



项目批准号	81330012
申请代码	H03
归口管理部门	
依托单位代码	25010008A0746-1394



81330012 1013483

# 国家自然科学基金委员会 资助项目计划书

资助类别：重点项目

亚类说明：

附注说明：立项领域：肠道稳态与消化系统疾病（不含肿瘤）（H03）

项目名称：在体示踪益生菌治疗肠易激综合征的微生态动力学研究

资助经费：290万元 执行年限：2014.01-2018.12

负责人：李延青

通讯地址：济南市文化西路107号

邮政编码：250012 电 话：18678827666

电子邮件：liyanqing@sdu.edu.cn

依托单位：山东大学

联系人：张玉生 电 话：(0531)88369277

填表日期：2013年08月21日

国家自然科学基金委员会制



## 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和自然科学基金相关项目及财务管理办法（查阅<http://www.nsfc.gov.cn/>），按《批准通知》的要求认真填写《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》经主管科学部审核批准后，将作为项目研究计划执行和检查、验收的依据。
- 三、《计划书》简表部分自动生成，其他部分按以下要求填写：
  - （一）各类获资助项目都必须填写中、英文摘要及主题词，按批准经费填报经费预算表。
  - （二）正文撰写：
    1. 对于面上项目、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》中明确要求调整研究内容的，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. 对于重点项目、重大项目、科学仪器基础研究专款项目及国家重大科研仪器设备研制专项（自由申请）项目，须选择“根据研究方案修改意见更改”，根据《批准通知》的要求填报研究内容，不得自行降低、更改研究目标（或仪器研制指标）或缩减关键的研究内容。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碰到的问题（或仪器研制风险），拟采用的研究方案和技术路线；
      - 2) 项目主要参与者分工，并请说明课题及合作单位之间的关系与分工。
    3. 对于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) 分年度进度安排；
      - 5) 研究队伍的组成情况。
    4. 对于其他类型项目，参照面上项目填报。



简表

申请者信息	姓 名	李延青	性 别	男	出生年月	1962年09月	民 族	汉族
	学 位	博士			职称	教授		
	电 话	18678827666		电子邮件	liyanqing@sdu.edu.cn			
	传 真	053182166090		个人网页				
	工 作 单 位	山东大学						
	所 在 院 系 所	齐鲁医院						
依托单位信息	名 称	山东大学					代码	25010001
	联 系 人	张玉生		电子邮件	kjcjj@sdu.edu.cn			
	电 话	(0531)88369277		网站地址	www.sdu.edu.cn			
合作单位信息	单 位 名 称							代 码
项目基本信息	项 目 名 称	在体示踪益生菌治疗肠易激综合征的微生物生态动力学研究						
	资 助 类 别	重点项目			亚 类 说 明			
	附 注 说 明	立项领域：肠道稳态与消化系统疾病（不含肿瘤）（H03）						
	申 请 代 码	H03:消化系统			H0307:消化道动力异常及功能性胃肠病			
	基 地 类 别							
	执 行 年 限	2014.01-2018.12						
	资 助 经 费	290.0000万元						



## 项目摘要

### 中文摘要(500字以内):

肠道菌群在肠稳态维持和肠易激综合征（IBS）等多种疾病的发病机制中起重要作用。我们前期研究发现腹泻型IBS患者存在肠上皮屏障功能异常，短期应用乳酸杆菌治疗可以调节IBS患者异常的小肠粘膜的屏障功能，改善患者的腹痛和腹胀症状，并降低患者的总体IBS症状评分。然而益生菌摄入后，益生菌如何在肠道内定植以及益生菌如何影响肠道微生物态尚不清楚，益生菌如何调节IBS的发病机制也尚不明确。本课题在前期研究成果的基础上，设计并构建了“示踪基因”，通过在体及离体定位示踪eGFP标记的益生菌体内定植和空间位置变化，并联合16S rDNA高通量测序和宏基因组学研究方法定量分析益生菌和肠道菌群的动态变化，建立消化道菌群的“微生物动力学（microbiodynamics）”，并进一步探讨微生物影响肠道功能的机制。其研究结果将揭示益生菌对肠道菌群的动力学作用，深入阐明益生菌治疗IBS的机制，优化益生菌的临床应用。

**关键词(不超过5个，用分号分开):** 肠易激综合征 ; 益生菌 ; 微生物动力学 ; 宏基因组 ; 在体示踪

### Abstract(limited to 500 words):

The gut microbiota is both physiologically and pathologically important to intestinal homeostasis and the pathogenesis of irritable bowel syndrome (IBS), among other diseases. We previously found that D-IBS patients are associated with mucosal barrier defect, and that short-term active lactic acid bacteria treatment for D-IBS modulates the patients' aberrant mucosal barrier function, and reduces abdominal pain and flatulence, thus then reduces the global IBS scores. However, how they colonize in the intestines after administration and affect microbiota are still largely unknown. Further, how the microbiota modulates the IBS pathophysiology is also unknown. Here we will innovatively construct "tracing genes" to track in vivo the colonization and translocation of eGFP labelled probiotics using endomicroscope and laser scanning microscope (LSM), and thus will quantitatively analyze the probiotics in the context of microbiota via 16S rDNA and metagenome high throughput sequencing. We aim to establish the "microbiodynamics" in the gastrointestinal tract, and elucidate how microbiota modulates intestinal function. This proposal will demonstrate the probiotics' effect on microbiota and provide insights into mechanisms of treating IBS, which will streamline the clinical application of probiotics.

**Keywords(limited to 5 keywords, seperated by;):** Irritable Bowel Syndrome ; Probiotics ; microbiodynamics ; Metagenome ; In vivo tracking



## 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	电子邮件	项目分工	每年工作时间(月)
1	李延青	1962.09	男	教授	博士	山东大学	18678827666	liyanqing@sdu.edu.cn	项目负责人	10
2	薛冰	1974.1	女	副教授	博士	山东大学	0531-88382044	xuebing@sdu.edu.cn	肠神经电生理检测和肠动力、感觉功能检测	10
3	李长青	1978.6	男	主治医师	博士	山东大学	13066001841	lw56102@126.com	CLE、LSM体外定位示踪	10
4	季锐	1982.10	男	主治医师	博士	山东大学	13678808563	jiruihawk@yahoo.com.cn	病例收集与随访，肠黏膜生物屏障功能检测	10
5	李真	1984.10	女	医师	博士	山东大学	13573106261	lizhenh@hotmail.com	病例收集，CLE、LSM定位示踪	10
6	李铭	1987.03	男	博士生	硕士	山东大学	13655416356	1299792@126.com	动物造模、16S rDNA与宏基因组测序结果分析，论文撰写	10
7	杜超	1988.7	女	博士生	硕士	山东大学	18660120825	duchao0608@163.com	动物造模，肠黏膜生物屏障功能检测，论文撰写	10
8	戚庆庆	1986.4	男	博士生	硕士	山东大学	13869199754	qiqingqing@sina.com	动物造模，CLE与LSM定位示踪研究，论文撰写	10
9	赵宏宇	1989.1	女	技师	学士	山东大学	15169179015	xiayu6207@126.com	实验技师	10



总人数	高级	中级	初级	博士后	博士生	硕士生
9	2	2	2		3	0



## 经费预算表

(金额单位:万元)

预算编制说明:

1. 在填报本表之前, 请根据项目资助类别认真阅读相关的资助经费管理办法; 经费预算的编制以申请书中的《经费申请表》为基础, 以《国家自然科学基金项目资助批准通知书》中的资助金额为依据;
2. 编制经费预算时, 不考虑不可预见因素和前期投入;
3. 购置与试制仪器设备在5万元以上(包括5万元)时, 须在报告正文中逐项说明用途和必要性。

