

江苏省科技项目合同

计划类别 社会发展--面上项目

项目编号 BE2020775

项目名称 间质干细胞来源外泌体转运14-3-3 ζ 促进LSEC自噬抑制肝
窦毛细血管化

项目类别 公共卫生

起止年限 2020年12月至2023年6月

项目负责人 谭友文 电话及手机 13914567088

项目联系人 王金兰 电话及手机 13952865898 80578876

承担单位 镇江市第三人民医院

单位地址 镇江市戴家门300号 邮政编码 212005

项目主管部门 镇江市科学技术局

江苏省科学技术厅

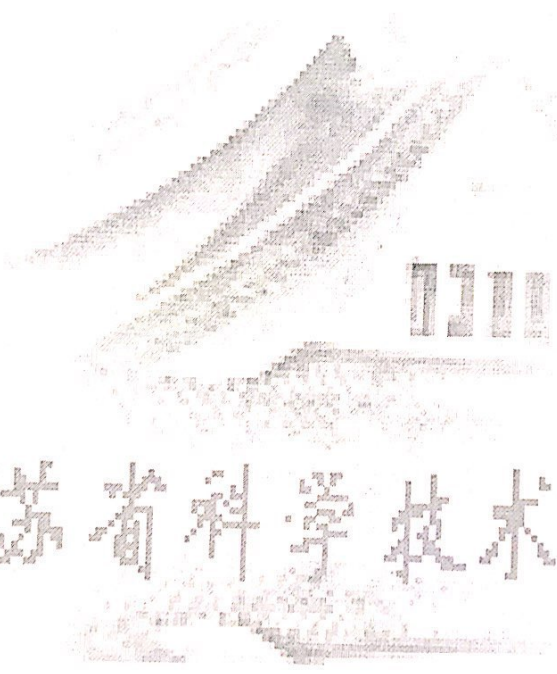
二〇二〇

说明:

1、本合同适用于省基础研究、重点研发、创新能力建设、国际科技合作、软科学研究等计划。

2、合同条款中所有空项都需如实填写,确无此项的,请在该栏中打“/”或在空白处写“无”。

3、乙方盖章必须是单位公章,部门章无效。



江苏省科学技术厅

委托单位（甲方）：江苏省科学技术厅

法定代表人：王秦

地址：南京市北京东路 39 号

邮政编码：210008

承担单位（乙方）：

承担单位：镇江市第三人民医院

统一社会信用代码：12321100468658318W

法定代表人：徐青龙

地址：镇江市戴家门 300 号 邮政编码：212005

项目负责人：谭友文

电话：13914567088 传真：

电子邮件：zjsywj1@126.com

保证单位（丙方、项目主管部门）：镇江市科学技术局

法定代表人（科技局局长）：蔡萍

地址：镇江市南徐大道 68 号市行政中心 1 号楼 9 楼 邮政编码：

212001

甲方批准由乙方承担省科技计划《间质干细胞来源外泌体转运 14-3-3 ζ 促进 LSEC 自噬抑制肝窦毛细血管化》项目的研究开发或建设任务。依据《中华人民共和国合同法》的规定，为明确甲、乙、丙三方

的权利和责任，保证项目的顺利实施和科研经费的合理使用，签订本合同。

第一部分 项目条款

一、项目的目标和主要研究内容

要解决的主要技术难题和问题，项目研究的创新点和内容等。



江苏省科学技术厅

- 1、工程化 MSC-ex 的分离纯化、表征及生物安全性评价
- 2、研究工程化 MSC-ex 对肝窦毛细血管化及肝纤维化的抑制作用
- 3、工程化 MSC-ex 转运 14-3-3 ζ 促 LSEC 自噬的作用及靶向性
- 4、探讨自噬降解泛素化 YAP 抑制 ANGPT2 表达和肝窦血管化的机制

江苏省科学技术厅

二、项目验收内容和考核指标

项目验收和考核突出高质量成果和创新绩效,具体包括 1、主要技术指标:如形成的专利、新技术、新产品、新品种、新装置、论文代表作、专著等数量、指标及其水平等;2、主要经济指标:如技术及产品所形成的市场规模、效益等;3、项目实施中形成的示范基地、中试线、生产线及其规模等;4、其他应考核的指标。

