类别： 青年

上海市卫生和计划生育委员会
科研课题计划任务书

（2014 版）

20144Y0073

课题名称 基于肝脏特性白喉毒素受体表达-细胞剔除系统的人源化肝脏小鼠模型研究

起止日期 2015-01-01 — 2017-12-31

工作单位 上海市公共卫生临床中心

通讯地址 上海市金山区沪卫公路 2901 号

联系电话 021-37990333-5 邮政编码 201508234

课题负责人 任晓楠

手 机 18121150293 电子邮箱 renxiaonan66@126.com

填表日期： 2014-6-13

填表说明

20144170073

一、本课题申请书系上海市卫生和计划生育委员会为所组织的科研课题研究而设计。

二、本课题申请书编写请使用A4普通纸张打印填报，各栏空格不够时，请自行加页。左侧装订成册（不要采用胶圈、文件夹等带有突出棱边的装订方式）。

三、本课题申请书各项内容要实事求是，逐条认真填写，外来语同时用原文和中文表达。

四、研究起始年月日统一规定为申请年度的次年1月1日。

五、所属学科及代码要求尽可能填写到三级学科，在没有三级学科情况下填写二级学科。

六、单位名称填写必须与所盖公章一致，否则无效。

七、本课题申请书一式二份。

一、简表

课题负责人	姓名	任晓楠	性别	女	出生日期	1986-11-08		
	学历	硕士	学位	硕士研究生	职称	研究实习员	职务	
	工作单位	上海市公共卫生临床中心			部门	实验动物部		
	从事专业	实验动物学						
研究课题	课题名称	基于肝特异性白喉毒素受体表达-细胞剔除系统的人源化肝脏小鼠模型的建立						
	类别：□基础研究 □应用研究 □开发研究 □其它（） 应用研究							
	所属学科	医学实验动物学		代码	310.51			
	相关学科1			代码				
	相关学科2			代码				
	相关学科3			代码				
	申请金额（万元）	2						
	研究内容和预期成果摘要（限400字）							

肝脏移植手术对于解决肝脏系统疾病和肝脏代谢紊乱等是一种重要的手段，但是肝脏移植手术仍然面临很多尚未解决的问题，需要更多的相关研究提高移植后肝脏细胞的再生和增殖问题。肝脏损伤动物模型是研究肝细胞移植和再生重要的关键技术平台。然而，缺乏合适的小动物模型很大程度上限制了肝移植技术优化相关的临床前研究。本项目拟通过白喉毒素诱导 Alb-cre/DTR/SICD beige 小鼠从而开发出可诱导型肝损伤的小鼠模型，并在此基础上通过移植人肝细胞，从而建立人源肝嵌合小鼠模型。该项目的实施将丰富上海市乃至全国实验动物的资源，并为拓宽实验动物育种学的方法提供新思路。所开发的模型不仅为肝移植研究提供了一种可行的动物模型，同时还可支撑重大传染性肝病的研究，为脂肪肝、肝硬化、肝癌等肝脏疾病的研究提供人源化研究平台。

2014Y0073

二、立题依据

三、课题研究的总目标和特色、创新点，主要研究内容及所需要解决的技术难点

四、课题完成形式和考核指标

五、课题年度计划及年度目标

六、工作条件和环境保障

七、课题完成后的预期社会效益、经济效益

以上二到七点详细内容见申请书。

20144Y0073

八、单位伦理委员会意见

研究课题若涉及伦理问题，需经所在单位伦理委员会审批。（请插入伦理委员会批准件，格式为 jpg）

2014Y0073

上海市公共卫生临床中心申报科研项目伦理批件

申报项目类别	上海市卫生局科研课题
题　目	基于肝特异性白喉毒素受体表达-细胞清除系统的人源化肝癌小鼠模型研发
负责人	任晓辉

伦理委员会意见：

同意！

伦理委员会主任签字（盖章）：2014.6.9

注：此批件仅作为科研项目的申报使用，不作为最终结论。

九、合作形式、内容和合作单位意见

课题如与外单位合作，需明确合作形式、内容与经费，明确知识产权归属，双方签署合作 协议。(请插入合作协议，格式为 jpg)

