

关于国家自然科学基金资助项目批准及有关事项的通知

周辛欣 先生/女士：

根据《国家自然科学基金条例》的规定和专家评审意见，国家自然科学基金委员会（以下简称自然科学基金委）决定批准资助您的申请项目。项目批准号：

81600414，项目名称：SIRT1在溃疡性结肠炎肠上皮细胞内质网应激损伤中的作用及机制研究，直接费用：17.00万元，项目起止年月：2017年01月至2019年12月，有关项目的评审意见及修改意见附后。

请尽早登录科学基金网络信息系统（<https://isisn.nsfc.gov.cn>），获取《国家自然科学基金资助项目计划书》（以下简称计划书）并按要求填写。对于有修改意见的项目，请按修改意见及时调整计划书相关内容；如对修改意见有异议，须在计划书电子版报送截止日期前提出。**注意：请严格按照《国家自然科学基金资助项目资金管理办法》填写计划书的资金预算表，其中，劳务费、专家咨询费科目所列金额与申请书相比不得调增。**

计划书电子版通过科学基金网络信息系统（<https://isisn.nsfc.gov.cn>）上传，由依托单位审核后提交至自然科学基金委进行审核。审核未通过者，返回修改后再行提交；审核通过者，打印为计划书纸质版（一式两份，双面打印），由依托单位审核并加盖单位公章后报送至自然科学基金委项目材料接收工作组。计划书电子版和纸质版内容应当保证一致。

向自然科学基金委提交和报送计划书截止时间节点如下：

- 1、提交计划书电子版截止时间为**2016年9月11日16点**（视为计划书正式提交时间）；
- 2、提交计划书电子修改版截止时间为**2016年9月18日16点**；
- 3、报送计划书纸质版截止时间为**2016年9月26日16点**。

请按照以上规定及时提交计划书电子版，并报送计划书纸质版，未说明理由且逾期不报计划书者，视为自动放弃接受资助。

附件：项目评审意见及修改意见

国家自然科学基金委员会
医学科学部
2016年8月17日

附件：项目评审意见及修改意见表

| | | | | | |
|--|-----------------------------------|-------|------|---------------------|-------|
| 项目批准号 | 81600414 | 项目负责人 | 周辛欣 | 申请代码1 | H0306 |
| 项目名称 | SIRT1在溃疡性结肠炎肠上皮细胞内质网应激损伤中的作用及机制研究 | | | | |
| 资助类别 | 青年科学基金项目 | | 亚类说明 | | |
| 附注说明 | | | | | |
| 依托单位 | 浙江大学 | | | | |
| 直接费用 | 17.00 万元 | | 起止年月 | 2017年01月 至 2019年12月 | |
| 通讯评审意见： | | | | | |
| <1> | | | | | |
| 一、简述申请项目的主要研究内容和申请者提出的科学问题或假说 | | | | | |
| 申请者在前期研究基础上，结合课题组前期研究结果，提出假说：SIRT1能够保护肠上皮细胞免于ERS诱导的细胞凋亡和肠道炎症，其机制可能与抑制ERS应激和后续的凋亡信号有关。 | | | | | |
| 二、具体意见 | | | | | |
| （一） 申请项目的预期结果及其科学价值和意义 | | | | | |
| 该研究具有一定的科学意义，从内质网应激的角度，对SIRT1调节溃疡性结肠炎肠上皮细胞屏障功能的作用和机制作了探讨。 | | | | | |
| （二） 科学问题或假说是否明确，是否具有创新性 | | | | | |
| 立论依据阐述清楚，研究背景了解较为深入，提出的假说清晰明确，国内外未见相关报道，具有很好的创新性。 | | | | | |
| （三） 研究内容、研究方案及所采用的技术路线 | | | | | |
| 研究内容具体，研究目标明确，研究方案合理，技术路线能够验证所提出的假说。课题组成员有很好的工作积累，掌握课题开展所需的实验方法，项目实施的可行性好。 | | | | | |
| （四） 申请人的研究能力和研究条件 | | | | | |
| 申请人具有较好的科研背景，有预实验的工作基础，实验平台具备完成该项目的研究条件。 | | | | | |
| （五） 其它意见或修改建议 | | | | | |
| <2> | | | | | |
| 一、简述申请项目的主要研究内容和申请者提出的科学问题或假说 | | | | | |
| 在前期研究基础上，申请者推测SIRT1可保护肠上皮细胞免于ERS诱导的细胞凋亡和肠道炎症。为此本课题通过体内外实验，探讨SIRT1对于ERS诱导肠上皮细胞凋亡的保护作用和机制。 | | | | | |
| 二、具体意见 | | | | | |
| （一） 申请项目的预期结果及其科学价值和意义 | | | | | |
| 明确SIRT在UC中的作用及对ERS诱导细胞凋亡的影响及可能机制，为UC治疗提供潜在的靶点。 | | | | | |
| （二） 科学问题或假说是否明确，是否具有创新性 | | | | | |
| 立题中明确提出假说，即SIRT1能够保护肠上皮细胞免于ERS诱导的细胞凋亡和肠道炎症。 | | | | | |
| （三） 研究内容、研究方案及所采用的技术路线 | | | | | |
| 研究方案中没有给出所用实验动物数量 | | | | | |
| （四） 申请人的研究能力和研究条件 | | | | | |
| 尽管申请人研究经历薄弱，但本课题有良好的研究前景，课题组成员科研能力雄厚，可支持完成。 | | | | | |
| （五） 其它意见或修改建议 | | | | | |

<3>

一、简述申请项目的主要研究内容和申请者提出的科学问题或假说

研究内容：检测SIRT1表达改变对细胞凋亡的影响，同时检测ERS标记性分子GRP78及其诱导凋亡相关分子caspase-12，CHOP的表达水平。（1）

体外实验研究SIRT1对结肠上皮细胞炎症损伤、细胞凋亡的影响；（2）

动物实验研究SIRT1对结肠上皮组织炎症损伤、细胞凋亡的影响。

科学假说：SIRT1能够保护肠上皮细胞免于ERS诱导的细胞凋亡和肠道炎症，机制可能为抑制ERS诱导凋亡的相关分子（caspase-12，CHOP等）的表达。

二、具体意见

（一） 申请项目的预期结果及其科学价值和意义

本研究预期证明SIRT1参与溃疡性结肠炎上皮细胞炎症损伤及细胞凋亡整个过程，该过程与内质网应激相关。本课题前期研究发现UC肠粘膜组织SIRT1表达减少，而已有研究表明SIRT1可影响内质网应激，所以，预期结果值得期待。其科学价值在于发现一个新的靶点可以调控溃疡性结肠炎肠上皮细胞凋亡，为今后治疗提供理论依据。

（二） 科学问题或假说是否明确，是否具有创新性

该研究提出了明确假说，即观察溃疡性结肠炎肠道内SIRT1表达有差异，将其与内质网应激相联系，揭示SIRT1对于ERS诱导肠上皮细胞凋亡的保护作用及可能机制。已有相关研究证明激活SIRT1可使结肠炎上皮细胞ERS减轻，改善肠道炎症（标书背景部分有说明），本课题再次将SIRT1这个靶基因作为研究溃疡性结肠炎的入手点，并将其内质网应激结合，具备一定的新颖性。

（三） 研究内容、研究方案及所采用的技术路线

该研究分别通过体外体内实验论证SIRT1对结肠上皮细胞炎症损伤、细胞凋亡的影响，并探索其机制。采用选择性SIRT1抑制剂及激动剂干扰其表达情况的方法进行深入机制研究。基本可以满足该课题所提出的问题。从体内到体外，从抑制到过表达，方法合乎逻辑，具有可行性。

