



项目批准号	81570360
申请代码	H0212
归口管理部门	
依托单位代码	13001208A0528-0970



815703601009772

国家自然科学基金委员会 资助项目计划书

资助类别：面上项目

亚类说明：

附注说明：常规面上项目

项目名称：Ghrelin通过miR-208家族调控UCP2表达改善心衰心肌代谢重构的机制研究

直接费用：52万元

间接费用：10.4万元

项目资金：62.4万元

执行年限：2016.01-2019.12

负责人：杨萍

通讯地址：长春市仙台大街126号

邮政编码：130033

电话：0431-84995091

电子邮件：pyang@jlu.edu.cn

依托单位：吉林大学

联系人：朱峰

电话：0431-85167419

填表日期：2015年09月06日

国家自然科学基金委员会制

Version: 1.009.772



国家自然科学基金委员会资助项目计划书填报说明

- 一、项目负责人收到《关于国家自然科学基金资助项目批准及有关事项的通知》（以下简称《批准通知》）后，请认真阅读本填报说明，参照国家自然科学基金相关项目管理办法及《国家自然科学基金资助项目资金管理办法》（请查阅国家自然科学基金委员会官方网站首页“政策法规”-“管理办法”栏目），按《批准通知》的要求认真填写和提交《国家自然科学基金委员会资助项目计划书》（以下简称《计划书》）。
- 二、填写《计划书》时要求科学严谨、实事求是、表述清晰、准确。《计划书》经国家自然科学基金委员会相关项目管理部门审核批准后，将作为项目研究计划执行和检查、验收的依据。
- 三、《计划书》各部分填写要求如下：
 - （一）简表：由系统自动生成。
 - （二）摘要及关键词：各类获资助项目都必须填写中、英文摘要及关键词。
 - （三）项目组主要成员：计划书中列出姓名的项目组主要成员由系统自动生成，与申请书原成员保持一致，不可随意调整。如果批准通知中“项目评审意见及修改意见表”中“对研究方案的修改意见”栏目有调整项目组成员相关要求的，待项目开始执行后，按照项目成员变更程序另行办理。
 - （四）资金预算表：按批准资助的直接费用填报资金预算表和预算说明书，其中的劳务费、专家咨询费金额不应高于申请书中相应金额；间接费用及项目总经费由系统自动生成。国家重大科研仪器研制项目还应按照预算评审后批复的直接费用各科目金额填报资金预算表、预算说明书及相应的预算明细表。
 - （五）正文：
 1. 面上项目、青年科学基金项目、地区科学基金项目：如果《批准通知》中没有修改要求的，只需选择“研究内容和研究目标按照申请书执行”即可；如果《批准通知》中“项目评审意见及修改意见表”中“对研究方案的修改意见”栏目明确要求调整研究期限和研究内容等的，须选择“根据研究方案修改意见更改”并填报相关修改内容。
 2. 重点项目、重点国际（地区）合作研究项目、重大项目、国家重大科研仪器研制项目：须选择“根据研究方案修改意见更改”，根据《批准通知》的要求填写研究（研制）内容，不得自行降低、更改研究目标（或仪器研制的技术性能与主要技术指标以及验收技术指标）或缩减研究（研制）内容。此外，还要突出以下几点：
 - （1）研究的难点和在实施过程中可能遇到的问题（或仪器研制风险），拟采用的研究（研制）方案和技术路线；
 - （2）项目主要参与者分工，合作研究单位之间的关系与分工，重大项目还需说明课题之间的关联；
 - （3）详细的年度研究（研制）计划。



3. 国家杰出青年科学基金、优秀青年科学基金和海外及港澳学者合作研究基金项目：须选择“根据研究方案修改意见更改”，按下列提纲撰写：
 - (1) 研究方向；
 - (2) 结合国内外研究现状，说明研究工作的学术思想和科学意义（限两个页面）；
 - (3) 研究内容、研究方案及预期目标（限两个页面）；
 - (4) 年度研究计划；
 - (5) 研究队伍的组成情况。
4. 对于其他类型项目，参照面上项目的方式进行选择和填写。



简表

申请者信息	姓 名	杨萍	性 别	女	出生年月	1959年01月	民 族	汉族
	学 位	博士			职称	教授		
	电 话	0431-84995091		电子邮件	pyang@jlu.edu.cn			
	传 真	0431-84995091		个人网页				
	工 作 单 位	吉林大学						
	所 在 院 系 所	吉林大学中日联谊医院						
依托单位信息	名 称	吉林大学					代码	13001208A0528
	联 系 人	朱峰		电子邮件	zhufeng@jlu.edu.cn			
	电 话	0431-85167419		网站地址	www.jlu.edu.cn			
合作单位信息	单 位 名 称							代 码
项目基本信息	项 目 名 称	Ghrelin通过miR-208家族调控UCP2表达改善心衰心肌代谢重构的机制研究						
	资 助 类 别	面上项目			亚 类 说 明			
	附 注 说 明	常规面上项目						
	申 请 代 码	H0212:心力衰竭						
	基 地 类 别							
	执 行 年 限	2016.01-2019.12						
	直 接 费 用	52万元			间 接 费 用	10.4万元		
	项 目 资 金	62.4万元						



项目摘要

中文摘要(500字以内):