20144Y0073

十、课题组成员登记表

	姓名	性别	身份证号码	职称（职务）	单位（部门）	课题中的分工	每年从事本项目的工作月数	本人签名
课题主要研究人员	任晓娟	女	370105198611081[illegible]	研究实习员	上海市公共卫生临床中心	免疫检测	10	任晓娟
	彭秀华	女	310228[illegible]445	兽医师	上海市公共卫生临床中心	小鼠繁育	6	彭秀华
	秦波音	男	320684198312[illegible]415	助理兽医师	上海市公共卫生临床中心	小鼠繁育	6	秦波音
	陈丽香	女	320925198803057463	研究实习员	上海市公共卫生临床中心	小鼠免疫	4	陈丽香
	杨华	女	310228197312251848	高级兽医师	上海市公共卫生临床中心	移植手术	2	杨华
	蔡家麟	男	310103198511114012	研究实习员	上海市公共卫生临床中心	小鼠定型	2	蔡家麟
课题参加人员	刘雪	女	370404198906056826	研究生	复旦大学	免疫检测	4	刘雪
	任蓉蓉	女	141182198901190023	研究生	复旦大学	免疫检测	6	任蓉蓉
	于辛	女	230506199106270447	研究生	复旦大学	小鼠定型	2	于辛

20141Y0073

十一、课题经费预算表

单位：万元

	上海市卫生计生委资助	单位自筹资金	其他	合计
总计	2	0	0	2
设备购置费	0	0	0	0
试制改造费	0	0	0	0
租赁使用费	0	0	0	0
材料费	0.8	0	0	0.8
测试化验加工费	0.5	0	0	0.5
燃料动力费	0	0	0	0
差旅费	0	0	0	0
会议费	0.1	0	0	0.1
国际合作与交流费	0	0	0	0
出版/文献/信息传播/知识产权事务费	0.2	0	0	0.2
劳务费	0.2	0	0	0.2
专家咨询费	0.1	0	0	0.1
管理费	0.1	0	0	0.1
其他	0	0	0	0

项目(课题)预算说明：对各支出项目主要用途、与项目(课题)的相关性及测算方法、测算依据进行详细分析说明。

设备购置费用于购置酶标仪；材料费用于小鼠的饲养繁殖，实验试剂购买，人肝细胞购买等；测试化验加工费用相关生化指标和免疫学指标的检测；会议费用于参加会议交流；出版费用于文章版面费和专利申请费。

20144Y0073

十二、课题依托单位意见

申请单位对课题的管理支撑及人、财、物等保障签署具体意见

同意

20144Y0073

如立项不资助:

□ 单位同意予以经费资助，资助金额_____万元。

☑ 单位不予以经费资助。

依托单位负责人签章

公章

日期: 2014.9.22

十三、上级主管部门意见

主管部门负责人签章

公 章

日期:

自筹资金承诺函(格式)

20144Y0073

_____(单位全称)，承诺为_____课题，提供_____万元的配套资金，资金来源为_____。

配套资金的管理和使用要求(包括使用方向、用途、开支科目等)：_____。

特此证明。

出资单位(公章)：

年 月 日

十四、上海市卫生和计划生育委员会意见

课题合同签章：

日期：

密级：

上海市科学技术委员会
科研计划项目课题任务书

（2011版）

课题编号	12140900300		
课题名称	用于肝脏重大疾病研究的人肝／免疫系统双嵌合体小鼠的开发及其综合评价		
课题性质	上海市实验动物研究项目		
开始日期	2012-11-01		
结束日期	2015-06-30		
依托单位	上海市公共卫生临床中心（盖章）		
通讯地址	上海市金山区漕廊公路2901号		
联系电话	021-37990333-5239	邮政编码	201508
课题责任人	周晓辉		
手　　机	15901966863	电子邮件	zhouxiaohui@shaphc.org
账 户 名	上海市公共卫生临床中心		
账　　号	038589-50040012884		
开户银行	农行金山区象州路支行		