科目	预算经费	备注(计算依据与说明)
<b>一. 研究经费</b>	217.5000	
1. 科研业务费	162.0000	
(1) 测试/计算/分析费	147.0000	16SrDNA高通量测序, 数据分析等
(2) 能源/动力费	2.0000	实验室水、电排污费等
(3) 会议费/差旅费	8.0000	参加国内学术会议、学术交流
(4) 出版物/文献/信息传播事务费	5.0000	论文发表费、检索费、资料费
(5) 其他	0	
2. 实验室材料费	55.5000	
(1) 原材料/试剂/药品购置费	53.0000	载体构建、测序、转染, 益生菌菌株购买等
(2) 其他	2.5000	实验动物购买、饲养及耗材
3. 仪器设备费	0	
(1) 购置	0	
(2) 试制	0	
4. 实验室改装费	0	
5. 协作费	0	
<b>二. 国际合作与交流费</b>	29.0000	
1. 出境国际旅费	20.0000	参加国际学术会议
2. 境外合作人员来华生活费	9.0000	邀请外国专家来华学术交流
3. 来华举办学术会议费	0	
4. 其他	0	
<b>三. 劳务费</b>	29.0000	直接参加项目研究的研究生、博士后人员的劳务费用
<b>四. 管理费</b>	14.5000	不得超过预算经费的5%
<b>合 计</b>	290.0000	
与本项目相关的其他经费来源	国家其他计划资助经费	0
	其他经费资助(含部门匹配)	0
	其他经费来源合计	0



## 报告正文

(一)、研究的难点和在实施过程中可能碰到的问题，拟采用的研究方案和技术路线：

### 【研究目标】

1. 明确益生菌摄入后，在宿主肠道内定植情况与动态改变；以及在益生菌的作用下，肠道原有菌群发生的数量、分布和功能的动态改变。
2. 明确肠道菌群改变对肠道生物屏障和肠胶质细胞、肠神经功能的影响，纠正肠道功能异常的机制。

### 【研究内容】

#### 一、 益生菌的体内示踪标记

##### 1. 构建 AcGFP-示踪基因标记的单种益生菌：

本课题将在前期研究的基础上，建立动物模型并深入探究益生菌摄入后在肠道的定植和分布过程。为将摄入的益生菌与肠道固有菌群区分，本课题中动物实验部分使用的益生菌 *Lactobacillus bulgaricus* 将转导 AcGFP-(GTCA)<sub>120</sub> 示踪基因。该基因在 pAcGFP1 质粒的基础上，在 AcGFP 基因的下游 EcoRI 内切酶位点增加特殊的 GTCA 规则循环，并在其两侧加上引物结合区，使之与 16SrDNA V1~V2 区扩增引物（27F-338R）相结合。经此示踪基因标记的益生菌在 16SrDNA 测序过程中会得到独有的 GTCA 规则循环序列，其丰度代表摄入干预益生菌 *Lactobacillus bulgaricus* 的数量，以此定量示踪益生菌在体内的动态变化。同时该细菌表达 AcGFP，因此也可利用 CLE 和 LSM 定位示踪菌体在肠黏膜的位置分布。



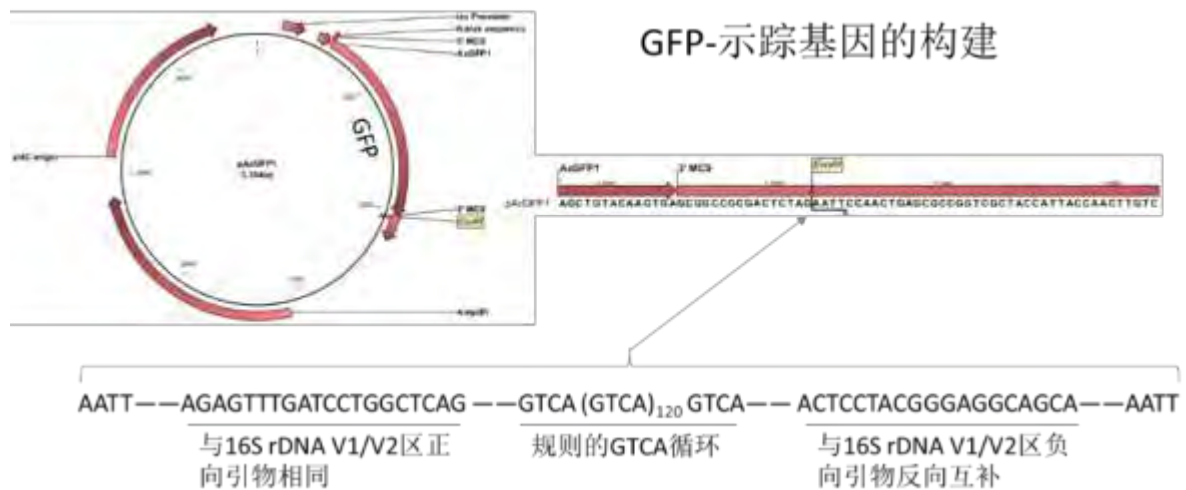
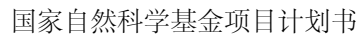


图 2.AcGFP-示踪基因构建及示踪原理。(注: AcGFP 是较 eGFP 稳定性更强,更适于长期示踪研究.)

## 2. 多种益生菌利用不同示踪基因分别标记:

为在体内示踪过程中区分不同益生菌，本课题已经构建不同序列的示踪基因来标记第二种益生菌，例如 AcGFP-(GGTTCCAA)<sub>60</sub> 示踪基因转导入 *Lactobacillus plantarum* 299V 菌株，以比较单一制剂与混合制剂对肠道微生态动力学的影响差异。经此标记益生菌在 16SrDNA 测序结果中得到 GGTTCCAA 规则重复序列并与 GTCA 重复序列相区分，两种序列的含量分别代表 *Lactobacillus plantarum* 299V 和 *Lactobacillus bulgaricus*，实现两种益生菌成分的同时定量示踪。同法在第三种菌的标记采用 AcGFP-(GGTCAA)<sub>80</sub> 基因标记(表 1)。利用 Roche 454 FLX+高通量测序系统、QIIME 软件和 SmashCommunity 软件一次性分析肠道菌群组成和每种基因标记的外来益生菌的各自含量，为菌群动力学研究提供了创新性的重要途径。

## 二、定位示踪荧光标记益生菌的动态分布

### 1. 模拟 IBS 的造模与示踪基因标记的单种益生菌治疗:

建立 TNBS 炎症后内脏高敏感模型和母婴分离应激模型模拟 IBS，益生菌治疗后的不同时间点进行 CLE 体内示踪实验和 LSM 体外示踪。

## 2. CLE 的体内定位示踪:

动物用 CLE 在体检测荧光标记益生菌的 AcGFP 荧光信号, 逐段分析荧光标记



的黏膜附着菌的数量与位置分布。

### 3. LSM 离体定位示踪益生菌:

同法造模并以益生菌治疗, 利用荧光免疫原位杂交 (fluorescent in situ hybridization, FISH) 技术, 分别检测(GTCA)<sub>120</sub>、(GACT)<sub>120</sub> 等示踪基因的位置, LSM 观察, 分析示踪基因标记的益生菌与肠上皮的位置关系, 以及不同益生菌单独作用或混合制剂作用后的消化道内纵向分布及黏膜内位置分布变化。

### 4. FISH 评价肠道生物屏障功能

已有文献表明 IBS 患者肠黏膜相关菌群中的非特异性细菌数量增加。FISH 法检测上述各组冰冻切片中黏膜相关总菌群、大肠埃希菌、球形梭菌、拟杆菌-普雷沃氏菌属数量, 评估肠道生物屏障功能。

