

河北省重点研发计划项目任务书

专 项 名 称：卫生健康创新专项

项 目 名 称：基于 AMPK/SIRT1/PGC-1 α 通路介导的线粒体自噬探讨恩格列净对 2 型糖尿病患者心肌保护的机制

项 目 编 号：22377726D

签 订 年 度：2022 年

项 目 起 止 年 月：2022-07 至 2025-06

承 担 单 位（乙方）：河北医科大学第二医院

合 作 单 位：

项 目 负 责 人：周红 负责人手机

项 目 联 系 人：李娜 联系人手机

开 户 名 称：河北医科大学第二医院

开 户 银 行：河北银行建华支行

开 户 银 行 行 号

账 号

归口管理单位（丙方）：省卫生健康委员会

科技厅分管处室：社会发展科技处

河北省科学技术厅制

填 写 说 明

一、项目任务书是省科技厅对河北省科技计划项目全程管理的基本文件之一。要求承担单位严格按照规定格式客观、准确、全面填写，并对所填写内容的真实性负责。承担单位登录河北省科技计划项目综合服务平台在线填写、提交，逐级审核并经科技厅审核同意后在线打印书面任务书一式五份，报归口管理部门审查盖章，并将书面文件报省科技厅分管业务处室审查确认。

二、任务书甲方为项目任务下达单位，即省科技厅；乙方为项目承担单位；丙方为项目归口管理部门，指各市和雄安新区科技主管部门、省直有关部门和单位。

三、“项目名称”、“项目编号”、“项目起止年月”、“项目承担单位”等必须与省科技计划下达的内容完全一致。

四、开户名称与承担单位一致（采用集中支付方式的单位除外）。

五、项目如涉及多家（包含两家）单位参加，有关单位应在签订本任务书前，就项目任务分工、专项经费分配、项目经费筹集与使用、知识产权归属等问题签订有关合同或协议，作为本任务书的附件。

六、省财政给予的专项经费，必须按照财政科技专项经费使用管理的规定，在财务独立建帐并按照明确的支出范围和该任务书确定的经费预算支出。执行期间需要调整经费的，按有关规定执行。

七、本任务书一式五份，分存甲方三份，乙方一份，丙方一份。本项目任务书打印书面文件要求盖章，其中乙方盖所在单位公章，丙方盖科技计划管理章（省直厅局盖科研管理章）。

一、承担单位和合作单位情况

1. 承担单位基本情况

单位名称	河北医科大学第二医院			法定代表人	时保军	
单位地址	和平西路 215 号			所属地区	河北省-石家庄市-新华区	
社会统一信用代码（营业执照注册号或组织机构代码）						
项目负责人	周红		手机			
办公电话			E-mail			
项目联系人	李娜		手机			
办公电话			E-mail			
开户名称	河北医科大学第二医院		开户银行行号			
开户银行	河北银行建华支行		账号			
职工总数	5451 人	技术人员数	5307 人	中高级技术人员数	3250 人	
是否为省级以上高新技术企业	否	是否为省级以上科技型中小企业	否	所属园区		
上年度单位研发投入		上年度单位销售收入		上年度单位研发投入 / 销售收入		
万元		万元		%		
注册资本	123550.0	注册时间	2017-07-10	单位拥有专利数量	10	
单位性质	医疗机构（非企业）		单位规模	其他		
其它特征	省国际科技合作基地					

2. 合作单位情况

单位名称	国别	所属地区	单位地址	单位性质	联系人	手机

二、项目实施的主要任务

（一）项目的主要研究内容

研究内容分为两部分：临床研究和体外研究

（1）临床研究：

首先将纳入的 T2DM 患者与健康志愿者在基线时进行心功能各项指标比较，证实 T2DM 患者心功能较正常人受损；

将 T2DM 患者随机分为两组，给予恩格列净和平行对照药物二甲双胍治疗 24 周，证实恩格列净改善心功能和各项炎症及氧化应激指标，并且调控 AMPK/SIRT1/PGC-1 α 水平。再通过相关性分析证实 AMPK/SIRT1/PGC-1 α 水平与心功能指标的相关性，提示恩格列净可能通过 AMPK/SIRT1/PGC-1 α 通路改善 T2DM 患者心功能。

