

贵州省科技计划项目（课题）
任 务 书

项目名称	NF-κB/HNF1α-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）何敬怀

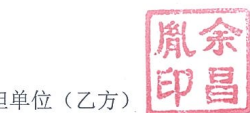
财务负责人（盖章）13007870506



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



The Science and Technology Department of Guizhou Province

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

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			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：

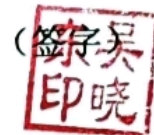
1. 本合同书系遵义市科技与大数据局为组织市科技计划项目而设计，合同书甲方为遵义市科技与大数据局，乙方为课题承担单位。
2. 合同书正式文本一式叁份，甲方壹份、乙方壹份、项目负责人壹份。
3. 合同书字迹要工整清楚，并用 A3 纸打印，骑缝装订。
4. 合同书编号由遵义市科技与大数据局统一规定。
5. 本合同签字生效后，甲方按合同规定向乙方核拨经费，乙方按合同要求专款专用，并接受甲方监督、检查。
6. 乙方应在合同到期三个月内，按规定之内容向甲方提交项目验收材料。
7. 在本合同生效后 5 年内，甲方有权因非商业目的（在政府性会议、报告、问津、统计资料等）使用乙方项目信息，乙方有义务向甲方提供资料。
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：

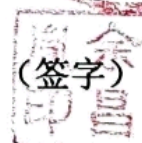


乙方（项目承担单位）：



(盖章)

代 表：



签订日期：2022 年 5 月 30 日

附件

2021 年贵州省卫生健康委科学技术基金项目

申 请 书

申报学科: 传染病

项目名称: 肝细胞 c-Met 在肝损伤重症化中的作用及机制研究

申请 者: 陈 娅

工作单位: 遵义医科大学附属医院

通讯地址: 贵州省遵义市汇川区大连路

联系方式 手机: 15902629310 座机: 0851-28608144

起止年限: 2021-09-01~2023-12-31

申请日期: 2021-04-19

贵州省卫生健康委

2021 年 制



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	肝细胞 c-Met 在肝损伤重症化中的作用及机制研究							
		英文	The role and mechanism of hepatocyte c-Met in severe liver injury							
	申报单位		遵义医科大学附属医院			申请金额	2.0 (万元)			
	申报学科		传染病学		拟完成的成果形式 (论著或专著)		论著			
	申报年度		2021-04-19		实施年限		2021-09-01~2023-12-31			
申 请 者	姓 名	陈 娅	性 别	女		出生年月	1992-10-11			
			身份证 号	5221241992 10113240		民 族	汉族			
	职 称		医师		学 历	硕士研究生		专 业	传染病	
	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		0851-28608144			
详细地址		贵州省遵义市大连路			E-mail	cy19921011@126.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	
	7		1	3	3	0	0	6	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
		邱隆敏	522101196 512083229	女	55	高级	传染病	遵义医科大学 附属医院	项目指导	邱隆敏
		何毅怀	450802197 911204330	男	41	中级	传染病	遵义医科大学 附属医院	实验指导和 具体实施	何毅怀
		程其娇	522724198 912080226	女	31	中级	传染病	遵义医科大学 附属医院	具体实施	程其娇
		许维毅	522725197 908296827	女	41	中级	传染病	遵义医科大学 附属医院	具体实施	许维毅
		蒋小铃	522131199 605156601	女	24	硕士生	传染病	遵义医科大学 附属医院	具体实施	蒋小铃
		唐永静	522121199 503240842	女	26	硕士生	传染病	遵义医科大学 附属医院	具体实施	唐永静



研究内容和意义	摘要	重症肝病死亡率高，其预后与早期预警、及时有效的治疗密切相关。促肝细胞生长因子受体 c-Met、内质网应激与肝细胞的保护性反应密切相关，可能影响肝损伤的重症化过程。在我们前期研究发现重症肝病患者肝内 c-Met 表达明显下调，在急性肝损伤小鼠模型中脂多糖抑制 c-Met 蛋白表达并加重肝损伤，c-Met 表达降低显著加剧模型小鼠肝损伤。推测 c-Met 表达下调，通过增加肝细胞对凋亡及程序性坏死信号的敏感，促进肝损伤的重症化过程，为验证此推测，拟通过四氯化碳及脂多糖建立肝损伤重症化的小鼠模型，首先探讨 c-Met、内质网应激、肝细胞凋亡及程序性坏死在肝损伤重症化中的变化特点、差异及其调控关系，其次通过特异性调节 c-Met 基因表达（敲减及过表达），探讨肝细胞 c-Met 影响肝损伤重症化的作用机制及意义。	
		中文	促肝细胞生长因子受体；内质网应激；凋亡；程序性坏死；肝损伤重症化
	主题词	英文	c-Met; endoplasmic reticulum stress; apoptosis; necroptosis; severe 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:

重症肝病在我国较常见, 死亡率高, 它不仅包括急性肝衰竭、亚急性肝衰竭、慢加急性肝衰竭及慢性肝衰竭在内的各型肝衰竭, 还包括失代偿期肝硬化等肝病, 常见的病因有: 肝炎病毒、酒精及药物等^[1]。尽管目前针对重症肝病, 我国有较成熟的治疗模式(内科治疗-人工肝-肝移植), 但由于其并发症多且重, 病情进展迅速, 肝源有限等原因, 导致其病死率居高不下, 严重影响我国人民生命安全, 所以阻止肝病向重症进展(肝损伤重症化)、对肝病重症化的早期预警、探究重症肝病的发病机理对及时进行有效的干预, 改善重症肝病患者的预后有着非常重要的临床意义。肝损伤重症化与多种因素相关, 如诱发的病因、原有基础疾病及合并细菌感染等^[2]。

(1) 肝细胞凋亡、程序性坏死与肝损伤重症化间的联系

肝细胞损伤或死亡加重, 与肝损伤的程度密切相关^[3]。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^[4]。细胞凋亡^[5]是由死亡信号、线粒体氧化应激或内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)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。程序性坏死^[6]是一种与坏死有相似形态学改变, 与凋亡有相似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 protein3, RIP3)、混合系激酶区域样(mixed lineage kinase domain-like pseudokinase, MLKL)磷酸化激活为特点。肝细胞内源性抗损伤反应障碍致其对损伤因素敏感性增高, 引起肝细胞死亡明显增加^[7], 因此, 提高肝细胞抗损伤能力, 减少肝细胞凋亡及程序性坏死, 是预防及治疗肝损伤重症化的重要策略。

(2) 根据文献及团队前期研究提示 ERS 调控肝细胞凋亡及程序性坏死并影响肝损伤进展

内质网是真核细胞中最大的细胞器, 主要有三大功能: ①负责分泌蛋白和膜蛋白的合成、折叠、转运以及多种翻译后修饰; ②储存钙离子和调节细胞内钙信号; ③是胆固醇和脂质合成的场所。肝细胞富含内质网, 对维持细胞正常功能至关重要。



各种致病因素作用于细胞,通过诱发 ER 中错误折叠和未折叠蛋白的堆积以及 Ca^{2+} 平衡紊乱及细胞凋亡信号通路等内质网反应,称为 ERS。ERS 激活的反应有 3 种类型^[8,9]: ①未折叠或错误折叠的蛋白质在 ER 蓄积引起的未折叠蛋白反应(unfolded protein response, UPR); ②正确折叠的蛋白在 ER 过度蓄积,激活核因子 κB (NF- κB)引发的内质网超负荷反应(endoplasmic reticulum overload response, EOR); ③胆固醇缺乏引发的胆固醇调节级联反应。目前一般用 UPR 来提示 ER 发生了应激反应,对其它原因如脂质代谢紊乱等导致的 ERS 研究甚少。ERS 是真核细胞的一种保护性应激反应。ER 通过激活 UPR 保护细胞,恢复细胞正常状态。当 ERS 不能维持细胞内环境稳态将激活凋亡信号进而触发 ER 相关凋亡。

UPR 由需肌醇酶 1 (inositol requiring enzyme1, IRE1)、活化转录因子 6 (activating transcription factor 6, ATF6) 和蛋白激酶 R 样内质网激酶 (protein kinase R-like ER kinase, PERK) 协同介导。ERS 时, IRE1、PERK 及 ATF6 等通路激活,促进下游信号及相关基因的表达^[10]。X 盒结合蛋白 1 (X-box binding protein-1, XBP1) 接受 ATF6 的调控,其 mRNA 经 IRE1 剪切后翻译成为具有转录活性的剪接型 XBP1 (spliced XBP1, XBP1s), 促进 ERS 相关基因表达。

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。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 可进一步诱导葡萄糖调节蛋白 78 (glucose-regulated protein 78, GRP78)、葡萄糖调节蛋白 94 (glucose-regulated protein 94, GRP94)、C/EBP 同源蛋白 (C/EBP homologous protein, CHOP) 等的表达,促进细胞内稳态恢复^[11]。

ERS 作为一种防御性应激反应,最近研究发现 ERS 在许多肝脏疾病的发病中发挥了重要作用^[12]。其可通过 PERK/eIF2 α 信号抑制总体蛋白合成,通过 ATF6、ATF4、XBP1 等转录因子上调分子伴侣表达,促进蛋白加工,同时激活内质网相关降解,减轻内质网的蛋白负荷,以恢复细胞内稳态以维持细胞正常状态。但持续或过强的 ERS,将激活凋亡、程序性坏死等信号,引起损伤反应^[13]。

我们前期发现: ERS 在急性肝损伤中介导肝细胞程序性坏死^[14]; ERS 通过激活 NF- κB 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 ERS, 减轻急性肝损伤^[15]; 特异性抑制 cI β 2 α 去磷酸化通过减轻急性肝损伤中肝内 ERS, 减少肝细胞凋亡^[16]; 近期在体内及体外实验中敲减 ATF6 表达, 发现 ERS、肝细胞凋亡及程序性坏死均加重, 提示 ERS 在肝损伤中可能整合多种信号, 通过多种机制影响肝细胞凋亡及程序性坏死。在进一步的动物模型及肝病患者肝组织中均发现 ERS、肝细胞凋亡及程序性坏死与肝损伤的程度正相关, 提示 ERS 介导的肝细胞凋亡及程序性坏死加重可能是肝损伤重症化的基本环节。

(3) 促肝细胞生长因子受体 c-Met 可减轻肝损伤, 对抗其重症化趋势

促肝细胞生长因子受体, 也称细胞间质上皮转换因子 (cellular-mesenchymal epithelial transition factor, c-Met) 是一种具有多功能跨膜的酪氨酸激酶, 是大小约 110kb 位于人类 7 号染色体长臂上的活性片段, 其在不同的细胞、不同的作用底物中所表现的功能有所不同, 可促进肝细胞、干细胞及内皮细胞的增殖和分裂, 还可控制调节胚胎发育中细胞移动, 参与细胞信息转导以及骨架的重排^[17,18]。c-Met 由胞外 α 链 (50×10^5) 和跨膜 β 链 (145×10^5) 经二硫键连接组成的异源体, 其主要表达于上皮细胞中, 在糖基化修饰及断裂等作用下由单链前体 (相对分子量为 1.7×10^5) 形成成熟的受体蛋白 c-Met (相对分子量为 1.9×10^5)。c-Met 在结构上分为胞内域、跨膜螺旋结构域及胞外域^[19,20]。肝细胞生长因子 (hepatocyte growth factor, HGF) 作为 c-Met 的唯一高亲和性的配体^[21], 是由间叶细胞合成, c-Met 在 HGF 的诱导下形成二聚体形式, 在 c-Met 二聚化的影响下, 催化结构上的 Tyr1234 和 Tyr1235 两个残基发生磷酸化, 接着 C 端结构区上的 Tyr1356 和 Tyr1349 也发生磷酸化, 进而募集 PI3K、GRB2、GAB1、STAT3、SHP2、SRC、PLC γ 1、PTP 等下游信号细胞间充质因子, 信号在级联式磷酸化反应的作用下被逐级放大, 进而激活 P13/Akt、STAT3/JNK、RAS/MAPK 等信号通路^[22-26], 从而协调细胞的生长、增殖、存活、形态变化及运动等一系列关键的生物学效应, 由此可见 c-Met 信号通路在机体胚胎发育、器官形成及组织再生中具有极其重要的功能。

我们在前期收集了在遵义医科大学附属医院就诊的 5 例慢性乙型肝炎普通患者及 4 例乙型肝炎病毒相关慢加急性肝衰竭患者的肝脏组织标本, 通过蛋白组学检测我们发现慢乙肝及肝衰竭这两种不同程度肝损伤患者肝脏组织中 c-Met 的表达存在明显的差异, 表现为肝损伤程度较重的肝衰竭组患者 c-Met 表达低于肝损伤程度相对较轻的普通慢乙肝患者, 由此我们推测肝脏损伤程度与肝内 c-Met 的表达密切相关。且我们在肝损伤小鼠模型的预实验中发现, 肝内 c-Met 的表达水平与肝损伤程度呈负相关, c-Met 的肝



内水平下调,可能会加剧 ERS 及其介导的肝细胞凋亡及程序性坏死,促进肝损伤重症化,同时也提示:ERS 与肝内 c-Met 水平降低可能是相互促进,形成正反馈作用的调控环路,若不及时纠正,将可能通过加重肝细胞凋亡及程序性坏死,显著促进肝损伤重症化,由此推断,在肝损伤中 c-Met、ERS、肝细胞凋亡及程序性坏死形成一个复杂的调控轴。

(4) LPS 通过抑制 c-Met 与 ERS 的调控作用促进肝损伤重症化

合并感染是肝损伤重症化常见的危险因素,内毒素加重肝细胞损伤是其重要的机制之一^[27]。内毒素以脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)为主要成分。正常生理状态下,肠道中的内毒素通过肠粘膜屏障后,可被肝脏网状内皮系统(主要是 Kupffer 细胞)清除,一般不会对人体造成损害。但是当大量内毒素进入肝脏或肝脏发生疾病时,机体内毒素的产生与清除能力失衡,可通过直接损伤肝细胞或间接促进炎症反应,加重肝损害。大量内毒素可直接参与肝细胞损伤并诱导肝细胞凋亡,血内毒素水平与其诱导肝细胞凋亡的程度成正相关。

我们预实验通过腹腔注射 LPS 部分模拟自发性腹膜炎加重肝损伤,发现高剂量 LPS 诱导肝损伤的同时可直接抑制 c-Met 的表达,低剂量 LPS (不引起正常生理条件下小鼠肝损伤)可抑制 c-Met 与 ERS 的相互调控作用,加剧肝细胞凋亡及程序性坏死,加重肝损伤,提示 c-Met 与 ERS 的调控作用被抑制,进而加重肝细胞凋亡及程序性坏死,促进肝损伤重症化。

