

关于国家自然科学基金资助项目批准及有关事项的通知

浙江大学 徐承富 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:

81470838, 项目名称: **Olfactomedin**

4在非酒精性脂肪性肝病中的作用及机制研究, 资助金额: **73.00**万元, 项目起止年月: **2015年01月**至 **2018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://isis.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。

计划书电子版通过科学基金网络信息系统(<https://isis.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(建议双面打印)为计划书纸质版(一式两份), 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**2014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**2014年9月18日16点**;
- 3、报送计划书纸质版截止时间为**2014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
2014年8月15日

附件：项目评审意见及修改意见表

项目批准号	81470838	项目负责人	徐承富	申请代码1	H0314
项目名称	Olfactomedin 4在非酒精性脂肪性肝病中的作用及机制研究				
资助类别	面上项目	亚类说明	常规面上项目		
附注说明					
依托单位	浙江大学				
资助金额	73.00 万元	起止年月	2015年01月 至 2018年12月		
<p>通讯评审意见：</p> <p><1></p> <p>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</p> <p>具有生物学功能的糖蛋白Olfm4与肥胖有关，在NAFLD中肝脏表达上调，敲低Olfm4显著减轻软脂酸诱导的干细胞脂肪变性程度，但Olfm4对NAFLD的调节机制不明。本申请项目拟明确Olfm4在NAFLD中的具体作用和机制。</p> <p>二、具体意见</p> <p>（一） 申请项目的预期结果及其科学价值和意义</p> <p>本申请项目的实施将阐明Olfm4在NAFLD中的作用及其发挥作用的具体分子机制，有助于认识NAFLD的发病机制，为NAFLD的干预提供可能的治疗靶点。</p> <p>（二） 科学问题或假说是否明确，是否具有创新性</p> <p>本研究具备一定的前期工作基础，前期研究通过细胞核动物实验分析了Olfm4与NAFLD的关系，发现Olfm4的表达变化对NAFLD具有调节作用，于是进一步探讨Olfm4在NAFLD发生发展中的作用和分子机制，科学问题的提出依据充分，具有科研创新性。</p> <p>（三） 研究内容、研究方案及所采用的技术路线</p> <p>本研究方案设计合理，拟通过体外、体内实验，应用siRNA和Olfm4过表达腺病毒、Olfm4基因敲除小鼠等研究Olfm4表达变化对肝脏脂肪变和炎症的影响，逻辑清楚，方案可行。</p> <p>（四） 申请人的研究能力和研究条件</p> <p>申请人具备NAFLD研究背景，部分相关工作已发表，并熟悉实验相关技术，所在平台拥有项目开展的硬件条件，具备承担此课题的能力。</p> <p>（五） 其它意见或修改建议</p> <p>腺病毒过表达和Olfm4基因敲除小鼠等研究还应关注糖代谢、能量消耗等功能变化及相应机制，关于NAFLD的分子机制不应局限于脂质代谢和炎症反应，内质网应激、氧化应激等多因素都应考虑。</p> <p><2></p> <p>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</p> <p>近年来发现的一种具有多种生物学功能的糖蛋白Olfm4，对NAFLD具有调节作用，本研究将在观察Olfm4表达变化对肝脏脂变和炎症影响的同时，筛选和验证Olfm4调节新靶点，探讨其调节机制。</p> <p>二、具体意见</p> <p>（一） 申请项目的预期结果及其科学价值和意义</p> <p>明确Olfm4在NAFLD中的具体作用及机制，为NAFLD防治提供新线索。</p>					

（二） 科学问题或假说是否明确，是否具有创新性
申请者前期实验提示Olfm4对NAFLD具有调节作用，但其调节机制尚不清楚。本研究拟在观察Olfm4表达变化对肝脏脂变和炎症影响的同时，筛选和验证Olfm4调节新靶点，探讨其调节机制。该假设具有前期研究基础，机制创新性较强。

（三） 研究内容、研究方案及所采用的技术路线
本项目拟在已有基础上，建立NAFLD细胞及小鼠模型并结合Olfm4 基因敲除小鼠，运用siRNA和重组腺病毒技术抑制或增强Olfm4表达，在观察Olfm4表达变化对肝脏脂变和炎症影响的同时，通过Western Blot、qPCR等方法检测Olfm4表达改变对肝脏脂质代谢、炎症反应等相关分子的影响，并运用表达谱芯片筛选和验证Olfm4调节新靶点，所采用的技术路线能够验证所提出的科学问题，方法的逻辑合理、可行性高。

（四） 申请人的研究能力和研究条件
申请者前期发表相关SCI论文，有较好的研究基础，所在实验室具有较完善的研究条件。

（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
该项目旨在探索olfactomedin 4对于NAFLD的影响及其机制。申请人提出的科学假说为：olfactomedin 4通过4E-BP1、cathepsin D等途径影响NAFLD的发生发展。