具体步骤如下

① 选择我院内分泌门诊就诊的未应用降糖药物治疗的 T2DM 早期患者（病史<5 年， $7\leq\text{HbA1c}\leq 9\%$ ）80 例，既往无心血管疾病史；在我院体检中心选择血糖正常的健康志愿者 40 例，通过心脏超声检查比较两组心功能的各项指标。

② 将 T2DM 患者随机分为两组：实验组 40 例，给予恩格列净 10mg qd 口服；对照组 40 例，给予二甲双胍 0.5 tid 口服，共治疗 24 周。

③ 于基线时和 24 周末，应用心脏超声测定患者心功能指标；

④ 于基线时、12 周末和 24 周末分别测定空腹血糖 (FBG)、空腹胰岛素 (FINS)、糖化血红蛋白 (HbA1c)、游离脂肪酸 (FFA)、血脂、肝功能和尿酸；测量身高和体重计算 BMI；根据 FBG 和 FINS 计算胰岛素抵抗指数 (HOMA-IR)；

⑤ 于基线时和 24 周末留取血清，测定心肌损伤指标：乳酸脱氢酶及其同工酶、NT-proBNP 和可溶性生长激素表达基因 2 蛋白 (sST2) 水平；测定炎症指标：白介素-1 β (IL-1 β)、IL-6、炎性小体 3 (NLRP3) 和超敏 C 反应蛋白水平；测定氧化应激指标：超氧化物歧化酶 (SOD) 活性和丙二醛 (MDA) 含量；测定相关通路的变化：提取单核细胞测定磷酸化 AMPK 及 SIRT1/PGC-1 α 水平。

⑥ 观察这些指标 24 周时较基线时的变化，并进行组间比较；分析 AMPK/SIRT1/PGC-1 α 水平与炎症和氧化应激指标及心功能各项指标的相关性。

（2）体外研究：大部分已完成，

应用分组对比研究，具体步骤如下：

① 提取原代 SD 大鼠心肌细胞；

② 应用药物干预和细胞转染等手段，将细胞进行分组如下：

对照组 (NG, 5.5 mM 葡萄糖)；

高糖组 (HG, 30 mM 葡萄糖);

高渗透压组 (OSM, 5.5 mM 葡萄糖+ 24.5 mM 甘露醇);

高糖 + 恩格列净 (0.1, 1.0, 10 μ M);

高糖 + 恩格列净 (1.0 μ M) + AMPK 抑制剂 Compound C;

高糖 + 恩格列净 (1.0 μ M) + SIRT1 抑制剂尼克酰胺;

高糖 + 恩格列净 (1.0 μ M) + PGC-1 α 敲低 (转染 Ad-PGC-1 α - shRNA) ;

高糖 + 空病毒对照 (转染 Ad-EV);

高糖 + 二甲双胍 (2.5 mM);

③ 分组后继续培养 48 h。

④ 测定心肌细胞凋亡指标: 细胞凋亡率和 DNA 碎片; 共聚焦显微镜观察细胞线粒体超微结构; 测定线粒体功能指标: 线粒体膜电位、线粒体呼吸控制率 (RCR)、细胞内 ATP 含量以及总 ROS 和线粒体 ROS 产物, 测定氧化应激指标: 细胞上清液 SOD 活性和 MDA 水平。测定炎症指标: 细胞上清液 IL-1 β 、IL-6。应用 Real-time PCR 测定 SIRT1、NLRP3、Bax 和 Bcl-2 mRNA 表达; 应用 Westernblot 测定 p-AMPK、SIRT1、PGC-1 α 、NLRP3、Bax/Bcl-2、cleaved caspase-3 蛋白表达, 测定线粒体自噬相关蛋白 LC3B-I/II、TOM20、Hsp60 表达。

⑤ 进行组间的两两比较。

(二) 项目拟采取的研究方法

1、项目拟采用的方法、原理、机理、算法、模型等

(1) 临床研究:

属于随机、开放标签、平行对照研究, 采用下列公式计算样本量

$$n=(Z_{\alpha}/2 + Z_{\beta})^2 \sigma^2/\delta^2$$

初步考虑需要 80 例 T2DM 早期患者 (病史<5 年, 7% $\leq$ HbA1c $\leq$ 9%), 既往无心血管疾病史。 将患者随机分为两组: 实验组 40 例, 给予恩格列净 10mg qd 口服; 对照组 40 例, 给予二甲双胍 0.5 tid 口服, 治疗 24 周。比较 24 周时下列指标较基线时的变化:

①应用心脏超声测定心功能指标, 即左心室舒张末期内径 (LVEDd)、左心室收缩末期内径 (LVESd)、左心室射血分数 (LVEF)、左房容积 (LAD)、二尖瓣口舒张早期血流速度 (Ea)、二尖瓣口舒张晚期血流速度 (Aa) 和 E 峰下降时间 (EDT), 并计算 E/E' 值及左心室 Tei 指数;

②应用 ELISA 法测定血清 IL-1 β 、IL-6、NLRP3 和 sST2 水平; 应用电化学发光法测定乳酸脱氢酶及其同工酶、NT-proBNP 和超敏 C 反应蛋白水平; 应用比色法测定 SOD 活性和 MDA 含量。

③提取单核细胞应用 Westernblot 测定磷酸化 AMPK 及 SIRT1/PGC-1 α 水平。

④测定 FBG、FINS、HbA1c、FFA、血脂、肝肾功能和尿酸; 计算胰岛素抵抗指数

$HOMA-IR = FBG \times FINS / 22.5$;

(2) 体外研究:

提取原代心肌细胞进行培养, 建立高糖诱导的心肌细胞损伤模型; 应用 CCK-8 方法测定细胞活力, 摸索恩格列净干预浓度。

将细胞分组进行培养, 即分别给予恩格列净、二甲双胍、AMPK 抑制剂和 SIRT1 抑制剂干预以及采用转染技术敲低 PGC-1 α 表达。

①应用 TUNEL 和流式细胞术测定细胞凋亡率; DNA 凝胶电泳测定 DNA 碎片;

②共聚焦显微镜观察细胞线粒体超微结构; 应用 JC-1 荧光探针法测线粒体膜电位; 应用氧电极法测定线粒体 RCR; 应用荧光素酶法测细胞内 ATP 含量; 应用荧光探针法测定总 ROS 和线粒体 ROS 产物,

③应用试剂盒测定细胞上清液 SOD 活性和 MDA 水平;

④应用 ELISA 法测定上清液中 IL-1 β 和 IL-6 水平;

