

关于国家自然科学基金资助项目批准及有关事项的通知

靳斌 先生/女士：

根据《国家自然科学基金条例》的规定和专家评审意见，国家自然科学基金委员会（以下简称自然科学基金委）决定批准资助您的申请项目。项目批准号：

81571367，项目名称：通过干预老年肝脏微环境（Niche）抑制Wnt通路，逆转外源干细胞早衰的机制研究，直接费用：57.00万元，项目起止年月：2016年01月至2019年12月，有关项目的评审意见及修改意见附后。

请尽早登录科学基金网络信息系统（<https://isisn.nsfc.gov.cn>），获取《国家自然科学基金资助项目计划书》（以下简称计划书）并按要求填写。对于有修改意见的项目，请按修改意见及时调整计划书相关内容；如对修改意见有异议，须在计划书电子版报送截止日期前提出。**注意：请严格按照《国家自然科学基金资助项目资金管理办法》填写计划书的资金预算表，其中，劳务费、专家咨询费科目所列金额与申请书相比不得调增。**

计划书电子版通过科学基金网络信息系统（<https://isisn.nsfc.gov.cn>）上传，由依托单位审核后提交至自然科学基金委进行审核。审核未通过者，返回修改后再行提交；审核通过者，打印为计划书纸质版（一式两份，双面打印），由依托单位审核并加盖单位公章后报送至自然科学基金委项目材料接收工作组。计划书电子版和纸质版内容应当保证一致。

向自然科学基金委提交和报送计划书截止时间节点如下：

- 1、提交计划书电子版截止时间为**2015年9月11日16点**（视为计划书正式提交时间）；
- 2、提交计划书电子修改版截止时间为**2015年9月18日16点**；
- 3、报送计划书纸质版截止时间为**2015年9月25日16点**。

请按照以上规定及时提交计划书电子版，并报送计划书纸质版，未说明理由且逾期不报计划书者，视为自动放弃接受资助。

附件：项目评审意见及修改意见

国家自然科学基金委员会
医学科学部
2015年8月17日

附件：项目评审意见及修改意见表

项目批准号	81571367	项目负责人	靳斌	申请代码1	H2501
项目名称	通过干预老年肝脏微环境（Niche）抑制Wnt通路，逆转外源干细胞早衰的机制研究				
资助类别	面上项目	亚类说明			
附注说明	常规面上项目				
依托单位	山东大学				
直接费用	57.00 万元	起止年月	2016年01月 至 2019年12月		
<p>通讯评审意见：</p> <p><1></p> <p>一、简述申请项目的主要研究内容和申请者提出的科学问题或假说</p> <p>主要内容：从不同年龄的大鼠分离肝基质细胞，用蛋白组学筛选细胞外液差异表达蛋白。分析差异表达蛋白与Wnt通路的联系；通过对相关因子不同组合的RNA干预，探讨最佳干预干细胞衰老的组合；对体外结果进行在体验证。</p> <p>科学假说或问题：细胞微环境影响干细胞衰老、干预微环境可能改善衰老表型。</p> <p>二、具体意见</p> <p>（一） 申请项目的预期结果及其科学价值和意义</p> <p>预期结果： 筛选影响干细胞早衰的微环境因子，验证这些因子对干细胞衰老的作用，验证干预这些因子可逆转干细胞衰老。</p> <p>科学价值与意义： 在干细胞衰老的机制方面有理论价值、为扩大肝脏供源（老年肝脏用于肝移植）提供依据。</p> <p>（二） 科学问题或假说是否明确，是否具有创新性</p> <p>科学问题基本明确。从微环境改变探索干预干细胞衰老有一定新意。</p> <p>（三） 研究内容、研究方案及所采用的技术路线</p> <p>研究内容、研究方案及所采用的技术路线基本能验证所提出的科学问题或假说。方法的逻辑性、可行性也基本没有问题。</p> <p>（四） 申请人的研究能力和研究条件</p> <p>申请人有一定的干细胞、衰老相关研究基础，有一定的前期工作积累。实验室与依托单位也有条件完成课题。</p> <p>（五） 其它意见或修改建议</p> <p>无</p> <p><2></p> <p>一、简述申请项目的主要研究内容和申请者提出的科学问题或假说</p> <p>该课题提出老年器官的微环境中存在导致干细胞早衰的根源。拟通过检测移植后缺血再灌注损伤、肝功能、干细胞衰老及Wnt通路等指标，明确干预老年微环境对防止干细胞早衰的作用，为提高临床老年供肝的利用率提供理论和实验基础。</p> <p>二、具体意见</p> <p>（一） 申请项目的预期结果及其科学价值和意义</p> <p>该项目探讨干预老年微环境对防止干细胞早衰的作用及分子机制，具有一定研究意义。</p> <p>（二） 科学问题或假说是否明确，是否具有创新性</p> <p>老年器官的微环境中存在导致干细胞早衰的根源的科学假设是明确，但具体的方向却过于宽泛，明确具体机制和信号的确立对假说的合理性将提供有益的补充。</p>					

