

贵州省科技计划项目（课题）

任 务 书

项目名称	GPX4 抑制 GSDMD 减轻急性肝衰竭时细胞焦亡及炎症反应的作用机制研究		
计划类别	科学技术基金		
项目类型	一般类型		
所属学科	临床医学→内科学→传染病学		
技术领域	生物医药		
管理处室	科技项目管理处		
管理单位（甲方）	贵州省科学技术厅		
承担单位（乙方）	名称	贵州医科大学	
	统一社会信用代码	125200004292028528	
	通讯地址	贵州省贵安新区大学城贵州医科大学	
	邮政编码	550025	单位电话
	项目负责人	李宏	联系电话
	项目联系人	闫飞	联系电话

贵州省科学技术厅

2020 年

一、共同条款

1. 项目（课题）任务书是项目（课题）执行和验收的主要依据，双方须按相应科技计划类别的要求进行填写。经双方约定无需填写的内容，应在空白处划“/”。如需调整项目（课题）任务，应向对方提出变更内容及其理由的书面函件，经双方同意后实施。未形成调整的书面协议前，双方须按原任务书履行，否则后果由自行调整的一方负责。

2. 本任务书所称乙方，包括承担单位与参与单位，以任务书封面所列承担单位为乙方代表，各参与单位向承担单位负责并与承担单位共同向甲方负责。

3. 政务公开。甲方将向社会公开（1）乙方向甲方提交的申报材料，（2）本任务书，（3）乙方向甲方提供的其他资料（包括但不限于科技报告、验收申请表、年度计划执行情况、下一年度经费预算和有关统计报表）。乙方承诺这些资料不涉及国家秘密、商业秘密以及个人隐私并同意甲方向社会公开。

4. 信息采集。为科技管理的需要，甲方将采集乙方和完成人员的信息。除按照省政府要求的政务云建设之外，甲方将不对第三方提供这些信息，也不用于商业目的。

5. 乙方应按贵州省对省级财政科研经费管理的有关规定和本任务书的约定使用经费。甲方或其代表将根据这些规定和约定监督经费的使用情况。对乙方不符合规定的开支，甲方或其代表有权直接提出调整或撤销意见，乃至中止本项目（课题）任务。

6. 报表及报告。乙方在项目（课题）执行期内，必须按要求及时向甲方（1）提交至少 1 份科技报告，（2）编报年度计划执行情况、下一年度经费预算和有关统计报表。逾期不报，甲方有权暂停拨款。

7. 事中及事后监管。甲方有权委托第三方对乙方在项目执行过程中和项目执行完成后的情况进行监管，乙方应予配合。

8. 任务中止。因乙方原因（包括但不限于：申报书内容有出入、挪用经费、技术措施或某些条件不落实）或不可抗力致使项目（课题）任务无法执行而中止时，乙方应视不同情况退还部分、全部所拨经费。

9. 标识。在发表论文、展示有关产品和成果时（商业推广除外），乙方应明示该产品和成果接受贵州省科技计划支持，并标明项目（课题）任务编号。

10. 知识共享。乙方同意在公开发表本项目（课题）任务产生的论文后一个月内，向甲方免费提供电子副本并同意甲方在甲方自有的网站、APP 等知识管理系统中向甲方的服务对象免费共享该副本。乙方与第三方关于版权的协议中不应限制甲方的这一权利。

11. 成果转化。对本项目（课题）任务产生的科技成果，乙方应当按照有关法律的规定实施转化，该成果的完成人在同等条件下有优先实施权。乙方在 3 年内未实施转化的，甲方可授权注册地在贵州的企事业单位实施转化，该企事业单位将适当补偿乙方。

12. 若项目（课题）承担单位的上级主管部门或所在地的市（州）科技局承诺项目（课题）的配套资金等条件，须在“资金等匹配条件落实保证方”栏加盖公章。

二、项目（课题）实施内容（限 2000 字）

（课题的目标、主要研究内容、实施地点及规模）

针对急性肝衰竭时大量肝细胞死亡机制至今未彻底阐明的问题，认为目前已大量报道的肝细胞坏死、自噬、凋亡等常见细胞死亡方式不能完全解释急性肝衰竭时“雪崩式”肝细胞大量死亡及“瀑布样”剧烈炎症反应的特点，进而提出细胞焦亡这一高度炎性细胞死亡方式可能是急性肝衰竭时大量肝细胞死亡及剧烈炎症反应的重要机制之一，并进一步探讨 GPX4 在细胞焦亡中可能存在的负调节作用机制。研究内容如下：1. 过表达 GPX4 基因对 D-氨基半乳糖/脂多糖联合诱导的急性肝衰竭小鼠肝组织细胞焦亡通路的影响研究。2. 体外过表达 GPX4 基因抑制 GSDMD 减轻人 HL7702 肝细胞焦亡作用及机制研究。3. GPX4 与 GSDMD 蛋白质相互作用机制研究。

1. 过表达 GPX4 基因对 D-氨基半乳糖/脂多糖联合诱导的急性肝衰竭小鼠肝组织细胞焦亡通路的影响研究：

1.1 建立 GPX4 过表达小鼠：GPX4 空载及过表达慢病毒通过小鼠尾静脉注射 2 周，建立并验证过表达小鼠。

1.2 分组：C57BL/6J 小鼠共 80 只，数字随机法分为两批次（40 只/批）进行实验。每次分为正常对照组（Control）、空载对照组（LV-NC）、空载模型组（LV-NC-Model, LV-C-M）、GPX4 过表达模型组（LV-GPX4+/+-M）共 4 组，每组 10 只，共 40 只。

1.3 观察及检测指标：根据前期实验结果予 D-Galn300mg/Kg+/LPS10ug/Kg 一次性腹腔注射建立 ALF 模型，6 小时成模。

①第一批次观察记录小鼠一般情况，生存时间，生存率。

②第二批次 6 小时后戊巴比妥麻醉，眼球取血分离血清，门静脉灌流留取肝组织，多聚甲醛固定肝右叶行病理学检查，剩余肝组织-80℃冻存待测。

③全自动生化仪及凝血功能仪检测血清 ALT、凝血酶原国际标准化比值（international normalized ratio, INR）、血氨。

④ELISA 检测炎性细胞因子 IL-1 β 、IL-18 水平。

⑤肝组织匀浆检测氧化应激指标 SOD、GSH-Px、CAT 活性及 MDA 含量。

⑥qRT-PCR 检测肝组织 Caspase1、Caspase11、GSDMD 及 GPX4 的 mRNA 表达。

⑦Western Blot 检测肝组织 Caspase1、Caspase11、GSDMD 及 GPX4 蛋白表达。

2. 体外过表达 GPX4 基因抑制 GSDMD 减轻人 HL7702 肝细胞焦亡作用及机制研究：

2.1 建立 D-Galn/LPS 联合诱导的人 HL7702 肝细胞株损伤模型

D-Galn/LPS 联合诱导的 0, 6, 12, 24 不同时间节点人 HL7702 肝细胞损伤模型，检测以下指标：

①cck8 法测定细胞生存率；

②全自动生化仪检测细胞上清液 ALT、LDH；

③扫描电镜观察肝细胞焦亡形态；

④qRT-PCR 和 Western Blot 检测细胞 Caspase1、Caspase11、GSDMD、GPX4 mRNA 表达。

⑤Western blot 检测 Caspase1、Caspase11、GSDMD、GPX4 蛋白表达。

⑥共聚焦荧光显微镜观察各时间点 GSDMD、GPX4 蛋白表达变化。

2.2 过表达或抑制 GPX4 对 D-GalN/LPS 诱导的 HL7702 肝细胞损伤模型中细胞焦亡通路指标的影响

慢病毒转染建立 GPX4 基因过表达稳转 HL7702 细胞株，GPX4 特异性抑制剂 RSL3 抑制 GPX4 基因及蛋白表达，观察调节 GPX4 对 D-GalN/LPS 诱导的 HL7702 肝细胞损伤模型中细胞焦亡通路的影响。分为正常对照组（Control）、空载对照组（LV-NC）、空载模型组（LV-NC-Model, LV-C-M）、GPX4 过表达模型组（LV-GPX4+/+-M）、空载+RSL3 模型组（LV-NC-RSL3-M）-/-损伤组共 5 组。D-GalN/LPS 建立损伤模型，24 小时收集样本进行以下指标检测：

①cck8 法测定各组细胞生存率；

②全自动生化仪检测细胞上清液 ALT、LDH；

③根据试剂盒说明检测氧化应激相关指标：裂解细胞检测超氧化物歧化酶（Superoxide Dismutase, SOD）、谷胱甘肽过氧化物酶（glutathion peroxidase, GSH-PX）、过氧化氢酶（catalase, CAT）活性及丙二醛（malondialdehyde, MDA）含量。

