

天津市卫生健康委员会
科技项目

开题报告

项目编号: ZC20175

项目类别: 自筹项目

项目名称: HMGB1-RAGE 信号轴在肝脏瘀血再灌注损伤中作用及机制研究

项目申请人: 崔子林

工作单位: 天津市第一中心医院

起止年限: 2020年8月31日-2023年8月31日

天津市卫生健康委员会

2020年制

开题活动提示：

开题主要研讨课题研究的可行性，重在捋清思路，开题由各单位科研管理部门负责组织实施。

一、开题活动简况：开题时间、地点、主持人、评议专家（为课题组外专家，专家不少于3人）等。

时间：2020年9月20日

地点：天津市第一中心医院肝胆外科示教室

组长：王连江

评议专家

序号	姓名	职称	专业	单位	专家签字
1	王连江	主任医师	肝胆外科	天津市第一中心医院	
2	史瑞	副主任医师	肝胆外科	天津市第一中心医院	
3	侯建存	副主任医师	肝胆外科	天津市第一中心医院	

二、开题报告要点：研究内容、研究方法、分工、研究进度、拟使用经费、预期成果等，要求具体明确、可操作，限 1000 字以内。

本研究将采用小鼠部分肝脏淤血再灌注损伤模型，通过对分子生物学、组织形态学和肝功能的评估，应用 HMGB1 中和抗体、重组 rHMGB1、AG490 和 RAGE-/-小鼠等干预手段，观察 HMGB1 拮抗或 RAGE 拮抗等对 HMGB1、RAGE 及其下游 JAK2、STAT1、STAT3 的变化，炎症因子以及肝功能、肝脏病理学改变，证明 HMGB1-RAGE-JAK2 信号途径在肝脏淤血再灌注损伤中的作用，阐明肝脏淤血再灌注损伤分子机制，以及拮抗/阻断 HMGB1-RAGE-JAK 信号途径对肝脏淤血再灌注损伤的保护作用。应用 IL-1R 拮抗剂、IL-1 β 敲除等干预手段，证明 HMGB1-IL-1 β 轴是肝脏淤血再灌注中引发剧烈肝脏损伤的潜在机制。

建立 C57BL/6 小鼠及 RAGE-/-小鼠肝脏淤血再灌注损伤模型，干预 HMGB1 及 AG490 治疗检测小鼠肝功能、中性粒细胞浸润程度、检测外周血、肝组织细胞因子、粘附分子、趋化因子的表达；检测 JAK2、STAT1、STAT3 的总蛋白和磷酸化蛋白表达；测定 STAT1、STAT3 DNA 结合能力；检查外周血和肝组织 HMGB1、RAGE 的表达，计算肝组织中 HMGB1 胞浆/细胞核表达比率，观察肝脏组织冰冻切片中 HMGB1、RAGE 在肝细胞、树突状细胞（DC）的表达情况。建立 C57BL/6 小鼠和 IL-1 β 敲除小鼠肝脏淤血再灌注损伤模型，干预 IL-1 通路，观察肝功能和病理学改变、微循环和 MPO，监测外周血 HMGB1；观察淤血再灌注损伤肝脏组织中 HMGB1 在肝细胞、DC 的表达情况，肝组织和外周血乙酰化 HMGB1 的表达。

本人主要参与实验设计及主持实验，课题成员张雅敏参与实验指导，冯睿、杨龙和朱刘洋参与指标检测，刘子荣及刘晓龙参与动物模型制作。

研究经费 2 万元，用于实验动物、抗体和引物购买。

本研究拟于第一年上半年完成肝脏淤血再灌注损伤模型的建立，应用 HMGB1 抗体、重组 HMGB1 干预，评估 HMGB1 在肝脏淤血再灌注损伤的作用和机制。第一年下半年通过应用 RAGE 基因敲除小鼠，评估 RAGE 在肝脏淤