工程化 MSC-ex 的分离纯化、表征及生物安全性评价 研究工程化 MSC-ex 对肝窦毛细血管瘤化及肝纤维化的抑制作用 工程化 MSC-ex 转运 14-3-3 ζ 促 LSEC 自噬的作用及靶向性 探讨自噬降解泛素化 YAP 抑制 ANGPT2 表达和肝窦血管瘤化的机制

1、建立 HA 和 (或) 14-3-3 ζ 工程化 MSC-ex 的新方法

阐明 14-3-3 ζ 在 MSC-ex 促 LSEC 自噬中的作用,阐明 β -TrCP 泛素化修饰 YAP 在 MSC-ex 促进作用,促进 LSEC 自噬抑制 YAP/ ANGPT2 中的作用及机制

2、MSC-ex 的分离纯化、表征及生物安全性评价

评价 14-3-3 ζ MSC-ex 对小鼠肝窦毛细血管瘤化,分析比较 MSC-ex 和 HA-MSC-ex 的促自噬作用

,探讨自噬降解泛素化 YAP 抑制 ANGPT2 表达和肝窦血管瘤化机制

3、发表 SCI 收录论文 3 篇,其中 1 篇研究性论文 IF>8; 申请国家专利 1-2 项; 培养硕士研究生 4 名,博士研究生 2 名。

4、阐明 14-3-3 ζ 促自噬降解 β -TrCP 泛素化 YAP,抑制 ANGPT2 表达的作用。为治疗肝纤维化提供实验依据和新的方法。

5、明确 MSC-ex 对 LSEC 的自噬促进作用及靶向性。

建立稳定高效的 MSC-ex 抑制肝窦毛细血管瘤化的方法,探明 MSC-ex 转运 14-3-3 ζ 促进 LSEC 自噬,抑制 ANGPT2 表达和肝窦毛细血管瘤化的分子机制。

三、项目进度及考核指标

时间	考核指标
2020 年 12 月 至 2021 年 3 月	课题组研讨, 前期准备, 购置实验耗材, 构建相关载体
2021 年 4 月 至 2021 年 6 月	动物饲养、肝纤维化模型构建, MSC-ex 生物安全性评价
2021 年 7 月 至 2021 年 9 月	F1-F2 肝纤维化模型构建与评价
2021 年 10 月 至 2021 年 12 月	转基因小鼠肝纤维化模型构建
2022 年 1 月 至 2022 年 3 月	转基因小鼠肝纤维化模型构建

2022 年 4 月 至 2022 年 6 月	Cre-MS-ex 构建,
2022 年 7 月 至 2022 年 9 月	HA-MS-ex 的 LSEC 靶向性及自噬性研究
2022 年 10 月 至 2022 年 12 月	自噬降解泛素化 YAP 的作用, YAP/ANGPT2 调控血管形成作用
2023 年 1 月 至 2023 年 3 月	数据整理, 撰写论文
2023 年 4 月 至 2023 年 6 月	完成结题报告

四、项目承担单位、参加单位及主要研究开发人员

(一) 项目承担单位、参加单位

项目承担单位	镇江市第三人民医院		
项目合作单位	单位名称		国家或地区
	单位一		
	单位二		
	单位三		
	单位四		
	单位五		
境外合作单位	单位一		
	单位二		

江苏省科学技术厅

(二) 项目主要研究开发人员

姓名	性别	出生年份	职称	学位	从事专业	本项目工作时间(%)	工作单位	项目分工	国别	身份证件号码
项目负责人										
谭友文	男	1969	正高	博士	感染病	8	镇江市第三人民医院	负责	中国	321102196903101955
项目骨干 (不超过 5 人, 不含项目负责人)										
周兴蓓	男	1983	中级	博士	检验	8	镇江市第三人民医院	动物实验	中国	321111198306115326
何聪	女	1990	初级	硕士	感染病	8	镇江市第三人民医院	分子生物	中国	360728199001120010
史浚缦	男	1993	其他	硕士	感染病	8	镇江市第三人民医院	分子生物	中国	320282199301043110
王佳敏	男	1996	其他	硕士	内科学	10	镇江市第三人民医院	分子生物	中国	33100419961207032X
参加人员 (不超过 10 人)										
张凯	男	1990	初级	学士	感染病	6	镇江市第三人民医院	数据处理	中国	321181199003064916
刘化甲	男	1987	初级	学士	感染病	6	镇江市第三人民医院	数据整理	中国	230221198704151619