④qRT-PCR 和 Western Blot 检测细胞 Caspase1、Caspase11、GSDMD mRNA 表达。

⑤Western blot 检测 Caspase1、Caspase11、GSDMD 蛋白表达。

3. GPX4 与 GSDMD 相互作用机制研究

3.1 免疫荧光共定位：红-绿荧光双染色，激光共聚焦免疫荧光共定位观察 GPX4 蛋白与 GSDMD 蛋白位置关系，Image J 软件计算皮尔森系数计算两者相关性。

3.2 蛋白质免疫共沉淀（Co-Immunoprecipitation, CoIP）检测 GPX4 蛋白与 GSDMD 蛋白作用关系。

3.3 质谱分析进一步验证两者关系。

贵州省科学技术厅

三、项目（课题）考核指标

(一) 量化考核指标					
1. 科技产出					
论文（篇）	期刊	国际	国内		省级
	核心期刊	1	1		0
	一般期刊	0	0		0
报告（篇）	科技报告	研究报告	科技成果转化报告		其他报告
	0	0	0		0
专著（部）	0				
知识产权（件）	专利	发明	实用新型	外观设计	PCT
	申请(受理)数	0	0	0	0
	授权数	0	0	0	0
	其他	软件著作权	集成电路布图设计	植物新品种	
	申请数	0	0	0	
	登记数	0	0	0	
标准（项）	标准分类	国家标准	行业标准	地方标准	企业标准
	牵头	0	0	0	0
	参与	0	0	0	0
中试线（条）	0				
生产线（条）	0				
累计新增销售收入（万元）	0				
累计新增利税（万元）	0				
2. 研发服务能力					
培养、引进人才（人）	培养高级职称以上		培养中级职称以上	引进高级职称以上	
	0		1	0	
引进新产品、新技术、新材料情况	新产品（种）	新技术（项）		新工艺（项）	新材料（项）
	0	0		0	0

其他指标	支撑平台（个）	试验基地（个）	示范点（区）（个）
	0	0	0
（二）其他主要技术经济指标及社会效益			
1. 阐明细胞焦亡在急性肝衰竭时肝细胞大量死亡及剧烈炎症反应中的作用机制，为急性肝衰竭发病机制提供新思路。 2. 明确 GPX4 通过负调控 GSDMD 抑制肝细胞焦亡减轻急性肝衰竭的作用机制，为药物研制及开发寻找有效干预靶点。 3. 发表核心论文 2 篇，其中国际核心期刊 1 篇，IF>3 分，国内核心期刊 1-2 篇。 4. 项目组 1 人晋升中级职称。			



四、项目（课题）进度

(一) 项目（课题）起止时间：2020-01-01——2022-12-31	
(二) 项目（课题）实施进度目标	
开始日期—结束日期	阶段目标（限 500 字）
2020-01-01-2022-12-31	1) 2020 年 1 月 1 日-2020 年 3 月 检索文献，完善研究思路与方法，优化实验方案，完成相关综述；完成 ALF 动物模型，检测细胞焦亡 ALF 的相关性。 2) 2020 年 3 月-2020 年 9 月 建立 GPX4 慢病毒过表达小鼠，结束急性肝衰竭动物实验，完成相关指标检测。 3) 2020 年 10 月-2021 年 2 月 启动体外研究，建立人 HL7702 肝细胞损伤模型，完成体外 GPX4 与 GSDMD 作用关系证明实验部分。 4) 2021 年 3 月-2022 年 1 月 分析总结资料，根据需要适当调整研究方案及补充实验，整理、统计数据，撰写、发表相关论文。 5) 2022 年 2 月-2022 年 12 月 根据杂志修稿意见，补充必要的实验。
-	



五、承担/参与单位工作分工及经费分配

承担/参与单位名称(盖章)	工作分工	总经费分摊(万元)	省科技厅经费分配(万元)
贵州医科大学	负责项目全部考核指标	10	10
合计		10	10



六、项目（课题）经费预算

单位：万元

经费来源预算			经费支出预算			
科 目	预算数		科 目	预算数	专项经费	自筹经费
来源预算合计	10		支出预算合计	10	10	0
一、省科技计划拨款	年度	拨款金额	一、直接费用	10	10	0
	2020	10				
	合计	10				
二、国家其它拨款	0		1. 设备费	1.5	1.5	0
三、部门拨款	0		（1）购置设备费	0	0	0
四、地方拨款	0		（2）试制设备费	0	0	0
			（3）设备改造与租赁费	1.5	1.5	0
			2. 材料费	5.61	5.61	0
			3. 测试化验加工费	0.27	0.27	0
			4. 燃料动力费	0	0	0
			5. 差旅费/会议费/国际合作与交流费	0.42	0.42	0
			6. 出版/文献/信息传播/知识产权事务费	0.2	0.2	0
			7. 劳务费	2	2	0
			8. 专家咨询费	0	0	0
			9. 其他支出	0	0	0
			二、间接费用	0	0	0
			其中：绩效支出	0	0	0

七、大型仪器设备购买清单（20 万元以上/台·套）

序号	仪器名称及规格型号	数量	单价	金额(万元)	资金来源	用途
合计（万元）				0		



八、完成人员信息

(一) 项目负责人:								
姓名	职务	手机号码	职称	学位	学历	在项目(课题)中承担的任务	所在单位	签名
李宏	无	66	副高	硕士	研究生	项目设计及实施, 论文撰写	贵州医科大学	
(二) 主要完成人员:								
姓名	手机号码	职称	学位	学历	在项目(课题)中承担的任务	所在单位	签名	
程明亮		正高	学士	本科	方案指导	贵州医科大学		
罗天永		正高	学士	本科	方案实施进度监控及结果汇总、分析	贵州医科大学		
谢静		中级	学士	本科	数据统计分析	贵州医科大学		
陈良琪		初级	学士	本科	细胞培养、PCR	贵州医科大学		
汪娅		其他	硕士	研究生	western blot、PCR	贵州医科大学		
李璨		其他	硕士	研究生	流式细胞技术	贵州医科大学		

九、签署栏

贵州省科学技术厅（甲方）（公 章）

负责人（签字）年 月 日

项目（课题）承担单位（乙方）

项目（课题）负责人（签字）（公 章）

财务负责人（盖章）年 月 日

帐 户 名：贵州医科大学

帐 号：521142000012015012236

开户银行：交通银行贵阳相宝山支行



资金等匹配条件落实保证方贵州省科学技术厅

乙方主管部门或市（州）科技局（公 章）

负责人（签字）年 月 日

填 写 说 明

1. 本任务书系贵州省科学技术厅为贵州省科技计划项目（课题）而设计，任务书甲方为贵州省科学技术厅，乙方为项目（课题）承担/参与单位。
2. 本任务书一式四份，由贵州省科学技术厅与项目（课题）承担单位签订，项目（课题）承担/参与单位二份，贵州省科学技术厅二份。
3. 任务书采用 A3 双面打印填报，中缝装订。
4. 任务书合同编号由贵州省科学技术厅统一编写。
5. 按照省政府“五码合一”的要求，“组织机构代码”栏可填写组织机构代码或社会信用代码。
6. “承担/参与单位名称”须单位盖章，“人员信息”中“项目负责人”和“主要研究开发人员”须由相关人员签字。

贵州省科学技术厅

附：项目（课题）实施内容、考核指标及相关填写说明

1. 研发及成果转化类项目

项目（课题）实施内容说明：填写主要研究开发及成果转化内容，预期突破行业领域核心技术情况，采取的技术路线及其可行性研究等。

2. 创新载体建设类项目

项目（课题）实施内容说明：实现的科研条件建设、研发能力建设、人才团队建设目标，对区域、产业发展的带动作用 and 实现的经济社会效益等方面进行阐述。

考核指标说明：主要包括平台或园区申请及授权的各种专利、新技术、新产品等；经济指标为园区核心区企业数量、规模、研发能力、效益及带动示范区、辐射区的情况；管理指标为园区管理架构、管理制度等。

3. 创新平台建设类项目

项目（课题）实施内容说明：实现的科研条件建设（研究室及开放平台）、研发能力建设、人才团队培养和引进、运行机制与条件保障、主要研究方向等方面进行阐述。

考核指标说明：在“其他主要技术经济指标及社会效益”处填写基础能力（仪器设备、科研用房、依托单位投入）提升情况、设立实验室开放基金、相关人才计划、开展学术交流情况。