综上所述,本课题组拟通过小鼠模型,首先探讨 c-Met、ERS、肝细胞凋亡及程序性坏死在肝损伤重症化中的变化特点,然后部分模拟自发性腹膜炎来探讨 LPS 调节 c-Met 在重症肝病中的作用,结合特异性调节关键基因技术,探讨肝细胞 c-Met 影响肝损伤重症化的作用机制及意义。希望通过以上研究旨能为临床医师对重症肝病的治疗及阻止肝损伤重症化提供一些科学依据及提醒临床医师对某些正常生理条件下并不引起肝损伤的因素引起重视并提前进行干预,改善重症肝损伤患者的预后。



参考文献:

- [1] Brahmania M,Liu S,Wahed AS,et al.Alcohol, tobacco and coffee consumption and liver disease severity among individuals with Chronic Hepatitis B infection in North America [J]. Annals of hepatology,2020,19(4):437-445.
- [2] Fernandez J,Acevedo J,Wiest R, et al. Bacterial and fungal infections in acute-on-chronic liver failure: prevalence characteristics and impact on prognosis[J].Gut, 2018, 67(10):1870-1880.
- [3] Schwabe RF,Luedde T.Apoptosis and necroptosis in the liver: a matter of life and death[J]. Nature reviews Gastroenterology & hepatology,2018, 15(12):738-752.
- [4] Grootjans S, Vanden Berghe T, Vandenabeele P.Initiation and execution mechanisms of necroptosis: an overview[J]. Cell death and differentiation ,2017, 24(7):1184-1195.
- [5]Zhao XC, Livingston MJ, Liang XL,et al. Cell Apoptosis and Autophagy in Renal Fibrosis [J]. Advances in experimental medicine and biology,2019, 1165:557-584.
- [6] Fauster A, Rebsamen M, Willmann KL,et al.Systematic genetic mapping of necroptosis identifies SLC39A7 as modulator of death receptor trafficking[J]. Cell death and differentiation,2019, 26(6):1138-1155.
- [7]Wei X, Yu H, Zhao P,et al.Serum regucalcin is a useful indicator of liver injury severity in patients with hepatitis B virus-related liver diseases[J]. Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas 2019,52(10):e8845.
- [8] Shi W, Chen Z, Li L,et al. Unravel the molecular mechanism of XBP1 in regulating the biology of cancer cells[J].Journal of Cancer,2019,10(9):2035-2046.
- [9] Song MJ, Malhi H. The unfolded protein response and hepatic lipid metabolism in non alcoholic fatty liver disease[J].Pharmacology & therapeutics,2019, 203:107401
- [10]Hughes A, Oxford AE, Tawara K,et al.Endoplasmic Reticulum Stress and Unfolded Protein Response in Cartilage Pathophysiology; Contributing Factors to Apoptosis and Osteoarthritis[J]. International journal of molecular sciences,2017, 18(3).
- [11]Starr CR, Gorbatyuk MS.Delineating the role of eIF2alpha in retinal degeneration[J]. Cell death & disease,2019,10(6):409.



- [12]Maiers JL,Malhi H.Endoplasmic Reticulum Stress in Metabolic Liver Diseases and Hepatic Fibrosis[J].Seminars in liver disease,2019, 39(2):235-248.
- [13]Bian M, He J, Jin H,et al. Oroxylin A induces apoptosis of activated hepatic stellate cells through endoplasmic reticulum stress[J]. Apoptosis : an international journal on programmed cell death[J].2019, 24(11-12):905-920.
- [14]Tian RD, Chen YQ, He YH,et al.Phosphorylation of eIF2alpha mitigates endoplasmic reticulum stress and hepatocyte necroptosis in acute liver injury[J].Annals of hepatology, 2020, 19(1):79-87.
- [15]Huang WG, Wang J, Liu YJ, et al.Endoplasmic Reticulum Stress Increases Multidrug-resistance Protein 2 Expression and Mitigates Acute Liver Injury[J].Current molecular medicine,2020, 20(7):548-557.
- [16]Tang YJ, Chen H, Yi Y, et al.Inhibition of eIF2alpha Dephosphorylation Protects Hepatocytes from Apoptosis by Alleviating ER Stress in Acute Liver Injury[J]. BioMed research international,2020, 2020:2626090.
- [17]Puccini A, Marín-Ramos NI, Bergamo F, et al. Safety and Tolerability of c-MET Inhibitors in Cancer[J].Drug Saf, 2019;42(2):211-233.
- [18]Moosavi F, Giovannetti E, Saso L, et al. HGF/MET pathway aberrations as diagnostic, prognostic, and predictive biomarkers in human cancers[J]. Crit Rev Clin Lab Sci,2019, 56(8):533-566.
- [19]Wang Z, Nie Y, Zhang K, et al. Solution structure of SHIP2 SH2 domain and its interaction with a phosphotyrosine peptide from c-MET[J].Arch Biochem Biophys,2018,656:31-37.
- [20]Kojima T, Funato Y, Miki H. Phosphatase of regenerating liver sensitizes MET to functional activation by hepatocyte growth factor[J].Biochem J,2019,476(10):1419-1431.
- [21]Wang H, Rao B, Lou J, et al. The Function of the HGF/c-Met Axis in Hepatocellular Carcinoma[J].Front Cell Dev Biol,2020,8:55.
- [22]Huang X, Xu X, Wang X, et al. The AKT-independent MET-V-ATPase-MTOR axis suppresses liver cancer vaccination[J].Signal Transduct Target Ther,2020,5(1):122.
- [23]Wei K, Li M, Zöller M, Wang M, et al. Targeting c-MET by Tivantinib through



synergistic activation of JNK/c-jun pathway in cholangiocarcinoma[J].Cell Death Dis,2019,10(3):231.

[24]Gao W Han J.Overexpression of ING5 inhibits HGF-induced proliferation,invasion and EMT in thyroid cancer cells,via, regulation of the c-Met/PI3K/Akt signaling pathway[J].Biomed Pharmacother,2018,98:265-270.

[25] Bongartz H, Gille K, Hessenkemper W, et al. The multisite docking protein Grb2-associated binder 1 (Gab1) enhances interleukin-6-induced MAPK-pathway activation in an SHP2-,Grb2-,and time-dependent manner[J].Cell Commun Signal,2019,17(1):135.

[26]Boichuck M, Zorea J, Elkabets M, et al.c-Met as a new marker of cellular senescence[J].Aging (Albany NY),2019,11(9):2889-2897.

[27]Carpino G, Del Ben M, Pastori D, et al. Increased Liver Localization of Lipopolysaccharides in Human and Experimental NAFLD[J]. Hepatology,2020, 72(2):470-485.



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) 通过建立小鼠模型，验证肝内 c-Met、ERS、细胞凋亡及程序性坏死在肝损伤重症化中的变化特点，并探讨其相互调控关系及意义

本部分首先通过腹腔注射不同剂量的四氯化碳 (carbon tetrachloride, CCl₄) 建立急性肝损伤小鼠模型。

①通过统计小鼠死亡率，检测血清转氨酶及胆红素水平，分析肝组织病理变化，综合评估肝损伤程度，确定成功建立急性肝损伤小鼠模型；

②检测急性肝损伤模型小鼠肝细胞内 c-Met 表达水平，探讨肝内 c-Met 表达水平与肝损伤程度的相关性；

③检测急性肝损伤模型小鼠肝组织内 ERS、细胞凋亡、程序性坏死，拟验证肝细胞 ERS、肝细胞凋亡及程序性坏死与肝损伤程度呈正相关。

2) 通过 shRNA 干扰技术，探讨 c-Met 表达对急性肝损伤小鼠模型肝损伤重症化的意义

①通过小鼠尾静脉注射重组特异基因 shRNA 的 8 型腺相关病毒预转染 4~6 周，以敲减 c-Met (由于在 CCl₄ 诱导的模型小鼠中 c-Met 表达主要表现为升高，故选用敲减为主的干预)；

②使用 CCl₄ 诱导已予基因敲减的模型小鼠使其发生急性肝损伤；

③检测已予 shRNA 干扰后的急性肝损伤模型小鼠肝损伤情况、肝组织内 ERS、细胞凋亡、程序性坏死，拟验证在敲除了 c-Met 后肝损伤程度、肝细胞 ERS、肝细胞凋亡及程序性坏死较未敲除时加重，阐明 c-Met 具有保护肝细胞，对抗肝损伤的作用。

3) 通过脂多糖部分模拟自发性腹膜炎，探讨内毒素血症影响下肝内 c-Met、ERS、细胞凋亡及程序性坏死在肝损伤重症化中的变化特点及相互调控的关系和意义

①通过不同剂量的 LPS 诱导小鼠发生急性肝损伤，探讨 LPS 对肝内 c-Met-ERS-细胞凋亡/程序性坏死调控轴的影响及在肝损伤中的作用；

②检测不同剂量 LPS 诱导的急性肝损伤小鼠模型肝损伤情况、肝组织内 ERS、细胞凋亡、程序性坏死及肝细胞内 c-Met 表达水平，拟探讨：不同剂量 LPS 诱导下肝



损伤情况、肝组织内 ERS、细胞凋亡、程序性坏死及肝细胞内 c-Met 表达水平有何变化，其次拟确定一个正常生理情况下不引起小鼠肝损伤的 LPS 浓度；

③通过正常生理条件下不引起肝损伤的低剂量 LPS 干预 CCl₄ 诱导的急性肝损伤的模型小鼠；

④检测在经正常生理条件下不造成肝损伤低剂量 LPS 干预后 CCl₄ 诱导的急性肝损伤模型小鼠肝损伤情况、肝组织内 ERS、细胞凋亡、程序性坏死及 c-Met，拟验证：在肝损伤的基础上，正常生理条件下不引起肝损伤低剂量的 LPS 也可能通过抑制 c-Met 与 ERS 的相互调控作用，增加 ERS 介导的肝细胞凋亡及程序性坏死，促进肝损伤进展（通过预实验我们发现急性肝损伤模型小鼠对低剂量的脂多糖异常的敏感）。

4) 通过 c-Met 的过表达，探讨 c-Met 表达对 LPS 诱导的小鼠肝损伤重症化的影响及机制

①通过小鼠尾静脉注射 cDNA 的 8 型腺相关病毒或慢病毒预转染 4~6 周，以过表达 c-Met（由于在 LPS 诱导的急性肝损伤模型小鼠中 c-Met 蛋白表达主要表现为降低，故选用过表达为主的干预）；

②使用 LPS 诱导已予 c-Met 过表达的模型小鼠使其发生急性肝损伤；

③检测已予 cDNA 干扰后的急性肝损伤模型小鼠肝损伤情况、肝组织内 ERS、细胞凋亡、程序性坏死，拟验证在过表达 c-Met 后肝损伤程度、肝细胞 ERS、肝细胞凋亡及程序性坏死较未过表达时减轻，阐明 c-Met 具有保护肝细胞，对抗肝损伤的作用。

(2) 研究目标

1) c-Met 通过减轻 ERS 介导的肝细胞凋亡及程序性坏死，保护损伤的肝脏；

2) LPS 通过下调 c-Met 的表达，增加肝细胞对 ERS 介导的凋亡及程序性坏死信号的敏感性，从而促进肝损伤重症化；

3) 肝脏靶向过表达 c-Met，通过负调控 ERS 介导的肝细胞凋亡及程序坏死，减轻肝损伤。

(3) 拟解决的关键问题

肝细胞凋亡及程序性坏死的增加与肝损伤重症化相关，上调 c-Met 表达通过减轻 ERS 介导的肝细胞凋亡及程序性坏死，有利于阻止肝损伤的重症化过程。



2. 研究思路、方法、技术路线、实验方案及可行性分析:

(1) 研究思路、方法及实验方案

1) 通过建立小鼠模型, 验证肝内 c-Met、ERS、细胞凋亡及程序性坏死在肝损伤重症化中的变化特点, 并探讨其相互调控关系及意义 (见技术路线图 1)

①实验动物使用 SPF 级雄性 BALB/c 小鼠, 分别通过不同剂量的 CCl₄ 腹腔注射诱导实验小鼠, 由于在前期研究提示 CCl₄ 给药后 ERS 相关指标在诱导后 24h 变化最显著, 故选用 12h、24h、48h 及 72h 为观测点, 检测实验小鼠不同时间节点肝损伤变化 (通过统计小鼠死亡率、检测血清肝功转氨酶及胆红素指标、HE 染色观察肝脏病理形态学改变综合评估肝损伤程度), 确定成功建立急性肝损伤模型。

CCl₄ 诱导小鼠急性肝损伤, 将小鼠随机分为模型组及对照组。模型组: 分别按以下剂量腹腔注射 CCl₄: 0.25 mL/kg、0.5 mL/kg、1 mL/kg、2 mL/kg (按 CCl₄ 折算: CCl₄ 与橄榄油按体积比为 1:4 的比例混合, 0.22μm 滤菌器滤菌, 4~8℃ 保存), 给药 1 次, 注射前禁食禁饮 8h; 溶剂对照组: 等剂量橄榄油, 0.22μm 滤菌器滤菌, 4~8℃ 保存, 腹腔注射, 给药 1 次, 注射前禁食禁饮 8h; 正常对照组: 未予处理。每个时间节点每组均有 12 只小鼠。

②检测急性肝损伤实验小鼠模型组及对照组肝内肝细胞凋亡 (Western blot 检测 cleaved caspase-3 表达、TUNEL 显色法测细胞凋亡)、程序性坏死 (Western blot 检测 p-RIP3 及 MLKL 的磷酸化水平, 免疫组化检测 p-MLKL 表达)、ERS (Western blot 检测 UPR 相关蛋白: p-PERK、PERK、p-eIF2α、eIF2α、ATF4、ATF6、XBP1s、GRP78、GRP94、ERP29、CHOP、caspase-12) 及检测 c-Met (Western blot 检测蛋白表达、定量 PCR 检测 mRNA 表达、免疫组化检测肝组织切片中的蛋白表达并定位)。

2) 通过 shRNA 干扰技术, 探讨 c-Met 表达对急性肝损伤小鼠模型肝损伤重症化的意义 (见技术路线图 2)

①通过小鼠尾静脉注射重组特异基因 shRNA 的 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 0.1mL 的 PBS 中), 预转染 4~6 周, 在肝脏靶向敲减实验小鼠肝内 c-Met 的关键基因, 通过观察绿色荧光检测肝细胞转染效率, 定量 PCR 及 Western blot 法检测目的基因的 mRNA 及蛋白水平, 确定成功敲减目的基因表达;



