

浙江省卫生和计划生育委员会文件

浙卫发〔2018〕52号



浙江省卫生计生委关于下达 2019年浙江省医药卫生科技计划的通知

各市卫生计生委（局），省级医疗卫生计生单位，高等医学院校：
根据《浙江省医药卫生科技计划项目管理暂行办法》规定的程序，2019年浙江省医药卫生科技计划项目经专家评审和立项公示，计划项目已确定，现下达给你们。

请各级卫生计生行政管理部门按照有关规定，加强对项目实施、项目验收、成果转化和科研诚信的管理，履行好项目管理的主体职责，确保科技经费专款专用。请项目承担单位于2019年10月20日前通过“浙江省卫生健康科技研发转化平台”确认提

交项目合同书，逾期未提交的视同放弃项目立项资格。项目负责人应按照合同书的要求，认真做好项目实施工作，规范使用课题经费，强化科研诚信管理，确保研究任务顺利完成。

我委将择优对列入省医药卫生科技计划的项目给予经费资助（宁波地区单位除外），对立项资助的项目，单位应给予 1:1 以上经费配套，对立项不资助的项目，单位应给予不少于 3 万元的启动经费配套。

附件：2019 年省医药卫生科技计划项目

浙江省卫生计生委

2018 年 9 月 21 日

（信息公开形式：主动公开）

附件

平台计划

序号	编号	项目名称	单位	负责人
1	2019ZD001	CDK1 基因在卵巢子宫内腺样癌的表达及其与预后的关系	省肿瘤医院	于爱军
2	2019ZD002	基于行动学研究的鼻咽癌放射性口腔黏膜炎照护蓝图的构建与应用研究	省肿瘤医院	叶彩仙
3	2019ZD003	冻干人用狂犬病疫苗 (Vero 细胞) 不同接种程序安全性和免疫原性对比研究	省疾病预防控制中心	任江萍
4	2019ZD004	回肠造口并发症预防体系的建立与应用研究	浙江大学医学院附属第一医院	钟紫凤
5	2019ZD005	环状 RNA circ_0001982 靶向 miR-143-3p 调控代谢综合征胰岛素抵抗的机制研究	浙江大学医学院附属邵逸夫医院	杜颖
6	2019ZD006	基于人工智能护理决策支持系统的开发应用	浙江大学医学院附属邵逸夫医院	潘红英
7	2019ZD007	吡啶乙酰胺类化合物对库欣病的治疗作用及初步分子机制研究	浙江大学医学院附属邵逸夫医院	夏李群
8	2019ZD008	气道上皮细胞特异性的 IL17A 调控慢性气道炎症性疾病的作用与机制研究	浙江大学医学院附属邵逸夫医院	高晓虹
9	2019ZD009	超声造影预测下肢缺血性疾病患者腰交感神经毁损治疗效果的观察	浙江大学医学院附属邵逸夫医院	吴
10	2019ZD010	miR-200c 调控放射性口腔黏膜炎发生的分子机制研究	浙江大学医学院附属邵逸夫医院	童庆华
11	2019ZD011	ICU 护士跨专业合作核心能力评价指标体系的构建及实证分析	浙江大学医学院附属邵逸夫医院	叶俊
12	2019ZD012	浙江杭州地区宫颈癌和宫颈上皮内瘤变患者 HPV 感染情况及亚型分布的调查研究	浙江大学医学院附属邵逸夫医院	叶俊
13	2019ZD013	新生儿认知功能损伤的研究	温州医科大学附属第二医院	俞晨艺