五、项目经费预算

(一) 项目经费来源预算

经费单位: 万元

	预算数	2020 年	2021 年	2022 年	2023 年	备注
合计	100	50	20	20	10	
1、省拨款	50	50	0	0	0	
2、部门、地方配套	0	0	0	0	0	
3、承担单位自筹	50	0	20	20	10	
4、其他来源	0					

(二) 项目经费支出预算

经费单位: 万元

	预算数	其中: 省拨款	备注
(一) 直接费用	97.5	49	
1、设备费			
2、材料费/测试化验加工费/燃料动力费	65	33	细胞培养、化学试剂、抗体、耗材
3、差旅费/会议费/国际合作交流费	10	5	参加国内外会议
4、劳务费/专家咨询费	10	5	研究生劳务费
5、其他费用	12.5	6	文献检索、查新费、版面费
(二) 间接费用	2.5	1	
6、管理费	2.5	1	医院管理
7、绩效支出			
合计	100	50	

注: 1.项目经费支出决算的时间跨度, 应从项目立项(以项目立项公示为起点)至项目完成(提交验收申请)为止。因财政拨款到位较迟由项目承担单位垫资, 或项目实施超过合同期限但不超 1 年的, 期间项目经费支出均纳入决算范围。

2.对省科技计划项目产生的代表作和“三类高质量论文”的发表支出可在省拨款中按规定据实列支, 其他论文发表支出均不允许列支。

第二部分 一般条款

一、项目实施中的廉政风险防控

为保证项目实施的质量和效果，省、市、县、园区的科技管理部门及有关单位应严格执行廉洁自律准则等党规党纪，共同做好项目实施全过程的廉政风险防控和反腐败工作，接受社会监督；项目承担单位法定代表人和项目负责人对项目财政资金使用管理负主体责任。

二、缔约各方的权利、义务

1. 缔约各方要按照国家、省有关科技计划与经费管理的规定，认真履行本合同的各项条款，保证任务目标按时完成。

2. 甲方应按合同约定的金额提供项目研究开发经费，有权监督、检查合同履行情况。合同履行期间，甲方有权直接组织或委托丙方检查、监督乙方对本合同的履行情况。乙方完成项目研究开发任务后，由甲方负责或委托进行验收。

3. 乙方应严格履行合同义务，为项目实施提供承诺的技术与条件保障，包括财务管理、成果管理、科技档案管理服务保障等合同约定的义务。项目申请验收前乙方应提交科技报告，未提交科技报告的项目不予验收。乙方应加强项目实施成果的转化，自项目验收后一年内未实施转化的项目，甲方有权责成乙方将成果在省技术产权交易市场挂牌转让。

4. 丙方应按合同约定的金额提供项目配套经费，并进行相关的协调和监督，完成甲方委托的相关任务。

5. 甲方有权根据乙方项目计划进度完成情况进行检查，并决定是否拨付或调整后续经费。

6. 项目实施期间，乙方项目负责人结合项目实施进展情况可对科研团队进行调整，在不降低研究目标的前提下可自主调整研究方案和技术路线，由乙方自主进行备案。在省级科研项目总预算不变的情况下，乙方项目负责人可根据科研活动实际需要自主调整直接费用全部科目的经费支出，不受比例限制，由乙方办理调剂手续。严禁弄虚作假、截留和挪用项目经费等违反财经纪律的行为。

7. 在项目实施过程中, 实行重大事项报告制度。发生如下事项的, 乙方应在 5 个工作日内, 以书面的形式经丙方告知甲方:

- (1) 项目执行过程中实现重大突破的;
- (2) 乙方或其他参加单位发生重大变故、出现财务状况危机;
- (3) 乙方或其他参加单位的研究进度严重滞后的;
- (4) 主要研究人员不能正常履行职责, 严重影响课题研究工作的;
- (5) 乙方或其他参加单位发生分立、合并、企业重组、并购等情况的;
- (6) 其他应该告知甲方的与本合同项目实施、管理有关的事项。