（四） 申请人的研究能力和研究条件

该申请人前期具有基础研究的相关经历，有相应文献发表。前期预实验有一定的基础。该研究机构为大学附属医院，以往申请过相关基金，具备完成该项目的研究条件。

（五） 其它意见或修改建议

增加前期工作基础，从而为本课题可行性增加说服力。

对研究方案的修改意见：

医学科学部

2016年8月17日

浙江省自然科学基金资助项目批准通知

周辛欣同志：

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 | | LQ16H030001 | | 依托单位 | | 浙江大学 | |
| 项目名称 | | SIRT1 在炎症性肠病肠道黏膜上皮细胞内质网应激损伤中的作用及机制研究 | | | | | |
| 项目负责人 | | 周辛欣 | | 证件号码 | | 331003198506050041 | |
| 项目类别 | | 青年基金项目 | | 研究期限 | | 2016 年 1 月 至 2018 年 12 月 | |
| 总经费 (万元) | | 5.0 | 省财政资助经费 (万元) | 5.0 | 单位联合资助经费 (万元) | | 0.0 |
| 序号 | 其他主要成员 | 证件号码 | | 性别 | 单位名称 | | |
| 1 | 季峰 | 330103196211260098 | | 男 | 浙江大学/医学院 | | |
| 2 | 沈哲 | 330521198203090256 | | 男 | 浙江大学/医学院 | | |
| 3 | 张雪群 | 330222198007200067 | | 女 | 浙江大学/医学院 | | |
| 4 | 钟卫祥 | 421121198204137010 | | 男 | 浙江大学/医学院 | | |
| 5 | 王亚梅 | 150426199103202828 | | 女 | 浙江大学/医学院 | | |
| 6 | | | | |  | | |

浙江省自然科学基金委员会办公室



浙江省自然科学基金

资助项目研究计划书

| | |
|--------|--|
| 立项编号 | LQ16H030001 |
| 项目名称: | SIRT1 在炎症性肠病肠道黏膜上皮细胞内质网应激损伤中的作用及机制研究 |
| 总资助经费: | 5.0 万元 |
| 起止年月: | 2016 年 1 月 至 2018 年 12 月 |
| 项目负责人: | 周辛欣 电话: 13588137257 |
| 电子邮箱: | zhouxx03@126.com |
| 通信地址: | 浙江/杭州市/上城区 . 庆春路 79 号 |
| 邮政编码: | 310003 |
| 依托单位: | 浙江大学 |
| 联 系 人: | 谢崇波 电话: 13858054383 |
| 申报日期: | 2015-11-24 |

浙江省自然科学基金委员会

二〇一五年制

填写说明

- 一、收到《浙江省自然科学基金资助项目批准通知》（简称《批准通知》）后，请认真阅读自然科学基金有关项目和经费管理办法，按要求认真填写《浙江省自然科学基金资助项目研究计划书》（简称《计划书》）。填写《计划书》时要求科学严谨、实事求是、表述清晰、准确，并认真阅读本填报说明。
- 二、项目负责人和依托单位应当按照申请书的内容填写、审核资助项目研究计划书，除根据确定的资助额度对项目经费预算进行适当调整外，不得对申请书的其他内容进行变更。
- 三、《计划书》经项目负责人和依托单位签字盖章，并经省自然科学基金委员会办公室审核批准后，将作为项目研究计划执行和检查、验收的依据。
- 四、资助项目的有关研究成果，包括论文、专著、专利、获奖情况，均须按规定标注“浙江省自然科学基金资助项目”和立项编号。
- 五、省自然科学基金的资助经费管理（包括省级财政拨款经费、单位联合资助经费）依照《关于改进加强省级财政科研项目 and 资金管理的若干意见》（浙政办发〔2014〕148 号）、《浙江省省级科技研发和成果转化项目经费管理暂行办法》（浙财教〔2012〕357 号）和《关于严肃财经纪律规范科技经费使用和加强监管的若干意见》（浙财教〔2012〕29 号）等相关文件的规定执行，非省级财政拨款单位联合资助经费参照以上文件执行。

基本信息

| | | | | | | |
|--------|--|-------------|--------------------------------------|---|--------------------|----------|
| 负责人信息 | 姓 名 | 周辛欣 | 性别 | 女 | 出生日期 | 1985-6-5 |
| | 电 话 | 13588137257 | E-mail | | zhouxx03@126.com | |
| | 证件类型 | 身份证 18 位 | 证件号码 | | 331003198506050041 | |
| 项目基本信息 | 项目名称 | | SIRT1 在炎症性肠病肠道黏膜上皮细胞内质网应激损伤中的作用及机制研究 | | | |
| | 项目类别 | | 青年基金项目 | | 研究属性 | 应用基础研究 |
| | 学科代码 | | H0306 | | | |
| | 学科代码名称 | | 医学科学部/消化系统/消化道内环境紊乱、黏膜屏障障碍及相关疾病 | | | |
| | 依托基地名称 | | 浙江省传染病重点实验室 | | | |
| | 预计研究年限 | | 2016 年 1 月 至 2018 年 12 月 | | | |
| | 总资助经费 | | 5.0 万元 | | | |
| | <p>项目研究目标、内容和意义简介</p> <p>近来研究发现肠黏膜上皮细胞内质网应激(ERS)导致肠上皮屏障功能受损是炎症性肠病(IBD)的重要病因。沉默信息调节因子 1 (SIRT1)可以减轻 ERS 诱导的细胞凋亡, 但是否对 ERS 导致的黏膜屏障损伤和肠道炎症具有保护作用尚未见文献报道。本研究在已有研究基础上构建结肠炎细胞模型和 IBD 动物模型, 通过选择性 SIRT1 抑制剂或激动剂作用, 探讨 SIRT1 对肠上皮屏障损伤的保护作用, 并进一步研究 SIRT1 表达改变对于细胞凋亡的影响; 通过检测 ERS 诱导凋亡的相关分子 caspase-12, CHOP 的表达水平, 揭示 SIRT1 对于 ERS 诱导的肠黏膜上皮细胞凋亡的保护作用及可能机制。本课题的顺利实施, 将为深入认识 IBD 发生发展的分子机制, 发现新的 IBD 治疗靶标作出有益的尝试。</p> | | | | | |

项目组成员

| 编 号 | 姓 名 | 成员类别 | 出生日期 | 性别 | 单位名称 | 电 话 | 每年工作时间 (月) |
|-----|-----|-------|------------|----|----------|---------------|------------|
| 1 | 周辛欣 | 负责人 | 1985-6-5 | 女 | 浙江大学 | 13588137257 | 6 |
| 2 | 季峰 | 主要成员 | 1962-11-26 | 男 | 浙江大学/医学院 | 13906517282 | 6 |
| 3 | 沈哲 | 主要成员 | 1982-3-9 | 男 | 浙江大学/医学院 | 13656713039 | 6 |
| 4 | 张雪群 | 主要成员 | 1980-7-20 | 女 | 浙江大学/医学院 | 13777860734 | 6 |
| 5 | 钟卫祥 | 主要成员 | 1982-4-13 | 男 | 浙江大学/医学院 | 13777494586 | 6 |
| 6 | 王亚梅 | 非主要成员 | 1991-3-20 | 女 | 浙江大学/医学院 | 0571-87236863 | 9 |
| 7 | | | | | | | |

项目经费

总资助经费 5.0 万元, 其中省财政资助经费 5.0 万元(第一批财政拨款 5.0 万元, 第二批财政拨款 0.0 万元), 单位联合资助经费 0.0 万元。

| 科研经费 | 名称 | 总资助经费 预算(万元) | 备注(计算依据与说明) |
|------|----------------------|-----------------|---|
| 直接费用 | 1、设备费 | 0.00 | |
| | 2、材料费 | 3.00 | 抗体、试剂的购买, 一次性耗材购置费, 实验动物的购置, 标本的采集和运输费等 |
| | 3、测试化验加工费 | 0.00 | |
| | 4、燃料动力费 | 0.00 | |
| | 5、差旅费 | 0.22 | 参加学术交流交通费 |
| | 6、会议费 | 0.00 | |
| | 7、合作、协作研究与交流费 | 0.00 | |
| | 8、出版/文献/信息传播/知识产权事务费 | 0.20 | 论文发表版面费和印刷费, 文献检索等 |
| | 9、人员劳务费 | 0.75 | 用于直接参加项目研究硕士生人员劳务费 |
| | 10、专家咨询费 | 0.00 | |
| 间接费用 | 11、管理费 | 0.55 | 项目依托单位用于公共管理补助支出 |
| | 12、激励支出 | 0.28 | 用于奖励科研人员 |