血再灌注损伤的作用和机制。评估分析 HMGB1 通过 RAGE 介导肝脏淤血再灌注损伤。

拟于第二年上半年通过应用 AG490 对抗 JAK2, 完成评估 HMGB1-RAGE 及其下游信号通路 JAK2/STAT 在肝脏淤血再灌注损伤的作用和机制。第二年下半年对 IL- β 基因敲除小鼠应用, 分别应用 IL-1R 拮抗剂或者重组 IL-1 β , 评估 IL- β 对 HMGB1 乙酰化的影响。从而证实 HMGB1-RAGE-IL- β -HMGB1 循环在肝脏淤血再灌注损伤中的作用。

本实验预计 1) 阐明 HMGB1-RAGE 信号轴在肝脏淤血再灌注损伤中的机制, 以及通过干预 HMGB1-RAGE 轴对淤血再灌注损伤的保护作用, 以明确 HMGB1-RAGE 信号轴作为防治肝脏淤血再灌注损伤的新靶点。2) 明确 HMGB1-RAGE 信号轴-IL-1 β -HMGB1 循环在淤血再灌注损伤机制中的作用。阐明应用针对 HMGB1 的阻断剂或者拮抗剂, 不仅抑制 HMGB1-RAGE 轴, 同时阻断 HMGB1-RAGE 信号轴-IL-1 β -HMGB1 循环, 成为防治淤血再灌注损伤的有效干预措施。

实验中指标检测采取盲法, 由主持人统计, 确保实验结果客观性。

项目申请人签名

范子林

年 月 日

四、所在单位科研管理部门意见

单位（公章）



请将此报告上传至市卫生健康委科研管理平台。

编号:

Z	C	2	0	2	3	1		
---	---	---	---	---	---	---	--	--

天津市卫生健康科技项目 任务合同书

项目名称: HMGB1-RAGE 信号轴在肝脏淤血再灌注损伤中作用及机制研究

项目类别: 自筹

起止年限: 20 20 年 08 月 至 20 23 年 08 月

承担单位: (加盖公章) 天津市第一中心医院

项目负责人: 崔子林 电话: 传真:

通讯地址: 天津市南开区复康路 24 号

邮编: 300192 电子邮箱:

合(协)作单位: (加盖公章)

项目委托单位: (加盖公章) 天津市卫生健康委员会

主管部门: (加盖公章) 天津市卫生健康委员会

天津市卫生健康委员会

二〇二〇年制

说 明

1. 本合同书适用于列入天津市卫生健康科技项目填写。
2. 任务合同书中文字须用宋体小四号字填写。凡不填写内容的栏目,请用“无”表示。对于选择栏目,采用将所选项空格涂黑的方式确定。

3. 项目编号由天津市卫生健康委统一规定,应将项目编号填入任务合同书封面。

4. 合同书正本必须用电子文档录入和打印(A4纸),左侧装订,一式4份,天津市卫生健康委2份,返项目承担单位2份。

5. 《项目申报书》是本任务合同书填报的重要依据,任务合同书填报不得降低考核指标,不得自行对主要研究内容作大的调整。《项目申报书》和本任务合同书将共同作为项目过程管理、验收和监督评估的重要依据。

依据《天津市卫生健康科技项目管理暂行方案》,天津市卫生健康委员会委托天津市第一中心医院+崔子林承担天津市卫生健康科技项目中的自筹项目+HMGB1-RAGE信号轴在肝脏淤血再灌注损伤中作用及机制研究项目的科研任务。市卫生健康委对项目的实施进行跟踪管理;项目承担单位按合同书约定的研究内容和目标实施研究工作;协助方积极配合市卫生健康委对项目进行管理。各方就本项目的实施与管理中的权利

和义务签订如下合同书。

一、项目的目标和主要研究内容

目标:

阐明 HMGB1-RAGE 信号轴在肝脏淤血再灌注损伤中的机制, 以及通过干预 HMGB1-RAGE 轴对淤血再灌注损伤的保护作用, 以明确 HMGB1-RAGE 信号轴作为防治肝脏淤血再灌注损伤的新靶点。明确 HMGB1-RAGE 信号轴-IL-1 β -HMGB1 循环在淤血再灌注损伤机制中的作用。阐明应用针对 HMGB1 的阻断剂或者拮抗剂成为防治淤血再灌注损伤的有效干预措施。