能量代谢紊乱是心功能不断恶化的因素并可能成为新的治疗靶点, Ghrelin是调节能量代谢的促生长激素释放多肽。我们前期研究发现Ghrelin可通过下调AT1受体抑制心肌重构; 下调影响能量代谢的线粒体内膜解偶联蛋白2 (UCP2)可改善心肌重构; 我们还在心衰心肌的高通量测序中发现miRNA-208存在差异性表达, 且有研究表明其可通过AT1受体参与心肌重构。我们假设Ghrelin可通过miRNA-208家族调控UCP2并改善由AT1受体介导的能量代谢紊乱。我们将建立动物实验模型及细胞实验, 采用基因沉默/过表达等方法探究心衰心肌miRNA-208家族成员与UCP2下调的关系及对心肌代谢重构的影响, 通过细胞转染沉默相关基因及特异性阻断剂明确Ghrelin受体 (GHSR1a/GHS-R1b) 及受体后PI3K/Akt通路对miRNA-208家族的调控作用, 进一步揭示ghrelin的抗心衰作用。

关键词: 慢性心力衰竭; 促生长激素分泌素; 心肌重构; 微小RNA; 解偶联蛋白2

Abstract(limited to 4000 words):

Energy metabolism disorder plays a role in cardiac function deterioration and may become the new target for treatment of heart failure. The growth hormone-releasing peptide ghrelin could regulate energy metabolism. Our previous studies have found that ghrelin could inhibit myocardial remodeling by down-regulating Ang II type 1 (AT1) receptor expression. Myocardial remodeling could be significantly attenuated by down-regulating the expression of mitochondrial uncoupling protein 2 (UCP2), which was found to be a regulator of myocardial energy metabolism. By high-throughput sequencing, microRNA-208 was found to be expressed differently in myocardial tissue between heart failure and normal rats. Moreover, studies have shown that miR-208 was involved in myocardial remodeling through regulating the AT1 receptor. Therefore, we assume that ghrelin improves the energy metabolism disorders mediated by AT1 receptor via regulate the UCP2 expression through miR-208. In this study, the rat model of heart failure will be established and the primary rat cardiomyocytes will be cultured, gene silencing, gene overexpression and other methods will be used to explore the relationship of miR-208 family members and the UCP2 expression, and the influence on myocardial metabolic remodeling. Silencing specific genes with siRNA or application specific blocker will be used to clear the readjustment of ghrelin receptors (GHSR1a/GHS - R1b) and PI3K/Akt pathway on miR-208, which will further reveal the anti-heart failure mechanisms of ghrelin.

Keywords: Chronic heart failure; Ghrelin; Myocardial remodeling; microRNA; uncoupling protein 2



项目组主要成员

编号	姓名	出生年月	性别	职称	学位	单位名称	电话	证件号码	项目分工	每年工作 时间（月）				
1	杨萍	1959. 01	女	教授	博士	吉林大学	0431-84995091	220102195901163328	项目负责人	6				
2	李佳戡	1974. 02	女	主治医师	博士	吉林大学	0431-84995258	220104197402128423	数据整理	8				
3	曾红	1968. 10	女	副教授	博士	吉林大学	0431-84995258	220103196810083542	数据整理、统计及分析	8				
4	周雪艳	1961. 11	女	教授	博士	吉林大学	0431-84995258	220104196111083320	细胞转染	8				
5	杨春艳	1980. 02	女	医师	博士	吉林大学	0431-84995258	220182198002200047	细胞培养	8				
6	刘雪岩	1988. 04	女	医师	硕士	吉林大学	0431-84995258	370811198804100086	实时定量PCR	8				
7	李冰	1984. 12	女	医师	硕士	吉林大学	0431-84995816	220203198412134521	western blot及免疫组化检测	8				
8	杨四宝	1987. 08	女	博士生	硕士	吉林大学	0431-84995258	130929198708012267	动物模型构建	10				
9	陈维维	1990. 12	男	硕士生	学士	吉林大学	0431-84995258	440106199012300331	动物模型构建	10				
10	高广媛	1991. 04	女	硕士生	学士	吉林大学	0431-84995258	642221199104150041	ELISA检测	10				
总人数			高级		中级		初级		博士后		博士生		硕士生	



10	3	1	3		1	2
----	---	---	---	--	---	---



国家自然科学基金项目资金预算表（定额补助）

项目名称： Ghrelin通过miR-208家族调控UCP2表达改善心衰心肌代谢重构的机制研究

项目负责人： 杨萍

金额单位： 万元

序号	科目名称	金额	备注
	(1)	(2)	(3)
1	一、 项目资金支出	62.4000	/
2	（一）直接费用	52.0000	
3	1、 设备费	0.0000	
4	（1）设备购置费	0.0000	
5	（2）设备试制费	0.0000	
6	（3）设备改造与租赁费	0.0000	
7	2、 材料费	39.0000	用于实验动物、实验耗材及实验试剂购买
8	3、 测试化验加工费	3.0000	用于引物合成、质粒构建、实时定量PCR等
9	4、 燃料动力费	0.0000	
10	5、 差旅费	0.5000	用于会议宿费以及国内机票等交通费用
11	6、 会议费	0.5000	预计共参加4次国内学术会议，用于会议注册
12	7、 国际合作与交流费	0.0000	
13	8、 出版/文献/信息传播/知识产权事务费	3.0000	用于文献检索及发表论文版面费
14	9、 劳务费	6.0000	用于直接参加项目研究的研究生劳务费
15	10、 专家咨询费	0.0000	
16	11、 其他支出	0.0000	
17	（二）间接费用	10.4000	
18	其中：绩效支出	2.6000	
19	二、 自筹资金	0.0000	