8. 乙方是科学数据管理责任主体, 应根据《江苏省科学数据管理实施细则》要求, 建立健全本单位科学数据相关管理制度, 确保数据质量。

9. 乙方应切实加强作风和学风建设, 赋予科研人员更大自主权, 营造风清气正的科研环境, 激发科研人员创新创造活力。

10. 乙方应落实《关于改进科技评价破除“唯论文”不良导向的若干措施(试行)》相关要求, 加强对在省科技计划项目省拨经费中列支论文发表情况的核验。

11. 甲、乙、丙各方对项目合同及其他技术资料负有保密责任, 甲方有权因非商业目的使用乙方及其项目的信息(涉及乙方商业秘密的除外)。

三、科研诚信管理

1. 甲方及丙方严格按照科研诚信要求, 加强对乙方及相关科研人员科研诚信管理, 对项目实施过程中的违背科研诚信要求的行为进行严肃查处。

2. 乙方应切实履行科研诚信建设的主体责任, 建立健全本单位学术论文发表诚信承诺制度、科研过程可追溯制度、科研成果检查和报告制度等成果管理制度; 对本项目形成的重要论文等科研成果的署名、研究数据真实性、实验可重复性等进行诚信审核和学术把关。

3. 乙方应督促项目参加人员坚守底线、严格自律、恪守科学道德准则, 遵守科研活动规范, 践行科研诚信要求。乙方应加强对项目参加人员的科研诚信教育, 对在科研诚信方面存在的倾向性、苗头性问题的, 应当及时开展科研诚信诫勉谈话, 加强教育; 情节较严重的, 应按程序及时调整出项目团队。

4. 在项目实施过程中, 对乙方及其相关科研人员有严重违背科研诚信要求的行为, 甲方和相关部门应对乙方采取约谈主要负责人、停拨或核减经费、记入科研诚信严重失信行为数据库、移送至有管理权限的纪检监察部门处理等措施。

四、违约责任

1. 甲方未能按合同约定的经费数提供经费, 导致乙方研究开发工作延误的, 应允许合同规定的研究开发工作完成期限相应顺延。

2. 乙方无正当理由未履行合同时, 甲方有权停拨、追缴部分或全部省拨经费, 由此造成的经济损失由乙方承担。因乙方原因, 导致研究开发工作未能达到合同约定指标的, 乙方应采取措施尽快使项目达到合同预定要求, 并承担由此而增加的费用。因不可抗力导致资助项目无法完成的, 乙方应当根据经费审计结果退回应当予以退回的财政性资金。如乙方不退回, 则由丙方负责通过催收、诉讼等方式追回应当予以退回的财政性资金。

3. 乙方违反经费使用规定或经甲方检查确认计划进度不符合合同约定的, 甲方有权减拨或停拨后续经费; 情节严重的, 或因乙方主观原因导致项目无法正常实施的, 甲方有权解除本合同, 乙方应返还甲方已拨付的全部经费。

4. 在履行本合同过程中, 确因在现有水平和条件下难以克服的技术困难, 导致研究开发部分或全部失败造成损失的, 经甲方确认风险责任后, 甲方在其拨款额度范围内承担损失。

5. 乙方已勤勉尽责、但因技术路线选择失误或其他不可预见原因不能履行合同义务时, 应及时通知甲、丙方, 并提供相关证明。经甲方审核同意, 可以免除乙方违约责任。

五、合同的变更、解除和争议解决

1. 发生下列情况之一, 缔约方应当协商变更或解除合同:

(1) 由于不可抗力或意外事故导致合同无法履行或部分无法履行的;

(2) 由于项目目标已被他人先行实现, 有关成果已被申请专利或公开, 继续履行合同已无必要的;

(3) 由于乙方未按合同要求履行合同,或是由于其他原因,导致项目在检查或评估中被淘汰的。

2. 合同一方发生合并、分立或更名的,由变更后的单位继受或分别继受变更一方在合同中的权利义务。本合同缔约各方可以根据前述主体变更情况签署本合同的变更协议。

3. 乙方完成任务目标并通过验收(结题)后,结余资金不再收回,留归项目组用于后续科研活动直接支出或由项目承担单位统筹用于科研活动直接支出。

4. 当省科技计划的相关管理办法发生变化与调整时,三方按照新的要求执行。

5. 合同在履行过程中发生争议的,缔约各方应通过友好协商的方式解决。如协商不成时,缔约各方有权向南京仲裁委员会申请仲裁裁决。

六、附则

1. 乙方在项目申报时签署的《科研诚信承诺书》作为合同附件。项目如涉及多家(包含两家)单位参加,乙方应在签订本合同前与有关单位就合作任务和知识产权分配等问题签订有关合同或协议(仅委托其他单位进行常规试验、检测,提供社会化科技服务和少量辅助科研工作的情况除外),同时作为本合同的附件。项目实施过程中,甲方有关同意项目合同调整的批复一并作为本合同附件。

