

| | | | | | |
|-------------------|--------------------------|--------|-------------------|---------|-------|
| 研究类别 | 临床研究 | 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---泌尿科外科学 | | | | |
| 开始日期 | 2016-01 | | 完成日期 | 2018-12 | |
| 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 |
| 1.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 1.0 | 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 | | 0.6 |
| 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 | | 0.2 |
| 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 | | 0.2 |
| 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 | | 1.0 |
| 预计成果 | | | | | |
| 定量指标 | | | | | |
| 论文数 | 其中SCI数 | | 其中发明专利 | | 著作数 |
| 2 | 1 | | 0 | | 0 |
| 新产品 | 技术标准 | | 培养硕士数 | | 培养博士数 |
| 0 | 0 | | 0 | | 0 |
| 定性指标 | | | | | |
| 预期目标1 | 明确低氧诱导自噬能否介导膀胱癌细胞的化疗抵抗 | | | | |
| 预期目标2 | 探索低氧诱导自噬介导膀胱癌细胞化疗抵抗的可能机制 | | | | |



| | |
|-------|---------------------|
| 预期目标3 | 在国内外专业杂志上发表1~2篇研究论著 |
| 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二医院 | | | |
| 通讯地址 | 浙江杭州解放路88号 | 邮编 | 310009 | |
| 联系电话 | 057187783914 | 联系人 | 雷红梅 | |
| 合作单位 | | | | |
| 序号 | 单位名称 | 联系人 | 联系电话 | 职责 |
| 1 | | | | |
| 2 | | | | |
| 3 | | | | |
| 4 | | | | |
| 5 | | | | |



负责人

| | | | |
|------|---------------|------|--------|
| 姓名 | 茅夏娃 | 身份证号 | |
| 出身年月 | | 手机 | |
| 职务 | 主治医师 | 专业 | 泌尿科外科学 |
| 学历 | 硕士 | 学位 | 硕士 |
| 工作单位 | 浙江大学医学院附属第二医院 | | |

其他成员

| 序号 | 姓名 | 出生年月 | 职称 | 工作单位 | 项目分工 |
|----|-----|------|-------|---------------|-----------------|
| 1 | 茅夏娃 | | 主治医师 | 浙江大学医学院附属第二医院 | 项目总负责 |
| 2 | 张楠 | | 主治医师 | 浙江大学医学院附属第二医院 | 实验操作（细胞培养与凋亡方面） |
| 3 | 郑一春 | | 副主任医师 | 浙江大学医学院附属第二医院 | 实验操作（细胞培养与凋亡方面） |
| 4 | 李祎 | | 主治医师 | 浙江大学医学院附属第二医院 | 实验操作（蛋白组学方面） |
| 5 | 吴慧锋 | | 主治医师 | 浙江大学医学院附属第二医院 | 实验操作（蛋白组学方面） |
| 6 | 肖家全 | | 主任医师 | 浙江大学医学院附属第二医院 | 实验统计与分析 |



本课题计划3年内完成，具体安排和进度如下

- ①、2016.1~2016.6 各种试剂的购买，仪器设备的调试，低氧与常氧条件下膀胱癌细胞BIU-87的培养与传代。
- ②、2016.7~2017.6 低氧对膀胱癌细胞化疗抗性的影响
- ③、2017.7~2018.6 低氧诱导对膀胱癌细胞凋亡的影响；低氧对膀胱癌细胞自噬水平的影响，HIF-1 α 水平测定，LC3、beclin-1蛋白测定；siRNA-HIF-1 α 的构建；转染siRNA后caspase3水平测定；自噬抑制剂与HIF抑制剂对化疗抗性的影响。
- ④、2018.7~2018.12 数据统计与分析，论文撰写，成果申报



五、项目基本情况

研究内容:

1、低氧对膀胱癌细胞化疗抗性的影响

①、应用化学药物: 顺铂 (cisplatin), 表柔比星 (epirubicin), 阿霉素 (Doxorubicin), 不同浓度, 不同作用时间处理膀胱癌BIU-87细胞株。观察它们对膀胱癌细胞生长的影响以及它们的细胞毒性和药物浓度、时间之间的依赖关系。

②、以第①部分的实验结果为基础, 在1%O₂低氧条件下选用合适的药物浓度和药物作用时间, 化疗药物处理BIU-87细胞株, 观察在1%O₂低氧下化疗药物对细胞毒性的影响, 并与①组常氧组进行对比。

