

申报编号: 22ZDYF1334

立项编号: 2022YFS0284

四川省科技计划项目 任务书 (重点研发项目)

MAT2A抑制剂在牙釉质发育缺陷治疗中的应用潜能研

项目名称: 究

承担单位: 四川大学华西口腔医院 (盖章)

项目负责人: (签字)

推荐单位: 四川大学

立项经费: 20 (万元)

项目起止年限: 2022-01-01 至 2023-12-31

四川省科学技术厅制

任务书填写和打印说明

1. 填写任务书各项内容应实事求是，认真填写，表述明确。外来语要同时用原文和中文表达，第一次出现的缩略词，须注明全称。

2. 任务书各个部分都必须填写，原则上不能有空白；确实无法填写的内容，请填“无”或“0”。

3. 任务书是项目牵头单位向合作单位拨经费、中期检查、绩效评价（验收）的依据。任务书的内容应参照项目申报书填写，各项指标不能调减，可以调增。

4. 任务书必须通过四川省科技信息管理系统在线填写、上报，并经承担单位、推荐单位和四川省科技厅审核通过后签订，必须确保网上的四川省科技信息管理系统的电子文档与最终打印稿一致。

5. 项目负责人将任务书打印一式四份纸质文档，A4纸，左侧装订，不得加用塑料等额外装订材料。由承担单位和推荐单位审核签署意见并加盖公章后，报送四川省科技厅相关处室进行纸质文档和网上的审核签署。纸质文档盖“四川省科学技术厅科研项目合同专用章”后，四川省科技厅存档一份，另三份返项目单位归档（推荐单位一份、承担单位一份、项目负责人一份）。

6. 任务书是四川省科技厅与项目承担各方的约束性文本，其中四川省科技厅为甲方，项目承担单位为乙方，推荐单位为丙方。任务书受《四川省科技计划项目管理办法》、《四川省科技计划项目专项资金管理办法》等相关管理制度保护，由四川省科技厅负责解释。



一、项目信息表

项目名称	MAT2A抑制剂在牙釉质发育缺陷治疗中的应用潜能研究		
起始时间	2022-01-01	终止时间	2023-12-31
知识产权	☒ 申报单位独占 ☐ 相关单位共享		

第一承担单位

单位名称	四川大学华西口腔医院	社会信用代码	12510000450755937Y
单位地址	成都市人民南路三段14号	邮编	610041
职工人数	1000 人	单位性质	
单位负责人	叶玲	推荐单位	四川大学
联系人	陈凯	联系部门	
联系人手机	13980653988	联系人电话	028-85502415

科研（财务）助理

姓名	贺鹏程	身份证号	50023#####016
手机号	15923179848	工作单位	四川大学华西口腔医院

合作单位

社会信用代码	单位名称	在本项目中分工

项目负责人

姓名	万冕	性别	女	出生年月	1988-10-16
学历/学位	博士/ 博士	职称	讲师	手机	13980842684
从事专业	口腔医学				

项目组人数

项目组人数	总计__7__人，其中：高级职称__0__人， 中级职称__3__人，初级职称__0__人，其他__4__人。
-------	---

项目概述

牙釉质是覆盖于牙齿表面坚硬的矿化组织，行使咀嚼、保护和美观等功能。发育过程中任何信号的干扰和突变都可能导致DDE。患牙未及时发现或未正确处理则会造成恒牙早失或间隙改变，甚至对患儿的牙合及颌面部发育产生不利影响。其



发病率逐年上升，且因诊断标准、人群数量、年龄范围及国家和地区不同而差异较大。大量环境因素已被证实与DDE的发生密切相关。但环境因素致釉质发育缺陷的机制尚不明确，其内在分子机制的探究也鲜有报道，这限制了DDE防治措施的开发。目前临床中DDE的主要治疗方法仍然是充填治疗。然而在治疗过程中，DDE患牙存在充填治疗效果不佳，长期预后差，敏感性高和不易麻醉等问题。DDE带来了巨大的社会问题及病患经济负担。本课题组前期实验结果显示MAT2A介导的甲硫氨酸代谢循环，H3K27me3修饰与DDE发生发展密切相关，环境暴露可致DESCs异常增殖，MAT2A过表达及H3K27me3修饰水平上升。FIDAS-5及AG-270作为MAT2A抑制剂，对MAT2A的过表达均表现出了显著的抑制作用。已有研究指出MAT2A抑制剂在肿瘤的防治中具有较好的前景，但对于DDE的疗效不甚明确。本项目立足于课题组前期工作基础，并充分查阅文献，探索MAT2A抑制剂对环境暴露下DESCs动力学行为的影响；分析MAT2A抑制剂影响环境暴露下MAT2A介导的甲硫氨酸代谢循环与H3K27me3修饰的表观遗传学机制；探究MAT2A抑制剂对小鼠切牙牙釉质发育的影响，揭示其在DDE防治中的应用潜能。



二、项目研究主要目标、研究内容、技术关键、技术路线和应用方案。(不超过3000 字)

1.主要研究目标

环境暴露所致的 DDE 因高发病率及对口腔健康、颌面部发育的严重影响而成为社会广泛关注的公共健康问题。其发展机制及防治措施一直是口腔生物医学研究的热点之一。本课题组前期实验结果显示 MAT2A 介导的甲硫氨酸代谢循环, H3K27me3 修饰与 DDE 发生发展密切相关,环境暴露可致 DESCs 异常增殖, MAT2A 过表达及 H3K27me3 修饰水平上升。FIDAS-5 及 AG-270 作为 MAT2A 抑制剂,对 MAT2A 的过表达均表现出了显著的抑制作用。已有研究指出 MAT2A 抑制剂在肿瘤的防治中具有较好的前景,但对于 DDE 的疗效不甚明确。本课题拟探究 MAT2A 抑制剂在 DDE 防治中的应用潜能,并初步探讨其作用机制。本项目的主要研究目标为:

- 1) 探索 MAT2A 抑制剂对环境暴露下 DESCs 动力学行为的影响。
- 2) 分析 MAT2A 抑制剂影响环境暴露下 DESCs 动力学行为的表观遗传学机制。
- 3) 探究 MAT2A 抑制剂对小鼠切牙牙釉质发育的影响,揭示其在 DDE 防治中的应用潜能。

2.研究内容

本项目的研究内容主要包括以下三个方面:

- 1) 分析 MAT2A 抑制剂对环境暴露下 DESCs 动力学行为的影响。本部分实验利用双酚 A (bisphenol A, BPA) 染毒模拟环境暴露下的 DESCs, MAT2A 抑制剂处理 BPA 染毒的 DESCs,检测其对 DESCs 增殖分化的影响,确定 MAT2A 抑制剂对 DESCs 命运选择的调控作用。具体包括:
 - a. 体外培养小鼠 DESCs, BPA 染毒: 检测牙釉质发育关键基因, MAT2A 表达水平及组蛋白甲基化 (H3K27me3) 修饰水平,确定成功模拟环境暴露下 DESCs;
 - b. MAT2A 抑制剂处理 BPA 染毒 DESCs: 检测 BPA+MAT2A 抑制剂联合处理组细胞的增殖分化相关基因及蛋白的表达水平,克隆形成能力及增殖活性,明确 MAT2A 抑制剂对 BPA 处理 DESCs 高增殖低分化的抑制作用。
- 2) 研究 MAT2A 介导的甲硫氨酸代谢循环与组蛋白甲基化修饰交互作用调控环境暴露下 DESCs 动力学行为的表观遗传学机制。本部分实验基于前述的体外实验结果,进一步探究 MAT2A 抑制剂特异性抑制 MAT2A 过表达及 SAM 合成,下调 DESCs 增殖分化关键基因启动子区 H3K27me3 修饰水平,进而解除增殖分化关键基因的转录抑制,最终抑制 DESCs 的增殖活性并启动分化进程的表观遗传调控机制。具体包括:



a. 体外培养 DESCs, MAT2A 抑制剂处理 BPA 染毒 DESCs: 检测 MAT2A, SAM 水平与其直接调控的下游基因/蛋白的表达水平, 以及 H3K27me3 修饰达水平;

b. ChIP-qPCR 检测 H3K27me3 及 EZH2 在 DESCs 关键基因启动子区富集水平的变化, 分析 MAT2A 介导的甲硫氨酸代谢循环与 EZH2 介导的 H3K27me3 修饰的相关性。

3) 探究 MAT2A 抑制剂在牙釉质发育缺陷中的防治潜能。本部分实验利用 BPA 染毒构建 DDE 小鼠模型, 检测切牙上皮组织全基因组 H3K27me3 富集水平、MAT2A 及牙釉质形成关键基因的表达水平, 分析 MAT2A 介导的甲硫氨酸代谢循环与基因启动子区 H3K27me3 修饰水平的相关性, 确定 MAT2A 在牙釉质发育过程中的调控作用。具体包括:

a. 孕鼠 BPA 染毒, 构建 DDE 模型小鼠: microCT 及扫描电镜确定 DDE 模型构建成功;

b. MAT2A 抑制剂处理 DDE 模型小鼠: microCT 及扫描电镜检测 DDE 组小鼠和 MAT2A 抑制剂处理组小鼠切牙釉质的变化, 探究 MAT2A 抑制剂对 DDE 严重程度的影响。

c. 体内研究检测 MAT2A 抑制剂对 DDE 模型小鼠切牙唇侧颈环 DESCs 动力学行为的变化, MAT2A 表达水平, 增殖分化关键基因表达水平, 及 H3K27me3 修饰水平的改变。

3. 技术路线

本项目的主要技术路线如下:

绿色标记代表前期已进行的实验部分, 黑色标记将要开展的课题所采用的技术路线。

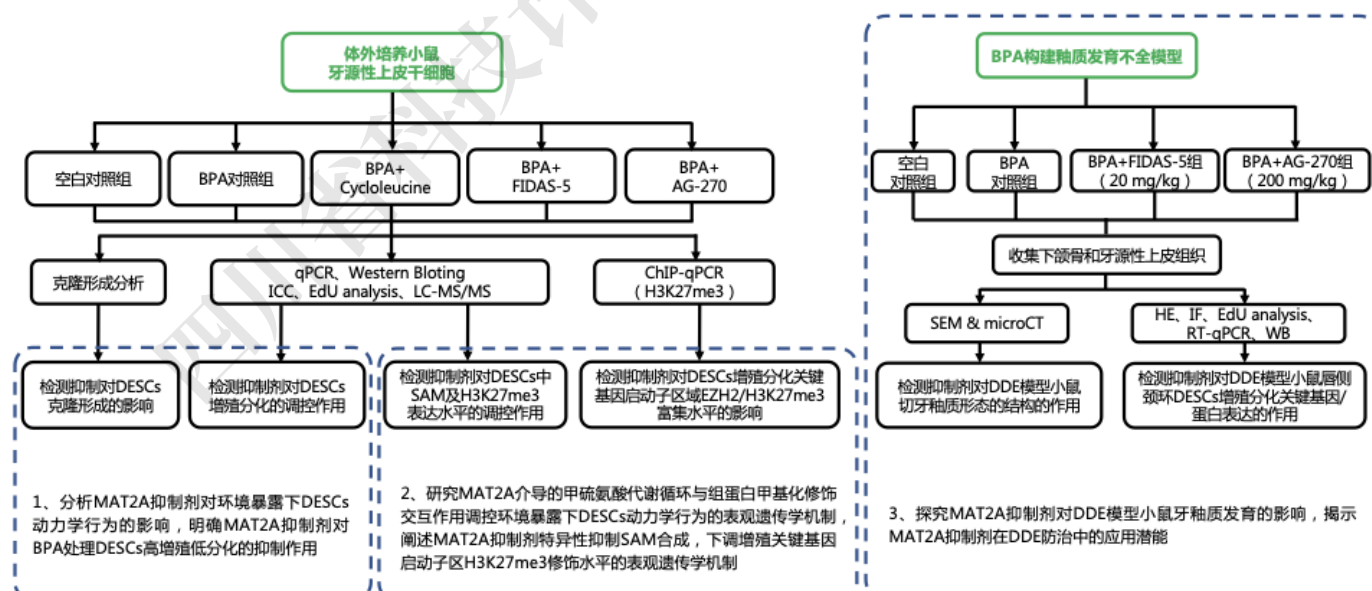


图 3 主要技术路线



4. 研究方案

第一阶段：探究 MAT2A 抑制剂对环境暴露下 DESCs 动力学行为的影响。

1) 动物实验的伦理学:本研究所涉及动物实验经过口腔疾病研究国家重点实验室及四川大学华西口腔医学院实验伦理委员会批准,符合口腔疾病研究国家重点实验室及四川大学华西口腔医学院实验伦理要求。

2) 小鼠 DESCs 的体外培养:

小鼠切牙上皮组织分离:体视显微镜下,去除小鼠下颌切牙根尖周围的骨组织,暴露切牙根部。体视显微镜下机械分离牙源性上皮组织备用。DESCs 专用培养基 (DMEM/F12 含有 20 ng/ml 小鼠 EGF 重组蛋白、25ng/ml FGF 重组蛋白、1X B27、1%青链霉素混合液), 5 天后细胞贴壁后,隔天换液。

3) SRB 检测 MAT2A 抑制剂对 DESCs 的细胞毒作用:取对数生长期的 DESCs 制成单细胞悬液,调整最适细胞浓度,接种于 96 孔细胞培养皿,培养 24h 后,加入不同的 MAT2A 抑制剂,作用 48h 后,吸取原培养液,加入 10%三氯醋酸 100 μ L,固定 1h;用双蒸水洗涤,干燥后,每孔加入 SRB 溶液,室温染色 20 分钟,醋酸洗涤,烘箱干燥;每孔加入 Tris Base 溶液使 SRB 溶解。酶标仪检测各孔 OD 值 (检测波长: 515nm);记录结果结算抑制率。

4) MAT2A 抑制剂对 BPA 处理 DESCs 增殖分化能力的影响:为考察 MAT2A 抑制剂对 DESCs 增殖分化能力的影响,我们引入 BPA 作为阳性对照进行比较,将细胞样本分为 5 个组,分别是空白对照组、Cycloleucine 组、FIDAS-5 组、AG-270 组与 BPA (1.0X10⁻¹¹ μ g/ml)阳性对照组。RT-qPCR 及 Western Blot 检测 DESCs 增殖分化关键基因/蛋白的表达水平。

5) 结晶紫染色检测克隆形成:将 DESCs 接种于 24 孔板,细胞贴壁后更换含 BPA, MAT2A 抑制的培养基后培育 7 天,去培养基, PBS 清洗, 甲醛固定, 结晶紫染色, 蒸馏水清洗多余结晶紫染液, 电热恒温鼓风干燥箱烘干后, 显微镜下观察并采图, 随机选取三个视野计算克隆数, 统计并分析克隆形成能力。

第二阶段：分析 MAT2A 抑制剂影响环境暴露下 DESCs 动力学行为的表观遗传学机制。

1) 检测 MAT2A 抑制剂对 BPA 染毒 DESCs 中过表达 MAT2A 及 H3K27me3 的抑制作用:为考察 MAT2A 抑制剂对 DESCs 中 MAT2A 及 H3K27me3 的影响,引入 BPA 作为阳性对照进行比较,将细胞样本分为 5 个组,分别是空白对照组、Cycloleucine 组、FIDAS-5 组、AG-270 组与 BPA (1.0X10⁻¹¹ μ g/ml)阳性对照组。检测 DESCs 中 MAT2A 基因/蛋白的表达水平及 H3K27me3 的表达水平。



2) ChIP-qPCR 检测 MAT2A 抑制剂对 DESCs 中增殖分化关键基因启动子区域 EZH2 及 H3K27me3 的富集水平: 为考察 MAT2A 抑制剂对 DESCs 中增殖分化关键基因启动子区域 EZH2 及 H3K27me3 富集水平的影响, 引入 BPA 作为阳性对照进行比较, 将细胞样本分为 5 个组, 分别是空白对照组、Cycloleucine 组、FIDAS-5 组、AG-270 组与 BPA ($1.0 \times 10^{-11} \mu\text{g/ml}$) 阳性对照组。DESCs 以甲醛溶液室温交联, 重悬, 终止交联, 细胞核裂解, 收集裂解物, 溶解悬浮于缓冲液中, 使用 EZH2 及 H3K27me3 抗体沉淀溶解物, DNA 纯化。ChIP-qPCR 检测相关启动子区域 EZH2 及 H3K27me3 的修饰水平。并与第一部分的 RT-qPCR 结果联合分析 MAT2A 介导的甲硫氨酸代谢循环与 EZH2 介导的 H3K27me3 的相关性。

第三阶段: 探究 MAT2A 抑制剂对 DDE 模型小鼠牙釉质发育的影响, 揭示 MAT2A 抑制剂在 DDE 防治中的应用潜能。

1) BPA 染毒构建 DDE 小鼠模型: 8 周龄 C57BL/6 小鼠按雌:雄为 2:1 合笼交配, 查到阴道栓确定为受孕。孕鼠随机均分为 3 组, 即空白对照组、溶剂对照组(玉米油)、参考剂量 BPA 组 ($50 \mu\text{g/kg/day}$) 每组 10 只。孕鼠自受孕至子代小鼠出生后第 21 天 (postnatal day21, P21) 每日灌胃染毒。子代小鼠 P21 断乳。于 P21 及 P42, 小鼠安乐死, 尽快收集血液及下颌骨备用。microCT 扫描选取合适的阈值以区分矿化组织及其他组织, 获得三维信息并进行重建后数据分析。使用含有四氧化锇的酒精浸泡, 酒精脱水, 干燥, 喷金, 采用扫描电子显微镜观察。

2) MAT2A 抑制剂处理 DDE 模型小鼠: 为考察 MAT2A 抑制剂对 DDE 模型小鼠切牙釉质发育的影响, 我们将 DDE 模型小鼠分为 4 个组, 分别是空白对照组、FIDAS-5 组 (20 mg/kg), AG-270 组 (200 mg/kg) 与 BPA ($50 \mu\text{g/kg/day}$) 阳性对照组。3 周龄 DDE 模型小鼠下颌骨唇侧局部注射 MAT2A 抑制剂, 于 6 周龄, 小鼠安乐死, 尽快收集血液及下颌骨备用。

3) microCT 及扫描电镜确定 MAT2A 抑制剂对 DDE 模型小鼠釉质形态和结构的影响: microCT 扫描选取合适的阈值以区分矿化组织及其他组织, 获得三维信息并进行重建后数据分析。使用含有四氧化锇的酒精浸泡, 酒精脱水, 干燥, 喷金, 采用扫描电子显微镜观察。

4) 检测小鼠唇侧颈环 DESCs 增殖分化关键基因/蛋白表达的变化: 如前所述收集小鼠切牙上皮组织, 分离提纯总 RNA/蛋白, 检测 DESCs 增殖分化关键基因/蛋白的表达水平。