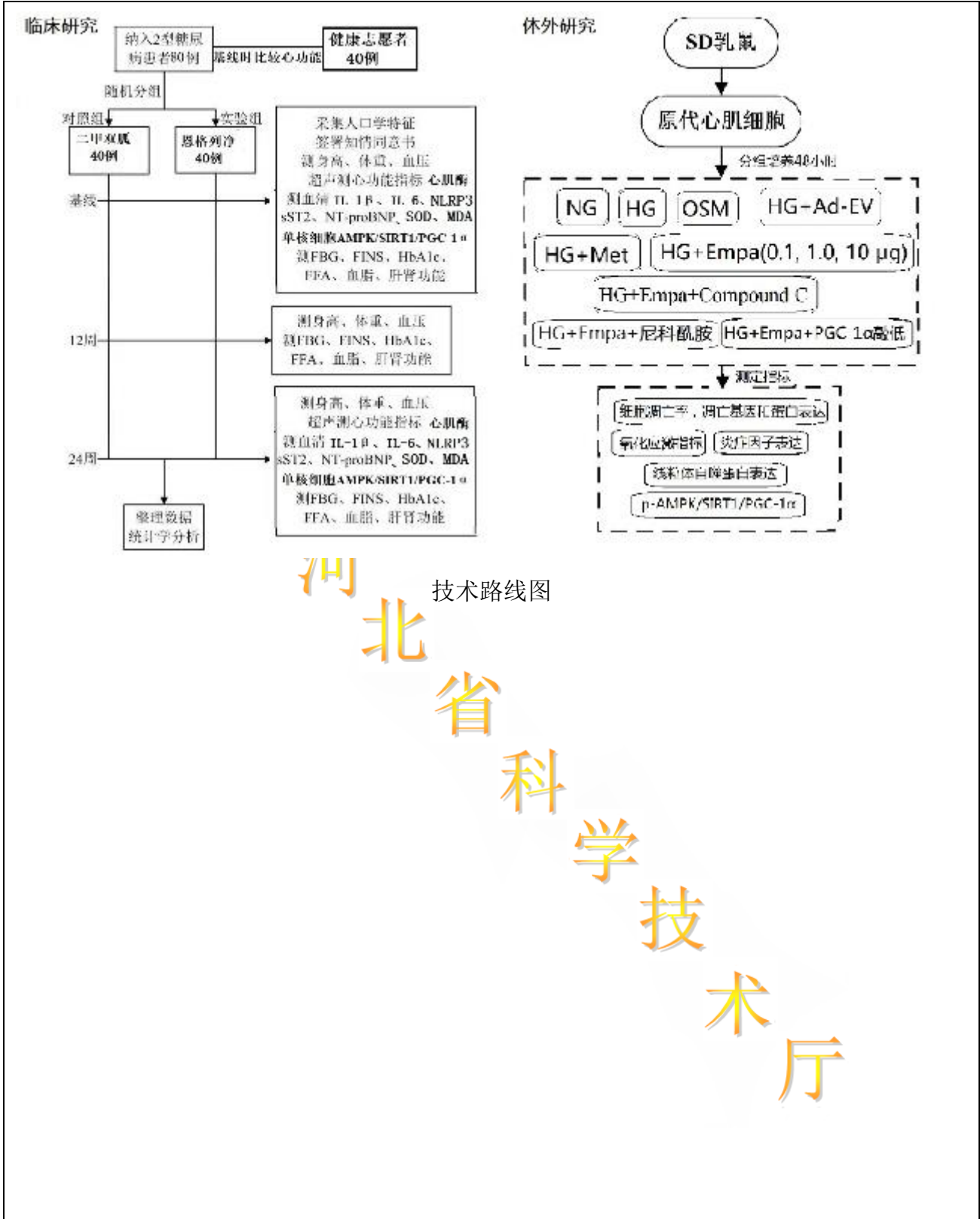
⑤应用 Real-time PCR 测定 SIRT1、NLRP3、Bax 和 Bcl-2 mRNA 表达;

⑥应用 Western blot 测定 p-AMPK、SIRT1、PGC-1 α 、LC3B-I/II、TOM20、Hsp60、NLRP3、Bax/Bcl-2、cleaved

2、项目研究方法(技术路线)的可行性、先进性分析

可行性: 本课题的研究思路是建立在全面分析国内、外相关研究和我们前期的工作基础上提出的。我们已经发表了一篇关于 SGLT2 抑制剂在 DCM 中作用机制的综述 (SCI 收录, IF: 4.216), 前期体外研究已发现恩格列净能够抑制高糖诱导的心肌细胞线粒体损伤, 改善线粒体自噬和细胞凋亡。因此, 本研究的提出既有理论依据, 又有前期研究基础。本项目的实施场所为河北医科大学第二医院, 内分泌门诊有大量的 T2DM 患者就诊, 能够确保研究的样本量。申请人为博士生导师, 课题组成员中有博士学位、在读博士和主治医师, 曾多次承担国内外多中心临床试验, 人员结构合理, 能够满足本试验的要求。在实验技术方面已熟练掌握了原代心肌细胞提取、细胞转染、流式细胞术及荧光定量 PCR 和 Western blot 等技术, 保证了研究的实施。

先进性: 针对线粒体自噬和氧化应激在 DCM 发病中的作用, 本研究将临床研究与体外实验相结合, 首先在临床上证实恩格列净对 T2DM 早期患者确有心脏保护作用, 且减轻炎症反应和氧化应激。再通过体外细胞培养探索各个分子环节, 这样既排除了代谢等因素的影响, 又使得各个环节的干预措施容易实施, 同时保证了结果的可靠性, 从临床-细胞-分子通路多层次揭示恩格列净防治 DCM 的分子机制。