②使用 CCl₄ 诱导已予基因敲减的模型小鼠使其发生急性肝损伤，实验小鼠随机分组，每组 12 只小鼠，分为：a.正常对照组：未予处理；b.Control shRNA 组：先 Control shRNA 预干预，后用溶剂橄榄油诱导；c. shRNA 组：先目的基因的 shRNA 预干预，后用溶剂橄榄油诱导；d.Control shRNA+模型组：先 Control shRNA 预干预，后用 CCl₄ 诱导；e. shRNA+模型组：先目的基因的 shRNA 预干预，后用 CCl₄ 诱导；

③通过评估肝损伤变化，检测肝细胞凋亡（Western blot 检测 cleaved caspase-3 表达、TUNEL 显色法测细胞凋亡）、程序性坏死（Western blot 检测 p-RIP3 及 MLKL 的磷酸化水平，免疫组化检测 p-MLKL 表达）、ERS（Western blot 检测 UPR 相关蛋白：p-PERK、PERK、p-eIF2 α 、eIF2 α 、ATF4、ATF6、XBP1s、GRP78、GRP94、ERP29、CHOP、caspase-12）的变化，探讨 c-Met 在肝损伤重症化中的影响及作用机制。

3）通过脂多糖部分模拟自发性腹膜炎，探讨内毒素血症影响下肝内 c-Met、ERS、细胞凋亡及程序性坏死在肝损伤重症化中的变化特点及相互调控的关系和意义（见技术路线图 3）

①通过不同剂量 LPS（0.1mg/kg、0.5mg/kg、2.5mg/kg、5mg/kg）诱导小鼠 12、24、48 及 72 小时，检测肝损伤、肝细胞凋亡、程序性坏死、ERS 及 c-Met 表达，探讨 LPS 对肝内 c-Met-ERS-细胞凋亡/程序性坏死调控轴的影响，并确定在正常生理条件下不引起实验小鼠肝损伤的临界浓度。

LPS 诱导小鼠，将小鼠随机分为模型组：分别按以下剂量腹腔注射 LPS：0.1mg/kg、0.5mg/kg、2.5mg/kg、5mg/kg（1mg LPS 先溶于 5mL 的 PBS 中，0.22 μ m 滤菌器滤菌，-20℃保存，给药 1 次，注射前禁食禁饮 8h；溶剂对照组：腹腔注射等剂量的溶剂 PBS，给药 1 次；正常对照组：未予处理。每个时间节点每组 12 只小鼠。

②检测不同剂量 LPS 诱导的急性肝损伤实验小鼠肝损伤变化（通过统计小鼠死亡率、检测血清肝功转氨酶及胆红素指标、HE 染色观察肝脏病理形态学改变综合评估肝损伤程度）、肝细胞凋亡（Western blot 检测 cleaved caspase-3 表达、TUNEL 显色法测细胞凋亡）、程序性坏死（Western blot 检测 p-RIP3 及 MLKL 的磷酸化水平，免疫组化检测 p-MLKL 表达）、ERS（Western blot 检测 UPR 相关蛋白：p-PERK、PERK、p-eIF2 α 、eIF2 α 、ATF4、ATF6、XBP1s、GRP78、GRP94、ERP29、CHOP、caspase-12）及检测 c-Met（Western blot 检测蛋白表达、定量 PCR 检测 mRNA 表达、免疫组化检测肝组织切片中的蛋白表达并定位），探讨上述指标与 LPS 的剂量关系及确定一个正常生理条



件下不引起实验小鼠肝损伤的 LPS 浓度；

③通过低剂量（在正常生理条件下不引起实验小鼠肝损伤）LPS 干预 CCl₄ 诱导的急性肝损伤小鼠模型，检测肝损伤、肝细胞凋亡、程序性坏死、ERS 及 c-Met 表达；

实验小鼠随机分为：正常对照组、溶剂对照组、LPS 组、CCl₄ 模型组、LPS+ CCl₄ 模型组，每组 12 只小鼠。

4) 通过 c-Met 的过表达，探讨 c-Met 表达对 LPS 诱导的小鼠肝损伤重症化的影响及机制（见技术路线图 4）

①通过小鼠尾静脉注射重组特异基因 cDNA 的 8 型腺相关病毒或慢病毒，每只小鼠每次注射 $1-2 \times 10^{10}$ viral genome copies(溶于 0.1mL 的 PBS 中)，预转染 4~6 周，在肝脏靶向过表达实验小鼠肝内 c-Met 的关键基因，通过观察绿色荧光检测肝细胞转染效率，定量 PCR 及 Western blot 法检测目的基因的 mRNA 及蛋白水平，确定成功过表达目的基因；

②使用 LPS 诱导已予基因过表达的模型小鼠使其发生急性肝损伤，实验小鼠随机分组，每组 12 只小鼠，分为：a.正常对照组：未予处理；b.Control cDNA 组：先 Control cDNA 预干预，后用溶剂 PBS 诱导；c. cDNA 组：先目的基因的 cDNA 预干预，后用溶剂 PBS 诱导；d.Control cDNA+模型组：先 Control cDNA 预干预，后用 LPS 诱导；e. cDNA +模型组：先目的基因的 cDNA 预干预，后用 LPS 诱导；

③通过评估肝损伤变化，检测肝细胞凋亡（Western blot 检测 cleaved caspase-3 表达、TUNEL 显色法测细胞凋亡）、程序性坏死（Western blot 检测 p-RIP3 及 MLKL 的磷酸化水平，免疫组化检测 p-MLKL 表达）、ERS（Western blot 检测 UPR 相关蛋白：p-PERK、PERK、p-eIF2 α 、eIF2 α 、ATF4、ATF6、XBP1s、GRP78、GRP94、ERP29、CHOP、caspase-12）的变化，探讨 c-Met 在肝损伤重症化中的影响及作用机制。



