

所属学科组	所属亚学科组
医药科学	基础医学与临床

资助编号
7192071

北京市自然科学基金资助项目任务书 (面上项目)

项目名称: 载磁性粒子纳米骨水泥在多发性骨髓瘤 PDX 小鼠模型中的抗肿瘤效果及机制研究

负责人: 杜心如

依托单位: 首都医科大学附属北京朝阳医院

资助金额: 20 万元

起止年月: 2019.1 至 2022.12

填写日期: 2019-02-25

北京市自然科学基金委员会办公室

2022 年

填表说明

一、填报任务书前，请登陆北京市自然科学基金网站

(<http://kw.beijing.gov.cn/col/col1458/index.html>)，查阅市自然科学基金的有关管理规定。认真填写任务书各项内容，要求科学严谨、实事求是、表达明确。外来语应用中文和英文同时表达，第一次出现的缩写词，须注出全称。

二、任务书为 A4 纸，任务书正文要求宋体 5 号字，双面打印，于左侧装订成册，一式两份（均为原件），报送北京市自然科学基金委员会办公室。

三、填表说明：

1、简表和研究项目组成员登记表（含负责人）依据申请书生成，不允许修改。

2、任务书正文：

1) 一般情况下，任务书正文依据申请书生成，不允许修改。根据资助通知要求，如需修改资助项目任务书正文，须根据原申请书、学科评审组修改意见认真修改。

2) 字数限制：研究目标和内容不超过 1500 字，研究方案不超过 1000 字，预期研究结果及可考核的指标不超过 800 字，年度目标和年度研究计划不超过 1000 字。

3、项目经费使用计划：

1) 项目经费管理按照《北京市自然科学基金项目资助经费管理办法》执行。

2) 项目经费使用计划包括：

(1) 直接费用。在项目实施过程中发生的与之直接相关的费用，具体包括：设备费、材料费、测试化验加工费、燃料动力费、差旅费、会议费、国际合作与交流费、档案/出版/文献/信息传播/知识产权事务费、劳务费、咨询费、其他费用。

(2) 间接费用。依托单位在组织实施项目过程中发生的无法在直接费用中列支的相关费用，主要包括依托单位为项目研究提供的现有仪器设备及房屋，水、电、气、暖消耗，结题验收、项目经费审计等管理费用及绩效支出等。绩效支出是依托单位为提高科研工作绩效安排的相关支出。

3) 金额用阿拉伯数字表示，以万元为单位，小数点后取两位。

4) 支出内容与计算依据必须填写。

一、简表

负责人信息	姓名(中文)	杜心如	姓名(拼音)	duxinru
	性别	男	民族	汉族
	出生日期	1965-05-08	电子邮箱	duxinru@yahoo.com.cn
	办公电话	010-85231703	手机	13683156652
	专业技术职务 (职称)	教授	最高学位	博士
	最高学位授予单位	中国协和医科大学		
	研究领域	多发性骨髓瘤, 脊柱转移瘤		
	其他			
依托单位	单位名称	首都医科大学附属北京朝阳医院	单位类别	医院
	隶属关系	市属	邮政编码	100020
	通信地址	北京市朝阳区工体南路 8 号		
	联系人	赵离钟	联系电话	85231217
	传真	85231217	电子邮箱	keyan@bjcyh.com
合作单位	单位名称	清华大学	联系人	龙静
项目基本信息	项目名称(中文)	载磁性粒子纳米骨水泥在多发性骨髓瘤 PDX 小鼠模型中的抗肿瘤效果及机制研究		
	项目名称(英文)	Antitumor Effect and Mechanism of Magnetic Particle-loaded Nano-bone Cement in Multiple Myeloma PDX Mice Model		
	申报学科 1(名称)	骨髓增殖性疾病	申报学科 1(代码)	H0808
	申报学科 2(名称)		申报学科 2(代码)	
	依托实验室	部门开放	起止年月	2019.1 至 2022.12
	研究性质	应用基础研究	资助金额	20 万元
	所属学科组	医药科学		
	所属亚学科组	基础医学与临床		

二、任务书正文

（一）研究目标和内容

1. 研究目标

（1）通过高温有机溶剂法制备 Fe_3O_4 纳米颗粒并配置不同浓度的载磁性粒子骨水泥，评价不同浓度的载磁性粒子骨水泥的组织特性及生物力学强度。

（2）以 PDX-Model 为研究对象，通过肿瘤内部植入载磁性粒子骨水泥进行干预，预期研究在交变磁场下磁性粒子对多发性骨髓瘤髓外浆细胞瘤的作用效果，探讨作用机制，分析热效应对肿瘤组织血管形成的影响。

（3）通过 TA-Fe 法观察处理后各组 PDX 小鼠肿瘤内部及周围的微血管构筑特点，应用免疫组化技术，检测肿瘤组织内 CD31、CD34 及 VEGF 表达情况，分析热效应对肿瘤组织血管形成的影响。