2. 有关合同的未尽事宜,按照国家、省有关科技计划与经费管理的规定执行。

3. 本合同正本一式六份(甲、乙、丙方各执2份),自缔约各方签章后生效。

4. 本合同有关词语、条款的含义,如无特别说明的,按照科技项目管理的通常认识和理解予以解释。

第三部分 附加条款

签订合同各方

甲方:

法定代表人或委托代理人 (签字)



项目主管处室负责人 (签字)



项目主管处室经办人 (签字)



乙方:

承担单位法定代表人或委托代理人 (签字)

项目负责人 (签字)



开户银行、帐号

建行镇江润州支行

3205 0175 5336 0000 0159

丙方:

法定代表人或委托代理人 (签字)



课题任务书编号:	密级:
GWLM202002	普通

中国公共卫生联盟（第一批）

课题任务书

项 目 名 称: MSC-exosome 在肝纤维化诊疗中的作用与机制研究
 项目申请方向: 研究方向*感染性疾病
 项目承担单位: 江苏大学附属镇江三院
 项目负责人: 谭友文
 联 系 人: 王金兰
 联 系 电 话: 13952865898
 起 止 年 限: 2021 年 01 月 到 2022 年 12 月

中国公共卫生联盟

二〇二零年十二月

一、研究目标与任务

1. 研究目标:

(1) 建立稳定高效的14-3-3 ζ -MSC-exosome抗肝纤维化的方法,为肝纤维化的治疗提供新的模式和研究策略。

(2) 探明14-3-3 ζ -MSC-exosome抗肝纤维化的分子机制,为基于14-3-3 ζ -MSC-exosome抗肝纤维化提供实验和理论依据。

研究意义:

为14-3-3 ζ -MSC-exosome的产品化提供实验依据,为目前人们所关注的重大疾病肝硬化的治疗提供一个可选择的有效方法和新的思路。

2. 研究内容:

(1) 14-3-3 ζ -MSC-exosome的分离纯化及生物安全性评价

① 采用14-3-3 ζ 基因腺病毒载体转染MSC(14-3-3 ζ -MSC),分离纯化14-3-3 ζ -MSC-exosome并鉴定其组成及生物学作用,与MSC-exosome生物学特性比较。

② 参照治疗用生物制品临床前安全性评价技术审评一般原则及生物制品非临床安全性评价的CASE by CASE原则对14-3-3 ζ -MSC-exosome的安全性进行综合评价。

(2) 建立稳定的14-3-3 ζ -MSC-exosome抗肝纤维化的方法,并对其疗效作出评价

① 体外分离活化的肝肌成纤维细胞,观察并比较MSC-exosome或14-3-3 ζ -MSC-exosome对肝肌成纤维细胞的活化及胶原合成的抑制作用。

② 构建小鼠肝纤维化模型,不同途径接种MSC-exosome或14-3-3 ζ -MSC-exosome,体内观察并比较不同时间及不同浓度MSC-exosome或14-3-3 ζ -MSC-exosome抗肝纤维化及抑制胶原沉积的效果,寻找14-3-3 ζ -MSC-exosome抗肝纤维化的有效途径、时间及剂量。建立稳定高效的14-3-3 ζ -MSC-exosome抗肝纤维化的方法。

