名称	遵义医科大学附属医院		
	统一社会信用代码	12520000429401122B		
	通讯地址	贵州省遵义市大连路149号		
	邮政编码	563003	单位电话	0851-28608776
	项目负责人	何毅怀	联系电话	13885219059
	项目联系人	程疑	联系电话	13765847904
推荐单位（丙方）	遵义医科大学			

贵州省科学技术厅

2020 年 月

五、承担/参与单位工作分工及经费分配

承担/参与单位名称(盖章)	工作分工	总经费分摊(万元)	省科技厅经费分配(万元)
遵义医科大学附属医院	负责项目全部考核指标。	10	10
合计		10	10



八、完成人员信息

(一) 项目负责人:								
姓名	职务	手机号码	职称	学位	学历	在项目(课题)中承担的任务	所在单位	签名
何毅怀	无	13885219059	中级	硕士	研究生	项目主持	遵义医科大学附属医院	何毅怀
(二) 主要完成人员:								
姓名	手机号码	职称	学位	学历	在项目(课题)中承担的任务	所在单位	签名	
罗亚文	18908523636	正高	硕士	研究生	实验指导	遵义医科大学附属医院	罗亚文	
刘玉娟	15934657337	中级	硕士	研究生	建立小鼠及细胞模型, 探讨相关指标潜在的调控关系。	遵义医科大学附属医院	刘玉娟	
李霞	18716138941	初级	硕士	研究生	探讨 ERS 对肝细胞 NF- κ B/HNF1 α 信号及凋亡的影响、机制及意义。	遵义医科大学附属医院	李霞	
唐永静	15120282148	初级	硕士	研究生	通过靶向调控 RelA、HNF1 α 表达, 探讨 NF- κ B/HNF1 α 信号对肝细胞 ERS、凋亡的调控机制及其在肝损伤中的作用。	遵义医科大学附属医院	唐永静	
廖月	17726366634	初级	硕士	研究生	探讨在肝损伤进展中肝内 NF- κ B/HNF1 α -ERS 反馈环及肝细胞凋亡的变化、作用机制及治疗对策。	遵义医科大学附属医院	廖月	

九、签署栏

贵州省科学技术厅（甲方） （公 章）

负责人（签字）



项目（课题）承担单位（乙方）

项目（课题）负责人（签字）何毅怀

财务负责人（盖章） 13007870506

帐户名：遵义医科大学附属医院

帐 号：523061200018170038819

开户银行：交通银行遵义大连路支行



资金等匹配条件落实保证方

乙方主管部门或市（州）科技局

负责人（签字）

（公 章）

年 月 日

贵州省科学技术厅

所属学科：

遵义医学院附属医院 硕士生科研启动基金合同书

合同编号：院字（ 2018 ） 38 号

项目名称：eIF2 α 磷酸化在急性肝损伤肝细胞程序性
坏死的作用及其机制探索

主 持 人：刘霞

主持单位：遵义医学院附属医院

联系电话：18685642660

申请日期：2018 年 10 月 29 日



表一

简 表

项目名称		eIF2 α 磷酸化在急性肝损伤肝细胞程序性坏死的作用及其机制探索						
起止年月		2019.01-2020.06		批准经费(万元)		2.0		
主持人	姓名	刘霞	性别	女	出生年月	1991.09	民族	汉族
	职称	住院医师		专业	内科学			
所在单位		遵义医学院附属医院感染科		签订日期		2018.10.29		
项目 组	总人数	高级职称	中级	初级	博士生	硕士生	其他人员	
	5	1	2	2	1	4	0	
合作单位数		协作单位数		协作人数				
内容简介								
<p>肝脏是人体最大、功能最多的生物代谢器官，随着药物滥用、外源性毒物侵袭的增加，急性肝损伤发生率呈逐渐升高，已成为继病毒性肝炎所致肝损害的另一个重要因素。急性肝损伤的发病机制尚未完全明确，研究显示应激可能导致急性肝损伤的重要因素，比如内质网应激、氧化应激等，其中内质网应激在急性肝损伤的作用受到广泛关注。因此，寻找和研究急性肝损伤发病机制，观察内质网应激在急性肝损伤过程中的变化，探讨其介导肝细胞凋亡机制，可为临床上有效防治急性肝损伤提供可靠的科学理论依据。</p> <p>通过本课题内容的研究，首先明确，磷酸化 eIF2α 对急性肝损伤程序性坏死的影响，进一步探索在急性肝损伤程序性坏死的基础上，磷酸化 eIF2α 调动肝细胞内质网应激自我防御功能的机制，揭示急性肝损伤的肝细胞在受到外界刺激时调动肝细胞内内质网应激抵抗肝损害的调节功能和分子机制，eIF2α 磷酸化可调动内质网应激来减轻急性肝损伤来减少肝细胞坏死。因此，我们的研究结果可能为急性肝损伤的调节提供新的见解。</p>								