三、进度安排和阶段目标

2022/07-2022/12: 在我院体检中心完成招募健康志愿者 40 例, 记录人口学特征并测定心功能指标; 根据纳入和排除标准, 在内分泌门诊招募 2 型糖尿病患者, 筛查受试者。

2023/01-2023/12: 完成所有受试者的随机入组 (每组 40 例) 并继续进行随访; 并将研究人员合理分工, 补充完成体外研究部分。

2024/01-2024/12: 完成所有受试者 24 周的治疗和访视, 即三次来院访视和三次电话访视。汇总临床试验数据进行统计学分析, 将临床研究和体外研究相结合撰写论文, 参加国内会议讨论和交流, 并进行 SCI 期刊投稿。

2025/01-2025/06: 发表论文, 申报成果。

中期目标:

(1) 在基线时比较糖尿病患者与健康志愿者的心脏功能指标, 证实 2 型糖尿病早期即可出现心肌损伤, 心功能发生改变。

(2) 确保受试者中有 50% 顺利完成了访视, 观察两组间主要数据是否有统计学差异。

(3) 比较临床研究和细胞研究的主要指标是否具有 consistency。

(4) 评估受试者的依从性和保留率应在 80% 或以上。

(5) 参加国内会议讨论和交流, 发表会议论文 1 篇。

四、项目承担单位、合作单位任务分工、知识产权归属

项目的承担单位和知识产权归属均为河北医科大学第二医院。

河北省科学技术厅

五、项目绩效评价考核目标及指标

总体目标	实施期目标		第一年度目标 (当前年度)	第二年度目标 (当前年度)	第三年度目标 (当前年度)
	(1) 明确在真实世界中恩格列净能够改善 2 型糖尿病患者心脏功能，减轻氧化应激和炎症反应，具有降糖之外的心脏获益。 (2) 证实体外高糖环境中，恩格列净能够减轻心肌细胞氧化应激和炎症反应，改善线粒体自噬和功能，探明恩格列净心肌保护的分子机制。 (3) 为糖尿病心肌病的早期防治提供新思路。通过临床方案推广，改善糖尿病患者的生活质量，降低病死率，秉承降糖的同时关注心血管结局的理念。 (4) 在国内会议上交流，并发表论文 2 篇； (5) 申报省级成果 1 项； (6) 培养博士研究生 3 名；		2023 年度： (1) 证实糖尿病患者心功能较正常人显著受损，表现为舒张功能或/和收缩功能下降。 (2) 确保受试者有 50% 已经完成了访视，观察两组间主要数据是否有统计学差异。 (3) 比较临床研究和细胞研究的主要指标是否具有一致性。 (4) 参加国内会议讨论和交流，发表会议论文 1 篇。	2024 年度： 完成受试者 24 周的临床访视，关注受试者的失访情况和保留率。汇总临床试验数据进行统计学分析，撰写论文，参加国内会议讨论和交流，并进行 SCI 期刊投稿。	2025 年度： 发表 SCI 论文 1 篇，申报省级成果 1 项。
绩效指标	指标名称	指标值			
	发表科技论文（篇）	2	1		1
	培养研究生（人）	3	1	1	1

六、参加人员及分工

序号	姓名	性别	年龄	证件号码	职称	学历	学位	现从事专业	单位名称	分工
1	周红	女	55		主任医师	研究生	博士	医疗卫生技术	河北医科大学第二医院	课题设计和项目申请及监督完成
2	李娜	女	35		主治医师	研究生	硕士	医疗卫生技术	河北医科大学第二医院	负责体外实验的完成和血标本中氧化应激、炎症因子指标以及单核细胞上激酶水平的测定
3	王婷	女	36		主治医师	研究生	硕士	医疗卫生技术	河北医科大学第二医院	负责受试者的筛选和随访工作
4	李贵芝	女	36		主治医师	研究生	硕士	医疗卫生技术	河北医科大学第二医院	负责受试者的筛选和随访工作
5	毛天杰	女	45		主治医师	研究生	博士	医疗卫生技术	河北医科大学第二医院	负责患者心脏超声指标的测定
6	葛艳红	女	44		副主任护师	本科	硕士	医疗卫生技术	河北医科大学第二医院	负责静脉采血以及研究药物的发放和回收。