2012年11月21日订

表1 劳务费预算明细表

项目编号：12140900300　　金额单位：千元

	姓名	证件类别	证件号码	性别	出生日期	现工作单位	现专业技术职务	目前参加其它课题数/时间	本课题中的分工	本课题的全部投入计时工时（人月）	劳务费平均标准（元/人月）	申请本次资助额	签章
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)=(10)×(11)/1000	
课题责任人	周晓辉	身份证	362227197307018091	男	1973-07-01	上海市公共卫生临床中心	副教授	1/06	课题负责人	8.0	1000	8.0	
课题参与人员	陈丽香	身份证	320925198803057463	女	1988-03-05	上海市公共卫生临床中心	技术员	1/08	人肝、免疫荧光手术	12.0	750	9.0	
课题参与人员	王丛	身份证	370902198008130945	女	1980-08-13	上海市公共卫生临床中心	实习研究员	1/03	细胞分离	12.0	750	9.0	
课题参与人员	彭秀华	身份证	310228197303161445	女	1973-03-16	上海市公共卫生临床中心	兽医师	1/03	种群繁育	12.0	750	9.0	
课题参与人员	徐春华	身份证	310104198204234037	男	1982-04-23	上海市公共卫生临床中心	助理兽医师	1/03	表型鉴定	12.0	750	9.0	
课题参与人员	秦波音	身份证	320684198312203415	男	1983-12-20	上海市公共卫生临床中心	助理兽医师	1/03	基因定型	12.0	750	9.0	
课题参与人员	羽晓瑜	身份证	320106197908092049	女	1979-08-09	复旦大学	博士生	1/03	HBV感染模型	12.0	750	9.0	
课题参与人员	周晓静	身份证	341221198708061043	女	1987-08-06	上海市公共卫生临床中心	硕士生	1/08	免疫学检测	12.0	750	9.0	
课题参与人员	杨涛	身份证	330802198911221613	男	1989-11-22	上海市公共卫生临床中心	硕士生	0/00	病毒学检测	12.0	750	9.0	
累计												80.0	/

上海市科研计划项目资助课题经费预算表

（经费预算编制依据见沪科合（2009）006号）

课题编号: 12140900300

课题名称: 用于肝脏重大疾病研究的人肝／免疫系统双嵌合体小鼠的开发及其综合评价

金额单位：千元

经费来源合计	400.0	
其中：1．申请本次资助	400.0	
2．自筹经费来源	0.0	
（1）其他财政拨款	/	
（2）单位自有货币资金	/	
（3）其他资金	/	

课题支出预算	预算总额	其中：申请本次资助额	计算依据	填表说明
1．劳务费	80.0	80.0		按表1列示
（1）课题责任人（负责人）	8.0	8.0		
（2）课题高级研究人员	0.0	0.0		
（3）课题参与人员	72.0	72.0		
（4）引进人才	0.0	0.0		
2．设备费	0.0	0.0		
（1）购置	/	/	见《编制说明》	/
（2）试制	/	/	见《编制说明》	/
（3）现有仪器设备使用费	/	/	见《编制说明》	/
（4）设备租用费	/	/	见《编制说明》	
3．业务费	288.0	288.0		
（1）材料费	198.5	198.5	见《编制说明》	按表4列示
（2）燃料及动力费	/	/	见《编制说明》	
（3）测试化验与加工费	53.5	53.5	见《编制说明》	按表5列示
（4）出版物/文献/信息传播/知识产权事务费	/	/	见《编制说明》	
其中：专业软件购买费	/	/	见《编制说明》	
（5）会议费	20.0	20.0	见《编制说明》	
（6）差旅费	16.0	16.0	见《编制说明》	
4．修缮费	/	/	见《编制说明》	
5．管理费	32.0	32.0	见《编制说明》	
6．其他费用	0.0	0.0		
（1）国际合作与交流费	0.0	0.0	见《编制说明》	
/	0.0	0.0	见《编制说明》	

/	0.0	0.0	见《编制说明》	
/	0.0	0.0	见《编制说明》	
费用总计	400.0	400.0		

预算编制人（签名）		本表系按照《上海市科研计划课题预算编制要求说明》〔沪科合（2009）006号〕如实填写。
课题责任人或课题负责人（签名）		财务负责人（签名） 依托单位财务部门（盖章） 2012年11月21日