序号	编号	项目名称	单位	负责人
29	2019ZD029	大肠癌细胞外泌体 miR-30b-5p 表达与大肠癌进展的关系及分子机制研究	浙江大学医学院附属邵逸夫医院	王佩宇
30	2019ZD030	时钟型术中淋巴结标本管理器的设计及应用研究	浙江大学医学院附属邵逸夫医院	祁海跨
31	2019ZD031	特征性呼吸气体检测应用于侵袭性肺曲菌病早期筛查及诊断的研究	浙江大学医学院附属邵逸夫医院	胡蕙蕙
32	2019ZD032	基于人工智能开发急性肾损伤预测预警模型在 ICU 的应用研究	浙江大学医学院附属邵逸夫医院	朱涛
33	2019ZD033	基于甲状腺结节要素化观测的甲状腺超声影像数据库系统的建立与初步应用	浙江大学医学院附属邵逸夫医院	杨黎明
34	2019ZD034	慢性病患者健康适应力的动态趋势分析及应对策略构建研究	浙江大学医学院附属邵逸夫医院	汤磊雯
35	2019ZD035	全科医生主导的肥胖人群“精准化-整合式”体重管理模式研究	浙江大学医学院附属邵逸夫医院	陈丽英
36	2019ZD036	Graves 病时甲状腺滤泡细胞对碘-131 辐射敏感性的实验研究	浙江大学医学院附属邵逸夫医院	黄中柯
37	2019ZD037	ATF4 转录调控长链非编码 RNA HOX13-AS 的表达机制及其在胃癌耐药中的作用	浙江大学医学院附属邵逸夫医院	李慕春
38	2019ZD038	基于人群健康体检大数据的早期动脉硬化风险评估及智能干预模型的研究	浙江大学医学院附属邵逸夫医院	方力争
39	2019ZD039	医联体框架下的安宁疗护模式构建与应用研究	浙江大学医学院附属邵逸夫医院	项伟岚
40	2019ZD040	飞秒激光辅助的姚氏法深板层角膜移植术的新技术开发与临床研究	浙江大学医学院附属邵逸夫医院	许叶圣
41	2019ZD041	细胞周期蛋白依赖性激酶 9 (CDK9) 在术后多裂肌肌炎性损伤和再生修复中的作用和机制	浙江大学医学院附属邵逸夫医院	胡志军
42	2019ZD042	重症胰腺炎病人的早期康复治疗临床研究	浙江大学医学院附属邵逸夫医院	郭丰
43	2019ZD043	Tp12 激酶对类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞的功能影响及机制研究	浙江大学医学院附属邵逸夫医院	韩咏梅

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 王观宇 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:

81472213, 项目名称: 新相关基因Bmi-1在大肠癌肝转移中的作用及机制研究, 资助金额: 52.00万元, 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.nsf.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.nsf.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	81472213	项目负责人	王观宇	申请代码1	H1617
项目名称	新相关基因Bmi-1在大肠癌肝转移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	52.00 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 主要科学假说：在肿瘤微环境（炎症因子刺激，低氧等）作用下，Bmi-1能促进大肠癌细胞EMT发生，同时Bmi-1能维护大肠癌干/祖细胞的干性，促进转移肿瘤干细胞在肝脏微环境内的活力，促进灶灶的形成和发展。主要研究内容：1) 研究Bmi-1在低氧条件下对大肠癌细胞转移的影响及可能作用机制；2) 研究Bmi-1在促炎因子（IL-1β为代表）作用下对大肠癌细胞转移的影响及可能作用机制；3) 在大肠癌肝转移裸鼠模型和临床组织标本验证Bmi-1调控的关键分子表达变化。</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 如能得到预期结果，将有助于揭示Bmi-1在大肠癌肝转移中的促进作用及可能分子作用机制，为大肠癌肝转移的靶向治疗提供新的有效靶点和理论依据，具有较重要的科学价值和理论意义。</p> <p>（二） 科学问题或假说是否明确，是否具有创新性 申请者充分阅读了相关文献和前期工作基础上提出了该项目的科学假说，该假说明确，有一定创新性。</p> <p>（三） 研究内容、研究方案及所采用的技术路线 该项目的研究内容及方案存在以下问题 1) 应该围绕一种微环境因素低氧或炎症因子IL-1β深入研究，即使研究两种环境因素，也应有机地将二者结合起来，而申请书中只是平行研究两种因素的影响及机制。 2) 在研究Bmi-1在低氧或炎症因子作用下对大肠癌细胞转移的影响时，首先构建了Bmi-1过表达或沉默的细胞系，然后在不同环境因素处理下观察对细胞特性的影响及机制，这种设计的策略不合理。建议：应首先研究低氧或炎症因子对Bmi-1表达或活性的影响，并观察细胞生物学特性改变，然后在低氧或炎症因子处理时，反向改变Bmi-1，观察生物学效应，即采用回复实验。 鉴于研究内容及方案中存在的问题，难以充分验证所提出的科学假说。</p> <p>（四） 申请人的研究能力和研究条件 申请人具有较强研究能力，有多篇相关论文发表，也有较好的工作基础，所在单位具备研究相关的设备条件等。</p> <p>（五） 其它意见或修改建议</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 BMI-1是表观调控的PolycombGroup蛋白家族成员之一，作为重要的调控蛋白质分子通过干预重要抑癌基因Rb和P53通路参与细胞周期、细胞分化、细胞衰老和死亡过程，并在肿瘤的发生发展（转移）中担负非常重要的作用。因此，该项目拟利用小鼠肿瘤转移模型和三维细胞培养等技术策略，研究在肿瘤微环境改变（低氧作用，炎症因子作用）对BMI-1大肠癌的转移和浸润</p>					