主要研究内容:

通过将采用小鼠部分肝脏淤血再灌注损伤模型, 通过对分子生物学、组织形态学和肝功能的评估, 应用 HMGB1 中和抗体、重组 rHMGB1、AG490 和 RAGE-/-小鼠等干预手段, 观察 HMGB1 拮抗或 RAGE 拮抗等对 HMGB1、RAGE 及其下游 JAK2、STAT1 STAT3 的变化, 炎症因子和中性粒细胞浸润、粘附程度以及肝功能、肝脏病理学改变, 证明 HMGB1-RAGE-JAK2 信号途径在肝脏淤血再灌注损伤中的作用, 从而阐明肝脏淤血再灌注损伤分子机制, 以及拮抗/阻断 HMGB1-RAGE-JAK 信号途径对肝脏淤血再灌注损伤的保护作用。应用 IL-1R 拮抗剂、IL-1 β -/-小鼠、AG490 等干预手段, 证明 HMGB1 信号途径-IL-1 β 互相促进分泌, 导致促炎症反应恶性循环是肝脏淤血再灌注中引发剧烈肝脏损伤的潜在机制。

项目研究内容、目标、技术难点、创新点:

研究内容

通过建立小鼠部分肝脏淤血再灌注损伤模型和应用 HMGB1 中和抗体等, 观察肝脏淤血再灌注损伤后 HMGB1、RAGE 及其下游 JAK2、STAT1/ STAT3 表达变化, 细胞因子、趋化因子和粘附分子表达变化, 中性粒细胞浸润、粘附程度, 以及肝功能、肝脏病理学改变, 从而明确 HMGB1 在肝脏淤血再灌注损伤中的作用, 以及干预 HMGB1 对肝脏淤血再灌注损伤的保护作用。

通过建立小鼠部分肝脏淤血再灌注损伤模型, 应用 RAGE-/-缺陷型小鼠、HMGB1 中和抗体和重组 HMGB1, 观察肝脏淤血再灌注损伤对 HMGB1、RAGE 及其下游 JAK2、STAT1/ STAT3 的变化, 细胞因子、趋化因子和粘附分子变化, 中性粒细胞浸润、粘附程度, 以及肝功能、肝脏病理学改变, 从而明确 HMGB1-RAGE 在肝脏淤血再灌注损伤中的作用, 阻断 HMGB1/RAGE 减轻肝脏损伤的作用。

通过建立小鼠部分肝脏淤血再灌注损伤模型和应用 JAK2 特异性抑制剂 AG490, 观察阻断 JAK2 后对细胞因子、趋化因子和粘附分子变化, 中性粒细胞浸润、粘附程度, 以及肝功能、肝脏病理学改变, 结合研究内容 1 和研究内容 2 从而明确 HMGB1 的下游 JAK2 转导途径在肝脏淤血再灌注损伤中的作用。

通过建立小鼠部分肝脏淤血再灌注损伤模型和应用 IL-1R 拮抗剂、IL-1 β 基因敲除小鼠、重组 rHMGB1 和 AG490 等, 观察在淤血再灌注损伤时, IL-1 β 对 HMGB1、乙酰化 HMGB1 外周血水平和肝组织中表达的影响, 从而明确 IL-1 β 在肝脏损伤时对 HMGB1 主动释放的作用, HMGB1-IL-1 β 互相促进使得炎症级联反应放大, 淤血再灌注引起组织更为显著的损伤。

研究目标

本研究将采用小鼠部分肝脏 C/R 模型, 应用 HMGB1 中和抗体、重组 rHMGB1、AG490 和 RAGE-/-小鼠等干预手段, 通过对分子生物学、组织形态学和肝功能的评估, 观察 HMGB1 拮抗或 RAGE 拮抗等对 HMGB1、RAGE 及其下游 JAK2、STAT1 STAT3 的变化, 炎症因子和中性粒细胞浸润、粘附程度以及肝功能、肝脏病理学改变, 证明 HMGB1-RAGE-JAK2 信号途径在肝脏淤血再灌注损伤中的作用, 从而阐明肝脏淤血再灌注损伤分子机制, 以及拮抗/阻断 HMGB1-RAGE-JAK 信号途径对肝脏淤血再灌注损伤的保护作用。

