

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
7192160

北京市自然科学基金资助项目 任务书（面上项目）

项目名称： SIRT1 基因修饰的脂肪干细胞外泌体在促进皮肤创伤修复中的作用机制研究

负 责 人： 王智

依托单位： 中国医学科学院北京协和医院

资助金额： 20 万元

起止年月： 2019.1 至 2021.12

填写日期： 2019-02-22

北京市自然科学基金委员会办公室

2019 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/jjb/>), 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）	王智	姓名（拼音）	Wang Zhi
	性别	男	民族	汉族
	出生日期	1979-01-11	电子邮箱	miosis@126.com
	办公电话	69152711	手机	13911230654
	专业技术职务（职称）	主治医师	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	整形外科、修复重建外科、显微外科、创面治疗		
	其他			
依托单位	单位名称	中国医学科学院北京协和医院	单位类别	医院
	隶属关系	中央	邮政编码	100730
	通信地址	东城区帅府园 1 号北京协和医院科研处		
	联系人	刘玉霞	联系电话	69155715
	传真	69156874	电子邮箱	pumchkyc@126.com
合作单位	单位名称		联系人	联系电话
项目基本信息	项目名称（中文）	SIRT1 基因修饰的脂肪干细胞外泌体在促进皮肤创伤修复中的作用机制研究		
	项目名称（英文）	Based on CXCL12/CXCR4 axis to study the molecular mechanism of promoting skin wound healing by SIRT1 gene modified adipose stem cell exosomes		
	申报学科 1（名称）	创面愈合与瘢痕	申报学科 1(代码)	H1507
	申报学科 2（名称）		申报学科 2(代码)	
	依托实验室	国家重点	起止年月	2019.1 至 2021.12
	研究性质	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
--	--------	---------

BLN

二、任务书正文

（一）研究目标和内容

1、研究目标

本课题通过小鼠皮肤创伤模型和小鼠 EPCs 和 MEFs 细胞培养，以稳定过表达 SIRT1 的 ADSCs 外泌体进行干预，研究其在皮肤创伤修复中的作用机制，为建立皮肤创伤快速修复方案奠定理论乃至技术基础。具体目标主要分为以下两点：

（1）构建小鼠皮肤创伤模型，证明 SIRT1-ADSCs 外泌体促进伤口愈合；（2）探讨 SIRT1/CXCL12/CXCR4 对小鼠 EPCs 和 MEFs 生物学功能影响的分子机制。

2、主要研究内容

（1）SIRT1-ADSCs 外泌体促进创伤组织修复的作用机制研究

1）SIRT1-ADSCs 外泌体的作用机制：皮肤创伤模型小鼠尾静脉注射 ADSCs，SIRT1-ADSCs 和 siSIRT1-ADSCs 以及对应细胞的外泌体进行治疗干预。不同修复时间后计算伤口愈合率。剪取完整伤口组织，进行 Masson 染色，I、III 型胶原的免疫组化，ki67 和 CD31 免疫荧光检测。Real-time PCR 和 western blot 分别检测 CXCL12/CXCR4 的 mRNA 和蛋白表达水平。通过分析 SIRT1-ADSCs 外泌体治疗后伤口愈合情况，以及相关基因表达水平，研究确定 SIRT1-ADSCs 外泌体的作用机制。

2）SIRT1/CXCL12/CXCR4 在创伤组织修复中的作用机制：皮肤创伤模型小鼠进行尾静脉注射稳定干扰 CXCR4 慢病毒，两周后进行皮肤创伤手术。相关检测指标同上。通过分析 SIRT1、CXCL12、CXCR4 的表达水平变化，研究 SIRT1/CXCL12/CXCR4 在创伤组织修复中的作用机制。

（2）SIRT1-ADSCs 外泌体影响小鼠 EPCs 和 MEFs 生物学功能的作用机制研究

分析稳定干扰或过表达 SIRT1 的 ADSCs 中 CXCL12 的 mRNA 和蛋白表达水平以及乙酰化水平，研究外泌体影响 EPCs 和 MEFs 生物学功能的作用机制。构建稳定干扰 CXCR4 的 EPCs 和 MEFs 细胞株，分析 ADSCs、SIRT1-ADSCs 和 siSIRT1-ADSCs 外泌体处理后细胞增殖情况；检测 SIRT1/CXCL12/CXCR4 和 I、III 型胶原的 mRNA 和蛋白表达水平；以及对细胞迁移能力的影响，确定 EPCs 的成管能力。研究确定 SIRT1-ADSCs 外泌体影响小鼠 EPCs 和 MEFs 生物学功能的作用机制。