项目组成员

姓名	性别	年龄	职称	职务	专业	课题中的分工	签名
易宇	女	27	住院医师	无	内科学	实验操作、数据收集	易宇
何毅怀	男	38	主治医师	无	内科学	实验指导	何毅怀
刘玉娟	女	32	主治医师	无	内科学	实验指导	刘玉娟
林世德	男	54	主任医师	科主任	内科学	实验指导	林世德



研究目标、研究内容和拟解决的关键问题及预期达到的目标

一、研究目标:

通过本课题内容的研究,首先明确,磷酸化 eIF2 α 对急性肝损伤程序性坏死的影响,进一步探索在急性肝损伤程序性坏死的基础上,磷酸化 eIF2 α 调动肝细胞内质网应激自我防御功能的机制,揭示急性肝损伤的肝细胞在受到外界刺激时调动肝细胞内质网应激抵抗肝损害的调节功能和分子机制, eIF2 α 磷酸化可调动内质网应激来减轻急性肝损伤来减少肝细胞坏死。因此,我们的研究结果可能为急性肝损伤的调节提供新的见解。

二、研究内容:

体外水平检测 eIF2 α 的磷酸化对急性肝损伤程序性坏死中的影响及其机制探索:(1) 建立急性肝损伤小鼠模型和人肝 L02 系细胞急性肝损伤,初步探讨急性肝损伤相关的肝脏内质网应激,程序性坏死变化特点。

(2) 通过 PBA 预干预小鼠或人肝细胞 L02 细胞急性肝损伤模型,进一步发现 eIF2 α 信号在急性肝损伤肝脏内质网应激,肝细胞程序性坏死的变化特点。(3) 通过 Salubrinal 或 ISRIB 分别增强或抑制 eIF2 α 信号激活,探讨 eIF2 α 信号对急性肝损伤肝脏内质网应激,肝细胞凋亡及程序性坏死的影响。(4) 细胞活力测定使用 Cell Titer 96 Aqueous One, 通过 MTS 方法评估细胞活力。将细胞在 37 $^{\circ}$ C 温育 3 小时后,使用酶标仪 (Bio-Rad model 680; Bio-Rad, Hercules, CA, United States) 在 490nm 处测量吸光度,通过用 20 μ L MTS 替换培养基来测定细胞活力。将细胞活力标准化为对照的百分比。该实验进行五次。(5) 血清丙氨酸氨基转移酶活性从个体小鼠收集外周静脉血样并制备其血清样品。在自动化机器中通过紫外分光光度法测定血清 ALT 活性水平。

三、拟解决关键问题:

通过诱导急性肝损伤小鼠模型、人肝 L02 细胞,从不同层次,即内质网应激反应,肝细胞程序性坏死及凋亡,初步阐明 eIF2 α 信号对急性肝损伤程序性坏死的影响及机制。

四、预期达到目标:

(1) 通过急性肝损伤小鼠模型、人肝 L02 细胞,从不同层次,即内质网应激,肝细胞程序性坏死及凋亡,初步阐明 eIF2 α 信号对急性肝损伤程序性坏死的影响及机制, eIF2 α 磷酸化可减轻内质网应激进而减轻急性肝损伤肝细胞程序性坏死;(2) 提交研究报告 1 篇;



拟采取的研究方法、技术路线、实验方案及可行研究

一、研究方法:

1、动物的培养、人肝细胞选材及实验: (1) 获得雄性 BALB/c 小鼠 (6-8 周龄, 体重 $18 \pm 2\text{g}$), 并在遵义医学院动物中心实验室内保持室温 $20-24^{\circ}\text{C}$, 12 小时光照、黑暗循环的无病院设施中饲养, 小鼠随意进入同样正常的食物和水, 使小鼠适应一周并用于实验。(2) 诱导急性肝损伤, 本部分通过腹腔注射四氯化碳, 诱导小鼠急性肝损伤实验组, 同时建立对照组, 运用 Western blot 及免疫组化方法检测各组肝脏内质网应激 (eIF2 α), 程序性坏死相关蛋白的表达, 通过肝组织切片 HE 染色观察各组病理改变; (3) 选取的人肝细胞系 L02 细胞获自中国科学院 (中国上海) 的典型培养物保藏中心细胞库。对人肝 L02 细胞使用衣霉素 (实验组)、PBS (对照组) 后分别在 12、24、48 小时时候对比检测, 运用 Western blot 方法检测各组肝脏内质网应激, 程序性坏死及肝细胞凋亡相关蛋白的表达; (4) 然后预先对人肝 L02 细胞使用 PBA, 并注射衣霉素诱导急性肝损伤随机分为实验组 (PBA+衣霉素)、对照组 (PBA+PBS), 检测上游 ER 应激及肝细胞程序性坏死及凋亡指标变化; 5) 再进一步将人肝 L02 细胞随机分组, 并预先注射 salubrinal ($1\text{mg}/\text{kg}$ 体重), ISRIB ($0.25\text{mg}/\text{k}$ 体重) 以及 PBS, 并注射衣霉素作为 A 组 (salubrinal + 衣霉素), B 组 (ISRIB + 衣霉素) 以及对照组 (PBS+衣霉素), 并进行检测上游 ER 应激及肝细胞程序性坏死及凋亡指标进行对比。

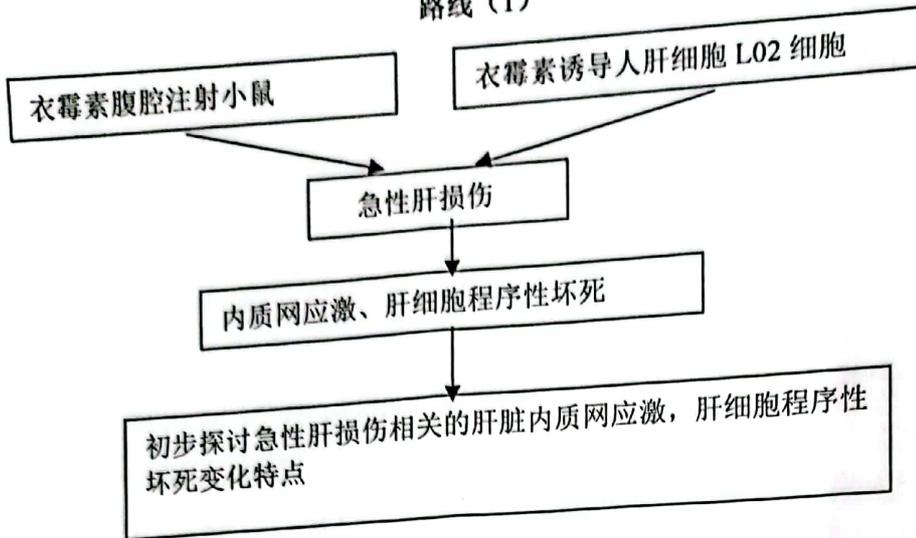
2、使用免疫组织学检测对照组、实验组的表达情况: 将小鼠肝组织固定在 10% 福尔马林中并包埋在石蜡中, 将石蜡包埋的组织切片 ($5\ \mu\text{m}$) 用苏木精和曙红 (H&E) 染色。另外, 使用针对裂解的半胱天冬酶-3 (9664, Cell Signaling Technology), CHOP (ab11419) 的单克隆抗体对一些组织切片进行免疫组织化学, 在光学显微镜下对切片进行光成像。

3、利用 Western-blot 技术检测对照组、实验组内质网应激标志蛋白表达变化: 通过使用蛋白裂解液提取小鼠、人肝 L02 细胞的总蛋白, 进一步通过 Western-blot 实验检测比较对照组和实验组各组肝脏内质网应激 (eIF2 α), 程序性坏死及肝细胞凋亡 (p-MLKL、RIP3) 的蛋白变化。