2. 主要研究内容

（1）高温有机溶剂法制备 Fe_3O_4 纳米颗粒并配置不同浓度载磁性粒子骨水泥，测量其磁性、固化时间、抗压能力、磁场下升温曲线。

（2）将小鼠分为实验组和对照组：实验组 4 组，分别为不同浓度的 NOD/SCID + 载 Fe_3O_4 骨水泥组（5%、10%、15%、20%）；对照组 3 组，分别为 NOD/SCID 空白对照组；NOD/SCID + 单纯骨水泥组；NOD/SCID + 单纯 Fe_3O_4 组。所有小鼠均暴露在 390kHz、22kA/m 的交变磁场中，升温至 46℃ 后维持 30min，分别评估各组的抑瘤效果及作用机制。在种植后 3 天，1 周，2 周，3 周，4 周，6 周，8 周，10 周，12 周，4 月等不同观测时间节点进行测量及用动物 MRI 观察肿瘤生长情况。同时抽取尾静脉血进行化验，检测项目包括 HB，LDH，IL-6 等。

（3）应用 CCK-8 法对肿瘤组织进行细胞增殖率及细胞抑制率的检测。

（4）应用流式细胞仪对处理后各组小鼠肿瘤细胞进行细胞凋亡检测、 CD_4^+ 细胞数量检测及 $\text{CD}_4^+/\text{CD}_8^+$ 细胞比值检测。

（5）应用 Western blot 法对各组小鼠肿瘤细胞进行凋亡相关蛋白检测，测定肿瘤细胞中 Bcl-2、Bax、Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9 凋亡蛋白表达情况。

（6）应用 TA-Fe 法观察处理后各组 PDX 小鼠肿瘤内部及周围的微血管构筑特点。

（7）肿瘤组织免疫组化，测定各组小鼠肿瘤组织切片中的毛细血管特异性标记抗体 CD31、CD34 表达，进行毛细血管密度测定；测定肿瘤内 VEGF 蛋白的表达。计算机图像半定量分析单位面积内 CD31、CD34 及 VEGF 棕色颗粒面积，计算阳性颗粒密度（单位表皮棕色颗粒面积/单位视野表皮面积）。通过对比，分析热效应对肿瘤组织血管形成的影响。

异。

3. 拟解决的关键问题

（1）采用高温有机溶剂法制备 Fe_3O_4 纳米颗粒，评价不同浓度的载磁性粒子骨水泥的组织特性及生物力学强度。

（2）建立多发性骨髓瘤髓外髓外浆细胞瘤小鼠模型，应用 TA-Fe 法直接显示 PDX 小鼠模型肿瘤内部/周围血管形态及分布特点以及微血管构筑。

(3) 采用 CCK-8 法及流式细胞技术评价载磁性粒子骨水泥对多发性骨髓瘤髓外浆细胞瘤小鼠的抑瘤效果，应用 Western blot 法分析作用机制。采用免疫组化法检测肿瘤组织内 CD31、CD34 及 VEGF 表达情况，分析热效应对肿瘤组织血管形成的影响。

BUNSF

(二) 研究方案

1. 研究方案

(1) 高温有机溶剂法制备 Fe_3O_4 纳米颗粒并配置不同浓度载磁性粒子骨水泥，测量其磁性、固化时间、抗压能力、磁场下升温曲线。

(2) NOD/SCID 免疫缺陷小鼠 100 只。将人源性髓外浆细胞瘤肿瘤组织种植于小鼠背部皮下，制作 PDX-model。

(3) 分别在不同时期 1 周，2 周，3 周，4 周，6 周，8 周，10 周，12 周，3 月，4 月等不同时间点用小鼠 MRI 观察测量各组小鼠肿瘤生长情况。在不同观察节点取血样进行生化检测，具体项目包括 HB, LDH IL-6 等。

(4) PDX 模型成功后，NOD/SCID 免疫缺陷小鼠分为 4 个实验组和 3 个对照组，实验组 1：肿瘤内部包埋 PFe-5 后缝合肿瘤，实验组 2：肿瘤内部包埋 PFe-10 后缝合肿瘤，实验组 3：肿瘤内部包埋 PFe-15 后缝合肿瘤，实验组 4：肿瘤内部包埋 PFe-20 后缝合肿瘤；对照组 1：单纯切开后缝合肿瘤组织，对照组 2：肿瘤内部包埋 PMMA 骨水泥后缝合肿瘤，对照组 3：肿瘤内部包埋 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒后缝合肿瘤。将处理后的各组小鼠置于 390kHz、22kA/m 的交变磁场中，监测温度升至 46℃后维持 30min，立即处死所有小鼠并进行下一步实验。