注：

1. 与本课题有关的前期研究（包括阶段性成果）支出的各项经费不得列入本预算；
2. 申请市科委科研计划项目课题资助经费在200千元人民币以下时，请在"计算依据"栏直接作出有关说明；
3. 课题下设的每个子课题（子合同）均需单独填报各自的课题预算表及其预算说明，并将子课题（子合同）预算汇总后计入课题经费预算相应栏内；

密级：

中心科研课题计划任务书

课题编号 2014M08

课题名称 用于肝移植研究的人源肝嵌合可诱导型肝损小鼠模型技术开发

课题性质 科研课题

起止年月 2014.7—2016.6

课题负责人 任晓楠

所在科室 实验动物部

手　　机 18121150293

E-Mail renxiaonan66@126.com

科室负责人 周文江

填表日期： 2014 年 5 月 20 日

填表说明

一、本课题计划任务书系上海市公共卫生中心为所组织的科研课题研究而设计。

二、本课题任务书编写请使用 A4 普通纸张双面打印填报，各栏空格不够时，请自行加页。左侧装订成册（不要采用胶圈、文件夹等带有突出棱边的装订方式）。

三、本课题计划任务书各项内容要实事求是，逐条认真填写，外来语同时用原文和中文表达。

四、本课题计划任务书一式两份，经正式审定后，科研科和课题负责人各留存一份。

一、 简表

<table>
<tr><td rowspan="4">课题负责人</td><td>姓名</td><td>任晓楠</td><td>性别</td><td>女</td><td>出生年月</td><td colspan="3">1986.11</td></tr>
<tr><td>学历</td><td>研究生</td><td>学位</td><td>硕士</td><td>职称</td><td>无</td><td>职务</td><td>无</td></tr>
<tr><td colspan="2">所在部门</td><td colspan="6">实验动物部</td></tr>
<tr><td colspan="8">从事专业 实验动物学</td></tr>
<tr><td rowspan="4">研究课题</td><td colspan="8">名称 用于肝移植研究的人源肝嵌合可诱导型肝损小鼠模型技术开发</td></tr>
<tr><td colspan="8">类别： ☐临床研究 ☑技术开发 ☐临床护理</td></tr>
<tr><td>所属学科</td><td colspan="3">实验动物学</td><td colspan="3">经费金额（万元）</td><td>4</td></tr>
<tr><td colspan="8">研究内容和预期成果摘要（限 400 字）

肝脏移植手术对于解决肝脏系统疾病和肝脏代谢紊乱等是一种重要的手段，但是肝脏移植手术仍然面临很多尚未解决的问题，需要更多的相关研究提高移植后肝脏细胞的再生和增殖问题。
肝脏损伤动物模型是研究肝细胞移植和再生重要的关键技术平台。然而，缺乏合适的小动物模型很大程度上限制了肝移植技术优化相关的临床前研究。
本项目拟开发可诱导型肝损伤的转基因小鼠并与免疫缺陷小鼠杂交，在此基础上通过移植人肝细胞，从而建立人源肝嵌合小鼠模型。该模型不仅为肝移植研究提供了一种可行的动物模型支撑，还可作为其他肝病研究的人源化研究平台。该基础技术平台的建立，对于促进上海市公共卫生临床中心肝病中心的临床基础研究有重要意义。</td></tr>
</table>

二、立题依据

包括国内外研究现状、水平和发展趋势（含知识产权和技术标准状况）、经济建设和社会发展需求，当前须解决的主要问题、学术价值等。

肝脏疾病是对人类威胁最大的疾病之一，除病毒性肝炎外，肝脏疾病中肝硬化、肝癌等的危害也相当严重；目前，中国每年用于肝炎和肝病的直接医疗费用高达1000多亿元人民币。 肝脏移植手术对于解决肝脏系统疾病和肝脏代谢紊乱等来说是一种非常重要的手段之一，但是肝脏移植手术仍然面临很多尚未解决的问题，需要更多的相关研究提高移植后肝脏细胞的再生和增殖问题。与肝脏的移植相比，肝脏细胞的移植更具可行性，所需费用也较小。