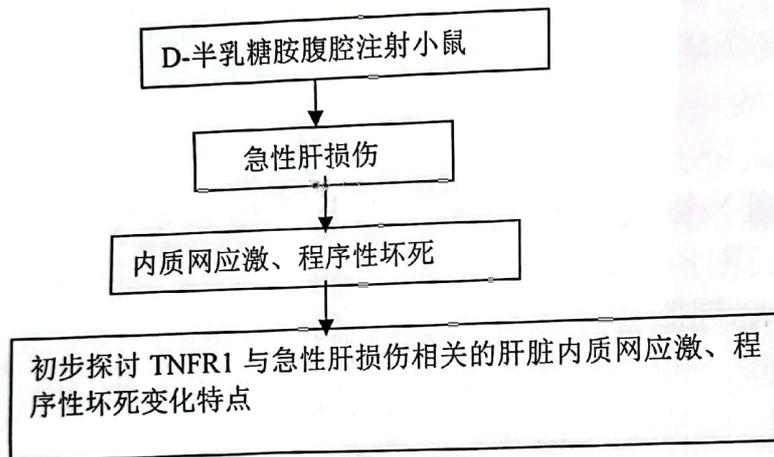


二、技术路线及实验方案:

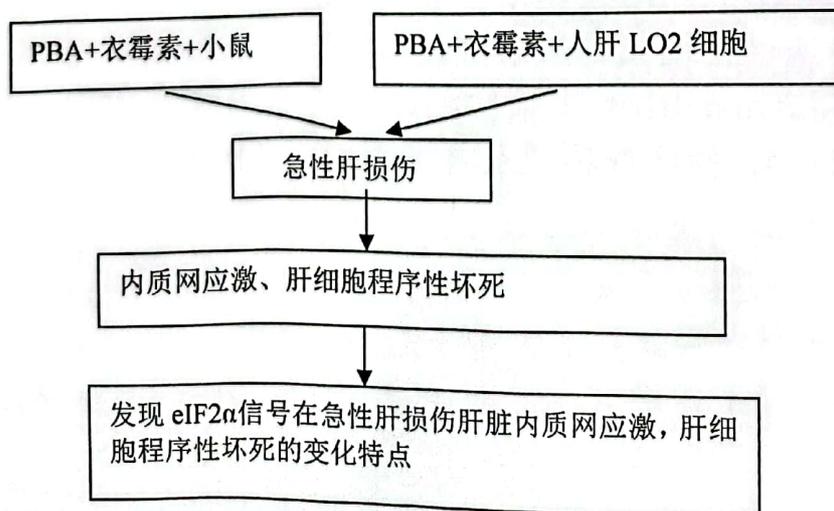
路线 (1)



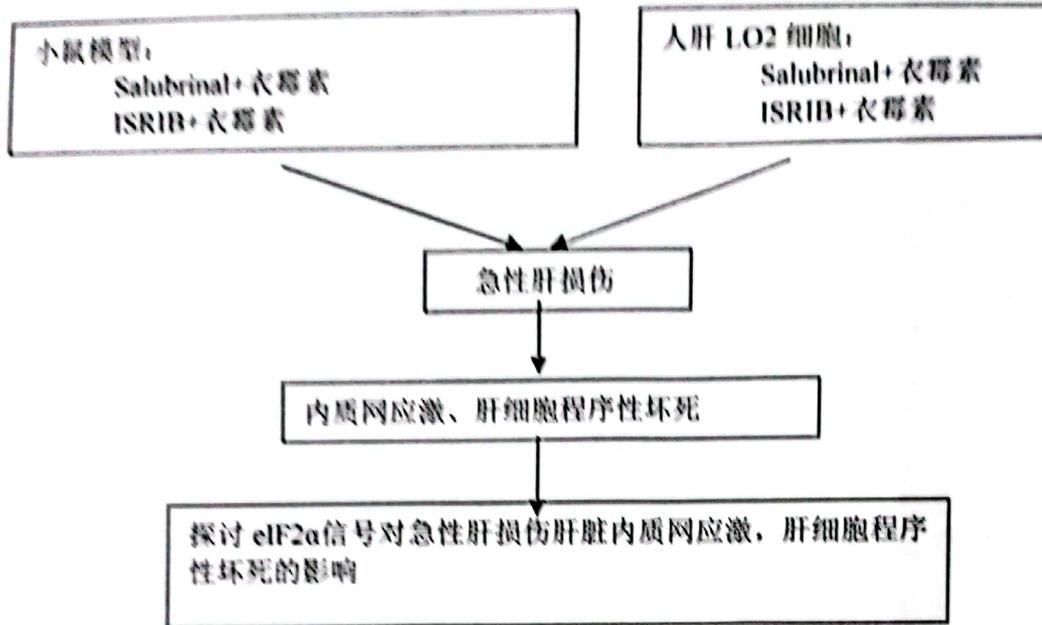
路线 (2)



