

江苏省科技项目合同

计划类别 基础研究计划（自然科学基金）--面上项目

项目编号 BK20211010

项目名称 Fgfr2 在成骨细胞介导的上颌膜内成骨中的作用机制研究

项目类别 JD0333 口腔医学

起止年限 2021 年 7 月 至 2024 年 6 月

项目负责人 李煌 电话及手机

项目联系人 丁梦 电话及手机

承担单位 南京市口腔医院

单位地址 南京市中央路 30 号 邮政编码 210008

项目主管部门 南京市科学技术局

江苏省科学技术厅

二〇二一年

说明：

1、本合同适用于省基础研究、重点研发、国际科技合作/港澳台科技合作、软科学研究等计划。

2、合同条款中所有空项都需如实填写，确无此项的，请在该栏中打“/”或在空白处写“无”。

3、乙方盖章必须是单位公章，部门章无效。



江苏省科学技术厅

委托单位（甲方）： 江苏省科学技术厅

法定代表人： 王秦

地址： 南京市北京东路 39 号

邮政编码： 210008

承担单位（乙方）：

承担单位： 南京市口腔医院

统一社会信用代码： 12320100425800986D

法定代表人： 杨旭东

地址： 南京市中央路 30 号 邮政编码： 210008

项目负责人： 李煌

电话： 传真：

电子邮件：

保证单位（丙方、项目主管部门）： 南京市科学技术局

法定代表人（科技局局长）： 赵成军

地址： 南京市建邺区江东中路 265 号新城大厦 B 座 邮政编码： 210019

甲方批准由乙方承担省科技计划 《Fgfr2 在成骨细胞介导的上颌膜内成骨中的作用机制研究》 项目的研究开发或建设任务。依据《中华人民共和国民法典》的规定，为明确甲、乙、丙三方的权利和责任，保证项目的顺利实施和科研经费的合理使用，签订本合同。

第一部分 项目条款

一、项目的目标和主要研究内容

要解决的主要技术难题和问题，项目研究的创新点和内容等。

- 1、Fgfr2 成骨细胞条件敲除小鼠与野生型小鼠颅颌面部表型差异，探究 Fgfr2 在上颌膜内成骨中的时空作用
- 2、体外培养成骨细胞，敲除 Fgfr2 对其成骨分化功能的影响
- 3、研发制备改良的 GelMA 生物材料，促进骨缝的再生
- 4、利用质粒 DNA，研发制备具有 Fgfr2 激活性的改良 GelMA 生物材料
- 5、手术移植具有 Fgfr2 激活性的改良 GelMA，探究恢复 Fgfr2 功能对促进骨缝改建和上颌骨发育的作用

江苏省科学技术厅

二、项目验收内容和考核指标

项目验收和考核突出高质量成果和创新绩效，具体包括 1、主要技术指标：如形成的专利、新技术、新产品、新品种、新装置、论文代表作、专著等数量、指标及其水平等；2、主要经济指标：如技术及产品所形成的市场规模、效益等；3、项目实施中形成的示范基地、中试线、生产线及其规模等；4、其他应考核的指标。

Fgfr2 成骨细胞条件敲除小鼠与野生型小鼠颅颌面部表型差异，探究 Fgfr2 在上颌膜内成骨中的时空作用体外培养成骨细胞，敲除 Fgfr2 对其成骨分化功能的影响研发制备改良的 GelMA 生物材料，促进骨缝的再生利用质粒 DNA，研发制备具有 Fgfr2 激活性的改良 GelMA 生物材料手术移植具有 Fgfr2 激活性的改良 GelMA，探究恢复 Fgfr2 功能对促进骨缝改建和上颌骨发育的作用 1、Fgfr2 成骨细胞条件敲除小鼠模型的构建体外成骨细胞敲除 Fgfr2，观察对成骨分化的影响改良 GelMA 生物材料的制备及物理性能检测具有 Fgfr2 激活性的改良 GelMA 生物材料的制备。2、探索骨性错合畸形的发生机制，为临床骨性错合畸形的防治提供指导寻找骨性错合畸形早期分子干预靶点。3、参加国际国内会议报告 1~2 次；发表 SCI 论文 2~3 篇，IF>5 的不少于 1 篇；在中文核心期刊发表论文 1~2 篇 4、探索 Fgfr2 在上颌发育中的作用以及靶向 Fgfr2 治疗上颌发育不足的可能性，为临床治疗骨性错合畸形提供理论依据和新策略 5、完成国内 Fgfr2 成骨细胞条件敲除小鼠模型的首次构建为骨性错合畸形如地包天的早期分子干预提供新的方向为其他骨骼疾病的治疗提供治疗思路。