二、具体意见
（一） 申请项目的预期结果及其科学价值和意义
本项目的预期结果为揭示olfactomedin 4对于NAFLD的影响及其分子机制，具有一定的科学价值和意义。

（二） 科学问题或假说是否明确，是否具有创新性
目前关于此领域的报道国际上尚无报道，该项目的研究有较强的创新性。

（三） 研究内容、研究方案及所采用的技术路线
研究方案合理可行，能够验证所提出的科学问题。

（四） 申请人的研究能力和研究条件
申请人具备较好的前期研究基础和研究条件，队伍结构合理，具备完成项目的条件。

（五） 其它意见或修改建议
对研究方案的修改意见：

医学科学部

2014年8月15日

浙江省医药卫生科技计划项目

合 同 书

计划类别: 面上项目 (编号: 2015KYB030)

课题名称: 糖蛋白Oflm4对肝细胞脂肪变性的调节作用及其机制
研究

申 请 者: 章亚男

申请单位: 省人民医院

联系手机: 13588386624

申请日期: 2015-02-08

浙江省卫计委

二〇一二年制

一、项目情况

项目名称	糖蛋白Oflm4对肝细胞脂肪变性的调节作用及其机制研究				
研究类别	基 础 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----胃肠病学				
开始日期	2015-07	完成日期	2018-06		
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
1.5	3.0	0.0	0.0	1.5	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	1.5
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	0.0
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	0.0
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	3.0	合计	1.5

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Olfm4表达变化对肝细胞脂肪变性程度的影响		
预期目标2	揭示Olfm4调节肝细胞脂肪变性程度的可能机制		
预期目标3			
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	省人民医院			
通讯地址	杭州市上塘路158号	邮编	310013	
联系电话	057185893677	联系人	童向民	
合作单位				
序号	单位名称	联系人	联系电话	职责
1				
2				
3				
4				
5				

三、项目组成员

负责人					
姓名		章亚男		身份证号	330624198109070405
出身年月		1981-09-07		手机	13588386624
职务		主治医师		专业	老年医学
学历		硕士		学位	硕士
工作单位		省人民医院			
其他成员					
序号	姓名	出生年月	职称	工作单位	项目分工
1	章亚男	1981-09-07	主治医师	省人民医院	课题组织与协调
2	谢建洪	1964-08-20	主任医师	省人民医院	病理学分析
3	劳迪波	1968-05-17	副主任医师	省人民医院	生化指标检测
4	张丽	1978-06-04	主治医师	省人民医院	蛋白表达分析
5	周宁	1980-10-08	主治医师	省人民医院	基因表达分析

四、 计划进度

2015. 7-2016. 6

(1) 建立NAFLD细胞模型和Olfm4表达干预模型

2016. 7-2017. 6

(1) 分析Olfm4表达抑制对肝细胞脂肪变性的影响;

(2) 分析Olfm4表达增强对肝细胞脂肪变性的影响。

2017. 7-2018. 6

(1) 分析Olfm4表达变化对肝细胞脂肪变性影响的机制;

(2) 课题总结、论文撰写与投稿。

五、 项目基本情况

研究内容:

(1) 脂肪变性肝细胞模型及Olfm4表达干预模型的建立: 用软脂酸刺激人肝细胞株建立脂肪变性肝细胞模型; 通过油红染色、肝细胞内甘油三酯含量测定等方法评价模型的建模情况。同时运用重组腺病毒和siRNA等方法建立Olfm4表达干预模型。

(2) Olfm4对肝细胞脂肪变性的调节作用: 利用siRNA转染或腺病毒感染正常人肝细胞株L02细胞, 观察Olfm4表达抑制和表达增强对软脂酸诱导肝细胞脂肪变性程度的影响; 通过点突变进行siRNA恢复实验, 以排除siRNA的脱靶效应。

(3) Olfm4对肝细胞脂肪变性的调节机制: 在上述研究观察Olfm4表达变化对肝细胞脂肪变性调节作用的同时, 运用Real time RT-PCR和Western Blot等方法, 检测Olfm4表达抑制或增强后, 脂肪变性肝细胞模型中4E-BP1、Cathepsin D、SREBP-1、GRP78、S6K、PPAR γ 、Akt信号通路分子的变化, 从而揭示Olfm4调节肝细胞脂肪变性的可能机制。

研究方法:

(1) 脂肪变性肝细胞模型的建立

采用软脂酸刺激正常人肝细胞株L02细胞建立脂肪变性肝细胞模型。具体方法为：正常人肝细胞株L02细胞用含小牛血清、青链霉素的DMEM培养基传代培养，直至细胞达到80%-90%融合度。软脂酸（购于Sigma-Aldrich, St. Louis, MO）和小牛血清白蛋白以3:1比例加入DMEM培养基中。培养24h、48h和72h后收获。油红O染色观察细胞内脂滴形成情况，收集培养液测定ALT、AST水平，收集细胞冻溶液测定其中甘油三酯含量，综合评估建模情况。