(5) 本部分实验应用 CCK-8 法对处理后的 7 组小鼠的肿瘤组织进行细胞增殖率及细胞抑制率的检测，计算各组细胞抑制率，分析磁性粒子骨水泥的体内抗肿瘤效果。

(6) 应用流式细胞技术对各组小鼠肿瘤组织进行细胞凋亡/坏死检测，并计算各组小鼠肿瘤细胞的 CD_4^+ 细胞数量及 $\text{CD}_4^+/\text{CD}_8^+$ 细胞比值。通过 Western blot 法检测经处理后细胞凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax、Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9 的表达情况，对磁性粒子骨水泥诱导肿瘤细胞凋亡/坏死的通路进行初步分析。

(7) 收集各组肿瘤组织标本，免疫组化染色，观察切片中 CD31、CD34 及 VEGF 表达情况。应用半定量法进行测量。分析热效应对肿瘤细胞血管形成的影响。

2. 技术路线及关键技术

技术路线

(1) 磁性颗粒制备

采用高温有机溶剂法制备 Fe_3O_4 纳米颗粒，所用的试剂：六水合三氯化铁、乙酸铵；称取 1.35g 六水合三氯化铁和 3.85g 乙酸铵加入到 70m L 乙二醇中，快速搅拌均匀后持续搅拌 30min，将其转移至 100m L 反应釜中，于 200℃下反应 12h 后冷却至室温，所得产物分别用无水乙醇和去离子水清洗 3 次，于 80℃ 真空干燥 12h 制得基底 Fe_3O_4 。首使用一锅法将标准化学配比的纳米颗粒生长至 14nm 左右，作为种子备用，然后反复使用种子介导法，最终获得所需尺寸的纳米颗粒。应用能谱仪和透射电子显微镜 (Hitachi HT7700, 日本) 评价磁性纳米颗粒的成分和形貌，应用振动样品磁强计 (GMW MODEL3473-70, 美国) 测量 Fe_3O_4 磁性，重复 3 次并记录数据。

(2) 磁性骨水泥制备

准备 4 组磁性 PMMA 骨水泥，分别为 PFe-5、PFe-10、PFe-15、PFe-20。标准对照组为不添加任何磁性材料的 PMMA 骨水泥标准品，PFe-5、PFe-10、PFe-15、PFe-20 分别为添加 5%、10%、15%、20% 的磁

性纳米颗粒的骨水泥。磁性骨水泥的固液比严格按照临床要求以 2:1 (g: ml) 混合配置。

(3) 磁性骨水泥凝固时间测定

磁性骨水泥样品的凝固时间按照 ISO 5833 标准进行测定。将实验所需的材料于 23℃、相对湿度 40%-50% 环境下放置 2h 以上。将 Fe₃O₄ 磁性纳米颗粒和 MMA 液体放入试管，在超声仪中使磁性纳米颗粒在 MMA 液体中均匀分散后，与 PMMA 粉末混匀，1min 后转移至直径为 6mm、高为 12mm 的圆形模具中。以 30s 为间隔将维卡针（北京亚欧中兴科技有限公司）置于骨水泥表面，以维卡针不陷入骨水泥中且表面未出现明显痕迹的时间计为凝固时间，每个样品重复 3 次，记录数据。

(4) 磁性骨水泥抗压能力测定

磁性骨水泥的抗压强度按照 ISO 5833 标准进行测定。将相应比例的 Fe₃O₄ 磁性纳米颗粒、MMA 液体、PMMA 粉末在坩埚中混匀，1min 后移到直径为 6mm、高为 12mm 的不锈钢圆柱形模具中，在 37℃、相对湿度大于 80% 的环境下等待样品完全凝固。经脱模，砂纸打磨后在室温、标准大气压下利用电子万能测力机（INSTRON，美国）以交叉十字头下降速度为 20mm/min 的条件测量样品的抗压强度。每组样品测量 3 次，记录数据。

(5) 磁性骨水泥体外升温曲线测定

将 4 组制好的直径为 6mm、高为 12mm 的磁性骨水泥样品模型分别放入 390kHz、22kA/m 的交变磁场（MSI AUTOMATION，美国）中，用光纤测温监测系统（Neoptix，加拿大）测量其升温曲线，每组样品测量 3 次，记录数据。

(6) 建立并完善 PDX 小鼠模型

首先于取临床中手术切除新鲜的多发性骨髓瘤髓外浆细胞瘤的肿瘤组织标本，并将肿瘤组织置于胎牛血清+10%DMSO 冻存液中液氮保存。进行组织移植前将肿瘤组织于 37℃ 水浴快速解冻，取约 2×2×2mm 大小，于 NOD/SCID 免疫缺陷小鼠背部皮下移植，通过小鼠 CT 观察肿瘤生长情况，在肿瘤增长至 300mm³ 时，将小鼠处死并切除背部肿瘤组织，应用 HE 染色方法对组织切片进行染色，与原瘤的病理结果进行对比，确认多发性骨髓瘤髓外浆细胞瘤的 PDX 模型维持了原瘤的组织学结构，证明 PDX 模型的建立。用同样方法使用同一人源肿瘤组织在 NOD/SCID 免疫缺陷小鼠制备 PDX 模型。