肝脏损伤的动物模型的建立是研究肝细胞移植和再生的关键性的技术平台。 然而，缺乏合适的小动物模型很大程度上限制了肝移植技术优化相关的临床前研究。就小鼠而言，人源肝细胞移植要在小鼠体内嵌合、再生成功，需要满足两个条件：一为本身肝脏有损伤，外源植入的肝细胞才有机会克服生存竞争而“殖民”成功；二为防止免疫排斥，因此往往需要有免疫缺陷鼠特征。现有的动物模型，例如Alb-uPA/SCID小鼠模型曾被应用于肝细胞移植研究中。但是由于uPA小鼠繁殖困难，死亡率高，移植手术需要在小鼠出生2周内完成且手术风险较大等一系列问题而限制了其广泛应用，为了克服Alb-uPA小鼠的一系列缺点，可诱导型肝损伤人源化小鼠模型的建立将对肝细胞的移植研究提供新的更适合的动物模型。

本项目拟在构建可诱导型肝损伤/免疫缺陷小鼠（Alb-cre/DTR/SCID-beige），其原理在于Alb-cre/DTR小鼠肝脏特异表达白喉毒素受体，当喂食白喉毒素后，可诱导小鼠肝脏的损伤。Alb-cre/DTR小鼠与免疫缺陷鼠SCID-beige杂交，在诱导肝损与免疫缺陷的基础上可引入人源肝构建嵌合小鼠模型。本研究将结合中心动物部转基因鼠资源与技术优势以及中心外科手术团队肝移植手术技术优势，从而研发出具有自主知识产权的模型技术。

该模型技术的建立不仅将为肝移植研究提供一种可行的动物模型支撑，对于深入探讨肝细胞移植和肝脏再生等研究具有重要的理论意义和应用价值，还可作为其他肝病研究的人源化研究平台。总之，该基础技术平台的建立，对于促进上海市公共卫生临床中心肝病中心的临床基础研究有重要意义。

三、课题研究的总目标和特色、创新点，主要研究内容及所需要解决的技术难点

1.研究目标:1)项目旨在开发可诱导型肝损伤的免疫缺陷型Alb-cre/DTR/SCID-beige 2)进行人肝移植，构建嵌合小鼠，分析嵌合后肝细胞再生以及小鼠的生物学特性。

2.创新点:1)本项目拟在构建可诱导型肝损伤的免疫缺陷型Alb-cre/DTR/SCID-beige小鼠模型，从而开发人源化肝嵌合小鼠模型，

2)为克服原有uPA-SCID小鼠模型在人肝嵌合成功率、存活率等方面的缺陷，本项目拟通过杂交技术引入Alb-cre/DTR/SCID-beige,实现可调控表达从而人为控制肝损表达强度和时机，将有助于提高人源化肝小鼠嵌合成功率、存活率。

3.主要研究内容:

1）诱导型Alb-cre/DTR小鼠模型建立:

A. Alb-cre 转基因小鼠的繁殖与保种;

B. DTR 转基因小鼠的繁殖与保种;

C. 诱导型Alb-cre/DTR小鼠的构建;

2）诱导型Alb-cre/DTR/SCID-beige小鼠模型建立:

A. Alb-cre/DTR小鼠与SCID-beige小鼠杂交获得Alb-cre/DTR/SCID-beige小鼠;

B. 通过白喉毒素建立可诱导型肝损伤Alb-cre/DTR/SCID-beige小鼠

3）人肝嵌合小鼠模型的建立和相关指标的检测:

A.肝损小鼠的人肝细胞移植;

B.肝脏病理改变的组织学监测;

C.血清中相关生化指标、细胞因子、特异性抗体水平监测。

D.移植效率的检测

4.需要解决的技术难点:

1）Alb-cre/DTR/SCID-beige三转基因小鼠的杂交与繁育工作比较艰巨，但是本课题组成员中有经验丰富的专业人员加盟:金玫蕾教授，原中科院实验动物中心负责人，多年从事小鼠遗传繁育研究，指导杂交繁育;周晓辉副研究，中心动物部副主任，指导诱导肝损表型分析;彭秀华兽医师，具体负责繁育筛选等)，目前已经获得Alb-cre/DTR 双基因小鼠，正在进行三基因杂交筛选。

