

一、项目情况

项目名称	CD40 在变应性鼻炎慢性过程及组织重塑中的作用				
项目主管 处室	社会处		项目主管		叶琳
归口管理 部门	浙江大学		项目计划类别		公益技术研究社会发展项目
技术管理 领域	外科		项目技术来源		自主开发
项目开始 日期	2014 年 07 月		项目完成日期		2016 年 12 月
承担单位	单位名称		浙江大学		
	单位类型		高等学校	法人代码	47009501-6
	通讯地址		杭州市西湖区余杭塘路 388 号	邮政编码	310058
	联系人		吴宏华	E-mail	kjcgx@zju.edu.cn
	电话/传真		88981187	手 机	
合作单位	单位名称				法人代码
	1				
	2				
	3				
	4				
	5				

二、项目负责人及项目组成员

项目 负责 人	姓 名	徐盈盈	学 历	大学	身份 证号 码	330102196302011226	
	学 位	学士	专业技 术职称	副高级	现从 事专 业	耳鼻咽喉科学	
	手机	13819195596	Email	xuyingyingzh@163.com	邮政 编码	310058	
	工作单 位	浙江大学	法人代 码		通讯 地址	杭州市庆春路 79 号	
项目 组	姓 名	身份证号码	职称	所在单位	从事 专业	项目分工	年参加 项目时 间(月)

成员	徐盈盈	330102196302011226	副高级	浙江大学	耳鼻咽喉科学	实验设计、数据统计	6
	程可佳	33010219780927031X	中级	浙江大学（医学院）	耳鼻咽喉科学	构建 siRNA	6
	刘洪燕	371426198202107225	中级	浙江大学（医学院）	耳鼻咽喉科学	小鼠饲养、标本取材	6
	戴利波	330227198001066823	中级	浙江大学（医学院）	耳鼻咽喉科学	ELISA 法	4
	刘永才	430623198204134515	初级	浙江大学（医学院）	耳鼻咽喉科学	实时 RT-PCR	4
	李全成	330702198803070410	初级	浙江大学（医学院）	耳鼻咽喉科学	免疫印迹法	4
	鲍洋洋	341125198908050218	其他	浙江大学（医学院）	耳鼻咽喉科学	免疫组化检测	4

三、主要研发内容

1. 研究内容

- ① 小鼠 OVA 致敏后，实验起始第 22 天起予 5% OVA 鼻腔激发，每侧鼻腔给予 5% OVA 生理盐水溶液 10 μ g 点鼻，每日 1 次，连续 1 周。其后继续 2 次/周给予 5% OVA 点鼻，至第 105 天（变应原激发共达 12 周），进而建立慢性 AR 小鼠模型。
- ② 利用上述模型和基因沉默技术，观察鼻内局部应用 CD40 siRNA 在 A R 慢性过程中对体液免疫的作用。
- ③ 利用上述模型和基因沉默技术，观察鼻内局部应用 CD40 siRNA 在 A R 慢性过程中对细胞免疫的作用。
- ④ 利用上述模型和基因沉默技术，观察鼻内局部应用 CD40 siRNA 在 A R 慢性过程中对组织重塑的影响。

2. 技术关键

① 如何成功建立慢性 AR 小鼠模型，是完成本研究的关键所在。

OVA 作为变应原致敏和激发的小鼠模型用于研究急性 AR 的历史悠久。近年来，有研究者开始以 OVA 作为变应原建立慢性变应性炎症的小鼠模型，但多为研究下呼吸道疾病，如变应性哮喘；对慢性 AR 小鼠模型研究得较少。文献报道，豚鼠 OVA 致敏后，实验起始第 22 天起予 5% OVA 鼻腔激发，每侧鼻腔给予 5% OVA 生理盐水溶液 25 μ L 点鼻，每日 1 次，连续 1 周。其后继续 2 次/周 给予 5% OVA 点鼻，至第 105 天(变应原激发共达 12 周)，进而建立慢性 AR 豚鼠模型。亦有文献报道通过相同方法建立了慢性变应性哮喘小鼠模型，但每次激发用 OVA 量较小，为 OVA10 μ g。本课题组按照此方法，通过减低激发频率，延长整个激发过程的间隔时间来建立慢性 AR 小鼠模型。