路线 (3)



路线 (4)



三、可行性研究：本研究团队研究梯队合理，具有良好的协作精神、创新精神，是一支年轻化、高学历的研发队伍，多年来从事肝衰竭发病机制及诊疗的研究，相关研究结果已发表在 *Mol Cell Biochem*、*World J Gastroenterol* 等期刊上，有较丰富的研究基础及经验。本研究的技术难点是小鼠肝脏条件性过表达 eIF2 α 信号及干扰 eIF2 α 表达，进一步阐明 eIF2 α 信号对急性肝损伤程序性坏死时影响及机制。



表三

预期研究成果（主要技术经济指标及预期经济效益和社会效益）

- 一、通过本课题内容的研究，明确磷酸化 eIF2 α 对急性肝损伤程序性坏死的影响；
- 二、探索在急性肝损伤程序性坏死的基础上，磷酸化 eIF2 α 调动肝细胞内质网应激自我防御功能的机制，揭示急性肝损伤的肝细胞在受到外界刺激时调动肝细胞内质网应激抵抗肝损害的调节功能和分子机制，eIF2 α 磷酸化可调动内质网应激来减轻急性肝损伤来减少肝细胞坏死，为急性肝损伤的调节提供新的见解。
- 三、在国内核心期刊发表论文 1-2 篇。

实现本项目预期目标已具备的条件（包括过去的研究工作基础，现有的主要仪器设备、研究技术人员及协作条件）

- 一、遵义医学院及遵义医学院附属医院有多个公共实验平台，如遵义医学院附属医院的感染科实验室、呼吸科实验室、贵州省细胞工程重点实验室、遵义医学院的中心实验室、药理实验室及生理实验室等实验室，具有开展动物实验、免疫组化、Western blot 等研究条件，在不用添加新设备的情况下可保证本研究顺利完成。
- 二、研究团队可行性分析：本研究团队研究梯队合理，具有良好的协作精神、创新精神，是一支年轻化、高学历的研发队伍，多年来从事肝衰竭发病机制及诊疗的研究，相关研究结果已发表在 Mol Cell Biochem、World J Gastroenterol 等期刊上，有较丰富的研究基础及经验。
- 三、研究技术可行性分析：本研究的技术难点是小鼠肝脏条件性过表达 eIF2 α 信号及干扰 eIF2 α 表达，进一步阐明 eIF2 α 信号对急性肝损伤程序性坏死时影响及机制。



表四

课题的年度考核指标及年度目标

年度	课题的年度考核指标及年度目标
2019.01-2019.06	建立急性肝损伤模型，初步探讨急性肝损伤程序性坏死相关的肝脏内质网应激，肝细胞程序性坏死的变化特点。并使用 Cell Titer 96 AQueous One，通过 MTS 方法评估细胞活力，并从个体小鼠收集外周静脉血样并制备其血清样品，测定血清 ALT 活性水平。
2019.07-2019.12	通过 PBA 预干预小鼠或人肝细胞 L02 细胞急性肝损伤模型，发现 eIF2 α 信号在急性肝损伤程序性坏死的变化特点；通过 Salubrinal 或 ISRIB 分别增强或抑制 eIF2 α 信号激活，探讨 eIF2 α 信号对小鼠急性肝损伤肝脏内质网应激，肝细胞凋亡及程序性坏死的影响。
2020.01-2020.06	整理实验数据，补充实验，发表论文及撰写研究报告。



甲方（项目委托单位）：



（盖章）



代表：

（签字）

乙方（项目主持单位）

（盖章）

代表：

（签字）

签订日期：



申请项目经费预算表

申请资助总金额 (万元)	2.0	
其他经费来源渠道 及金额 (万元)		
预算支出科目	金额 (万元)	计算根据及理由
1、设备购置费	0.4	
2、设备试剂费	1.0	
3、材料费	0.3	
4、出版/文献/信息传播/知识产权事务费	0.3	



遵义市科技计划项目合同书

(科技合作)