以及肿瘤细胞干性的影响，并深入探讨BMI-1在其中的分子机制和信号作用途径。

二、具体意见

（一） 申请项目的预期结果及其科学价值和意义

研究在肿瘤微环境改变对BMI-1大肠癌的转移和浸润以及肿瘤细胞干性的影响及分子机制，对认识和理解BMI-1在肿瘤发生发展中生物学作用有一定价值。

（二） 科学问题或假说是否明确，是否具有创新性

项目的选题水平和科学性较高，申请课题组有良好的前期研究基础和结果，原创性强，学术思路新颖，切入点和研究方向清晰。

（三） 研究内容、研究方案及所采用的技术路线

项目设定的研究内容合适，研究层次和技术路线清晰，所选定的科学问题准确，总体方案基本可行。

（四） 申请人的研究能力和研究条件

但是，研究内容有些偏散，重点和突破点不够明确，此外，项目的申请人的基础研究的能力略有偏弱。完成该项目的研究条件基本具备。

（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

申请人前期研究显示Bmi-1与大肠癌远处转移相关。在此基础上，申请人提出bmi-1可能介导低氧或IL-1b刺激下的大肠癌转移，并计划揭示其分子机理。

二、具体意见

（一） 申请项目的预期结果及其科学价值和意义

该项目有望进一步揭示Bmi-1在肿瘤微环境中调控侵袭转移的新机制，具有一定的科学价值。

（二） 科学问题或假说是否明确，是否具有创新性

申请人的前期数据支持其假说。该项目具有一定的创新性。

（三） 研究内容、研究方案及所采用的技术路线

研究内容基本合理。申请人团队掌握相关技术，项目具有可行性。

（四） 申请人的研究能力和研究条件

申请人具有一定的科研能力，具备相关研究条件。

（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

浙江省基础公益研究计划项目批准通知

董庆华同志：

根据浙江省自然科学基金相关管理规定，浙江省自然科学基金委员会会同相关部门决定资助您申请的以下项目：

项目批准号	LGF20H220001		依托单位	浙江大学	
项目名称	靶向 Bmi-1 防治放射性口腔黏膜炎的新型小分子药物 TB 研发				
项目负责人	董庆华		证件号码	[REDACTED]	
项目类别	公益技术研究计划/社会发展		研究期限	2020年1月至2022年12月	
总经费 (万元)	10.00	省财政资助经费 (万元)	10.00	联合资助经费 (万元)	0.00
序号	其他主要成员	证件号码	性别	单位名称	
1	洪艺扬	[REDACTED]	女	浙江大学/医学院/附属邵逸夫医院	
2	陶菁菁	[REDACTED]	女	浙江大学医学院附属邵逸夫医院	
3	范梦静	[REDACTED]	女	浙江大学医学院附属邵逸夫医院	
4	张静	[REDACTED]	女	浙江大学医学院附属邵逸夫医院	
5					
6					