② 针对 CD40 的 siRNA 的构建及转染。

根据公认的 siRNA 设计原则 (Nat Biotech 2004; 22: 326-330) 设计针对 CD40 的 3 条 siRNA，用实时 RT-PCR 和流式细胞仪技术验证 CD40 的 mRNA 和细胞因子水平的表达，选用验证后效果最好的一条。同时合成阳性对照和阴性对照。转染载体选用美国 Ambion 公司生产的 pSilencer4.1-CMV neo vector。

③ 如何准确定量检测细胞免疫和体液免疫中 CD40 及相关细胞因子的水平。

只有能定性、定量地检测 CD40 及相关细胞因子的水平，才能评价其在不同免疫中的作用，并同时验证基因沉默的效果。本课题采用酶联免疫吸附测定法、Western blot 技术、实时 RT-PCR 和流式细胞仪等先进实验方法和仪器，保证了实验的顺利进行和结果的可靠。

3. 主要创新点

① 在国内外首次将 CD40 siRNA 通过鼻腔局部给药在慢性 AR 中进行 RNA 干扰，观察 CD40 在这一类疾病中的作用；在国内外首次研究 CD40 siRNA 局部应用对慢性 AR 尤其是组织重塑的治疗作用。siRNA 局部给药具有全身给药无法比拟的优势。

② AR 的动物模型目前多局限在急性过程，本课题通过局部给药的方式来建立慢性 AR 小鼠模型，着重研究 AR 的慢性过程和组织重塑，为进一步揭示 AR 的发病机理提供帮助。

四、目标任务和主要技术经济指标

① 建立慢性 AR 小鼠模型，通过鼻内局部应用 CD40 siRNA，预期可使脾脏中 DC 表达 CD40 下降，血清、鼻中隔组织匀浆上清液中 IL-4、IL-5、IL-13 和 IFN- γ 水平下降，淋巴细胞中 Treg 水平上升，进而抑制变应性炎症过程。进一步揭示 AR 的发病机制。

② 建立慢性 AR 小鼠模型，通过鼻内局部应用 CD40 siRNA，预期可使鼻中隔黏膜上皮细胞增多，上皮细胞中杯状细胞减少，细胞外基质减

少，进而减轻组织重塑的程度，抑制变应性炎症的慢性过程。

③ CD40 可作为治疗 AR 慢性过程的新靶点，鼻内局部应用 CD40 siRNA 可作为治疗 AR 的新方法。

④ 本课题所得研究成果预计发表 SCI 收录论文 1-2 篇，国内核心期刊发表论文 1-2 篇。

五、项目经费来源

1、本项目研发总经费 10.00 万元，其中：甲方补助 10.00 万元，乙方自筹 0.00 万元，丙方配套 0.00 万元。

2、经费拨付和到位计划：

	首期	二期	三期	合计
甲方	10.00	0.00	0.00	10.00
乙方自筹	0.00	0.00	0.00	0.00
丙方配套	0.00	0.00	0.00	0.00

六、项目经费支出预算

经费开支科目	预算经费总额（万元）	其中省科技厅经费（万元）
一、直接费用	8.54	8.54
1. 设备费	0.00	0.00
2. 材料费	4.00	4.00
3. 测试化验加工费	1.04	1.04
4. 燃料动力费	0.00	0.00
5. 差旅费	0.50	0.50
6. 会议费	0.50	0.50
7. 合作、协作研究与交流费	0.00	0.00
8. 出版/文献/信息传播/知识产权事务费	0.50	0.50
9. 劳务费	1.50	1.50
10. 专家咨询费	0.50	0.50
二、间接费用	1.46	1.46
11. 管理费	0.80	0.80
12. 激励费	0.66	0.66
合计	10.00	10.00

七、需增添的仪器设备

名称及规格型号	数量	单价 (万元)	省科技厅拨款 (万元)	自筹或其他 (万元)	用途说明