PDX 建模，肿瘤生长至 300mm³ 时，麻醉小鼠，逐层切开肿瘤组织，按照实验组分组将等体积各浓度组载磁性粒子骨水泥骨水泥置入肿瘤中央，逐层缝合组织，对照组分别单纯切开缝合肿瘤、单纯置入等体积 PMMA 骨水泥以及单纯置入等体积 Fe₃O₄ 磁性粒子。手术完毕后将各组小鼠放入 390kHz、22kA/m 的交变磁场中，测温计测温，当温度达 46℃ 以上时开始计时，30min 后停止，进行下一步检测。

(7) CCK-8 法检测细胞增殖率/抑制率

处理后立即处死小鼠，收集各组肿瘤细胞，稀释密度至 1×10⁵/ml，每孔 100μl 接种于 96 孔板中，设置空白组为加入 125μl RPMI 1640 培养基，将培养板置入培养箱（37℃，5%CO₂）孵育 24h 后，向各孔加入 10μl CCK-8 溶液，继续于培养箱（37℃，5%CO₂）孵育 4h 后，将 96 孔培养板置于酶标仪上检测波长为 450nm 的吸光度（A），记录数据并计算肿瘤细胞增殖率及抑制率。实验重复 3 次。

(8) 流式细胞技术法检测细胞凋亡

收集各组细胞悬液于流式管中，以 1000 r/min 离心 5 min，小心弃去上清液。然后加入 1 ml 4℃ 的 PBS 缓冲液，振荡器低速震荡使细胞悬浮，以 2000 r/min 离心 5 min，小心弃去上清液，此步骤重复两次。将细胞重悬于 300μl 结合缓冲液（1×Binding Buffer）中，并加入 10 μl AnnexinV-FITC，轻轻混匀，避光室温反应 10 min。加入 5μl PI 混匀后室温反应 5min，再向流式管中加入 200μl 1×Binding Buffer，同时另取两个空流式管，各加入 500μl 1×Binding Buffer，其中一个管只加 10 μl AnnexinV-FITC，另一

管只加入 5 μ L PI, 用于调节流式细胞仪荧光补偿, 各组立即进行流式细胞仪检测。光源为 488 nm 氩离子激光器, FITC 受激发后发绿色荧光, PI 发红色荧光。实验结果为四方格图, PI 和 annexin V 分别是 X 和 Y 轴, PI 单染的细胞是已经死亡的细胞, annexin V 单染的细胞是凋亡早期的细胞, 而双染是凋亡晚期的细胞, 因此, 图中左下方格代表无染色的正常细胞百分率, 左上方格代表已死亡细胞百分率, 右上方格代表晚期凋亡/坏死细胞百分率, 右下方格表示早期凋亡细胞百分率。实验重复 3 次, 记录各组细胞凋亡率。另收集各组细胞洗涤后直接上机进行 CD₄⁺细胞数目检测并计算 CD₄⁺/CD₈⁺细胞比值, 重复 3 次。

(9) Western blot 法检测凋亡蛋白

配置细胞裂解液 100 μ L RIPA 裂解液+0.1 μ L 蛋白酶抑制剂, 分别将洗涤后的各组细胞收集于 1.2ml EP 管中, 向各管中加入配置好的细胞裂解液 100 μ L, 快速于 VorTeX 低速震荡混匀 (每 5s 一次, 共震荡 5 次), 用超声波细胞粉碎机处理细胞(160w, 持续 5s, 间隔 5s, 共 5 次), 剪切 DNA, 至溶液不再黏稠。设置离心机 4 $^{\circ}$ C, 12 000 r/min, 离心 10 min, 移液枪小心吸取上清液保留。蛋白质提取过程全程严格冰上操作。按照说明书配置好分离胶和浓缩胶, 取 15% SDS-聚丙烯酰胺凝胶进行电泳。移液枪向各孔加样, 保证各孔蛋白质含量相同, 起始电压为 60V, 当染料进入分离胶后, 提高电压到 120 V, 直至溴酚蓝达分离胶底部, 停止电泳, 转至聚偏二氟乙烯膜 (polyvinylidene fluoride, PVDF) (PVDF 使用前用无水甲醇浸泡 1-2min)。置牛奶封闭液中摇床封闭 2 h。从封闭液中取出 PVDF 膜, 根据凋亡蛋白分子量对照 MARKER 剪膜, 右下角剪角标记, 分别放入洁净密闭小方盒中, 立即加入一定比例稀释的一抗溶液 (Bcl-2 1:500, Bax 1:500, Caspase-3 1: 200, Caspase-8 1:500, Caspase-9 1:500), 4 $^{\circ}$ C 过夜。用 1 \times TBST 洗膜 4 次, 每次 10 min。PVDF 膜置于羊抗兔 IgG 二抗溶液中 (Goat anti-Rabbit IgG (H+L) secondary antibody 1:1000), 放入摇床平缓摇动 2 h。用 1 \times TBST 洗膜 4 次, 每次 10 min。参照 ECL 试剂盒操作步骤进行 ECL 反应, 拍摄分析。