(2) 技术路线图

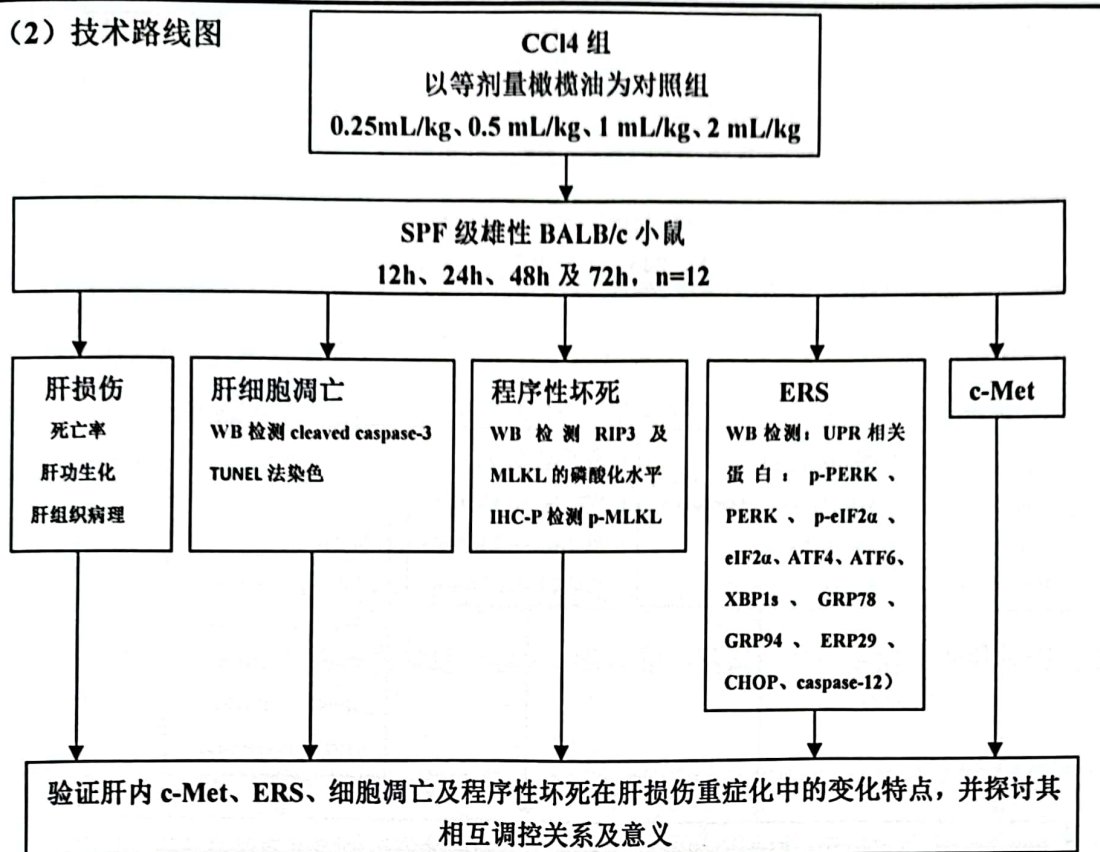


图 1

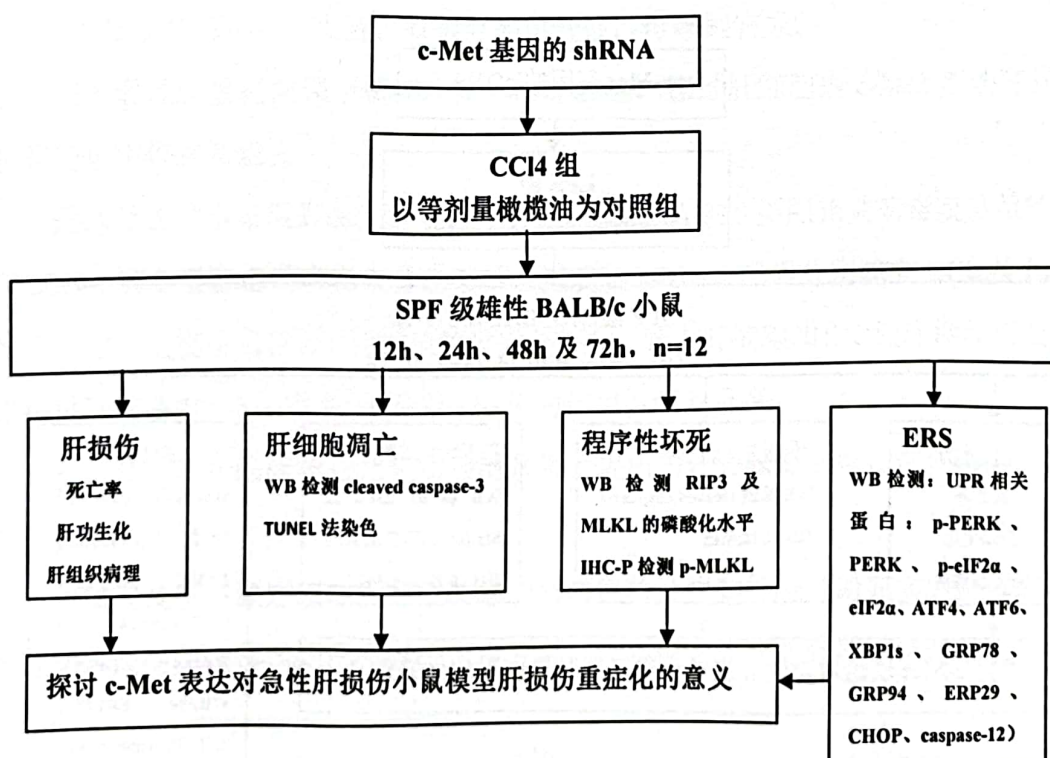


图 2



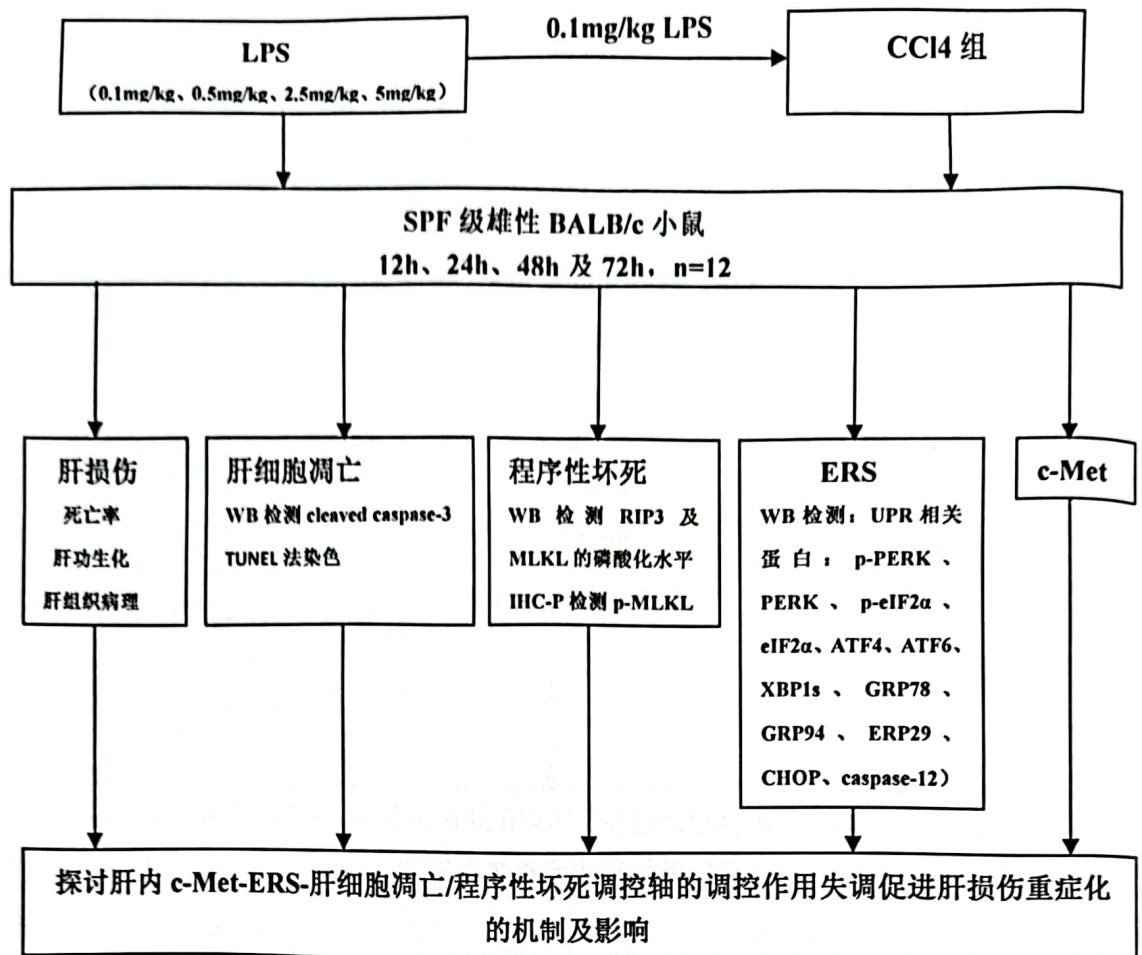


图 3

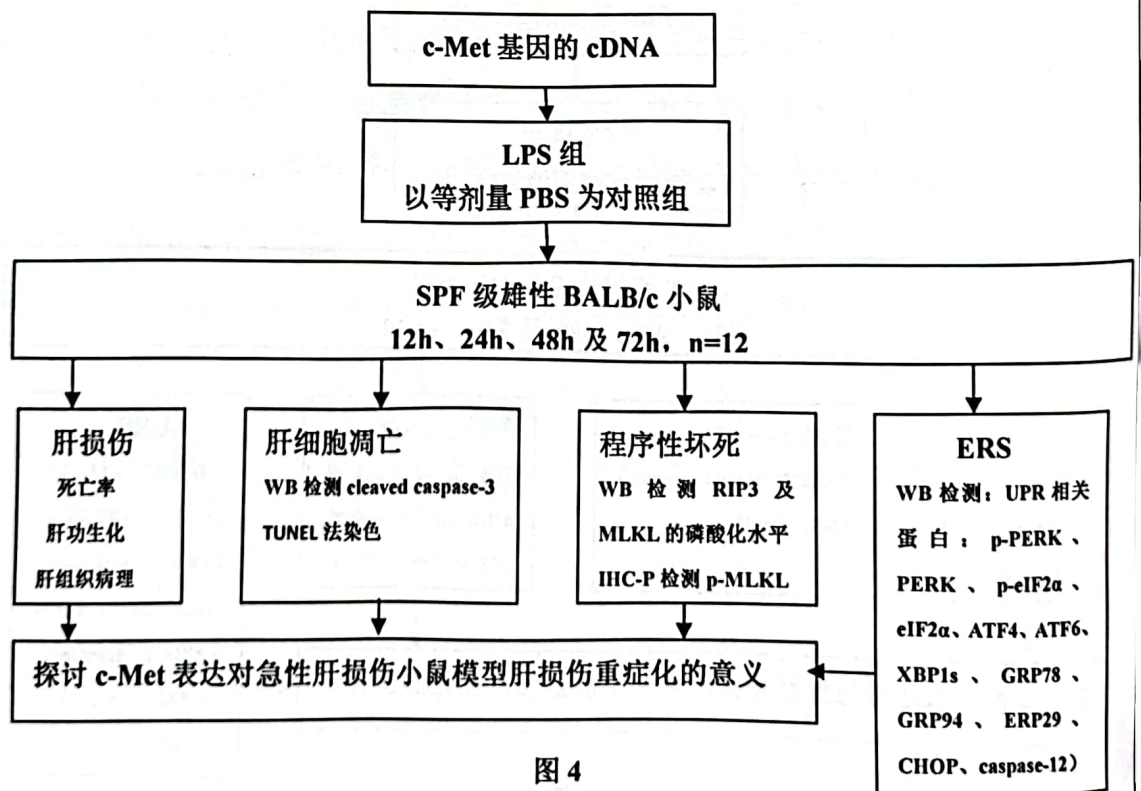


图 4



(3) 可行性分析

理论上可行:

1) 通过建立小鼠模型, 验证肝内 c-Met 对肝损伤重症化的调节作用

本部分的关键首先是探究肝内 c-Met 在不同程度肝损伤模式中的表达有何差异, 在前期我们已完成了对 5 例普通慢性乙型肝炎患者及肝损伤较重的 4 例乙型肝炎病毒相关慢加急性肝衰竭患者肝脏组织的相关蛋白检测, 我们发现在重症肝病患者肝组织内存在低水平的 c-Met 表达, 高水平的 ERS、细胞凋亡及程序性坏死, 且在预实验中结果显示肝内 c-Met 表达与肝损伤程度呈负相关关系, 这与临床标本检测结果相似: 重症的肝病患者肝内 c-Met 表达低下。

此部分有临床标本检测结果及预实验结果的支持, 完全可以顺利完成。

2) 通过脂多糖部分模拟自发性腹膜炎, 探讨脂多糖调节肝内 c-Met 对肝损伤重症化的作用机制

通过 CCl₄ 建立急性肝损伤模型后, 通过腹腔注射在正常生理条件下不引起实验小鼠肝损伤低浓度的 LPS 部分模拟自发性腹膜炎, 再次检测在内毒素血症的影响下实验小鼠肝损伤、肝细胞凋亡、程序性坏死、ERS 及 c-Met 表达的变化, 通过前期预实验我们已经发现急性肝损伤模型小鼠对低剂量的 LPS 异常的敏感。

此部分有预实验的支持, 有很好的可行性, 可顺利完成。

3) 通过肝脏靶向调节模型小鼠 c-Met 表达, 探讨肝细胞内 c-Met 影响肝损伤重症化的作用机制及意义

此部分通过小鼠尾静脉注射重组特异基因 shRNA 的 8 型腺相关病毒及重组特异基因 cDNA 的 8 型腺相关病毒来分别敲减及过表达 c-Met, 然后分别建立 CCl₄ 及 LPS 诱导的急性肝损伤小鼠模型, 通过检测肝损伤变化、肝内肝细胞凋亡、程序性坏死及 ERS 来探讨肝细胞内 c-Met 影响肝损伤重症化的作用机制及意义。

此部分是基于临床特点及预实验的基础上提出的, 有很好的可行性, 可完成。

技术上可行:

申请人及所在课题组成员有着丰富的科研经验及强劲的基础研究实力, 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的技术基础。



实验设备可行:

本课题依托遵义医科大学附属医院的感染科实验室、全科实验室、细胞工程重点实验室及遵义医科大学中心实验室,具有动物中心、细胞培养能力及可顺利开展Wester Blot、免疫组化、PCR 及体内外特异干扰基因表达等实验方法,无需添加任何实验设备便可顺利完成该课题的所有实验。



3. 本项目的特色和创新之处:

本课题基于重症肝病死亡率高,其预后与早期预警、及时有效的治疗密切相关等临床特点,根据 c-Met、ERS 均与肝细胞的保护性反应密切相关,推测其可能影响肝损伤的重症化,结合我们前期研究,本项目拟围绕肝损伤重症化中的发病机制及治疗,首先通过建立小鼠模型探讨肝细胞 c-Met、ERS、肝细胞凋亡及程序性坏死在肝损伤重症化中的变化特点,并确定其存在轴性的调节关系,其次通过正常生理情况下不造成肝损伤的低剂量 LPS 干预探讨内毒素血症基于 c-Met 对肝损伤、ERS、肝细胞凋亡及程序性坏死的影响及对肝损伤重症化中的作用机制及意义,然后通过特异性调节关键基因表达,进一步探讨 c-Met 在肝损伤重症化中的作用机制及影响,经过以上步骤深入的探讨肝细胞 c-Met/ERS-凋亡/程序性坏死调控轴在肝损伤重症化中的作用机制及意义。本研究可以提高临床医师对平时并不造成肝损伤作用物质的警惕性,提前进行临床干预,增加肝脏抗损失能力,改善重症肝病患者的预后。

4. 研究进度计划:

(1) 2021 年 09 月 01 日-2021 年 12 月 31 日

检测急性肝损伤小鼠模型组及对照组肝损伤、细胞凋亡、程序性坏死、ERS 及 c-Met 的表达。

(2) 2022 年 01 月 01 日-2022 年 12 月 31 日

通过 shRNA 干扰技术,探讨 c-Met 信号通路在肝损伤重症化中的作用机制。

通过 LPS 部分模拟自发性腹膜炎,检测模型小鼠的肝损伤、细胞凋亡、程序性坏死、ERS 及 c-Met 的表达。

(3) 2023 年 01 月 01 日-2023 年 06 月 30 日

通过 cDNA 干扰技术,探讨 c-Met 信号通路在肝损伤重症化中的作用机制。

(4) 2023 年 07 月 01 日-2023 年 12 月 30 日

数据分析、总结、补充实验、撰写文章。



5. 预期研究成果

- (1) 初步阐明肝细胞 c-Met 在肝损伤重症化中的作用机制及意义;
- (2) 完成研究报告 1 份;
- (3) 发表 SCI 论文 1 篇, 北图核心 1 篇。



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：

申请人所在课题组从事重症肝病相关蛋白组学研究已有 10 余年，有着丰富的科研经验及强劲的基础研究实力，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的技术基础。

围绕本课题，本课题组已进行了如下研究及预实验：

1) 在重症肝病患者肝组织蛋白组学中 c-Met、ERS、细胞凋亡及程序性坏死相关蛋白的变化特点

我们前期临床研究中已经完成了 4 例乙型肝炎病毒相关慢加急性肝衰竭患者（ACLF：肝移植时肝脏标本）及 5 例普通慢性乙型肝炎患者（CHB：肝穿活检）肝脏转录组及蛋白组学检测，初步分析两组患者的相关蛋白差异性表达，结果显示：在重症肝病患者细胞凋亡及程序性坏死相关蛋白显著升高($p<0.05$)，重症肝病患者肝内 c-Met 表达显著降低($p<0.05$)，如表 1：

表 1 重症肝病患者肝 c-Met 表达变化特点

蛋白	ACLF1	ACLF2	ACLF3	ACLF4	CHB1	CHB2	CHB3	CHB4	CHB5	FC	P
c-Met	70	66.1	46.9	30.3	92.2	87.9	114.3	92.5	95.8	0.552	0.011
CASP8	489.9	469.2	476.8	408.8	313.2	416.9	311	347.5	302.9	1.363	0.003

注：ACLF：慢加急性肝衰竭；CHB：慢性乙型肝炎；CASP8 为凋亡蛋白 caspase-8，是凋亡及程序性坏死信号的交汇点。

2) 通过 CCl₄ 诱导的急性肝损伤小鼠模型肝内 c-Met 表达上调且随 CCl₄ 剂量增加肝损伤加重、细胞程序性坏死加重、c-Met 表达增加，如表 2 及图 1：

表 2 CCl₄ 剂量依赖性增加小鼠血清 ALT 及 TBil 水平

组别	对照组	0.5 mL/kg	1 mL/kg	2 mL/kg
ALT (U/L)	42.52±4.11	2498.52±189.41**	4344.51±541.76&&	667.77±545.72##
TBil (μmol/L)	1.45±0.13	2.31±0.17**	4.98±0.34&&	6.59±0.49##

注：** $P<0.01$ ，与对照组相比；&& $P<0.01$ ，与 0.5 mL/kg 组相比；## $P<0.01$ ，与 1 mL/kg 组相比。



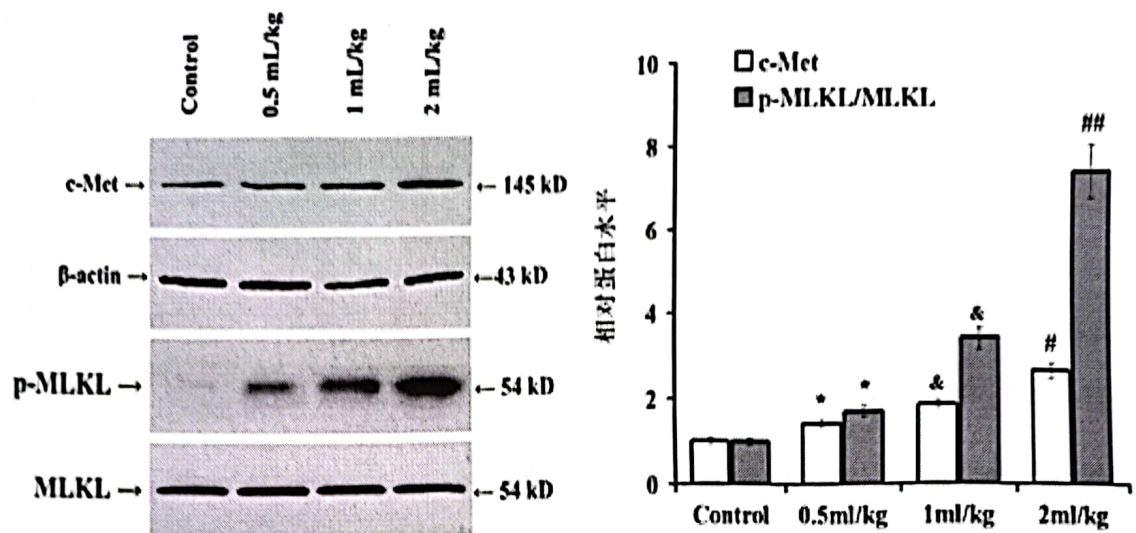


图 1 CCl_4 剂量依赖性对 c-Met 水平及程序坏死蛋白的变化特点

注: * $P < 0.05$, 与对照组相比; & $P < 0.05$, 与 0.5 mL/kg 组相比; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, 与 1 mL/kg 组相比。

3) 通过 LPS 诱导的急性肝损伤小鼠模型肝内 c-Met 表达下调且随 LPS 剂量增加肝损伤加重、细胞程序性坏死加重、c-Met 表达下降, 如表 3 及图 2:

表 3 LPS 剂量依赖性增加小鼠血清 ALT 及 TBil 水平

组别	对照组	0.1 mg/kg	0.5 mg/kg	2.5 mg/kg
ALT (U/L)	45.31±4.74	43.85±4.93	48.38±5.27	2869.74±295.47##
TBil (μmol/L)	1.38±0.11	1.63±0.15	1.72±0.14	5.93±0.41##