(3) 14-3-3 ζ -MSC-exosome体内抗肝纤维化的长期安全性分析

课题承担单位基本信息			
单位名称	江苏大学附属镇江三院		
单位性质	☒ 医疗机构	☐ 科研院所	☐ CDC
单位级别	☐ 省级	☒ 地市级	☐ 县级
单位地址	镇江市润州区戴家门 300 号		
邮政编码	212003	单位传真	051188970796
财务账号	32050175533600000159		
电子邮箱	tyw915@sina.com		
单位负责人	徐青龙	联系方式	
课题负责人	谭友文	联系方式	13914567088
科管联系人	王金兰	联系方式	13952865898
课题基本信息			
课题名称中文	MSC-exosome 在肝纤维化诊疗中的作用与机制研究		
课题名称英文	Role and mechanism of MSC exosomes in diagnosis and treatment of liver fibrosis		
申请金额(元)	5万	起止年月	2021 年 01 月—2022 年 12 月
项目申请方向	☒ 感染性疾病 ☐ 医院护理 ☐ 医院管理与文化建设		
预期成果	☐ 新技术 ☐ 新产品 ☐ 新方法 ☐ 技术标准 ☐ 专利 ☒ 论文 ☐ 专著 ☐ 计算机软件 ☐ 其他_____		
课题摘要 (500 字以内)	我们前期已发现 MSC-exosome 转移的 14-3-3ζ 与 YAP 核定位和 LOXL2 表达具有相关性,本研究将首先结合肝纤维化模型,按照治疗用生物制品临床前安全性评价技术审评一般原则及生物制品非临床安全性评价的 CASE by CASE 原则对 MSC-exosome 和 14-3-3ζ-MSC-exosome 的安全性及体内外生物学特性进行综合评价,并对使用剂量、作用时间、途径等作进一步研究,以保证治疗更加有效;结合 MSC-exosome 抑制肝肌成纤维细胞活化及胶原合成的细胞模型,采用 pull-down、Co-IP 等技术研究 14-3-3ζ 对于 YAP 核定位的调控作用,采用双萤光素酶报告基因系统、Ch-IP 等技术研究 YAP 核定位对于 LOXL2 的转录调控作用,明确 MSC-exosome 转移的 14-3-3ζ 抗肝纤维化的		

(1) 脐带MSC-exosome 的分离、鉴定、标记 (已完成)

① 脐带MSC-exosome 的分离 参照本课题组已建立的脐带MSC 的分离方法培养脐带MSC (Qiao C, Yan Y, et al. *Cell Biol Int*. 2008, 32(1):8-15.), 无血清培养 48h 后收集上清, 经 100 000Da MWC0 超滤离心管, 离心得到含 exosome 的浓缩液。将浓缩液移至蔗糖/D2O 密度垫上, 4℃, 100 000g 离心 60 min, 收集底部 2 ml 的缓冲垫 (含 exosome) 用 PBS 稀释后, 置入 100 000Da MWC0 再次超滤离心, 最后将收集的 exosome 浓缩液定量, 0.22 μ m 滤膜过滤除菌, 测定浓度, 分装后于 -80℃ 冷藏备用。

② 脐带MSC-exosome 的鉴定 ①透射电镜观察一般形态 取悬置均匀的 exosome 溶液, 3%磷钨酸溶液负染后电镜下观察 exosome 形态, 随机选取 20 个 exosome, 根据标尺记录其直径; ②流式细胞术检测表面标志 以 FITC 或 PE 标记 IgG 作为对照, FITC 或 PE 标记的抗体检测 exosome 表面标志 CD9、CD29、CD44、CD81、整合素 α 4 和 α 5 等表达; ③Western blot 检测蛋白表达 检测 exosome 相关蛋白 CD9、CD81 等的表达。

③ 脐带MSC-exosome 的 CM-Dil 染色 亲脂性红色荧光染料 CM-Dil 按 5 μ L/mL 的比例加入 MSC-exosome 中, 充分混匀后于 37℃ 避光温育 30 min, 然后转移至 100-kDa MWC0 超滤离心管, 并加入 10 倍体积的 PBS, 4℃、1 000 $\times$ g 离心 30 min 以洗去未与 hucMSC-Ex 结合的染料。荧光显微镜、流式细胞仪检测标记效率。

(2) 14-3-3 ζ -MSC-exosome 的分离纯化 (已完成)

① 重组穿梭质粒 pAdTrack-CMV-14-3-3 ζ 的构建

经 TA 克隆测序, 阳性质粒和穿梭载体 pAdTrack-CMV 同时用 Xba I、Sal I 双酶切, 紫外光下切胶回收。纯化后, 将目的基因片段与载体经 T4 DNA 连接酶连接过夜, 将 Akt 片段插入穿梭质粒中的相同位点获得重组穿梭质粒。重组穿梭质粒转入大肠杆菌 DH5 α 后扩增, 经 Xba I、Sal I 酶切及 PCR 验证挑取阳性克隆, 获得重组穿梭质粒 pAdTrack-CMV-14-3-3 ζ 。同时构建不含融合基因的空腺病毒质粒 pAdGFP, 作为对照, 方法同上。