(2) Olfm4表达干预模型的建立

将Olfm4基因克隆到转移载体pAdTrack-CMV中，在细菌BJ5183中与pAdEasy腺病毒基因组进行同源重组，得到Olfm4重组腺病毒基因组，通过转染HEK293细胞包装出重组腺病毒，用于增强Olfm4表达实验；设计并合成特异性针对Olfm4的小RNA干扰片段对肝细胞Olfm4表达进行干预，从而抑制肝细胞Olfm4的表达。

(3) Olfm4表达变化对肝细胞脂肪变性的影响及机制

在成功构建离体肝细胞Olfm4表达抑制和表达增强模型的基础上，用油红O染色，光镜下观察Olfm4表达变化对软脂酸诱导的肝细胞脂肪变性程度的影响，并通过点突变进行siRNA恢复实验，以排除siRNA的脱靶效应。用Real time RT-PCR和Western Blot等方法，检测Olfm4表达变化后，4E-BP1、Cathepsin D、SREBP-1、GRP78、S6K、PPAR γ 、Akt信号通路分子表达的变化。如果Olfm4表达抑制后，肝细胞脂肪变性程度减轻，4E-BP1、Cathepsin D和ABCA1表达或活性增加，SREBP-1、GRP78、PPAR γ 和S6K表达或活性降低，Akt信号通路变化减小；Olfm4表达增强后，肝细胞脂肪变性程度加重，4E-BP1、Cathepsin D和ABCA1表达或活性下调，SREBP-1、GRP78、PPAR γ 和S6K表达或活性升高，Akt信号通路受损，我们的推测得到验证。

创新点:

Olfm4是近年来发现的一种具有多种生物学功能的糖蛋白。本项目将在国内外首次研究Olfm4对肝细胞脂肪变性的调节作用及其可能机制。本项目的顺利实施, 将为深入认识肝脏脂肪变性的发生机制, 并探寻其可能干预治疗方法做出有益尝试。

六、 前期工作说明

申请者所在的单位是一家综合实力较强的三级甲等医院, 设有省部级重点实验室, 已具备本项目顺利开展的各项硬件条件: 二氧化碳细胞培养箱、超净台、荧光定量PCR仪、凝胶成像分析仪、显微镜、分光光度计、全自动生化分析仪等相关的仪器设备, 本项目所需的实验仪器不需要专门添置。

申请者前期预实验采用软脂酸和油酸培养L02细胞和HepG2细胞构建了脂肪变性的肝细胞模型, 可直接供本课题使用。

申请者前期还通过检索NCBI基因表达数据库(www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/profiles), 分析了O1fm4与肝脏脂肪变性可能的关系。结果发现, 数据库中已有一些尚未被发掘的基因芯片结果支持O1fm4与肝脏脂肪变性有关的推测。例如, Bektas等报道磷酸鞘氨醇裂解酶1 (Sphingosine 1-phosphate lyase, Sgpl1) 基因敲除肝脏脂质沉积重于野生型小鼠; 他们的基因芯片数据中含有尚未被发掘的信息——Sgpl1基因敲除小鼠肝脏O1fm4表达水平显著高于野生型小鼠 (NCBI GEO芯片数据登录号GSE18745)。再如, Pihlajamäki等比较了肥胖症患者和非肥胖者肝脏差异基因; 他们的芯片数据中也包含着新的信息——肥胖症患者肝脏O1fm4表达水平较非肥胖者有升高趋势 (NCBI GEO芯片数据登录号GSE15653, 图3B)。以上基因芯片结果提示O1fm4表达变化可能与肝脏脂肪变性有关。

在上述基础上, 本课题组还通过细胞学实验分析了O1fm4与肝细胞脂肪变性的关系。结果发现, 软脂酸刺激人肝细胞系HepG2细胞24h, 在诱导肝细胞出现脂肪变性的同时, 肝细胞O1fm4 mRNA表达也显著上调。该结果进一步支持O1fm4与肝细胞脂肪变性存在联系的科学假设, 为本项目研究做了铺垫。

七、 本课题相关内容的已有研究成果情况

申请人为第一作者. High serum ferritin levels increase the risk of hyperuricemia: a cross-sectional and longitudinal study. Ann Nutr Metab. 2014;64(1):6-12.

八、 附件信息

是否有查新检索报告:	<input type="checkbox"/> 是 <input checked="" type="checkbox"/> 否
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：

年 月 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：

省卫计委（盖章）：

年 月 日