（3）SIRT1/CXCL12 二者之间相互作用关系研究

构建带 HA 或 Flag 标签的 SIRT1 或 CXCL12 质粒，采用免疫共沉淀实验方法，分析二者之间的结合关系；采用飞行质谱技术检测 SIRT1 乙酰化 CXCL12 基因的乙酰化位点。

3、拟解决的关键问题

(1) SIRT1-ADSCs 外泌体促进皮肤创伤修复的作用机制是本课题关键科学问题之一。SIRT1 (沉默信息调节因子 2 相关酶 1) 是一种重要代谢调节分子, 参与能量代谢、DNA 修复、氧化应激等过程, 可能具有促进组织修复作用。本课题通过 SIRT1 修饰 ADSCs, 进而分离获得 SIRT1-ADSCs 的外泌体。通过干预动物皮肤创伤模型, 分析相关细胞因子的变化等, 确定 SIRT1-ADSCs 外泌体促进皮肤创伤修复作用及其作用机制;

(2) 研究 SIRT1/CXCL12/CXCR4 在创伤组织修复中的作用关系是本课题另一关键科学问题。本课题通过对皮肤创伤模型小鼠进行尾静脉注射稳定干扰 CXCR4 慢病毒, 分析 SIRT1、CXCL12、CXCR4 的表达水平变化, 并且通过免疫共沉淀实验分析 SIRT1 和 CXCL12 二者之间的结合关系, 确定 SIRT1/CXCL12/CXCR4 在创伤组织修复中的作用关系。

（二）研究方案

1、研究方法实验手段

（1）体内实验，研究 SIRT1-ADSCs 外泌体促进创伤组织修复的作用机制

1) 小鼠皮肤创伤模型制备：

通过对小鼠右侧腹股沟和背部做皮肤全层切口构建小鼠皮肤创伤模型。

2) SIRT1-ADSCs 外泌体的作用机制：

实验分组：sham；模型+PBS；模型+ADSCs；模型+SIRT1-ADSCs；模型+siSIRT1-ADSCs；模型+ADSCs 外泌体；模型+SIRT1-ADSCs 外泌体；模型+shSIRT1-ADSCs 外泌体。

样本搜集和指标检测：第 1、3、5、7、14、21 天处死并且对创口处拍照计算伤口愈合率。剪取完整伤口组织，进行 Masson 染色，I、III 型胶原的免疫组化，ki67 和 CD31 免疫荧光检测。Real-time PCR 和 western blot 分别检测 CXCL12/CXCR4 的 mRNA 和蛋白表达水平。

3) SIRT1/CXCL12/CXCR4 在创伤组织修复中的作用机制：

实验分组：sham；模型+vector；模型 siCXCR4；模型 siCXCR4+ADSCs 外泌体；模型 siCXCR4+SIRT1-ADSCs 外泌体。

样本搜集和指标检测如上。

（2）体外实验，研究 SIRT1-ADSCs 外泌体对小鼠 EPCs 和 MEFs 生物学功能影响的作用机制

EPCs 细胞株的实验分组：EPCs；EPCs+ADSCs 外泌体；EPCs+SIRT1-ADSCs 外泌体；EPCs+siSIRT1-ADSCs 外泌体；siCXCR4-EPCs+ADSCs 外泌体；siCXCR4-EPCs+SIRT1-ADSCs 外泌体；siCXCR4-EPCs+siSIRT1-ADSCs 外泌体。MEFs 细胞株的分组方式同 EPCs。

指标检测：CXCL12 的 mRNA 和蛋白表达水平以及乙酰化水平检测；MTT 检测细胞增殖情况；Real-time PCR 和 western blot 分别检测 SIRT1/CXCL12/CXCR4 和 I、III 型胶原的 mRNA 和蛋白表达水平；利用 Transwell 小室检测细胞迁移能力的影响，检测 EPCs 的成管能力，以及 MEFs 的迁移能力等。