预算说明书

(请对各项支出的主要用途和测算理由及合作研究外拨资金等内容进行详细说明, 可根据需要另加附页。)

本项目预计共需资金62.4 万元, 各项费用均按《国家自然科学基金项目资助经费管理办法》规定的要求进行预算, 本项目研究条件足够, 没有购置5万元以上固定资产及设备的预算, 具体经费申请说明如下:

1. 直接费用: 52万元, 直接用于科学研究的费用。具体如下:

1.1 材料费: 39 万

1) 实验动物: 2 万元, 大鼠 20 元/每只, 约500 只, 计10000 元; 大乳鼠20 元/每只, 约200只, 计4000元; 动物饲料、垫料等6000 元;

2) 实验室耗材: 8 万元, 主要用于细胞培养液、胎牛血清、培养瓶等实验耗材购买;

3) 试剂购买: 29 万元

各种免疫学抗体10 万元: 约5000 元/抗体, 各种抑制剂、磷酸化及总蛋白抗体等约20个; Ghrelin 等蛋白试剂8 万元: 购买 Ghrelin 等蛋白试剂(100ul Ghrelin 美国凤凰公司约2000元, 美国sigma公司约5000元)。

各种提取试剂盒5 万元: 包括DNA、总RNA、蛋白质和质粒等提取盒;

PCR 检测试剂盒3 万元: 用于RT-PCR、实时定量PCR 检测分析;

各载体及检测试剂盒3 万元: 各种克隆和表达载体、细胞凋亡等检测试剂盒;

1.2 测试化验加工费: 3 万元, 用于引物合成、质粒构建、动物模型血流动力学检测及流式细胞仪、实时定量PCR仪使用费用等。拟于吉林省药物研究院检测心衰大鼠模型血流动力学, 每只大鼠收费约100元, 拟检测150只大鼠; 拟于上海生工生物工程有限公司合成引物、构建质粒等约需费用1.0万元, 其他如实时定量PCR、流式细胞仪、共聚焦显微镜等仪器使用费约需0.5万元。

1.3 差旅费: 0.5 万元, 预计参加4次国内学术交流会议, 每年1次, 每次2-3人, 每次3-5天, 主要包括会议宿费以及往返车票等交通费用, 开支标准严格按照国家相关规定执行。

1.4 会议费: 0.5万元, 预计主办小型国内学术研讨会2次, 每次参会50人次左右, 邀约8-10名国内知名专家进行与研究项目相关的学术交流, 主要用于购买会议相关材料; 预计注册4次国内学术交流会议, 每年1次, 每次1-2人, 主要用于会议注册及购买相关材料。



1.5 出版/文献/信息传播/知识产权事务费：3万元，用于国际论文发表费，预计发表2-3篇SCI论文，每篇约需0.8万元；3-5篇核心期刊论文，每篇约需0.4万元。

1.6 劳务费：6万元，用于参与本项目的研究生（3人次，500 元/月×40 月）等科研人员劳务费；

2. 间接费用：

主要包括依托单位为项目研究提供的现有仪器设备及房屋，水、电、气、暖消耗，有关管理费用的补助支出，以及绩效支出等共计10.4万元，其中绩效支出2.6万元。

合计：62.4万元

项目负责人签字：

科研部门公章：

财务部门公章：



第一位评审专家意见：缺少同时干预 Ghrelin 和 miR-208 家族的实验。

第二位评审专家意见：在研究内容中心肌代谢评价相关内容需要加强，尤其是对于线粒体生物学的影响应作为本研究的一个关键点（UCP2 是线粒体蛋白）。

根据第一位专家的意见，于动物体内实验与细胞体外实验中添加同时干预 Ghrelin 和 miR-208 家族的实验；根据第二位评审专家意见丰富心肌代谢评价相关内容，检测心肌能量代谢底物（游离脂肪酸、乳酸）、能量生成标志物（如 ADP、ATP 及 ATP 酶）、能量转运分子（ANT、CK）表达，于不同环节评估心肌能量代谢；并检测线粒体超微结构改变，评估线粒体功能。

在研究内容与研究方案主面具体调整如下：

2.1 研究内容：

一、检测不同程度心衰患者 Ghrelin、miRNA-208 家族成员及能量代谢标志物表达水平，初步分析上述三者间的可能关系

- (1) 收集不同心衰程度患者血样，并设健康对照组；
- (2) 检测各组血样 Ghrelin、miRNA-208 家族成员（miRNA-208a 及 miRNA-208b）及能量代谢标志物（乳酸、游离脂肪酸、ATP 及 ATP 酶）表达水平；
- (3) 对上述表达物作相关性分析，初步判断其相互关系。

二、动物实验探讨上述三者间的可能关系，观察外源性 Ghrelin 对心衰心肌代谢重构的影响，初步探讨其可能机制

1、构建大鼠心衰模型，观察外源性 Ghrelin 对心衰不同时期心功能的影响：

- (1) 通过结扎大鼠左冠状动脉前降支制备大鼠心衰模型，给予 Ghrelin 干预，分别于给药后 1、2、4 及 8 周观察 Ghrelin 对心功能的影响；
- (2) 心脏彩超检测各组大鼠心功能；
- (3) 检测各组大鼠血流动力学；
- (4) 各组大鼠心肌形态学检查；
- (5) 心衰标志分子 BNP 检测；