## 三、 定量示踪基因标记益生菌的动态平衡

### 1. 动物实验:

#### 1) 益生菌定植初筛与 IBS 指标观察

同法造模、分组并治疗, 在不同时间点提取粪便总 DNA, 以示踪基因特异性引物 PCR 扩增, 初筛示踪基因标记益生菌是否定植。阳性结果确认益生菌定植后, 进行直肠扩张测压 (CRD)、腹部撤回反射 (AWR) 和活性炭传输实验、粪便含水量检测等 IBS 感觉、动力指标观测, 并收集各段肠腔粪便和肠黏膜样本, 评价益生菌的治疗效果。

#### 2) 微生态动力学研究:

提取粪便样本和黏膜表面菌群样本总 DNA, PCR 扩增 16SrDNA V1~V2 区产物进行测序分析, 基因扩增过程所选择的引物能够同上述构建载体中的引物结合区相结合, 以使示踪基因测序过程检中被测到。利用 QIIME 软件分析肠道菌群中各种门、属细菌的相对丰度和动态变化规律; 同时分析测序结果中示踪基因的相对丰度及其变化规律。探究摄入菌群与原有菌群的关系, 阐明特定益生菌摄入对微生态的动力学作用, 特定益生菌干预改变肠道微生态的程度。

#### 3) 宏基因组学研究肠道菌群功能动态变化:

选择上述测序结果中菌群构成有明显改变的关键时间节点, 提取样本中的总 DNA, 并宏基因组测序。利用 SmashCommunity 软件, 将测序结果比对 Microbial



reference genomes v2.0 数据库中 1511 种已有基因组完成图和草图的微生物的基因组，分析肠道菌群中的各类功能基因的分类丰度。结合 IBS 观测指标、示踪基因丰度和菌群组成，探究特定益生菌作用下的肠道菌群功能的动态变化，及其与肠道感觉、动力功能间的关系。

#### 4) 单一菌与混合制剂的比较研究：

为阐明多种益生菌同时摄入后对肠道微生态的复杂作用，本课题从研究两种益生菌共同作用下肠道菌群变化特征入手。同法造模，大鼠随机分为 5 组，正常对照组，模拟 IBS 组，AcGFP-(GTCA)<sub>120</sub> 标记的 *Lactobacillus bulgaricus* 治疗组，AcGFP-(GACT)<sub>120</sub> 标记的 *Bifidobacterium infantis* 35624 治疗组，以及两者等量混合制剂治疗组。上述时间点收集粪便样本。同法测序分析，比较单一菌种与混合菌种治疗后肠道菌群构成差异、外来标记菌转归的差异和 IBS 指标的改善程度，将依据研究结果适当选择多种益生菌的组合进一步研究。

## 2. 临床研究：

### 1) 病例收集、治疗与评估：

招募 D-IBS 患者，签署知情同意后行益生菌治疗。选择经动物实验筛选优化的相应益生菌治疗。人体研究部分采用已经上市的益生菌药品。记录 IBS 症状组分评分、排便次数和 Bristol 粪便性状评分、IBS 症状的受试者总体评价 (Subjects' Global Assessment, SGA)，利用 IBS-QOL 量表评估患者生活质量改善程度。

### 2) 微生态动力学与宏基因组学分析：

收集粪便样本，同前述方法进行 16S 与宏基因组测序和分析，分析益生菌摄入后的动态变化、肠道菌群动态变化、患者症状改善三者间的关系，比较单一益生菌与混合制剂的微生态动力学和治疗效果差异。

## 四、 益生菌调节肠道功能的机制研究

### 1. 体外实验

益生菌与 EGC 共培养：益生菌与 EGC 共培养，同时以肠侵袭性大肠杆菌与 EGC 共培养作为对照，以 Western blot、RT-PCR 检测肠胶质细胞 NF- $\kappa$ B、P 物质、一氧化氮合酶和 TNF- $\alpha$  的表达量；并获得共培养条件培养液。



肠神经系统（Enteric Nervous System, ENS）感觉神经元功能改变：分离大鼠结肠神经元，利用全细胞膜片钳技术依据电生理特性（有兴奋后超级化后电位）选择结肠内在初级感觉神经元（AH 神经元），给予共培养条件培养液刺激，膜片钳技术检测神经元兴奋性变化。

## 2. 体内试验

EGC 数目、形态和功能改变：同法模拟 IBS 造模，实验组给予  $10^9$  益生菌治疗，通过透射电镜和免疫组化染色检测肠黏膜胶质细胞数目、形态改变。免疫荧光法检测 EGC 胞体内兴奋性介质 P 物质、一氧化氮合酶和 TNF- $\alpha$  含量差异。

脊髓背根神经节(dorsal root ganglia, DRG)功能改变：同法模拟 IBS 造模，实验组给予  $10^9$  经筛选的菌株治疗，各组给予等量 CRD 刺激后，检测 DRG 自发放电、动作电位的产生和神经元钠电流，探究益生菌干预后的微生态改变对 DRG 的功能影响。

## 3. 肠内容物转流实验

空肠内容物转流：同法 SD 大鼠造模，给予益生菌治疗后麻醉大鼠，取空肠内容物。转流组 Swiss 无菌小鼠经口给予 0.1 mL 经益生菌治疗的大鼠空肠内容物，对照组小鼠给予安慰剂治疗大鼠空肠内容物。

EGC 数目、形态和功能改变：透射电镜和免疫组化染色检测上述两组肠黏膜胶质细胞数目、形态改变。免疫荧光法检测 EGC 胞体内兴奋性介质 P 物质、一氧化氮合酶和 TNF- $\alpha$  含量差异。

肠动力、感觉功能实验：对两组小鼠进行直肠扩张测压（CRD）、腹部撤回反射（AWR）和活性炭传输实验。分析益生菌作用下微生态改变对肠道感觉功能的影响。

根据上述实验结果，阐明益生菌引起的肠道微生态改变通过作用于肠胶质细胞调节肠道神经功能，继而纠正 IBS 患者肠道动力功能异常的机制。

## 【拟解决的关键问题】

1. 16S rDNA 高通量测序定量示踪基因标记的益生菌。



2. CLE 和 LSM 对示踪基因标记的益生菌定位示踪。

## 【研究方法】

### 第一部分：定位示踪荧光标记益生菌的动态分布

#### 1. 构建 AcGFP-示踪基因标记的单种益生菌

以 pAcGFP1 质粒为基础,在 AcGFP 基因的下游 EcoRI 内切酶位点增加 16S rDNA 引物结合区和特殊的规则基因片段,用于标记不同益生菌,如下表:

表 1 益生菌的示踪基因标记

菌株	荧光信号	上游正向引物结合区	规则重复标记基因	下游反向引物结合区
Lactobacillus bulgaricus	AcGFP	AGAGTTTGAT CCTGGCTCAG	(GTCA) <sub>120</sub>	ACTCCTACGG GAGGCAGCA
Bifidobacterium infantis 35624			(GACT) <sub>120</sub>	
Lactobacillus ramnosus GG			(GGTTCCAA) <sub>60</sub>	
Bifidobacterium lactisDN-173-010			(GGAACCTT) <sub>60</sub>	
Lactobacillus plantarum 299V			(GGTCAA) <sub>80</sub>	

#### 2. 模拟 IBS 造模与示踪基因标记益生菌的治疗:

建立 TNBS 炎症后内脏高敏感模型和母婴分离应激模型模拟 IBS, 随机分为治疗组和对照组, 治疗组以  $10^9$  个 AcGFP-(GTCA)<sub>120</sub> 标记的保加利亚乳酸杆菌 (Lactobacillus bulgaricus) 治疗, 在多个不同时间点进行实验。