4. 软科学项目

项目（课题）实施内容说明：实施内容包括研究内容（子课题设置）与方法、拟解决的关键问题、应用前景及创新之处等（对应申报书可行性报告有关内容）。

考核指标说明：包括预期研究成果形式、预期成果描述等（对应申报书项目预期成果及形式有关内容，分别在“其他主要技术经济指标及社会效益”处填写预期研究成果形式决策咨询报告（篇）（至少1篇）、决策咨询报告（篇）（至少1篇）、研究中期报告（篇）、研究分报告（篇）、调研报告（篇）和在“其他主要技术经济指标及社会效益说明”处填写预期成果描述内容）。

5. 人才类项目

项目（课题）实施内容说明：培养对象在培养期内围绕主攻方向开展创新、研发工作，并描述此方向在本领域或行业中的现状和趋势；写明个人（团队）在培养期内开展和掌握1-2项本学科领域领先（先进）技术（理论），提出具体工作方案、工作量等。

考核指标说明：在“其他主要技术经济指标及社会效益”中写明入选省部级以上人才计划及学术团体任职情况，开展学术交流的情况，人才团队建设情况，承担课题情况。

经费预算说明：经费预算无法归集到相应科目中，列入“其他支出”。

6. 其他项目类别。



合同号: gyfybsky-2021-28

财务编码: J-2021-28

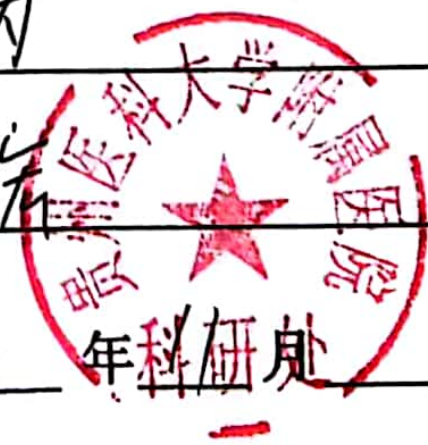
贵州医科大学附属医院
科研经费收支登记本

题名称 2021年博士科研启动基金

费总额 10万元 经费来源 院内

究部门 感染科 课题负责人 李宏

题起止时间 2021 年 11 月 日至 2024 年 科研处 日



附件 1

2019 年贵州省卫生健康委科学技术基金项目

申 请 书

申报学科：传染病学

项目名称：NLRP3/Caspase4/GSDMD 信号通路介导的细胞焦亡
在慢加急性肝衰竭中的作用机制研究

申请 者：李宏

工作单位：贵州医科大学附属医院

通讯地址：贵州医科大学附属医院感染科

联系方式 手机：[REDACTED] 座机：[REDACTED]

起止年限：2019 年 12 月 5 日-2021 年 12 月 31 日

申请日期：2019 年 5 月 12 日

贵州省卫生健康委

2019 年 制



一、项目申报简要信息

研 究 项 目	名 称	中文	NLRP3/Caspase4/GSDMD 信号通路介导的细胞焦亡在慢加急性肝衰竭中的作用机制							
		英文	The mechanism of NLRP3/Caspase4/GSDMD pathway mediated pyroptosis in acute-chronic liver failure							
	申报单位	贵州医科大学附属医院				申请金额	2 (万元)			
	申报学科	传染病学		拟完成的成果形式 (论著或专著)		论著				
	申报年度	2019		实施年限		2019 年 12 月—2021 年 12 月				
申 请 者	姓 名	李宏	性别	女		出生年月	[REDACTED]			
			身份证号	[REDACTED]		民 族	汉			
	职 称	副主任医师		学 历	硕士		专 业	传染病学		
	所 在 单 位	名 称	贵州医科大学附属医院				系、所、 科 室	感染科		
		性 质	事业单位		申请者电话		[REDACTED]			
		详细地址	贵州医科大学附属医院			E-mail	625062102@qq.com			
项 目 组	总人数	高级	中级	初级	博士后	博士生	硕士生	参加单位数		
	7	3	2	1			1	1		
	主要成员 (不含申请者)	姓 名	身份证号	性 别	年 龄	专业技术 职务	专 业	工作单位	项目中的 分工	签字
		吴君	[REDACTED]			高级	传染病学	贵州医科大学附属医院	方案设计	[REDACTED]
		罗天永				高级	传染病学	贵州医科大学附属医院	进度监管	[REDACTED]
		徐佳				中级	传染病学	贵州医科大学附属医院	标本采集	[REDACTED]
		李杨				中级	传染病学	贵州医科大学附属医院	数据分析	[REDACTED]
		陈良琪				初级	传染病学	贵州医科大学附属医院	流式检测	[REDACTED]
汪娅				硕士生	传染病学	贵州医科大学附属医院	细胞实验	[REDACTED]		



八、市（州）卫生健康局或主管部门审核意见

单位负责人（签章）

（公章）

日期： 年 月 日

九、省卫生健康委审批意见

单位负责人（签章）：

（公章）

日期： 年 月 日



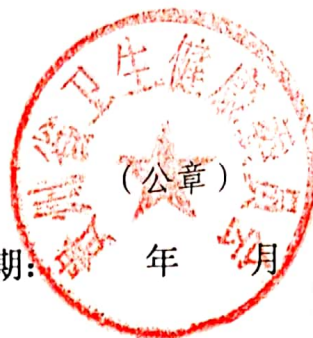
十、签订协议

省卫生健康委（甲方）：

请按该课题制定的研究内容、研究目的、研究方法、技术路线、研究进度和预期研究结果等，在规定时间内，按时完成课题研究工作和结题工作。

负责人（签章）：

日期： 年 月 日



项目承担单位（乙方）：

单位负责人（签章）：



日期： 年 月 日



项目负责人（丙方）：

项目负责人签字：

李

日期： 年 月 日

说明：该协议由省卫生健康委与当年获立项的项目负责人及承担单位

签定



研究 内 容 和 意 义	摘 要	慢加急性肝衰竭 (Acute-on-chronic liver failure, ACLF) 是我国肝衰竭中最主要的临床类型, 其病情进展迅速, 死亡率高达 30%-60%。采用消除病因、调节免疫及防治并发症等多方面综合治疗收效甚微, 其原因在于病程中肝细胞持续性死亡机制未彻底阐明。细胞焦亡这一高度细胞炎性死亡方式更好地解释了 ACLF 时“雪崩式”肝细胞大量死亡和“瀑布样”剧烈炎症反应。 我们前期研究发现: 1. ACLF 患者肝组织中细胞焦亡执行蛋白 GSDMD 表达较健康对照组显著增加; 2. 30 例 ACLF 患者外周血清检测细胞焦亡下游炎性细胞因子 IL-1β、IL-18 较健康对照组数十倍升高。说明细胞焦亡与 ACLF 发生发展密切相关。本项目拟采用分子生物学、蛋白组学技术、流式技术等从人体组织学、细胞学多层次证明: 1. 细胞焦亡是 ACLF 中肝细胞死亡的重要方式及继发“瀑布样”全身炎症反应的重要机制之一。2. NLRP3/Caspase4/GSDMD 通路介导的非经典焦亡通路可能是 ACLF 时肝细胞焦亡的重要机制。	
	主题词	中文	慢加急性肝衰竭; 细胞焦亡; 炎症反应; NLRP3/Caspase4/GSDMD 信号通路
		英文	Acute-on-chronic liver failure; Pyroptosis; inflammation response; NLRP3/Caspase4/GSDMD pathway

注: 1. 此表必须逐项认真填写, 采用国家公布的标准简化汉字。

2. 项目名称能确切反映研究内容, 最多不超过二十五个汉字 (包括标点符号)。

3. 申报学科填写要和扉页相对应。

4. 申请金额以万元为单位, 用阿拉伯数字表示, 注意小数点。(申请金额原则上不超过 5 万元)

5. 专业指长期从事技术岗位和研究的专业, 最多不超过十个汉字。

6. 参加单位数指研究项目组主要成员所在单位数, 包括主持单位和合作单位 (合作者所在单位), 以阿拉伯数字表示。

7. 项目组主要成员指每年参加研究工作四个月以上、在项目组内起主要作用的人员, 最多填写 7 人, 要求本人签章。

8. 摘要 500 字以下 (不含标点符号)。

9. 主题词数量不多于五个, 主题词之间用分号分开。



合同书编号:

贵州医科大学附属医院
2020年国家自然科学基金培育项目
合 同 书

项目名称: 曲美他嗪调控 P53/GPX4/GSDMD 通路介导的铁死亡-焦亡正反馈回路干预急性肝衰竭的机制研究



主 持 人: 李宏

科 室: 感染科

联系电话: [REDACTED]