（3）SIRT1 和 CXCL12 二者之间相互作用关系研究

1) 抽提 SIRT1-ADSCs 细胞总蛋白，利用 SIRT1 或 CXCL12 抗体进行免疫共沉淀，沉淀产物 SDS-PAGE 电泳后，进行 CXCL12 或 SIRT1 的 Western Blot 检测；验证 SIRT1 和 CXCL12 之间存在相互作用关系。

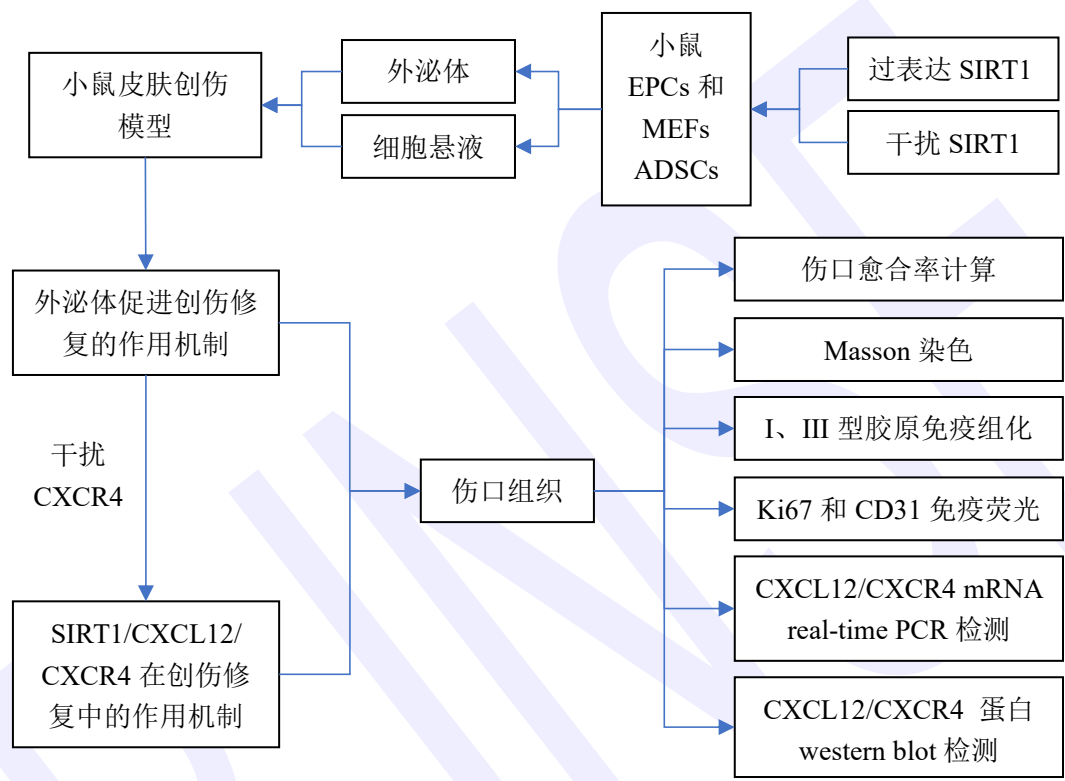
2) 构建带 HA 或 Flag 标签的 SIRT1 或 CXCL12 质粒（包含缺失 N 端、C 端或中间片段的不同长度）；共转染至 HEK293 细胞，利用免疫共沉淀，分析 SIRT1 和 CXCL12 的相互作用结构域。