5) 免疫组化检测小鼠唇侧颈环 DESCs 增殖分化关键基因表达的变化: 下颌骨固定, 脱水并石蜡包埋, 切片, 并保存于 4°C 中。脱蜡, 水合, 抗原修复, 封闭, 按比例稀释一抗后 4°C 冷室孵育过夜, 次日室温下避光孵育荧光二抗, 荡洗, 封片, 4°C 保存, 留待观察采图。



补充说明

四川省科技计划项目任务书正式版



三、项目的考核内容和考核指标

技术创新目标

产品或技术名称	主要技术参数/性能参数	现有指标	项目完成时的预期达到指标
MAT2A抑制剂在牙釉质发育缺陷治疗中的应用潜能	牙釉质釉柱结构、牙上皮细胞增殖分化状态及相关论文	EZH2抑制剂GSK126能够部分缓解牙釉质发育缺陷	MAT2A抑制剂在牙釉质发育缺陷治疗中具有良好的应用前景并发表SCI论文2篇
知识产权	发明专利授权 <u> 0 </u> 项，发明专利受理 <u> 1 </u> 项，实用新型专利授权 <u> 0 </u> 项，实用新型专利受理 <u> 0 </u> 项。		
技术标准制定	国际标准 <u> 0 </u> 项，国家、行业标准 <u> 0 </u> 项，地方、企业标准 <u> 0 </u> 项		
认证、许可	新药证书 <u> 0 </u> 项，新品种审定证书 <u> 0 </u> 项，计算机软件著作权登记证书 <u> 0 </u> 项，计量许可证书 <u> 0 </u> 项，计量型式证书 <u> 0 </u> 项，新药临床批件 <u> 0 </u> 件，三类医疗器械注册受理证明 <u> 0 </u> 件，三类医疗器械临床试验许可 <u> 0 </u> 件		
论文专著	公开发表 <u> 2 </u> 篇，引用 <u> 0 </u> 次，出版专著 <u> 0 </u> 部。		

示范应用目标

示范基地及规模	无
中试线及规模	无
推广应用目标	无
人才引进及培训	办 <u> 0 </u> 期培训班（现场会），培训农村科技人员 <u> 0 </u> 人，培训企业科技人员 <u> 0 </u> 人，培训科技管理人员 <u> 0 </u> 人，培训医疗技术、推广人员 <u> 0 </u> 人，培训技术人员 <u> 0 </u> 人次，引进国（境）外专家 <u> 0 </u> 人 <u> 0 </u> 人次。

经济效益目标

/	现有指标	项目完成时的预期达到指标
销售收入	<u> 0 </u> 万元	<u> 0 </u> 万元
节创汇	<u> 0 </u> 万元	<u> 0 </u> 万元

社会效益目标



形成的公益性贡献、价值和可持续影响	本项目立足于课题组前期工作基础，并充分查阅文献，对MAT2A抑制剂影响环境暴露下牙上皮干细胞（DESCs）动力学行为的表现遗传学机制进行研究，探究MAT2A抑制剂对牙釉质发育缺陷（DDE）模型小鼠牙釉质发育的影响，揭示其在DDE防治中的应用潜能，为DDE的临床防治提供新策略。因此，该项目的实施将产生以下社会效益： 1. 组蛋白甲基化是DESCs定向分化过程中的调控机制仍然是未解决的难题，也是牙釉质发育研究在表现遗传学领域的重要命题。本项目通过构建牙釉质发育缺陷模型，全基因组图谱及组蛋白甲基化修饰谱，进一步深入探讨甲硫氨酸代谢循环与表现遗传学交互作用的分子机制。研究成果将推动学者们对表现遗传学在牙釉质发育这一生物学事件中的认知范畴。对于完善牙釉质发育分子生物学机制及发掘牙釉质发育缺陷防治的新靶点具有重要的意义。 2. DDE患牙萌出后常因咬合力而致釉质崩解，牙本质暴露，易患龋且龋病进展迅速。患牙未及时发现或未正确处理则会造成恒牙早失或间隙改变，甚至对患儿的牙合及颌面部发育产生不利影响。本项目以MAT2A抑制剂靶向作用甲硫氨酸代谢循环为切入点，深入研究甲硫氨酸代谢循环与组蛋白甲基化修饰交互作用在牙釉质发育缺陷疾病发生的分子机制，探索临床治疗的新策略，并阐明其作用机制研究成果将为临床进一步改良和创新疾病防治策略提供总要理论基础。 3. DDE具有发病率高、致病因素多、就诊率低、公共卫生资源耗费高、诊治水平参差不齐等特点，严重危害口腔及全身健康。根据流行病学调查结果显示DDE发病率在全世界的范围内逐年攀升。本项目将提出MAT2A抑制剂应用于DDE防治手段的革新，为有效减轻社会公共负担，提高人民生活质量具有重要社会价值。
---------------------------------	---

人才培养目标

高端人才	院士 <u> 0 </u> 人，享受国务院政府特殊津贴专家 <u> 0 </u> 人，国家杰出青年科学基金 <u> 0 </u> 人，全国杰出专业技术人才 <u> 0 </u> 人，长江学者 <u> 0 </u> 人，新世纪优秀人才 <u> 0 </u> 人，省有突出贡献的优秀专家 <u> 0 </u> 人，省学术和技术带头人 <u> 0 </u> 人，省学术和技术带头人后备人选 <u> 0 </u> 人，其他国家级高层次人才 <u> 0 </u> 人，其他省级高层次人才 <u> 0 </u> 人。
职称晋升	高级 <u> 0 </u> 人，中级 <u> 0 </u> 人。
学位人才	在读博士后 <u> 0 </u> 人，在读博士研究生 <u> 1 </u> 人，在读硕士研究生 <u> 1 </u> 人，毕业博士后 <u> 0 </u> 人，毕业博士研究生 <u> 1 </u> 人，毕业硕士研究生 <u> 1 </u> 人，毕业学士 <u> 0 </u> 人。
吸纳大学生就业	博士后 <u> 0 </u> 人，博士研究生 <u> 0 </u> 人，硕士研究生 <u> 0 </u> 人，本科生 <u> 0 </u> 人，专科生 <u> 0 </u> 人。

科技报告的呈交情况

进展报告	年度报告 <u> 0 </u> 篇，中期报告 <u> 0 </u> 篇
最终报告	<u> 1 </u> 篇

关键核心考核指标(在上述指标中选择1-2项)