通过以上指标的检测明确 Ghrelin 对心衰不同时期心衰大鼠心功能的影响。

2、在体内动物模型中初步探讨外源性 Ghrelin 改善心功能的可能机制：



(1) 明确 Ghrelin 对心衰不同时期代谢重构的影响；

①通过结扎大鼠左冠状动脉前降支制备大鼠心衰模型，分别于术后不同时间点（即刻、1、2 及 4 周）观察心衰形成不同时期心肌能量代谢的变化情况及心肌重构情况；术后第 5 周给予 Ghrelin 干预，分别于给药后 1、2、4 及 8 周观察 Ghrelin 对心衰心肌能量代谢的影响；

②检测各组大鼠外周血及心肌组织能量代谢底物（游离脂肪酸、乳酸）、能量生成标志物（如 ADP、ATP 及 ATP 酶）、能量转运分子（ANT、CK）的表达水平，明确 Ghrelin 对心衰心肌能量代谢的影响；

③观察各组大鼠心肌组织线粒体超微结构的变化，检测各组大鼠外周血及心肌组织能量代谢调节关键分子 UCP2 的表达，明确 Ghrelin 对心衰心肌线粒体损伤的影响，并深入探讨 Ghrelin 影响心衰心肌能量代谢的可能靶点；

④检测各组大鼠心肌细胞凋亡水平，明确心衰不同时期心肌代谢重构的进展情况，并探讨 Ghrelin 对心肌重构的影响；

⑤检测各组大鼠心肌组织 Ghrelin 受体（GHS-R1a 与 GHS-R1b）的表达，初步探讨 GHS-R1a 与 GHS-R1b 在 Ghrelin 影响心衰心肌能量代谢中的作用。

(2)明确 Ghrelin 对心衰不同时期心肌 miRNA-208 家族成员(miRNA-208a 及 miRNA-208b) 表达的影响；

① 结扎大鼠左冠状动脉前降支制备大鼠心衰模型，给予 Ghrelin 干预，分别于给药后 1、2、4 及 8 周观察 Ghrelin 对心衰心肌 miRNA-208 家族表达的影响；

②检测各组大鼠外周血及心肌组织 miRNA-208 家族成员（miRNA-208a 及 miRNA-208b）表达水平；

③检测各组大鼠心肌组织 Ghrelin 受体（GHS-R1a 与 GHS-R1b）的表达，初步探讨 GHS-R1a 与 GHS-R1b 在 Ghrelin 影响心衰心肌 miRNA-208 家族成员表达中的作用。

(3) 明确 miRNA-208 家族成员与能量代谢的关系，寻找 miRNA-208 家族成员作用靶点；

①构建 miRNA-208 家族成员的慢病毒载体；



②结扎大鼠左冠状动脉前降支制备大鼠心衰模型，术后即刻给予模型大鼠尾静脉分别注射 miRNA-208 家族成员的慢病毒载体，于不同时间点（术后 1、2、4 及 8 周）观察 miRNA-208 家族成员对代谢重构的影响；

③结扎大鼠左冠状动脉前降支制备大鼠心衰模型，给予 Ghrelin 干预，即刻给予各组大鼠尾静脉分别注射 miRNA-208 家族成员的慢病毒载体，于不同时间点（给药后 1、2、4 及 8 周）观察 miRNA-208 家族成员在 Ghrelin 影响代谢重构中的作用；

④观察各组大鼠心肌组织线粒体超微结构的变化，检测各组大鼠外周血及心肌组织能量代谢底物（游离脂肪酸、乳酸）、能量生成标志物（如 ADP、ATP 及 ATP 酶）、能量转运分子（ANT、CK）及调节能量的关键分子 UCP2 的基因与蛋白表达水平，寻找 miRNA-208 家族成员的可能作用靶点。

（4）初步判断 Ghrelin 受体（GHS-R1a 及 GHS-R1b）在 Ghrelin 影响心衰心肌 miRNA-208 家族成员表达及能量代谢中的可能作用。

① 结扎大鼠左冠状动脉前降支制备大鼠心衰模型，给予 Ghrelin 干预，并在此基础上应用 GHS-R1a 特异性拮抗剂 JMV2959 阻断 GHS-R1a 的作用，探讨 GHS-R1a 在 Ghrelin 调控 miRNA-208 家族成员表达及影响心衰心肌能量代谢中的作用；

②检测各组大鼠外周血及心肌组织 miRNA-208 家族成员（miRNA-208a 及 miRNA-208b），观察线粒体超微结构，检测能量代谢底物（游离脂肪酸、乳酸）、能量生成标志物（如 ADP、ATP 及 ATP 酶）、能量转运分子（ANT、CK）及能量代谢重要调节分子 UCP2 的表达水平。

（5）初步探讨 Ghrelin 受体后信号分子 PI3K/Akt 信号通路在 Ghrelin 改善心肌能量代谢中的作用。

在上述动物模型中，检测各组大鼠外周血及心肌组织 PI3K 与 Akt 分子的表达情况，明确 Ghrelin 是否通过 PI3K/Akt 信号通路调控 miRNA-208 家族成员表达进而改善心肌能量代谢。

三、体外实验观察并验证 Ghrelin 对心肌代谢重构的影响及其可能机制（心肌细胞凋亡是心肌重构的重要因素之一，本研究以心肌细胞凋亡为观察对象明确能量代谢在 Ghrelin 改善心肌重构中的作用）



1、分离培养原代大鼠心肌细胞,并用 Ang II 诱导心肌细胞凋亡,探讨 Ghrelin 对 Ang II 诱导的心肌细胞凋亡的影响:

通过通过细胞形态学检查 (TUNEL 染色) 及相关凋亡分子 (Bax、Bcl-2 及 Caspase-3) 基因与蛋白水平的检测,明确 Ghrelin 对原代大鼠心肌细胞凋亡的影响;

2、探讨 Ghrelin 是否通过影响 UCP2 影响心肌能量代谢、改善心肌重构及其可能机制:

(1) 明确 UCP2 在 Ghrelin 影响心肌能量代谢、改善心肌重构中的作用:

1) 体外培养原代大鼠心肌细胞,用 Ang II 诱导心肌细胞凋亡,并给予 Ghrelin 干预,检测各组心肌细胞凋亡水平、观察心肌细胞线粒体超微结构改变、检测能量代谢底物 (游离脂肪酸、乳酸)、能量生成标志物 (如 ADP、ATP 及 ATP 酶)、能量转运分子 (ANT、CK) 的表达水平及调节能量代谢关键分子 UCP2 表达水平,并作相关性分析,判定能量代谢在 Ghrelin 改善心肌重构中的作用;

2) 体外培养原代大鼠心肌细胞,过表达 UCP2 及沉默 UCP2 后再用 Ang II 诱导心肌细胞凋亡,并给予 Ghrelin 干预,检测各组心肌细胞凋亡水平、观察心肌细胞线粒体超微结构改变、检测能量代谢底物 (游离脂肪酸、乳酸)、能量生成标志物 (如 ADP、ATP 及 ATP 酶)、能量转运分子 (ANT、CK) 的表达水平,明确 UCP2 在 Ghrelin 抑制 Ang II 诱导的心肌细胞凋亡中的作用;

(2) 探讨 miRNA-208 家族成员在 Ghrelin 影响心肌细胞能量代谢中的作用及可能机制:

1) 体外培养原代大鼠心肌细胞,用 Ang II 诱导心肌细胞凋亡,并给予 Ghrelin 干预,检测各组心肌细胞 miRNA-208 家族成员 (miRNA-208a 及 miRNA-208b) 表达水平,明确 miRNA-208 家族成员表达的情况及可能来源,并明确 Ghrelin 对 miRNA-208 家族成员表达的影响;

2) 体外培养原代大鼠心肌细胞,分别应用 miRNA mimic 与 miRNA inhibitor 过表达及沉默 miRNA-208 家族成员后再用 Ang II 诱导心肌细胞凋亡,并给予 Ghrelin 干预,检测各组心肌细胞凋亡水平、线粒体超微结构及能量代谢水平,明确 miRNA-208 家族成员在 Ghrelin 影响心肌细胞能量代谢中的作用;明确



miRNA-208 家族成员的作用是否具有一致性；并检测 AT1 受体表达，明确 miRNA-208 家族成员对 AT1R 的影响；

3) 在上述基础上检测各组心肌细胞 Ghrelin 受体 (GHS-R1a 与 GHS-R1b) 表达水平，明确 miRNA-208 家族是否可影响 Ghrelin 受体表达，Ghrelin 与 miRNA-208 家族之间是单纯的线性关系还是环形的互为因果关系；

(3) 明确 AT1 受体在 Ghrelin 调控 miRNA-208 家族改善心肌能量代谢中的作用：

体外培养原代大鼠心肌细胞，过表达及沉默 AT1R 后再用 Ang II 诱导心肌细胞凋亡，并给予 Ghrelin 干预，检测各组心肌细胞 miRNA-208 家族成员表达水平、线粒体超微结构、心肌细胞能量代谢标志物水平及心肌细胞凋亡水平，明确 AT1R 在 Ghrelin 调控 miRNA-208 家族改善心肌能量代谢中的作用；

(4)明确 Ghrelin 受体(GHS-R1a 与 GHS-R1b)在 Ghrelin 调控 miRNA-208 家族改善心肌能量代谢，抑制心肌细胞凋亡中的作用：

1) 体外培养原代大鼠心肌细胞，过表达 GHS-R1a 及沉默 GHS-R1a 后再用 Ang II 诱导心肌细胞凋亡，并给予 Ghrelin 干预，检测各组心肌细胞 miRNA-208 家族成员表达水平、线粒体超微结构、心肌细胞能量代谢标志物水平及心肌细胞凋亡水平，明确 GHS-R1a 在 Ghrelin 调控 miRNA-208 家族改善心肌能量代谢，抑制心肌细胞凋亡中的作用；

2) 体外培养原代大鼠心肌细胞，过表达 GHS-R1b 及沉默 GHS-R1b 后再用 Ang II 诱导心肌细胞凋亡，并给予 Ghrelin 干预，检测各组心肌细胞 miRNA-208 家族成员表达水平、线粒体超微结构、心肌细胞能量代谢标志物水平及心肌细胞凋亡水平，明确 GHS-R1b 在 Ghrelin 调控 miRNA-208 家族改善心肌能量代谢，抑制心肌细胞凋亡中的作用；

(5)明确 Ghrelin 受体后信号通路(PI3K 与 Akt)在 Ghrelin 调控 miRNA-208 家族改善心肌能量代谢，抑制心肌细胞凋亡中的作用：

体外培养原代大鼠心肌细胞，应用 PI3K 特异性拮抗剂 LY294002 阻断 PI3K 的作用后用 Ang II 诱导心肌细胞凋亡，并给予 Ghrelin 干预，检测各组心肌细胞 miRNA-208 家族成员表达水平、线粒体超微结构、心肌细胞能量代谢标志物水平及心肌细胞凋亡水平，明确 PI3K/Akt 信号通路在 Ghrelin 调控 miRNA-208 家