邮 箱: 625062102@qq.com

起止时间: 2020 年 7 月 至 2023 年 7 月



扫描全能王 创建

一. 基本信息

个人基本信息	姓 名	李宏	性别	女	出生年月				
	学 位	博士	职称	副主任医师	民族	汉			
	电 话		科室	感染					
	邮箱	625062102@qq.com							
	主要研究领域	肝衰竭							
项目基本信息	项目名称	曲美他嗪调控 P53/GPX4/GSDMD 通路介导的铁死亡-焦亡正反馈回路干预急性肝衰竭的机制研究							
	英文名称	Study on the mechanism of trimetazidine regulating P53/GPX4/GSDMD pathway in the intervention of Ferroptosis-Pyroptosis positive feedback loop mediated by P53/GPX4/GSDMD pathway in acute liver failure							
	研究期限	2020年7月至2023年7月							
	资助金额 (万元)	5. 0							
结题指标		1. 完成3区以上SCI论著1篇 2. 完成项目研究内容							
中文关键词		曲美他嗪, 急性肝衰竭, P53/GPX4/GSDMD, 铁死亡, 焦亡,							
英文关键词		trimetazidine,acute liver failure,P53/GPX4/GSDMD,ferroptosis,pyroptosis							



二、研究摘要（600字）

急性肝衰竭（ALF）死亡率高达 70% 以上，其原因在于发病机制未彻底阐明。铁死亡与焦亡是近年新发现的细胞死亡方式，介导不同的免疫效应。本课题组前期证明 GSDMD 介导的肝细胞焦亡是 ALF 时肝细胞死亡及继发炎症风暴的重要机制之一，曲美他嗪可通过上调谷胱甘肽过氧化物酶 4（GPX4）表达而抑制焦亡减轻 ALF。体外实验进一步研究发现抑制 GPX4 诱发铁死亡可强烈上调 GSDMD 的表达，说明铁死亡与焦亡形成正反馈回路导致 ALF 病情恶化。P53 对铁死亡的调控机制近期已有报道，本项目拟在前期基础上，进一步从细胞实验、动物实验、基因水平、蛋白水平探讨曲美他嗪通过调控 P53/GPX4/GSDMD 介导的铁死亡-焦亡正反馈回路改善 ALF 的作用机制，以进一步阐明急性肝衰竭的发病机制并为曲美他嗪在 ALF 中的临床应用提供理论基础。





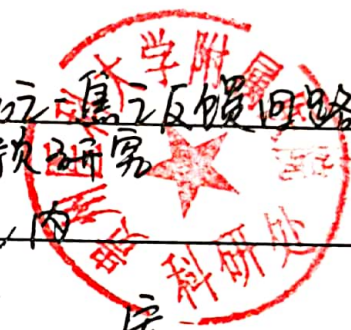
三、项目组主要参与者（注：项目组主要参与者不包括项目主持人）

编号	姓名	出生年月	性别	职 称	学 位	单位名称	电话	电子邮箱	身份证号码
1	程明亮			主任医师	学士	贵州医科大学附属医院		chengml@21. cn	
2	陆爽			副主任医师	博士	贵州医科大学附属医院		lushuang73@163. com	
3	乔里			技师	硕士	贵州医科大学附属医院		412129171@qq. com	
4	申晓旭			医师	硕士	贵州医科大学附属医院		512916746@qq. com	
5	赵文静			医师	硕士	贵州医科大学附属医院		1275821126@qq. com	
6	刘德康			医师	硕士	贵州医科大学附属医院		1659684412@qq. com	
7	汪娅			研究生	硕士	贵州医科大学		1052535767@qq. com	
8									
总人数			高级		中级	初级	博士后	博士生	硕士生
8			3		0	4	0	0	1

财务编码: I-2020-12

贵州医科大学附属医院
科研经费收支登记本

课题名称 SIRT1 调控 P53/GPX4/GSDMD 介导的细胞凋亡及反馈回路在急性
肝衰竭中的作用机制及曲美他嗪的干预研究
经费总额 伍万圆整 经费来源 院内
研究部门 感染科 课题负责人 李宏
课题起止时间 2020 年 9 月 1 日至 2023 年 8 月 31 日





申请代码	H0318
接收部门	
收件日期	
接收编号	8206030737



国家自然科学基金 申 请 书

(2020 版)

资助类别：	地区科学基金项目		
亚类说明：			
附注说明：			
项目名称：	SIRT1调控P53/GPX4/GSDMD介导的铁死亡-焦亡正反馈回路在急性肝衰竭中的作用机制及曲美他嗪的干预研究		
申 请 人：	李宏	电 话：	
依托单位：	贵州医科大学		
通讯地址：	贵州省贵阳市贵医街28号		
邮政编码：	550004	单位电话：	0851-88416078
电子邮箱：	625062102@qq.com		
申报日期：	2020年04月09日		

国家自然科学基金委员会



基本信息

申请人信息	姓名	李宏	性别	女	出生年月		民族	汉族
	学位	硕士	职称	副主任医师	每年工作时间（月）	8		
	是否在站博士后	否	电子邮箱	625062102@qq.com				
	电话		国别或地区	中国				
	个人通讯地址	贵州省贵阳市贵医街28号						
	工作单位	贵州医科大学/附属医院						
	主要研究领域	肝衰竭						
依托单位信息	名称	贵州医科大学						
	联系人	李一欣	电子邮箱	lxy918@163.com				
	电话	0851-88416078	网站地址	www.gmc.edu.cn				
合作研究单位信息	单位名称							
项目基本信息	项目名称	SIRT1调控P53/GPX4/GSDMD介导的铁死亡-焦亡正反馈回路在急性肝衰竭中的作用机制及曲美他嗪的干预研究						
	英文名称	SIRT1 regulate P53/GPX4/GSDMD-mediated ferroptosis-pyroptosis positive feedback loop in acute liver failure and the intervention of trimetazidine						
	资助类别	地区科学基金项目				亚类说明		
	附注说明							
	申请代码	H0318. 肝再生、肝保护、肝衰竭、人工肝						
	基地类别							
	研究期限	2021年01月01日 -- 2024年12月31日				研究方向：肝衰竭		
	申请直接费用	37.9500万元						
中文关键词		急性肝衰竭；铁死亡；焦亡；SIRT1；曲美他嗪						
英文关键词		acute liver failure; ferroptosis; pyroptosis; SIRT1; trimetazidine						



中文摘要	急性肝衰竭（ALF）死亡率高达70%以上，其原因在于发病机制未彻底阐明。铁死亡与焦亡是近年新发现的细胞死亡方式，介导不同的免疫效应。本课题组前期证明GSDMD介导的肝细胞焦亡是ALF时肝细胞死亡及继发炎症风暴的重要机制之一，曲美他嗪可通过上调谷胱甘肽过氧化物酶4（GPX4）表达而抑制焦亡减轻ALF。体外实验进一步研究发现抑制GPX4诱发铁死亡可强烈上调GSDMD的表达，说明铁死亡与焦亡形成正反馈回路导致ALF病情恶化。P53对铁死亡的调控机制近期已有报道，本项目拟在前期基础上，进一步利用基因敲除小鼠、体外慢病毒感染过表达和敲减靶点基因等方法，探讨SIRT1对P53/GPX4/GSDMD介导的铁死亡-焦亡正反馈回路的调控机制及曲美他嗪的作用，以进一步阐明急性肝衰竭的发病机制和干预靶点并为曲美他嗪在ALF中的临床应用提供理论基础。
英文摘要	The mortality rate of acute liver failure (ALF) is over 70%, the mechanism of hepatocyte death has not been fully studied. Ferroptosis and pyroptosis are two newly types of cell death, mediate different effects. Previously we demonstrated that GSDMD-mediated pyroptosis is one of the important mechanisms of hepatocyte death and inflammatory storm in ALF, and trimetazidine alleviate ALF by upregulating glutathione peroxidase 4 (GPX4) to inhibit pyroptosis. ferroptosis can strongly up-regulate the expression of GSDMD, indicating that ferroptosis and pyroptosis form a positive feedback effect of inflammation. Ferroptosis is regulated by P53 has been reported in recent. Our project is based on the pre-experiment, the use of gene knockout mice in vivo and lentivirus in vitro, explore the SIRT1 of P53 / GPX4 / GSDMD mediated ferroptosis - pyroptosis regulatory mechanism of positive feedback signal and the intervention effect of trimetazidine, further clarify the pathogenesis of acute liver failure and intervention targets, provide theoretical basis of trimetazidine for application in ALF.