研究计划

2016 年度

研究内容: (1) 采用 caco-2 细胞与 RAW264.7 细胞共培养, 然后用 LPS 刺激, 诱导体外肠道炎症模型; (2) 采用 BALB/c 小鼠, 通过硫酸葡聚糖钠 (DSS) 诱导 UC 模型, 三硝基苯磺酸 (TNBS) 诱导 CD 模型。

研究目标: (1) 体外实验结肠炎细胞模型的建立; (2) 体内实验 IBD 动物模型的建立。

2017 年度

研究内容: 分别通过选择性 SIRT1 抑制剂或选择性 SIRT1 激动剂作用于体外细胞模型, caco-2 跨膜阻抗值检测上皮细胞屏障完整性, 同时采用流式细胞仪检测细胞凋亡情况, 并进一步运用荧光定量 RT-PCR 或 Western Blot 等方法, 检测 SIRT1 表达增强或抑制后, 结肠炎细胞模型中 ERS 诱导凋亡的相关分子 caspase-12、CHOP 的表达情况。

研究目标: (1) 通过体外 SIRT1 干预, 明确 SIRT1 表达对肠道黏膜上皮细胞屏障损伤的影响; (2) 通过体外 SIRT1 干预, 明确 SIRT1 表达对 ERS 所诱导的细胞凋亡的保护作用及可能机制。

2018 年度

研究内容: DSS 诱导 UC 模型或 TNBS 诱导 CD 模型, 予以选择性 SIRT1 抑制剂或选择性 SIRT1 激动剂腹腔注射 7 天, 处死小鼠后检测结肠病理状况, 采用 TUNEL 染色方法检测细胞凋亡情况, 并进一步运用荧光定量 RT-PCR 或 Western Blot 等方法, 检测 SIRT1 表达增强或抑制后, 结肠炎模型中内 ERS 诱导凋亡的相关分子 caspase-12、CHOP 的表达情况。

研究目标: (1) 通过体内 SIRT1 干预, 明确 SIRT1 表达对肠道黏膜上皮细胞屏障损伤的影响; (2) 通过体内 SIRT1 干预, 明确 SIRT1 表达对 ERS 所诱导的细胞凋亡的保护作用及可能机制; (3) 数据统计分析, 文献调研, 论文撰写, 课题总结。

签字和盖章页

我接受浙江省自然科学基金的资助,将按照项目申请书、批准通知和计划书负责实施本项目,严格遵守浙江省自然科学基金相关项目和经费管理规定,切实保证研究工作时间,认真开展研究工作,按时报送有关材料,及时报告重大情况变动,对资助项目发表的论著和取得的研究成果按规定进行标注。

项目负责人(签字): 周辛欣
2015年12月10日

我单位同意承担上述浙江省自然科学基金项目,将保证项目负责人及其研究队伍的稳定和研究项目实施所需的条件,严格遵守浙江省自然科学基金相关项目和经费管理规定,并督促实施。

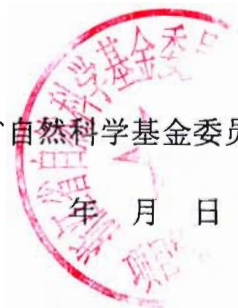
依托单位(公章):



浙江省自然科学基金委员会办公室审批意见:

同意。

浙江省自然科学基金委员会办公室



浙江省中医药科技计划 项目合同书

项目类别：科研基金项目

项目名称：姜黄素对溃疡性结肠炎肠上皮细胞内
质网应激损伤的保护作用及机制研究

依托学科：中西医结合消化病学

研究周期：2016年01月01日 至 2018年12月31日

申 请 人：周辛欣

电子信箱：zhouxx03@126.com

申请单位：浙江大学医学院附属第一医院

单位联系人：焦杨文

联系电话：13588137257

填报日期：2015年11月21日

浙江省卫生计生委制

二〇一五年

11-3

合同条款

(1) 合同书签订后至课题完成止, 乙方每年年底应向甲方提交年度执行情况(一式三份)并抄送丙方。

(2) 在执行过程中, 如需修改某项条款, 由签订合同书各方共同商定修改。

(3) 乙方无故不按合同书约定, 或并非因不可抗拒的客观原因, 如挪用科研经费等, 致无法完成研究, 甲方有权收回所拨经费。

(4) 项目经费, 应专款专用、单独列帐, 要严格按照科技经费管理有关规定的开支范围和现行财务制度开支标准掌握使用。

(5) 丙方应监督并保证研究任务的开展, 协调研究过程中出现的问题。

(6) 课题完成后, 乙方应按《浙江省中医药科技计划项目管理办法》的有关规定, 及时向甲方提出验收申请。

(7) 乙方对外发表学术论文等研究成果, 需标明该成果经浙江省中医药科研基金计划资助。

三、总体考核指标

本课题以目前研究热点UC肠上皮细胞ERS损伤为切入点,选取来源广泛且价格低廉、毒副作用小的姜黄素为研究药物。通过构建UC体外细胞模型及动物模型,明确姜黄素对肠上皮细胞损伤及ERS诱导的细胞凋亡的保护作用。通过信号通路关键因子检测观察姜黄素对ERS所诱导的凋亡相关分子的表达影响,揭示姜黄素抵抗ERS诱导的细胞凋亡的可能分子机制。通过本研究探索姜黄素在UC患者中的应用价值,最终为姜黄素用于UC患者的治疗提供理论依据。本课题研究结果将以原创性发表SCI收录论文1篇。

四、年度计划

| 起始日期 | 终止日期 | 主要完成任务 | 考核指标 |
|-------------|-------------|------------------------------|------------------------------------|
| 2016年01月01日 | 2016年12月31日 | UC动物模型的建立; 结肠炎细胞模型的建立; | 完成UC体内外实验模型构建 |
| 2017年01月01日 | 2017年12月31日 | 体外研究姜黄素对肠上皮细胞损伤和细胞凋亡的影响及分子机制 | 完成姜黄素对UC肠上皮细胞损伤和细胞凋亡的保护作用及其机制的体外验证 |
| 2018年01月01日 | 2018年12月31日 | 体内研究姜黄素对肠上皮细胞损伤和细胞凋亡的影响及分子机制 | 完成姜黄素对UC肠上皮细胞损伤和细胞凋亡的保护作用及其机制的体内验证 |

五、经费预算

| 经费来源 | 资助金额 | 配套、自筹经费 | 合计 |
|--------------------|----------|-------------|--------------------------------------|
| 金额(万元) | 3.00 | 3.00 | 6.00 |
| 支出科目 | 申请经费(万元) | 配套、自筹经费(万元) | 计算根据及理由 |
| 设备费 | 0.00 | 0.00 | |
| 材料费 | 1.85 | 3.00 | 抗体、试剂的购买，一次性耗材购置费，实验动物的购置，标本的采集和运输费等 |
| 测试化验加工费 | 0.00 | 0.00 | |
| 燃料动力费 | 0.00 | 0.00 | |
| 差旅费 | 0.25 | 0.00 | 参加学术交流交通费 |
| 会议费 | 0.00 | 0.00 | |
| 合作协议研究与交流 | 0.00 | 0.00 | |
| 出版/文献/信息传播/知识产权事务费 | 0.25 | 0.00 | 论文发表版面费和印刷费，文献检索等 |
| 人员劳务经费 | 0.50 | 0.00 | 用于直接参加项目研究硕士生人员劳务费 |
| 专家咨询费 | 0.00 | 0.00 | |
| 管理费用 | 0.15 | 0.00 | 项目依托单位用于公共管理补助支出 |
| 其他费用 | 0.00 | 0.00 | |