族改善心肌能量代谢，抑制心肌细胞凋亡中的作用。

3.1 研究方案：

本课题通过收集心衰患者血样、构建心衰动物模型及体外培养原代大鼠心肌细胞设立体内实验与体外实验，应用基因重组技术（慢病毒载体构建、细胞转染、基因过表达与沉默等）及蛋白质与核酸分析技术（免疫组织化学染色、ELISA、Western Blot 及 Real time-PCR 方法）等实验手段明确检测指标的动态变化，并对各指标进行定位、定性、定量分析，探讨 Ghrelin 调控 miRNA-208 家族改善心肌能量代谢，抑制心肌重构的作用及机制。具体方法如下：

一、检测不同程度心衰患者 Ghrelin、miRNA-208 家族成员及能量代谢标志物表达水平，并初步分析上述三者间的可能关系

（1）常规 ELISA 法检测各组血清 Ghrelin 及能量代谢标志物（乳酸、游离脂肪酸、ATP 及 ATP 酶）表达水平，实验方法熟练，实验室具有 Biotec- EPOCH 高质量酶标仪，实验试剂可购买，实验条件具备。

（2）miRNA-208 家族成员（miRNA-208a 及 miRNA-208b）基因检测：Trizol 法提取总 RNA、miRNA 特异性反转录引物进行反转录、荧光定量 PCR 法进行相对定量分析（Cytokine, 2008, 42(1):85-91），所在实验室拥有 ABI7500 Fast 实时定量 PCR 仪，能够保证相关研究顺利进行。

二、动物实验探讨上述三者间的可能关系，观察外源性 Ghrelin 对心衰心肌代谢重构的影响，初步探讨其可能机制

1、构建大鼠心衰模型，观察外源性 Ghrelin 对心衰不同时期心功能的影响：

（1）大鼠心衰模型的制备：

取 100 只雌性 Wistar 大鼠，随机选取 20 只做为假手术组，余下 80 只作为模型组结扎左冠状动脉前降支用于制备心梗后心衰模型。部分假手术组与模型组大鼠分别于术后即刻、1、2 及 4 周终止饲养，检测相关指标。余下的大鼠手术 4 周后，心衰模型组再随机分为模型组及模型-Ghrelin 组，具体分组如下：

①假手术组（SO group）：皮下注射与 Ghrelin 等体积的 0.9%生理盐水。

②模型组（MI group）：皮下注射与 Ghrelin 等体积的 0.9%生理盐水。

③模型-Ghrelin 组（MI-Ghrelin group）：皮下注射与 Ghrelin 0.2mg/kg。



④模型-Ghrelin 组+ GHS-R1a 拮抗剂(JMV2959)组：皮下注射与 Ghrelin 与 JMV2959。

实验大鼠常规饲养，分别于给药后 1、2、4 及 8 周终止饲养，检测相关指标。

本研究组已熟练掌握结扎大鼠左冠状动脉前降支构建心梗后心衰模型技术，并在先前的研究中成功构建此模型。

(2) 心脏彩超检测各组大鼠心功能：

用超声心动图检测各组大鼠心功能，本科室具有超声心动仪及检测大鼠心功能的专用探头，具有专业检测人员，检测技术纯熟，此项检查可于本科室完成。

(3) 检测各组大鼠血流动力学：

此项检测预计在吉林大学药学院完成，设备齐全，具备连压力换能器、AP-621G 载波放大器、RM-6000 型八道生理记录仪等检测仪器，技术熟练。

(4) 各组大鼠心肌形态学检查：

①常规心脏标本留取，大体模型用游标卡尺测量并拍照；

②常规 HE 染色观察心肌形态学改变，实验方法熟练，实验试剂可购买，实验条件具备。

(5) ELISA 法检测心衰标志分子 BNP 水平：

ELISA 法检测各组大鼠血清 BNP 水平，实验试剂盒可购买，实验操作技能熟练，实验条件具备。

2、在体内动物模型中初步探讨外源性 Ghrelin 改善心功能的可能机制：

(1) 组织形态学检查（HE 染色、TUNEL 染色）：

常规方法留取心脏标本，并石蜡包埋切片，严格按照试剂盒方法操作。本研究组操作熟练，实验条件具备，实验试剂可购买。

(2)线粒体超微结构观察：自心尖部向上横向切取约 2mm 厚心肌。放入 2.5% 戊二醛进行前固定，1% 锇酸进行后固定，乙醇系列脱水后采用 Epon812 环氧树脂包埋。LKB-III 型超薄切片机半薄切片定位，做超薄切片，采用醋酸双氧铀及柠檬酸铅进行双重染色。应用 JEM-1200EX 型透射电子显微镜进行心肌组织超微结构的观察。

(3) 能量代谢相关指标（乳酸、游离脂肪酸、ADP、ATP 及 ATP 酶）表达水平检测：



上述物质的表达水平可购买相关试剂盒进行检测（南京建成生物工程研究所所有售），严格按说明书进行操作，实验条件具备，实验可顺利进行。

(3) 免疫组织化学染色或 Western blot 法检测相关蛋白表达：

检测凋亡分子（Bax、Bcl-2 及 Caspase-3）、能量转运分子 ANT 及 CK、能量代谢调节关键分子 UCP2、Ghrelin 受体（GHS-R1a 与 GHS-R1b）及受体后信号分子 PI3K、Akt 的蛋白表达水平；