项目组主要参与者（注：项目组主要参与者不包括项目申请人）

编号	姓名	出生年月	性别	职 称	学 位	单位名称	电话	电子邮箱	证件号码	每年工作 时间（月）
1	程明亮		男	主任医师	学士	贵州医科大学		ngml@21cn.com		4
2	韩民		男	副主任医师	学士	贵州医科大学		582096@qq.com		4
3	乔里		男	技师	硕士	贵州医科大学		129171@qq.com		6
4	申晓旭		女	医师	硕士	贵州医科大学		916746@qq.com		6
5	赵文静		女	医师	硕士	贵州医科大学		5821126@qq.co		6
6	汪娅		女	硕士生	学士	贵州医科大学		2535767@qq.co		8

总人数	高级	中级	初级	博士后	博士生	硕士生
7	3	0	3	0	0	1



国家自然科学基金项目资金预算表（定额补助）

项目编号：8206030737

项目负责人：李宏

金额单位：万元

序号	科目名称	金额
	(1)	(2)
1	项目直接费用合计	37.9500
2	1、设备费	3.6000
3	(1)设备购置费	0.00
4	(2)设备试制费	0.00
5	(3)设备升级改造与租赁费	3.60
6	2、材料费	25.17
7	3、测试化验加工费	1.60
8	4、燃料动力费	0.00
9	5、差旅/会议/国际合作与交流费	1.40
10	6、出版/文献/信息传播/知识产权事务费	3.30
11	7、劳务费	2.88
12	8、专家咨询费	0.00
13	9、其他支出	0.00



预算说明书（定额补助）

（请按照《国家自然科学基金项目预算表编制说明》等的有关要求，对各项支出的主要用途和测算理由，以及合作研究外拨资金、单价≥10万元的设备费等内容进行必要说明。）

一、直接费用：37.95 万元

1、设备费：临床医学研究中心各平台租赁费用 500 元/月/人/平台×3 平台/月×24 月总计 3.6 万元。

2、材料费：25.17 万元

（1）动物实验 6.3 万元

C57BL/6 小鼠 40 只×40 元/只=1600 元，P53 基因敲除小鼠（3.5 万元），GSDMD 基因敲除小鼠（已有，无需另购），动物房饲养、饲料、垫料等约 8000 元，抑制剂 3000 元/支×3 支=9000 元，D-氨基半乳糖（sigma）3500 元/瓶×2 瓶=7000 元，脂多糖（sigma）1200 元/支×2 支=2400 元。

（2）细胞实验 6.46 万元

AML12 细胞株（已有，无需另购）；慢病毒包装过表达质粒及 siRNA：12000/个×4 个=48000
GibcoDMEM-F12 培养基：110 元/瓶×60 瓶=6600 元；Gibco 胎牛血清：5000 元/瓶×2 瓶=10000 元。

（3）Western blot 蛋白检测 7.95 万元

蛋白抽提试剂：500 元/支×6 支=3000 元；BCA 蛋白定量试剂盒：300 元/支×10 支=3000 元；蛋白分子 marker：500 元/支×6 支=3000 元；一抗抗体：3500 元/支×10 支=35000 元；二抗抗体：1000 元/支×6 支=6000 元；电泳液+电转液：1500 元/份×50 份=7500 元；PVDF 膜：1000 元/张×5 张=5000 元；ECL 化学发光试剂：1000 元/瓶×5 瓶=5000 元；PAGE 胶：1000 元/瓶×5 瓶=5000 元；TBST、甲醇等其他试剂：7000 元。

（4）RT-PCR 检测 2.96 万元

RNA 抽提试剂盒：1200 元/份×8 份=9600 元

RNA 反转录试剂盒：500 元/份×8 份=4000 元

RT-PCR 扩增试剂盒：2000 元/份×8 份=16000 元。

（5）流式及 ELISA 试剂盒 0.7 万元

流式多因子试剂盒 800 元/因子×5 因子=4000 元，氧化应激指标（SOD、GSH、CAT、MDA）试剂盒 500 元/个×4 个=2000 元

（6）耗材费 0.80 万元

各种枪头、培养皿、冻存盒、冻存管、EP 管、巴氏管、冻存盒、口罩、手套等实验室常用耗材。

3、测试化验加工费：1.60 万元

生化检测：100 元/样本×40 个=4000 元；肝组织切片 HE 染色及免疫组化：100 元/样本×40 个=4000 元，数据统计分析由贵州医科大学统计学教研室完成，0.8 万元。

4、燃料动力费：无

5、差旅/会议/国际合作与交流费：1.4 万元

2 人次/年，每次 3000-4000 元，共 2 年，合计：3500×2 人次/年×2 年=14000 元。

6、出版/文献/信息传播/知识产权丧失费：3.3 万元

发表中英文期刊论文 2-3 篇，每篇版面费 3000 元，合计 9000 元；发表 SCI 论文 1-2 篇，每篇版面费 12000 元，合计：24000 元。

7、劳务费：2.88 万元

3 人/年，平均每年工作 6 个月，800 元/月，共 2 年，合计：4800×3 人次/年×2 年=28800 元。

8、专家咨询费：无

9、其他支出：无



报告正文

参照以下提纲撰写，要求内容翔实、清晰，层次分明，标题突出。

请勿删除或改动下述提纲标题及括号中的文字。

（一）立项依据与研究内容（建议 8000 字以下）：

1. 项目的立项依据（研究意义、国内外研究现状及发展动态分析，需结合科学研究发展趋势来论述科学意义；或结合国民经济和社会发展中迫切需要解决的关键科技问题来论述其应用前景。附主要参考文献目录）；

1.1 细胞铁死亡、焦亡在急性肝衰竭中的研究进展

急性肝衰竭（acute liver failure, ALF）是指由药物、毒物、病毒、代谢等多种因素引起肝细胞大面积坏死，出现以黄疸、肝性脑病、脓毒血症、凝血功能障碍、多器官功能衰竭等为主要表现的严重临床综合征^[1]。急性肝衰竭病情凶险，发展迅猛，非肝移植患者死亡率高达 70%以上，而肝移植限于供体匮乏及昂贵的医疗费用至今无法广泛开展^[2]，急性肝衰竭的临床治疗长期处于无药可医，无肝可移的困境中。

肝细胞不可控式大规模死亡并继发炎症风暴是急性肝衰竭的核心事件^[3]。长期以来的研究一直认为坏死和凋亡是急性肝衰竭时肝细胞的主要死亡方式，然而 Dara 等在对乙酰氨基酚（Acetaminophen, APAP）诱导的小鼠急性肝衰竭模型中发现，敲除掉坏死通路关键的两个基因—受体相互作用蛋白酶 3(receptor interacting Protein kinase, RIPK3)和混合谱系激酶结构域样蛋白（Mixed lineage kinase domain-like Protein, MLKL）的小鼠生存率并没有明显提高^[4]。此外，针对凋亡的靶点抑制剂在急性肝衰竭的干预中并未取得实质性突破，说明急性肝衰竭时的肝细胞死亡方式还有待进一步深入研究。

铁死亡(Ferroptosis)和焦亡（Pyroptosis）是近年新发现的两种非凋亡形式的调节性细胞死亡方式，并以其介导的不同免疫学效应在各种疾病中产生不同作用^[5]。

铁死亡在形态学上铁死亡表现为细胞膜不破裂但膜上起泡、线粒体膜密度增加且外膜破裂、线粒体嵴减少或消失^[6]。在生化特征上主要以细胞内铁过载和谷胱甘肽过氧化物酶 4(Glutathione peroxidase 4, GPX4)活性下降而导致活性氧(reactive oxygen species, ROS)大量产生为特征。目前已知的铁死亡信号通路主要有胱氨酸/谷氨酸逆向转运体系(system Xc-)/GPX4 途径、铁代谢途径和酯酰基辅酶 A 合成酶 4 (AcylcoA synthetase long-chain family member4, ACSL4)脂质代谢途径^[7]。system Xc-是一种膜 Na⁺ 依赖性胱氨酸-谷氨酸交换转运体,由轻链亚基(SLC7A11)和重链亚基(SLC3A2)组成的二硫键异二聚体^[8], GPX4 是一种可将还原型 GSH 转化为氧化型 GSH, 抑制脂质过氧化反应的酶, 抑制 system Xc-可造成 GPX4 活性下降, 使 ROS 积累导致铁死亡^[9]。