六、合同书正文

1、研究内容

1.1 研究内容

1.1.1 建立结肠炎细胞和动物模型：肠道上皮细胞系(caco-2细胞)与小鼠巨噬细胞RAW264.7细胞共培养，然后用LPS刺激，诱导体外肠道炎症模型。采用C57BL/6小鼠，通过DSS诱导UC模型，并同时构建姜黄素治疗模型及阴性对照模型。

1.1.2 细胞水平实验：姜黄素作用于结肠炎细胞，caco-2跨膜阻抗值检测上皮屏障完整性，同时采用流式细胞仪检测细胞凋亡情况，并进一步运用荧光定量RT-PCR或Western Blot等方法，检测姜黄素作用后，结肠炎细胞模型中ERS诱导凋亡的相关分子caspase-12、CHOP的表达情况，判断姜黄素对于ERS诱导的细胞凋亡的保护作用。

1.1.3 动物水平实验：已经构建的小鼠模型，喂养7天处死小鼠后检测结肠病理状况，采用TUNEL染色方法检测细胞凋亡情况，并进一步运用荧光定量RT-PCR或Western Blot等方法，检测姜黄素作用后结肠炎模型中内ERS诱导凋亡的相关分子caspase-12、CHOP的表达情况，判断姜黄素对于ERS诱导的细胞凋亡的保护作用。

1.2 拟解决关键问题

- (1) 姜黄素对于ERS所诱导的肠道上皮细胞凋亡是否有保护作用。
- (2) 姜黄素对于ERS所诱导的肠道上皮细胞凋亡的可能保护机制。

1.3 预期目标

- (1) 构建结肠炎细胞模型和UC疾病小鼠模型。
- (2) 阐明姜黄素对UC肠道上皮损伤的保护作用。

(3)揭示姜黄素对于ERS所诱导的细胞凋亡的保护作用及可能机制。

1.4 主要创新点

姜黄素是从姜黄中分离出的一种低分子量酸性多酚类物质,具有抗氧化应激、抗细胞因子释放以及抗细胞凋亡等多种功能,且价格低廉、毒副作用小,已被越来越多地应用于相关基础和临床研究。目前已有研究显示姜黄素对UC有明显的抗炎和维持缓解作用,但其具体机制仍不清楚。在UC中姜黄素是否对ERS导致的黏膜屏障损伤和肠道炎症具有保护作用亦尚未见文献报道。

本项目构建体外细胞模型及动物模型探索姜黄素对肠上皮细胞损伤及ERS诱导的细胞凋亡的保护作用,并在此基础上观察姜黄素对ERS所诱导的凋亡相关分子的表达影响,以期揭示姜黄素抵抗ERS诱导的细胞凋亡的可能分子机制。通过本研究探索姜黄素在UC患者中的应用价值,最终为姜黄素用于UC患者的治疗提供理论依据。

2、研究方法和技术路线

2.1 研究方法

2.1.1 体外结肠炎细胞模型的建立

采用caco-2细胞与RAW264.7细胞共培养,然后用LPS刺激,诱导体外肠道炎症模型。具体方案为:人结直肠腺癌细胞caco-2细胞用含胎牛血清的MEM培养基传代培养于Transwell插入式小室,直至细胞呈现特征性的肠上皮细胞分化。另Raw264.7细胞用含10%胎牛血清DMEM培养于六孔细胞培养板中,贴壁后将上述Transwell插入培养caco-2细胞的六孔板中,LPS刺激6h后收集下层培养液,caco-2

细胞与RAW264.7细胞, ELISA测定培养液中促炎症因子分泌情况, 及caco-2、RAW264.7细胞中相关炎症因子mRNA表达水平, 综合评估建模情况。

2.1.2 动物模型的建立

采用健康雄性C57BL/6小鼠30只, 8周龄, 体重为18-25g。随机分为正常对照(NOR)组、DSS组和DSS+姜黄素组。NOR组正常喂养, DSS组给予3% DSS蒸馏水喂养5天后改用普通蒸馏水喂养, DSS+姜黄素组在给予DSS的基础上按100mg/(kg.d)的剂量给予姜黄素灌胃7天, 喂养7天处死小鼠; 监测各组小鼠体重变化情况, 观察小鼠精神状态、粪便形态及隐血, 采用结肠炎疾病活动指数(disease Activity Index, DAI)评定; 处死小鼠后取病变结肠段标本做病理学检查。部分结肠组织迅速于液氮中保存, 待用于检测细胞凋亡水平和细胞因子的表达。

2.1.3 体外研究姜黄素对结肠上皮损伤及上皮细胞凋亡的保护作用

在成功构建体外结肠炎细胞模型后, 分成姜黄素组和空白对照组, 加入药物后无血清培养基24、48、72h测量transwell小室中代表肠上皮黏膜屏障完整性指标caco-2跨膜阻抗值(Transepithelial electrical resistance, TER)及caco-2细胞中DNA损伤标志物H2AX及iNOS水平; 采用流式细胞仪Annexin V/PI方法检测细胞凋亡水平, 进一步用荧光定量RT-PCR或Western Blot方法, 检测ERS标志性分子GRP78的表达水平, 同时检测ERS诱导凋亡的相关分子caspase-12, CHOP的表达水平, 如果姜黄素作用后, TER值上升, 肠道上皮细胞氧化损伤标