(三) 研究内容、研究方案及所采用的技术路线
所设计的实验流程由于实验假说提出的不具体, 设计的方向过多, 不能明晰的解决一个问题。

(四) 申请人的研究能力和研究条件
申请人研究基础尚可, 发表过多篇SCI论文, 实验依托单位基础较强, 故申请人可完成相应工作量。

(五) 其它意见或修改建议
一定的前期工作基础, 可以给实验提供明确的指导方向, 多靶点的寻找往往每一个靶点的阐述都相对空泛, 建议适当前期工作, 筛选适当靶点, 进一步深化该科学假说的提出。

<3>

一、简述申请项目的主要研究内容和申请者提出的科学问题或假说

该课题组在外源干细胞改善老年供肝功能的研究中发现外源干细胞的早衰现象, 并通过阻断外源干细胞Wnt通路和导入TERT基因进行改善, 但效果不明显。因此相信老年器官的微环境中存在导致干细胞早衰的根源。本课题拟在前期工作基础上用基质细胞培养液模拟体内微环境: 通过SELDI-TOF璐、Tricine-SDS-PAGE、LC-MS和蛋白质芯片(PNT227)等技术靶标老、中、青年肝脏微环境中的差异蛋白; pSOS酵母双杂交技术明确蛋白质相互作用; 病毒感染和siRNA干扰整体调节微环境蛋白因子, 找到逆转早衰的因子组合。进而在大鼠肝脏移植模型中离体干预老年供肝, 通过检测移植后缺血再灌注损伤、肝功能、干细胞衰老及Wnt通路等指标, 明确干预老年微环境对防止干细胞早衰的作用, 为肝脏移植供体匮乏启用边缘供肝, 为提高临床老年供肝的利用率提供理论和实验基础。

二、具体意见

(一) 申请项目的预期结果及其科学价值和意义

该课题的目的是分离鉴定肝基质细胞, 并在体外通过老、中、青年大鼠基质细胞培养液模拟不同年龄肝脏体内微环境, 为体外培养的青年来源的干细胞提供生长环境。另外, 课题通过差异蛋白质组学技术对不同龄来源的基质细胞分泌液进行差异蛋白分析, 寻找具有明显差异的蛋白谱, 确定其中与衰老相关的细胞因子, 并实现与wnt通路的信息对接。此外选择在体外具有明显逆转效果的细胞因子进行体内干预, 并试图改善微环境是否可以提高老年供肝的移植效率的设想也是非常有意义的。

(二) 科学问题或假说是否明确, 是否具有创新性

课题组科学假说明确, 其中引用肝脏微环境Niche的工作, 使其干细胞研究抓住了干细胞当今最重要的课题, 具有创新性。

(三) 研究内容、研究方案及所采用的技术路线

研究内容、研究方案及所采用的技术路线能验证所提出的科学问题, 整个文章的逻辑性及可行性合理。

(四) 申请人的研究能力和研究条件

该研究所的基本设施合理, 条件优越, 负责人可以在课题的运行中进一步提高自身的能力和科研水平。

(五) 其它意见或修改建议

对研究方案的修改意见:

医学科学部

2015年8月17日

山东省重点研发计划 项目任务书

项目编号：2017GSF218021

项目名称：经外源TERT基因和Snail基因修饰的脐带源间充质干细胞
(MSC)对大鼠肝移植模型中边缘性供肝的保护优势及其作用
山东大学

项目主管部门（甲方）：山东大学基础医学院

项目承担单位（乙方）：山东大学

项目协作单位：

项目负责人：王伟

联系电话：13335102866

起止时间：2017年07月至2019年12月

山东省科学技术厅

二〇一七年制

填 写 说 明

1. 本任务书系省科技厅为组织山东省重点研发计划项目研究而设计，任务书甲方为科技发展计划项目主管部门，乙方为项目承担单位。

2. 本任务书部分内容由山东省科技计划管理信息系统自动生成，承担单位可根据项目实际情况进行补充修改。

3. 本任务书需用 A4 纸打印，一式四份，项目主管部门一份，项目承担单位一份；省科技厅两份。

一、项目基本信息表

单位名称	山东大学基础医学院			主管部门	山东大学	
单位类型	[01]	01.高等院校 02.科研院所 03.国有企业 04.集体企业 05.私营企业 06.有限责任公司 07.股份有限公司 08.股份合作企业 09.联营企业 10.其它				
通讯地址	济南市文化西路44号			邮政编码	250012	
项目负责人	姓名	性别	出生年月	身份证号码		联系电话
	王伟	女	1975-04-02	372501197504021122		13335102866
	传真		手机	E-mail		
	-		13335102866	jinglewei@sdu.edu.cn		
职工总数	240	人	大专以上人员	235	人	研究开发人员 219 人
项目起始时间		2017-07-01		计划完成时间		2019-12-31
技术领域	[17]	01. 电子信息 02.新材料 03. 先进制造 04. 新能源与高效节能 05. 交通运输 06. 现代服务业 07. 化工及建材 08. 轻工纺织 09.农业高技术 10. 农业生产 11. 农业设施装备 12. 农业现代产业 13. 新农村建设 14. 海洋科技 15. 资源与节约 16. 环境与可持续发展 17. 人口与健康 18. 中医药现代化 19. 公共安全 20. 生物技术 21.城镇发展与其他社会事业 22. 高新技术创新服务				
项目类别	[1] 1.科研 2.中试 3.新产品开发					
研究方式	[1] 1.本单位独立完成 2.产学研结合 3.引进消化再创新					
主要优势	[5][2][3](按优势大小选择三项) 1.重大理论突破 2.技术工艺创新突出 3.市场前景广阔 4.经济效益显著 5.社会效益显著 6.形成自主知识产权 7. 其它					
项目完成时 预期成果走向	知识产权 情况	专利	其中发明专利	技术标准	著作权	动植物新品种
		3	1	1	1	0
	科技报告 (篇)	立项报告	进展报告	专题报告	最终(技术)报告	合计
		0	1	0	1	2
	技术水平	[03] 1.国际领先 2.国际先进 3.国内领先 4.国内先进 5.省内领先 6.省内先进				
	市场前景	[04] 1.出口创汇 2.替代进口 3.填补国内空白 4.填补省内空白				
	产业化后 经济效益	年增销售收入(万元)		年增税收(万元)	年增利润(万元)	创汇(万美元)
0.00		0.00	0.00	0.00		

二、主要研究内容

本课题拟分离获取脐带源间充质干细胞（MSC），1）在体外建立 MSC 肝分化诱导体系，诱导转化为 HLC，对比研究 MSC 与 HLC 存活、迁移、免疫耐受及对肝移植中边缘性供肝的保护作用，确定 MSC 作用机制是否与 MSC 向 HLC 的分化有关；2）然后从①延缓衰老、提高存活增殖能力和②加强定位靶向作用两个方面入手，导入 TERT 基因和 Snail 基因进行修饰，再对比研究 MSC 与 HLC 存活、迁移、免疫耐受及对肝移植中边缘性供肝的保护作用，探讨 MSC 分化为 HLC 后发生功能和疗效变化的原因机制，从而进一步确定 MSC 作用机制是否与 MSC 向 HLC 的分化有关；3）将基因修饰前后的 MSC 通过不同途径移植到大鼠肝移植模型中，观察 MSC 的分布情况及受体大鼠的恢复状况，检测移植后后肝组织相关指标，包括肝功能指标、缺血再灌注损伤指标、提示肝组织中 MSC 激活增殖情况的染色剂显色指标等，探究实验组对边缘性供肝的保护作用及优势，讨论最佳 MSC 移植方式。

1）探讨确定 MSC 来源的 HLC 是否与 MSC 对肝移植中边缘性供肝的保护作用机制有关

①体外建立肝分化诱导培养体系，诱导 MSC 分化为 HLC；

②通过流式细胞仪分别检查 MSC 与 HLC 的粘附因子与趋化因子受体 CXCR4 的表达；酶联免疫吸附试验检查免疫抑制潜能与肝细胞生长因子的表达。

③将 MSC 与 HLC 分别移植入大鼠肝移植模型中比较两者的治疗恢复效果。

2）探讨经基因修饰的 MSC 在克服 MSC 治疗局限性中的作用及安全性

①通过导入外源 TERT 基因使其端粒酶活性得以提高，延长 MSC 的寿命，提高其细胞存活能力及缺血缺氧的抗“击打”能力，从而使得 MSC 可以更长效的作用于肝移植模型边缘性供体肝，提高治疗效果。