常规免疫组织化学染色或 Western Blot 法检测上述分子蛋白水平，免疫组织化学染色检测蛋白表达的优点是可定性、定位检测，而 Western Blot 法检测蛋白表达的优点是定量，二者有机结合将使实验数据更完备。

上述二种实验方法所需设备具备，技术纯熟，实验条件具备，可顺利完成。

(4) 实时定量 PCR 法检测相关指标 mRNA 表达：

检测凋亡分子（Bax、Bcl-2 及 Caspase-3）、能量转运分子 ANT 及 CK、能量代谢调节关键分子 UCP2、miRNA-208 家族成员（miRNA-208a 及 miRNA-208b）、Ghrelin 受体（GHS-R1a 与 GHS-R1b）及受体后信号分子 PI3K、Akt 的 mRNA 表达水平；

实时定量 PCR 法按本研究室常规方法进行（Cytokine, 2008, 42(1):85-91），实时定量 PCR 所用试剂盒可购买，所在实验室拥有 ABI7500 Fast 实时定量 PCR 仪，实验人员技术纯熟，能够保证实验顺利进行。

(5) 慢病毒载体构建：

设计 miRNA-208 家族成员（miRNA-208a 及 miRNA-208b）miRNA 前体的双酶切（XbaI、PacI）引物，对其 PCR 产物进行双酶切后回收，与双酶切后的慢病毒载体进行连接，将连接产物进行克隆，在 T293 细胞中进行慢病毒包装、浓缩，分装后-80℃保存备用。

三、体外实验观察并验证 Ghrelin 对心肌代谢重构的影响及其可能机制

1、分离培养原代大鼠心肌细胞，并用 Ang II 诱导心肌细胞凋亡，探讨 Ghrelin 对 Ang II 诱导的心肌细胞凋亡的影响：

(1) 分离培养原代大鼠心肌细胞：



取出生 24-48 小时 Wistar 大鼠，用 75%酒精消毒皮肤后无菌条件下开胸剪取心脏，将心脏放入预冷的 D-Hank's 液中，取心室于冷的 D-Hank's 液冲洗 3 次；将心室肌剪成 1mm³ 的碎块，冷 D-Hank's 液冲洗 3 次；在 37℃ 条件下用浓度为 0.06%胰酶反复消化（首次消化液弃掉），每次 5min，收集上清液于含有胎牛血清的试管中（放于冰上），待满管后离心 5min（1000rpm），弃上清，用含 10%血清的 DMEM/F12 培养液重悬细胞于培养瓶，37℃，5%CO₂ 条件下培养 90min，差速贴壁法去除心肌成纤维细胞，取细胞悬液进行台盼蓝染色，细胞计数同时计算细胞存活率，调整细胞浓度，铺板，随后分组给药进行实验。

(2) TUNEL 法检测细胞凋亡：

细胞铺于小玻片上，培养终止后严格按照 TUNEL 试剂盒方法操作，本研究组技术熟练，实验条件具备，实验可顺利完成。

(3) 凋亡相关分子 mRNA 及蛋白检测同动物实验。

2、探讨 Ghrelin 是否通过影响 UCP2 影响心肌能量代谢、改善心肌重构及其可能机制：

(1) RNAi 技术：

设计 siRNA 序列，制备 siRNA，将制备好的 siRNA 转导至心肌细胞，沉默 UCP2 基因。siRNA 基因沉默按本研究室常规方法进行（Gen Comp Endocrinol 2009; 161(2):276-282）。

(2) 设计 miRNA mimic 与 miRNA inhibitor：

分别设计 miRNA-208 家族成员（miRNA-208a 及 miRNA-208b）不同个体的 miRNA mimic 与 miRNA inhibitor 进行细胞转染，检测相关指标水平，本实验具有技术熟练的专业人员操作，实验条件具备，实验可顺利进行。

(3) 细胞转染：

1) 小分子 RNA 的单独转染采用转染试剂 Lipofectamine RNAiMAX 进行转染（细胞先铺板，待贴壁生长良好后再转染），以 24 孔板为例，其他孔板可根据孔的大小按比例放大或者缩小：CM 换成无血清培养过夜后，细胞融合率约 50~60%，更换新鲜的 DMEM 培养基（不含 FBS 和抗生素）每孔 500μl。将小分子 RNA



稀释于100 μ l Opti-MEM培养基中；每管加入1 μ l Lipofectamine RNAi MAX，轻柔混匀，室温放置15min；将RNAi MAX与miRNA/siRNA的稀释液加入24孔板的各孔细胞中，混匀后培养箱中培养48h，48h后按实验需要处理细胞。

2) 质粒DNA的转染用Lipofectamine 2000进行正转，以24孔板为例，其他孔板可根据孔的大小按比例放大或者缩小：CM和CF用不含FBS的DMEM培养基培养过夜后，细胞融合率约80~90%，更换新鲜的DMEM培养基（不含血清和抗生素）每孔400 μ l。将1.5 μ l Lipofectamine 2000稀释于50 μ l opti-MEM中混匀，室温放置5min；将质粒DNA1 μ g稀释于50 μ l Opti-MEM培养基中；将上述两液混合，室温放置20min；将Lipofectamine 2000与质粒DNA的稀释液加入24孔板的各孔细胞中，混匀后培养箱中培养6h，更换新鲜的DMEM培养基再培养42h后按实验需要处理细胞。

