

22

浙江省医药卫生科技计划项目

合 同 书

计划类别:	☐ 省部共建计划
	☐ 平台计划
	☒ 青年人才计划
	☐ 面上项目计划
	☐ 新技术适宜技术推广计划
课题名称:	BMMSCs外泌体通过Nrf2/HO-1轴改善小鼠移植胰岛功能及其机制研究
申 请 者:	李超
申请单位:	浙江大学医学院附属第二医院
联系手机:	15088608802
申请日期:	2018-08-05

浙江省卫计委
二〇一二年制

一、项目情况

项目名称	BMS6a外泌体通过Nrf2/HO-1轴改善小鼠移植胰岛功能及其机制研究					
研究类别	临床课题名称	已有				
		研究课题名称		已有		
	研究级别			已有	课题名称	
	申报学科	临床医学—内分泌学				
开始日期	2019-01	完成日期	2021-12			
项目经费预算 (万元)						
总计	向省卫生计生委申报	市卫生计生委	县卫生计生委	单位配套	其他	
3.0	0.0	0.0	0.0	3.0	0.0	
专项项目经费开支预算 (万元)		项目配套经费开支预算 (万元)				
设备费	0.0	设备费	0.0			
材料费	0.0	材料费	2.5			
试验化验加工费	0.0	试验化验加工费	0.5			

燃料动力费	0.0	燃料动力费	0.0
差旅费	0.0	差旅费	0.0
人员劳务费	0.0	人员劳务费	0.0
外拨费用	0.0	外拨费用	0.0
合作、协作研究与交流费	0.0	合作、协作研究与交流费	0.0
出版/文献/信息传播知识产权事务费	0.0	出版/文献/信息传播知识产权事务费	0.0
会议费	0.0	会议费	0.0
管理费	0.0	管理费	0.0
专家咨询费	0.0	专家咨询费	0.0
其他开支	0.0	其他开支	0.0
合计	0.0	合计	3.0

预计成果			
定量指标			
预期形成的成果适用范围	糖尿病		
预期形成的成果适用范围	药物		
预期成果的临床获益效果	提高生存率, 提高生活质量		
是否形成技术标准和诊疗方案	否		
发明专利	实用新型专利	外观设计专利	软件著作权
0	0	0	0
论文数	其中SCI数	著作数	新产品
1	1	0	0
技术标准	培养硕士数	培养博士数	
0	0	0	
定性指标			
预期目标1	明确BMS6a外泌体改善体内外小鼠胰岛功能的能力。		
预期目标2	初步论证并阐明BMS6a外泌体改善小鼠胰岛功能的分子机制, 特别是PI3K/AKT和ERK1/2信号通路激活的Nrf2/HO-1蛋白介导的抗氧化应激途径在该过程中的重要作用。		
预期目标3	本研究预期发表SCI论文1篇, 相关研究成果参加高水平学术会议1次。		
预期目标4			
预期目标5			

二、承担单位

第一申请单位			
单位名称	浙江大学医学院附属第二医院		
通讯地址	杭州市解放路58号	邮编	310009
联系电话	87783914	联系人	刘佳妍
合作单位			
序号	单位名称	联系人	联系电话
1	浙江省人民医院	袁毅	85893677
2			
3			
4			
5			