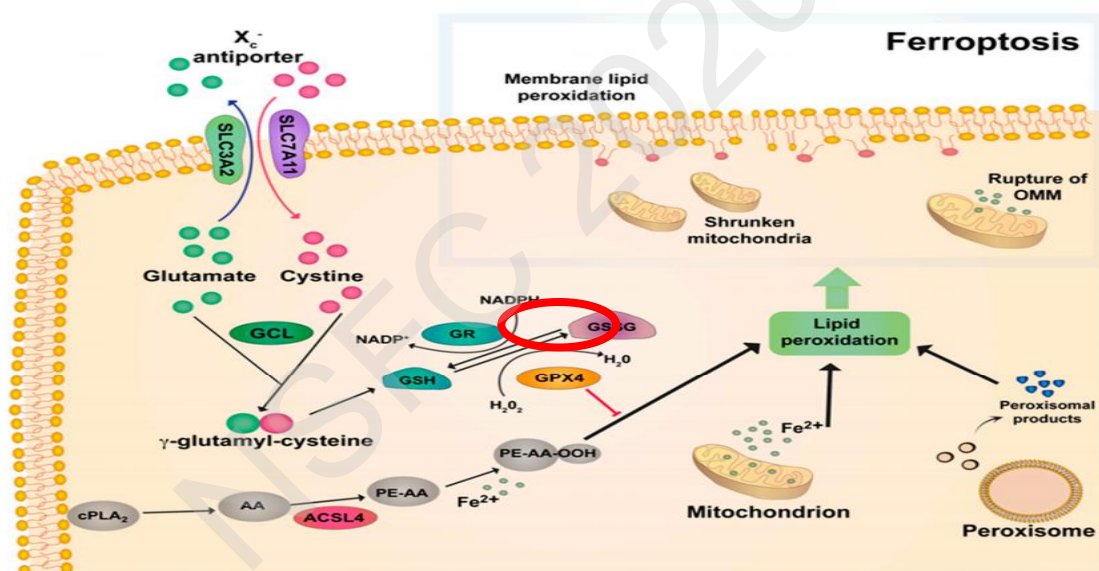


图 1 铁死亡发生机制示意图^[9]

Fig.1 Schematic diagram of the mechanism of Ferroptosis^[9]

目前,铁死亡的研究主要是在肿瘤、肾脏疾病和神经系统三类疾病^[10,11,12],但也逐渐发现铁死亡在血色病肝损伤、病毒性肝炎、酒精性肝炎、原发性肝癌等多种肝脏疾病中发挥了重要作用^[13,14,15,16]。Naoya 等在 APAP 诱导的小鼠急性肝衰竭模型中研究发现,抑制铁死亡通路表达可显著减轻 APAP 诱导的急性肝衰竭^[17]。Wang 等在 D-氨基半乳糖和脂多糖诱导的急性肝衰竭小鼠模型中也发现肝组织 GPX4、GSH 均显著降低,使用 HMGB1 抑制剂可通过提高 GPX4 及 GSH 而



减轻肝损伤提高小鼠生存率^[18]，这些结果说明铁死亡与肝损伤、急性肝衰竭关系密切^[19]。

细胞焦亡是机体重要的先天防御免疫之一，也是一种可诱发剧烈炎症反应的炎性细胞死亡方式^[20]。当细胞接收到内、外源性危险信号时，胞膜表面的模式识别受体通过识别病原、损伤相关分子模式启动一系列信号级联反应，活化多种炎症小体以激活胞内炎性半胱氨酸酶（cysteiny l aspartate specific Proteinase, Caspase）1、4/5（人）、11（鼠），进而将焦亡执行蛋白 GSDMD 精准切割为活性 N 端与非活性 C 端两个片段，N 端活性片段从胞浆移位插入内侧胞膜，形成大量筛状胞膜孔洞，造成细胞内容物、IL-1 β 和 IL-18 释放到胞外，招募免疫细胞定向迁移至损伤部位介导继发免疫损伤^[21]（焦亡发生机制见图 2）。适度的细胞焦亡可清除被病原体感染的细胞，而过度发生的细胞焦亡所释放的大量炎性因子已被证明是多种炎症疾病的重要机制之一。Khanova 和 Xu 分别通过体内外实验证明了焦亡是重度酒精性和非酒精性脂肪性肝炎时肝脏炎症活动的重要机制之一^[22,23]。

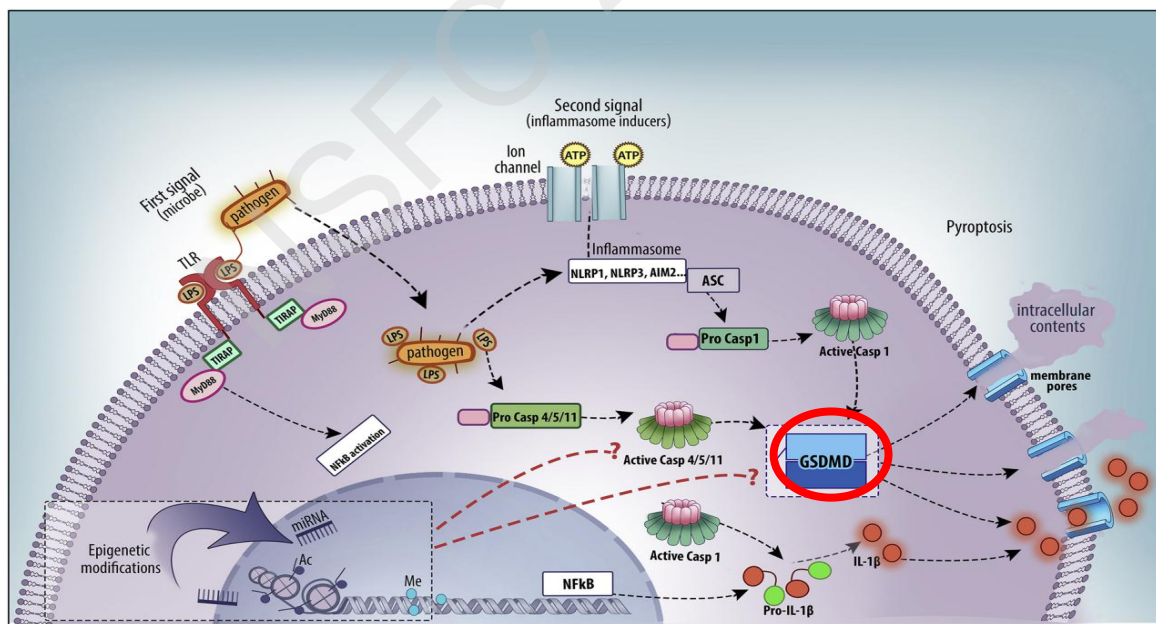


图 2 细胞焦亡发生机制示意图^[21]

Fig.2 Schematic diagram of the mechanism of pyroptosis^[21]

我们课题组前期研究发现：与正常人比较，急性肝衰竭患者肝组织中焦亡通路 Caspase1、Caspase4 及 GSDMD 蛋白表达明显增加，血清中焦亡下游炎性因子 IL-1 β 、IL-18 显著升高。在 D-氨基半乳糖/脂多糖诱导的 AML12 肝细胞损伤

模型中,随着损伤时间的延长,GSDMD 蛋白表达逐渐增加,细胞抑制率明显升高,但在细胞培养上清液中并未检测到 IL-1 β 和 IL-18,而是发现单核细胞趋化趋化因子 1 (monocyte chemoattractant protein 1, MCP1) 含量增加且与 GSDMD 表达上调一致。通过体外 GSDMDshRNA 转染肝细胞及 D-氨基半乳糖/脂多糖诱导的野生型与 GSDMD 基因敲除小鼠急性肝衰竭动物模型,我们进一步证明了肝细胞焦亡与免疫细胞焦亡释放 IL-1 β 及 IL-18 介导炎症反应的机制不同,而是通过上调 MCP1 及其配体 CCR2 招募巨噬细胞向肝脏定向迁徙介导剧烈炎症反应使急性肝衰竭病情恶化,敲减或敲除 GSDMD 抑制焦亡可显著减少肝细胞死亡、减轻肝脏炎症反应从而大幅度提高小鼠生存率(肝细胞焦亡在急性肝衰竭中的作用机制见图 3) [24]。

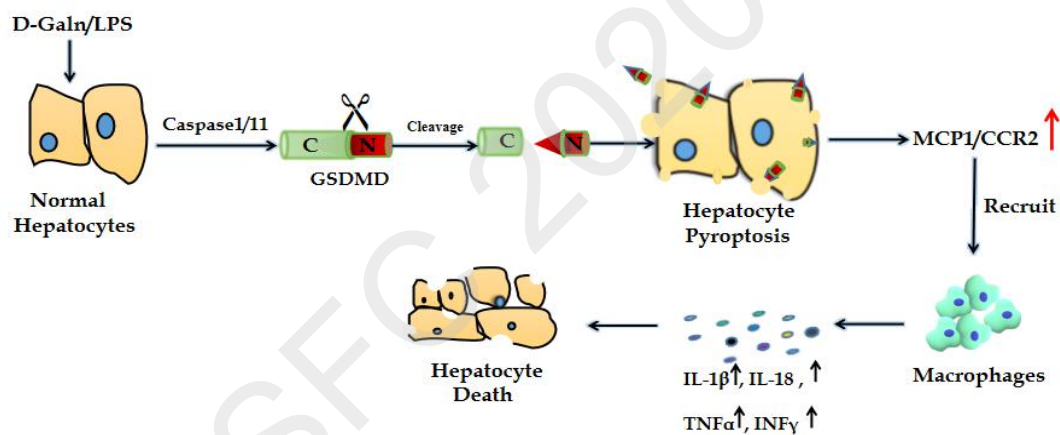


图 3 肝细胞焦亡在急性肝衰竭中的作用机制示意图

Fig.3 The mechanism of hepatocyte pyroptosis in acute liver failure

1.2 P53/GPX4/GSDMD 介导的铁死亡与焦亡正反馈信号回路研究

各种细胞死亡方式在疾病发生发展中具有不同的作用,可相互协同也可互相拮抗,其共同作用的结果决定了疾病的转归。铁死亡和焦亡作为新发现的两种细胞死亡方式,其相互联系及作用机制目前尚未见相关报道。