论文专著

四、计划进度和阶段目标（以半年为单位，叙述项目的进度安排和阶段目标任务。）

开始时间	结束时间	阶段目标
------	------	------



2022-01-01	2022-06-30	1. 准备实验动物试剂耗材; 2. 分析MAT2A抑制剂对环境暴露下DESCs动力学行为的影响。本部分实验利用双酚A (bisphenol A, BPA) 染毒模拟环境暴露下的DESCs, MAT2A抑制剂处理BPA染毒的DESCs, 检测其对DESCs增殖分化的影响, 确定MAT2A抑制剂对DESCs命运选择的调控作用。具体包括: a. 体外培养小鼠DESCs, BPA染毒: 检测牙釉质发育关键基因, MAT2A表达水平及组蛋白甲基化 (H3K27me3) 修饰水平, 确定成功模拟环境暴露下DESCs; b. MAT2A抑制剂处理BPA染毒DESCs: 检测BPA+MAT2A抑制剂联合处理组细胞的增殖分化相关基因及蛋白的表达水平, 克隆形成能力及增殖活性, 明确MAT2A抑制剂对BPA处理DESCs高增殖低分化的抑制作用。
2022-07-01	2022-12-31	1. 研究MAT2A介导的甲硫氨酸代谢循环与组蛋白甲基化修饰交互作用调控环境暴露下DESCs动力学行为的表观遗传学机制。本部分实验基于前述的体外实验结果, 进一步探究MAT2A抑制剂特异性抑制MAT2A过表达及SAM合成, 下调DESCs增殖分化关键基因启动子区H3K27me3修饰水平, 进而解除增殖分化关键基因的转录抑制, 最终抑制DESCs的增殖活性并启动分化进程的表观遗传调控机制。具体包括: a. 体外培养DESCs, MAT2A抑制剂处理BPA 染毒DESCs: 检测MAT2A, SAM水平与其直接调控的下游基因/蛋白的表达水平, 以及H3K27me3修饰水平; b. ChIP-qPCR检测H3K27me3及EZH2在DESCs关键基因启动子区富集水平的变化, 分析MAT2A介导的甲硫氨酸代谢循环与EZH2介导的H3K27me3修饰的相关性; 2. 整理第二阶段实验数据, 撰写并投递论文。
2023-01-01	2023-06-30	1. 探究MAT2A抑制剂在牙釉质发育缺陷中的防治潜能。本部分实验利用BPA染毒构建DDE 小鼠模型, 检测切牙上皮组织全基因组H3K27me3富集水平、MAT2A及牙釉质形成关键基因的表达水平, 分析MAT2A介导的甲硫氨酸代谢循环与基因启动子区H3K27me3修饰水平的相关性, 确定MAT2A在牙釉质发育过程中的调控作用。具体包括: a. 孕鼠BPA染毒, 构建DDE模型小鼠: microCT及扫描电镜确定DDE模型构建成功; b. MAT2A抑制剂处理DDE模型小鼠: microCT及扫描电镜检测DDE组小鼠和MAT2A抑制剂处理组小鼠切牙釉质的变化, 探究MAT2A抑制剂对DDE严重程度的影响。 c. 体内研究检测MAT2A抑制剂对DDE模型小鼠切牙唇侧颈环DESCs动力学行为的变化, MAT2A表达水平, 增殖分化关键基因表达水平, 及H3K27me3修饰水平的改变; 2. 整理第三阶段实验数据, 撰写并投递论文;
2023-07-01	2023-12-31	总结成果, 撰写并申请专利。



五、项目主要研究人员基本情况表

姓名	所在单位	职称	累计为 本项目 工作时间 (人月)	聘用人 员
万冕	四川大学华西口腔医院	中级	24	
周昕	四川大学华西口腔医院	中级	12	
杜玮	四川大学华西口腔医院	中级	12	
崔迪新	四川大学华西口腔医院	其他	10	
李宏宇	四川大学华西口腔医院	其他	10	
田青鹭	四川大学华西口腔医院	其他	10	
贺鹏程	四川大学华西口腔医院	其他	10	



六、项目经费预算

项目经费预算表（表1）

单位：万元

序号	预算科目名称	财政科技经费	自筹经费	合计
1	一、经费支出	20	0	20
2	（一）直接费用	16.67	0	16.67
3	1、设备费	0	0	0
4	（1）购置设备费	0	0	0
5	（2）试制设备费/设备改造费/设备租赁费	0	0	0
6	2、材料费	9.00	0	9.00
7	3、测试化验加工费	4.00	0	4.00
8	4、燃料动力费	0	0	0
9	5、差旅费/会议费/国际合作与交流费	1.5	0	1.5
10	6、出版/文献/信息传播/知识产权事务费	1.67	0	1.67
11	7、劳务费	0	0	0
12	8、专家咨询费	0.50	0	0.50
13	9、其他支出	0	0	0
14	（二）间接费用	3.33	0	3.33
15	其中：绩效支出	1.66	0	1.66
16	二、经费来源	20	0	20
17	1、申请项目专项经费	20	/	20
18	2、自筹经费	/	0	0

经费拨付进度（单位：万元）

科目	总经费	第一年	第二年	第三年	第四年	第五年
财政经费	20	20	0	0	0	0
承诺自筹	0	/	/	/	/	/



项目经费支出预算分解表(表2)

序号	单位名称	社会信用代码	单位类型	任务分工	任务负责人	合计	专项经费		自筹经费
							小计	其中:间接费用	
1	四川大学华西口腔医院	12510000450755937Y	A、承担单位	全面负责项目实施	万冕	20.00	20.00	3.33	0.00
累计						20.00	20.00	3.33	0.00

填表说明:单位类型分为: A、承担单位(即第一承担单位),B、合作单位(即合作承担单位); 请手动设置为横表打印。



各科目预算说明表（表3）

（一）间接费用

本项目间接费用预算为 3.33 万元，其中绩效支出核定为 1.66 万元。

（二）材料费

材料类型	材料名称	与研究任务的相关性
主要材料	实验动物	构建牙釉质发育缺陷大鼠及小鼠模型，培养牙上皮干细胞，分析MAT2A抑制剂效果的主要材料
主要材料	细胞培养基及添加物	用于培养牙上皮干细胞并进行干预实验的主要材料
主要材料	实验抗体	用于流式细胞术、组织化学实验的主要材料
主要材料	MAT2A抑制剂	MAT2A抑制剂FIDAS-5及AG-270用于进行DDE干预实验的主要材料
主要材料	ChIP相关试剂盒	CHIP酶切试剂盒（EZ-Zyme Chromatin Preparation kit）、CHIP试剂盒（Magna ChIP™ HiSens Kit）、DNA纯化试剂盒（DNA Purification Kit）等用于检测H3K27me3修饰改变的主要材料
主要材料	分子生物学试剂	购买RNA纯化试剂盒（RNeasy® Mini Kit, RNeasy® Micro-plus Kit）、PCR产物纯化试剂盒（PureLink® PCR Purification Kit）、PCR产物回收纯化试剂盒（Qiaquick® column purification kit），蛋白提纯试剂盒（NE-PER® Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents）等分子生物学试剂用于检测相关指标变化
辅助材料	实验耗材	常用细胞培养耗材（细胞培养皿、培养板、培养瓶、离心管、加样枪头、EP管、PCR管、冻存管）和分子生物学实验耗材（甲醇、乙醇、异丙醇、干冰等）
合计:专项经费 9.00 万元，自筹经费 0 万元，总经费 9.00 万元。		

