

2020-KY1-001-203 (永久)

浙江省基础公益研究计划项目批准通知

朱华陀同志:

根据浙江省自然科学基金相关管理规定,浙江省自然科学基金委员会会同相关部门决定资助您申请的以下项目:

项目批准号		LY20H030010		依托单位		浙江大学					
项目名称		UPF1 调控结肠上皮细胞 IL-6R/JAK 通路介导溃疡性结肠炎发生发展及分子机制									
项目负责人		朱华陀		证件号码		[REDACTED]					
项目类别		省自然科学基金/探索项目 Y		研究期限		2020 年 1 月 至 2022 年 12 月					
总经费 (万元)		9.00		省财政资助经费 (万元)		9.00		联合资助经费 (万元)		0.00	
序号	其他主要成员		证件号码		性别	单位名称					
1	陈文果		[REDACTED]		男	浙江大学/医学院/附属第一医院					
2	章粉明		[REDACTED]		女	浙江大学/医学院/附属第一医院					
3	宁龙贵		[REDACTED]		男	浙江大学					
4	李莎		[REDACTED]		女	浙江大学					
5	楼歆荷		[REDACTED]		女	浙江大学					
6											

浙江省自然科学基金委员会办公室

2019 年 11 月 10 日

项目管

60
浙江省医药卫生科技计划项目

合 同 书

计划类别: ☐ 省部共建计划
☐ 平台计划
☐ 青年人才计划
☒ 面上项目计划
☐ 新技术适宜技术培育推广计划

课题名称: UPF1调控结肠上皮细胞IL-6R-JAK/STAT3通路在炎症
性肠病中作用与机制探讨

申 请 者: 朱华陀

申请单位: 浙江大学医学院附属第一医院

联系手机: XXXXXXXXXX

申请日期: 2018-08-04

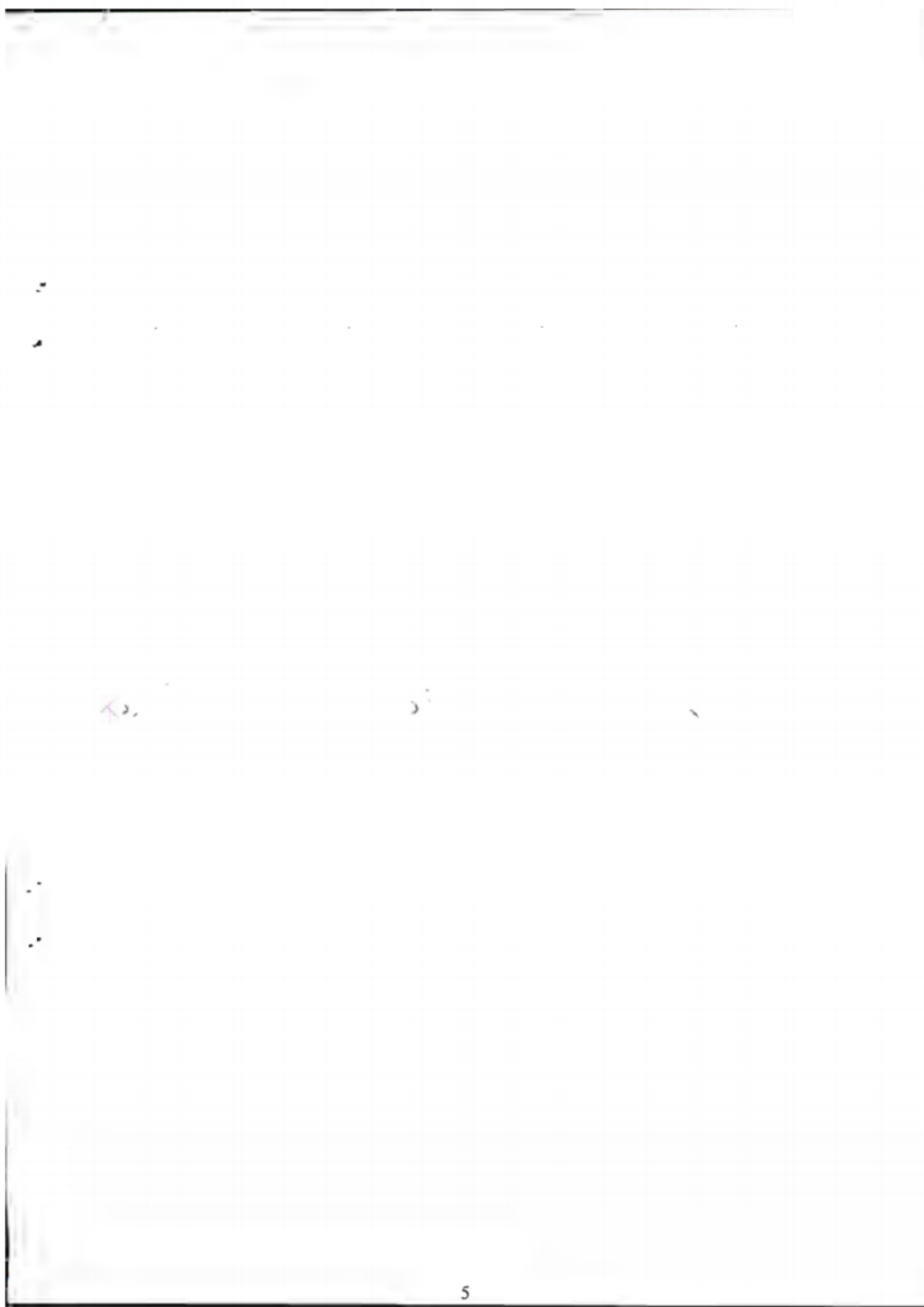
浙江省卫计委
二〇一二年制

一、项目情况

项目名称	UPF1调控结肠上皮细胞IL-6R-JAK/STAT3通路在炎症性肠病中作用与机制探讨				
研究类别	基础 研 究	已有 课题 名称			
		已有 课题 级别		已有 课题 年份	
申报学科	临床医学----胃肠病学				
开始日期	2019-01	完成日期	2021-12		
项目经费预算（万元）					
