
嘉兴市科技计划项目合同书

(民生科技创新研究)

申请编号: 2021AY30018

项目名称: NLRP3 炎症小体在膀胱癌中的作用及
机制研究

申请单位: 嘉兴市第二医院 (盖章)

项目负责人: 唐晨野

电话: 057389978623

手机: 13750781238

电子邮箱: john99233@126.com

申请日期: 2021-07-02

归口管理: 市直属

嘉兴市科学技术局

二〇一九年制

填 报 说 明

1. 本合同文本适用于财政科技经费资助的市级科技计划项目。
2. 本合同所列内容应实事求是填写，表达要明确、严谨。
3. 合同中的“项目主要研发内容”应与项目申报书一致，包括拟解决的主要技术问题、难点、主要创新点等。
4. 合同中的“项目主要技术指标、科技创新成果”应与项目申报书一致。包括项目完成时，技术指标达标程度、形成的专利、论文等科技创新成果数量等。
5. 合同中的“项目总经费”应与项目申报预算一致，“项目经费支出预算”按《关于进一步完善市级财政科研项目资金管理等政策的实施意见》（嘉委办[2018]55号）规定的开支范围填写。
6. 合同中的“备注”，包括重要的必须补充说明的内容。

一、项目基本情况

项目名称	NLRP3 炎症小体在膀胱癌中的作用及机制研究					
计划类别	公益类项目		项目类别	民生科技创新研究		
行业分类	卫生、体育和社会福利业 医疗卫生		技术领域	医疗创新技术及基础研究		
学科分类	外科学 泌尿外科学		技术来源	自有技术		
开始日期	2021-01-01		完成日期	2023-12-31		
预期项目总投资(万元)	16		预期总研发投入(万元)	16		
项目承担单位	单位名称	嘉兴市第二医院				
	法人代码	12330400470890343J	所在地	南湖区		
	详细地址	浙江省嘉兴市环城北路 1518 号		邮政编码	314000	
	单位 E-mail	jxeykjk1003@163.com	电话(传真)	0573-82050475		
	联系人	万志伟	手机			
	开户银行	嘉兴市工行东门支行	银行帐号			
合作单位	单位名称	组织机构代码		职责		
项目负责人	姓名	唐晨野	身份证号			
	手机号	13750781238	E-mail	john99233@126.com		
	学历	研究生	学位	硕士		
	职称/职务	主治医师/专科副主任	专业	泌尿外科学		
	所在二级单位		泌尿外科			
项目组	姓名	身份证号码	工作单位	职称/职务	从事专业	项目分工

成员	唐晨野		嘉兴市第二医院	主治医师/专科副主任	泌尿外科	项目总负责，基因敲除及过表达实验，论文修改及投稿
	孙春		嘉兴市第二医院	主治医师	泌尿外科	PCR、Western Blot 实验
	吴云涛		嘉兴市第二医院	主治医师	泌尿外科	细胞增殖、凋亡及侵袭转移相关实验
	汤志灵		嘉兴市第二医院	主任医师/专科主任	泌尿外科	动物移植瘤模型的构建
	郭晓		嘉兴市第二医院	主任医师/科主任	泌尿外科	联系院内、外合作单位，实验监督
	应向军		嘉兴市第二医院	主任医师	泌尿外科	动物状态的观察及记录，膀胱癌标本的获取及指标测定
	陈可安		嘉兴市第二医院	医师	泌尿外科	实验数据分析，撰写论文初稿
	翟孟贺		嘉兴市第二医院	医师	泌尿外科	细胞培养及动物饲养
	王冬蕾		嘉兴市第二医院	主管护师	护理学	实验材料采购及管理