3) 采用飞行质谱技术检测 SIRT1 乙酰化 CXCL12 基因的乙酰化位点，构建位点突变序列，验证乙酰化位点的突变是否抑制 CXCL12 在外泌体中富集。

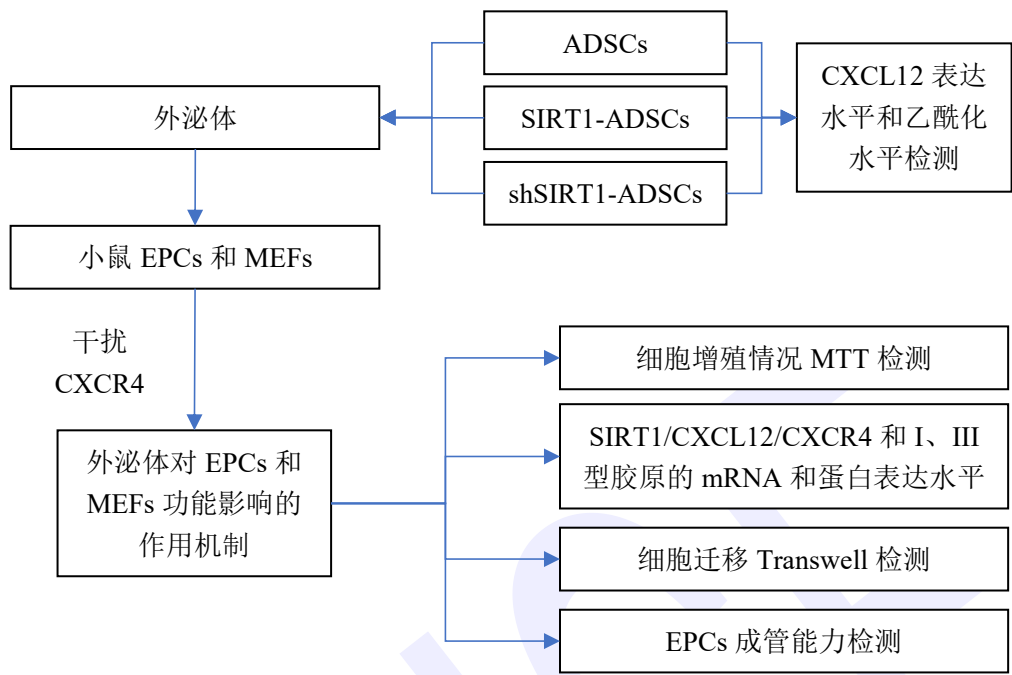
2、技术路线及关键技术

(1) 技术路线

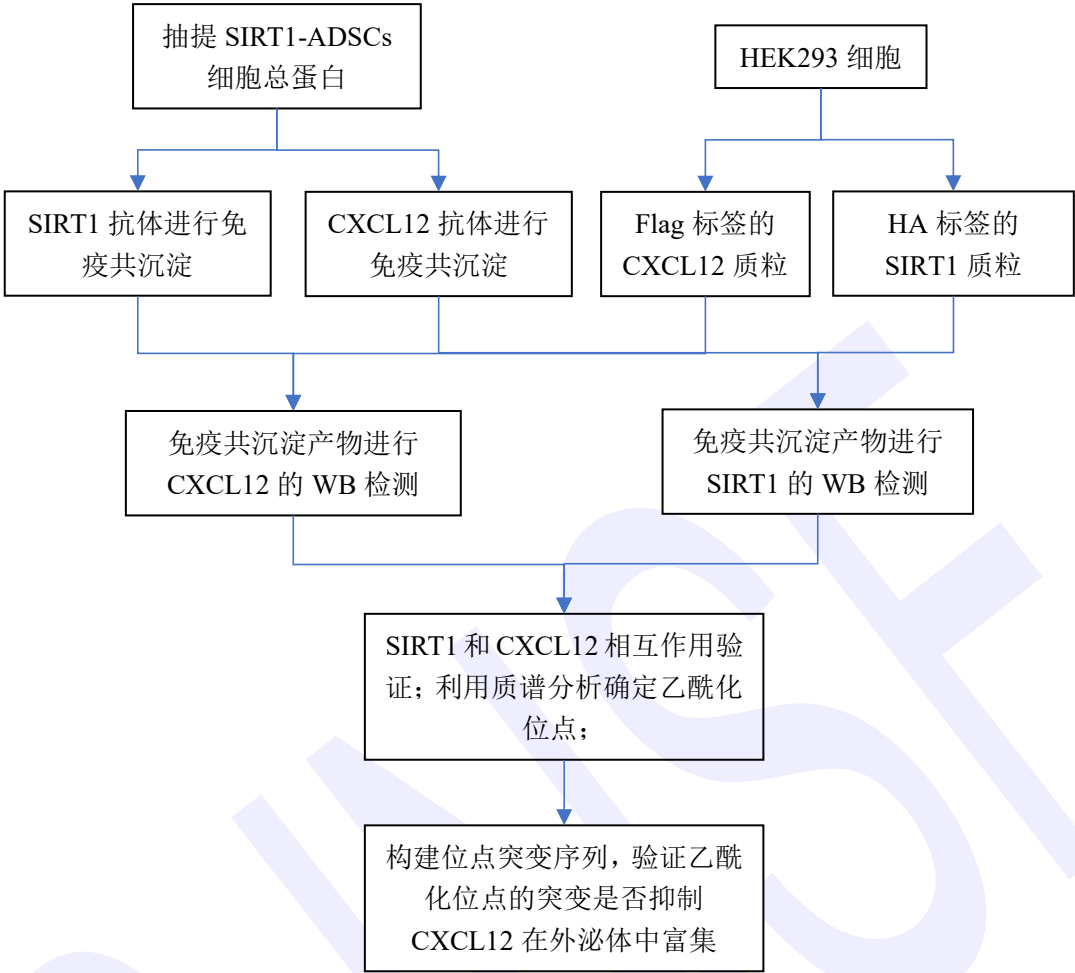
① 体内实验研究：SIRT1-ADSCs 外泌体促进创伤组织修复的作用机制



② 体外实验研究：SIRT1-ADSCs 外泌体对小鼠 EPCs 和 MEFs 生物学功能影响的作用机制



③ SIRT1 和 CXCL12 二者之间存在的相互作用关系实验



(2) 关键技术

1) 过表达或干扰基因载体构建和转染：利用慢病毒构建 SIRT1 过表达和干扰质粒，以及 CXCR4 干扰质粒。转染对应的细胞，48 小时后进行转染效率验证，挑选稳定干扰/过表达的细胞株进行后续实验。

2) 小鼠 EPCs 和 MEFs 的分离及培养：选用 6 周龄小鼠通过体外分离股骨和胫骨获得骨髓细胞悬液，筛网过滤结合磁珠分选技术筛选出 CD34+VEGFR2+内皮祖细胞备用。原代 MEFs 的分离选用妊娠 13.5 天的胚胎制备细胞上清液，技术稳定可靠。

3、可行性分析

1) 理论依据：前期研究发现，ADSCs 移植治疗能够促进小鼠皮肤组织创伤愈合，而 ADSCs 分泌的外泌体在促进创伤组织修复过程中发挥重要作用。综合前期预实验和文献报道，SIRT1 修饰的 ADSCs 可能通过乙酰化作用增强 CXCL12 表达，进而促进其外泌体中 CXCL12 的分泌；同时，外泌体中携带的 SIRT1 可进一步促进靶细胞中 CXCL12 表达，进而有利于创伤组织修复。我们推测 SIRT1-ADSCs