GPX4 是铁死亡的关键负调控基因,属于谷胱甘肽过氧化物酶(GPXs)家族成员之一,在氧化应激条件下,可直接清除线粒体中过多的氢过氧化物以减轻线粒体损伤,并可减少类二十烷醇生物和炎症细胞因子以减轻炎症反应保护机体免受损伤[25]。近年研究发现,除在铁死亡中发挥关键作用外,GPX4 对坏死、凋亡、自噬等多种细胞死亡方式有调节作用,如抑制 RIP3 依赖的坏死通路预防小鼠贫



血^[26],减少细胞过度自噬减轻缺氧调节下的视网膜色素上皮细胞损伤以及抑制成骨细胞凋亡改善骨质疏松等^[27]。Kang 等在体外实验中发现巨噬细胞过表达 GPX4 可抑制 Caspase-1、Caspase-11 的活性从而减少尼日利亚菌素诱导的巨噬细胞焦亡^[28],但并未阐明 GPX4 与焦亡执行蛋白 GSDMD 之间的关系。我们课题组前期使用曲美他嗪干预肝细胞损伤及急性肝衰竭小鼠模型中取得了较好的效果,发现其机制与上调 GPX4 的表达有关。我们进一步在细胞实验中利用慢病毒转染过表达 GPX4 及抑制 GPX4 的表达正反两方面进行验证,发现过表达 GPX4 可显著降低细胞抑制率,减少 GSDMD mRNA 及蛋白表达,而抑制 GPX4 可导致细胞抑制率显著升高, GSDMD 的 mRNA 的表达水平骤增三十余倍,蛋白表达显著增加,说明 GPX4 与 GSDMD 有显著的负调控作用关系,进一步通过共聚焦免疫荧光共定位及蛋白质免疫共沉淀技术,我们发现 GPX4 与 GSDMD 在蛋白水平有相互作用关系,意味着 GPX4 耗竭可使 GSDMD 显著上调触发细胞焦亡的发生,证明了铁死亡可促进焦亡发生。

p53 是一种众所周知的肿瘤抑制蛋白和转录因子,参与调节多种病理生理过程。生理条件下,各器官组织中 p53 主要通过 MDM2 介导的泛素化和降解途径维持在较低水平,而当细胞暴露于应激环境时, p53 蛋白可迅速蓄积并作用于下游靶点,直接或间接参与及调控自噬、凋亡等多种细胞死亡机制^[29]。P53 的激活是各种急慢性肝病持续进展的重要原因之一,但一直认为是由于其导致肝细胞过度凋亡所致^[30]。近年有少量研究发现, p53 也参与了对铁死亡和焦亡的调控。Jiang 等^[31,32]发现上调 p53 通过 SLC7 A11、GPX4 的 mRNA 和蛋白表达量显著降低而抑制 Cys 入胞,降低了 GSH 的合成,最终胞内活性氧堆积导致细胞死亡。Gupta 和 Zhang^[33,34]等发现上调 P53 可通过增加 Caspase1 的表达而促进肿瘤细胞焦亡。说明病理条件下, P53 的表达上调可通过耗竭 GPX4 使 GSDMD 表达增加而形成铁死亡-焦亡正反馈回路,寻找有效抑制 P53 的靶点可能具有同时抑制铁死亡及焦亡的作用。

沉默信息调节因子 2 同源蛋白 1 (silent mating type information regulation 2 homolog 1, SIRT1) 是一种烟酰胺腺嘌呤二核苷酸依赖性蛋白质脱乙酰基酶,在细胞、凋亡、炎症反应、能量平衡及氧化应激等方面发挥重要的调节作用^[35]。研究表明, P53 是 SIRT1 的主要底物之一,激活 SIRT1 可通过去乙酰化作用调



控 P53 在药物性肝损伤、酒精及非酒精性脂肪肝等多种肝脏疾病起到保护作用保护^[36]。但 SIRT1 通过调节 P53 而达到抑制铁死亡和焦亡两种细胞死亡方式的机制目前国内外未见相关报道。

1.3 曲美他嗪对急性肝衰竭的保护作用与机制研究

目前临床使用的保肝药物种类繁多，但大多数作用机制单一、疗效有限，且大部分需通过肝脏代谢，联用反而会加重急性肝衰竭时残存的肝脏负担，内科治疗迫切需要寻找更为有效的药物。曲美他嗪 (trimetazidine, TMZ) 是目前急慢性心力衰竭的一线药物，药理作用主要是通过阻断长链 3-酮酯酰 COA 硫解酶抑制脂肪酸的 β -氧化而促进葡萄糖氧化；促进三磷酸腺苷合成；增加磷脂酰胆碱合成等^[37]。2018 年美国 FDA 授予曲美他嗪为治疗慢加急性肝衰竭孤儿药地位，但我国尚未批准应用于临床，更不清楚其对急性肝衰竭是否有保护作用。

我们前期使用曲美他嗪干预 D-氨基半乳糖+脂多糖诱导的体外肝细胞损伤模型及小鼠急性肝衰竭模型，发现其具有较好的保护作用，其机制与上调 Nrf2、GPX4 表达抑制细胞焦亡有关，在此基础上，我们拟进一步深入研究曲美他嗪的保护机制是否与上调 SIRT1 抑制 P53/GPX4/GSDMD 介导的铁死亡-焦亡回路有关，为曲美他嗪在急性肝衰竭的临床应用奠定理论基础。

综上，我们提出科学假设：上调 SIRT1 可能通过抑制 P53/GPX4/GSDMD 介导的铁死亡-焦亡正反馈回路减少肝细胞死亡与炎症风暴改善急性肝衰竭（图 4）。

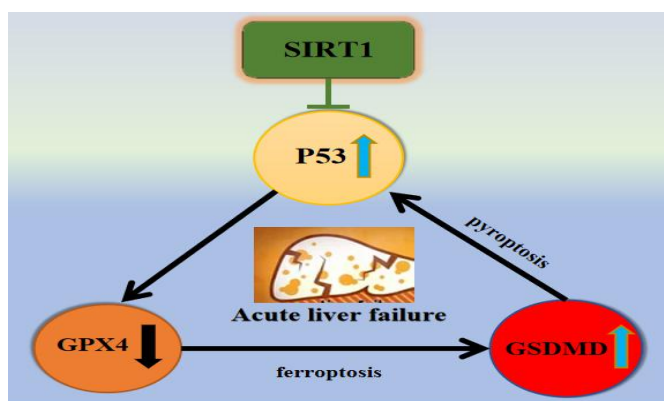


图 4 SIRT1 调控 P53/GPX4/GSDMD 正反馈通路在急性肝衰竭中的科学假设

Fig.4 The scientific hypothesis of SIRT1 regulate P53/GPX4/GSDMD positive feedback pathway in acute liver failure