(10) 肿瘤 TA-Fe 法染色

处理后各组实验动物用异氟烷气体吸入麻醉; 立即打开胸腔暴露心脏, 经左心室的升主动脉插管同时剪开右心耳开放右心房; 灌入温生理盐水 (37 $^{\circ}$ C) 40-80ml 快速冲洗, 见右心房流出色较清亮灌洗液后, 立即更换 2%的多聚甲醛和 2%单宁酸的混合媒染固定液 150-200ml 灌注; 固定 2-4 小时后, 解剖, 先肉眼观察肿瘤与周围结构关系, 拍摄记录后再以组织剪剪下小鼠背部肿瘤瘤体, 注意不要破坏包膜; 应用恒温冷冻切片机进行连续切片, 蒸馏水冲洗, 置于 2%氯化铁溶液中呈色 20 分钟, 再经蒸馏水冲洗 3 次; 常规酒精脱水, 二甲苯透明, 贴片。光学显微镜下观察新生血管, 显微摄影拍摄记录。

(11) 免疫组化检测细胞因子

用切片机切片, 取完整组织切片放于 37 $^{\circ}$ C 温水中展片, 取完整组织于载玻片上, 并放入到 67 $^{\circ}$ C 的烤箱中烤 2 个小时, 脱蜡至水, 用 pH7.4 的 PBS 缓冲液冲洗 3 次, 每次 3 分钟。取一定量 pH=6.0 柠檬酸盐缓冲液, 加入微波盒中, 微波加热至沸腾, 将脱蜡水化后的组织切片置于耐高温塑料切片架上, 放入已沸腾的缓冲液中, 中档微波处理 10 分钟, 取出微波盒流水自然冷却, 从缓冲液中取出玻片, 先用蒸馏水冲洗两次, 之后用 PBS 缓冲液冲洗 2 次, 每次 3 分钟。每张切片加 1 滴 3% H_2O_2 , 室温下孵育 10 分钟, 以阻断内源性过氧化物酶的活性。PBS 冲洗 3 次, 每次 3 分钟。去除切片 PBS 缓冲液, 每张切片加 1 滴 CD31、CD34、VEGF 一抗液体 60 μ l (稀释倍数 1:100), 4 $^{\circ}$ C 冰箱孵育过夜。切片 PBS 缓冲液冲洗 3 次, 每次 5 分钟。擦干 PBS 缓冲液液, 每张切片加 1 滴聚合物增强剂, 室温下孵育 20 分钟。PBS 缓冲液冲洗 3 次, 擦干后每张切片加 1 滴酶标抗鼠/兔聚合物, 室温下孵育 30 分钟。PBS 缓冲液冲洗 3 次, 擦干。每张切片加 1 滴新鲜配制的 DAB 液 (二氨基联苯胺), 显微镜下观察 5 分钟。苏木素复染,

0.1% HCl 分化，自来水冲洗，蓝化，切片经梯度酒精脱水干燥，二甲苯透明，中性树胶封固，晾干后观察。

关键技术

(1) 建立并完善人源性多发性骨髓瘤髓外髓外浆细胞瘤小鼠模型：首先于取临床中手术切除新鲜的多发性骨髓瘤髓外浆细胞瘤的肿瘤组织标本，并将肿瘤组织置于胎牛血清+10%DMSO 冻存液中液氮保存。进行组织移植前将肿瘤组织于 37℃ 水浴快速解冻，取约 2×2×2mm 大小，于 NOD/SCID 免疫缺陷小鼠背部皮下移植，通过小鼠 CT 观察肿瘤生长情况，在肿瘤增长至 300mm³ 时，将小鼠处死并切除背部肿瘤组织，应用 HE 染色方法对组织切片进行染色，与原瘤的病理结果进行对比，确认多发性骨髓瘤髓外浆细胞瘤的 PDX 模型维持了原瘤的组织学结构，证明 PDX 模型的建立。并用同样方法使用同一人源肿瘤组织在 NOD/SCID 免疫缺陷小鼠制备 PDX 模型。

(2) 利用高温有机溶剂法制备 Fe₃O₄ 纳米颗粒，应用能谱仪和透射电子显微镜评价磁性纳米颗粒的成分和形貌，应用振动样品磁强计测量 Fe₃O₄ 磁性并按照不同比例配置含 5%、10%、15%、20% 的磁性纳米颗粒的骨水泥。以 ISO 5833 为标准分别测定各组磁性骨水泥的固化时间、温度及生物力学强度。