江苏省科学技术厅

受理编号	X0081
学科专业代码	口腔正畸学
申报项目类别	重点项目

江苏省卫生健康委 医学科研项目申报书

项目名称： 肥胖状态下脂肪外泌体对颞下颌骨关节炎的作用
及其机制研究

项目负责人： 李煌

电 话：

电子邮箱：

申报单位： 南京市口腔医院

申报科室： 口腔正畸科

地 址： 江苏省南京市玄武区中央路30号

邮政编码： 210000

主管部门： 南京市卫健委

填报日期： 2022年03月23日

研究期限： 2023-01-01—2025-12-31

江苏省卫生健康委员会制

二零二一年

科研诚信承诺书

本人将按照《关于组织开展省卫生健康委2021年度医学科研项目申报工作的通知》(苏卫科教〔2021〕7号)要求,严格遵守科学道德和诚信要求,确保项目申报材料真实、合规、有效。如发现有科研诚信问题,本人将积极配合调查并接受相应处理。

项目负责人签名
(日期)



单位公章:



(日期)

2022.03.24

填写提纲

一、立项依据：

1. 研究意义

颞下颌关节骨关节炎(temporomandibular joint osteoarthritis, TMJ OA)是颞下颌关节病中最为严重的一种,它是一类以关节软骨及软骨下骨退行性病变为主的无菌炎症性疾病^{1,2}。近年来多个研究报道颞下颌关节病的患病率达 22%以上,在我国大陆地区更是高达 31%³⁻⁶。TMJ OA 与超负荷机械应力、肥胖、激素、衰老、精神状态等多种致病因素相关^{7,8},其中全身性因素对 TMJ OA 发病的影响越来越受到学者的关注。

由于人类生活水平的提高和饮食习惯的改变,肥胖已经成为一个普遍存在的公共健康问题⁹。研究发现肥胖的脂肪组织对骨关节炎的发生发展有着多方面的促进作用^{10,11}。肥胖状态下,脂肪组织除了增加机械负载,还能作为内分泌器官产生和分泌大量的脂肪因子(adipokines),引起全身代谢紊乱和系统性炎症¹²。近年来,肥胖和 TMJ OA 发病的相关性也在临床研究和动物实验中得到了证实¹³⁻¹⁵。我们的前期研究表明,高脂饮食(high fat diet, HFD)导致的肥胖可以加重小鼠 TMJ 的退行性病变,且伴随脂肪因子瘦素(leptin)和炎症因子的表达增高¹⁶。此外,和正常健康人群相比, TMJ OA 患者的 BMI(身体质量指数)增加,血浆中相关的饱和脂肪酸表达有明显上升(见工作基础)。因此,肥胖作为重要的全身性影响因素,对 TMJ OA 的发展起着促进作用。

与膝关节等负重关节不同,肥胖脂肪组织带来的过度机械负载无法直接作用与颞下颌关节等非负重关节。脂肪组织对于骨和软骨的远程调控机制尚不明确。脂肪细胞来源的外泌体(adipocyte derived exosomes, Ad-Exo)是一种新型脂肪因子,它可以携带特异性 miRNA 等生物活性物质进入循环系统,作用于全身的靶器官如 TMJ^{17,18}。我们的前期研究表明,肥胖状态下 Ad-Exo 的分泌增多,那么肥胖状态的 Ad-Exo 是如何聚焦于 TMJ 软骨,又是通过何种机制来加重 TMJ OA?