七、 本课题相关内容的已有研究成果情况

- 一、 日前主持或参加科研项目情况：
1. 国家自然科学基金青年科学基金项目，81706682，CD97/Ngn3轴在胞外囊泡促BMSCs分化为胰岛β样细胞中的调控作用研究，2018/01-2020/12.20万，在研，主持；
 2. 国家自然科学基金面上项目，81570698，靶向GLP-1受体的抗体类似蛋白质-SPIO造剂的制备及其在移植胰岛及靶向治疗中的研究，2016/01-2019/12，58万，在研，参加；
- 二、 期刊论文
1. 第一作者论文
 - (1) Li Chao(✉), Yang Bin, Zhihao Xu, Eric Boivin, Mazzen Black, Wenlong Huang, Baoyou Xu, Ping Wu, Bo Zhang, Xian Li, Kunsong Chen, Yulian Wu (✉) and Gina R Rayat (✉), Protective effect of cyanidin-3-O-glucoside on neonatal porcine islets, *J Endocrinol.* 2017 Dec;235(3):237-249.
 - (2) Li, Chao(✉), Liu, Da-Ren(✉), Li, Guo-Gang, Wang, Hou-Heng, Li, Xiao-Wen, Zhang, Wei, Wu, Yu-Lia (✉), Chen, Li, CD97 promotes gastric cancer cell proliferation and invasion through exosome-mediated MAPK signaling pathway, *World J Gastroenterol.* 2015.5.28, 21 (20): 6215-6228
 - (3) Liu, Daren(✉), Li, Chao(✉), Trojanowicz, Bogusz, Li, Xiaowen, Shi, Dihe, Zhan, Chenni, Wang, Zhifang, Chen, Li(✉), CD97 promotion of gastric carcinoma lymphatic metastasis is exosome dependent., *Gastric Cancer.* 2016.7.01, 19 (3): 754-766
 - (4) Qin, Wenjie(✉), Li, Chao (✉), Zheng, Wen (✉), Guo, Qingqu, Zhang, Yufeng, Kang, Muxing, Zhang, Bo, Yang, Bin, Li, Baozhong, Yang, Haijun, Wu, Yulian(✉), Inhibition of autophagy promotes metastasis and glycolysis by inducing ROS in gastric cancer cells., *Oncotarget.* 2015.11.24, 6 (37): 59899-59954
2. 第一作者论文 (口头报告论文)
- Li, Chao(✉), Yang, Bin, Xu, Zhihao, Li, Xian, Chen, Kunsong, Ray V Rajotte, Wu, Yulian(✉), Gina R. Rayat(✉), Protective Effect of Cyanidin-3-O-Glucoside on Xenotransplanted Neonatal Porcine Islets via ERK1/2 and PI3K/Akt-induced Nrf2-mediated H01 Induction, Joint Congress of the International Pancreas and Islet Transplant Association (IPITA), the International Xenotransplantation Association (IXA) and the Cell Transplant Society (CTS), 墨尔本, 2015.11.15-2015.11.19
3. 署名文章论文:
- 包括 Overexpression of HSPA1A enhances the osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells via activation of the Wnt/beta-catenin signaling pathway., *Sci Rep.* 2016.6.9, 6: 27622-27622 等, 共计6篇。

八、 附件信息

是否有查新检索报告:	☐ 是 ☒ 否
是否使用实验动物:	☒ 是 ☐ 否
是否涉及伦理问题:	☐ 是 ☒ 否
是否涉及实验室生物安全:	☒ 是 ☐ 否
是否涉及干细胞:	☒ 是 ☐ 否
是否是临床前新技术研究:	☒ 是 ☐ 否
是否涉及病毒研究:	☐ 是 ☒ 否

创新点:

T1DM是严重威胁人类健康的疾病，胰岛移植是治疗T1DM最有前景的方法之一。胰岛移植后的原发性移植失败是阻碍胰岛移植大规模临床应用的关键。本项目将从BMSCs外泌体改善胰岛移植功能这个新观点，探讨利用BMSCs外泌体改善胰岛移植早期失功能这个观点的可行性，预期将在提高胰岛移植效率的应用基础研究上有所突破。本项目的实施将有助于我们探索新的胰岛移植功能保护策略，有望为干细胞能够真正应用于临床胰岛移植提供一定的科学依据。