浙江省自然科学基金委员会办公室

2019年11月19日



分类号	年度	案卷号	件号	页数
005	2020	490	007	013

浙江省中医药科技计划 项目合同书

项目类别：科研基金项目

项目名称：槲皮素缓解放射性口腔黏膜炎的作用
及分子机制研究

依托学科：中西医结合疼痛医学

研究周期：2020年09月01日至2023年08月31日

申请人：董庆华

电子信箱：dongqinghua@zju.edu.cn

申请单位：浙江大学医学院附属邵逸夫医院

单位联系人：鲁建华

联系电话：13588708355

填报日期：2020年11月04日

浙江省卫生计生委制

二〇二〇年

合同条款

(1) 合同书签订后至课题完成止，乙方每年年底应向甲方提交年度执行情况(一式三份)并抄送丙方。

(2) 在执行过程中，如需修改某项条款，由签订合同书各方共同商定修改。

(3) 乙方无故不按合同书约定，或并非因不可抗拒的客观原因，如挪用科研经费等，致无法完成研究，甲方有权收回所拨经费。

(4) 项目经费，应专款专用、单独列帐，要严格按照科技经费管理有关规定的开支范围和现行财务制度开支标准掌握使用。

(5) 丙方应监督并保证研究任务的开展，协调研究过程中出现的问题。

(6) 课题完成后，乙方应按《浙江省中医药科技计划项目管理办法》的有关规定，及时向甲方提出验收申请。

(7) 乙方对外发表学术论文等研究成果，需标明该成果经浙江省中医药科研基金计划资助。

一、合同书简表

项目名称		槲皮素缓解放射性口腔黏膜炎的作用及分子机制研究								
学科类别		中西医结合口腔医学学								
申请单位		浙江大学医学院附属邵逸夫医院								
合作单位										
联系地址								邮编		
申请人	姓名	董庆华	性别	女	出生年月	1972-09				
	专业	中西医结合肿瘤学	学历	博士研究生	职务	中心实验室副主任				
	电话	13588708355	邮编		职称	副研究员				
研究总经费		6.00(万元)			资助经费		3.00(万元)			
					单位配套经费		3.00(万元)			
					自筹研究经费		0.00(万元)			
总人数		高级	中级	初级	辅助人员	博士	硕士	男	女	
4		1	1	1	1	1	1	1	3	
项目研究组	主要成员(不含申请人)	姓名	性别	年龄	职称	工作单位	课题分工		研究时间(月)	
		姚云斌	男	39	实验员	浙江大学医学院附属邵逸夫医院	动物实验		6	
		沈筱芸	女	38	实验师	浙江大学医学院附属邵逸夫医院	分子实验		8	
		张静	女	26	其他	浙江大学医学院附属邵逸夫医院	细胞实验		10	

二、项目简述(研究目标、内容和意义简介)

放射性口腔黏膜炎是因放射线电离辐射引起的口腔黏膜损伤(充血、糜烂、溃疡等),其典型症状是严重的疼痛。肿瘤患者放疗后常患有不同程度的口腔黏膜炎,尤其是头颈部肿瘤患者,放疗后几乎所有患者(90-100%)都会患口腔黏膜炎,其中约40%的患者需住院治疗重症口腔黏膜炎从而影响放疗的继续。放射性口腔黏膜炎的防治是全球性医学难点,目前没有特效药,治疗主要在减轻症状和减少并发症的发生。

从中医角度来看,放射性口腔黏膜炎属中医“口疮、口糜”范畴。放疗所用的高能射线是“火热毒邪”,一方面,该治疗会壮火食气,导致患者气虚,而热毒过盛,耗气伤津,使气阴两虚更甚;另一方面,热毒壅滞于经脉,导致血瘀。对此,这一类患者适宜使用益气养阴清热解毒的药物,如白花蛇舌草、菊花等中药。因此,从这些药物中寻找出有效的中药成分对防治放射性口腔黏膜炎具有十分重要的临床意义。

槲皮素存在于多种益气养阴清热解毒的中草药中,有很高的药用价值,其药理作用也很广泛,具有较好的祛痰、止咳、消炎、抗菌、抗病毒、降糖降压、免疫调节及心血管保护作用等作用。本课题组前期研究发现槲皮素能显著降低阿霉素引起的心肌细胞活性氧的产生,上皮组织的主要组成细胞是角化细胞,电离辐射可以引起角化细胞受损伤,据此推测槲皮素有可能降低电离辐射引起的角化细胞活性氧产生而具有缓解放射性口腔黏膜炎的作用。本课题组用小鼠放射性口腔黏膜炎模型进行预试验发现槲皮素有预防放射性口腔黏膜炎的作用,值得进一步深入研究。