本研究拟从临床问题出发,在临床患者样本检测的基础上,结合经典 TMJ OA 小鼠模型和高脂饮食诱导的 TMJ OA 肥胖小鼠模型,从体内外实验来深入探究肥胖状态下 Ad-Exo 对 TMJ OA 发病的影响,解析其在 TMJ OA 发病中的具体机制,为寻找新的 TMJ OA 分子治疗手段提供理论依据。

2. 选题的理论和实践依据

2.1 肥胖状态下脂肪组织对 TMJ OA 的发生发展起着多向促进作用

近二十年来,有研究表明骨关节炎的患者人数上升了 34.8%,除了人口老龄化的问题,肥胖人群的比例增加也是主要的危险因素之一¹⁹。近期研究表明,我国的肥胖人群较 10 年前有显著升高,其中青少年超重率和肥胖率为 19.1%和 12.4%²⁰,成年人超重率和肥胖率更是达到了 34.4%和 16.4%²¹。肥胖作为一种全身影响因素,它与多种疾病密切相关,其中与骨关节炎发生的关系已得到了证实²²。

与正常人体相比,肥胖人群体内囤积了更多的脂肪组织。根据所处的部位,脂肪组织可分为皮下脂肪(subcutaneous adipose tissues, SAT),内脏脂肪(visceral adipose tissues, VAT),骨髓脂肪组织(bone marrow adipose tissues, BMAT),以及关节内脂肪(intra-articular adipose tissues, IAAT)等;根据脂肪组织的形态功能又可分为白色脂肪组织、棕色脂肪组织、米色脂肪组织等²³。脂肪组织在传统上被认为是能量储存器官,但近年来其作为内分泌器官的作用逐渐得到了重视。脂肪组织可以合成分泌多种可溶性脂肪因子,对于全身组织器官如骨与软骨起着重要的调控作用^{24,25}。

在肥胖状态下,脂肪组织通过机械刺激、代谢改变、系统性炎症等多种途径调节骨关节炎的进展。一方面,全身系统的脂肪组织的增加会对关节造成超负荷力学加载。正常人体脂肪组织所占体重比例约为 20%,肥胖状态下皮下脂肪和内脏脂肪含量明显升高,体脂率可达 30%甚至更高²⁶,这种机械应力的异常增加会导致 OA 的开始和进展²⁷。另一方面,脂肪组织可以通过其内分泌作用影响关节健康。皮下脂肪和内脏脂肪是白色脂肪的主要来源,可以分泌大量脂肪因子和促炎因子,在不同程度上影响关节组织的代谢平衡²²。有研究发现从 OA 患者移植的皮下脂肪可以刺激促炎因子的激活²⁸。大量的脂肪因子被报道与 OA 的发生、发展相关²⁹。例如肥胖患者体内表达上调的瘦素和脂联素,现已被确定为是骨关节炎疼痛相关的标志物³⁰。还有研究表明,在肥胖、II 型糖尿病、骨质疏松等情况下,骨髓会发生脂肪性变³¹。此外,与脂肪组织的增加对骨关节炎的促进作用一致的是,PNAS 研究报道缺乏脂肪组织的小鼠关节的骨量会显著增加,且能够减轻机械力导致的软骨损伤,提示骨和脂肪组织之间存在直接的作用关系³²。