本课题采用小鼠部分肝脏淤血再灌注损伤模型, 应用 IL-1R 拮抗剂、IL-1 β -/-

小鼠、AG490 等干预手段，通过对分子生物学、组织形态学和肝功能的评估，观察对 HMGB1 和乙酰化 HMGB1 的影响，对 JAK2、STAT1/STAT3 变化的影响，对炎症因子和中性粒细胞浸润、粘附程度的影响，以及肝功能、肝脏病理学改变，证明 HMGB1 信号途径-IL-1 β 互相促进分泌，导致促炎症反应恶性循环是肝脏淤血再灌注中引发剧烈肝脏损伤的潜在机制。

技术难点

本研究技术难点在于小鼠部分肝脏淤血再灌注损伤模型的质量控制，需要对动物模型制作者进行严格培训，尽可能做到均质性。

创新点

目前有研究表明，HMGB1-RAGE 轴以及其下游信号转导通路 JAK/STAT 被认为是介导脏器缺血再灌注损伤的重要机制，而在肝脏淤血再灌注损伤机制尚不清楚。淤血再灌注损伤后，坏死细胞释放 HMGB1，促发 HMGB1-RAGE 轴及其 JAK/STAT，导致细胞因子等炎性介质（包括 IL-1 β ）大量释放，而 IL-1 β 又导致 HMGB1 的乙酰化后主动被细胞释放，造成 HMGB1-RAGE-细胞因子-HMGB1 的恶性循环，从而引发淤血再灌注损伤的发生发展。因此本课题从理论上、设计上都具有创新性。

文献报道肠道、肾脏、皮瓣等瘀血后再灌注损伤明显厉害于缺血后再灌注损伤，但是大多停留在现象的描述和炎性介质的测定。本课题组前期研究也只是从整体水平、细胞水平显示肝脏淤血再灌注损伤更为严重。因此在淤血再灌注损伤，是第一次从分子生物学水平深入研究其损伤和干预机制，以寻找防治的靶点。

二、项目完成后成果提供形式及考核指标

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、发明专利等数量、指标等）：发表 SCI 文章 1-2 篇

预计经济指标（如：研究项目通过产业化和实际应用后取得的直接经济效益）：无

预计项目实施后可形成的社会效益（如：项目通过实际应用后，对提高学科建设水平的贡献，在提高人民生活质量和健康水平，防病、治病等方面取得的综合效益）：阐明应用针对 HMGB1 的阻断剂或者拮抗剂，不仅抑制 HMGB1-RAGE 轴，同时阻断 HMGB1-RAGE 信号轴-IL-1 β -HMGB1 循环，成为防治淤血再灌注损伤的有效干预措施，预期在临床上达到相关病人受益。

学科梯队建设（如：培养学科梯队骨干及博士、硕士等）：
培养硕士研究生 2 名

其它应考核的指标：无

三、实施机制

课题参与单位的任务分工：无

合作模式、知识产权与成果分配约定：无

四、项目的计划进度及目标

时间进度	项目计划完成的内容及目标
2020 年 5 月~2021 年 8 月	通过肝脏淤血再灌注损伤模型的建立，应用 HMGB1 抗体、重组 HMGB1 等对小鼠进行随机分组，评估 HMGB1 在肝脏淤血再灌注损伤的作用和机制。
2021 年 8 月~ 2022 年 8 月	通过应用 RAGE 基因敲除小鼠，评估 RAGE 在肝脏淤血再灌注损伤的作用和机制。通过在 RAGE 基因敲除小鼠应用重组 HMGB1 等，结合前面的实验结果，评估分析 HMGB1 通过 RAGE 介导肝脏淤血再灌注损伤。
2022 年 8 月~2023 年 8 月	通过应用 AG490 对抗 JAK2，结合前阶段实验结果，评估 HMGB1-RAGE 及其下游信号通路 JAK2/STAT 在肝脏淤血再灌注损伤的作用和机制。在野生型分别应用 IL-1R 拮抗剂或者重组 IL-1 β 等，评估 IL- β 对 HMGB1 乙酰化的影响。从而证实 HMGB1-RAGE-IL- β -HMGB1 循环在肝脏淤血再灌注损伤的作用。在 IL- β 基因敲除小鼠应用，分别应用 IL-1R 拮抗剂或者重组 IL-1 β ，评估 IL- β 对 HMGB1 乙酰化的影响。从而证实 HMGB1-RAGE-IL- β -HMGB1 循环在肝脏淤血再灌注损伤的作用。