志物降低,细胞凋亡数量减少,GRP78, caspase-12, CHOP表达下调,我们的推测在细胞水平得到验证。

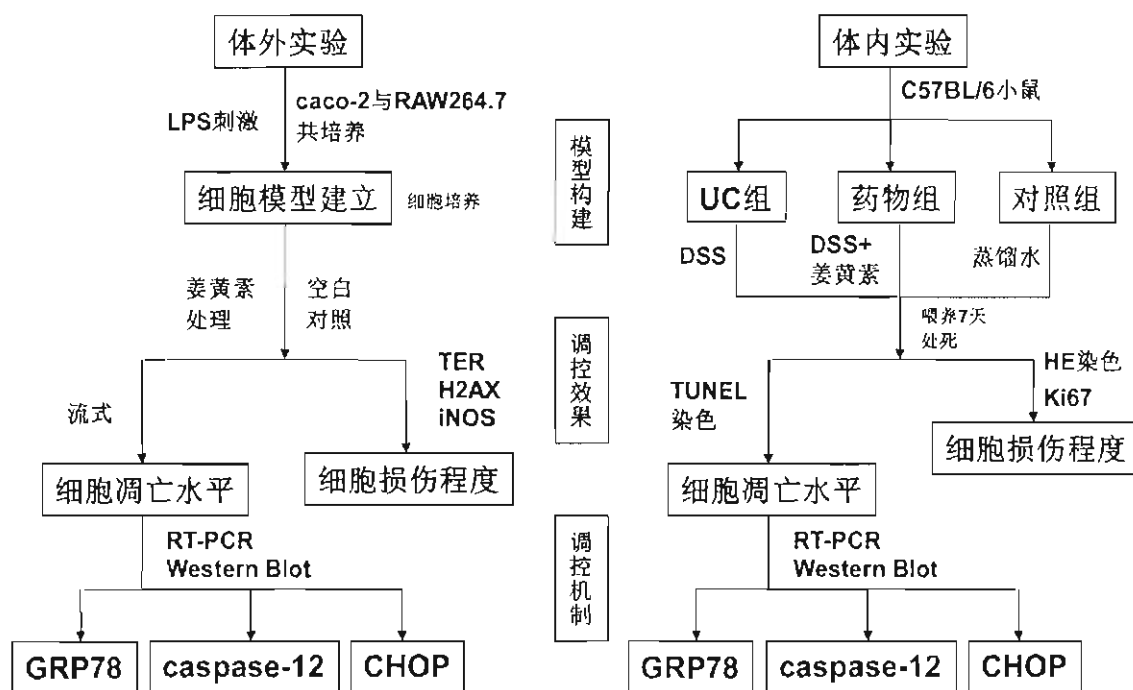
2.1.4 在体研究姜黄素对结肠上皮损伤及上皮细胞凋亡的保护作用

如上述建立的动物模型,处死小鼠后距肛门1CM处取出小鼠结肠后立即置于中性甲醛中固定,石蜡包埋、切片后行HE染色,组织学评分参照Murano M等(Clin Exp Immunol.2000,120:51-58)研究观察的组织学改变并评分,平均观察15个×100的视野,取均值。评分标准:0分为正常结肠黏膜;1分为隐窝腺体丢失1/3;2分为隐窝腺体丢失2/3;3分为隐窝腺体全部丢失,黏膜上皮完整,伴有轻度炎性细胞浸润;4分为黏膜上皮糜烂、破坏,伴有明显炎性细胞浸润;以EDTA 30 mmol/L联合DTT 0.5 mmol/L消化小鼠结肠上皮细胞,获得肠上皮细胞后采用TUNEL染色方法检测细胞凋亡水平;采用Western Blot方法和RT-PCR方法分别检测ERS标志性分子GRP78的表达水平,同时检测caspase-12, CHOP等凋亡相关分子的表达水平;如果姜黄素作用后,肠上皮细胞损伤程度减轻,细胞凋亡数量减少,GRP78, caspase-12, CHOP表达下调,我们的推测在动物水平得到验证。

2.2 技术路线

本研究拟采用DSS诱导UC小鼠模型;caco-2细胞与RAW264.7细胞共培养,LPS刺激RAW264.7细胞,诱导体外肠道炎症模型;并结合体外和体内两个方面,一方面探索姜黄素作用后对于肠道上皮黏膜屏障完整性、肠上皮细胞氧化损伤的影响,并通过进一步用荧光定量RT-PCR和Western Blot等方法,检测ERS标志性分子GRP78的表

达水平，同时检测caspase-12，CHOP等凋亡相关分子的表达水平明确姜黄素对于ERS诱导的细胞凋亡的保护作用及可能机制。具体技术路线如下：



2.3 可行性分析

2.3.1 本课题组具有较为扎实的研究基础：本课题组多年来从事IBD疾病研究，在建立IBD疾病动物模型、免疫细胞分离、以及RT-PCR技术、Western Blot技术、免疫荧光技术（IF）、流式细胞仪技术、ELISA技术等分子生物学技术方面具有一定的研究基础。

2.3.2 具有完成本课题研究的实验条件：(1)实验动物及试剂：本课题所需的动物可从上海西普尔-必凯实验动物有限公司购买，由浙江省动物实验中心饲养；细胞株、相关试剂均可从相应的试剂公司公开购买。(2)实验仪器及设备：本实验室已拥有荧光定量PCR仪、凝胶成像分析仪、切片机、显微镜、分光光度计、全自动生化分析仪等相

关的仪器设备。

2.3.3 课题组成员稳定,具有满足本项目所涉及的各项技术需要的多学科高素质研究人员,熟悉相关领域的研究,思维活跃,为项目的实施提供了人员的保障。

3、研究结果

3.1 预期研究成果

明确姜黄素在UC肠上皮细胞损伤中的保护作用;明确姜黄素对ERS诱导的细胞凋亡的影响及可能分子机制。

3.2 科学价值及效益分析

近年来 UC 发病率逐渐上升。传统治疗方法存在维持缓解效果差、激素依赖或抵抗、长期用药不良反应等诸多问题,寻找有效治疗 UC 的新药成为目前临床研究的热点。姜黄素广泛存在于多种植物的根茎中,其市场价格低廉,且毒副作用小、安全性高。若能应用于 UC 临床治疗,可以极大减轻患者的经济负担,具有明显的社会效益。

3.3 验收指标

本课题研究结果将以原创性论著发表 SCI 收录论文 1 篇,并进行国内学术交流。

七、合作单位

| | | |
|------------------------------------|---|------------------------------------|
| 合作单位 | 无 | |
| <div>合作单位盖章</div> <div>年 月 日</div> | | <div>合作单位盖章</div> <div>年 月 日</div> |
| <div>合作单位盖章</div> <div>年 月 日</div> | | <div>合作单位盖章</div> <div>年 月 日</div> |
| <div>合作单位盖章</div> <div>年 月 日</div> | | <div>合作单位盖章</div> <div>年 月 日</div> |

八、合同书签订各方意见

1. 课题组将严格按照计划管理和研究伦理的要求,认真落实合同约定的任务目标,优质完成课题研究。
2. 课题承担单位将根据要求,协助做好有关管理工作,保障课题实施所需的人力、物力和工作时间等,严格落实1:1的配套经费。

补充条款:

课题承担单位(乙方)

(公章)

课题负责人(签字)

周永欣

2015年11月26日

乙方上级主管单位(丙方)

负责人(签字)

王建东

2015年12月19日

课题批准单位(甲方):省卫生计生委中医药管理局)

(公章)

负责人(签字):

徐伟伟

年 月 日

浙江省中医药科技计划 项目合同书

项目类别：科研基金项目

项目名称：白藜芦醇诱导自噬在溃疡性结肠炎肠
黏膜上皮屏障损伤中的保护作用

依托学科：中西医结合消化病学

研究周期：2017年09月08日 至 2020年08月31日

申 请 人：潘航海

电子信箱：panhanghai@163.com

申请单位：浙江省人民医院

单位联系人：何晓鹏

联系电话：13605806408

填报日期：2017年11月14日

浙江省卫生计生委制
二〇一七年

合同条款

(1) 合同书签订后至课题完成止，乙方每年年底应向甲方提交年度执行情况(一式三份)并抄送丙方。

(2) 在执行过程中，如需修改某项条款，由签订合同书各方共同商定修改。

(3) 乙方无故不按合同书约定，或并非因不可抗拒的客观原因，如挪用科研经费等，致无法完成研究，甲方有权收回所拨经费。

(4) 项目经费，应专款专用、单独列帐，要严格按照科技经费管理有关规定的开支范围和现行财务制度开支标准掌握使用。

(5) 丙方应监督并保证研究任务的开展，协调研究过程中出现的问题。

(6) 课题完成后，乙方应按《浙江省中医药科技计划项目管理办法》的有关规定，及时向甲方提出验收申请。

(7) 乙方对外发表学术论文等研究成果，需标明该成果经浙江省中医药科研基金计划资助。

一、合同书简表

| | | | | | | | | | | |
|-------|-------------|--------------------------------|----|--------|-------|---------------|----------|---------|---|---------|
| 项目名称 | | 白藜芦醇诱导自噬在溃疡性结肠炎肠黏膜上皮屏障损伤中的保护作用 | | | | | | | | |
| 学科类别 | | 中西医结合消化病学 | | | | | | | | |
| 申请单位 | | 浙江省人民医院 | | | | | | | | |
| 合作单位 | | 浙江大学医学院附属第一医院 | | | | | | | | |
| 联系地址 | | 浙江省杭州市上塘路158号 | | | | | 邮编 | 310014 | | |
| 申请人 | 姓名 | 潘航海 | 性别 | 男 | | 出生年月 | 1984-02 | | | |
| | 专业 | 中西医结合消化病学 | 学历 | 硕士研究生 | | 职务 | | | | |
| | 电话 | 13605806408 | 邮编 | 310014 | | 职称 | 主治医师 | | | |
| 研究总经费 | | 6.00(万元) | | 资助经费 | | | 3.00(万元) | | | |
| | | | | 单位配套经费 | | | 3.00(万元) | | | |
| | | | | 自筹研究经费 | | | 0.00(万元) | | | |
| 项目研究组 | 总人数 | | 高级 | 中级 | 初级 | 辅助人员 | 博士 | 硕士 | 男 | 女 |
| | 7 | | 2 | 5 | 0 | 0 | 3 | 4 | 4 | 3 |
| | 主要成员（不含申请人） | 姓名 | 性别 | 年龄 | 职称 | 工作单位 | | 课题分工 | | 研究时间(月) |
| | | 周辛欣 | 女 | 31 | 主治医师 | 浙江大学医学院附属第一医院 | | 组织病理学实验 | | 6 |
| | | 刘景全 | 男 | 30 | 主治医师 | 浙江省人民医院 | | 分子生物学实验 | | 3 |
| | | 郑卫华 | 女 | 58 | 主任医师 | 浙江省人民医院 | | 课题指导 | | 5 |
| | | 张骏 | 男 | 38 | 副主任医师 | 浙江省人民医院 | | 动物实验 | | 6 |
| | | 沈淼 | 男 | 30 | 主治医师 | 浙江省人民医院 | | 细胞实验 | | 8 |
| | | 王蕾 | 女 | 31 | 主治医师 | 浙江省人民医院 | | 分子生物学实验 | | 8 |
| | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | |

二、项目简述（研究目标、内容和意义简介）

| | |
|--|---------------------------|
| <p>研究目标：明确白藜芦醇诱导自噬在UC肠黏膜上皮屏障损伤中的保护作用。</p> <p>研究内容：1. 构建结肠炎细胞和UC动物模型：采用肠道上皮细胞系（caco-2细胞）与巨噬细胞共培养，然后用LPS刺激，诱导体外肠道炎症细胞模型。采用C57BL/6小鼠，通过硫酸葡聚糖钠（DSS）诱导构建UC小鼠模型。2. 应用细胞水平实验和动物水平实验两方面的研究，白藜芦醇作用于体外及体内模型，运用Western blot、免疫组化技术检测肠上皮细胞DNA损伤标志物H2AX及iNOS、紧密连接蛋白occludin和ZO-1的表达水平及肠黏膜组织病理学观察判断黏膜上皮屏障完整性；通过透射电子显微镜观察组织自噬溶酶体数量，运用Western blot技术检测自噬相关蛋白（Beclin1、LC3B）及炎症因子（IL-1β、IL-18）的表达情况，揭示白藜芦醇通过激活自噬在UC肠黏膜上皮屏障损伤中的保护作用及可能机制。</p> <p>研究意义：UC是一种反复复发的疾病，近年来UC发病率正在呈逐年增高趋势。传统治疗方法存在治疗效果欠佳、费用昂贵、长期用药不良反应等诸多问题。白藜芦醇广泛存在多种植物中，且毒副作用小、价格低廉。本研究通过明确白藜芦醇诱导自噬在肠黏膜上皮屏障中的保护作用，为白藜芦醇用于防治UC提供有力的理论依据。本课题的顺利实施，深入认识UC发生发展的机制，发现新的UC治疗靶标做出有益的尝试，从而减轻UC患者长期承受的痛苦，减少用药的不良反应和患者医疗费用。</p> | |
| 关键词 | 白藜芦醇, 自噬, 溃疡性结肠炎, 肠黏膜上皮屏障 |

三、总体考核指标

- (1) 成功构建结肠炎细胞模型和UC疾病小鼠模型。
- (2) 揭示白藜芦醇在UC肠黏膜上皮屏障损伤中的保护作用。
- (3) 明确白藜芦醇诱导自噬在UC肠黏膜上皮屏障损伤中的保护机制。
- (4) 发表SCI论文1篇。

四、年度计划

| 起始日期 | 终止日期 | 主要完成任务 | 考核指标 |
|-------------|-------------|--|---------------------------------|
| 2018年01月01日 | 2018年12月31日 | 构建体外结肠炎细胞和UC动物模型 | 完成UC体内外实验模型的构建 |
| 2019年01月01日 | 2019年12月31日 | 体外研究白藜芦醇诱导自噬在UC肠黏膜上皮屏障中的保护作用 | 完成白藜芦醇诱导自噬在UC肠黏膜上皮屏障中的保护作用的体外验证 |
| 2020年01月01日 | 2020年12月31日 | 体内研究白藜芦醇诱导自噬在UC肠黏膜上皮屏障中的保护作用；课题总结，撰写学术论文 | 完成白藜芦醇诱导自噬在UC肠黏膜上皮屏障中的保护作用的体内验证 |

五、经费预算

| 经费来源 | 资助金额 | 配套、自筹经费 | 合计 |
|--------------------|----------|-------------|--|
| 金额(万元) | 3.00 | 3.00 | 6.00 |
| 支出科目 | 申请经费（万元） | 配套、自筹经费（万元） | 计算根据及理由 |
| 设备费 | 0.00 | 0.00 | |
| 材料费 | 1.95 | 3.00 | 免疫抗体及分子生物学试剂、血清、细胞培养基、实验动物、中药原料及其它常规实验用品、耗材等 |
| 测试化验加工费 | 0.00 | 0.00 | |
| 燃料动力费 | 0.00 | 0.00 | |
| 差旅费 | 0.00 | 0.00 | |
| 会议费 | 0.00 | 0.00 | |
| 合作协议研究与交流 | 0.00 | 0.00 | |
| 出版/文献/信息传播/知识产权事务费 | 0.00 | 0.00 | |
| 人员劳务经费 | 0.45 | 0.00 | 参与课题组研究生劳务费补助5人次，每人0.03万元每年，共3年，合计0.45万元 |
| 专家咨询费 | 0.30 | 0.00 | 课题指导，专家咨询费用 |
| 管理费用 | 0.30 | 0.00 | 按照10%提取 |
| 其他费用 | 0.00 | 0.00 | |

六、合同书正文

项目名称: 白藜芦醇诱导自噬在溃疡性结肠炎肠黏膜上皮屏障损伤中的保护作用

1、研究内容

1.1 研究内容

1.1.1 构建体外结肠炎细胞和UC动物模型：采用肠道上皮细胞系

（caco-2细胞）与巨噬细胞共培养，然后用LPS刺激，诱导体外肠道炎症细胞模型。采用C57BL/6小鼠，通过硫酸葡聚糖钠（Dextran Sodium Sulphate, DSS）诱导构建UC小鼠模型，并同时构建白藜芦醇治疗模型及阴性对照模型。

1.1.2 细胞实验：白藜芦醇作用于体外结肠炎细胞模型。①肠上皮细胞屏障的完整性：通过 Western blot 法检测紧密连接蛋白 occludin 和 ZO-1 的表达水平；②细胞氧化损伤情况：通过 Western blot 法检测白藜芦醇作用后细胞中 DNA 损伤标志物 H2AX 及 iNOS 表达水平；③自噬相关因子检测：通过 Western blot 法检测白藜芦醇作用后自噬相关蛋白 Beclin-1、LC3B 以及自噬相关炎症因子 IL-1 β 、IL-18 的表达情况。

1.1.3 动物实验：采用 DSS 诱导 UC 小鼠模型，予以白藜芦醇(100mg/kg)灌胃 7 天。①病理学观察：处死小鼠后检测白藜芦醇作用后肠上皮细胞显微镜下组织学改变及炎症评估；同时通过透射电子显微镜观察自噬溶酶体数量；②自噬相关因子检测：通过 Western blot 检测白藜芦醇作用后自噬相关蛋白 Beclin-1 及 LC3B，炎症因子 IL-1 β 和 IL-18 表达情况。

1.2 拟解决关键问题

- (1) 揭示白藜芦醇在UC肠黏膜上皮屏障损伤中的保护作用。
- (2) 明确白藜芦醇诱导自噬在UC肠黏膜上皮屏障损伤中的保护作用及可能机制。

1.3 预期目标

- (1) 构建结肠炎细胞模型和UC疾病小鼠模型。
- (2) 揭示白藜芦醇在UC肠黏膜上皮屏障损伤中的保护作用。
- (3) 明确白藜芦醇诱导自噬在UC肠黏膜上皮屏障损伤中的保护机制。

