

项目编号: 2017KJ191

天津市教委科研计划项目 (自然科学) 任务书

项目名称: miR-669b-3p 靶向调控 IDO 抑制小鼠心脏移植免疫排斥的机制研究

项目类别: ☒ 一般项目

项目负责人: 李川

联系电话: [REDACTED]

所在学校(盖章): 天津医科大学

起止年月: 2017 年 10 月 至 2020 年 09 月

天津市教育委员会制

二零一七年十二月

一、基本情况

项目编号		2017KJ191		☒ 一般项目 ☐ 重点项目	
项目名称		miR-669b-3p 靶向调控 IDO 抑制小鼠心脏移植免疫排斥的机制研究			
项目类别		☒ 基础理论研究项目 ☐ 应用研究项目 ☐ 开发性研究项目			
起始时间		2017 年 10 月		终止时间	2020 年 09 月
最终成果形式		论文			
参加项目人数		6 人	其中	高级 2 人, 中级 0 人, 其他 4 人; 博士 2 人, 硕士 3 人, 其他 1 人。	
项目 负责 人	姓名	李川		性别	男
	出生日期	1980 年 11 月		职称	副主任医师
	学历	博士		学位	博士
	手机			电子邮箱	mzzlee@163.com
承担 单位 信息	单位名称	天津医科大学		联系人	叶颖
	联系电话	022-83336717		电子邮箱	www.tijmu.edu.cn

二、主要研究内容

要解决的主要技术难点和问题 (3500 字左右)

1) miR-669b-3p 靶向 IDO 的验证

在前期研究中, 我们通过 miRNA 芯片技术对小鼠心脏移植术后受体心脏移植 miRs 的筛选, 发现 miR-669b-3p 上调近 5 倍。生物信息学预测 (TargetScan 和 miRanda) 结果提示 IDO 可能为 miR-669b-3p 的潜在靶基因。使用 miR-669b-3p agomir 和 antagomir 转染 293T 细胞, 提取细胞总 RNA, qRT-PCR 测定 IDO 的 mRNA 水平; 提取细胞总蛋白, Western blot 检测 IDO 蛋白水平。明确 miR-669b-3p 与 IDO 表达水平变化的关系, 并结合荧光素酶报告基因实验验证 IDO 是否为 miR-669b-3p 靶基因。

2) miR-669b-3p 影响 CD4+ T 细胞功能的体外研究

选用磁珠法从 C57BL/6 小鼠脾脏中分选出 CD4+ T 细胞, 并用 miRNA agomir 和 antagomir 转染试剂分别上调和下调 CD4+ T 细胞的 miR-669b-3p 水平, 以生理盐水作为对照组。转染 72h 后, 收获细胞, 分别检测 T 细胞的表面分子和细胞因子表达。另外, 我们还进一步将转染后

的各组 CD4⁺ T 细胞进行混合淋巴细胞培养（供体的脾淋巴细胞），检测 CD4⁺ T 细胞的增殖、凋亡情况以及细胞培养上清细胞因子、IDO 表达水平的改变。

3) miR-669b-3p 影响 CD4⁺ T 细胞功能的体内研究

我们在上一步的体外实验中分析了 miR-669b-3p 的表达对于 CD4⁺ T 细胞抑制功能的影响，而在体内是否也存在相似的作用呢？我们使用 miR-669b-3p agomir 和 antagomir 通过尾静脉注射于 C57BL/6 小鼠，分别上调和下调 miR-669b-3p 水平，并以生理盐水作为对照组。注射后 3 天，获取小鼠外周血、脾脏、胸腺、心脏组织等样本，检测 mi669b 和 IDO 的表达情况，以及 T 细胞亚群、CD4⁺ T 细胞功能和细胞因子（IFN- γ 、IL-4、IL-17、IL-2、IL-10、TNF- α 等）的变化。

4) miR-669b-3p 抑制小鼠心脏移植急性排斥反应的机制研究

在前面实验的基础上，我们将调控 IDO 的 miR-669b-3p 的表达作为干预手段应用于小鼠同种异位心脏移植模型中，观察 miR-669b-3p 表达水平对急性排斥反应及供体预后的影响。实验组使用 miRNA agomir 和 antagomir 尾静脉注射 C57BL/6 小鼠作为受体，上调或下调受体 miR-669b-3p 表达水平，然后进行小鼠同种异位心脏移植，在小鼠心脏移植模型中进一步阐明其体内作用机制。在心脏移植后第 3、5、7 天进行病理学分析，绘制移植心脏存活曲线，并检测受体外周血、脾脏中的 T 细胞亚群和不同炎症因子的表达情况，以及移植心脏组织中 IDO 的表达情况。

本项目将重点研究小鼠同种异体心脏移植免疫排斥过程中与 CD4⁺ T 细胞有关差异表达的 miRNA，及其对 CD4⁺ T 细胞的调控机制，进一步揭示 miR-669b-3p 通过靶向调控 IDO 在心脏移植排斥中起免疫调节作用的分子机制，从而通过调控特异性 miRNA 表达来影响 T 细胞的免疫功能，建立一种新的抑制移植免疫排斥的方法，为成功诱导免疫耐受奠定基础。