(3) 应用 CCK-8 法分析磁性粒子骨水泥的体内抗肿瘤效果，应用流式细胞技术及 Western blot 法进行细胞凋亡/坏死检测及凋亡/坏死通路的初步分析。应用免疫组化染色，观察切片中 CD31、CD34 及 VEGF 表达情况，并应用半定量法进行测量。

3. 可行性分析

(1) 前期工作基础：我们多年从事多发性骨髓瘤外科治疗工作，在临床上发现了多发性骨髓瘤髓外浆细胞瘤血管丰富，出血多，预后差，并对磁性粒子骨水泥及多发性骨髓瘤相关资料进行了前期文献调研。并积累了 50 余例新鲜肿瘤组织标本。

(2) 理论依据充分：目前应用于多发性骨髓瘤的人源的小鼠模型极少，已有报道的 SCID-hu 多发性骨髓瘤模型，是利用人类胚胎骨髓注入人多发性骨髓瘤细胞，创造骨髓微环境的人源化小鼠模型，但由于胚胎骨髓不易获取，此模型也不适于研究多发性骨髓瘤髓外浆细胞瘤。人源肿瘤异种移植模型 PDX-model (Patient-Derived Xenograft Model) 是目前常用的一种接近临床实际的一种研究方法，是将肿瘤患者的新鲜肿瘤组织移植到免疫缺陷小鼠体内，肿瘤增殖从而建立的肿瘤模型。PDX 模型保留了原代肿瘤的组织病理以及生长和转移的特性。在多次传代后仍然能够最大程度的保留肿瘤特异性。可以最大程度上反映原始肿瘤细胞及微环境改变。

(3) 实验条件和试验技术具备：本课题申请人所在的北京朝阳医院是集医、教、研、防为一体的三级甲等医院。骨科和血液科是重点科室之一，多发性骨髓瘤的诊治是骨科和血液科的主要特色之一，是北京市多发性骨髓瘤医疗与研究中心。拥有独立血液实验室 2 个、共用血液实验室 4 个。其中浆细胞疾病 M 蛋白鉴定已成为全国的多发性骨髓瘤的临床会诊中心。此外还开展了骨髓染色体检查、荧光原位杂交 (FISH)、干细胞培养及冻存、血小板抗体检测、分子生物学、细胞形态学、流式细胞等多种检查项目。实验条件可以保障完成多发性骨髓瘤患者筛查、细胞分离及培养、细胞增殖及凋亡检测和相关动物实验。合作单位 清华大学药学院具备有顶级的实验设备和标准动物实验所需的各项条件。可以制备在 NOD/SCID 免疫缺陷基础上敲除 VEGF 基因小鼠。

(4) 申请者和项目组成员优势：申请人是临床解剖学和骨肿瘤学方面的专家，尤其擅长多发性骨髓瘤骨病外科治疗，是国际骨髓瘤基金会中国多发性骨髓瘤工作组外科治疗专家委员会的主任委员；中国医药教育学会血液学专业委员会多发性骨髓瘤外科治疗学组的主任委员；中国中西医结合学会骨科分会骨肿瘤专业委员会委员；北京医学会骨科分会骨肿瘤学组委员等学术兼职，有较强的组织及管理能力，已从事骨科及骨肿瘤工作 20 年，完成多发性骨髓瘤骨病手术 200 余例次。课题另一重要成员是清华大学博士后，对动物模型制作有丰富的经验，在全国处于领先地位。高燕在免疫方面具有多项研究，其他人员均是骨科和多发性骨髓瘤专业研究生。课题组成员由高职、中职、博士后、博士生及硕士生组成，人员组成合理，体现了多学科合作。能出色完成此项研究工作。这些课题重要成员均曾经承担过省部级课题，承担并完成国家自然科学基金项目。在骨髓瘤研究方面，课题负责人在国内骨髓瘤骨病外科治疗方面达到国内领先水平，以第一或通讯作者在核心期刊发表骨髓瘤相关文章 11 篇，国际 SCI 文章 4 篇，作为主笔撰写《多发性骨髓瘤骨病外科治疗中国专家共识》。主编《多发性骨髓瘤外科治疗》专著 1 部，参编《多发性骨髓瘤诊疗常规》专著 2 部。相关专利 1 项。研究成果多次在国内骨髓瘤学术会议上交流演讲。