七、项目预算表

单位：万元

序号	预算科目名称	金额
1	一、省级财政资金	8.00
2	（一）直接费用	7.60
3	1. 设备费	0.00
4	其中：购置设备费	0.00
5	2. 业务费	6.80
6	3. 劳务费	0.80
7	（二）间接费用	0.40
8	其中：绩效支出	0.00
9	二、自筹资金	0.00
10	合 计	8.00

注：1.间接费用无需编制预算说明；2.绩效支出在间接费用中无比例限制。

项目预算基本测算说明（不包含单价 50 万以上的设备详细说明）
一、财政资金：合计 8.0 万元 （1）直接费用： 1. 材料费： 合计 4.0 万元 ① 用于购买临床研究中氧化应激指标和各种炎症因子指标以及 sST 药盒，共需 2.0 万元。 ② 用于购买 LC3B-I/II、TOM20、Hsp60、NLRP3、cleaved caspase-3 以及 AMPK/SIRT1/PGC-1α 抗体，共需 2.0 万元。 2. 测试化验加工费：合计 2.0 万元 用于支付临床研究中血生化和 BNP 检测，体外研究中透射电镜和流式的检测。 3. 差旅费：合计 0.8 万元 国内会议交流 2 次，每次 2 人，人均费用 0.2 万元，共支付 0.8 万元。 4. 劳务费：合计 0.8 万元 一名在读博士研究生，每年工作 8 个月，每月劳务费 0.05 万元，两年应付给该学生劳务费 0.8 万元。 （2）间接费用： 科研管理费： 0.4 万元
单价 50 万元以上的设备详细说明（无相关情况，本栏填“无”）
无

八、承担单位、合作单位经费预算明细表								
序号	单位名称	单位类型	任务分工	研究任务 负责人	合计	专项经费		自筹经费
						小计	其中： 间接费用	
1	河北医科大学第二医院	承担单位	项目的申请和监督完成	周红	8.00	8.00	0.40	0.00

河北省科学技术厅

九、承诺条款

签约各方在遵守省级科技计划管理有关规定前提下，承诺如下：

乙方：

1. 按照《河北省省级科技计划项目管理办法》（冀科规〔2020〕1号）、《重点研发专项资金（含省校科技合作）管理办法》（冀财教〔2022〕67号）等管理规定以及项目任务书约定等，足额匹配自筹的项目经费，及时拨付合作单位经费，确保项目科研人员有足够的时间投入研究工作，为项目实施提供所需的保障条件。

2. 建立健全科研、财务等内部管理制度，按规定管理使用项目经费，监督合作单位经费使用，真实报告经费决算，按规定提交项目经费审计报告。

3. 接受指导、检查并配合做好监督、评估等工作。

4. 完整、真实地填报项目管理相关材料，按要求提交项目执行情况、绩效评价、科技报告等相关材料。

5. 及时报告项目执行中出现的重大事项和问题，提出项目调整、终止申请，执行调整、终止、撤销工作。

6. 建立健全诚信管理、科研伦理审查等制度，负责对科研失信行为调查和处理。

7. 项目验收后形成的科技成果应进行登记，履行转化主体责任，推动科技成果转化应用。

8. 负责项目的原始科研记录和档案管理，严格遵守科技保密制度和相关规定。

9. 负责项目科研成果知识产权、项目形成的固定资产等保护与管理。

10. 项目实行验收结项制度，项目承担单位应在任务书规定执行期结束后3个月内提出验收申请，在项目执行期结束后6个月内完成验收程序。项目验收后向甲方上报验收证书。

丙方：

1. 督导项目承担单位按时启动和实施项目。

2. 对项目执行和经费使用情况进行检查和监督，协调解决项目实施中的有关问题，根据项目执行情况提出项目调整、终止及撤销建议，督导承担单位执行调整、终止及撤销工作。

3. 督促项目承担单位按期验收，受省科技厅委托主持项目验收；

4. 协调推动项目成果的转移转化与应用示范。

甲方：

1. 负责项目立项、调整、终止和撤销，协调解决执行过程中的重大问题。

2. 组织项目验收、绩效评价、统计、档案管理及信息公开工作。

3. 实施科技报告制度，建立项目成果库。

4. 统筹科技计划全过程的科研诚信管理，监督检查项目执行和经费使用。

十、任务书签订各方签章

甲方：省科技厅

(计划专用章)