总计	向 省 卫 生 计 生 委 申 请	市卫 生局 配套	县卫生局配套	单 位 配 套	其他
3.0	0.0	0.0	0.0	3.0	0.0
专项项目经费开支预算（万元）			项目配套经费开支预算（万元）		
设备费	0.0		设备费	0.0	
材料费	0.0		材料费	3.0	

试验化验加工费	0.0	试验化验加工费	0.0
燃料动力费	0.0	燃料动力费	0.0
差旅费	0.0	差旅费	0.0
人员劳务费	0.0	人员劳务费	0.0
外拨费用	0.0	外拨费用	0.0
合作、协作研 究与交流费	0.0	合作、协作研 究与交流费	0.0
出版/文献/信息传播知识产权事务 费	0.0	出版/文献/信息传播知识产权事务费	0.0
会议费	0.0	会议费	0.0
管理费	0.0	管理费	0.0
专家咨询费	0.0	专家咨询费	0.0
其他开支	0.0	其他开支	0.0
合计	0.0	合计	3.0

预计成果			
定量指标			
预期形成的成果适用疾病	预期形成成果：（1）建立离体和在体IBD模型UPF1及IL-6R表达干预模型； （2）明确UPF1调控IL-6R-JAK/STAT3介导炎性损伤、病理性凋亡在IBD发病中的作用；（3）揭示UPF1调控IL-6R-JAK/STAT3介导炎性损伤、病理性凋亡在IBD发病中的分子机制。适用疾病：炎症性肠病		
预期形成的成果适用领域	诊断, 检测, 病理		
预期成果的临床获益效果	提高诊断符合率		
是否形成技术标准和诊治方案	否		
发明专利	实用新型专利	外观设计专利	软件著作权
0	0	0	0
论文数	其中SCI数	著作数	新产品
2	1	0	0
技术标准	培养硕士数	培养博士数	
0	1	0	
定性指标			
预期目标1	建立离体和在体IBD模型UPF1及IL-6R表达干预模型；		
预期目标2	明确UPF1调控IL-6R-JAK/STAT3介导炎性损伤、病理性凋亡在IBD发病中的作用；		
预期目标3	揭示UPF1调控IL-6R-JAK/STAT3介导炎性损伤、病理性凋亡在IBD发病中的分子机制。		
预期目标4			
预期目标5			



二、承担单位

第一申请单位				
单位名称	浙江大学医学院附属第一医院			
通讯地址	杭州市庆春路79号	邮编	310003	
联系电话		联系人	焦杨文	
合作单位				
序号	单位名称	联系人	联系电话	职责
1				
2				
3				
4				
5				