注: ## $P < 0.01$, 与 0.5mg/kg 组相比。

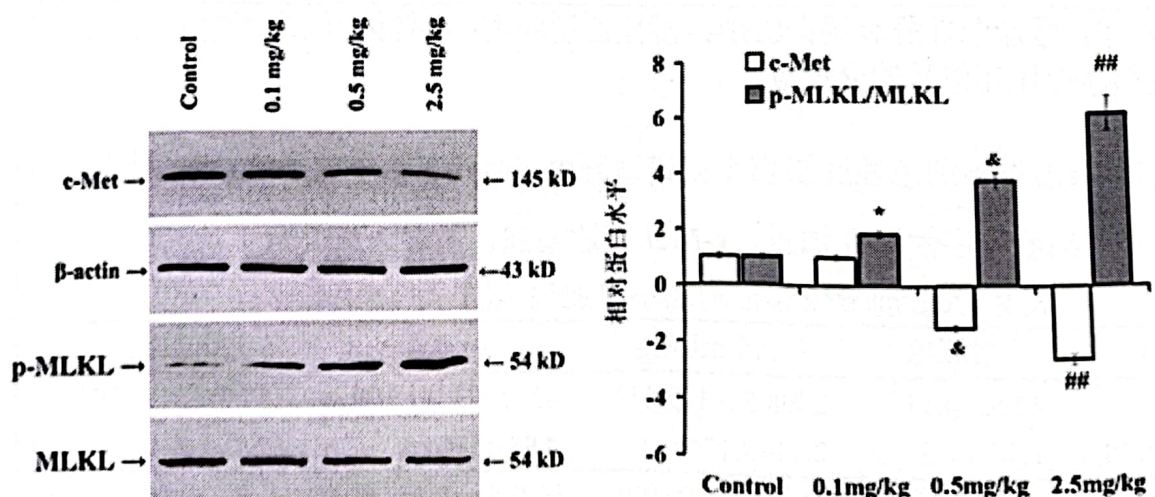


图 2 LPS 剂量依赖性对 c-Met 水平及程序坏死蛋白的变化特点



注: * $P < 0.05$, 与对照组相比; & $P < 0.05$, 与 0.1 mg/kg 组相比; ## $P < 0.01$, 与 0.5 mg/kg 组相比。

4) 低剂量 LPS (0.1mg/kg)增加小鼠 ALT 及 TBil 水平, 减少急性肝损伤模型小鼠肝内 c-Met 表达, 并增加肝内细胞程序性坏死, 如表 4 及图 3:

表 4 0.1mg/kg 的 LPS 增加 CCl₄ 诱导的小鼠血清 ALT 及 TBil 水平

组别	CCl ₄ 组	(LPS+CCl ₄) 组
ALT (U/L)	5832.48±583.83	6930±682.81**
TBil (μmol/L)	5.71±0.52	6.76±0.63**

注: ** $P < 0.01$, (LPS+ CCl₄) 组与 CCl₄ 组相比。

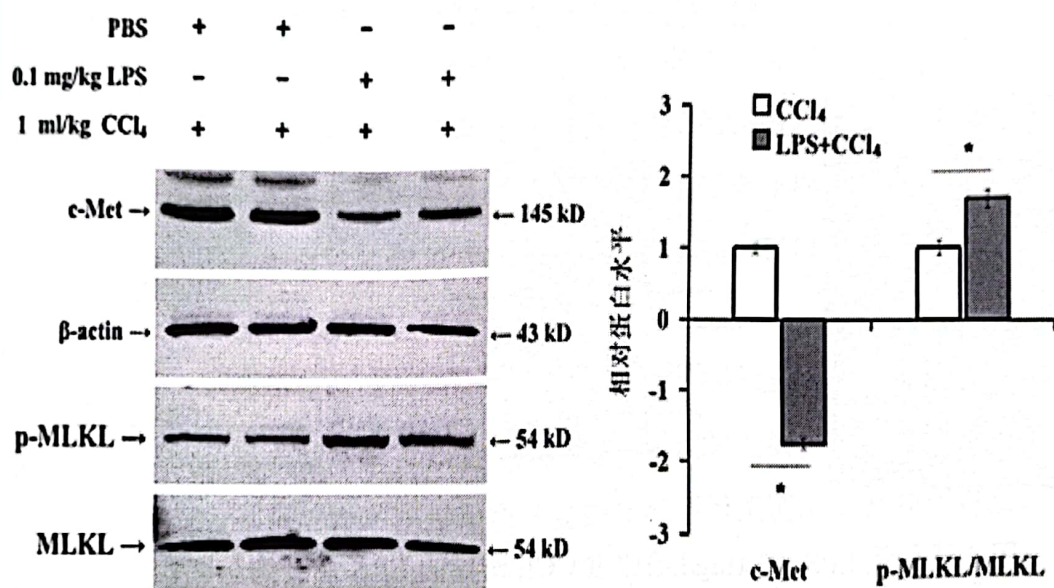


图 3 低剂量的 LPS 对 c-Met、肝细胞程序性坏死蛋白的影响

注: * $P < 0.05$, (LPS+ CCl₄) 组与 CCl₄ 组相比。

5) 低剂量 LPS (0.1mg/kg)加重 CCl₄ 诱导的 ERS 及肝细胞凋亡, 如图 4:



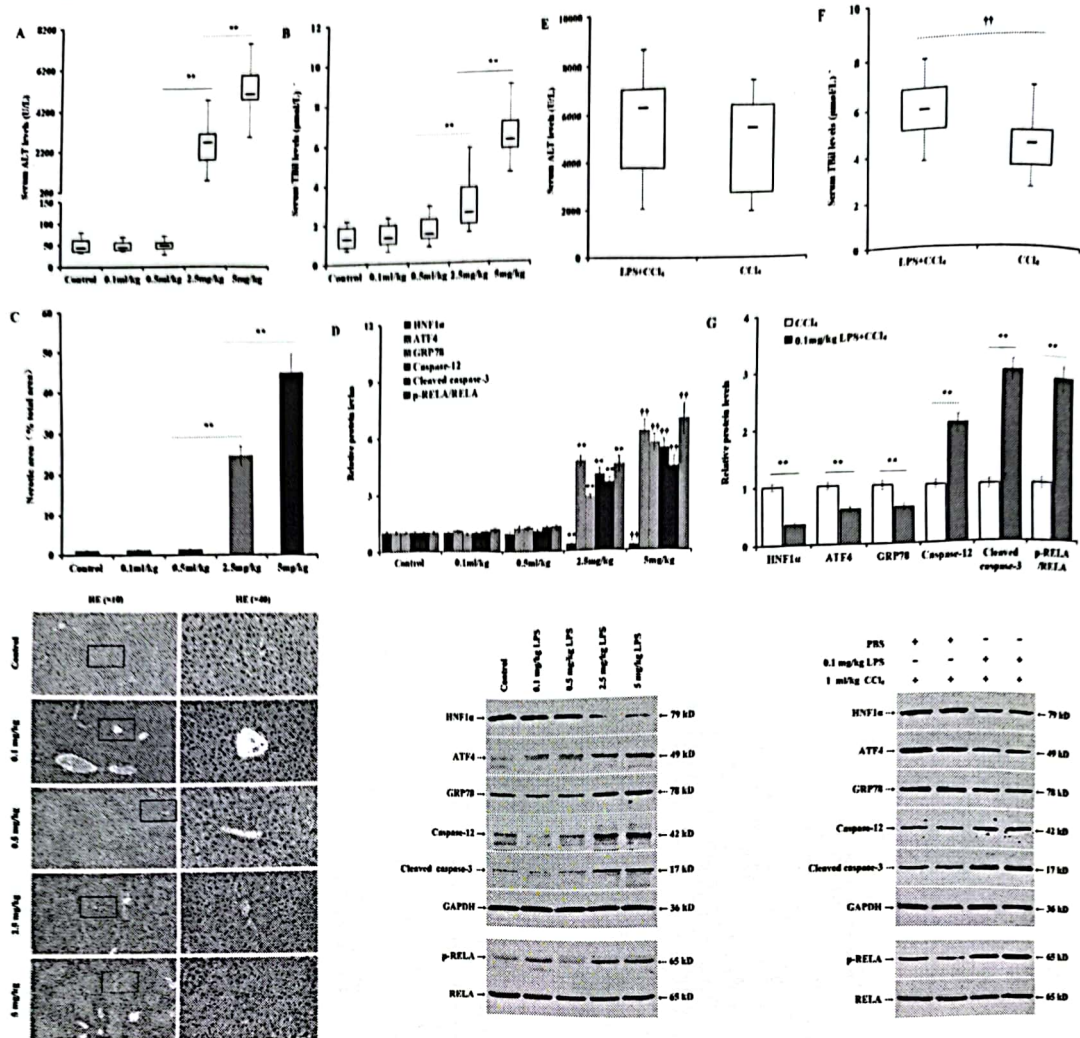


图4 低剂量 LPS (0.1mg/kg)加重 CCl₄ 诱导的 ERS 及肝细胞凋亡

注: (A) 酶速率法检测不同剂量 LPS 对小鼠血清 ALT 水平的影响; (B) 重氮法检测小鼠血清 TBil 水平的影响; (C) HE 染色观察病理变化; (D) WB 检测不同剂量 LPS 对相关蛋白表达的影响 (*为与 0.5mg/kg 组相比的 *P* 值; †为与 2.5mg/kg 组相比的 *P* 值); (E) 0.1mg/kg 的 LPS 对 CCl₄ 诱导的小鼠血清 ALT 水平的影响; (F) 0.1mg/kg 的 LPS 对 CCl₄ 诱导的小鼠血清 TBil 水平的影响; (G) WB 检测相关蛋白表达的影响; †† *P*<0.01; ** *P*<0.01。



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:

(1) 已具备的实验条件和资料

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, 拥有多个国家级临床研究中心、分中心及省级重点实验室。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是省级重点专科, 具备独立实验室, 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。

(2) 尚缺少的实验条件和资料

无



3. 申请者和项目组主要成员研究工作经历,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:

申请者信息

陈娅, 1992.10, 女, 遵义医科大学附属医院感染科, 住院医师, 硕士研究生, 主要研究方向: 重症肝病的发病机制及治疗。

(1) 教育及工作经历:

2019.10-至今: 遵义医科大学附属医院 感染科 住院医师

2016.09-2019.07: 遵义医科大学 传染内科 专业型研究生并住院医师规范化培训
导师: 邱隆敏

2010.09-2015.06: 南华大学 临床医学 学士

(2) 北图核心杂志发表论著(第一作者):

1) 陈娅, 邱隆敏.CRKP 碳青霉烯酶基因检测及同源性分析[J].中国感染控制杂志,2019,18(06):481-488.

2) 陈娅, 陈鸿, 刘瑶, 胡世芸, 胡潇云, 邱隆敏.耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌医院感染的危险因素分析[J].中华医院感染学杂志,2019,29(08):1131-1135.

3) 陈娅, 胡潇云, 刘瑶, 胡世芸, 代红燕, 邱隆敏.多药耐药鲍氏不动杆菌医院感染相关因素的 Meta 分析[J].中华医院感染学杂志,2018,28(11):1607-1612.

4) 陈娅,袁晓露,刘瑶,胡潇云,胡世芸,邱隆敏.脑梗死患者医院感染相关因素的 Meta 分析[J].中华医院感染学杂志,2018,28(20):3091-3096.

5) 陈娅,蔡红升,彭笏宸,胡世芸,胡潇云,邱隆敏.关节置换术患者手术部位感染危险因素的荟萃分析[J].中华医院感染学杂志,2017,27(18):4183-4320.

(3) 项目中承担的任务:

主持项目研究

主要成员信息

(1) 何毅怀: 实验指导及具体实施实验



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，授权发明专利 3 项。

教育及工作经历：

2015.01-至今 遵义医科大学附属医院，感染科，主治医师

2012.08-2014.12 遵义医学院附属医院，感染科，住院医师

2009.9-2012.6 遵义医学院，传染内科，硕士，导师：林世德

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；

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) Yongjing Tang[#]; Huan Chen[#]; Yu Yi; Guimei Chen; Fangwan Yang; Ying Li; Rendong Tian; Wenge Huang; Qijiao Cheng; **Yihuai He***; Inhibition of eIF2 α dephosphorylation protects hepatocytes from apoptosis by alleviating ER stress in acute liver injury, *BioMed Research International*, 2020, 2020: 2626090.

2) Wenge Huang[#]; Jun Wang[#]; Yujuan Liu; Hongxia Wang; Sizhen Zhou; Huan Chen; Fangwan Yang; Ying Li; Yu Yi; **Yihuai He***; Endoplasmic reticulum stress increases multidrugresistance protein 2 expression and mitigates acute liver injury, *Current Molecular Medicine*, 2020, 20(7): 548-557.

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



4) Rendong Tian[#]; Yiqun Chen[#]; Yihuai He^{*}; Yongjing Tang; Guimei Chen; Fangwan Yang; Ying Li; Wenge 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, *Mol Cell Biochem*, 2014, 389(1-2): 151-158.

专利申请成果

1) 何毅怀; 唐永静; 田仁冬; 沈访; 一种肝损伤内质网应激差异性表达模型小鼠的建立及检测方法; 2021-2-10, 中国, 201910115648.6.

2) 何毅怀; 陈欢; 唐永静; 汪杰; 沈访; 一种减轻内质网应激的4-苯基丁酸溶液及其制备方法, 2020-11-03, 中国, ZL201910097643.5.

3) 徐德林; 沈访; 何毅怀; 陈红波; 一种带有血压计的半自动止血带, 2019-2-21, 中国, ZL201610502053.2.

(2) 邱隆敏: 指导实验

邱隆敏, 遵义医科大学附属医院感染科, 主任医生, 硕士研究生导师, 目前主持省级课题2项并已结题, 近5年在北图核心期刊发表论著10篇。

教育及工作经历:

2005 年-至今, 主任医师, 遵义医科大学附属医院, 感染科

2000 年-2005 年, 副主任医师, 遵义医科大学附属医院, 感染科

1995 年-2000 年, 主治医师, 遵义医科大学附属医院, 感染科

1988 年-1995 年, 住院医师, 遵义医科大学附属医院, 感染科

1983 年-1988 年, 遵义医学院, 临川医学, 学士

主持或参加科研项目(课题)情况(按时间倒序排序):

1) 贵州省优秀人才省长基金资助项目《CHB 患者药物干预前后外周血及肝组织中 TCR CDR3 谱系漂移的特征探讨》, 已结题;

2) 贵州省社会发展公关项目《慢性 HBV 感染者 CD4+CD25+Treg TCR CDR3 谱系漂移特征初步探讨》, 已结题。

近 5 年代表性论著(通讯作者):



- 1) 胡世芸,吴洁姣,杨雪松,秦桂英,代红燕,钟鸣,邱隆敏.肝衰竭医院感染直接经济损失研究[J].中国感染控制杂志,2019,18(09):859-862.
- 2) 陈鸿,刘瑶,陈娅,邱隆敏.粪类圆线虫感染 1 例报道[J].中华医院感染学杂志,2019,29(16):2529-2532.
- 3) 陈娅,邱隆敏.CRKP 碳青霉烯酶基因检测及同源性分析[J].中国感染控制杂志,2019,18(06):481-488.
- 4) 陈娅,陈鸿,刘瑶,胡世芸,胡潇云,邱隆敏.耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌医院感染的危险因素分析[J].中华医院感染学杂志,2019,29(08):1131-1135.
- 5) 胡潇云,吕鑫,王颢,杨雪松,吴洁娇,邱隆敏.536 例开颅手术患者手术部位感染影响因素的 Logistic 回归分析[J].中华医院感染学杂志,2019,29(08):1176-1180.
- 6) 陈安林,陈娅,陈泽慧,刘瑶,胡潇云,胡世芸,邱隆敏.医院感染多重耐药鲍曼不动杆菌患者死亡危险因素的 Meta 分析[J].中国感染控制杂志,2019,18(01):53-58.
- 7) 陈娅,胡潇云,刘瑶,胡世芸,代红燕,邱隆敏.多药耐药鲍氏不动杆菌医院感染相关因素的 Meta 分析[J].中华医院感染学杂志,2018,28(11):1607-1612.
- 8) 陈娅,袁晓露,刘瑶,胡潇云,胡世芸,邱隆敏.脑梗死患者医院感染相关因素的 Meta 分析[J].中华医院感染学杂志,2018,28(20):3091-3096..
- 9) 陈娅,蔡红升,彭笛宸,胡世芸,胡潇云,邱隆敏.关节置换术患者手术部位感染危险因素的荟萃分析[J].中华医院感染学杂志,2017,27(18)
- 10) 龙盛双,胡潇云,张啟鹏,秦桂英,邱隆敏.多重耐药菌的科室分布及院内感染控制[J].中国消毒学杂志,2016,33(10):986-988.