#### 3. CLE 的体内定位示踪益生菌

大鼠麻醉后沿对系膜缘逐段切开大鼠结肠和小肠, CLE 体内检测 AcGFP 荧光信号, 观察体内荧光标记的黏膜附着菌的数量与分布。

#### 4. LSM 体外定位示踪益生菌

同法造模并以益生菌治疗, 利用荧光免疫原位杂交 (fluorescent in situ hybridization, FISH) 技术, 分别检测(GTCA)<sub>120</sub>、(GACT)<sub>120</sub> 等示踪基因的位置, LSM



观察，分析示踪基因标记的益生菌与肠上皮的位置关系，以及不同益生菌单独作用或混合制剂作用后的消化道内纵向分布及黏膜内位置分布变化。

## 5. FISH 评估肠道生物屏障功能

FISH 法检测上述各组冰冻切片中黏膜相关菌群中总菌群、大肠埃希菌、球形梭菌、拟杆菌-普雷沃氏菌属数量，评估肠道生物屏障功能。

## 第二部分：定量示踪基因标记益生菌的动态平衡

### 1. 动物实验：

#### 1) 模拟 IBS 的造模与示踪基因标记益生菌的治疗：

同法造模、分组并治疗，在不同时间点收集各段肠腔粪便和黏膜样本用于微生物生态动力学研究。

#### 2) 益生菌定植初筛与 IBS 指标观察

益生菌定植初筛：提取粪便总 DNA，以示踪基因特异性引物 PCR 扩增，初筛示踪基因标记益生菌是否定植。

感觉功能检测：直肠扩张测压（CRD）和腹部撤回反射（AWR）评分记录益生菌治疗组大鼠肠道感觉变化。

动力功能检测：包括（1）活性炭传输实验。（2）粪便含水量检测。

#### 3) 微生物生态动力学研究：

样品采集与处理：取得的粪便或黏膜样本提取总 DNA。DNA 定量后取 100ng DNA 并以 27F-338R 条码引物 PCR 扩增 20 循环，引物序列（非条码部分）27F，5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'；338R，5'-TGCTGCCTCCGTTAGGAGT-3'（注：引物即与 16S rDNA V1~V2 区结合，也与上述示踪基因中的引物结合区相结合）。电泳纯化扩增产物。

测序与分析：上述纯化的 DNA 扩增片段经定量后利用 Roche 454 FLX+ 系统高通量测序。以 QIIME 软件比对 16S rDNA 特异性的微生物数据库，以 Bayesian 分类法将测得的 16S rDNA 序列进行细菌名目分类，分析肠道菌群中各种门、属细菌的相对丰度和动态变化规律。同时分析测序结果中示踪基因（如 GTCA 重复片段）的相对丰度及其变化规律，代表摄入后益生菌的数量动态变化，探究肠道微生态环



境对益生菌的作用规律。计算 UniFrac 距离，并绘制 PcoA 主坐标分析散点图。通过以上分析探究摄入菌群与原有菌群的相互作用，阐明特定益生菌摄入在肠道微生态的变化规律，特定益生菌干预改变肠道微生态的程度。

#### 4) 宏基因组学研究肠道菌群功能动态变化：

选择上述测序结果中菌群构成有明显改变的关键时间节点，提取样本中的总 DNA，并宏基因组测序。利用 SmashCommunity 软件，将测序结果比对 Microbial reference genomes v2.0 数据库中 1511 种已有基因组完成图和草图的微生物的基因组，分析肠道菌群中的各类功能基因的分类丰度。结合 IBS 观测指标、示踪基因丰度和菌群组成，探究特定益生菌作用下的肠道菌群功能的动态变化，及其与肠道感觉、动力功能间的关系。

#### 5) 单一菌与混合制剂的比较研究：

同法造模，大鼠随机分为 5 组，正常对照组，模拟 IBS 组，AcGFP-(GTCA)<sub>120</sub> 标记的 *Lactobacillus bulgaricus* 治疗组，AcGFP-(GACT)<sub>120</sub> 标记的 *Bifidobacterium infantis* 35624 治疗组，以及两者等量混合制剂治疗组。上述时间点收集粪便样本。同法 16SrDNA 测序分析，比较单一菌种与混合菌种治疗后微生态改变是否存在差异，2 种益生菌的转归是否同各自单独应用时相同，以及 IBS 指标的改善程度。若混合制剂同单一菌株的作用存在差异，将依据研究结果适当选择多种益生菌的组合进一步研究。

## 2. 临床研究：

### 1) 病例收集、治疗与评估：

招募 D-IBS 患者，签署知情同意后行益生菌治疗。人体研究部分采用已经上市的益生菌药品。记录 IBS 症状组分评分、排便次数和 Bristol 粪便性状评分、IBS 症状的受试者总体评价 (Subjects' Global Assessment, SGA)，利用 IBS-QOL 量表评估患者生活质量改善程度。

### 2) 微生态动力学与宏基因组学分析：

收集粪便样本，同前述方法进行 16S 与宏基因组测序和分析，分析益生菌摄入后的动态变化、肠道菌群动态变化、患者症状改善三者间的关系，比较单一益生菌与混合制剂的微生态动力学和治疗效果差异。



### 第三部分：益生菌调节肠道功能的机制研究

#### 1. 体外实验：

##### 1) 菌株与肠胶质细胞共培养：

益生菌菌株与肠胶质细胞共培养，同时以肠侵袭性大肠杆菌与 EGC 共培养作为对照，并设立 EGC 单独培养的空白对照。细菌与肠胶质细胞的比例为 1:10，共培养时间为 6h 和 24h，并检测共培养前后培养液 pH 值。以 Western blot、RT-PCR 检测肠胶质细胞 NF- $\kappa$ B、P 物质、一氧化氮合酶和 TNF- $\alpha$  的表达量；并获得共培养条件培养液。

##### 2) ENS 感觉神经元功能改变：

肠神经系统（Enteric Nervous System，ENS）感觉神经元功能改变：分离大鼠结肠神经元，利用全细胞膜片钳技术依据电生理特性（有兴奋后超级化后电位）选择结肠内在初级感觉神经元（AH 神经元），给予共培养条件培养液刺激，膜片钳技术检测神经元兴奋性变化。

#### 2. 体内试验：

##### 1) EGC 数目、形态和功能改变：

同法模拟 IBS 造模，实验组给予 10<sup>9</sup> 益生菌治疗，通过透射电镜和免疫组化染色检测肠黏膜胶质细胞数目、形态改变。免疫荧光法检测 EGC 胞体内兴奋性介质 P 物质、一氧化氮合酶和 TNF- $\alpha$  含量差异。

##### 2) 脊髓背根神经节(dorsal root ganglia, DRG)功能改变：

同法模拟 IBS 造模，实验组给予 10<sup>9</sup> 经筛选的菌株治疗，各组给予等量 CRD 刺激后，检测 DRG 自发放电、动作电位的产生和神经元钠电流，探究益生菌干预后的微生态改变对 DRG 的功能影响。

#### 3. 肠内容物转流实验

空肠内容物转流：同法 SD 大鼠造模，给予益生菌治疗后麻醉大鼠，取空肠内容物。转流组 Swiss 无菌小鼠经口给予 0.1 mL 经益生菌治疗的大鼠空肠内容物，对照组小鼠给予安慰剂治疗大鼠空肠内容物。