肥胖对于 TMJ OA 也是重要的风险因素,患者机体内的慢性炎症和代谢紊乱状态对非负重关节同样有促进作用^{10,33}。有临床调查表明,颞下颌关节紊乱病与肥胖

程度之间存在着较高的相关性。Wright 在 2010 年报道了一例同卵双胞胎，发现肥胖和 TMJ 的慢性疼痛有高度相关性³⁴。Ahmet Karaman 等 2019 年评价了肥胖和 TMD 人群的相关性，他们对 1528 个 14-19 岁的个体进行了大样本调查，发现肥胖人群的 TMJ 的疼痛症状要更为严重¹⁴。Kwang-Sig Lee 等最新采用人工智能对韩国 4744 名大于 19 岁的 TMD 患者进行调查研究，发现在 TMD 前 20 位影响因素里，BMI 指数排名第一。Ossi Miettinen 对 8685 名芬兰大于 19 岁的人群进行调查，发现 BMI ≥ 25 的肥胖人群与 TMD 疼痛密切相关¹⁵。我们的前期研究也表明高脂饮食诱导的肥胖小鼠模型中，TMJ 软骨中脂肪因子瘦素的表达显著增高，且能促进炎症因子 IL-1 β 的分泌和分解代谢分子 MMP13 的表达增加，最终加重 TMJ OA 病变；采用降脂药他汀可以缓解 TMJ OA¹⁶。此外，我们还发现 TMJ OA 患者 BMI 指数有显著增加；TMJ OA 患者血浆胆固醇和多种饱和脂肪酸表达均有明显上升（见工作基础）。

由上可以看出，肥胖状态下的脂肪组织对于 TMJ OA 等骨关节炎有多向促进作用（图 1）—脂肪组织会通过增加机械负载和分泌脂肪因子来破坏机体代谢稳态，促进炎症发生，引起关节软骨降解，诱发免疫反应，并破坏成骨和破骨的平衡，最后加重骨关节炎。那么，脂肪组织是如何远程作用于骨与软骨，其背后的调控机制尚不清楚，有待于深入研究。

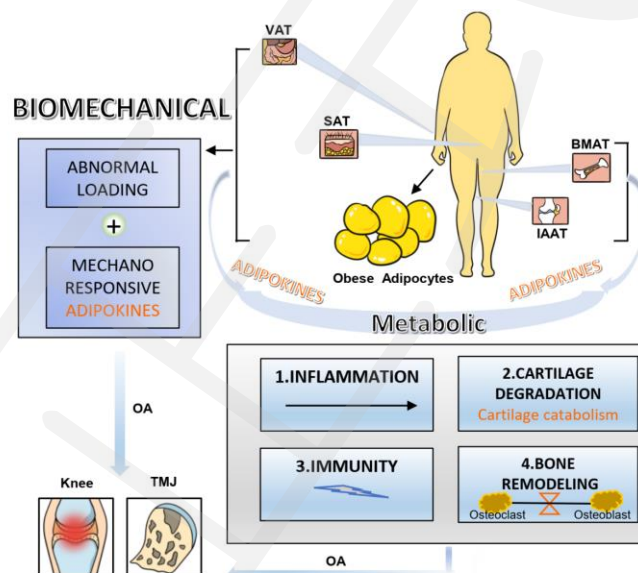


图 1. 肥胖促进 TMJ OA 等骨关节炎的发生机制（作者自绘）

肥胖状态下，脂肪组织 VAT/SAT//BMAT/IAAT 等增加，通过增加机械负载，分泌脂肪因子来破坏机体代谢稳态，促进炎症的发生，引起关节软骨的降解，诱发免疫反应，并破坏成骨和破骨的平衡稳态，最后加重骨关节炎。

南京市医学科技发展项目

申 请 书

学科名称：正畸专业

项目类别：卫生科技发展重点项目

项目名称：*FGFR2*基因与骨性错殆畸形的相关性及其
作用机制研究

承担单位：南京大学附属口腔医院南京市口腔医院

协作单位：无

项目负责人：李煌

申请时间：2020年08月10日

完成时间：2023年12月30日

南京市卫计委制

填写说明

一、填写本申请书之前，请先查阅“南京市医学科技发展项目（课题）管理办法”，按照有关规定认真填写。各项内容要求实事求是，表达要明确、严谨。外来语同时用原文和中文表达。