本课题用原代培养正常人角化细胞及小鼠放射性口腔黏膜炎模型验证槲皮素缓解放射性口腔黏膜炎的作用并对其作用机制进行探讨,有望据此开发防治放射性口腔黏膜炎的新型放射保护剂,有效缓解肿瘤患者放疗引起的放射性口腔黏膜炎的痛苦,促进患者放射性口腔黏膜炎提前愈合,使患者能继续进行放疗,最终提高放疗疗效及患者生存质量。

关键词	槲皮素, 口腔黏膜炎, 放疗
-----	----------------

三、总体考核指标

<p>(1) 明确槲皮素放射保护作用并对其作用机制进行探讨。</p> <p>(2) 为开发防治放射性口腔黏膜炎的新型放射保护剂提供理论和实验基础。如开发成功,能有效缓解肿瘤患者(尤其是头颈部肿瘤患者)放疗引起的放射性口腔黏膜炎的痛苦,促进患者放射性口腔黏膜炎提前愈合,使患者能继续进行放疗,最终提高放疗疗效及患者生存质量。</p> <p>(3) 发表1篇高质量SCI收录论文。</p>
--

四、年度计划

起始日期	终止日期	主要完成任务	考核指标
2020年09月01日	2021年08月31日	<p>(1) 研究槲皮素在电离辐射下对正常人角化细胞的保护作用。</p> <p>(2) 研究槲皮素对电离辐射后对正常人角化细胞炎症反应的缓解作用。</p>	明确槲皮素对正常人角化细胞的放射保护作用。
2021年09月01日	2022年08月31日	<p>(1) 研究槲皮素对电离辐射后细胞ROS产生及相关分子通路的影响。</p> <p>(2) 研究槲皮素对电离辐射后细胞DNA损伤修复及相关分子通路的影响。</p> <p>(3) 研究槲皮素对电离辐射后细胞NF-κB通路及下游相关分子变化的影响。</p>	明确槲皮素对正常人角化细胞放射保护作用的可能分子机制。

2022年09月01日	2023年08月31日	<p>(1) 建立小鼠放射性口腔黏膜炎模型。</p> <p>(2) 观察槲皮素对黏膜炎的缓解作用。</p> <p>(3) 观察槲皮素对电离辐射下组织炎性分子表达的影响。</p> <p>(4) 观察槲皮素对电离辐射下组织细胞活性氧产生、DNA损伤修复的影响。</p>	明确槲皮素对小鼠放射性口腔黏膜炎的缓解作用。总结发表论文。
-------------	-------------	--	-------------------------------

五、经费预算

经费来源	资助金额	配套、自筹经费	合计
金额(万元)	3.00	3.00	6.00
支出科目	申请经费(万元)	配套、自筹经费(万元)	计算根据及理由
设备费	0.00	0.00	
材料费	1.61	3.00	购买相关试剂及耗材
测试化验加工费	0.00	0.00	
燃料动力费	0.00	0.00	
差旅费	0.20	0.00	市内交通费、外出交流差旅费
会议费	0.00	0.00	
合作协议研究与交流	0.00	0.00	
出版/文献/信息传播/知识产权事务费	0.30	0.00	用于文章发表、成果查新
人员劳务经费	0.45	0.00	按15%规定提取,用于参与本项目研究的博士和硕士研究生或没有工资收入的人员劳务费用
专家咨询费	0.20	0.00	用于课题中期专家指导及验收等
管理费用	0.24	0.00	按8%规定提取,用于学校科研管理
其他费用	0.00	0.00	

六、合同书正文

浙江省中医药科技计划项目研究正文

1、研究内容

1.1 课题研究内容

1.1.1 明确槲皮素对正常人角化细胞的放射保护作用。

- (1) 研究槲皮素在电离辐射下对正常人角化细胞的保护作用。
- (2) 研究槲皮素对电离辐射后对正常人角化细胞炎症反应的缓解作用。

1.1.2 研究槲皮素对正常人角化细胞放射保护作用的分子机制。

- (1) 研究槲皮素对电离辐射后细胞 ROS 产生及相关分子通路的影响。
- (2) 研究槲皮素对电离辐射后细胞 DNA 损伤修复及相关分子通路的影响。
- (3) 研究槲皮素对电离辐射后细胞 NF- κ B 通路及下游相关分子变化的影响。