2、低氧诱导自噬在膀胱癌细胞化疗抗性中的作用

①、分别在 1%O₂和 20%O₂中培养膀胱癌细胞BIU-87细胞株, 分别使用化疗药物处理。DAPI染色观察细胞凋亡形态; PI染色检测细胞周期; PI-AnnexinV染色检测细胞凋亡。

②、选取化疗抗性最明显实验组作为处理对象, 检测自噬水平。Western Blot检测LC3及beclin-1蛋白水平; 透射电镜观察自噬细胞改变; 流式细胞仪检测细胞自噬率。

③、3-MA等自噬化学抑制剂处理BIU-87细胞株, Western Blot检测LC3及beclin-1蛋白水平; 透射电镜观察自噬细胞改变; 流式细胞仪检测细胞自噬率, 以及细胞死亡情况。

3、低氧诱导自噬对膀胱癌细胞化疗抗性的机制研究

①、Western Blot检测常氧和乏氧条件下, 膀胱癌细胞HIF-1 α 的表达

②、构建siRNA-HIF-1 α 转染BIU-87细胞, Western Blot和RT-PCR检测HIF-1 α 和Atg5的表达; Western Blot检测LC3及beclin-1蛋白水平

③、检测低氧和常氧以及siRNA-HIF-1 α 作用前后caspase3的表达

④、分别加入自噬抑制剂(3-MA)、HIF抑制剂(YC-1)以及同时加入两者, 观察细胞对化疗药物抗性的变化。



研究方法:

1、低氧对膀胱癌细胞化疗抗性的影响

- ①、顺铂, 表柔比星, 阿霉素不同浓度处理BIU-87细胞株。MTT 法检测细胞
- ②、若干个的药物浓度, 不同时间作用BIU-87细胞, MTT法检测细胞
- ③、化疗药物处理20%O₂及1%O₂培养下的BIU-87细胞, MTT法检测细胞

2、HIF-1 α 腺病毒载体以及靶向HIF-1 α siRNA腺病毒载体的构建

- ①、HIF-1 α 靶向性腺病毒载体: 扩增HIF-1 α 基因, 加上Bgl II与Sal I内切酶接头, 连接, 克隆, 鉴定。线性化后重组, 再克隆。线性化后转入HEK293细胞, 裂解细胞, 获取病毒原液, 感染HEK293细胞, 纯化病毒颗粒, 并命名为Ad-HIF-1 α 。

- ②、靶向HIF-1 α 基因siRNA腺病毒载体: 克隆入pShuttleII载体, pShuttleII-siHIF-1 α 线性化后电转化到含pAdEasy-1的BJ5183感受态细菌中, 脂质体转染HEK293, TCID₅₀法测定病毒效价; Western Blot检测感染前后HIF-1 α 蛋白

3、低氧诱导自噬在膀胱癌细胞化疗抗性中的作用

- ①、药物作用两组细胞。DAPI观察细胞凋亡; PI染色检测细胞周期; PI-annexinV检测细胞凋亡。

- ②、选取化疗抗性最明显的作为处理组, Western Blot检测LC3及beclin-1; 电镜观察细胞自噬; MDC检测细胞自噬率

- ③、3-MA作用处理组, Western Blot检测LC3及beclin-1; 电镜观察细胞自噬; 流式细胞仪检测自噬率。

4、低氧诱导自噬对膀胱癌细胞化疗抗性的机制研究

- ①、两种条件培养BIU-87, 选取抗性最明显的为处理组, Western Blot检测药物作用前后细胞HIF-1 α

- ②、两种条件培养BIU-87, siRNA-HIF-1 α 转染BIU-87细胞, 化疗药物作用细胞, Western Blot和RT-PCR检测化疗药物作用前后, HIF-1 α 和Atg5; Western Blot检测作用前后LC3、beclin-1。

- ③、两种条件培养BIU-87, siRNA-HIF-1 α 转染BIU-87细胞, 化疗药物作用细胞, Western Blot检测有无siRNA-HIF-1 α 作用时caspase3的表达

- ④、两种条件培养BIU-87, 加入3-MA、YC-1以及两者, 化疗药物作用BIU-87, MTT法检测



创新点:

低氧诱导膀胱癌细胞的HIF-1 α 表达上调,并活化自噬通路中的信号蛋白beclin 1和LC3,自噬的增加增强了膀胱癌细胞的化疗抗性,同时低氧促进HIF-1 α 水平增加,促进自噬相关分子Atg5表达,可能间接抑制凋亡相关分子caspase,从而抑制肿瘤细胞凋亡。本申请项目将可能发现缺氧诱导自噬促进膀胱癌细胞化疗抵抗,并提出HIF-1 α 在膀胱癌化疗抗性中的调节作用以及通过缺氧 \rightarrow HIF-1 α \rightarrow 自噬 \rightarrow 生长因子 \rightarrow 化疗抵抗的观点,为深入理解和认识膀胱癌化疗抵抗的提供新的观点。



六、前期工作说明

申请者所在单位有“教育部重点实验室-恶性肿瘤干预与预警实验室”及“国家中医药管理局中医药科研三级实验室-中药药理(心血管)实验室”，拥有非常优越的科研平台，实验设施先进，仪器齐全。医院实验室配备各种本项目所需的仪器设备，为本项目的实施提供了实验平台保障。

本项目依托单位为本单位泌尿外科，从“九五”开始一直从事泌尿外科的基础与应用研究，近3年来科室累计承担国家自然科学基金、省自然科学基金、省科技厅公益项目等各类课题16项，科研经费150余万(与本课题相关课题——国家自然科学基金：81202022，23.00万元，2013.01-2015.12，糖皮质激素及其受体在膀胱癌进展中的作用及机制研究；国家自然科学基金：81400756，24.00万元，2015.01-2017.12，HIF-1 α 介导缺氧诱导前列腺基质细胞自噬在良性前列腺增生中的作用和机制研究；国家自然科学基金：81402099，23.00万元，2015.01-2017.12，雄激素受体在膀胱癌进展中对GATA3的调控机制研究)。科室及研究小组现已建立了完整的研究膀胱癌模型以及研究相关的细胞学、免疫学、分子生物学、蛋白质组学等技术平台，近3年在SCI杂志及国内核心杂志发表学术论文18篇等系列研究成果，在国内外相关领域具有一定的学术影响。特别是重点围绕膀胱癌发病机制、缺氧与自噬的关系以及两者在相关疾病发病机制等方面，取得了较大的进展。



5. 本课题相关内容的已有研究成果情况



| | |
|--------------|--|
| 是否使用实验动物: | <input type="checkbox"/> 是 <input checked="" type="checkbox"/> 否 |
| 是否涉及伦理问题: | <input type="checkbox"/> 是 <input checked="" type="checkbox"/> 否 |
| 是否涉及实验室生物安全: | <input type="checkbox"/> 是 <input checked="" type="checkbox"/> 否 |
| 是否涉及干细胞: | <input type="checkbox"/> 是 <input checked="" type="checkbox"/> 否 |
| 是否是临床前新技术研究: | <input type="checkbox"/> 是 <input checked="" type="checkbox"/> 否 |
| 是否涉及病毒研究 | <input type="checkbox"/> 是 <input type="checkbox"/> 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：

2025 年 11 月 23 日

十、 单位审核意见

申报单位意见：

单位（盖章）：

负责人签字：

年 月 日

上级主管部门意见：

单位（盖章）：

负责人签字：

年 月 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基金计划，
请单位予以经费配套。

省卫计委（盖章）

年 月 日





项目基本信息查看

一、项目基本信息

项目编号： 2016147031 申报时间： 2015年10月12日 00:03:32

项目名称： 低氧诱导自噬对膀胱癌细胞化疗抗性的作用及机制研究

二、单位审核信息

单位审核时间： 2015年10月12日 09:52:53 单位审核结果： 同意

单位审核意见： 项目研究期限2016年1月—2018年12月；预期目标太高，论文数建议1-2篇 B类配套经费建议按1万元总额做预算；可行性报告请注明项目类型

三、主管单位审核信息

主管单位审核时间： 2015年10月12日 10:26:36 主管单位审核结果： 同意

主管单位审核意见： 同意

四、形式审查信息

形式审查时间： 形式审查是否通过： 同意

形式审查意见：

五、终审信息

终审审核时间： 2015年11月09日 13:21:38 终审是否通过： 立项不资助