二、研究内容（限 1000 字以内）

主要研究内容: (1) 检测几个膀胱癌细胞系及人正常膀胱上皮细胞的 NLRP3 表达差异, 筛选出相对高表达及低表达的膀胱癌细胞系; 对高表达的膀胱癌细胞系进行 NLRP3 基因敲除, 对低表达的膀胱癌细胞系进行 NLRP3 基因过表达, 检测膀胱癌细胞 NLRP3 表达及增殖、凋亡、侵袭迁移情况。 (2) 将 NLRP3 基因敲除、过表达的膀胱癌细胞分别种植到 BALB/c 裸鼠腹腔中, 观察裸鼠一般状态, 测量肿瘤体积及重量, 检测肿瘤组织 NLRP3 表达及生长、凋亡、侵袭迁移情况。
实施方案: (1) 分别采用实时定量聚合酶链锁反应法 (RT-qPCR)、免疫印迹法 (Western blot) 检测膀胱癌细胞系 (T24、5637、RT4、J82) 及人正常膀胱上皮细胞 (SV-HUC-1) 中 NLRP3 mRNA、蛋白的表达, 筛选出相对高表达及低表达的膀胱癌细胞系。 (2) 采用 CRISPR/Cas9 基因敲除技术对高表达的膀胱癌细胞系进行 NLRP3 基因敲除, 采用慢病毒基因过表达技术对低表达的膀胱癌细胞系进行 NLRP3 基因过表达, RT-qPCR 法检测 NLRP3 mRNA 表达, Western blot 法检测 NLRP3、Caspase-3、Caspase-9、Bcl-2、MMP-3、MMP-9 等蛋白表达, 细胞计数试剂盒法 (CCK-8)、细胞增殖成像分析试剂盒 (EdU 法) 检测细胞增殖, 膜联蛋白 V (Annexin V) -异硫氰酸荧光素 (FITC)/碘化丙啶 (PI) 双标记流式细胞术检测细胞凋亡, Transwell 实验检测细胞侵袭迁移情况。 (3) 将 NLRP3 基因敲除、过表达的膀胱癌细胞分别种植到 BALB/c 裸鼠腹腔中, 观察裸鼠一般状态, 测量肿瘤体积及重量, RT-qPCR 法检测肿瘤组织 NLRP3 mRNA 表达, Western blot 法检测肿瘤组织 NLRP3、Caspase-3、Caspase-9、Bcl-2、MMP-3、MMP-9 等蛋白表达, 末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记法 (TUNEL 法) 观察肿瘤组织细胞凋亡情况。
关键技术: CRISPR/Cas9 基因敲除技术、慢病毒基因过表达技术、细胞增殖检测 CCK-8 法、细胞增殖检测 EdU 法、细胞凋亡检测 TUNEL 法、流式细胞术、Transwell 实验、RT-qPCR、Western blot
创新点: (1) 关于肿瘤与炎症之间相互作用的研究较为广泛。作为目前的一个研究热点, 近年来 NLRP3 炎症小体在肿瘤中作用的研究越来越多, 但其在尿路上皮癌中的研究仍较少, 且多集中于组织水平和细胞水平。本研究首次采用细胞和动物实验从体外和体内两个水平对 NLRP3 炎症小体在膀胱癌发病中的作用进行探究, 研究结果将更具说服力。 (2) 膀胱癌的发病机制尚未完全阐明, 目前认为与多基因、多层次的细胞信号网络紊乱有关。本研究从炎症反应角度对膀胱癌的发病机制进行探究, 具有一定创新性, 也可为今后抗肿瘤药物的研究提供新思路。

三、项目验收指标

	预定技术指标									
1	观察 NLRP3 基因敲除及过表达后膀胱癌细胞增殖、凋亡及侵袭迁移情况，在体外明确 NLRP3 炎症小体在膀胱癌发生、发展过程中的作用。									
2	观察 NLRP3 基因敲除及过表达的裸鼠移植瘤模型的膀胱癌组织生长、凋亡及侵袭迁移情况，在体内验证 NLRP3 炎症小体在膀胱癌发生、发展过程中的作用。									
预期科技创新成果	专利			论文（项目负责人为第一或者通讯作者）						
	专利授权数（个）	进入实质审查发明专利数（个）	发明专利授权数（个）	TOP	SCI（SSCI）	EI	一级	二级	其他国内核心期刊	
	0	0	0	0	1	0	0	1	0	
	其他研究成果									
	无									
• 预期人才培养目标	职称			学历						
	正高	副高	中级	博士		硕士		学士		
	0	0	1	0		0		0		

四、计划进度目标

开始时间	结束时间	进度目标要求（每栏限 100 字）
2021-01-01	2021-12-31	进行课题组会议，讨论课题内容，明确成员分工；落实实验仪器设备，采购细胞、试剂等材料；培养膀胱癌细胞系，检测 NLRP3 表达，敲除或过表达 NLRP3 基因，检测 NLRP3 表达及细胞增殖、凋亡、侵袭迁移情况。
2022-01-01	2022-12-31	BALB/c 裸鼠的购买、饲养；将 NLRP3 基因敲除、过表达的膀胱癌细胞分别种植到裸鼠腹腔中，观察裸鼠一般状态，测量肿瘤体积及重量，检测肿瘤组织 NLRP3 表达及生长、凋亡、侵袭迁移情况。
2023-01-01	2023-12-31	整理并分析实验结果，撰写论文，投稿；课题总结、验收。

五、项目经费预算（万元）

预期项目总投资	16	财政科技经费	自筹	其他	第一次拨款额
		10	6	0	10

其中：财政科技经费第一次拨款 10 万元，其余经费根据项目执行、中期检查和验收情况，分期安排给乙方。

本申请单位和项目负责人承诺：财政科技经费实际安排少于申请额时，在预期项目总投资不变的前提下，自筹经费做相应调整。

项目经费支出预算

经费开支内容		总经费	其中财政科技经费
直接费用	1. 设备费	0	0
	（1）仪器设备购置费	0	0
	（2）仪器设备折旧费	0	0
	（3）仪器设备租赁费	0	0
	2. 材料费	4	2
	3. 测试化验加工费	6	3
	4. 燃料动力费	0	0
	5. 差旅费/会议费/合作协作研究与交流费	1	0
	6. 出版/文献/信息传播/知识产权事务费	2.45	2.45
	7. 劳务费	0	0
	8. 专家咨询费	0.55	0.55
间接费用	9. 管理费	0	0
	10. 激励费	2	2
	11. 其它费用	0	0

注：乙方须对项目经费进行单独建账、独立核算，并严格按照《关于进一步完善市级财政科研项目资金管理等政策的实施意见》（嘉委办[2018]55号）开支。

六、需增添的仪器设备和用途

名称	规格型号	数量	单价 (万元)	金额 (万元)	资金来源	用途说明
----	------	----	------------	------------	------	------

注：凡属市财政科技经费购买的仪器设备须在资金来源中需列明。