

山东省妇幼保健院  
国家卫生和计划生育委员会生育调控技术重点实验室

## 开放课题资助项目合同书

项 目 名 称: 胎盘植入中 microRNA-29a/b/c 调控绒毛外滋养  
细胞参与血管重塑的研究

项 目 编 号:

项目起止时间: 2018. 12. 1-2020. 12. 1

资助单位(甲方): 国家卫生和计划生育委员会生育调控技  
术重点实验室

项目负责人(乙方): 顾永忠

项目负责人所在单位: 山东省立医院

通 讯 地 址 : 山东省济南市经五纬七 324 号

联 系 电 话 :

电 子 信 箱 : yzhonggu@yeah.net

签 定 日 期 : 2018 年 11 月 20 日

山东省妇幼保健院  
国家卫生和计划生育委员会生育调控技术重点实验室

2018 年制表



扫描全能王 创建

## 一、主要研究内容和要达到的目标\*:

### 研究内容

#### 一、验证 EPHB2 为 miR-29a/b/c 的靶基因

1.双荧光素酶报告基因检测:构建含有 EPHB2 3' 端非编码区 (3' UTR) miR-29a/b/c 种子区序列的 pmirGLO 载体,测序验证,获得野生型 EPHB2-miR-29a/b/c-pmirGLO 质粒,再定点突变测序验证获得突变型质粒。将两种质粒分别与 miR-29a/b/c 转染入 293T 细胞中,双荧光素酶报告基因检测证实 miR-29a/b/c 可以结合 EPHB2 3' UTR。2.miR-29a/b/c 调控 EPHB2:miR-29a/b/c 的 mimics 转染入 HTR8-S/Vneo 细胞中,qRT-PCR 和 western blot 检测 EPHB2 基因 mRNA 和蛋白水平。

#### 二、定位 miR-29a/b/c 和 EPHB2

1.免疫组化:EphB2 免疫染色采用 Polink-2 plus®超敏二步法免疫组化检测;采用 TripleStain IHC 试剂盒对组织标本进行 CD146 (标记 EVT 细胞)、CD31 (标记血管内皮细胞)和 EphB2 三染色,检测血管重塑程度以及与 EphB2 表达量的关系。2.荧光原位杂交:采用 Exiqon 公司合成的针对 miR-29a/b/c 的 miRCURY LNA 探针对冰冻组织切片进行染色杂交定位 miR-29a/b/c。

#### 三、体外实验证实 miR-29a/b/c-EPHB2 对血管重塑的调控作用。

HTR-8/SVneo 细胞处理分组 (以下实验均按此分组)

因子	miR-29a/b/c	EPHB2	空白
过表达	mimics	EPHB2-pIRES2-EGFP 载体	空白
沉默基因	inhibitor	shRNA 和 SNEW 肽	空白

1.小管形成实验,96 孔培养板铺 Geltrex 基质胶,接种 HTR-8/SVneo 细胞,培养孵育 6-24h 后,倒置显微镜下观察 HTR-8/SVneo 细胞成管情况,Image J 软件分析测量。

2.细胞划痕实验,24 孔板中 HTR-8/SVneo 细胞生长均匀铺满时,用 200  $\mu$ l 无菌枪头做一划痕,清洗掉脱落的细胞,相差显微镜记录 0h 和 18h 的细胞迁移情况,Image J 软件分析测量。

3.肌动蛋白微丝评价,处理后的 HTR-8/SVneo 细胞在载玻片上生长接触融合,甲醛固定,TRITON X-100 透性化,TRITC-phalloidin 染色,DABCO 胶固定,荧光显微镜下观察记录。

4.基质金属蛋白酶测定,HTR-8/SVneo 细胞在 24 孔板中培养,收获细胞离心后取上清液采用明胶酶谱法测定 MMP2、MMP9。

5.滋养细胞-内皮细胞共培养,6 孔板载玻片上的人脐静脉内皮细胞(HUVEC)铺满后 CMFDA (绿色)标记,CMPX (红色)标记的 HTR-8/SVneo 细胞加入 HUVEC 细胞上培养 24h,甲醛固定,显微镜下观察在 HUVEC 单细胞层中的 HTR-8/SVneo 细胞岛 (红色)被认为是滋养细胞代替血管内皮细胞的结果,并采用 Image J 软件记录分析。

### 要达到的目标:

1. 在胎盘植入中,miR-29a/b/c 通过靶基因 EphB2 介导 EVT 细胞的迁移和子宫动脉重塑过



程，阐述胎盘植入的病理分子机制。

2. 预计发表高质量 SCI 论文 2-3 篇，培养研究生 2-3 名。

二、承诺在课题结束时将提供的研究成果及形式，至少必须包括下列

1、2 项：

- 1、 研究工作总结报告；
- 2、 已发表及已正式录用的符合合同条款中署名要求的学术论文；
- 3、 其它与本课题相关的成果证明材料。

课题负责人（签名）：丁晓忠

2018 年 11 月 20 日

\*主要研究内容和研究目标应与申请书中所述一致。





三、进度和阶段目标：	
2018 年 12 月~2019 年 12 月	收取组织样本，qRT-PCR 检测目的基因表达。构建载体，验证 EPHB2 为 miR-29a/b/c 靶基因，免疫组化染色定位 EphB2 以及评价血管重塑情况，荧光原位杂交实验定位 miR-29a/b/c。
2020 年 1 月~2020 年 12 月	体外功能实验，对 miR-29a/b/c 或 EPHB2 过表达或抑制，比较 EVT 迁移能力以及血管重塑能力。实验结果数据整理分析，撰写发表论文，课题结题鉴定。
年 月~ 年 月	
年 月~ 年 月	
年 月~ 年 月	
年 月~ 年 月	