(三) 预期研究结果及可考核的验收指标

(1) 在研究期间将参加 2020 将参加国内和国际骨髓瘤学术会议,并总结撰写高水平论文 3-5 篇发表,其中 SCI 1-2 篇。

(2) 本项目拟申请国内专利 1-2 项。

(3) 本项目的完成将阐明载磁性粒子骨水泥对多发性骨髓瘤髓外浆细胞瘤的抗肿瘤作用机制,为应用载磁性粒子骨水泥治疗多发性骨髓瘤髓外浆细胞瘤提供依据。目前国外已完成载磁性粒子骨水泥对骨肉瘤的体外实验并初步探讨相关作用机制,但尚缺乏载磁性粒子骨水泥对体外 EMP 相关研究,本项目完成后拟填补相关临床空白,为提高临床治疗 EMP 提供新方法。

(4) 本项目拟每一阶段完成相对独立部分后实验立即总结,并在研究过程中发现新问题,及时总结,修正实验。根据各部分实验拟提交载磁性粒子骨水泥生物特性、PDX 小鼠模型建立、载磁性粒子骨水泥对 PDX 模型 EMP 的抗肿瘤效果、载磁性粒子骨水泥对 PDX 模型的细胞凋亡机制及载磁性粒子骨水泥对 PDX 模型肿瘤血管形成的影响等五项研究报告。

(1) 研究生培养

本项目拟培养临床型硕士研究生 2-3 名。

(2) 职称晋升

本项目拟培养晋升副高级职称 2 人。

(四) 年度目标和年度研究计划

第 1 年度 (2019 年)

1、年度目标

收集 30 例多发性骨髓瘤髓外浆细胞瘤组织用于 PDX-model 的制作

收集 30 例多发性骨髓瘤髓外浆细胞瘤组织用于 PDX-model 的制作;制作 10 例人源性共 100 只 PDX-model 模型;利用高温有机溶剂法制备 Fe₃O₄ 纳米颗粒并配置不同浓度的载磁性粒子骨水泥,评价不同浓度的载磁性粒子骨水泥的组织特性及生物力学强度。进行国际学术交流活动 2 次。

2、年度研究计划

第一年初步探索实验条件,制备载磁性粒子骨水泥;制作 10 例人源性共 100 只 PDX-model 模型,用于预实验相关研究,并为后续研究打下基础。

3、年度考核指标

进行国内学术交流活动 2 次。

第 2 年度 (2020 年)

1、年度目标

完成 CCK-8、流式细胞分析实验、免疫组化实验、TA-Fe 实验

完成 PDX 模型观察实验;所取标本进行单宁酸-氯化铁媒染血管,制作切片,完成观察;完成人多发性骨髓瘤髓外浆细胞瘤组织标本中 CD31、CD34 及 VEGF 免疫组化,揭示其规律;应用流式细胞技术分析载磁性粒子骨水泥对 PDX 小鼠模型的抗肿瘤效果。

2、年度研究计划

评价载磁性粒子骨水泥对多发性骨髓瘤髓外浆细胞瘤小鼠抑瘤效果及细胞凋亡的影响,分析各组小鼠肿瘤新生血管与载磁性粒子骨水泥的关系。通过免疫组化分析载磁性粒子骨水泥对肿瘤血管形成

的影响。

3、年度考核指标

进行国际学术交流活动 1 次。

第 3 年度（2021 年）

1、年度目标

完成 Western blot 实验

完成载磁性粒子骨水泥处理后 PDX 小鼠模型髓外浆细胞瘤的细胞凋亡蛋白的测定，分析凋亡通路。

2、年度研究计划

总结三年的实验结果，2021 年 10 月结题

3、年度考核指标

进行国际学术交流活动 1 次；撰写论文 SCI 2-3 篇。

三、研究项目组成员登记表（含负责人）

序号	姓名	出生日期	专业技术职务 (职称)	最高 学位	专业	项目分工	年工作月 数	工作单位
1	杜心如	1965-05-08	教授	博士	骨科	参与基础实验	4	首都医科大学附属北京朝阳 医院
2	要星辰	1991-12-16	医师	硕士	外科学	进行基础实验	10	首都医科大学附属北京朝阳 医院
3	史湘君	1988-09-26	在读博士生	硕士	药学	参与动物建模实验	6	清华大学
4	徐子彧	1981-03-04	主治医师	学士	骨科	参与基础实验	6	首都医科大学附属北京朝阳 医院
5	魏彦哲	1992-01-13	在读硕士生	学士	外科学	参与基础实验	10	首都医科大学附属北京朝阳 医院
6	齐磊	1993-02-08	在读硕士生	学士	外科学	参与基础实验	10	首都医科大学附属北京朝阳 医院