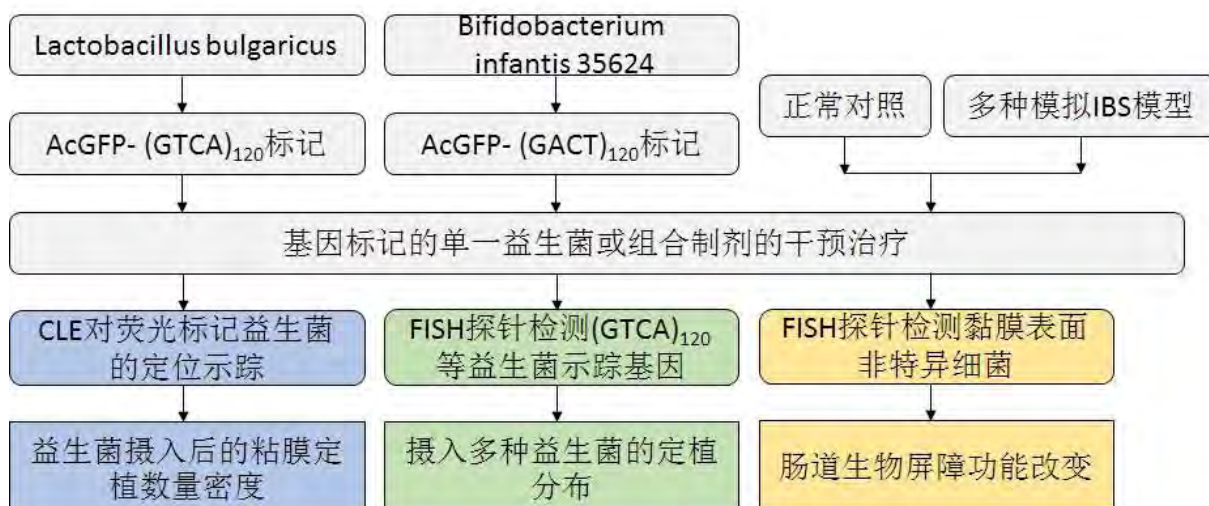
EGC 数目、形态和功能改变：透射电镜和免疫组化染色检测上述两组肠黏膜胶质细胞数目、形态改变。免疫荧光法检测 EGC 胞体内兴奋性介质 P 物质、一氧化氮合酶和 TNF- $\alpha$  含量差异。

肠动力、感觉功能实验：对两组小鼠进行直肠扩张测压（CRD）、腹部撤回反射（AWR）和活性炭传输实验。分析益生菌作用下微生态改变对肠道感觉功能的影响。

根据上述实验结果，阐明益生菌引起的肠道微生态改变通过作用于肠胶质细胞调节肠道神经功能，继而纠正 IBS 患者肠道动力功能异常的机制。

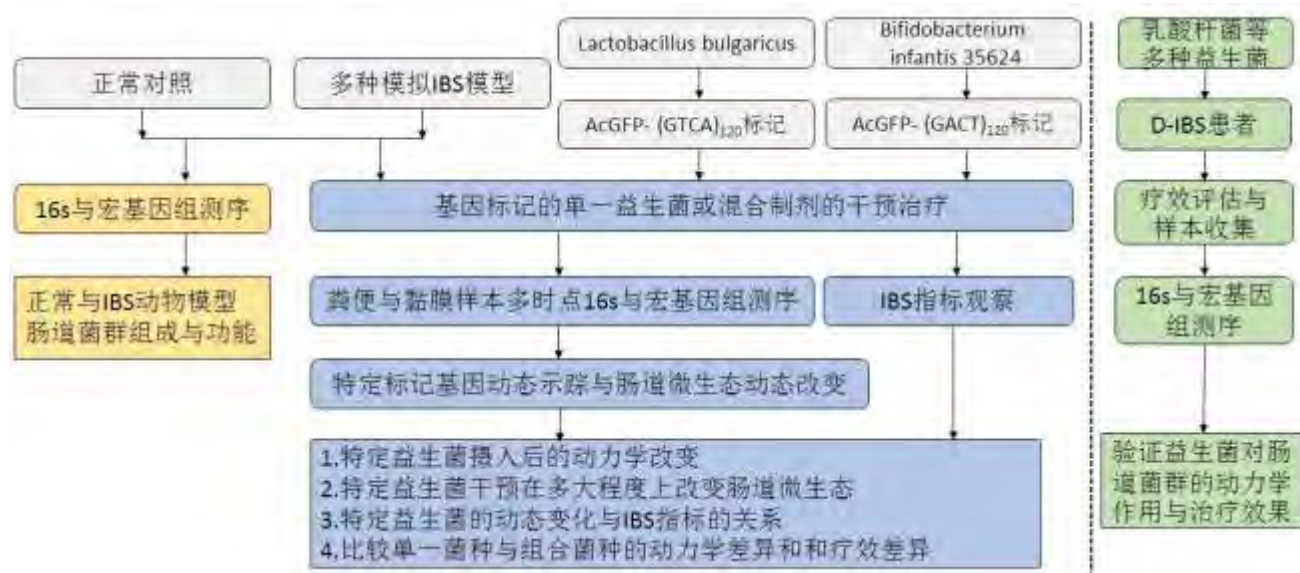
### 【技术路线】

#### 第一部分：定位示踪荧光标记益生菌的动态分布

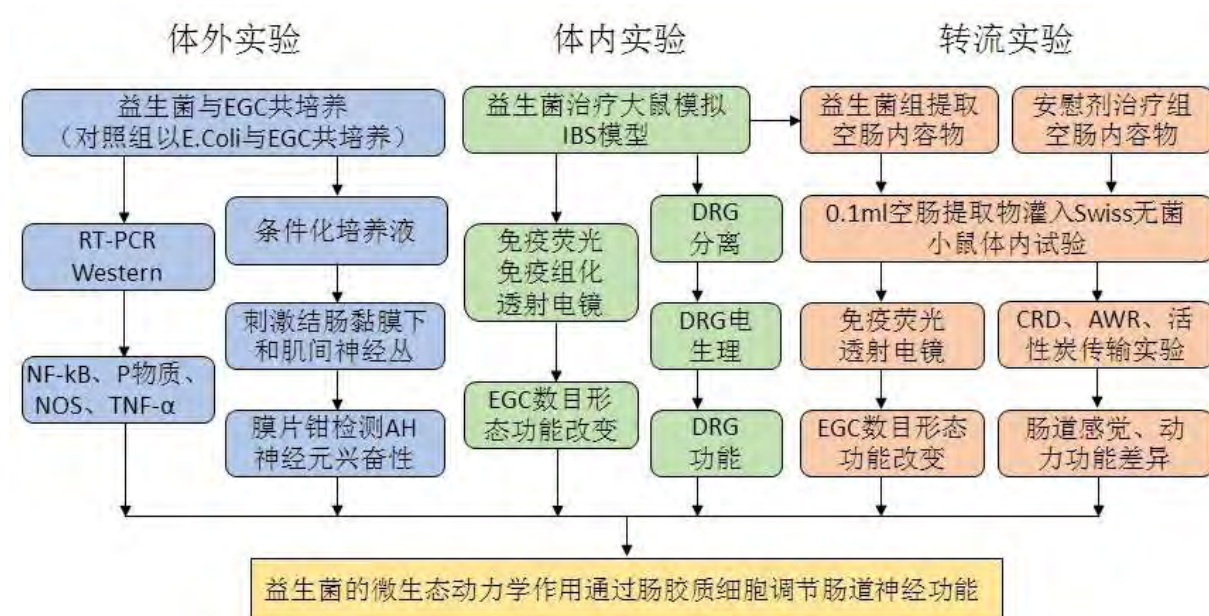




## 第二部分：定量示踪基因标记益生菌的动态平衡



## 第三部分：益生菌调节肠道功能的机制研究



【研究的难点和在实施过程中可能碰到的问题】



## 研究难点 1. CLE 在体检测 AcGFP 标记的益生菌荧光信号

### 难点成因：

前期工作中发现 CLE 在体检测 AcGFP 标记的益生菌可能受以下因素的干扰：正常结肠粘膜具有一定自发荧光；肠粘膜附着有自发荧光阳性的杂质；AcGFP 在厌氧菌中荧光强度较弱。因此 CLE 在体检测 AcGFP 标记的益生菌荧光信号可能存在信噪比低、对比度不理想的问题。