三、项目组成员

负责人					
姓名		朱华陀		身份证号	
出身年月				手机	
职务		医师		专业	胃肠病学
学历		硕士		学位	硕士
工作单位		浙江大学医学院附属第一医院			
其他成员					
序号	姓名	出生年月	职称	工作单位	项目分工
1	朱华陀		医师	浙江大学医学院附属第一医院	项目设计与论文撰写
2	陈洪谭		副主任医师	浙江大学医学院附属第一医院	实验指导与实施分配
3	杨铭		主治医师	浙江大学医学院附属第一医院	实验数据分析与统计
4	章粉明		医师	浙江大学医学院附属第一医院	UPF1及IL-6R表达干预模型建立
5	宁龙贵		研究生	浙江大学医学院附属第一医院	细胞实验验证及机制研究
6	楼歆荷		研究生	浙江大学医学院附属第一医院	动物实验验证及机制研究

四、 计划进度

计划在 2019.01-2021.12 三年内完成本项目研究工作，各年度研究计划如下：

2019.01-2019.12

- (1) IBD细胞模型及动物模型构建与评估；
- (2) 人结肠癌细胞Caco-2中UPF1及TKR4表达干预模型建立；
- (3) 小鼠中UPF1及IL-6R表达干预模型建立。

2020.01-2020.12

- (1) 体外研究UPF1表达变化对IL-6R-JAK/STAT3介导结肠上皮细胞中炎性损伤及凋亡的影响及机制；
- (2) 在体研究UPF1表达变化对IL-6R-JAK/STAT3介导结肠上皮细胞中炎性损伤及凋亡的影响及机制；

2021.01-2021.12

- (1) 体内外模型中研究以UPF1为核心的NMD机制调控IL-6R表达的具体分子机制；
- (2) 实验数据收集、整理、统计分析；
- (3) 论文撰写、项目成员参加国内外相关研究领域会议。

五、项目基本情况

研究内容:

1. UPF1、IL-6R/IL-6的表达及JAK/STAT3通路激活和细胞炎性损伤、凋亡的检测: 基于IBD细胞和动物模型, 采用qPCR、western blot检测UPF1、IL-6R/IL-6表达水平变化, JAK/STAT3通路激活情况; 共聚焦显微镜观察细胞及动物模型中结肠细胞及线粒体、内质网、溶酶体的形态变化。

2. 体外研究UPF1对IBD发生过程中结肠上皮细胞IL-6R-JAK/STAT3介导的炎性损伤、病理性凋亡的调节作用: 运用RNAi慢病毒和重组腺病毒载体的方法, 抑制或增强体外IBD模型中Caco-2细胞中UPF1的表达, 采用荧光定量qPCR、western blot、ELISA等方法, 检测结肠炎体外模型中Caco-2细胞相关炎症因子表达及损伤、凋亡相关分子, DAMPs产生与释放, 以及ROS及下游MOS、ERS等反应产生情况。

3. 体外研究UPF1通过IL-6R-JAK/STAT3途径对IBD发生发展过程中调控机制: 在上述体外研究结果的基础上, 运用western blot、qPCR等方法, 检测Caco-2细胞中UPF1表达抑制或增强后, IL-6R表达水平变化及JAK/STAT3活化水平, 相关炎症因子表达及损伤、凋亡相关分子, DAMPs产生与释放, 以及ROS及下游MOS、ERS等反应产生情况。并运用免疫共沉淀 (Co-immunoprecipitation, Co-IP)、双荧光素酶报告基因系统 (dual luciferase reporter assay system, DLR) 探索UPF1调控IL-6R转录具体机制; 并在此基础上, RNAi慢病毒抑制IL-6R表达, 检测JAK/STAT3活化水平, 相关炎症因子表达及损伤、凋亡相关分子, DAMPs产生与释放, 以及ROS及下游MOS、ERS等反应产生情况。反过来, 检测到细胞模型中IL-6R增强后, 通过腺病毒过表达UPF1, 检测上述指标变化; 从体外水平揭示UPF1通过IL-6R-JAK/STAT3调控结肠上皮细胞炎性损伤、凋亡参与IBD发病的可能机制。