总人数	高级	中级	初级	博士后	博士生	硕士生	参加单位数
6	1	1	1	0	1	2	2

说明：高级、中级、初级、博士后、博士生、硕士生人员数、参加单位数由申请者负责填报（含申请者），总人数自动生成。

四、项目经费使用计划

单位：万元

资助总金额		20	
	支出科目	金额	支出内容及计算依据
直接费用	1、设备费	0	
	(1) 设备购置费	0	本研究所需设备实验室已具备，无需外购
	(2) 其他设备费	0	本研究所需设备实验室已具备，无需外购
	2、材料费	12	NOD/SCID 小鼠 250 元/只×100，共 2.50 万元；小鼠饲养费 10 元/笼/天，共 3.00 万元。组织保存及细胞培养耗材、小鼠操作器械 4.10 万元。购买实验抗体 0.30 万元/瓶×8，共计 2.40 万元
	3、测试化验加工费	2	支付给外院单位的标本制作、TA-Fe 检测、荧光显微镜检测等费用 2.00 万元
	4、燃料动力费	0	承担单位为课题研究提供项目实施过程中直接使用的相关仪器设备、科学装置等运行发生的水、电、气、燃料消耗费用等
	5、差旅费	0.8	国际国内会议 2 人次，0.40 万元/人次，共计 0.80 万元
	6、会议费	0.4	国际国内会议 2 人次，0.20 万元/人次，共计 0.40 万元
	7、国际合作与交流费	0.4	国际交流 2 人次，0.20 万元/人次，共计 0.40 万元
	8、档案/出版/文献/信息传播/知识产权事务费	1	发表论文 0.50 万元/篇，SCI2 篇，共计 1.00 万元
	9、劳务费	1.8	支付给参与项目研究的研究生劳务费用，200 元/月×3 人×10 月×3 年，共计 1.80 万元
	10、咨询费	0.6	项目研究过程中支付给临时聘请的咨询专家的费用，0.20 万元/人次×3，共计 0.60 万元
	11、其他费用	0	承担单位为本课题研究提供办公耗材等其他支出费用
间接费用	12、绩效支出	0	
	13、其他费用	1	科研管理费、审计费，共计 1.00 万元

五、项目负责人承诺书

我代表研究团队承诺：

（一）承诺本项目研究内容未获其他项目经费支持，也不用该项目内容再申请其他项目。

（二）承诺按本任务书中相关内容，负责实施本项目。遵守北京市自然科学基金的有关管理规定，保证研究工作时间，认真开展研究工作，按规定报送项目进展报告、验收报告等相关材料。发生重大情况变动时，及时报告。

（三）项目经费使用应按照《北京市自然科学基金资助项目经费管理办法》及依托单位相关管理规定执行。

（四）公开发表的论著、论文等相关资料涉及本资助项目内容时，按规定标注“北京市自然科学基金资助”（英文：Supported by Beijing Natural Science Foundation）及项目编号，其中第一标注论文的数量应在 1 篇以上。

项目负责人（签字）：

六、共同条款

甲方（北京市自然科学基金委员会办公室）、乙方（资助项目依托单位）、丙方（资助项目合作单位）共同遵守以下条款：

1、甲方按照北京市自然科学基金的有关管理规定对资助项目予以管理。依照经费管理办法及任务书的规定向项目依托单位核拨项目经费；项目实施过程中对项目实施情况进行检查，必要时可进行实地调研；资助期满后，根据验收评审专家的意见，给出验收结论并书面通知依托单位和项目负责人。

2、乙、丙双方须遵守北京市自然科学基金的有关管理规定，保证项目负责人及其研究队伍的稳定和项目实施所需研究条件，协助甲方进行项目中期管理和验收工作。

3、乙、丙双方应按本任务书规定的内容保证整体目标按时完成。

4、乙、丙双方应按照资助项目经费管理办法的规定，监督项目经费的使用。

5、本任务书自各方签字盖章之日起生效。

如合作单位为多方时，合作单位各方均应执行任务书中有关丙方的条款。

七、任务书各方签字

甲 方	单位名称	北京市自然科学基金委员会办公室			北京市自然科学基金 委员会办公室 年 月 日	
	单位负责人	(签字)				
	部门负责人	(签字)				
	项目主管	(签字)				
	地 址	北京市西城区广莲路 1 号建工大厦 B 座				
	邮政编码	100195				
	电 话		传 真			
	电子信箱					
乙 方	单位名称	首都医科大学附属北京朝阳医院			单位公章 年 月 日 财务章 (预留银行印鉴)	
	统一社会信用代码	121100004006863122				
	地 址	北京市朝阳区工体南路 8 号				
	邮政编码	100020				
	联系人	赵离钟	电 话	85231217		
	手 机	13021135322	传 真	85231217		
	电子信箱	keyan@bjcyh.com				
	帐户名称	首都医科大学附属北京朝阳医院				
	开户银行	北京银行建国支行				
	帐 号	01090329400120109005780				
	单位负责人	(签字)				
	项目负责人	(签字)				
	财务负责人	(签字)				
丙 方	合作单位 1		合作单位 2		合作单位 3	
	单位负责人		单位负责人		单位负责人	
	单位公章： 年 月 日		单位公章： 年 月 日		单位公章： 年 月 日	