1.4 主要创新点

白藜芦醇一种从植物中提取的天然化学物质,广泛存在于葡萄、松树、虎杖及花生等多种天然植物中,具有抗炎、抗氧化、抗菌、抗衰老、抗肿瘤、免疫调节等作用,且价格低廉、毒副作用小。近年来越来越多地被应用于临床研究。目前已有研究表明白藜芦醇能够改善UC肠道炎症,修复和维持肠黏膜上皮屏障完整性,但其具体机制尚不明确。白藜芦醇可通过诱导自噬,抑制炎症反应。近年来肠上皮细胞自噬受损在肠道炎症中的作用逐渐引起关注,UC中肠上皮细胞存在自噬功能受损。但是白藜芦醇是否通过诱导自噬抑制肠道炎症反应,减少肠上皮细胞屏障受损,对UC起到治疗作用目前没有相关报道。

本课题拟构建体外细胞模型及动物模型探索白藜芦醇诱导自噬对UC肠黏膜上皮屏障损伤中的保护作用。本课题的顺利实施,将深入认识UC发生发展机制,为白藜芦醇用于临床防治UC提供有力科学依据。

2、研究方法和技术路线

2.1 研究方法

2.1.1 体外结肠炎细胞模型的构建

采用人结肠癌细胞 caco-2 细胞（购于中国科学院上海细胞生物学研究所）。caco-2 细胞较易培养，成熟的 caco-2 细胞与人肠上皮细胞相似。caco-2 与巨噬细胞共培养，然后用 LPS 刺激，诱导体外结肠炎细胞模型。具体方案：将人单核细胞 THP1 细胞接种于 Transwell 下室中，培养 24h 后换液，培养 48h 诱导分化。通过光镜进行形态学观察，鉴定细胞是否为巨噬细胞，分化成功后更换培养基。将 caco-2 细胞接种于 Transwell 小室中，培养细胞呈现特征性的肠上皮细胞分化。将上室插入到培养有巨噬细胞的下室中，向下室加入 LPS 至终浓度为 10ng/ml，培养 24h，收集下层培养液。用 ELISA 检测所收集培养液中相关炎症因子表达水平，综合评估建模情况。

2.1.2 UC动物模型的构建

UC 动物模型采用 DSS 诱导 UC 小鼠模型的方法。健康雄性 C57BL/6 小鼠，饲养于 SPF 级动物房，给予 5g/L DSS 高压灭菌水喂养 7 天。对照组小鼠饮用液体为普通灭菌水，连续 7 天，隔天更换。监测小鼠体重变化情况，观察小鼠精神状态、粪便形态及隐血。颈椎脱臼处死，采用结肠炎疾病活动指数（Disease Activity Index, DAI）评定；处死小鼠后取结肠组织，测量全长，4% 甲醛固定远端结肠，常规石蜡包埋、切片，HE 染色，光镜下观察作结肠炎病理组织学评分。另留取各组小鼠结肠及血清标本，通过 ELISA 检测 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等促炎症因子的表达变化，综合评估建模情况。

2.1.3 体外研究白藜芦醇诱导自噬在 UC 肠黏膜上皮屏障中的保护作

用

在成功构建体外结肠炎细胞模型的基础上，将细胞分为对照组（成熟 caco-2 组）、结肠炎模型组（LPS-caco2 组）和实验组（白藜芦醇作用于 LPS-caco2）三组，培养 24、48、72h，用于以下实验。

① 肠上皮细胞完整性评估：Western blot 技术检测细胞 DNA 损伤标志物 H2AX 及 iNOS 表达水平，判断细胞氧化损伤情况，检测紧密连接蛋白 occludin 和 ZO-1 的表达水平，判断肠上皮细胞的完整性。

② 自噬相关因子检测：采用 Western blot 技术检测自噬相关蛋白 Beclin-1 及 LC3B 表达，炎症因子 IL-1 β 和 IL-18 表达情况。

通过以上实验，如果实验组和结肠炎模型组比较，肠上皮细胞屏障完整性指标升高和氧化损伤指标下降，自噬相关蛋白 Beclin-1 及 LC3B 表达增加，炎症因子 IL-1 β 和 IL-18 表达下调，则白藜芦醇诱导自噬对 UC 肠黏膜上皮屏障损伤的保护作用在细胞水平得到验证。

2.1.4 体内研究白藜芦醇诱导自噬在 UC 肠黏膜上皮屏障中的保护作用

在成功构建结肠炎动物模型的基础上，将模型动物分成两组：UC 模型组（DSS）组和实验组（DSS+白藜芦醇）。UC 模型组用给予 5g/L DSS 高压灭菌水喂养 7 天，实验组在给予 DSS 的基础上按 100mg/(kg·d) 的剂量给予白藜芦醇灌胃 7 天，并设立正常对照组。喂养 7 天后颈椎脱臼处死小鼠，取小鼠结肠组织。

① 结肠病理检测及炎症评估：剪取部分结肠组织用中性甲醛中固定，石蜡包埋、切片后行 HE 染色。黏膜上皮屏障组织学炎症指数评分参照

Murano M等（ClinExp Immunol. 2000, 120: 51-58）研究观察的组织学改变并评分，平均观察15个×100的视野，取均值。评分标准：0分为正常结肠黏膜；1分为隐窝腺体丢失1/3；2分为隐窝腺体丢失2/3；3分为隐窝腺体全部丢失，黏膜上皮完整，伴有轻度炎性细胞浸润；4分为黏膜上皮糜烂、破坏，伴有明显炎性细胞浸润。

② 肠黏膜上皮屏障完整性评估：HE染色后光镜下观察形态学改变，包括测量肠黏膜上皮层厚度、绒毛高度、绒毛宽度和绒毛密度；透射电镜下观察肠上皮细胞超微结构和紧密连接形态。免疫组化技术检测结肠上皮细胞紧密连接蛋白occludin和ZO-1的表达水平。

③ 自噬溶酶体检测：剪取部分结肠组织戊二醛固定，纯包埋剂包埋，做超薄组织切片，4%醋酸铀水溶液、枸橼酸铅染色，用透射电子显微镜观察自噬溶酶体数量。

④ 自噬相关因子检测：剪取部分结肠组织碾碎后，裂解液中裂解，离心去上清液，提取组织蛋白，Western blot技术检测自噬相关蛋白Beclin-1及LC3B和炎症因子IL-1 β 和IL-18的表达水平。

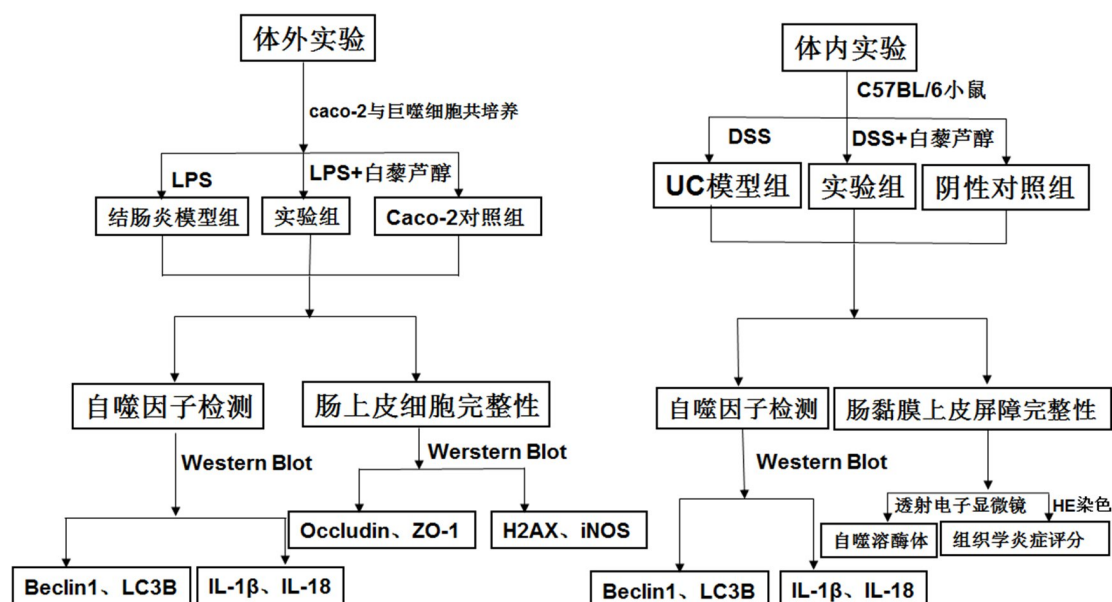
通过以上实验，如果实验组与UC模型组对比，肠道炎症反应降低，肠黏膜上皮屏障完整性受损减轻，自噬溶酶体数量增加，自噬相关蛋白Beclin-1及LC3B表达水平上升，炎症因子IL-1 β 和IL-18表达水平下调，则论证白藜芦醇诱导自噬对UC肠黏膜上皮屏障损伤的保护作用在动物水平得到验证。