六、 前期工作说明

- 1、已开展的与课题相关的工作及其业绩
- 项目申请者长期从事糖尿病治疗的基础和临床研究，尤其是在干细胞治疗糖尿病、胰岛移植治疗T1DM等方面，均具有较好的研究工作经历。曾作为访问学者在加拿大阿尔伯塔大学接受良好的科研训练，具有严谨的科研思维，较强的创新能力和扎实的细胞生物学、分子生物学和胰岛移植等领域的理论和实验技术基础。近年来，申请者围绕上述主题主持国家自然科学基金青年基金一项，以第一作者或共同第一作者发表SCI论文5篇，国际会议论文1篇，以合作作者发表SCI论文7篇，作国际会议口头演讲一次。同时，申请者是国际移植协会 (TTS) 和国际胰腺和胰岛移植协会 (IPITA) 会员，曾两次参加TTS主办的国际性学术大会 (1、2016年8.18-8.23, 香港, 26th International Congress of the Transplantation Society, 以Co-Chair身份主持Organ Donation Research分会会议; 2、2015年11.15-11.19, 墨尔本, Joint Congress of the International Pancreas and Islet Transplant Association (IPITA), the International Xenotransplantation Association (IXA) and the Cell Transplant Society (CTS), 做oral presentation. 研究成果获得国际同行的极大关注，并获得国际移植协会 (TTS) 和国际胰腺和胰岛移植协会 (IPITA) 联合颁发的Scientific Award (和 \$1,000奖金)。此外申请者学术思维活跃，擅长学术交流与分享，是《中国普通外科杂志》中青年编委，组织能力较强，有能力协调该项目的顺利实施。本项目组成员均具有丰富的干细胞或糖尿病研究经历，多人获得省卫计委动物实验培训资质证书，在小鼠胰岛的分离和纯化、糖尿病小鼠模型的构建等方面积累了丰富的经验，具有扎实的科研理论和实践基础，严谨的科研作风，可确保项目顺利实施。
- 本项目已获相关预实验结果如下 (以下数据均未发表)：
- (1) 已成功分离并培养小鼠胰岛；
- (2) 已成功提取小鼠BMSCs并鉴定：从B6 rag1-/-小鼠骨髓中提取BMSCs，流式细胞术显示该细胞表达干细胞特征性分子CD29、CD105、CD90，不表达CD34、CD45、CD31，说明所提取的BMSCs具有较高的纯度。
- (3) 已成功提取BMSCs外泌体并鉴定：从BMSCs细胞中提取的外泌体在透射电镜 (TEM) 下均呈双层球状结构，动态光散射 (DLS) 检测提示囊泡的粒径分布分别集中于30-100 nm; Western blot 显示提取的Exos表达外泌体特征蛋白Alb11s、CD81和TSG1。
- (4) 已明确不同浓度BMSCs外泌体对小鼠胰岛活性的影响：为观察不同浓度BMSCs外泌体对小鼠胰岛活性的影响，我们用含不同浓度外泌体的培养基分别培养胰岛48 h，然后将其分散成单个细胞后用台盼蓝染色和流式分析技术分别比较不同胰岛细胞间的存活率。台盼蓝染色实验表明，未经花青苷孵育的胰岛细胞48 h后的细胞存活率为48.37%，在外泌体浓度为0.5 μ g/ml到2.0 μ g/ml之间时，经孵育的胰岛细胞存活率升高，并呈现浓度依赖性效应。其中经0.5 μ g/ml和2.0 μ g/ml 外泌体孵育的胰岛细胞存活率分别为63.84%和69.62%，两者与未孵育组具有显著的统计学差异 ($p < 0.05$)。
- (5) 已明确BMSCs外泌体具有增强小鼠胰岛抵抗H2O2诱导的体外氧化应激损伤的能力：为进一步验证BMSCs外泌体对小鼠胰岛的保护作用，我们用含或不含0.1 μ g/ml、0.5 μ g/ml和2.0 μ g/ml的BMSCs外泌体培养基预先孵育小鼠胰岛48 h，然后将培养基替换成含0.5 mM H2O2的新鲜培养基继续培养6 h。培养结束后收集胰岛，用流式细胞术检测其活性。流式结果表明与正常对照组相比，只接受H2O2孵育的胰岛细胞活性只有7.24%，而在接受H2O2孵育前经2.0 μ g/ml BMSCs外泌体孵育的胰岛活性较外泌体未处理组明显升高 (图9)。以上结果说明BMSCs外泌体具有强大的保护小鼠胰岛能力，这种能力或与其提高胰岛细胞抗氧化应激能力相关。