二、申请书需以下附件：

1. 与合作单位或协作单位的合同书（或协议书）；
2. 有动物实验的须出具医学实验动物和动物设施及实验人员合格证明；
3. 涉及药物临床试验的，必须具备自主知识产权，同时提供相关证明（如院内制剂相关证明等）
4. 凡涉及临床试验的，需提供本单位医学伦理学批件；
5. 凡涉及人类遗传资源（含有人体基因组、基因及其产物的器官、组织、细胞、血液、制备物、重组脱氧核糖核酸构建体等及其产生的信息资料）的，有境外合作内容的，必须按照有关规定办理报批手续；
6. 其他证明材料。

一、立项依据（包括国内外研究现状、发展趋势、理论与实践依据、研究目的意义等）

（1）骨性错殆畸形是由上下颌骨生长不均衡造成的颌间关系异常，遗传因素是骨性错殆畸形的重要致病因素，但其具体发病机制仍不清楚。

骨性错殆畸形是正畸临床最常见的颅面部骨骼畸形，它表现为上下颌骨三维方向上的骨性不调^[1]。人群中骨性错殆畸形的患病率高达27.9%^[2]。骨性错殆畸形严重影响患者的身心健康。骨性错殆畸形影响患者咀嚼和发音，进而影响患者的消化功能和全身营养状态^[3]。颜面部的畸形会降低患者在社会生活中的自信心^[4,5]，甚至可能导致严重的心理障碍^[6,7]。因此骨性错殆畸形的防治有重要的临床意义。

骨性错殆畸形的早期发现和早期治疗能够在儿童生长发育旺盛的时候促进或者抑制颌骨生长，在一定程度上改善骨骼的异常发育，即使难以将严重的骨性错殆畸形纠正至正常骨面型，也能一定程度减轻症状。部分未能早期发现骨性错殆畸形并进行治疗的患者以及严重的骨性错颌畸形患者可在成年后通过手术改变上下颌骨的位置，从而改善面形。目前的早期正畸治疗效果有限、后期手术治疗花费高且患者未成年阶段伴有的面部不美观严重影响生活质量。因此，探索骨性错殆畸形的发病机理，探寻早期诊断和治疗骨性错殆畸形的新方法是必要而迫切的。

遗传因素是骨性错牙合畸形的重要致病因素^[8-13]。正畸临床上发现，骨性错殆畸形有明显的遗传倾向和家族聚集性^[14]，尤其是骨性 III 类错殆畸形。国内外多个研究都报道了骨性错殆畸形的家族聚集性发病^[15-17]。骨性错殆畸形属于多基因遗传病^[18]，多基因遗传病是指疾病的发生受到多对等位基因控制，而并非由一对等位基因控制。探究骨性错殆畸形发病中遗传基因的影响及机制将有利于骨性错殆畸形的早期诊断和早期治疗，例如利用基因芯片可以快速高效的获得基因突变、缺失等异常信息^[19]，从而能够在胚胎期就获得遗

传性疾病的相关信息，尽早制定治疗计划。然而，目前尚缺乏对骨性错颌畸形的遗传机制的研究，无法通过基因检测早期预估骨性错颌畸形的发生，也就无法通过更早期的正畸治疗来减少骨性错颌畸形的发生^[20-21]。因此，明确骨性错颌畸形的遗传机制以及分子水平的发病机制，对进一步理解骨性错颌畸形的病因，对于早期预估、预防和针对性治疗都具有重要的指导意义。

(2) FGFR2 基因与颅面部骨骼发育关系密切，申请人前期研究中首次发现 FGFR2 基因内含子 2 上的 SNP 位点 rs2981578、rs10736303 和 rs1078806 与骨性错颌畸形的发生相关且连锁不平衡。

颅面部骨骼的发育与多个基因相关，其中成纤维细胞生长因子受体 2(fibroblast growth factor receptor2, FGFR2)基因与骨性错颌畸形的关系得到了我们的关注。**FGFR2** 是成纤维细胞生长因子受体家族中主要参与膜内成骨的成员，膜内成骨是颅面骨组织形成的主要方式^[22]。