2）人肝细胞移植手术：本项目将与中心外科刘保池主任及其团队合作，可保证肝细胞外科手术顺利进行。项目申请人所在实验动部在小鼠肝内／脾内注射手术，尾静脉注射，各种取材操作等方面也有相当丰富的经验。

四、课题完成形式和考核指标

主要技术指标、形成的专利、标准、新技术、新产品、新装置、论文专著等数量、指标及其水平等；社会、经济效益考核指标；人才培养情况。

成功构建可诱导型肝损伤/免疫缺陷小鼠模型（Alb-cre/DTR/SCID-beige），并申请相关小鼠模型专利一项或发表受项目资助相关核心期刊以上论文1篇。

本研究构建的人源化肝嵌合小鼠，不仅将为肝移植研究提供一种可行的动物模型支撑，对于深入探讨肝细胞移植和肝脏再生等研究具有重要的理论意义和应用价值，还可作为其他肝病研究的人源化研究平台。

五、课题年度计划及年度目标

年度	课题的年度计划及年度目标（按季度划分工作节点，要求明确关键的、必须实现的节点目标）
2014 年	2014 年 7 月-2014 年 9 月：Alb-cre 和 DTR 转基因小鼠的繁殖与保种 2014 年 10 月-2014 年 12 月：Alb-cre 和 DTR 小鼠的杂交，获得 Alb-cre/DTR 小鼠
2015 年	2015 年 1 月-2015 年 3 月：Alb-cre/DTR 小鼠和 SCID-beige 小鼠杂交获得 Alb-cre/DTR/SCID-beige 小鼠 2015 年 4 月-2015 年 6 月：白喉毒素诱导 Alb-cre/DTR 小鼠特异性肝损模型的建立 2015 年 7 月-2015 年 9 月：白喉毒素诱导 Alb-cre/DTR/SCID-beige 小鼠特异性肝损模型的建立 2015 年 10 月-2015 年 12 月：人肝细胞移植到 Alb-cre/DTR/SCID-beige 小鼠体内
2016 年	2016 年 1 月-2016 年 3 月：人肝细胞表达情况和效率的检测和实验数据的汇总 2016 年 4 月-2016 年 6 月：文章撰写，准备投稿

六、课题完成后的预期社会效益、经济效益

1、效益分析:

该项目的实施将丰富中心乃至上海市、实验动物的资源，并为拓宽实验动物育种学的方法提供新思路。所开发的模型为肝脏等重大传染性肝病的研究提供人源化研究平台。

2、成果应用趋向和应用单位:

本研究构建的人源化肝嵌合小鼠，不仅将为肝移植研究提供一种可行的动物模型支撑，对于深入探讨肝细胞移植和肝脏再生等研究具有重要的理论意义和应用价值，还可作为其他肝病研究的人源化研究平台。对于实验动物学的研究和医学平台肝移植手术的研究都将提供一定的实验思路和技术支撑。

七、合作形式、内容和合作单位意见

1、合作形式和内容

2、合作单位意见（对合作内容、形式、参加人员素质及保证工作条件等）签署具体意见:

负责人签章

公　章

年　月　日

此课题如与国外合作，签有协议的请附合作协议复印件。

八、课题经费预算表

金额单位：万元

支出科目	数量	单价	金额	备注/计算依据
各品系小鼠繁殖、饲养、配种	100	1.5 元/天*100 天	1.5	
小鼠基因定型需要的试剂等	10	0.05	0.5	
移植需要的人源化肝脏/肝细胞及后续相关检测	3	0.5	1.5	
专利申请费与论文版面费/参加会议交流	5	0.1	0.5	
合计			4	

九、申请人承诺

本人保证按照任务书计划完成课题，如期汇报结题。

申请人签字

年 月 日

十、科室意见

提供申请人完成课题必要的科室支持。

科室负责人签字

年 月 日

十、科研主管部门意见

监督管理项目的执行和结题。

科研主管部门负责人签章

公 章

年 月 日

十一、单位意见

支持保障项目的顺利开展。

公 章

年 月 日