### 解决方案：

本研究备有以下两种益生菌标记和在体示踪的替代方案：

#### 1.CLE 在体检测荧光素钠标记益生菌

$10^9$  保加利亚乳酸杆菌离心后重悬于 10ml PBS 溶液，加入 3ml 浓度 10% 的荧光素钠溶液并混匀。 $37^{\circ}\text{C}$  孵育 5min 后弃去上清液并重悬于 1ml 生理盐水，大鼠灌胃后同法 CLE 在体检测益生菌的荧光信号。荧光素钠标记细菌后 CLE 在体观察信噪比高，对比度好，文献中多次报道，具有良好的可重复性。

#### 2.CLE 在体检测 CFSE 标记益生菌

$10^9$  保加利亚乳酸杆菌离心后重悬于 5uM CFSE 染色 15min，重悬于肉汤培养基并孵育 30min 使 CFSE 水解。大鼠灌胃后同法 CLE 在体检测益生菌的荧光信号。CFSE 用于定位示踪特异性好，文献中多次报道，具有良好的可重复性。

## 研究难点 2. 示踪基因在益生菌菌体内的稳定性

### 难点成因：

有文献报道，在无抗生素选择压力的情况下，外源性质粒转然后 pKPSPgfp 质粒在 *E. coli* 中以每代 0.13 的概率丢失，而同一质粒在乳酸杆菌中每代丢失的概率  $<0.005$ 。因此原有的示踪基因标记方法可能无法区分是益生菌的质粒丢失还是益生菌的数量减少。

### 解决方案：

在具体研究中采用同源重组的方法将示踪基因定点整合至细菌染色体中。以示踪基因向保加利亚乳酸杆菌染色体整合为例说明。示踪基因选取加利亚乳酸杆菌（ATCC 标准株，11842），向其基因组 214580bp-215260bp 的无基因区域定点整合示踪基因。对这一区域序列设计两对同源臂分别命名为 TF1、TF2。以温度敏感型载体 pKSV7（含有氯霉素等耐药基因）为基础，构建同源重组载体。合成同源重组



目的片段，结构为 TF1-示踪基因-TF2，并克隆入 pKSV7 载体 SphI 和 SmaI 限制性内切酶位点之间。将上述同源重组质粒电转保加利亚乳酸杆菌，挑取转化子进行 PCR 鉴定，获得阳性转化子。挑取阳性转化子接种入氯霉素终浓度为 5 $\mu$ g/mL 的 LB 液体培养基中，30 $^{\circ}$ C 培养 24 h。按 1% 比例转接入新鲜 LB 液体培养基中，42 $^{\circ}$ C 培养 12 h，涂无抗性平板，挑单菌落进行氯霉素(5 $\mu$ g/mL) 抗性测定。对无氯霉素抗性的转化子进行 PCR 鉴定，筛选染色体上整合了示踪基因的重组保加利亚乳酸杆菌。

染色体中整合示踪基因避免了在传代过程中由于益生菌质粒丢失等原因造成的偏倚。同时示踪基因整合在益生菌的无基因区段，不影响益生菌的生物学特性。同前述方法进行 16s 定量示踪试验，探究益生菌摄入后的动态变化和肠道菌群的变化。

### 研究难点 3. 菌群代谢物调节肠道神经功能的机制

#### 难点成因：

益生菌摄入后不仅通过自身定植影响肠道原有菌群的数量、形态和功能，其代谢产物如短链脂肪酸等也对肠道功能产生广泛影响。

#### 解决方案：

拟补充研究内容：群代谢物丁酸盐通过 AP-1、BDNF 通路对话调节肠胶质细胞功能

#### 1. 体外实验：

- a) 培养 *Lactobacillus bulgaricus*、*Lactobacillus plantarum* 299V、*Bifidobacterium infantis* 35624、*E. Coli* 培养，取上清液成分，检测短链脂肪酸含量。以细菌上清液、丁酸盐分别刺激肠胶质细胞，检测 EGC，RT-PCR、Western Blot 检测 AP-1 信号通路活化情况，并检测肠胶质细胞 c-fos 表达、ERK1/2 信号通路。
- b) 丁酸盐和 BDNF 分别刺激、共同刺 EGC，检测 AP-1、Trk-B 通路的活化、EGC 胞体内兴奋性介质 P 物质、一氧化氮合酶和 TNF- $\alpha$  含量差异，分析二者是否存在协同或拮抗。
- c) 构建慢病毒载体的 shRNA，分别干扰 EGC 细胞 AP-1 成员 FOS、FOSB 和 JUN，以丁酸盐刺激 EGC，RT-PCR、Western Blot 检测 EGC 胞体内兴奋性介质 P



物质、一氧化氮合酶和 TNF- $\alpha$  的表达量, 探讨丁酸盐-AP-1 信号通路在介导肠道菌群代谢产物调节肠胶质细胞的机制。

## 2. 体内试验

- a) 同法模拟 IBS 造模, 实验组给予  $10^9$  益生菌治疗, 检测益生菌干预后粪便丁酸盐含量差异。
- b) 取材行肠粘膜免疫组化, 检测 GFAP 表达量, 反应肠胶质细胞数量功能改变。免疫荧光检测 EGC 胞体内兴奋性介质 P 物质、一氧化氮合酶和 TNF- $\alpha$  含量差异。
- c) 构建肠胶质细胞条件性 FOS、FOSB 或 JUN 基因敲除小鼠, 同法模拟 IBS 造模, 治疗组给予益生菌治疗, 检测在 AP-1 成员敲除的情况下 EGC 在 IBS 模型和益生菌治疗模型中的活化水平。探讨 AP-1 信号通路在介导益生菌对肠道神经功能调节中的机制。
- d) 分离小鼠结肠神经元, 利用全细胞膜片钳技术依据电生理特性选择结肠内在初级感觉神经元 (AH 神经元), 给予共培养条件培养液刺激, 膜片钳技术检测神经元兴奋性变化。

## (二)、年度研究计划及预期研究成果

### 【年度研究计划】

第一年 (2014.1-2014.12):

构建 AcGFP-基因标记载体, 并稳定转导入特定益生菌。模拟 IBS 造模, 利用上述 AcGFP-示踪基因的标记益生菌治疗, CLE 体内定位示踪, LSM 体外定位示踪益生菌的定植与分布。或采用前述替代方案进行益生菌标记、定位示踪。同年申报示踪基因发明专利。

第二年 (2015.1-2015.12):

模拟 IBS 造模, 利用上述示踪基因标记益生菌的治疗, 同时进行肠道感觉与动力功能检测, 提取粪便样本和黏膜表面菌群样本行 16SrDNA 测序及宏基因组高通量测序, 分析肠道菌群中各种门、属细菌的相对丰度和动态变化规律。同时分析测序结果中示踪基因的相对丰度及其变化规律。探究摄入的益生菌与原有菌群的相互作用关系, 阐明特定益生菌摄入对肠道微生态的动力学作用。派出 2-3 人参加



国际性学术会议，交流学术成果。

**第三年（2016.1-2016.12）：**

同法造模，给予不同基因标记的单一益生菌菌株和混合制剂治疗，LSM 下利用 FISH 定位示踪益生菌的动态变化，并评估肠道生物屏障功能。进行肠道感觉、动力功能检测，提取粪便样本和黏膜表面菌群样本行 16SrDNA 测序及宏基因组高通量测序，分析比较单一菌株和混合制剂对肠道微生态及肠道功能的影响。举办一次高层学术会议，交流研究成果。