2.2 技术路线

本研究拟构建体外结肠炎细胞模型及UC小鼠模型，白藜芦醇作用

于体外及体内模型，运用 Western blot、免疫组化技术检测肠上皮细胞 DNA 损伤标志物 H2AX 及 iNOS、紧密连接蛋白 occludin 和 ZO-1 的表达水平及肠黏膜组织病理学观察判断黏膜上皮屏障完整性；通过透射电子显微镜观察组织自噬溶酶体数量，运用 Western blot 技术检测自噬相关蛋白（Beclin-1、LC3B）及炎症因子（IL-1 β 、IL-18）的表达情况，揭示白藜芦醇通过激活自噬在 UC 肠黏膜上皮屏障损伤中的保护作用及可能机制。

具体技术路线图如下：



2.3 可行性分析

2.3.1 理论可行性：UC中存在肠黏膜上皮屏障受损，修复和改善肠黏膜上皮屏障完整性明显减轻肠道炎症。国内外最新研究及我们前期研究表明自噬受损导致UC肠黏膜上皮屏障破坏，诱导肠上皮细胞自噬能够抑制肠道炎症反应，维持肠黏膜上皮屏障完整性。研究表明白藜芦醇能够减轻肠道炎症，保护肠黏膜屏障；白藜芦醇可以通过能诱导自

噬抑制炎症反应。因此我们推测白藜芦醇极可能通过诱导自噬在溃疡性结肠炎肠黏膜上皮屏障损伤中的起保护作用。研究内容具有很强的逻辑性，立论依据充分。

2.3.2 方法可行性：（1）实验动物及试剂：本课题所需的细胞可从中科院细胞资源中心购买，所需的动物可从上海斯莱克实验动物有限责任公司购买；相关试剂均可从相应的试剂公司公开购买。（2）实验仪器及设备：本实验室已拥有荧光定量PCR仪、凝胶成像分析仪、切片仪、透射电子显微镜、分光光度计、全自动生化分析仪等相关的仪器设备。（3）实验动物和伦理：本研究严格遵守实验动物保护规范，已通过动物实验伦理审查。

2.3.3 人员可行性：课题组成员稳定，具有满足本项目所涉及的各项技术需要的多学科高素质研究人员，熟悉相关领域的研究。课题组成员均有承担/参加国家级省部级以上科研项目，为课题的顺利实施提供了必要基础。

3、研究结果

3.1 预期成果

- （1）成功构建结肠炎细胞模型和UC疾病小鼠模型。
- （2）揭示白藜芦醇在UC肠黏膜上皮屏障损伤中的保护作用。
- （3）明确白藜芦醇诱导自噬在UC肠黏膜上皮屏障损伤中的保护机制。
- （4）发表原创性SCI收录论文1篇，并进行国内学术交流。

3.2 科学价值

本研究若能明确白藜芦醇诱导自噬保护肠黏膜上皮屏障，减轻肠道炎症，将为白藜芦醇用于临床防治UC提供有力的理论依据。本课题

的顺利实施，深入认识UC发生发展的机制，发现新的UC治疗靶标做出有益的尝试。

3.3 效益分析

UC 是一种反复复发的疾病，患者、家庭和社会均要长期承担巨大痛苦和经济负担。近年来 UC 发病率正在呈逐年增高趋势。传统治疗方法存在治疗效果欠佳、费用昂贵、长期用药不良反应等诸多问题，白藜芦醇广泛存在多种植物中，且毒副作用小、价格低廉。若白藜芦醇应用于 UC 患者临床治疗，将进一步改善 UC 患者生活质量极大帮助患者减轻医疗费用负担。

3.4 验收指标

- (1) 成功构建结肠炎细胞模型和UC疾病小鼠模型。
- (2) 揭示白藜芦醇在UC肠黏膜上皮屏障损伤中的保护作用。
- (3) 明确白藜芦醇诱导自噬在UC肠黏膜上皮屏障损伤中的保护机制。
- (4) 发表 SCI 论文 1 篇。

七、合作单位

| | | | |
|--------|---------------|--------|--|
| 合作单位 | 浙江大学医学院附属第一医院 | | |
| 合作单位盖章 | | 合作单位盖章 | |
| 年 月 日 | | 年 月 日 | |
| 合作单位盖章 | | 合作单位盖章 | |
| 年 月 日 | | 年 月 日 | |
| 合作单位盖章 | | 合作单位盖章 | |
| 年 月 日 | | 年 月 日 | |

八、合同书签订各方意见

1. 课题组将严格按照计划管理和研究伦理的要求，认真落实合同约定的任务目标，优质完成课题研究。

2. 课题承担单位将根据要求，协助做好有关管理工作，保障课题实施所需的人力、物力和工作时间等，严格落实1:1的配套经费。

补充条款：

课题承担单位（乙方）

（公 章）

课题负责人（签字）

年 月 日

乙方上级主管单位（丙方）

（公 章）

负责人（签字）

年 月 日

课题批准单位（甲方）：省卫生计生委中医药管理局
)

（公 章）

负责人(签字)：

年 月 日

七、合作单位

| | | |
|---|---|--|
| 合作单位 | 浙江大学医学院附属第一医院 | |
| <div data-bbox="356 348 685 682"></div> <div data-bbox="397 456 601 501">合作单位盖章</div> <div data-bbox="528 693 724 735">年 月 日</div> | <div data-bbox="986 484 1173 525">合作单位盖章</div> <div data-bbox="1101 703 1288 742">年 月 日</div> | |
| <div data-bbox="403 954 601 993">合作单位盖章</div> <div data-bbox="531 1174 724 1213">年 月 日</div> | <div data-bbox="982 954 1173 993">合作单位盖章</div> <div data-bbox="1104 1170 1291 1209">年 月 日</div> | |
| <div data-bbox="406 1428 603 1471">合作单位盖章</div> <div data-bbox="532 1642 724 1681">年 月 日</div> | <div data-bbox="985 1424 1178 1464">合作单位盖章</div> <div data-bbox="1107 1642 1298 1681">年 月 日</div> | |

八、合同书签订各方意见

1. 课题组将严格按照计划管理和研究伦理的要求,认真落实合同约定的任务目标,优质完成课题研究。
 2. 课题承担单位将根据要求,协助做好有关管理工作,保障课题实施所需的人力、物力和工作时间等,严格落实1:1的配套经费。
- 补充条款:

课题承担单位(乙方)

课题负责人(签字)

潘航江



2017年11月14日

乙方上级主管单位(丙方)

(公章)

负责人(签字)

年 月 日

课题批准单位(甲方): 省卫生计生委中医药管理局



(公章)

负责人(签字):

徐伟伟

2017年11月30日