② 重组腺病毒 Ad-14-3-3 ζ 的转染包装及扩增

② 14-3-3 ζ -MSC-exosome 体外对 HSC 活化和胶原合成的抑制作用 活化的肌成纤维细胞中加入 CM-Dil 标记 14-3-3 ζ -MSC-exosome 共培养, 同时设立 PBS、MSC-exosome 对照组, 在作用不同时间点收集 HSC, 使用荧光显微镜检测 HSC 内 PKH-26 标记 MSC-exosome; 3H-TdR 掺入法和流式细胞术检测 HSC 细胞增殖和细胞周期; 透射电镜观察细胞超微结构; Real-Time PCR、Western blot 和免疫组化检测 HSC 活化相关基因 α -SMA、TIMP-1、MMP-2、FAP、cyclin-D1、TGF- β 1、I 型和 III 型胶原的表达。综合评价并比较 MSC-exosome 或 14-3-3 ζ -MSC-exosome 体外共培养对 HSC 活化和胶原合成的抑制作用。



技术路线 (一)

5) 建立稳定高效的14-3-3 ζ -MSC-exosome体内注射抗肝纤维化的方法

① 14-3-3 ζ -MSC-exosome注射的有效剂量 (技术路线2) 复制已建立的四氯化碳 (CCL4) 诱导的小鼠肝纤维化模型 (Yan Y, et al. Liver Int, 2009, 29(3):356-65.), 按随机数字表法分组, 设立生理盐水、MSC、MSC-exosome (50 μ g、

2w、4w和8w分别尾静脉注射相应的200 μ l 生理盐水和生理盐水exosomes悬液，蛋白含量分别为①中明确的最佳剂量。每隔1周每组取2只小鼠按①中指标观察exosomes治疗后肝纤维化的修复情况。

技术路线（三）



③ 14-3-3 ζ -MSC-exosome抗肝纤维化注射的其他有效途径（技术路线4） 选取②中明确exosome注射的最佳剂量，③中明确的最佳时间，分别通过尾静脉、腹腔、灌胃、肝门静脉、肝被膜下途径注射14-3-3 ζ -MSC-exosome，按照②中指标观察观察exosomes治疗后肝纤维化的修复情况。

技术路线（四）

综合评价评价并比较MSC-exosome或14-3-3 ζ -MSC-exosome体内抗肝纤维化的有效剂量、时间、途径及效果。

9) 探讨LOXL2、YAP的相关性及在肝纤维化进展和疗效判断中的价值

① 将MSC-exosome、14-3-3 ζ -MSC-exosome及14-3-3 ζ 敲减MSC-exosome分别与(4)中活化的肌成纤维细胞共培养, Real-Time PCR、Western blot 等技术检测YAP核定位、LOXL2基因的表达。体外分析YAP核定位与LOXL2表达的相关性。

② 结合临床肝纤维化标本, 探讨LOXL2、YAP相关性以及在肝纤维化进展和疗效判断中的价值

征得患者知情同意后, 收集30例确诊肝纤维化患者抗纤维化治疗前后肝组织和血液标本, 同时完成临床病案室资料的查询、登记与整理。肝纤维化患者肝穿刺后取部分肝组织标本进行常规病理切片用于病理学分析及免疫组织化学染色, 另取部分液氮冻存备用。Western blot 和免疫组化等检测肝组织LOXL2、整合素表达和YAP核转位。分析纤维化肝组织中LOXL2、YAP核转位的相关性; 结合临床病理资料评价LOXL2/YAP检测在临床纤维化进展和疗效判断中的特异性和应用价值。所有临床实验标本采集均经医学伦理委员会批准(见附件)。

4. 创新点

(1) 关键蛋白14-3-3 ζ 修饰脐带MSC-exosome治疗肝纤维化

相对于脐带MSC, 脐带MSC-exosome具有颗粒更小、靶向结合、保存稳定等优点, 能特异性地作用于受损组织, 且其脂质双分子膜结构能阻止各种酶类对其生物分子的降解, 从而达到高效修复的目的。此外, 脐带MSC-exosome还可能成为理想的药物载体发挥更广泛的生物学功能。因此, 以14-3-3 ζ 蛋白修饰的脐带MSC-exosome为代表的干细胞成分治疗将可能是肝纤维化等组织损伤治疗领域重要手段之一, 具有鲜明的特色。