（三）测试化验加工费

加工或测试内容	与研究任务的相关性
引物合成	检测相关基因的表达水平需合成相关引物，预计合成40对引物。
转录组测序	用于构建MAT2A抑制剂干预DDE组及DDE组全转录组图谱，预计检测8个样本。
ChIP-seq	用于构建MAT2A抑制剂干预DDE组及DDE组组蛋白修饰图谱，预计检测8个样本。
代谢组学研究	用于检测MAT2A抑制剂干预DDE组及DDE组代谢组图谱，预计检测12个样本。
合计:专项经费 4.00 万元，自筹经费 0 万元，总经费 4.00 万元。	

（四）燃料动力费

设备名称	与研究任务的相关性
合计:专项经费 0 万元，自筹经费 0 万元，总经费 0 万元。	



(五) 会议费/差旅费/国际合作交流费

预计差旅费	预计会议费	预计国际合作交流费
专项经费 1.50 万元, 自筹经费 0 万元	专项经费 0 万元, 自筹经费 0 万元	专项经费 0 万元, 自筹经费 0 万元
总经费 1.50 万元	总经费 0 万元	总经费 0 万元
合计:专项经费 1.5 万元, 自筹经费 0 万元, 总经费 1.5 万元。		

(六) 出版/文献/信息传播/知识产权事务费

费用名称	与研究任务的相关性
出版费	根据任务需要, 本项目需要发表两篇论文两篇
专利费	根据任务需要, 本项目需要申请专利1项
文献检索费	根据任务需要, 需要进行文献检索
结题验收材料印刷费	根据任务需要, 在项目结题验收时, 需要对研究资料进行打印装订
合计:专项经费 1.67 万元, 自筹经费 0 万元, 总经费 1.67 万元。	

(七) 劳务费

聘用人员	参与的研究任务(承担的具体工作)
合计:专项经费 0 万元, 自筹经费 0 万元, 总经费 0 万元。	

(八) 专家咨询费

咨询形式	与研究任务的相关性
会议	项目进行过程中征询专家意见和建议
合计:专项经费 0.50 万元, 自筹经费 0 万元, 总经费 0.50 万元。	

(九) 其他支出

费用名称	与研究任务的相关性
合计:专项经费 0 万元, 自筹经费 0 万元, 总经费 0 万元。	

(十) 设备费

(1) 购置设备费

设备名称	与研究任务的相关性
合计:专项经费 0 万元, 自筹经费 0 万元, 总经费 0 万元。	

(2) 试制设备费/设备改造费/设备租赁费



设备名称	类型	与研究任务的相关性
合计:专项经费 0 万元, 自筹经费 0 万元, 总经费 0 万元。		

四川省科技计划项目任务书正式版



七、项目承担单位承诺书

1. 我单位保证在项目实施（包括项目申请、评估评审、检查、项目执行、资源汇交、验收等过程）中所提交的材料真实、准确、有效。

2. 我单位将严格履行《四川省科技计划项目管理办法》、《四川省科技计划项目专项资金管理办法》等项目及经费管理办法文件规定，组织实施管理机构的职责和《项目任务书》中的各项约定，承诺项目经费专款专用、单独核算，为项目实施提供必要的条件和进行有效的管理与监督。

3. 我单位保证严肃调查处理或配合相关调查机构调查处理在实施项目过程中发现的科研不端行为，并及时向推荐单位和四川省科技厅报告相关调查处理结果。

4. 我单位已对任务书的内容和密级进行了审核，项目所属密级符合《中华人民共和国保守国家秘密法》、《科学技术保密规范》及《对外科技交流保密提醒制度》中的密级要求和条件，保证严格遵守国家有关保密规定，在科研活动和对外合作中不泄露国家秘密。

5. 我单位保证在项目执行期间及时做好科技报告的呈交工作，在项目完成后1年内做好项目验收工作，如项目通过验收，及时做好项目的科技成果登记工作。

6. 我单位已按照《国家科技计划（专项、基金等）严重失信行为记录暂行规定》的要求建立了规范科研行为、调查处理科研不端行为的相关制度，并自愿接受监督。

项目承担单位盖章：

年 月 日



八、项目研究人员承诺书

1. 本人承诺在项目实施（包括项目评估评审、检查、项目执行、资源汇交、验收等过程）中，遵守科学道德和诚信要求，严格执行《四川省科技计划项目管理办法》、《四川省科技计划项目专项资金管理办法》等相关科技计划管理及经费管理办法规定和《项目任务书》中的约定，不发生下列科研不端行为：

- （1）在职称、简历以及研究基础等方面提供虚假信息；
- （2）抄袭、剽窃他人科研成果；
- （3）捏造或篡改科研数据；
- （4）在涉及人体研究中，违反知情同意、保护隐私等规定；
- （5）违反科研伦理和实验动物管理规范；
- （6）其他科研不端行为。

2. 如本人被举报在项目实施中存在科研不端行为，将积极配合相关调查机构组织开展的调查。

3. 本人承诺严格遵守《中华人民共和国保守国家秘密法》、《科学技术保密规范》及《对外科技交流保密提醒制度》，在科研活动和对外合作中不泄露国家秘密。

项目负责人签字：

项目参与人签字：

年 月 日

项目承担单位盖章：

年 月 日



九、任务书签订各方盖章及意见

甲方	单位名称	四川省科学技术厅	(项目合同章) 年 月 日
	分管厅领导	(签章)	
	分管处室负责人	(签章)	
	项目管理人	石梁萍	
	电话及传真	86710082	
乙方	牵头单位名称	四川大学华西口腔医院	(牵头单位名称) (合作单位公章) 年 月 日
	地址及邮编	成都市人民南路三段14号, 610041	
	电话及传真	028-85502415	
	开户银行	中国工商银行成都滨江支行	
	帐 号	4402204009008902113	
	合作单位名称		
丙方	推荐单位名称	四川大学	(单位公章) 年 月 日
	电话及传真		