**第四年（2017.1-2017.12）：**

选择符合罗马 III 标准的 D-IBS 患者，行益生菌治疗，进行肠道感觉与动力功能评估，同前述方法进行行 16S rDNA 与宏基因组测序和分析，分析特定益生菌作用下的微生态动态变化，肠道感觉、动力功能的关系。

**第五年（2018.1-2018.12）：**

根据前述结果筛选出与肠道感觉、动力功能密切相关的菌株，单独培养或与肠胶质细胞共培养获得条件化培养液，Western blot、RT-PCR 检测肠胶质细胞 NF- $\kappa$ B、P 物质、一氧化氮合酶和 TNF- $\alpha$  的表达量，体外刺激 AH 神经元，检测 ENS 感觉神经元功能改变。体内试验检测 EGC 数目、形态和功能改变以及 DRG 功能改变。肠内容物转流实验检测空肠内容物转流后 swiss 小鼠 EGC 数目、形态、功能改变，以及肠动力、感觉功能改变。撰写论文，成果鉴定。

**【预期研究成果】**

- 1) 通过 CLE、LSM 和 16S rDNA 测序技术体内示踪，明确益生菌摄入后的肠道菌群动态改变。
- 2) 明确单一益生菌与混合制剂在 IBS 治疗中的微生态动力学差异。
- 3) 阐明益生菌引起的肠道菌群改变通过调节肠道黏膜生物屏障和神经功能，纠正 IBS 患者异常肠道功能的机制。
- 4) 发表 SCI 论文 4-6 篇，取得专利 1 项，并举办国际性学术交流活动 1 次，交流研究成果。
- 5) 培养博士研究生 3 人。



### （三）项目组主要成员分工

本课题组主要成员分工如下：

项目组成员	分工
李延青	项目研究主管，研究方向指导
薛冰	肠神经电生理检测和肠动力、感觉功能检测
李长青	CLE、LSM 体外定位示踪
季锐	病例收集与随访，肠黏膜生物屏障功能检测
李真	病例收集，CLE、LSM 定位示踪
李铭	动物造模、16SrDNA 与宏基因组测序结果分析，论文撰写
杜超	动物造模，肠黏膜生物屏障功能检测，论文撰写
戚庆庆	动物造模，CLE 与 LSM 定位示踪研究，论文撰写
赵宏宇	实验技术指导

### （四）经费预算

研究经费预算（共计 290 万）：

#### 1.科研业务费（162 万）：

##### ①测试、计算、分析费（147 万）：

本项目需要进行大量 16SrDNA 高通量测序、宏基因组测序、数据分析、LSM 检测，包括：16SrDNA 高通量测序，宏基因组测序，微生物多样性分析，宏基因组学数据高级分析，LSM、电镜检测费，电生理检测和各项检测后的统计分析、计算机处理所需的费用。预算如下：

- a.16SrDNA 高通量测序：10 万/100 样本/批×10 批=100 万
- b. 宏基因组测序：18 万/10 样本/批×2 批=36 万
- c.微生物多样性分析：0.3 万/批×10 批=3 万
- d. 宏基因组学数据高级分析：2 万/批×2 批=4 万
- e. LSM、电镜检测费：200 元/小时×50 小时=1 万



g. 电生理检测: 100 元/小时×100 小时=1 万

f. 统计分析、计算机处理所需的费用: 2 万

## ②能源动力费 (2 万):

本项目所需要在以下实验研究室, 即山东大学心血管重构与功能研究实验室、山东大学齐鲁医院胃肠疾病转化医学实验室、山东大学齐鲁医院中心实验室和山东大学分子生物学实验室进行较多大型科研设备的使用, 因此需要一定的实验室水电费用。

## ③会议差旅费 (8 万):

本项目实施期间预期有较多科研成果, 并参与国内会议论文交流, 因此需要一定的会议差旅费用。

## ④出版物、文献、信息传播费 (5 万):

本项目预期有较多国际和国内学术论文发表, 因此需一定的论文发表费 (版面费)、检索费、资料费等费用。

## 2. 实验材料费 (55.5 万):

本项目实验设计周密, 包临床、动物、细胞三大阶段的实验路线, 因此需要较多的实验试剂和相关耗材, 具体如下:

### ①原材料、试剂、药品购置费 (53 万):

载体构建、测序、转染, 益生菌菌株购买, 各种试剂盒、FISH 探针、LSM 与电镜试剂、引物等。具体如下:

a. 合成、构建 AcGFP-基因标记载体并全长测序: 1 万×5=5 万

b. 益生菌菌株购买、载体转染及克隆筛选: 1 万×5=5 万

c. FISH 探针合成 0.6 万×10=6 万 (注: 9 个探针+1 个对照)

d. PCR 试剂、引物等: 4 万

e. 菌群 DNA 相关试剂盒 PSP Spin Stool DNA Plus Kit、QIAquick GelExtraction Kit、QuantiT PicoGreen kit: 4 万

f. LSM 与电生理检测试剂等其它耗材: 5 万

g. 细菌和细胞培养耗材(包括胎牛血清等): 5 万

h. 免疫组化与免疫荧光试剂: GFAP、TNF- $\alpha$ 、P 物质、NOS 等相关单克隆抗体, 荧光标记二抗、组化试剂盒等共 12 万。

i. RT-PCR 试剂: 反转录试剂盒、PCR 试剂盒、引物: 4 万

j. 透射电镜用试剂: 戊二醛、丙酮、醋酸双铀、柠檬酸铅、钨酸等约 3 万。

### ②实验动物购买、饲养及耗材费(2.5 万):





本项目需要购买数目较多实验动物，包括 swiss 无菌小鼠，动物饲养等均需花费一定费用。

- a. swiss 无菌小鼠：150 元×60 只=0.9 万
- b. SD 大鼠：40 元×50 只=0.2 万
- c. 灭菌标准维持饲料：80 元/箱×100 箱=0.8 万
- d. 普通饲料、垫料及其它耗材：0.6 万

### **3.国际合作与交流费(29 万)**

#### **①出境国际旅费（20 万）：**

本项目预期有较多科研成果，参加国际学术会议进行交流，因此需要一定费用。

#### **②境外合作人员来华生活费（9 万）：**

本研究团队与国外多家研究机构保持友好合作关系，经常邀请外籍专家到本研究团队所在地进行学术交流，因此需要一定费用。

#### **1. 劳务费（29 万）：**

本项目有 3 位研究生直接参与，因此需要一定的劳务费用。

#### **2. 管理费（14.5 万）：**

项目依托单位为组织和支持本资助项目研究而支出的费用。



## 国家自然科学基金资助项目签批审核表

	<p>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：81330012），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。</p> <p>项目负责人（签章）： 年 月 日</p>	<p>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。</p> <p>依托单位（公章） 年 月 日</p>					
本栏目由基金委填写	<p>科学处审查意见：</p>						
	<p>建议年度拨款计划（本栏目为自动生成，单位：万元）：</p>						
	年度	总额	第一年	第二年	第三年	第四年	第五年
	金额						
	<p>科学部审查意见：</p> <p>负责人（签章）： 年 月 日</p>						
本栏目主要用于重大项目等	<p>相关局室审核意见：</p> <p>负责人（签章）： 年 月 日</p>						
	<p>委领导审批意见：</p> <p>委领导（签章）： 年 月 日</p>						