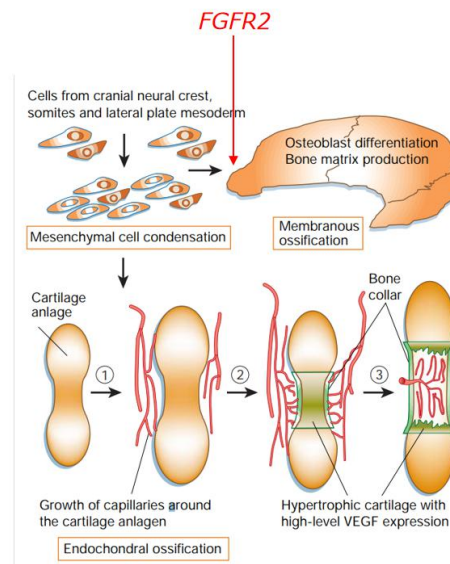


图 1.1 FGFR2 基因参与膜内成骨（修改自 Nature. 2003 May 15;423(6937):343-8）

有研究报道 FGFR2 上的多个突变都能导致颅缝早闭综合征，进而出现明显的颅面骨发育异常^[23-26]；Fgfr2 突变的动物模型表现为颅面部骨骼密度、体积以及比例的明显变化^[27-29]。Fgfr2 全敲小鼠胚胎期死亡，并表现出包括颅骨在

内的多个组织器官发育异常^[30]；而 *Fgfr2* 间质细胞条件敲除鼠则表现为生长迟缓、头颅畸形以及骨密度改变^[31]。由此可见，**FGFR2 基因对颅面部骨骼发育至关重要**。然而，到目前为止，关于 FGFR2 基因与骨性错颌畸形发病风险相关性的研究较少，仅在 2015 年 Fontoura 等^[32]报道了 rs2162540 与骨性 II 类错颌畸形相关，rs11200014 与骨性 III 类错颌畸形相关，且这一结果有待进一步验证。同时，该研究报道的两个阳性位点均位于内含子 2 上，尚无功能研究报道，它们与骨性错颌畸形相关的内在机制仍不明确。此外，FGFR2 基因与中国人骨性错颌畸形的相关性尚未有报道。因此，本研究旨在**中国黄种人群中对 FGFR2 基因与骨性错颌畸形发生的相关性进行研究，并尝试探究其内在机制**。本研究团队前期研究发现五个阳性位点 (rs2162540、rs2981578、rs1078806、rs11200014 和 rs10736303) 与骨性错颌畸形相关，其中 rs2162540 与骨性 II 类错颌畸形显著相关 ($P=0.003$)；rs2981578、rs1078806、rs11200014 以及 rs10736303 则被发现与骨性 III 类错颌畸形显著相关 ($P<0.05$)。rs2981578、rs10736303 以及 rs1078806 是首次被发现与骨性错颌畸形相关，提示 **FGFR2 是骨性错颌畸形易感基因**。这五个阳性位点都位于 *FGFR2* 基因长转录本的内含子 2 上且连锁不平衡，提示这些阳性 SNP 位点可能并非都具有功能意义，不具有功能意义的 SNP 位点可能会因为与功能位点连锁不平衡而被发现与疾病相关。因此，我们尝试寻找这 5 个阳性位点中可能存在的一个或者多个功能位点。

申请人研究团队查阅大量文献发现，SMAD4 能与靶基因上 5'-AGAC-3' 序列结合，其中“GAC”序列对其结合最为关键^[33]，而此次发现的五个阳性位点中 rs10736303 所在序列为 5'-agaC/T-3'。SMAD4 是骨形态发生蛋白 (Bone morphogenetic protein, BMP) 和转化生长因子- β (Transforming growth factor, TGF- β) 通路的共同转导分子^[34]，在维持成骨细胞功能中发挥着重要作用。此外，在乳腺癌中 rs2981578 被报道是 Runt 相关转录因子 2 (Runt-related transcription factor 2, RUNX2) 的结合位点^[35]。RUNX2 是一种在成骨细胞分化过程中起重要作用的转录因子^[36]。分子机制的研究则表明，RUNX2 蛋白参