十、附加条款

1. 任务各方共同遵守《四川省科技计划项目管理办法》、《四川省科技计划项目专项资金管理办法》等相关管理办法，以下简称《办法》，并自愿接受其约束。
2. 任务书下达后，项目负责人全面负责项目的实施工作，各成员必须严格履行相应职责。
3. 项目实施过程中，项目的研究计划、主要研究人员、研究任务、经费预算等需要调整时，项目负责人应根据《办法》中有关规定，向甲方或乙方提出变更理由及其内容的申请报告，经甲方或乙方审查通过后实施。未经批准，项目负责人必须按原任务书履行。
4. 乙方必须接受甲方对项目进度及经费使用的监督和检查，并按甲方要求及时提供相关执行情况报告和相关统计报表，逾期不报，甲方有权暂停资助或终止项目。
5. 乙方因某种原因致使无法按计划执行而主动要求结题时，乙方应在规定时限内提出申请；如乙方未主动提出申请，甲方有权根据调查情况终止任务。
6. 乙方应遵守任务书的约定，及时呈送符合撰写标准的科技报告，并获得科技报告收录证明。乙方可根据项目具体情况提出科技报告的保密和解密期限要求。乙方应在项目验收后按规定进行成果登记。
7. 任务到期完成后，乙方必须在三个月内完成验收准备，主动提交验收材料，并在任务到期后1年内完成项目验收手续。
8. 推荐单位作为任务书中的丙方加盖公章，负责协调项目的组织实施、经费使用及监督检查中出现的有关问题。
9. 项目研究成果及其形成的知识产权归项目承担单位所有。在特定情况下，国家根据需要保留无偿使用、开发、使之有效利用和获取收益的权利。乙方申报成果、专利、发表论文时需注明由“四川省科技计划资助”（英文标注：“Supported by Sichuan Science and Technology Program”）。乙方因实施本项目而引起的各种知识产权纠纷由乙方负全部责任。
10. 乙方对项目执行过程中产生的研究成果须及时采取知识产权保护措施，依法取得相关知识产权，并予以有效管理和充分使用。
11. 乙方指定项目组成员_____为本项目档案员，负责本项目档案的收集、积累和保存工作，要做到随时收集、编号登记、入袋保管，归档的重点是项目各个阶段形成的不同载体的文件材料和技术资料，特别是研究实验阶段形成的作为成果依据的原始材料。
12. 乙方在项目实施过程中应建立相应的规章制度，加强安全管理，确保人员及设备安全，并对科研安全负全部责任。
13. 乙方在项目实施过程中，应遵守科研诚信、科技行为廉洁的有关规定，不得向甲方、丙方工作人员行贿或报销应由个人支付的任何费用，被纪检监察机关或司法机关查证属实的，甲方有权终止项目实施并追缴拨付的全部科研经费。
14. 任务书是对签订各方都有法定约束力的协议，自各方签字盖章之日起正式生效，若有争议或纠纷，按照《办法》有关条款处理。
15. 任务书未尽事宜，由甲乙双方协商解决。协商不成的，可向仲裁机构申请仲裁或向人民法院起诉，但在有关司法、仲裁结果生效之前，乙方应按照甲方要求继续履行或终止履行本任务书。



四川大学华西口腔医院临床研究项目 资助批准通知

郑黎薇 老师：

根据《四川大学华西口腔医院探索与研发项目管理办法》(院管字【2019】4号)和专家评审意见，医院决定批准资助您申请的临床研究项目。项目批准号：LCYJ2019-24，项目名称：乳牙牙髓干细胞应用于年轻恒牙再生性牙髓治疗的临床前研究，资助金额30万元，项目起止年月：2020年1月至2022年12月。

请根据批准的经费金额和项目申请表中的经费预算，严格遵守医院设备购置和经费使用的有关规定，合理、及时使用经费。



四川大学华西口腔医院



2019 年 12 月

国家自然科学基金资助项目批准通知

(预算制项目)

郑黎薇 先生/女士:

根据《国家自然科学基金条例》、相关项目管理办法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)决定资助您申请的项目。项目批准号: 82170921, 项目名称: 引导管上皮-牙囊间充质交互作用促进牙萌出的机制研究, 直接费用: 55.00万元, 项目起止年月: 2022年01月至 2025年12月, 有关项目的评审意见及修改意见附后。

请您尽快登录科学基金网络信息系统(<https://isisn.nsfc.gov.cn>), **认真阅读《国家自然科学基金资助项目计划书填报说明》并按要求填写《国家自然科学基金资助项目计划书》(以下简称计划书)**。对于有修改意见的项目,请您按修改意见及时调整计划书相关内容;如您对修改意见有异议,须在电子版计划书报送截止日期前向相关科学处提出。

请您将电子版计划书通过科学基金网络信息系统(<https://isisn.nsfc.gov.cn>)提交,由依托单位审核后提交至自然科学基金委。自然科学基金委审核未通过者,将退回的电子版计划书修改后再行提交;审核通过者,打印纸质版计划书(一式两份,双面打印)并在项目负责人承诺栏签字,由依托单位科研、财务管理等部门审核、签章并在承诺栏加盖依托单位公章,且将申请书纸质签字盖章页订在其中一份计划书之后,一并报送至自然科学基金委项目材料接收工作组。纸质版计划书应当保证与审核通过的电子版计划书内容一致。**自然科学基金委将对申请书纸质签字盖章页进行审核,对存在问题的,允许依托单位进行一次修改或补齐。**

向自然科学基金委提交电子版计划书、报送纸质版计划书并补交申请书纸质签字盖章页截止时间节点如下:

1. **2021年10月22日16点:** 提交电子版计划书的截止时间(视为计划书正式提交时间);
2. **2021年10月29日16点:** 提交修改后电子版计划书的截止时间;
3. **2021年11月5日16点:** 报送纸质版计划书(其中一份包含申请书纸质签字盖章页)的截止时间。

4. 2021年11月25日16点：报送修改后的申请书纸质签字盖章页的截止时间。

请按照以上规定及时提交电子版计划书，并报送纸质版计划书和申请书纸质签字盖章页，未说明理由且逾期不报计划书或申请书纸质签字盖章页者，视为自动放弃接受资助；未按要求修改或逾期提交申请书纸质签字盖章页者，将视情况给予暂缓拨付经费等处理。