1.1.3 研究槲皮素对小鼠放射性口腔黏膜炎的缓解作用。

- (1) 建立小鼠放射性口腔黏膜炎模型。
- (2) 观察槲皮素对黏膜炎的缓解作用(溃疡愈合情况、病理切片 HE、CD45、Tunel、PCNA 染色等)。
- (3) 观察槲皮素对电离辐射下组织炎症分子表达的影响。
- (4) 观察槲皮素对电离辐射下组织细胞活性氧产生、DNA 损伤修复的影响。

1.2 拟解决关键问题

明确槲皮素缓解放射性口腔黏膜炎的作用及可能分子机制。

1.3 预期目标

- (1) 明确槲皮素缓解放射性口腔黏膜炎的作用。
- (2) 明确槲皮素缓解放射性口腔黏膜炎的分子作用机制。
- (3) 为槲皮素开发成为新型放射保护剂提供理论基础, 最终减轻肿瘤患者放射治疗的痛苦。

1.4 主要创新点

- (1) 本项目是前期原创性和开拓性研究工作的延续, 创新性强。前期研究率先发现槲皮素能降低正常人角化细胞电离辐射后活性氧产生, 深入研究槲皮素缓解放射性口腔黏膜炎发生的分子机制, 可以成

为防治放射性口腔黏膜炎的重要突破口。

(2) 本项目所用细胞全部为原代培养正常人角化细胞。由于原代培养细胞的标本来源有限以及培养技术要求较高,国内外很多相关研究用永生化上皮角化细胞系 HaCaT 进行试验, HaCaT 与正常人上皮角化细胞差异较大,因为原代培养正常人角化细胞具有固定的寿命(图 2),体外培养经历指数生长期(exponential)、开始衰老期(senescing)、衰老期(senescent),与正常人口腔粘膜细胞的生命周期一致,因此比细胞系更能准确模拟体内细胞状况。

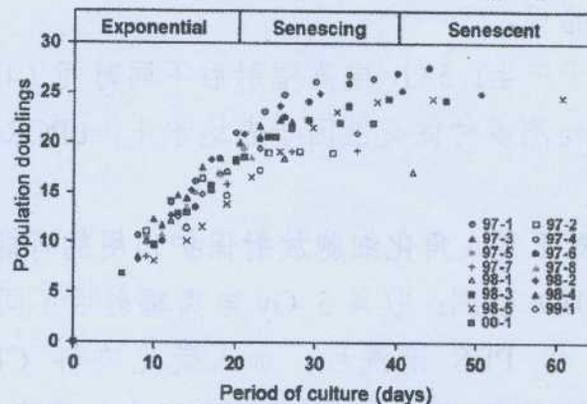


图 2: 15 个原代培养正常人角化细胞群体倍增时间图

(3) 采用小鼠放射性口腔黏膜炎模型,使复杂的体内生物过程能得以模拟,让研究结果更加可靠。

2、研究方法和技术路线

2.1 研究方法

2.1.1 原代培养正常人角化细胞

(1) 原代培养正常人角化细胞:收集本院健康成年人切除包皮组织,参照本课题组以前发表的方法建立原代培养正常人上皮角化细胞(NHK)。PBS 冲洗组织,剪成小块,加入 0.25% Dispase(美国 GIBCO), 37°C 消化 2 h 后取上皮角化层加入 0.25% 胰蛋白酶消化液中, 37 °C 振荡消化 5min, 加小牛血清终止消化,用吸管吹打成单细胞悬液,细胞培养于专用角化细胞培养液(美国 GIBCO), 37°C 5%CO₂ 饱和湿度细胞培养箱中培养。

2.1.2 明确槲皮素对正常人角化细胞的放射保护作用

(1) 细胞死亡检测: Annexin V/PI 染色、TUNEL 染色可用于细胞凋亡定量检测;此外,western blot 可检测 Caspase3、PARP 等凋亡相关标记蛋白。SA β -Gal 染色可检测衰老细胞,采用碧云天公司的细胞衰老 β -半乳糖苷酶染色试剂盒,按照试剂盒说明操作。衰老时 β -半乳糖苷酶活性水平上调,细胞染为蓝绿色。计算 5 Gy 电离辐射后不同时间(3、5、10 天)凋亡和衰老细胞比率。