合同编号： 遵市科合 HZ 字（2022）344 号

项目名称： 基于 HNF1 α -内质网应激调控环的 MAFLD
的发病机制与白及多糖的治疗作用研究

起止年限： 2022 年 08 月 01 日至 2025 年 07 月 31 日

承担单位（盖章）： 遵义医科大学附属医院

项目负责人 何毅怀

项目联系人： 何毅怀 电话： 13885219059

承担单位注册地址： 贵州省遵义市汇川区大连路 149 号

遵义市科技与大数据局制

一、项目概述（主要内容、关键技术及投资）

（一）主要内容

（1）体外实验

- 1.1 探讨在肝细胞脂肪变性中细胞凋亡、内质网应激及 HNF1 α 表达的变化及特点。
- 1.2 探讨在肝细胞脂肪变性中 HNF1 α 低表达的机制。
- 1.3 探讨 HNF1 α 的下调对内质网应激的影响及机制及在肝细胞脂肪变性中的作用。
- 1.4 探讨白及多糖对肝细胞脂肪变性的治疗作用及机制

（2）体内实验

- 2.1 探讨在 MAFLD 中肝细胞凋亡、内质网应激及 HNF1 α 表达的变化及特点。
- 2.2 探讨在 MAFLD 中内质网应激影响肝细胞 HNF1 α 表达的作用机制。
- 2.3 探讨 HNF1 α 对肝细胞内质网应激的影响、机制及在 MAFLD 中的作用。
- 2.4 探讨白及多糖对 MAFLD 的治疗作用及机制。

（二）关键技术

（1）成功建立 MAFLD 小鼠模型。

（2）通过 8 型腺相关病毒或质粒介导特异的 shRNA 或 cDNA 转染，条件性调控目的基因表达。

（3）通过双荧光素酶报告基因检测转录因子对目的基因的转录调控。

（三）项目投资

获得科技经费 9 万元。

二、项目年度计划安排（分年任务安排及阶段目标）

（一）项目进度安排

本项目研究起止时间：2022 年 08 月 01 日至 2025 年 07 月 31 日；

（二）项目各年度目标及任务

2022 年 08 月 01 日至 2023 年 07 月 31 日；

研究任务：

1) 体外实验

①通过人源性肝细胞株，探讨在肝细胞脂肪变性中细胞凋亡、内质网应激及 HNF1 α 表达的变化及特点。

②通过双荧光素酶报告基因检测内质网应激相关目标蛋白对 HNF1A 基因的调控作用，进一步确定肝细胞脂肪变性中内质网应激下调肝细胞 HNF1 α 表达的作用机制。

2) 体内实验

①通过小鼠模型，探讨在 MAFLD 中肝细胞凋亡、内质网应激及 HNF1 α 表达的变化及特点。

②针对内质网应激相关目标信号基因，通过肝脏靶向调控其表达，预干预 MAFLD 模型小鼠，探讨 MAFLD 中内质网应激影响肝细胞 HNF1 α 表达的作用机制。

研究目标：围绕相关研究结果，申请发明专利 1 项。

2023 年 08 月 01 日至 2024 年 07 月 31 日；

研究任务：

1) 体外实验

①通过特异性敲减和过表达 HNF1 α ，探讨肝细胞 HNF1 α 对内质网应激、凋亡及脂肪变性的影响及作用机制。

②通过白及多糖干预 OA 诱导的 LO2 细胞及 HepG2 细胞，检测 HNF1 α 表达、内质网应激、细胞脂肪变性及凋亡的变化，探讨白及多糖对肝细胞脂肪变性的影响及作用机制。

2) 体内实验

①通过肝脏靶向敲减和过表达模型小鼠 HNF1 α 及其下游的内质网应激相关的基因，进一步探讨 HNF1 α 对肝细胞凋亡、脂肪变性及内质网应激的影响及作用机制。

②通过白及多糖干预高脂饮食诱导的 MAFLD 模型小鼠，检测肝损伤、血脂水平、肝内 RelA 及 HNF1 α 表达、内质网应激、细胞脂肪变性及凋亡的变化，探讨其治疗作用及机制。

研究目标：围绕相关研究结果，发表高质量科技期刊论文 2 篇，其中 SCI 论文 1 篇。

(3) 第三年度：2024 年 08 月 01 日至 2025 年 07 月 31 日

研究任务：数据分析、总结、补充实验；准备结题相关材料。

研究目标：拟发表高质量科技期刊论文 2 篇，其中 SCI 论文 1 篇。

三、考核指标（包括项目总体目标、经济指标、技术指标、科技产出指标、经济社会效益目标。如项目产品的主要性能指标、达到的质量指标；项目完成后的经济指标；形成的专利、新技术、新产品、新装置、论文专著等数量、指标及其水平等；技术及产品应用所形成的市场规模、效益等；项目实施中形成的示范基地、中试线、生产线及其规模等；其它应考核的指标）