的外泌体中趋化因子 CXCL12 与受体细胞中 CXCR4 作用，促进创伤组织的血管生成和成纤维化，从而加速创伤组织修复，具有理论创新性。

2) 实验依据充分：本课题是在前期工作基础上的提炼和深入。申请者研究中发现，与 ADSCs 外泌体处理组相比，SIRT1 基因修饰的 ADSCs 外泌体促进小鼠 EPCs 的成管能力显著增强。为了研究其作用机制，申请者通过 ELISA 方法检测了 ADSCs 和 SIRT1-ADSCs 外泌体中与创伤愈合调节相关的趋化因子水平，发现 CXCL12 的水平显著上调。申请者进一步利用慢病毒成功构建稳定干扰 SIRT1 的 ADSCs，结果表明 siSIRT1-ADSCs 的外泌体中 CXCL12 水平与 ADSCs 外泌体相比显著下调。同时，利用 ADSCs，SIRT1-ADSCs 和 siSIRT1-ADSCs 的外泌体处理小鼠 MEFs，通过划痕实验检测各处理组 MEFs 的迁移能力以及 western blot 检测 MEFs 中 CXCR4 的蛋白表达水平。结果表明 siSIRT1-ADSCs 外泌体处理组 MEFs 的迁移能力显著低于另外两组，SIRT1-ADSCs 组最高。上述结果提示，外泌体的创伤修复能力可能与外泌体中 CXCL12 的水平有关。综上所述，我们的假设是基于前期开展的重要研究结果。