附件：项目评审意见及修改意见表

国家自然科学基金委员会

2021年10月12日

附件：项目评审意见及修改意见表

项目批准号	82170921	项目负责人	郑黎薇	申请代码1	H1501
项目名称	引导管上皮-牙囊间充质交互作用促进牙萌出的机制研究				
资助类别	面上项目		亚类说明		
附注说明					
依托单位	四川大学				
直接费用	55.00 万元		起止年月	2022年01月 至 2025年12月	
通讯评审意见： <1>具体评价意见： 一、该申请项目的研究内容是否具有原创性并值得鼓励尝试？请针对创新点（如新思想、新理论、新方法、新技术等）详细阐述判断理由。 牙萌出是牙胚、牙槽骨以及多种细胞及其分子相互作用的复杂有序的过程，这一过程需要在牙胚冠方形成萌出通道，即邻近牙槽骨吸收形成硬组织通道，并且软组织通过吸收改建而形成软组织通道。但目前引导管在牙萌出中的调控机制尚不清楚，引导管上皮-牙囊间充质交互作用调控牙萌出机制研究较少。该项目首先利用临床病例回顾性分析，证明引导管对恒牙的正常萌出具有积极作用，并进行牙萌出的冠方物理通道及微环境的分子生物学机制研究，研究原创性。 二、请评述申请项目所提出创新点的科学价值及对相关领域的潜在影响。 牙萌出对于咬合发育、口颌系统发育及全身生长发育都有重要意义。探究牙萌出机理，有利于深入理解牙萌出障碍及其发生机制，为基于分子生物学的精准治疗策略提供理论依据。多向研究表明引导管异常与牙阻生相关，该项目以探究引导管内上皮和牙囊间充质相互作用对牙萌出的调控作用为研究目标，进行牙萌出的冠方物理通道及微环境的分子生物学机制研究，为口腔临床治疗手段与技术的革新提供理论依据。 三、请结合申请人的学术背景及研究方案评述开展该原创性研究的可能性。 申请人所在研究团队在前期进行临床回顾性研究与数据总结，发现引导管的不同类型、表现形式及与牙萌出阶段的关系，为探究引导管对牙萌出关键作用提供较好的临床依据。课题组前期数据提示，引导管内上皮和牙囊间充质在牙萌出过程中调节牙槽骨吸收形成引导管，并促进冠方的阻力去除，这为探究引导管上皮和牙囊间充质的相互作用提供了理论依据。同时项目计划构建引导管上皮E-cad缺失动物模型，有助于探讨引导管上皮来源的E-cad对牙萌出过程中破骨细胞分化的作用及机制。申请人具备一定研究基础。 四、其他建议 <2>具体评价意见： 一、该申请项目的研究内容是否具有原创性并值得鼓励尝试？请针对创新点（如新思想、新理论、新方法、新技术等）详细阐述判断理由。 该申请项目的研究内容是具有一定的创新性，值得鼓励尝试： 1. 该课题首次分析儿童恒牙胚引导管与牙萌出之间的相关性及其引导管形态学特征。 2. 通过检测引导管上皮细胞、牙囊间充质细胞、破骨细胞的分布及组织学特性，探索上皮-间充质相互作用在破骨细胞分化及牙萌出硬组织通道形成中的作用 3. 进一步通过构建条件性敲除鼠，深入探讨上皮来源E-cad在破骨细胞分化及牙槽骨吸收中的作用机制。 二、请评述申请项目所提出创新点的科学价值及对相关领域的潜在影响。 该课题从临床数据出发，探索引导管上皮-牙囊间充质交互作用促进牙萌出的作用机制，从新的角度理解牙萌出的调控机制，为牙萌出障碍的防治提供新思路和理论基础。 三、请结合申请人的学术背景及研究方案评述开展该原创性研究的可能性。					

该课题申请人一直从事牙发育相关机制研究，具有较好的前期研究基础。研究方案合理，项目课题组成员分工合理；申请人所在研究单位为口腔疾病研究国家重点实验室，能够提供项目开展所需的各种条件。

四、其他建议

无

<3>具体评价意见：

一、该申请项目的研究内容是否具有原创性并值得鼓励尝试？请针对创新点（如新思想、新理论、新方法、新技术等）详细阐述判断理由。

本项目具有创新性，鼓励尝试。目前对于牙萌出的调控机制仍存在许多空白。该项目从临床角度出发，通过实践发现引导管结构与牙萌出关系密切，从而着眼于对引导管结构、引导管细胞组成及其与周围组织细胞间的相互作用进行研究，立意新颖独特。且该项目计划通过多种细胞共培养体系研究相互调控作用及相关机制，区别于传统的单一细胞二维培养方法，将更有利于阐明各种细胞之间的交互作用。

二、请评述申请项目所提出创新点的科学价值及对相关领域的潜在影响。

目前已有的引导管与牙萌出关系的研究样本量小、测量数据有限、缺乏生物学机制。该项目前期研究基础得到的大样本量的临床影像分析结果，对未来牙萌出影像化评估和预测具有指导性。且该项目期望解决的科学问题，即引导管上皮-牙囊间充质交互作用在牙萌出过程中的作用及调控机制，将为未来基于分子水平的精准临床诊疗提供理论依据。

三、请结合申请人的学术背景及研究方案评述开展该原创性研究的可能性。

申请人已结题的和正在主持的面上项目均与牙上皮研究相关，此外申请人还主持了关于颞下颌关节炎、根尖周骨质缺损相关的研究项目，并且赴美国进行口腔颌面生物学方向的学习，以上经历说明申请人在牙上皮细胞、牙间充质细胞及骨生物学方面都具有坚实的理论基础和丰富的研究经验，为该项目的顺利进行提供了保障。

该项目从临床角度出发，在基于临床结果的基础上，通过一系列体内、体外研究，从动物表型到功能机制验证层层递进，实验技术手段成熟，对项目的工作开展有明确细致的计划，该项目可执行性高。

四、其他建议

该项目中提出上皮来源的E-cadherin可能调控破骨细胞分化，促进牙萌出。建议同时检测牙囊细胞中是否存在某些因子对破骨细胞的分化也起作用，从而更好的说明引导管上皮和牙囊间充质在牙萌出过程中的作用。

修改意见：

医学科学部

2021年10月12日