(2) 细胞克隆形成率试验:在 6 孔板中接种细胞(300-8000 个/孔),0-10 Gy 辐射,10 天后固定染色,计细胞克隆数,绘制细胞 survival curve 并计算相关指标。

(3) 检测炎症因子产生:5 Gy 电离辐射后不同时间(4h、12h、1d、3d、7d) Elisa 可检测多种促炎性因子表达水平,qPCR 检测 mRNA 表达水平。

2.1.3 研究槲皮素对正常人角化细胞放射保护作用的可能分子机制

(1) 活性氧(ROS)检测:收集 5 Gy 电离辐射后不同时间(3、5、10 天)的细胞,用 PBS 清洗后,加入荧光染料 CM-H2DCFDA (Invitrogen 公司)染色 30 min,CM-H2DCFDA 被胞内 ROS 氧化产生荧光,其荧光强度可代表 ROS 产生水平,可在荧光显微镜(Olympus BH2-RFCA)下观察,也可用流式细胞仪检测。

(2) 细胞 DNA 损伤修复检测:5 Gy 电离辐射后不同时间(1、8、24、48h),Comet assay 检测拖尾长度,Neutral comet assay 检测 DSB 修复情况 Western blot 检测 DNA 修复相关蛋白表达情况,如 Rad51、DNA-Pkcs 等。免疫荧光染色检测 DNA 损伤的重要标志— γ -H₂AX 的表达情况。

(3) 检测 NF- κ B 激活状况:Western-blot 检测 5 Gy 电离辐射后不同时间(5m、30m、1h、8h、24h)胞浆胞核中 IKK α 、IKK β 激活, I κ B α 磷酸化(Ser32、Ser36)及经泛素-蛋白酶体途径降解的情况、p65 (Rel A)在 Ser276 和 Ser536 位点的磷酸化状态。免疫荧光染色分析 NF- κ B 蛋白表达及核转运情况。

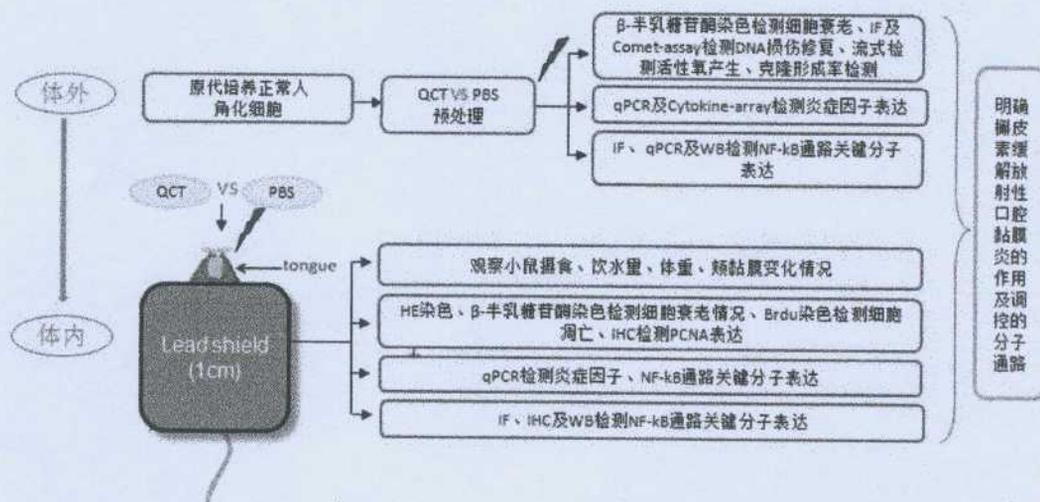
(4) 相关信号通路检测:Western-blot 检测 5 Gy 电离辐射后不同时间活性氧产生相关通路(ROS/TRAF/NIK 通路等)、DNA 损伤应答通路(ATM/ATR 等)、NF- κ B 相关通路(TNF- α /TRAF2/NF- κ B 等)的