论著之外的代表性研究成果和学术奖励:

邱隆敏(3/13); 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).

(3) 程其娇: 具体实施

教育及工作经历:

2020.04-至今: 遵义医科大学附属医院, 感染科, 主治医师

2017.10-2020.03:遵义医科大学附属医院, 感染科, 住院医师

2014.09-2017.06:遵义医科大学, 消化内科硕士, 导师: 陈安海



2009.09-2014.06:遵义医学院, 珠海校区, 临床医学, 学士

主持或参加科研项目(课题)情况(按时间倒序排序):

1) 遵义市科技局, 科学技术基金项目, 遵市科合社字(2020) 230, 内质网应激调节PI3K/AKT/mTOR通路活性促进肝癌细胞干性的影响, 2020-09 至 2023-08, 4万元, 在研, 主持;

2) 国家自然科学基金委员会, 地区科学基金项目, 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, 参加;

3) 遵义医学院, 硕士启动基金项目, 院字(2017) 33 号, 乙型肝炎病毒感染对肝细胞内质网应激的影响及作用机制初步探索, 2018-01 至 2019-12, 2万元, 已结题, 主持。

代表性论著(#并列第一作者)

1) Qijiao Cheng#; Anhui Chen#; Qian Du; Qiushi Liao; Zhangli Shuai; Changmei Chen; Xinrong Yang; Yaxia Hu; Ju Zhao; Songpo Liu; Guo Rong Wen; Jiabin An; Hai Jing; Biguang Tuo; Rui Xie*; Jingyu Xu*; Novel insights into ion channels in cancer stem cells (Review), *International Journal of Oncology*, 2018, 53(4): 151-157.

2) Yongjing Tang#; Huan Chen#; Yu Yi; Guimei Chen; Fangwan Yang; Ying Li; Rendong Tian; Wenge Huang; Qijiao Cheng; Yihuai He*; Inhibition of eIF2 α dephosphorylation protects hepatocytes from apoptosis by alleviating ER stress in acute liver injury, *BioMed Research International*, 2020, 2020: 2626090.

(4) 许维毅: 具体实施

教育及工作经历:

2020.04-至今: 遵义医科大学附属医院 感染科 中级主管护师

2019.10-2020.04: 遵义医科大学附属医院 小儿呼吸科 中级主管护师

2013.09-2019.10: 遵义医科大学附属医院 肿瘤科 中级主管护师

2005.07-2013.09: 遵义医科大学附属医院 肿瘤科 初级护师

2000.09-2005.07: 贵阳中医学院 护理学 学士

代表性论著(第一作者)



1) 许维毅.研究个性化护理干预对小儿肺炎支原体感染的价值[J].养生健康指南, 2020,37:149.

2) 许维毅,肖会荣,冷丽娟.三级医院不同层次的护理实习生带教方法分析[J].大家健康,2015,7(14):279.

3) 许维毅,肖会荣.中晚期宫颈癌患者阴道冲洗的护理体会[J].内蒙古中医药,2013,8(23):174-175.

(5) 蒋小铃：具体实施

蒋小铃，遵义医科大学 传染内科 专业型研究生。

教育及工作经历：

2020.07-至今：遵义医科大学附属医院 传染内科 研究生在读

2015.09-2020.07：福建中医药大学 临床医学专业 学士

(6) 唐永静：具体实施

唐永静，遵义医科大学 传染内科 在读研究生。

教育及工作经历：

2015.09-2020.07：遵义医科大学医学与科技学院 临床医学 学士

主持或参加科研项目（课题）情况（按时间倒序排序）：

1) 内质网应激对急性肝衰竭小鼠凝血功能的影响及机制：遵义医科大学医学与科技学院大学生创新创业训练计划项目，项目编号：遵医科院 20162311，3000 元，2016.11-2017.10，结题，主持。

代表性论著（#：并列第一作者；*通讯作者）

1) **Yongjing Tang**[#]; Huan Chen[#]; Yu Yi; Guimei Chen; Fangwan Yang; Ying Li; Rendong Tian; Wenge Huang; Qijiao Cheng; Yihuai He^{*}; Inhibition of eIF2 α dephosphorylation protects hepatocytes from apoptosis by alleviating ER stress in acute liver injury, *BioMed Research International*, 2020, 2020: 2626090.

2) 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.

3) Rendong Tian[#]; Yiqun Chen[#]; Yihuai He^{*}; **Yongjing Tang**; Guimei Chen; Fangwan



Yang; Ying Li; Wenge 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.

专利申请成果

1) 一种肝损伤内质网应激差异性表达模型小鼠的建立及检测方法, 何毅怀、唐永静、田仁冬、沈访, ZL201910115648.6, 发明专利

2) 一种减轻内质网应激的 4-苯基丁酸溶液及其制备方法, 何毅怀、陈欢、唐永静、汪杰、沈访, ZL201910097643.5, 发明专利

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) :

暂无



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)	4.0	2.0	2.0	0	0
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、基因敲减或过表达等相关费用			
研究材料费	2.0	实验小鼠及饲料、四氯化碳、D-氨基半乳糖、脂多糖等试剂，Western blot 检测、免疫组化及 PCR 相关费用。			
图书资料费	0				
论文版面费	1.0	发表 SCI 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）

该项目通过建立小鼠模型，验证 c-Met、ERS、细胞凋亡及坏死在肝损伤重症化中的变化，旨研究 c-Met 在肝损伤重症化中的作用及机制。该项目立题新颖，技术路线设计合理，经费预算合理，项目组成员结构合理，能保证项目顺利实施，同意申报。

学术委员会负责人 余昌胤

日期：2021 年 04 月 19 日

2. 合作单位领导审查意见：

同意申报	
合作单位 1	合作单位 2
日期：2021 年 04 月 19 日	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）

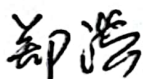
余昌胤

（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	肝细胞 c-Met 在肝损伤重症化中的作用及机制研究
研究项目分类	☒ 科研课题 (☒ 基础研究 ☐ 应用基础研究 ☐ 临床研究 ☐ 药学 ☐ 其他_____ ☐ 其他_____
研究材料及实验类型	☐ 人体标本收集 (☐ 血液 ☐ 尿液 ☐ 粪便 ☐ 痰液 ☐ 其他_____ ☐ 动物标本收集 (☐ 血液 ☐ 细胞 ☐ 组织 ☐ 其他_____ ☒ 动物实验 ☐ 人体实验
审查文件	1、医学伦理审查申请表 ☐ 2、知情同意书 ☐ 3、动物伦理审查表 ☒ 4、项目申请书 ☒ 5、其他文件 ☐
伦理审查方式	☐ 会议审查 ☐ 函审 ☒ 快速审查
审查结论: 陈娅同志申请的贵州省卫生健康委科学技术基金项目《肝细胞 c-Met 在肝损伤重症化中的作用及机制研究》，经过我院伦理委员会审查，该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 2021 年贵州省卫生健康委科学技术基金项目。	
伦理委员会委员签名:  	主任委员/副主任委员签名:  申请者所在单位伦理委员会(盖章)  2021年4月19日



八、市（州）卫生健康局或主管部门审核意见

单位负责人（签章）

（公章）

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： 年 月 日



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 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。 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。								



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℃ 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;



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 (1mg/kg 体重), ISRIB (0.25mg/kg 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。

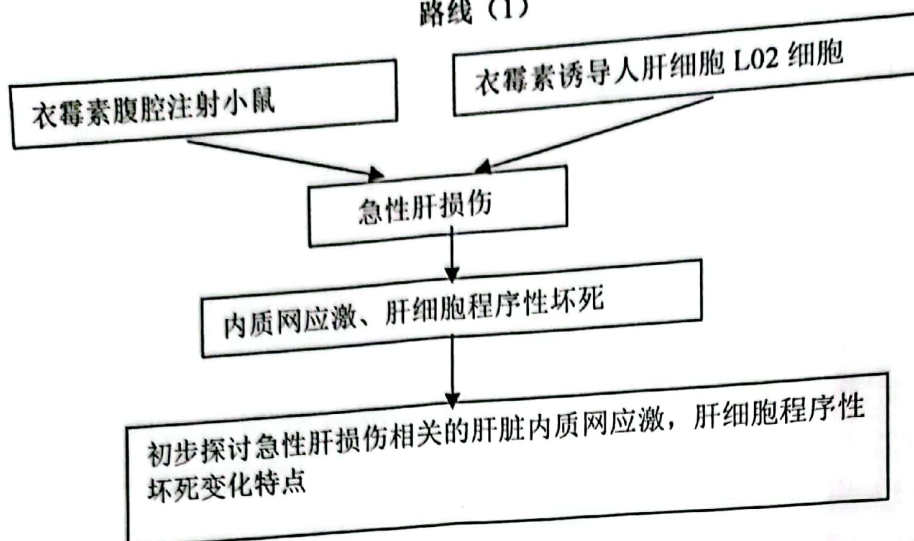
2、使用免疫组织学检测对照组、实验组的表达情况: 将小鼠肝组织固定在 10% 福尔马林中并包埋在石蜡中, 将石蜡包埋的组织切片 ($5\mu\text{m}$) 用苏木精和曙红 (H&E) 染色。另外, 使用针对裂解的半胱天冬酶-3 (9664, Cell Signaling Technology), CHOP (ab11419) 的单克隆抗体对一些组织切片进行免疫组织化学, 在光学显微镜下对切片进行光成像。

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。

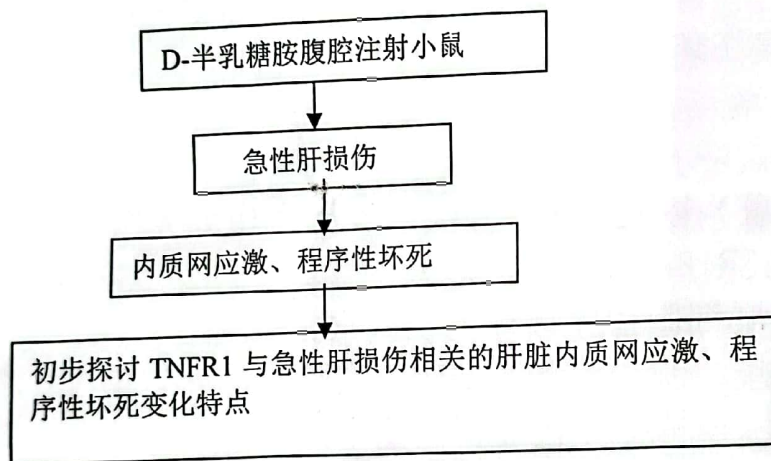


二、技术路线及实验方案:

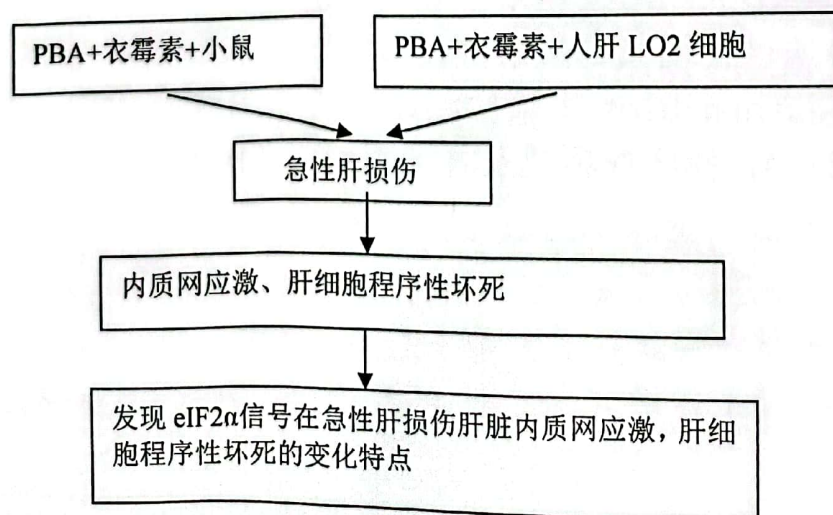
路线 (1)



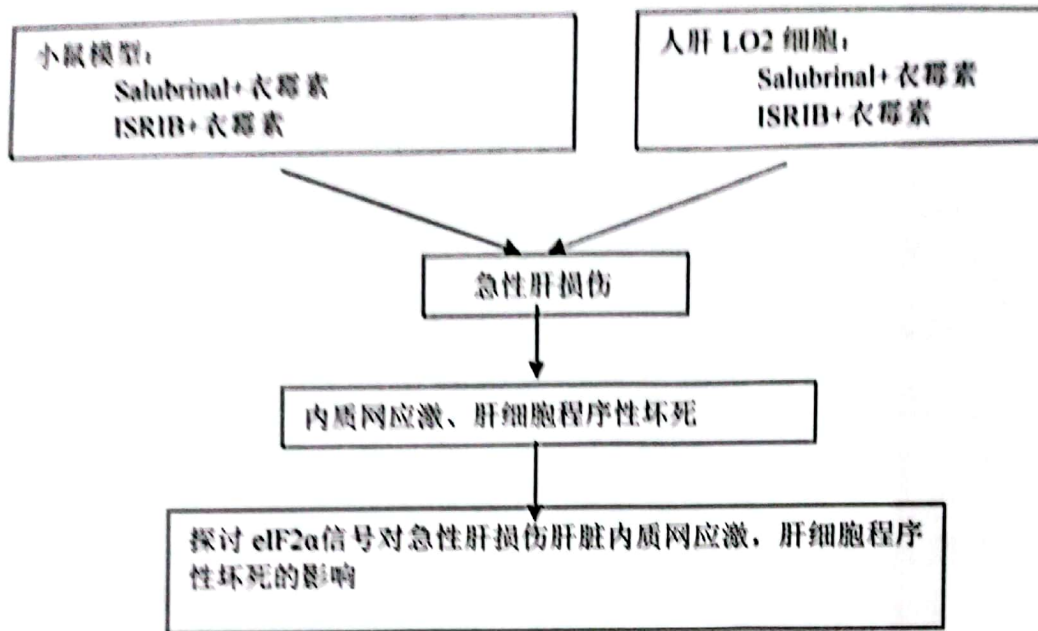
路线 (2)