4. 在体研究UPF1对IBD发生过程中结肠上皮细胞IL-6R-JAK/STAT3及损伤、凋亡的调节作用: 运用RNAi慢病毒或重组腺病毒抑制或增强IBD模型小鼠结肠细胞UPF1的表达, 观察肠道细胞UPF1表达变化对诱导小鼠IBD和炎症、损伤、坏死、凋亡程度的调节作用。

5. 在体研究UPF1通过IL-6R-JAK/STAT3途径对IBD发生发展过程中调控机制: 在上述体内研究动物中, 运用qPCR、Western Blot、IHC、ELISA和电镜等方法, 检测UPF1表达抑制或增强后, 模型小鼠结肠上皮细胞中IL-6R-JAK/STAT3信号通路分子及下游细胞因子以及肠道上皮细胞中氧化损伤、炎症反应、DAMPs产生与释放, 以及胞内ROS产生水平及MOS、ERS反应变化。从体内水平揭示UPF1通过IL-6R-JAK/STAT3调控结肠上皮细胞炎症、损伤、凋亡参与IBD发病的可能机制。

研究方法:

1. 体外结肠炎细胞模型的建立及UPF1、IL-6R/IL-6、JAK/STAT3的表达和细胞炎性损伤、凋亡的检测;
2. IBD在体小鼠模型的建立及UPF1、IL-6R/IL-6、JAK/STAT3的表达和细胞炎性损伤、凋亡的检测;
3. UPF1及IL-6R表达干预模型的建立;
4. 体外研究UPF1表达变化对IL-6R-JAK/STAT3介导结肠上皮细胞中炎性损伤及凋亡的影响及机制;
5. 在体研究UPF1表达变化对IL-6R-JAK/STAT3介导结肠上皮细胞中炎性损伤及凋亡的影响及机制;

创新点:

近年来,被称为“绿色癌症”的IBD在我国患病率呈逐渐上升趋势,严重危害了人们的生活健康;IBD虽是当前消化系统疾病研究热点之一,但其相关发病机制迄今尚未完全明了。UPF1是研究前期通过转录谱印记关联分析法,预测出的可能与IBD发病密切相关蛋白分子。近年研究发现,以UPF1为核心的NMD机制可调控并参与机体免疫反应,但是否参与IBD的发生发展尚无研究报道,且在研究前期,我们发现:抑制人结肠细胞NCM460中UPF1表达,上游分子IL-6R表达显著升高;JAK/STAT3通路在UPF1敲低组激活更加明显。基于以上线索,本项目申请者提出:UPF1可能通过IL-6R调控结肠上皮细胞JAK/STAT3途径,并释放大量的DAMPs启动免疫应答,并介导结肠上皮细胞的炎性损伤、凋亡过程,产生大量的ROS引发MOS及ERS,加重肠道屏障的破坏,从而在IBD发生与发展过程中发挥重要作用。因此,本项目以IBD为研究对象、研究思路有创新性、研究结果不仅有助于进一步阐明UPF1调控IL-6R-JAK/STAT3介导炎性损伤、病理性凋亡在IBD中发病机制且在临床诊治和新药研法有参考价值为主要特色。

六、 前期工作说明

(1) 转录谱印记比对法预测研究基础: 本课题组所在实验室运用转录谱印记关联分析的方法, 利用已发表的转录谱实验数据 (NCBI 基因表达数据库 GEO), 将 IBD 转录谱数据和基因沉默转录谱实验数据进行整合, 通过计算机分析, 从整体细胞反应入手辨识与 IBD 相关的功能分子, 初步建立了一系列可能与 IBD 发病密切相关蛋白分子; 通过该研究, 建立了较为成熟的蛋白功能研究技术路线, 为今后研究不同蛋白分子在 IBD 中的分子机制, 发现潜在的小分子靶标药物提供了依据与保证。

(2) UPF1 在 IBD 小鼠模型表达降低: 在 DSS 诱导 IBD 小鼠急性模型中, IHC 检测发现 UPF1 普遍表达于结肠上皮细胞中, 且在小鼠模型病变结肠表达水平明显下降, 通过 qPCR、western blot 确认在 IBD 模型小鼠中 UPF1 表达降低。

(3) UPF1 调控体外模型中结肠上皮细胞的 IL-6R 表达及 JAK/STAT3 通路: 运用 siRNA 及 pENTER 载体分别敲低、过表达 NCM460 细胞中 UPF1 表达可相应增加、降低 IL-6R 水平, 激活及抑制 JAK/STAT3 通路。

(4) 申请人长期从事 IBD 相关临床基础研究, 科研经验丰富, 主持国家自然科学基金青年基金一项, 参与省自然科学基金一项, 以第一作者发表有论文如下:

(1) Dysregulated Up-Frameshift Protein 1 Promotes Ulcerative Colitis Pathogenesis Through the TNFR1-NF-kappaB/MAPKs Pathway. Dig Dis Sci 2018.