3) 技术方法成熟：课题组成员熟练掌握小鼠皮肤创伤模型建立、慢病毒载体构建、免疫共沉淀、片段缺失融合蛋白构建、小鼠 EPCs 和 MEFs 的分离培养鉴定、相关基因 mRNA 含量和蛋白表达水平检测等实验技术，且有从事相关研究的工作经验。

4) 设备平台强大：项目申请者所在的中国医学科学院北京协和医院是集医疗、教学、科研于一体的全国排名第一的三甲综合医院，整形美容外科是卫健委国家临床重点学科，拥有博士研究生培养点和临床博士后流动站。科研力量雄厚，具备一流的临床样品标本库。拥有成熟运作的相关技术平台及激光共聚焦显微镜，能够提供项目研究中病理学、免疫组织化学杂交、实时定量反转录 PCR 及多重免疫荧光标记技术所需的全部硬件设施，能保障本项目的顺利进行。

（三）预期研究结果及可考核的验收指标

- （1）发表 SCI 论文 2 篇，中文核心期刊论文 2 篇，国内会议论文 1 篇，国际会议论文 1 篇。
- （2）证实 SIRT1 基因修饰的 ADSCs 外泌体对皮肤创伤的修复作用优于不经修饰的 ADSCs 外泌体，确定其理论基础。
- （3）明确创伤愈合过程中 SIRT1/CXCL12/CXCR4 的相互作用机制。
- （1）培养博士研究生毕业 2 名，硕士研究生毕业 2 名。
- （2）晋升副高级职称 1~2 人。

（四）年度目标和年度研究计划

第 1 年度（2019 年）

1、年度目标

2019.01—2019.12: 完成小鼠模型的建立和几株细胞的分离工作。

2、年度研究计划

2019.01-2019.05 细化实验方案，根据实验需求订购试剂耗材；

2019.06-2019.09 购买及饲养实验小鼠，尝试构建小鼠皮肤创伤模型，检测相应指标，评估模型建立情况，最终构建稳定的动物模型；

2019.10-2019.12 分离小鼠 ADSCs、EPCs 和 MEFs 细胞，利用流式细胞仪及免疫荧光鉴定三种细胞，细胞鉴定合格后扩大培养，用于后续研究。

本年度研究计划处于准备阶段，为后续实验提供所需试剂耗材、稳定的动物模型及相应细胞。

3、年度考核指标

2019.01—2019.12: 对构建的小鼠模型分离的原代细胞鉴定结果进行评估。

第 2 年度（2020 年）

1、年度目标

2020.01—2020.12: 完成 SIRT1 和 CXCL12 干扰和过表达载体构建，外泌体分离和鉴定。

2、年度研究计划

2020.01-2020.04 构建 SIRT1 干扰质粒、SIRT1 过表达质粒、CXCR4 干扰质粒，将三种质粒包被成慢病毒；

2020.05-2020.06 使用 SIRT1 干扰及过表达慢病毒转染 ADSCs 细胞，制备 SIRT1 稳定干扰及过表达 ADSCs 细胞株，用于后续体内实验；使用 CXCR4 慢病毒转染 EPCs 和 MEFs 细胞，制备 CXCR4 稳定干扰 EPCs 和 MEFs 细胞株，用于后续体外实验；纯化并鉴定 ADSCs、SIRT1-ADSCs、siSIRT1-ADSCs 三种细胞株外泌体，用于后续体内及体外实验；

2020.07-2020.12 使用小鼠皮肤创伤模型，体内实验明确 SIRT1-ADSCs 外泌体促进创伤组织修复的功能，检测相关基因表达，筛选出 SIRT 下游靶基因 CXCL12。