三、项目任务指标

技术指标、经济指标、**技术创新能力**及社会效益

内容提示：写具体的任务指标，如发表几篇什么类型的论文、申请几项专利等，应用研究类预达到什么技术指标等。

- 1) 明确 IDO 是否为 **miR-669b-3p** 的潜在靶基因，以及 miR-66b-3p 在体外和体内对 CD4+ T 细胞的增殖、**凋亡情况**的影响。
- 2) 进一步揭示 miR-669b-3p **靶向调控** IDO 在心脏移植排斥中的免疫调节作用的分子机制，从而通过调控特异性 **miRNA** 表达水平来抑制 T 细胞的免疫功能，建立一种新的抑制移植免疫排斥的**实验方法**。
- 3) 预期发表学术论文 2 篇，包括 **SCI 论文** 1 篇。协助培养博士生 1 名，硕士生 1 名。

项目负责人（签字）：

李川
2018年01月16日

四、项目进度和阶段目标

起止时间 (半年为时间段)	主要工作内容及阶段目标
2017 年 10 月-2018 年 03 月	miR-669b-3p 靶向 IDO 的验证。使用 miR-669b-3p agomir 和 antagomir 转染 293T 细胞，检测 IDO 的 mRNA 水平和蛋白表达水平。
2018 年 04 月-2018 年 09 月	继续 miR-669b-3p 靶向 IDO 的验证。明确 miR-669b-3p 与 IDO 表达水平变化的关系，并结合荧光素酶报告基因实验验证 IDO 是否为 miR-669b-3p 靶基因。

2018 年 10 月-2019 年 03 月	miR-669b-3p 影响 CD4+ T 细胞功能的体外和体内研究。分选野生型 B6 小鼠脾脏 CD4+ T 细胞，用 miRNA agomir 和 antagomir 转染试剂分别上调和下调 CD4+ T 细胞的 miR-669b-3p 水平，将转染后的各组 CD4+ T 细胞进行混合淋巴细胞培养，检测体外 CD4+ T 细胞的增殖、凋亡情况以及细胞培养上清细胞因子、IDO 表达水平的改变。
2019 年 04 月-2019 年 09 月	继续 miR-669b-3p 影响 CD4+ T 细胞功能的体外和体内研究。使用 miR-669b-3p agomir 和 antagomir 通过尾静脉注射于野生型 B6 小鼠，分别上调和下调 miR-669b-3p 水平。获取小鼠外周血、脾脏、胸腺、心脏组织等样本，检测体内 mi669b 和 IDO 的表达情况，以及 T 细胞亚群、CD4+ T 细胞功能和细胞因子（IFN- γ 、IL-4、IL-17、IL-2、IL-10、TNF- α 等）的变化。
2019 年 10 月-2020 年 03 月	miR-669b-3p 靶向 IDO 抑制小鼠心脏移植急性排斥反应的机制研究。使用 miRNA agomir 和 antagomir 尾静脉注射 B6 小鼠作为受体，上调或下调受体 miR-669b-3p 表达水平。在心脏移植后第 3、5、7 天进行病理学分析，绘制移植心脏存活曲线，并检测受体外周血、脾脏中的 T 细胞亚群和不同炎症因子的表达情况，以及移植心脏组织中 IDO 的表达情况。
2020 年 04 月-2020 年 09 月	继续 miR-669b-3p 靶向 IDO 抑制小鼠心脏移植急性排斥反应的机制研究。完成课题的收官工作，并进行论文的撰写。

五、参加人员及分工

序号	姓名	性别	出生年月	技术职称	工作单位	分工
1	李川	男	1980 年 11 月	副主任医师	天津医科大学总医院	实验设计
2	戚峰	男	1970 年 06 月	主任医师	天津医科大学总医院	实验指导
3	王金淼	男	1987 年 12 月	医师	天津医科大学总医院	动物模型建立
4	李宏岳	男	1986 年 10 月	研究实习员	天津医科大学总医院	细胞培养

5	王晓东	男	1990 年 12 月	博士研究生	天津医科大学总医院	流式细胞学分析
6	鲁遥衡	男	1993 年 06 月	硕士研究生	天津医科大学总医院	数据分析

六、经费支出预算

科目	金额 (万元)
1. 设备费	0
2. 材料费	5
3. 测试化验加工费	0.3
4. 燃料动力费	0
5. 差旅费	0.2
6. 会议费	
7. 国际合作与交流费	
8. 档案出版、文献信息传播、知识产权事务费	0.5
9. 劳务费	0
10. 咨询费	0
11. 管理费	0
12. 其他费用	0
总计	6

学校财务部门意见:



年 月

七、审核意见

所在院系意见



学校科研主管部门意见

填写报表真实；学校保证为该课题的研究提供条件；学校担保申请人在研究期限内完成课题工作。



市教委科技处意见

同意立项，经费贰万元