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）



（签字）

乙方（项目主持单位）

（盖章）

代表：

（签字）

签订日期：



表五

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 (2021) 58 号

项目名称: 肝内 c-Met 蛋白-内质网应激-程序性坏死调控轴
在肝衰竭中的作用及机制研究

起止时间: 2021 年 06 月 21 日 至 2023 年 06 月 30 日

承担单位 (盖章): 遵义医科大学附属医院

项目负责人: 陈娅 联系电话: 15902629310

项目联系人: 陈娅 联系电话: 15902629310

承担单位通讯地址: 贵州省遵义市汇川区大连路 149 号

遵义市科学技术局制

一、项目概述（主要内容、关键技术及总投资）

（一）主要内容

1. 通过建立小鼠模型，验证肝内 c-Met、ERS 及程序性坏死在肝衰竭中的变化特点，并探讨其相互调控关系及意义；
2. 通过 shRNA 干扰技术，探讨 c-Met 表达对急性肝损伤小鼠模型发生肝衰竭的意义；
3. 通过脂多糖部分模拟自发性腹膜炎，探讨内毒素血症影响下肝内 c-Met、ERS 及细胞程序性坏死在肝衰竭中的变化特点及相互调控的关系和意义；
4. 通过 c-Met 的过表达，探讨 c-Met 表达对 LPS 诱导的小鼠肝衰竭的影响及机制；
5. 通过体外实验，验证肝细胞 c-Met 蛋白-ERS-程序性坏死调控轴的作用机制以及 LPS 干预的作用机制。

（二）关键技术

本课题的关键技术是基因干扰技术。

（三）项目投资

本课题项目总经费 2.0 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

2021年06月21日-2023年06月30日

（二）项目各年度目标及任务

2021年06月-2022年06月

建模，完成ERS、程序性坏死相关标志蛋白及c-Met蛋白检测

完成shRNA干扰技术及LPS模拟自发性腹膜炎相关指标的检测

2022年06月-2023年06月

完成c-Met基因的过表达及体外实验

数据分析、总结，补充实验，撰写研究报告及文章

三、考核指标（包括技术指标、经济指标、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；新增销售收入、新增利税等经济指标；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. 明确在肝损伤中肝内 c-Met 与 ERS 相互调控的作用机制及其在肝衰竭中的意义；

2. 阐明 c-Met 的低表达增加了肝脏对脂多糖的敏感性及脂多糖通过下调 c-Met 的表达来促进肝损伤，c-Met 对肝细胞具有保护作用。

（二）科技产出指标

完成研究报告 1 份，发表论文 2 篇，其中核心期刊 1 篇。

（三）项目执行期内经济指标和社会效益

通过阐明 c-Met 蛋白在肝衰竭患者中的表达情况，有助于肝衰竭患者诊治的进展，减轻患者病情，减少住院时间，从而减轻患者的经济负担，有利于社会人民健康的发展。

（四）项目实施中形成的中试线、生产线及其规模

实验室规模

四、项目承担单位、参加单位、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：

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
陈娅	15902629310	住院医师	研究生	项目主持	遵义医科大学附属医院

主要研究成员：

邱隆敏	13312345138	主任医师	本科	项目指导	遵义医科大学附属医院
何毅怀	13885219059	主治医师	研究生	检测 c-Met、ERS 及程序性坏死相关蛋白	遵义医科大学附属医院
程其娇	18311545100	主治医师	研究生	完成 shRNA 干扰技术	遵义医科大学附属医院
薛泽敏	15186611401	初级护师	本科	脂多糖模拟自发性腹膜炎相关指标的检测	遵义医科大学附属医院
蒋小铃	15080491280	其他	研究生	c-Met 的过表达技术	遵义医科大学附属医院
唐永静	15120282148	其他	研究生	完成体外实验	遵义医科大学附属医院

五、项目经费来源预算（单位：万元）

年 度 类 别	2021 年	2022 年	20 年	合 计
一、市科技计划拨款	2.0			2.0
二、自筹经费				
三、银行贷款				
四、其 它				
合 计	2.0			2.0

六、项目经费支出预算（单位：万元）

科 目	总投资	自筹经费	科技计划拨款
合 计	2.0		2.0
1、设备费			
(1) 购置设备费			
(2) 试制设备费			
2、材料费	1.1		1.1
3、测试化验加工费	0.5		0.5
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	0.4		0.4
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学技术局为组织市级科技计划项目而设计, 合同书甲方为遵义市科学技术局, 乙方为项目承担单位, 丙方为乙方所在地县级科技管理部门。

2. 合同书正式文本一式叁份, 甲方壹份、乙方壹份、丙方壹份。

3. 合同书字迹要工整清楚, 并用 A3 纸双面打印, 中缝装订。

4. 合同书编号由遵义市科学技术局统一规定。

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, 并接受甲方及丙方监督、检查。

6. 乙方应在合同到期后的三个月内, 按规定之内容向甲方提交项目验收申请材料。

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、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, 甲方有权撤销或中止合同, 撤销或中止合同后, 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（遵义市科技局）：



负责人（签字）：



乙方（项目承担单位）：



(盖章)

负责人（签字）：



丙方（乙方所在地县级科技管理部门）：

(盖章)

负责人（签字）：

签订日期： 年 月 日

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 (2021) 60 号

项目名称： 内质网应激对胆红素代谢相关蛋白 (MRP2)
表达的影响及其在急性肝损伤中的作用

起止时间： 2021 年 6 月 21 日至 2023 年 6 月 30 日

承担单位 (盖章)： 遵义医科大学附属医院

项目负责人： 易宇 联系电话： 18786912014

项目联系人： 易宇 联系电话： 0851-28608144

承担单位通讯地址： 贵州省遵义市汇川区大连路 149 号

遵义市科学技术局制

一、项目概述（主要内容、关键技术及总投资）

（一）主要内容

1、建立急性肝损伤小鼠模型，初步探讨在急性肝损伤中内质网应激对血清总胆红素水平的影响。

2、建立内质网应激肝细胞模型，测量和比较模型小鼠和细胞模型中的 MRP2 蛋白水平，研究内质网应激对急性肝损伤中 MRP2 表达的影响。

3、通过抑制 NF- κ B 活化，证明内质网应激反应中，NF- κ B 激活上调了 MRP2 表达。进一步研究 MRP2 高表达对急性肝损伤的影响。

（二）关键技术

1、建立实验性急性肝损伤小鼠模型；

2、建立内质网应激肝细胞模型；

（三）项目投资

项目总经费 2.0 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

2021 年 06 月 21 日—2023 年 06 月 30 日

（二）项目各年度目标及任务

2021 年 06 月 21 日-2021 年 12 月 31 日

建立实验性急性肝损伤小鼠模型，初步研究内质网应激在急性肝损伤中对胆红素代谢的影响。

2022 年 01 月 01 日-2022 年 10 月 31 日

建立内质网应激肝细胞模型，测量和比较模型小鼠和细胞模型中的 MRP2 蛋白水平，研究内质网应激对急性肝损伤中 MRP2 表达的影响。

2022 年 11 月 01 日-2023 年 02 月 28 日 分析数据、补充实验

2023 年 03 月 01 日-2023 年 06 月 30 日 撰写论文、提交结题报告。

三、考核指标（包括技术指标、经济指标、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；新增销售收入、新增利税等经济指标；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

研究内质网应激对胆红素代谢相关蛋白（MRP2）表达的影响极其在急性肝损伤中的作用。

- 1、明确肝细胞内质网应激对急性肝损伤小鼠血清胆红素水平的影响。
- 2、测量和比较模型小鼠和细胞模型中的 MRP2 蛋白水平，研究内质网应激对急性肝损伤中 MRP2 表达的影响。
- 3、明确 MRP2 表达的水平高低对急性肝损伤肝细胞耐受性的影响。

（二）科技产出指标

- 1、提交研究报告 1 份。
- 2、在国内核心期刊发表论文 1-2 篇。

（三）项目执行期内经济指标和社会效益

本实验拟首先明确在急性肝损伤中内质网应激对血清总胆红素水平的影响，进一步探索在内质网应激对急性肝损伤中胆红素代谢 MRP2 表达的影响，初步证明内质网应激通过 NF- κ B 信号通路调控 MRP2 的表达，MRP2 表达的水平高低对急性肝损伤肝细胞耐受性的影响。同时指导临床，为临床治疗急性肝损伤高胆红素血症的治疗提供依据，可带来一定的社会经济效益。

（四）项目实施中形成的中试线、生产线及其规模

实验规模：本实验需要小鼠 50 只来诱导急性肝损伤模型，初步探讨在急性肝损伤中内质网应激对血清总胆红素水平的影响。进一步研究 MRP2 高表达对急性肝损伤的影响。

四、项目承担单位、参加单位、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：易宇

姓名	手机号码	职称	学历	在项目中承担的任务	所在单位
易宇	18786912014	住院医师	硕士	项目主持	遵义医科大学附属医院
主要研究成员：					
林世德	13885254802	主任医师	博士	课题及实验指导	遵义医科大学附属医院
何毅怀	13885219059	主治医师	硕士	实验监督及临床实验	遵义医科大学附属医院
刘玉娟	15934657337	主治医师	硕士	动物实验	遵义医科大学附属医院
刘霞	18685642660	主治医师	硕士	细胞实验	遵义医科大学附属医院

五、项目经费来源预算（单位：万元）

年 度 类 别	2021 年	2022 年	20 年	合 计
一、市科技计划拨款	2.0			2.0
二、自筹经费				
三、银行贷款				
四、其 它				
合 计	2.0			2.0

六、项目经费支出预算（单位：万元）

科 目	总投资	自筹经费	科技计划拨款
合计	2.0		2.0
1、设备费			
(1) 购置设备费			
(2) 试制设备费			
2、材料费	1.2		1.2
3、测试化验加工费	0.4		0.4
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	0.4		0.4
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学技术局为组织市级科技计划项目而设计，合同书甲方为遵义市科学技术局，乙方为项目承担单位，丙方为乙方所在地县级科技管理部门。

2. 合同书正式文本一式叁份，甲方壹份、乙方壹份、丙方壹份。

3. 合同书字迹要工整清楚，并用 A3 纸双面打印，中缝装订。

4. 合同书编号由遵义市科学技术局统一规定。

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，并接受甲方及丙方监督、检查。

6. 乙方应在合同到期后的三个月内，按规定之内容向甲方提交项目验收申请材料。

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、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，甲方有权撤销或中止合同，撤销或中止合同后，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（遵义市科技局）：



负责人（签字）：



乙方（项目承担单位）：



（盖章）

负责人（签字）：



丙方（乙方所在地县级科技管理部门）：

（盖章）

负责人（签字）：

签订日期： 年 月 日

附件 3

荆门市科学技术研究与开发计划
(重点☐ 一般☒ 引导☐) 项目
申 报 书
(2021 年度)

项目编号: 2021YFYB074

项目名称: 内质网应激与乙肝肝硬化肝内甲胎蛋白表达的
的相关性研究

项目类别: 一般科技计划项目

承担单位: 荆门市第一人民医院 (盖章)



起止年限: 2021 年 5 月-2023 年 5 月

填报日期: 2021 年 4 月 16 日

网上申报 ☒ 是 ☐ 否

荆门市科学技术局制

项 目 名 称	内质网应激与乙肝肝硬化肝内甲胎蛋白表达的相关性研究					
行 业 领 域	1、电子信息 2、机电一体化 3、新材料 4、轻、化工 5、新能源 6、数控装备 7、农业 8、林业 √9、医药 10、卫生 11、环保 12、其它					
课题 活动 类型	√1、基础研究 2、应用研究 3、试验发展 4、推广示范与服务					
申 请 单 位	法定代表人		段 睿		联系电话	0724-2305811
	联系人		饶春恺		联系电话	0724-2305985
	单位地址		象山大道 168 号		所属园区或 基地	无
	单位类别		√1、大专院校 2、科研院所 3、企业 4、其它			
	所在地区		1、东宝区□ 2、荆门高新区·掇刀区□ 3、漳河新区□ 4、屈家岭管理区□ 5、市直 ☒ 6、其它□			
	开户 银行	荆门市农业银行南 门支行		银 行 账 号	17-570501040001346	
合 作 单 位	全称		遵义医科大学附属医院			
	地址		贵州省遵义市汇川区大连路 149 号			
	组织机构代码		429401122		邮政编码	563000
	法定代表人		余昌胤		联系电话	0851-286081 00
	联系人		何毅怀		联系电话	13885219059

一、 立项意义和必要性

甲胎蛋白（alpha-fetoprotein, AFP）具有抗凋亡及促进细胞生长的作用，其血清水平持续升高是诊断肝细胞癌的重要线索，而在良性肝病中常表现为一过性升高，被认为与肝前体细胞增殖、肝损伤修复有关。内质网应激涉及多种肝病的发病机制，对蛋白质的合成及修饰等具有重要调控作用。我们前期研究：在体外，内质网应激抑制肝癌细胞系HepG2细胞AFP mRNA表达，但通过抑制其蛋白分泌提高细胞内AFP蛋白水平，沉默AFP表达增加肝癌细胞凋亡。而我们进一步在体内研究发现，四氯化碳诱导的急性肝损伤小鼠肝内发生内质网应激的同时AFP蛋白表达增加，但对其血清AFP水平并无明显影响。由此推测：良性活动性肝病中肝内AFP蛋白表达增加，与反映肝前体细胞增殖的血清AFP升高机制有区别，然而肝内AFP蛋白表达的上调机制及意义尚不清楚。故本课题基于临床，对血清AFP正常的良性肝病如乙肝肝硬化中内质网应激对肝内AFP表达的影响、机制及意义进行研究。