  

四、课题负责人、所在单位及主要研究人员*：	
负责人：顾永忠	
所在单位：山东省立医院	
主要研究人员：	

  

姓 名	职 称	研究专业方向	项目中的分工	所在单位	签 名
王珊	副主任医师	复发性流产	撰写论文	山东省立医院	王珊
李红燕	副主任技师	胎盘植入诊断	数据收集	山东省立医院	李红燕
周宇	主治医师	胎盘功能	标本收集	山东省立医院	周宇
刘菁	博士研究生	胎盘病理	体内实验	山东省立医院	刘菁
卢媛	博士研究生	滋养细胞功能	体外实验	山东省立医院	卢媛
陈鹏正	硕士研究生	胎盘源性疾病	体外实验	山东省立医院	陈鹏正

\*主要研究人员应与申请书一致。



扫描全能王 创建

五、经费开支预算计划：		总计： 伍万元整	(大写)
支 出 科 目	金额(万元)	用 途 说 明	
一、研究经费：	5		
材料费	3.8	PCR 试剂；WB 试剂和抗体；细胞培养及转染试剂；质粒购买；其他各种实验耗材。	
测试化验加工费	0.4	载体构建测序及测序费用。	
差旅费	0.1	研究人员来室工作的差旅费。	
会议费	0.1	参加的国内学术会议注册。	
出版/文献/信息传播/知识产权事务费	0.3	版面费和成果鉴定。	
专家咨询费	0		
劳务费	0.3	硕士研究生劳务费。	
二、其他：	0		

附：经费使用说明：

1. 本实验室提供资助的开放基金应用于项目研究，不能用于支付通讯、招待和交通等费用，主要开支范围如下：

(1) 与资助课题直接有关的科研业务费用(包括材料费、加工费、测试费和化验费)，不少于总资助额的 75%；

(2) 论文版面费、学术活动费(包括本实验室同意参加的国内学术会议、科学考察、调研、评审及鉴定费用)，不超过总资助额的 15%；

(3) 研究人员来室工作的差旅费等。

2. 此课题应尽可能使用本实验室的仪器设备(不具备使用条件





的除外)。课题需购置的特殊设备和测试等所产生的费用,凭发票在课题经费中支出。以课题经费购置的设备归本实验室所有,相关测试资料由本实验室存档。

3. 课题研究结束后,结余的经费及剩余的原材料、仪器设备等一律留在本实验室,不得带走或他用。

4. 所在单位应建立课题帐户,实行单独核算。所有单据经课题负责人及单位领导签字后,将扫描件上传至实验室,课题负责人在上述开支范围内参照重点实验室的有关规定在所在单位财务部门进行财务结算。实验室按课题进度和完成任务情况分段拨付课题经费。首次划拨资助额的 30%,中期考核合格后再拨付 40%,待论文或专著发表后,拨清剩余款项。

## 六、合同条款

第一条 甲方对乙方申请的国家卫生和计划生育委员会生育调控技术重点实验室开放课题资助项目 胎盘植入中 microRNA-29a/b/c 调控绒毛外滋养细胞参与血管重塑的研究 的研究,

资助人民币 5 万元。

第二条 乙方同意接受该开放课题的资助,并按本合同的内容和本实验室《2018 年度开放课题招标指南及管理办法》的有关规定,认真组织项目的实施。

第三条 甲乙双方都应努力创造多种有利条件,对课题科研工作给予大力支持,使该课题能按计划完成。



第四条 乙方应按规定于每年1月30日前将上年度已正式发表的论文及本课题研究成果取得的奖励等复印件，提供给本实验室存档并编入工作年报。

第五条 乙方在项目计划执行期间所取得的有关研究成果、专著、论文、研究报告、总结、评价书及成果报道等，均应标注国家卫生和计划生育委员会生育调控技术重点实验室开放基金资助项目，项目编号：2018KF003”，同时注明本重点实验室主任（王谢桐，Wang Xietong）为通讯作者或共同通讯作者。

第六条 乙方在结题时必须以第一作者身份在学术刊上发表与本课题相关的SCI论文至少1篇。课题研究成果归重点实验室和课题负责人共有，成果的鉴定、奖励、专利等由双方协商共同署名。申报科研成果时，作为完成者，乙方可排第一位，但申报单位必须为甲方，知识产权归属甲方，乙方按有关规定享受应有的权益。

第七条 甲方转让该项目成果或技术而取得经济利益，可视情况从取得的经济利益中提取30%付给乙方，其余作为国家卫生和计划生育委员会生育调控技术重点实验室的发展基金留存滚动使用。

第八条 合同中未尽事宜由甲乙双方协商解决。

第九条 本合同一式四份，甲乙双方及实验室负责人、乙方所在单位各一份，经签字、盖章后生效。





甲方(公章): 国家卫生和计划生育委员会  
生育调控技术重点实验室



负责人(签字):



乙方(公章):



负责人(签字):

课题负责人: 顾永忠

年 月 日

2018年11月20日

乙方开户行: 招商银行济南分行营业部

乙方银行账号: [REDACTED]





课题承担者的承诺:

我承诺以本表为有约束力的协议,遵守国家卫生与计划生育委员会生育调控技术重点实验室有关开放研究基金管理规定,按计划认真开展研究工作,按要求标注署名研究成果。

课题负责人(签章): 丁晓永

2018年11月20日