(2) 脐带MSC-exosome抗肝纤维化的新机制: 14-3-3 ζ 通过exosome为转运载体靶向阻滞YAP核定位, 抑制YAP对于LOXL2的转录激活作用, 降低胶原合成与沉积

目前, 脐带MSC-exosome抗肝纤维化的机制尚不清楚, 已有研究发现LOXL2和YAP分子与胶原合成与沉积密切相关(*Nat Med*, 2011, 17(5):552-3.; *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2015, 308(4): L344-57.)。基于前期的研究及相关分析, 我们推测脐带MSC-exosome来源的14-3-3 ζ 蛋白对YAP入核和LOXL2表达起关键作用,

阐明 14-3-3 ζ -MSC-exosome 转移 14-3-3 ζ 抗肝纤维化机制将为临床应用脐带 MSC-exosome 治疗肝纤维化提供新的实验和理论依据。

二、预期成果及考核指标

1. 主要技术指标：如形成的知识产权、技术标准、新技术、新产品、新装置、论文专著等数量、指标及其水平等；

(1) 建立稳定的 14-3-3 ζ -MSC-exosome 抗肝纤维化的方法，对其疗效及体内长期作用的安全性作出评价。

(2) 结合临床肝纤维化组织标本，探讨 14-3-3 ζ ，LOXL2、YAP 的相关性及在肝纤维化进展和疗效判断中的价值。

(3) 基于对 14-3-3 ζ -MSC-exosome 抗肝纤维化的有效剂量、时间及途径的研究，为 MSC-exosome 的产品化提供实验依据，为目前人们所关注的重大疾病肝硬化的治疗提供一个可选择的有效方法和新的思路。

(4) 课题的成果形式主要为论文，发表 SCI 收录论文 3~5 篇，其中 1~2 篇发表在 IF>5 杂志上；申请国家专利 1~2 项；培养博士研究生 2 名，硕士研究生 3 名。

2. 主要经济与社会效益指标：

为 14-3-3 ζ -MSC-exosome 的产品化提供实验依据，为目前人们所关注的重大疾病肝硬化的治疗提供一个可选择的有效方法和新的思路。

3. 项目实施中形成的软件系统、管理方案等；

无

4. 人才队伍建设：

培养博士研究生 2 名，硕士研究生 3 名

5. 其他应考核的指标。

四、课题经费来源与支出预算 (单位:万元)

支出明细	A. 中国公共卫生联盟拨付经费	B. 课题申报单位匹配经费	总经费 [*] (A+B)	测算依据
材料费	3	2	5	动物饲养, 分子生物实验等耗材
测试化验加工费	0.5	1	1.5	动物解剖, 病理阅片等
出版/文献/信息传播/知识产权事务费	0.5	0.5	1	专利申请, 论文发表等
差旅会议国合费				
临床应用费	0.5	1	1.5	研究生劳务费
劳务费 (≤30%)				
专家咨询费 (≤10%)				
间接费用 (=10%)	0.5	0.5	1	
合 计	5	5	10	

总经费=中国公共卫生联盟拨付经费+课题承担单位匹配经费。

五、课题组人员基本情况

负责人	身份证号	性别	职称	学历	业务专业	科室	任务分工	签字
谭友文	321102196903101955	男	正高	博士	感染病	感染病	设计、培训	谭友文
参加人	身份证号	性别	职称	学历	业务专业	科室	任务分工	签字
周兴蓓	321111198306115326	女	中级	硕士	感染病	肝科	病例收集, 动物实验	周兴蓓
何聪	360728199001120010	男	初级	硕士	感染病	肝科	分子生物实验	何聪
王佳敏	33100419961207032x	女	研究生	学士	内科学	肝科	分子生物实验	王佳敏
郑赛男	220182199603220443	女	研究生	学士	内科学	肝科	分子生物实验	郑赛男
时怡纯	320282199606152561	女	研究生	学士	内科学	肝科	分子生物实验	时怡纯

课题
组 人
员

六、任务书签订各方签章

甲方：中国公共卫生联盟（公章）

负责人（签字）：

朱明

2020 年 12 月 23 日

乙方：项目承担单位（公章）

单位法人（签字/签章）：

项目负责人（签字）：

科管负责人（签字）：

财务负责人（签字）：

潘友文

李兰

姚中

2020 年 12 月 23 日