单位：万元

五、项目经费

[illegible]

七、合同书签订各方签章

任务下达单位:

负责人(签字)



市卫生健康委审定意见:

同意



2020年12月31日

项目承担单位:

项目负责人(签字)

崔子林

崔子林

财务负责人(盖章)

王

帐户名: 天津市第一中心医院

帐号: 12001655000052516714

开户银行: 建行天津南开支行



2020年12月23日

项目承担单位主管部门:

负责人(签字)

主管部门审定意见:

(公章)

年 月 日

提出调整或撤销。

8. 本合同书所协议的其它条款如下：

①

②

附件 1: 项目基础信息表

项目名称	HMGB1-RAGE 信号轴在肝脏淤血再灌注损伤中作用及机制研究				起止年限	2020.08—2023.08		
项目类别	自筹							
承担单位	名称	天津市第一中心医院			法人	沈中阳		
	地址	天津市南开区复康路 24 号			邮编	300192		
	单位类别	☐ 科研院所 ☐ 大专院校 ☒ 事业单位 ☐ 其它			隶属	☒ 直属单位 ☐ 其它		
参加单位 1	名称				所在地			
	参与方式	☐ 合作 ☐ 协作 ☐ 技术承接方 ☐ 技术依托方						
参加单位 2	名称				所在地			
	参与方式	☐ 合作 ☐ 协作 ☐ 技术承接方 ☐ 技术依托方						
项目负责人及主要参加人	项目负责人	姓名			性别		出生	
		学历/学位	博士研究生/博士		职务	无	职称	主任医师
		电话			E-mail	13602184643@163.com		
		工作单位	天津市第一中心医院					
	第一参加人	姓名	张雅敏		性别	男	出生	
		学历/学位	博士研究生/博士		职务	主任	职称	主任医师
		工作单位	天津市第一中心医院					
	第二参加人	姓名	冯睿		性别	男	出生	1988 年 10 月
		学历/学位	博士研究生/博士		职务	无	职称	医师
		工作单位	天津市第一中心医院					
项目简介 (包括项目目标、创新点、预期成果等, 100 字以内)	阐明 HMGB1-RAGE 信号轴在肝脏淤血再灌注损伤中的机制, 以及通过干预 HMGB1-RAGE 轴对淤血再灌注损伤的保护作用, 以明确 HMGB1-RAGE 信号轴作为防治肝脏淤血再灌注损伤的新靶点。明确 HMGB1-RAGE 信号轴-IL-1 β -HMGB1 循环在淤血再灌注损伤机制中的作用。阐明应用针对 HMGB1 的阻断剂或者拮抗剂, 不仅抑制 HMGB1-RAGE 轴, 同时阻断 HMGB1-RAGE 信号轴-IL-1 β -HMGB1 循环, 成为防治淤血再灌注损伤的有效干预措施。预期可以培养硕士研究生 2 名, 发表相关的 SCI 论文 1-2 篇。							
预期成果和效益	专利____件, 其中发明专利____件; 著作权____件; 论文论著____1____篇; 技术标准或生产规范____项; 新产品____个; 应用推广____项; 新工艺____项; 新装置新设备____项; 新材料____项; 人才引进____人; 人才培养____2____人; 其他____;							
	预期经济效益: 无 预期社会效益: 阐明应用针对 HMGB1 的阻断剂或者拮抗剂, 不仅抑制 HMGB1-RAGE 轴, 同时阻断 HMGB1-RAGE 信号轴-IL-1 β -HMGB1 循环, 成为防治淤血再灌注损伤的有效干预措施, 预期在临床上达到相关病人受益。							