（一）主要技术指标

- （1）初步阐明基于 HNF1 α -内质网应激调控环的 MAFLD 的发病机制。
- （2）初步阐明白及多糖对 MAFLD 的治疗作用及治疗靶点。

（二）科技产出指标

- （1）完成研究报告 1 份。
- （2）发表高质量科技期刊论文 4 篇，其中 SCI 论文 2 篇。
- （3）申请发明专利 1 项。
- （4）培养研究生 2 名。
- （5）完成地厅级/获批省级课题 1 项。

（三）经济或社会效益目标

1.通过本项目研究揭示了 HNF1 α -内质网应激调控环对 MAFLD 的调控作用机制及白及多糖对 MAFLD 的治疗作用,为 MAFLD 发生发展机制的阐述和防治提供理论基础。

2.通过本项目的研究为该专业方向未来研究及医疗服务行业培养相关卫生技术人员以及研究生,以更好促进医学及社会发展。

四、项目承担单位、参加作单位、项目负责人及主要研究成员

项目承担单位：遵义医科大学附属医院

主要参加单位：无

项目负责人：

姓名	手机号码	职称	学历	在项目中承担的任务	所在单位
何毅怀	13885219059	副主任医师	硕士	实验设计及主持	遵义医科大学 附属医院

主要研究成员：

罗亚文	18908523636	主任医师	硕士	项目指导	遵义医科大学 附属医院
程其娇	18311545100	主治医师	硕士	实验数据整理与分析	遵义医科大学 附属医院
姜金莲	18998191420	在读研究生	硕士	体外实验	遵义医科大学 附属医院
唐永静	15120282148	在读研究生	硕士	体外实验	遵义医科大学 附属医院
邓洁	19985206242	在读研究生	硕士	体内实验	遵义医科大学 附属医院
廖月	17726366634	在读研究生	硕士	体内实验	遵义医科大学 附属医院

五、项目经费来源预算（单位：万元）

类别	年度	2022年	2023年	20年	合计
	一、联合资金		9		
二、自筹经费					
三、银行贷款					
四、其它					
合计		9			9

六、项目经费支持预算（单位：万元）

科目	总投资	联合资金	自筹经费
合计	9	9	
1、设备费			
(1) 购置设备费			
(2) 试制设备费			
2、材料费	5.05	5.05	
3、测试化验加工费	2.95	2.95	
4、燃料动力费			
5、差旅费			
6、会议费			
7、国际合作与交流费			
8、出版/文献/信息传播/ 知识产权事务费	1.0	1.0	
9、劳务费			
10、专家咨询费			
11、其他支出			

七、共同条款:

1. 本合同书系遵义市科技与大数据局为组织市科技计划项目而设计, 合同书甲方为遵义市科技与大数据局, 乙方为课题承担单位。

2. 合同书正式文本一式叁份, 甲方壹份、乙方壹份、项目负责人壹份。

3. 合同书字迹要工整清楚, 并用 A3 纸打印, 骑缝装订。

4. 合同书编号由遵义市科技与大数据局统一规定。

5. 本合同签字生效后, 甲方按合同规定向乙方核拨经费, 乙方按合同要求专款专用, 并接受甲方监督、检查。

6. 乙方应在合同到期三个月内, 按规定之内容向甲方提交项目验收材料。

7. 在本合同生效后 5 年内, 甲方有权因非商业目的 (在政府性会议、报告、问津、统计资料等) 使用乙方项目信息, 乙方有义务向甲方提供资料。

8. 任何一方因不可抗拒不能履行合同时, 应及时书面通知另一方, 并在合理期间内出具合同不能履行的证明。任何一方提出变更合同的要求, 需与另一方协商, 签订变更协议后方可执行。

9. 甲乙双方应严格遵守《遵义市科技计划项目管理办法》和合同的各项条款, 在项目实施过程中, 如发现乙方违反本合同及有关规定, 甲方有权撤消或中止合同, 撤消或中止合同后, 乙方应进行项目清算, 并将甲方支持项目经费如数退还。

10. 根据项目具体情况, 经双方协商订立的附加条款将作为合同的组成部分。

甲方（遵义市科技与大数据局）：

（盖章）

代 表：

（签字）

乙方（项目承担单位）：

（盖章）

代 表：

（签字）

签订日期： 年 月 日