五、项目基本情况

研究内容

本项目拟从以下两方面开展研究：

(1) 探索小鼠BMSCs外泌体改善小鼠胰岛功能的能力

以小鼠成纤维细胞为阴性对照，研究B6 ragl^{-/-}小鼠来源的BMSCs外泌体增强体外小鼠胰岛活性的能力，并评价其对体外小鼠胰岛胰岛素释放功能的影响；构建免疫缺陷糖尿病小鼠胰岛移植模型，通过尾静脉注射BMSCs外泌体，观察胰岛移植对糖尿病小鼠血糖的调控能力；进行腹腔葡萄糖耐量试验（Intraperitoneal Glucose Tolerance Test, IPGTT）测定胰岛移植对小鼠血糖变化的调控能力；检测移植后小鼠胰岛内的胰岛素含量及胰岛相关标志蛋白insulin和glucagon的表达水平，由此综合评价BMSCs外泌体对移植胰岛功能的影响。

(2) 探索BMSCs外泌体通过抗氧化应激途径改善小鼠胰岛功能的可能机制

构建体外小鼠胰岛移植模型，用不同浓度的BMSCs外泌体移植小鼠胰岛，观察其对小鼠胰岛活性及胰岛素释放能力的影响；检测不同BMSCs外泌体移植的小鼠胰岛细胞内PI3K/AKT, ERK1/2, Nrf2和HO-1等通路或蛋白的表达情况，用相关通路抑制剂阻断相关通路，再次检测BMSCs外泌体对小鼠胰岛的保护功能。

研究方法

第一部分：探索BMSCs来源的外泌体改善体内小鼠胰岛功能的能力

(1) 小鼠BMSCs的提取和鉴定

采用全骨髓冲洗法获取B6 ragl^{-/-}小鼠BMSCs并培养，流式细胞术检测培养细胞的CD29, CD105, CD90, CD34, CD45和CD31等蛋白的表达，以鉴定所得干细胞的纯度，用三系分化实验验证所获干细胞的分化潜能。

(2) BMSCs外泌体的分离和鉴定

1) BMSCs外泌体的分离
分别培养常規小鼠BMSCs细胞，待细胞长至80%满时，加无血清培养基继续培养48 h后收集上清，过滤除去细胞碎片后，经差速离心法分别获取外泌体。

2) 外泌体鉴定

通过透射电镜（Transmission Electron Microscope, TEM）观察所获囊泡的形态和大小，通过动态光散射技术（Dynamic Light Scattering, DLS）测定所获囊泡在水相中的粒径分布，通过Western blot分析外泌体表面特征性标志物Alix, CD81, TSG101等蛋白的表达。

(3) 不同浓度的BMSCs外泌体对小鼠胰岛的保护功能比较

1) 小鼠胰岛细胞提取外泌体的验证

将BMSCs外泌体用PKH67标记后，与小鼠胰岛细胞共培养24 h，离心洗涤后置于荧光显微镜下，观察靶细胞对外泌体的摄取及其在细胞内的分布。

2) BMSCs外泌体促进小鼠胰岛体外存活能力比较

将不同浓度的BMSCs外泌体与小鼠胰岛共培养48 h，用台盼兰染色法及流式技术检测小鼠胰岛存活率。

3) 不同BMSCs外泌体移植的小鼠胰岛分泌胰岛素能力的测定

用不同浓度的BMSCs外泌体与小鼠胰岛细胞共培养48 h，用免疫荧光法测定小鼠胰岛内的胰岛素（insulin）及C肽（C-peptide）含量。

(4) 不同BMSCs外泌体对肾包膜下移植胰岛的糖尿病小鼠血糖调控能力比较

1) 免疫缺陷糖尿病小鼠模型的构建

本研究使用6-8周龄的雄性免疫缺陷小鼠B6 ragl^{-/-}作为移植受体，于移植前5天经腹腔注射180 mg/kg链脲菌素（streptozotocin, STZ）构建糖尿病小鼠模型。经尾静脉监测小鼠血糖水平，测得连续两次空腹血糖 ≥ 18 mmol/L即可认为模型制作成功。造模后将糖尿病小鼠随机分为4组，每组6只。