变化。

2.1.4 研究槲皮素对小鼠放射性口腔黏膜炎的缓解作用及关键分子变化

8-10 周龄 C57BL/6 小鼠随机分为三组（每组 20 只），一组为对照组（PBS 灌胃），一组接受低剂量药物灌胃（50 mg/kg 体重），一组接受高剂量药物灌胃（300 mg/kg 体重）。药物灌胃一周后戊巴比妥钠腹腔注射麻醉，单次 25Gy X 射线照射头部，身体其余部分用铅皮防护不予照射，建立放射性口腔黏膜炎小鼠模型（见研究基础图 6）。随后整体观察：每日观察小鼠摄食、饮水量、体重、颊黏膜变化情况等。黏膜炎程度按照 Sonis 等的分级：0 分：黏膜正常、无充血糜烂。1 分：黏膜出现红斑但无糜烂；2 分：黏膜出现严重的红斑、充血，形成表浅的糜烂。3 分：黏膜出现严重的红斑、充血，形成 1 至多个溃疡，但范围不超过颊黏膜的 1/4。4 分：形成溃疡面积接近颊黏膜的 1/2。5 分：颊黏膜溃疡完全成片，粘膜丧失柔韧性。组织学观察：照射后 6、9、12、15 天，随机处死 5 只，切取颊黏膜，福尔马林固定后，常规石蜡包埋切片、HE 染色（如 CD45、p16、PCNA 染色等）、免疫荧光（如 p-NF- κ B、 γ -H2AX 等）、凋亡和衰老检测，显微镜下观察组织病理改变。另取组织液氮冻存，用于提取组织蛋白和 RNA。组织冰冻切片 DHE 染色可观察组织 ROS 产生情况。

2.2 技术路线



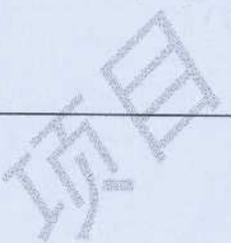
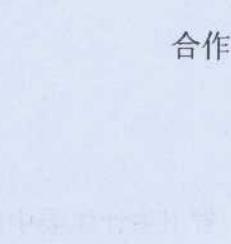
2.3 可行性分析

- (1) 前期相关工作较完整,有相关理论基础支持,立项依据充分。
- (2) 技术成熟,实验中用到的方法、技术都已熟练掌握并实际应用。
- (3) 科研人员经验丰富,配备合理,能保证课题顺利进行。
- (4) 依托单位为省重点实验室,科研实力雄厚,实验仪器和设备齐全。课题依托单位保证资金配套,可保障本研究顺利完成。

3、研究结果

- (1) 明确槲皮素放射保护作用并对其作用机制进行探讨。
- (2) 为开发防治放射性口腔黏膜炎的新型放射保护剂提供理论和实验基础。如开发成功,能有效缓解肿瘤患者(尤其是头颈部肿瘤患者)放疗引起的放射性口腔黏膜炎的痛苦,促进患者放射性口腔黏膜炎提前愈合,使患者能继续进行放疗,最终提高放疗疗效及患者生存质量。
- (3) 发表1篇高质量SCI收录论文。

七、合作单位

合作单位	无
<p>合作单位盖章</p> <p>年 月 日</p> 	<p>合作单位盖章</p> <p>年 月 日</p> 
<p>合作单位盖章</p> <p>年 月 日</p> 	<p>合作单位盖章</p> <p>年 月 日</p> 
<p>合作单位盖章</p> <p>年 月 日</p> 	<p>合作单位盖章</p> <p>年 月 日</p> 

八、合同书签订各方意见

1. 课题组将严格按照计划管理和研究伦理的要求，认真落实合同约定的任务目标，优质完成课题研究。
2. 课题承担单位将根据要求，协助做好有关管理工作，保障课题实施所需的人力、物力和工作时间等，严格落实1:1的配套经费。

补充条款：

课题承担单位（乙方）



2020年 11月 10日

课题负责人（签字）

A handwritten signature in black ink, appearing to be "董...".

乙方上级主管单位（丙方）



年 月 日

负责人（签字）

A handwritten signature in blue ink, appearing to be "杨...".

课题批准单位（甲方）：省卫生计生委中医药管理局（公章）

负责人（签字）：

A handwritten signature in blue ink, reading "谢国建".



2020年 11月 23日