项目批准号	81170352
归口管理部门	
申请代码	H0307
收件日期	

## 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：

项目名称：BDNF 在功能性便秘肠神经及平滑肌重构中作用的研究

资助经费：60.00 万元 执行年限：2012.01-2015.12

负责人：左秀丽

通讯地址：山东省济南市文化西路 107 号

邮政编码：250012 电话：0531-82169508

电子邮件：xiulizuo@gmail.com

依托单位：山东大学

联系人：张玉生 电话：(0531)88369277

填表日期：2011年8月31日

国家自然科学基金委员会



## 国家自然科学基金委员会资助项目计划书填报说明

- 一、收到《国家自然科学基金委员会资助项目批准通知》（以下简称《批准通知》）后，请认真阅读本填报说明和自然科学基金相关项目及财务管理办法（查阅 [Http://www.nsf.gov.cn/](http://www.nsf.gov.cn/)），按《批准通知》的要求认真填写《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》经主管科学部审核批准后，将作为项目研究计划执行和检查、验收的依据。
- 三、《计划书》为个性化表格，简表部分自动生成，不同类别的项目按不同要求撰写。请按以下提纲撰写《计划书》：
  - 1、各类获资助项目都必须撰写中、英文摘要及主题词，填报经费预算表。
  - 2、对于基金面上项目，项目组成员和研究内容按申请书执行，一般不得修改。如果《批准通知》中明确要求调整研究内容，须在《计划书》报告正文中对修改的内容作详细说明。没有要求修改的内容时，只需在报告正文中填写“研究内容和研究目标按照申请书执行”即可。
  - 3、重点、重大项目的项目组成员和研究内容根据批准项目的实际情况填报，不能自行降低、更改研究目标，或缩减关键的研究内容。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碰到的问题，拟采用的研究方案和技术路线；
    - （2）项目组主要成员分工，并请说明课题及合作单位之间的关系与分工；
  - 4、国家杰出青年科学基金和海外青年学者合作研究基金的计划书正文按下列提纲撰写：
    - 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) 分年度进度安排
    - 5) 研究队伍的组成情况



## 简表

申请者信息	姓 名	左秀丽	性 别	女	出生年月	1968 年 6 月	民 族	汉族
	学 位	博士			职 称	副教授		
	电 话	0531-82169508		电子邮件	xiulizuo@gmail.com			
	传 真			个 人 网 页				
	工 作 单 位	山东大学						
	所 在 院 系 所	齐鲁医院						
依托单位信息	名 称	山东大学					代 码	25010001
	联 系 人	张玉生		电子邮件	kjcjj@sdu.edu.cn			
	电 话	(0531)88369277		网站地址				
合作单位信息	单 位 名 称						代 码	
项目基本信息	项 目 名 称	BDNF 在功能性便秘肠神经及平滑肌重构中作用的研究						
	资 助 类 别	面上项目			亚 类 说 明			
	附 注 说 明							
	申 请 代 码	H0307:消化道动力异常及功能性胃肠病						
	基 地 类 别							
	执 行 年 限	2012.01-2015.12			研究属性	应用基础研究		
	资助经费	60.00 万元						



## 项目摘要

中文摘要(500 字以内):

脑源性神经营养因子 (BDNF) 是重要的神经生长因子, 在肠神经系统形成、发育及功能维持中发挥重要作用, 新近发现 BDNF 可促进肠动力, 增加功能性便秘 (FC) 患者的排便次数。本研究旨在从 BDNF 在 FC 肠神经及平滑肌重构中作用的层面探讨其促动力机制: ①检测 FC 患者肠道动力的改变, 肠粘膜 BDNF 及神经递质水平的变化, 印证 BDNF 与 FC 肠道动力的关系; ②建立功能性便秘动物模型, 结合 BDNF 基因敲除小鼠, 检测肠神经及平滑肌形态及功能的改变, 检测 BDNF-PLC- $\gamma$ /DAG-IP3 信号通路和肠神经-平滑肌重构的关系; ③体外共培养小鼠结肠平滑肌细胞和肌间神经元, 应用 BDNF 及 TrkB、PLC、IP3 抗体进行干预, 结合膜片钳技术研究神经元、神经肌肉接头及平滑肌细胞形态与功能变化, 探讨 BDNF 在肠神经-平滑肌重构及肠动力中的潜在作用机制。本研究对阐明 FC 的发生机理, 寻找 FC 治疗的新靶点, 具有重要意义。

关键词(不超过 5 个, 用分号分开): 脑源性神经营养因子; 功能性便秘; 肠神经系统; 肠平滑肌; 重构

Abstract(limited to 500 words):

Brain-derived neurotrophic factor (BDNF), a member of the neurotrophin family, may play a critical role in enteric nervous system (ENS). Recent studies have indicated that BDNF promote the gut motility and improve the defecation in functional constipation (FC) patients. This study aims to investigate the mechanism of its prokinetic effect from the level of gut nerve and smooth muscle reconstruction: (i) To confirm the prokinetic effect of BDNF on FC patients via detection the gut motility, mucosal BDNF and neurotransmitters. (ii) To establish FC animal model/BDNF knock-out mice and study the relation between BDNF-PLC- $\gamma$ /DAG-IP3 signal pathway and gut innervation/smooth muscle reconstruction. (iii) To co-culture gut smooth muscle cells and myenteric neurons and treat them with BDNF, TrkB/PLC/IP3 antibodies, then explore the mechanism of BDNF on ENS/smooth muscle reconstruction and dismotility. The present study is of significant importance for the etiology and new treatment strategy in FC patients.

Keywords(limited to 5 keywords, separated by;): Brain-derived neurotrophic factor; functional constipation; enteric nervous system; smooth muscle; reconstruction



## 经费预算表

(金额单位: 万元)

## 预算编制说明:

1. 在填报本表之前, 请根据项目资助类别认真阅读相关的资助经费管理办法; 经费预算的编制以申请书中的《经费申请表》为基础, 以《国家自然科学基金项目资助批准通知书》中的资助金额为依据;
2. 编制经费预算时, 不考虑不可预见因素和前期投入;  
购置与试制仪器设备在 5 万元以上 (包括 5 万元) 时, 须在报告正文中逐项说明用途和必要性。

科 目	预算经费	备 注 (计算依据与说明)
<b>一. 研究经费</b>	42. 0000	
1. 科研业务费	10. 0000	
(1) 测试/计算/分析费	1. 0000	电生理检测, 统计分析等
(2) 能源/动力费	2. 0000	水电、动力等费用
(3) 会议费/差旅费	5. 0000	项目组成员参加学术会议、课题交流等
(4) 出版物/文献/信息传播事务费	2. 0000	检索, 资料, 论文发表, 信息交流等
(5) 其它		
2. 实验材料费	29. 0000	
(1) 原材料/试剂/药品购置费	23. 0000	各种相关试剂, 材料, 干预药物等
(2) 其它	6. 0000	实验动物购买及饲养, 耗材等
3. 仪器设备费	3. 0000	小型试验设备, 计算机配件等
4. 实验室改装费		
5. 协作费		
<b>二. 国际合作与交流费</b>	6. 0000	
1. 项目组成员出国合作交流	4. 0000	出国参加国际学术会议及交流
2. 境外专家来华合作交流	2. 0000	邀请境外专家来院交流指导
<b>三. 劳务费</b>	9. 0000	直接参加项目研究的研究生劳务费
<b>四. 管理费</b>	3. 0000	单位为组织和支持项目研究而支出的费用
<b>合 计</b>	60. 0000	
与本项目相关的其他经费来源	国家其他计划资助经费	
	其他经费资助 (含部门匹配)	
	<b>其他经费来源合计</b>	0. 0000



## 报告正文

研究内容和研究目标按照申请书执行。





## 国家自然科学基金资助项目签批审核表

<p>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：81170352），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。</p> <p>项目负责人（签章）： 年 月 日</p>		<p>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。</p> <p>依托单位（公章） 年 月 日</p>					
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						
本栏目主要用于重大项目等	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						
本栏目主要用于重大项目等	委领导审批意见：						
	委领导（签章）： 年 月 日						