(2) Serum periostin is a potential biomarker for non-alcoholic fatty liver disease: a case-control study. Endocrine. 2016 ;51(1): 91-100. (共同第一作者)

(3) Computational Prediction and Validation of BAHD1 as a Novel Molecule for Ulcerative Colitis. Scientific reports. 2015;5:12227.3.

七、 本课题相关内容的已有研究成果情况

主持或参加科研项目:

1. 国家自然科学基金青年基金, 81600413, BAHD1-TNFR1-RIPK1/3轴调控结肠上皮细胞坏死性凋亡及在溃疡性结肠炎中作用与机制探讨, 2017/01-2019/12, 19万元, 在研, 主持。
2. 浙江省自然科学基金项目, LY16H030005, 上游移码蛋白1相关的无意义介导mRNA降解在小鼠葡聚糖硫酸钠结肠炎中的作用探讨, 2016/01-2018/12, 8万, 在研, 参加。
3. 省部共建项目, WKJ-ZJ-1516, 炎症性肠病、肠结核、肠淋巴瘤的诊断和鉴别诊断标志物研究, 2015/07-2017/12, 30万元, 结题, 参加。

代表性研究成果:

1. Zhu H, Huang S, Yue M, Chen W, Lu C, Lou X, Li C, Shan G, Chen H, Xu X, Xu G, Chen L. Dysregulated Up-Frameshift Protein 1 Promotes Ulcerative Colitis Pathogenesis Through the TNFR1-NF-kappaB/MAPKs Pathway. Dig Dis Sci 2018.
2. Zhu J, Zhu H, Dai Y, Li C, Fang Z, Zhao D, Wan X, Wang Y, Wang F, Yu C, Li Y. Serum periostin is a potential biomarker for non-alcoholic fatty liver disease: a case-control study. Endocrine. 2016 ;51(1): 91-100.
3. Zhu H, Wan X, Li J, Han L, Bo X, Chen W, Lu C, Shen Z, Xu C, Chen L, Yu C, Xu G. Computational Prediction and Validation of BAHD1 as a Novel Molecule for Ulcerative Colitis. Scientific reports. 2015;5:12227.
4. Dai Y, Zhu J, Fang Z, Zhao D, Wan X, Zhu H, Yu C, Li Y. A case-control study: Association between serum neuregulin 4 level and non-alcoholic fatty liver disease. Metabolism. 2015;64(12):1667-73.
5. Dai Y, Yu W, Zhu H, Ding J, Yu C, Li Y. Is Helicobacter pylori infection associated with glycemic control in diabetics? World J Gastroenterol. 2015;21(17):5407-16.
6. Guo L, Chen W, Zhu H, Chen Y, Wan X, Yang N, Xu S, Yu C, Chen L. Helicobacter pylori induces increased expression of the vitamin d receptor in immune responses. Helicobacter. 2014;19(1):37-47).

八、 附件信息

是否有查新检索报告：	☐ 是 ☒ 否
是否使用实验动物：	☒ 是 ☐ 否
是否涉及伦理问题：	☐ 是 ☒ 否
是否涉及实验室生物安全：	☐ 是 ☒ 否
是否涉及干细胞：	☐ 是 ☒ 否
是否是临床前新技术研究：	☐ 是 ☒ 否
是否涉及病毒研究	☐ 是 ☒ 否

九、承诺书

本单位（或个人）承诺：

本申请书中所填写的内容和资料真实、有效，如存在弄虚作假和与事实相违背的内容，由本单位（个人）承担全部责任。

申报单位（盖章）：

项目负责人签字：朱厚院

2018年10月22日

十、单位审核意见

申报单位意见：

同意

单位（盖章）：

负责人签字：

2018年10月25日

上级主管部门意见：

同意

单位（盖章）：

负责人签字：

2018年10月25日

十一、省卫计委终审意见

省卫计委审核意见：

同意列入省医药卫生科研面上项目，
请单位予以经费配套。

省卫计委（盖章）：

2018年11月17日