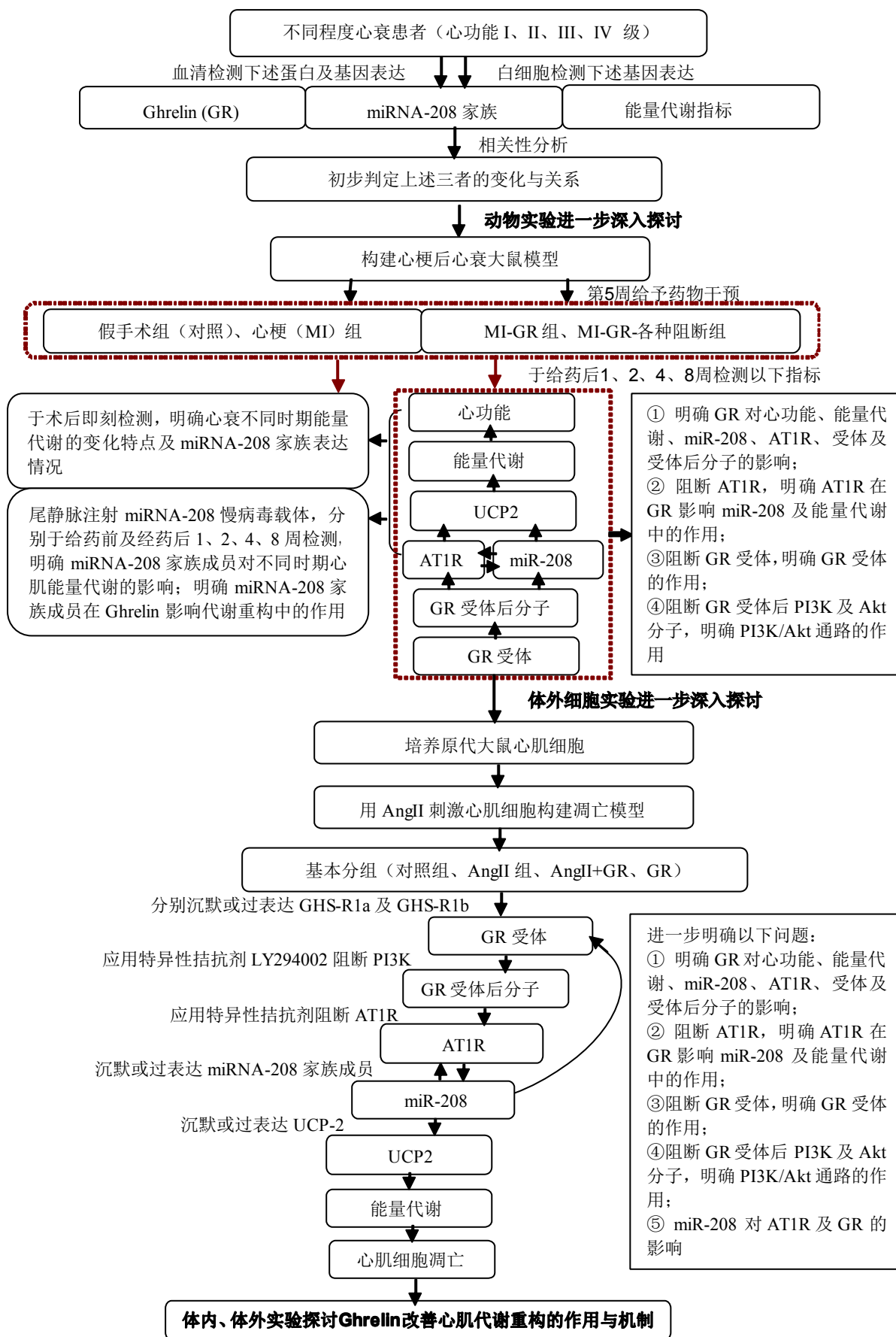
(4) 透射电镜观察线粒体超微结构：常规培养处理细胞，待到实验结束后使用细胞刮收集细胞，800r/min 离心弃去上清，用戊二醛固定，4度冰箱固定1-1.5h，清洗，固定，脱水，浸透，包埋，常规切片与染色。

(5) 其它：

能量代谢相关指标（ADP、ATP、ATP 酶）检测，凋亡分子（Bax、Bcl-2及Caspase-3）、能量转运分子 ANT 及 CK、以及能量代谢调节关键分子 UCP2、Ghrelin 受体（GHS-R1a 与 GHS-R1b）及受体后信号分子 PI3K、Akt 的 mRNA 及蛋白检测，方法同动物实验；

3.2 技术路线

实验按下技术路线进行：





国家自然科学基金资助项目签批审核表

	我接受国家自然科学基金的资助，将按照申请书、项目批准意见和计划书负责实施本项目（批准号：81570360），严格遵守国家自然科学基金委员会关于资助项目管理、财务等各项规定，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（签章）： 年 月 日	我单位同意承担上述国家自然科学基金项目，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，严格遵守国家自然科学基金委员会有关资助项目管理、财务等各项规定，并督促实施。 依托单位（公章） 年 月 日					
本栏目由基金委填写	科学处审查意见：						
	建议年度拨款计划（本栏目为自动生成，单位：万元）：						
	年度	总额	第一年	第二年	第三年	第四年	第五年
	金额						
	科学部审查意见： 负责人（签章）： 年 月 日						
本栏目主要用于重大项目等	相关局室审核意见： 负责人（签章）： 年 月 日						
	委领导审批意见： 委领导（签章）： 年 月 日						