本年度研究计划从动物水平明确 SIRT1-ADSCs 外泌体对创伤具有修复功能，筛选 SIRT1 下游靶基因，为后续 SIRT1 调控机制研究指明方向。

3、年度考核指标

2020.01—2020.12: 对构建的 SIRT1 和 CXCL12 干扰和过表达载体及分离的外泌体进行评估。

第 3 年度（2021 年）

1、年度目标

2021.01—2021.12: 完成对相关分子机制进行研究，撰写论文。

2、年度研究计划

2021.01-2021.02 使用 CXCR4 稳定干扰 EPCs 和 MEFs 细胞株，体外细胞实验研究 SIRT1-ADSCs 外泌体对两种细胞的生物学功能影响，检测相关基因表达，细胞层面确认 SIRT1 对 CXCL12 的调控关系；

2021.04-2021.06 免疫共沉淀、Western Blot 检测等多种生化手段解析 SIRT1 调控 CXCL12 的分子机制；

2021.07-2021.12 对课题关键性实验再次重复，整理实验数据，分析实验结果，撰写论文并投稿，根据投稿反馈意见对相关实验做进一步补充。

本年度研究计划从细胞水平确认 SIRT1 外泌体功能，解析 SIRT1 调控皮肤创伤修复的分子机制，并完成论文发表。

3、年度考核指标

2021.01—2021.12: 发表论文进行考核，SCI 论文 2 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	王智	1979-01-11	主治医师	博士	整形外科学	项目负责人, 细胞实验和动物实验操作	8	中国医学科学院北京协和医院
2	王友彬	1968-10-01	教授	博士	整形外科学	体外细胞实验操作和指导	4	中国医学科学院北京协和医院
3	黄渭清	1967-09-25	教授	博士	整形外科学	动物实验操作和指导	6	中国医学科学院北京协和医院
4	宋可新	1976-09-29	主治医师	博士	整形外科学	动物模型制作和样本采集	4	中国医学科学院北京协和医院
5	冯程	1986-01-28	医师	博士	整形外科学	外泌体分离、质粒载体构建和转染	6	中国医学科学院北京协和医院
6	刘浩	1990-12-20	在读博士生	硕士	整形外科学	质谱分析、免疫组化、流式细胞分析	6	中国医学科学院北京协和医院

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

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	
直接费用	支出科目	金额	支出内容及计算依据
	1、设备费	0	
	（1）设备购置费	0	无
	（2）其他设备费	0	无
	2、材料费	11.5	（1）抗体 4.5 万元； （2）蛋白提取试剂盒 1.5 万元； （3）RT-PCR 检测试剂盒 1 万元； （4）细胞培养试剂与耗品 2 万元； （5）外泌体分离试剂盒 2.5 万元；
	3、测试化验加工费	4.5	（1）免疫组化检测 1 万元； （2）流式细胞仪测试 0.5 万元； （3）载体构建 1.5 万元； （4）小鼠模型 1.5 万元。
	4、燃料动力费	0	无
	5、差旅费	1.2	用于出席相关领域国内会议的往返交通费、食宿费、注册费等。
	6、会议费	0	无
	7、国际合作与交流费	0	无
	8、档案/出版/文献/信息传播/知识产权事务费	0.5	出版费、资料费、印刷费、软件购买费、文献检索费、专利申请等费用。
	9、劳务费	1.6	用于支付直接参与项目的研究人员的劳务费。
	10、咨询费	0.2	聘请专家参与项目研讨。
	11、其他费用	0	无
间接费用	12、绩效支出	0.3	用于课题组成员的绩效发放。
	13、其他费用	0.2	单位管理费、水电费、供暖费等。

五、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。

六、项目负责人承诺书

我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；公开发表的论著、论文等相关资料涉及本资助项目内容时，按规定进行标注。

项目负责人（签字）：

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	北京市海淀区四季青路 7 号院 2 号楼 3 层 311 室				
	邮政编码	100195				
	电 话		传 真			
	电子信箱					
乙 方	单位名称	中国医学科学院北京协和医院			单位公章 年 月 日 财务章 (预留银行印鉴)	
	统一社会信用代码	110000000852				
	地 址	东城区帅府园 1 号北京协和医院科研处				
	邮政编码	100730				
	联系人	刘玉霞	电 话	69155715		
	手 机	15210903116	传 真	69156874		
	电子信箱	pumchkyc@126.com				
	帐户名称	中国医学科学院北京协和医院				
	开户银行	中国建设银行北京朝阳支行				
	帐 号	11001018700059999999				
	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		