②通过导入 Snail 基因上调 CXCR4 的表达，促进受体生成，提高 MSC 向正调节表达 SDF-1 的受损组织迁移效率，加强其对 MSC 的归巢作用，从而提高 MSC 对肝移植中边缘性供肝的保护作用。

③致瘤检测：6、8、10 周后，经病理切片镜下检测是否有肿瘤的发生。

4）通过基因修饰前后的 HLC 与 MSC 的比较，探讨 MSC 分化成 HLC 后发生功能和疗效变化的原因可能，进一步确定 HLC 是否与 MSC 对肝移植中边缘性供肝的保护作用机制有关。

①对 HLC 进行同样的基因修饰、培养；

②通过流式细胞仪分别检查基因修饰前后的 HLC 与 MSC 的粘附因子与趋化因子受体 CXCR4 的表达；酶联免疫吸附试验检查免疫抑制潜能与肝细胞生长因子的表达。

③将基因修饰前后的 HLC 与 MSC 分别移植入大鼠肝移植模型中比较两者的治疗恢复效果。

5）探讨 MSC 不同的移植方式对于治疗效果的影响

目前 MSC 常用的移植方式有外周静脉移植，门静脉移植，肝内移植等。但哪种移植方式最好还有待确定。

我们将研究不同的细胞植入方式对于干细胞治疗效果的影响。这将对 MSC 的临床应用提供指导建议。

三、主要技术指标

- 1) 形态学观察、表型鉴定：贴壁生长及细胞形态特征；流式细胞仪行细胞表型鉴定
- 2) 免疫抑制潜能检测：MSC/HLC 与 CD4+T 细胞共培养
Ficoll-Paque 密度梯度离心法分离外周血单核细胞，加入 CD4+T 细胞 kit II 分离纯化 CD4+T 细胞；与 MSC/HLC 共培养，激活 CD4+T 细胞功能，ELISA 检测 IFN- γ 浓度，观察细胞存活情况
- 3) HGF 表达检测：ELISA 法
- 4) 归巢能力检测：Transwell 迁移实验
- 5) 衰老指标检测： β -半乳糖苷酶染色阳性细胞数，促衰老蛋白 p53、p21 检测
- 6) 肝功能检测：移植后 3h、12h、24h、48h、3d、5d、1w 及 2w、4w，8w，12w 分别取材测白蛋白含量，全自动生化分析仪测血中 ALT、AST、TBil、DBil 数值
- 7) 示踪剂检测及电镜观察提示存活情况：MSC、HLC 移植后第 1、3、5 天和第 1、2、4、8、12 周，肝脏标本取材后，立即以 OCT 包埋，冰冻切片。荧光显微镜下，直接照片，用 IBAS2.5 全自动图像分析系统分析；常规肝脏组织透射电镜制作，电镜下着重观察组织中增生干细胞
- 8) 致瘤检测：6、8、10 周后，经病理切片镜下检测是否有肿瘤发生

四、主要创新点及先进性

- 1) 由于干细胞培养受到细胞寿命的影响，很难得到足够数量的干细胞，本课题的一个创新点是：依据前期研究在干细胞移植前，将外源 TERT 基因导入干细胞，不但可以提高干细胞体外培养的数量，还有利于干细胞移植后存活率的延长以及双向分化能力的增强；并通过导入 Snail 基因上调趋化因子受体 CXCR4 的表达，借以提高干细胞特定分布于损伤部位的效率，促进其归巢，改善研究效果。
- 2) 不同于以往大多数的研究，对 MSC 肝损伤修复作用的机制是否与 MSC 向 HLC 的分化有关提出疑问，并通过对比 MSC 和 HLC 存活、迁移、免疫耐受及对肝移植中边缘性供肝的保护作用，探讨 MSC 分化为 HLC 后发生功能和疗效变化的原因机制，从而进一步确定 MSC 作用机制是否与 MSC 向 HLC 的分化有关。
- 3) 选择成体大鼠作为 MSC 来源，成体干细胞不像胚胎干细胞那样可能会导致肿瘤的发生，因此具有更高的生物安全性。
- 4) 首次提出了 MSC 对肝移植中边缘性供肝的保护研究，扩展边缘性供肝的疗效及应用范围，可为解决全球性肝移植匮乏问题作出贡献。