2) 糖尿病小鼠BMSCs移植模型构建及其对血糖

三、项目组成员

负责人					
姓名	李超	身份证号	330825198804043510		
出生年月	1988-04-04	手机	1508608802		
职务	主治医师	专业	普通外科学		
学历	博士	学位	博士		
工作单位	浙江大学医学院附属第二医院				
其他成员					
序号	姓名	出生年月	职称	工作单位	项目分工
1	李超	1988-04-04	主治医师	浙江大学医学院附属第二医院	实验总体设计，动物实验，数据收集与分析
2	蔡娟娟	1986-09-30	技师	浙江省人民医院	免疫组化染色，协助动物实验
3	周凡	1967-12-26	副主任医师	浙江大学医学院附属第二医院	动物模型构建及胰岛移植
4	何晓曼	1994-09-20	研究生	浙江大学医学院附属第二医院	胰岛培养及体外实验
5	陈霄	1991-02-14	研究生	浙江大学医学院附属第二医院	western blot及流式分析

四、计划进度

2019年1月-2019年12月：

获取小鼠BMSCs并鉴定；提取BMSCs外泌体并鉴定；明确BMSCs外泌体对体外培养的小鼠胰岛的保护能力；探讨BMSCs外泌体对小鼠胰岛抵抗体外氧化应激的能力。

2020年1月-2020年12月：

构建小鼠胰岛肾包膜下移植模型，探讨BMSCs外泌体对小鼠胰岛移植功能的影响；分析BMSCs外泌体对PI3K/AKT, ERK1/2信号通路及其下游Nrf2和HO-1蛋白表达的影响；探讨相关通路抑制剂对小鼠胰岛抗氧化应激能力的影响；收集、整理、分析数据。

2021年1月-2021年12月：

完成小鼠胰岛移植模型本体的免疫染色分析；汇总数据，分析结果，撰写学术论文；参加学术会议，交流研究成果，完成项目总结。

九、承诺书 本单位（或个人）承诺： 本申请书中所填写的内容和资料真实、有效，如存在弄虚作假与事实相违背的内容，由本单位（个人）承担全部责任。 项目负责人（盖章）：[Signature] 2018年10月27日	科研诚信承诺书 (模板) 本项目申报人及课题组成员承诺： 我们承诺本申请书中所填写的内容和资料真实，不存在虚假造假和学术不端行为，符合国家《关于进一步加强科研诚信建设的若干意见》的规定，如有违背，由本项目申报人及课题组成员承担全部责任。 [Signatures] 何晓星 项目负责人及所有成员签字 2018年7月30日 学术委员会意见： 我们已根据国家《关于进一步加强科研诚信建设的若干意见》和单位项目申报与学术诚信有关规定，对项目申请人和课题组成员申请情况进行了认真核实，同时承诺在项目实施过程中做好监督，杜绝发生学术不端行为。 学术委员会负责人签字：[Signature] 2018年7月30日
十、单位审核意见 申报单位意见： 浙江中医药大学附属医院 [Signature] 2018年10月24日 上级主管部门意见： 同意 [Signature] 2018年10月24日	
十一、省卫计委终审意见 省卫计委审核意见： 同意列入省医药卫生青年人才项目， 请单位予以经费配套。 省卫计委（盖章）：[Stamp] 2018年10月24日	

	项目合作单位 单位名称：浙江省人民医院 单位盖章：[Stamp] 2018年10月24日 联系人：袁毅
--	---

医学实验动物证明

课题名称	BMMSCs外泌体通过Nrf2/HO-1轴改善小鼠移植胰岛功能及其机制研究
课题负责人	李超
负责人动物实验培训合格证	院外培训
课题承担单位	浙江大学医学院附属第二医院
实验动物名称	C57BL/6-rag1tm1/mom
实验动物级别	☐ 普通级 (CV) ☐ 清洁级 (CL) ☒ 无特殊病原体级 (SPF) ☐ 无菌动物级 (GF)
动物提供单位	上海斯莱克实验动物有限责任公司
动物生产许可证号	SCXK (浙) 2017-0005
动物实验操作场所	☒ 本单位内完成 ☐ 委托外单位完成
动物使用许可证号	SYXX (浙) 2015-0010
动物实验具体地点	杭州市上城区马市街3号
实验操作人员名单	蔡娟娟;
动物实验培训合格证	院外培训;
实验场所所在单位意见:	

经核实, 上述情况属实!

实验场所所在单位科教部门盖章



2015年0月22日