主管业务处项目主管：

主管业务处处长：

日期：

乙方（承担单位）：河北医科大学第二医院

本单位同意承担省级科技计划项目，严格履行法人负责制，为项目实施提供保障条件，严格遵守科技计划项目管理、财务管理等相关规定，严格落实《河北省省级科技计划项目科研诚信管理办法》有关要求。

(公章)

(项目负责人)：周红

本人根据省级科技计划项目申报指南的要求自愿提交项目任务书，在项目执行过程中，严格遵守科技计划项目管理、财务管理等相关规定，严格落实《河北省省级科技计划项目科研诚信管理办法》相关要求，按时报送过程管理和验收有关资料，及时报告变动情况。本人承诺违反相关要求，承担相应违约责任。

项目负责人(签字)：

日期：

所在单位负责人(签字)：

日期：

合作单位：

(公章)

日期：

丙方（归口管理单位）：省卫生健康委员会

(科研计划专用章)

负责人：

日期：

经办人：

日期：

十一、附件目录：		
序号	附件名称	附件说明

备注：1. 有合作协议必须上传合作双方单位盖章后的合作协议扫描件。
2. 有合作单位协议必须附后装订。

河北省科学技术厅

附件 1

承诺书

本单位作为省级科技计划“基于 AMPK/SIRT1/PGC-1 α 通路介导的线粒体自噬探讨恩格列净对 2 型糖尿病患者心肌保护的机制”项目承担单位，郑重承诺：项目实施过程中：

1. 涉及人体及相关研究的，按照规定通过伦理审查并签署知情同意书。
2. 涉及药物临床研究的，遵守国家关于药物研发及临床试验有关规定；涉及新冠肺炎临床研究，遵守国务院应对新冠肺炎疫情联防联控机制科研攻关组印发《关于规范医疗机构开展新型冠状病毒肺炎药物治疗临床研究的通知》。
3. 涉及人类遗传资源采集、保藏、利用、对外提供等，遵照《人类遗传资源管理条例》相关规定执行。
4. 涉及实验动物和动物实验的，遵守国家实验动物管理的法律、法规、技术标准及有关规定，使用合格实验动物，在合格设施内进行动物实验，保证实验过程合法，实验结果真实、有效，并通过实验动物福利和伦理审查。
5. 涉及高等级病原微生物研究，按照国家相关法律法规执行，确保实验室生物安全和生物技术研究安全。
6. 不得擅自发布项目立项、科研进展及研究成果相关信息。

本单位严格做好各项监管工作，并积极创造有利条件，确保项目依法依规，顺利实施。

项目负责人签字：

年 月 日

项目承担单位盖章：

年 月 日

河北省卫生健康委员会办公室文件

冀卫办科教〔2021〕3号

河北省卫生健康委员会办公室 关于下达河北省 2021 年度医学科学研究 课题计划的通知

河北医科大学第二医院：

在各有关单位课题主研人申报的基础上，经我委组织的形式审查、专家评审、伦理审查等环节，最终确定了《2021 年度河北省医学科学研究课题计划》，现将涉及你单位的相关课题印发给你们，请尽快通知课题负责人按计划开展研究工作，并加强对课题实施、课题验收、成果转化和科研诚信的管理，履行好课题管理职责。

凡列入我委指令性课题，均给予 0.5 万元经费资助（课题编号 20210001--20210307 为指令性课题，20210308--20211833 为指导性课题），课题承担单位给予 1:1 或 1:2 配套经费支持；列入我委指导计划的课题，承担单位也应给予适当经费支持。

附件：2021 年度河北省医学科学研究课题计划

河北省卫生健康委办公室

2021 年 3 月 26 日



（信息公开形式：依申请公开）

20210196	SGLT2抑制剂恩格列净通过AMPK/MAPKs/ PGF-1a通路抑制对高糖诱导的心肌细胞凋亡	河北医科大学第二医院	李娜
----------	--	------------	----