五、项目经费预算

项目计划总投资		10.00 万元		其中已完成投资		0.00 万元	
计划新增投资来源		单位自筹		0.00 万元			
		金融贷款		0.00 万元			
		财政 拨款	10.00 万元	其中:国家财政拨款		0.00 万元	
				省科技经费		10.00 万元	
				地方政府配套		0.00 万元	
		其它		0.00 万元			
新增投资中省科技 经费支出预算		直接经费		设备费		1.25 万元	
				材料费		3.00 万元	
				测试化验加工费		1.25 万元	
				燃料动力费		0.00 万元	
				差旅会议国际合作与交流费		0.75 万元	
				出版/文献/信息传 播/知识产权事务费		0.75 万元	
				劳务费		1.00 万元	
				专家咨询费		0.50 万元	
				其它费用		0.00 万元	
		间接费用		承担单位为项目研究提供的房屋占用，日常水、电、气、暖消耗		0.45 万元	
				有关管理费用的补助支出		0.15 万元	
				激励科研人员的绩效支出		0.45 万元	
				其它费用		0.45 万元	

六、项目进度安排

	开始时间	截止时间	完成的主要指标(要可考核)
计划进度	2017-07-01	2018-01-31	课题设计，可行性论证，查新咨询，组建科研小组，订购动物和试剂并进行预实验
	2018-02-01	2018-09-30	分离脐带源MSC，建立大鼠肝移植模型，建立体外肝分化诱导体系，诱导分化HLC
	2018-10-01	2019-05-31	MSC与HLC的基因修饰，对比研究修饰前后的MSC和HLC存活、迁移、免疫耐受及对肝移植边缘性供肝的保护作用，探讨MSC分化为HLC后发生功能和疗效变化的原因机制，从而进一步确定MSC作用机制是否与MSC向HLC的分化有关
	2019-06-01	2019-12-31	总结资料，分析结果，撰写及发表论文，科研鉴定，申报科学技术奖

七、项目课题组成员

姓名	性别	出生年月	职称/职务	工作单位	项目中分工	参加月/年
王伟	女	1975-04-02	副教授	山东大学	项目负责人	10
杜刚	男	1981-03-19	主治医师	山东大学/齐鲁医院	SC的分离培养大鼠肝移植模型的建	8
靳斌	男	1975-02-26	副主任医师	山东大学/齐鲁医院	大鼠肝移植模型的建立	8
刘炎锋	男	1982-11-23	主治医师	山东大学/齐鲁医院	MSC、HLC形态学观察及表型鉴定	8
施彬垚	男	1993-04-25	研究生	山东大学	MSC、HLC基因修饰	10
孔都	男	1993-06-19	研究生	山东大学	细胞培养	10
姜政辰	男	1992-03-17	研究生	山东大学	实验大鼠的培养	10
张浩	男	1993-06-17	研究生	山东大学	MSC、HLC移植	10
杨金奂	男	1992-10-12	研究生	山东大学	数据采集及结果分析	10
周兵海	男	1990-02-19	研究生	山东大学	数据采集及结果分析	10

八、任务书签订各方意见

项目主管部门（甲方）

（公 章）

负责人（签字）

年 月 日

项目承担单位（乙方）

项目负责人（签字）

财务负责人（盖章）

（公 章）

年 月 日

省科技厅主管处、单位

（公 章）

负责人（签字）

年 月 日

九、共同条款

1. 乙方必须按要求编报年度计划执行情况、下一年度经费预算和有关统计报表，交甲方汇总后，及时上报省科技厅。逾期不报，省科技厅有权暂停拨款。

2. 任务书执行过程中，乙方如需调整任务，向甲方提出变更内容及其理由的申请报告，经甲方审核后报省科技厅审定后实施。未接到正式批准书以前，双方须按原任务书履行，否则后果由自行调整的一方负责。

3. 乙方因某种原因（如：与项目申请书内容有出入、挪用经费、技术措施或某些条件不落实）致使计划无法执行，而要求中止，应视不同情况，部分、全部退还所拨经费；如乙方没有提出中止任务书的要求，甲方可根据调查情况有权提出中止的处理建议，报省科技厅审核批准后执行。

4. 甲方根据应用技术研发资金开支的规定，监督经费的使用情况。凡不符合规定的开支，甲方负责提出调整意见。必要时，省科技厅有权直接提出调整或撤销意见。

5. 乙方应严格按照规定提交相应的科技报告：立项下达后、任务书签署前，应呈交立项报告；项目执行中，年度或中期审核前应呈交进展报告；专题报告[指实验（试验）报告、调研报告、工程报告、测试报告、评估报告等蕴含科研活动细节及基础数据的报告]根据项目执行情况据实呈交；项目完成后三个月内、申请验收前，须呈交最终（技术）报告。对未提交相应科技报告或者科技报告质量达不到合格标准的项目，按不通过验收或不予结题处理。

6. 本任务书签订各方均负有相应的责任。若有争议或纠纷时，按山东省重点研发计划管理办法有关条款处理。