二、 相关领域国内外现状及发展趋势

AFP 长期以来被认为是原发性肝癌（hepatocellular carcinoma, HCC）临床诊断的经典肿瘤标志物，常被用来监测 HCC 的发生、发展，评估疗效及预测预后^(1, 2)。此外，最近的一项研究证实，AFP 在 HCC 发展过程中调节肝癌细胞中的各种生物过程⁽³⁾。特别是，AFP 可促进细胞增殖和迁移，抑制细胞凋亡和自噬，促进 HCC 的恶性行为^(4, 5)。我们前期在体外研究发现，内质网应激抑制肝癌细胞系 HepG2 细胞 AFP mRNA 表达及其蛋白分泌，但总体仍提高其细胞内蛋白水平；升高的 AFP 蛋白水平有利于肝癌细胞存活。

在除外肿瘤的肝病，即良性肝病中，包括急性肝炎、慢性肝炎、肝硬化及肝衰竭等，可引起患者血清中不同程度的 AFP 水平一过性升高，并随患者病情变化而波动。良性活动性肝病中以慢性乙型肝炎为主，血清 AFP 水平与慢性病毒性肝炎患者肝组织的炎症、纤维化程度呈低度正相关关系，随病理分级的增加而呈阶梯状增高^(6, 7)。良性肝病患者血清 AFP 水平一般在 400μg/L 以下。升高的 AFP 多在 3 个月内降为正常，但肝硬化患者 AFP 可呈持续性低水平升高。AFP 升高，被认为是肝损伤后再生的肝前体细胞所分泌，提示肝细胞广泛损害后肝细胞迅速再生，可用于判断急性肝功能衰竭患者的预后，肝炎患者在发生肝细胞炎症性坏死之后，高水平 AFP 患者预后较好^(8, 9)。但也有研究发现人类肝脏部分切除后，肝脏迅速及广泛再生，而 AFP

轻度或低水平升高，不支持在良性活动性肝病时 AFP 升高是反映正常肝组织再生的假设。提示在良性活动性肝病中 AFP 表达的调控机制及生物学功能有待深入研究。

在前期研究中我们及其他学者均发现内质网应激是各种肝脏疾病中常见的病理现象，急性肝衰竭肝细胞存在持续内质网应激⁽¹⁰⁾。内质网应激是否参与调控良性活动性肝病中肝内 AFP 的表达尚不清楚。

参考文献:

1. Sauzay C, Petit A, Bourgeois AM, Barbare JC, Chauffert B, Galmiche A, Houessinon A. Alpha-fetoprotein (AFP): A multi-purpose marker in hepatocellular carcinoma. *Clin Chim Acta* 2016;463:39-44.
2. Zhang XP, Wang K, Cheng SQ. Surveillance for Early-Stage Hepatocellular Carcinoma by Ultrasound Plus Alpha-Fetoprotein Measurement: More Details, More Significance. *Gastroenterology* 2018;155:1274-1275.
3. Wang S, Zhu M, Wang Q, Hou Y, Li L, Weng H, Zhao Y, et al. Alpha-fetoprotein inhibits autophagy to promote malignant behaviour in hepatocellular carcinoma cells by activating PI3K/AKT/mTOR signalling. *Cell Death Dis* 2018;9:1027.
4. Zhu M, Li W, Lu Y, Dong X, Chen Y, Lin B, Xie X, et al. Alpha fetoprotein antagonizes apoptosis induced by paclitaxel in hepatoma cells in vitro. *Sci Rep* 2016;6:26472.
5. Tzartzeva K, Obi J, Rich NE, Parikh ND, Marrero JA, Yopp A, Waljee AK, et al. Surveillance Imaging and Alpha Fetoprotein for Early Detection of Hepatocellular Carcinoma in Patients With Cirrhosis: A Meta-analysis. *Gastroenterology* 2018;154:1706-1718 e1701.
6. Fouad R, Elsharkawy A, Abdel Alem S, El Kassas M, Alboraie M, Sweedy A, Afify S, et al. Clinical impact of serum alpha-fetoprotein and its relation on changes in liver fibrosis in hepatitis C virus patients receiving direct-acting antivirals. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2019.
7. Tai WC, Hu TH, Wang JH, Hung CH, Lu SN, Changchien CS, Lee CM. Clinical implications of alpha-fetoprotein in chronic hepatitis C. *J Formos Med Assoc* 2009;108:210-218.
8. Wang X, Shen C, Yang J, Yang X, Qin S, Zeng H, Wu X, et al. Alpha-Fetoprotein as a Predictive Marker for Patients with Hepatitis B-Related Acute-on-Chronic Liver Failure. *Can J Gastroenterol Hepatol* 2018;2018:1232785.
9. Huang GQ, Xie YY, Zhu PW, Wang XD, Lin Z, Wang Y, Ye JP, et al. Stratified alpha-fetoprotein pattern accurately predicts mortality in patients with acute-on-chronic hepatitis B liver failure. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2018;12:295-302.
10. 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. *Mol Cell Biochem* 2014;389:151-158.

三、主要研究内容、技术工艺路线

研究内容：

(1) 通过临床研究，探讨血清 AFP 正常的乙肝肝硬化患者肝内 AFP 表达的变化，及其与内质网应激的相关性

本部分首先回顾性分析 2018 年我院及遵义医科大学附属医院消化内科和肝病门诊及病房良性肝病（CT、核磁共振或病理检查排除肝癌）不同血清 AFP 水平的肝病分布情况，及疾病谱变化；

其次检测曾行肝穿活检术、血清 AFP 正常（小于 7ng/mL）肝硬化患者肝组织中的 AFP 蛋白表达及内质网应激反应（通过 GRP78 标记）。标本来源：在病理科调取既往行肝穿活检的 40 份乙肝肝硬化患者肝组织蜡块，重新切片。

拟明确在血清 AFP 正常的乙肝肝硬化患者肝内 AFP 表达升高，同时存在内质网应激。

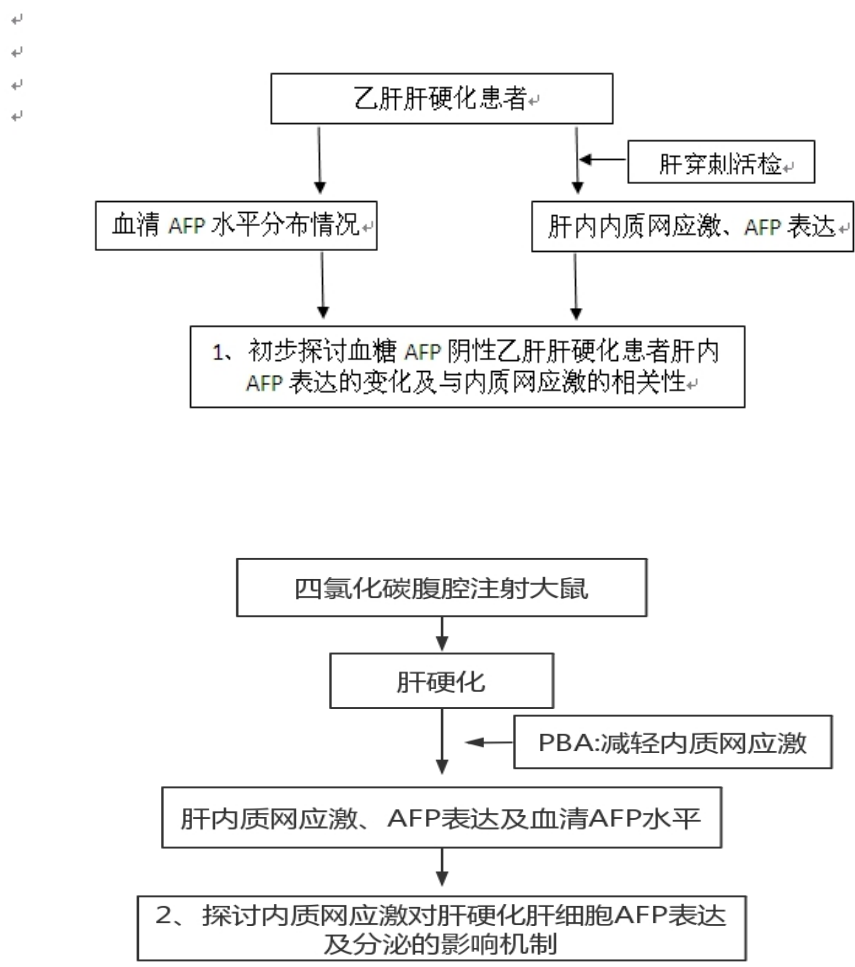
(2) 通过四氯化碳诱导小鼠肝硬化模型，检测肝内 AFP 的表达情况，并探讨内质网应激对肝硬化中肝内 AFP 表达的调控作用及机制

本部分通过多次注射四氯化碳（每周注射 2 次，共 12 周），浓度逐渐增加诱导小鼠肝硬化模型；随后通过 Western blot 检测肝内内质网应激相关蛋白水平（p-eIF2 α 、p50ATF6、XBP1s、GRP78 及 CHOP），及通过 qPCR、免疫组化、Western blot 法检测肝内 AFP mRNA、蛋白表达，及血清 AFP 蛋白水平，明确在肝硬化中肝内内质网应激被诱导，同时 AFP 蛋白表达上调。

通过内质网应激保护剂 4-苯基丁酸预干预 2 小时，减轻模型小鼠内质网应激，检测肝内 AFP 蛋白、mRNA 水平，及上清液 AFP 蛋白水平，进一步探讨内质网应激对肝硬化模型小鼠肝内 AFP 表达的影响及机制。

拟明确内质网应激增加肝硬化肝内甲胎蛋白表达。

技术路线：



四、关键技术和创新点阐述

关键技术：拟通过临床、动物模型不同层次的研究，初步阐明在血清 AFP 正常的肝硬化中，肝内 AFP 表达升高，与通常血清中标志肝前体细胞增殖的 AFP 升高机制有区别

创新点：1. 提高肝病发病机制的认识；2. 为开发以调控内质网应激-AFP 表达为靶点的新型保肝药物提供理论依据。

五、知识产权及预期成果说明

知识产权归合作双方共同拥有

预期成果：初步阐明内质网应激对肝硬化肝内 **AFP** 表达的影响、机制及意义。

六、技术、经济具体考核指标

1) 通过检测内质网应激相关蛋白 (p-eIF2 α 、p50ATF6、XBP1s、GRP78 及 CHOP) 及肝内 AFP mRNA、蛋白表达，血清 AFP 蛋白水平阐明内质网应激是肝硬化肝细胞 AFP 表达的上调机制之一；

2) 发表 **SCI** 论文 1 篇。

七、技术和市场风险分析

我院在该项目实施中：1. 该项目肝病患者的肝组织标本来院于我院：从我院病理科申请调出既往肝病患者肝组织石蜡块重新切片进行试验；2. 运用 western blot 及免疫组化等方法检测肝病患者肝脏 AFP 表达及内质网应激。技术成熟，市场风险分析低风险。

八、年度工作计划安排

1. 项目起止年限：

2021 年 5 月-2023 年 5 月

2. 计划进度安排

1) 2021 年 5 月-2021 年 12 月

通过临床研究，探讨血清 AFP 正常乙肝肝硬化患者肝内 AFP 表达的变化，及其与内质网应激的相关性；

2) 2022 年 1 月-2022 年 12 月

通过四氯化碳诱导小鼠肝硬化模型，检测肝内 AFP 的表达情况，并探讨内质网应激对肝硬化肝内 AFP 表达的调控作用及机制；

3) 2023 年 01 月-2023 年 05 月

整理实验数据，补充实验，发表论文及撰写研究报告。

九、投资预算、资金来源渠道说明

费用合计 1.5 万元，说明如下：

(1) 临床研究部分，探讨血清 AFP 正常的良性肝病患者肝内 AFP 表达的变化，及其与内质网应激的相关性。该部分资金由合作单位遵义医科大学附属医院合作人承担。

(2) 实验性肝硬化小鼠模型建立建立 该部分资金由合作单位遵义医科大学附属医院合作人博士启动基金承担。

(3) 运用 western blot 法检测模型小鼠肝组织内质网应激标志蛋白 (GRP78、p-eIF2 α 、XBP1s、p50ATF6、ATF6 及 CHOP) 表达变化。qPCR、免疫组化、Western blot 法检测模型小鼠肝内 AFP mRNA、蛋白表达，及血清或上清液 AFP 蛋白水平

我院承担对内质网应激蛋白 GRP78、p-eIF2 α 两个指标进行检测 (试剂盒费用 0.9 万元+劳务费 0.1 万元) 及科研管理费用 0.5 万元共计 1.5 万元预计由本项目申请所得。

十、项目组主要成员						
项目 负责 人 简 介	姓名		钟卫卫	联系电话		13451217784
	学历		硕士研究生	学位		硕士
	专业技术职称		主治医师	专业		消化内科
	工作单位		荆门市第一人民医院			
	工作经历、主要成果和发表的论文（200 字以内）		2011 年 07 月-至今 工作于荆门市第一人民医院。 2020 年发表 SCI 一篇 第一作者 Effect of IncRNA KCNQ10T1 on autophagy and drug resistance of hepatocellular carcinoma cells by targeting miR-338-3。 湖北省自然科学基金面上项目 编号：2016CFC732 名称：外周血 mRNA 与肝脏组织评分相关性研究 2020 年已结题 第二项目负责人。 荆门市一般科技项目 编号：2020YFYB103 名称：PERK-Eif2a 通路在小鼠急性肝衰竭中的作用及机制 2020 年已结题 第二项目负责人。			
项目 组 成 员	姓名	职称	所学专业	现从事专业	项目中任务	联系电话
	周薇	副主任 医师	消化内科	消 化 内 科	实施临床 试验	133779923 66
	余红	主 任 医师	儿科学	儿科学	指导项目 完成	139718513 58
	饶春恺	主 任 药师	药学	药学	指导项目 完成	139718498 50
	梅丹丹	主 管 护师	消化内科	消 化 内 镜	资料收集 和整理	186086946 82
	张永炼	主 治 医师	普外科	胃 肠 外 科	实施临床 试验	134773949 58

代倩倩	主 管 护师	传染病学	传 染 内 科	资料收集 及整理	186726085 98
吴梅	主 治 医师	消化内科	消 化 内 科	资料收集 与整理	139979496 22
陈碧涛	主 任 医师	消化内科	消 化 内 科	经费管理	137979985 91
何毅怀	主 治 医师	传染内科	传 染 内 科	协助完成 课题	138852190 59

--

十一、审核意见

推荐单位意见:

同意申报



2021年4月16日