参考文献

1. Stravitz RT, Lee WM. Acute liver failure[J]. *Lancet*. 2019;394(10201):869–881.
2. Flamm SL, Yang YX, Singh S, Falck-Ytter YT. American Gastroenterological Association Institute Guidelines for the Diagnosis and Management of Acute Liver Failure. AGA Institute Clinical Guidelines Committee[J]. *Gastroenterology*. 2017;152(3):644–647.
3. Bernal W, Auzinger G, Dhawan A. Acute liver failure[J]. *Lancet*. 2010;376(9736):190–201.
4. Dara L, Johnson H, Suda J, Win S, Gaarde W, Han D, Kaplowitz N. Receptor interacting protein kinase 1 mediates murine acetaminophen toxicity independent of the necrosome and not through necroptosis[J]. *Hepatology*. 2015;62(6):1847–1857.
5. Green DR. The Coming Decade of Cell Death Research: Five Riddles[J]. *Cell*. 2019;177(5):1094–1107.
6. Dixon SJ, Stockwell BR. The role of iron and reactive oxygen species in cell death [J]. *Nat Chem Biol*. 2014;10(1):9–17.
7. Doll S, Proneth B, Tyurina YY, et al. ACSL4 dictates ferroptosis sensitivity by shaping cellular lipid composition[J]. *Nat Chem Biol*. 2017;13(1):91–98.
8. Stockwell BR. A powerful cell-protection system prevents cell death by ferroptosis[J]. *Nature*. 2019;575(7784):597–598.
9. Kajarabille N, Latunde-Dada GO. Programmed Cell-Death by Ferroptosis: Antioxidants as Mitigators[J]. *Int J Mol Sci*. 2019;20(19):4968.
10. Yang, W.S.; SriRamaratnam, R.; Welsch, M.E.; et al. Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4[J]. *Cell* 2014, 156, 317–331.
11. Do Van, B Gouel, F, et al. Ferroptosis, a newly characterized form of cell death in Parkinson's disease that is regulated by PKC[J]. *Neurobiol. Dis.* 2016, 94, 169–178.
12. Friedmann Angeli, J P, Schneider, M, Proneth, B, et al. Inactivation of the ferroptosis regulator Gpx4 triggers acute renal failure in mice[J]. *Nat. Cell Biol.* 2014, 16, 1180–1191.
13. Mehta, K.J, Je Farnaud S, Sharp P. Iron and liver fibrosis: Mechanistic and clinical aspects[J]. *World J. Gastroenterol.* 2019, 25, 521–538.
14. Pietrangelo A. Iron in NASH, chronic liver diseases and HCC: How much iron is too much? [J]. *Hepatol.* 2009, 50, 249–251.
15. Li Tan, H.-Y, Wang, N. The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Liver Diseases[J]. *Int.*



J. Mol. Sci. 2015, 16, 26087–26124.

16. Macías-Rodríguez RU, Inzaugarat ME, Ruiz-Margáin A. Reclassifying Hepatic Cell Death during Liver Damage: Ferroptosis-A Novel Form of Non-Apoptotic Cell Death?[J]. Int J Mol Sci. 2020,21(5):1651.

17. Yamada N, Karasawa T, Kimura H, et al. Ferroptosis driven by radical oxidation of n-6 polyunsaturated fatty acids mediates acetaminophen-induced acute liver failure[J]. Cell Death Dis. 2020,11(2):144.

18. Wang Y, Chen Q, Shi C, Jiao F, Gong Z. Mechanism of glycyrrhizin on ferroptosis during acute liver failure by inhibiting oxidative stress[J]. Mol Med Rep. 2019,20(5):4081–4090.

19. Iorga A, Dara L. Cell death in drug-induced liver injury[J]. Adv Pharmacol. 2019;85:31–74.

20. Bergsbaken T, Fink SL, Cookson BT. Pyroptosis: host cell death and inflammation[J]. Nat. Rev. Microbiol. 2009,7(2):99–109.

21. Shi J, Gao W, Shao F. Pyroptosis: Gasdermin-Mediated Programmed Necrotic Cell Death[J]. Trends Biochem Sci. 2017,04,42 (4): 245–254.

22. Khanova E, Wu R, Wang W, et al. Pyroptosis by caspase11/4-gasdermin-D pathway in alcoholic hepatitis in mice and patients[J]. Hepatology. 2018,05,67(5):1737–1753.

23. Xu B, Jiang M, Chu Y, et al. Gasdermin D plays a key role as a Pyroptosis executor of non-alcoholic steatohepatitis in humans and mice[J]. Hepatol. 2017,68(4):773–782.

24. Li H, Zhao XK, Cheng YJ, et al. Gasdermin D-mediated hepatocyte Pyroptosis expands inflammatory responses that aggravate acute liver failure by upregulating monocyte chemotactic protein1/CC chemokine receptor-2 to recruit macrophages[J]. World J Gastroenterol. 2019,25(44): 6527–6540.

25. Carlson BA, Tobe R, Yefremova E. Glutathione peroxidase4 and vitamin E cooperatively prevent hepatocellular degeneration[J]. Redox Biol. 2016;10;9:22–31.

26. Özge Canli, Yasemin B Alankuş, Sasker Grootjans. Glutathione Peroxidase 4 Prevents Necroptosis in Mouse Erythroid Precursors[J]. Blood. 2016,01,127 (1):139–148.

27. Young-Sun Lee, Dae-Hee Lee, et al. Ferroptosis-Induced Endoplasmic Reticulum Stress: Cross-talk Between Ferroptosis and Apoptosis[J]. Mol Cancer Res. 2018,07,16 (7):1073–1076.

28. Rui Kang, Ling Zeng, Shan Zhu. Lipid Peroxidation Drives Gasdermin D-Mediated Pyroptosis in Lethal Polymicrobial Sepsis[J]. Cell Host & Microbe. 2018,24(1):97–108.



29. Sabapathy K, Lane DP. Therapeutic targeting of p53: all mutants are equal, but some mutants are more equal than others[J]. Nat Rev Clin Oncol. 2018;15(1):13–30.
30. Chen D, Ni HM, Wang L, et al. p53 Up-regulated Modulator of Apoptosis Induction Mediates Acetaminophen-Induced Necrosis and Liver Injury in Mice[J]. Hepatology. 2019;69(5):2164–2179.
31. Jiang L, Kon N, Li T, et al. Ferroptosis as a p53-mediated activity during tumour suppression [J]. Nature, 2015, 520 (7545) :57–62.
32. Wang S J, Ou Y, Jiang L, et al. Ferroptosis: a missing puzzle piece in the p53 blueprint[J]. Mol Cell Oncol, 2015, 3(3): e1046581.
33. Gupta, Radha, Furukawa, et al. Direct transcriptional activation of human caspase-1 by tumor suppressor p53[J]. Biol. Chem. 2001, 276:10585–10588.
34. Zhang T, Li Y, Zhu R, et al. Transcription Factor p53 Suppresses Tumor Growth by Prompting Pyroptosis in Non-Small-Cell Lung Cancer[J]. Oxid Med Cell Longev. 2019, 2019:8746895.
35. Yang Y, Duan W, Li Y, et al. Novel role of silent information regulator 1 in myocardial ischemia[J]. Circulation. 2013;128(20):2232–2240.
36. Yan T, Huang J, Nisar MF, et al. The Beneficial Roles of SIRT1 in Drug-Induced Liver Injury[J]. Oxid Med Cell Longev. 2019;2019:8506195.
37. Kantor PF, Lucien A, Kozak R. The antianginal drug trimetazidine shifts cardiac energy metabolism from fatty acid oxidation to glucose oxidation by inhibiting mitochondrial long-chain 3-ketoacyl coenzyme A thiolase[J]. Circ Res. 2000, 17;86(5):580–588.

2. 项目的研究内容、研究目标，以及拟解决的关键科学问题（此部分为重点阐述内容）；

2.1 研究内容

2.1.1 细胞焦亡与人急性肝衰竭的临床相关性（已完成）

收集 30 例急性肝衰竭患者及 30 例健康人血清标本、5 例急性肝衰竭肝组织标本（乙肝病毒感染所致）及 5 例健康肝组织标本，通过检测血清焦亡相关炎症因子 IL-1 β 、IL-18 含量及肝组织焦亡通路 Caspase1、Caspase4、GSDMD 蛋白相对表达量分析焦亡与急性肝衰竭临床相关性。



2.1.2 从细胞实验和动物实验探讨肝细胞焦亡在急性肝衰竭中的作用机制（已完成）

建立 D-氨基半乳糖/脂多糖（D-Galn/LPS）联合诱导的体外小鼠 AML12 肝细胞损伤模型及急性肝衰竭小鼠模型，采用 GSDMDshRNA 细胞转染与 GSDMD 基因敲除小鼠从细胞、动物两个层次探讨肝细胞焦亡在急性肝衰竭中的作用机制。

2.1.3 从细胞实验和动物实验探讨曲美他嗪对急性肝衰竭的保护作用及机制（已完成）

曲美他嗪低、中、高剂量组及还原型谷胱甘肽阳性药物对照组对 D-Galn/LPS 诱导的肝细胞损伤模型及急性肝衰竭小鼠模型进行干预，观察其效果并初步探讨其对焦亡通路的影响及机制。

2.1.4 从细胞实验探讨 GPX4 与 GSDMD 介导的铁死亡与焦亡两种细胞死亡方式间的联系（已完成）

慢病毒感染过表达 GPX4 与 RSL3 特异性抑制 GPX4 表达，qRT-PCR 及 Western blot 检测对 GSDMD 表达的影响，采用共聚焦免疫荧光共定位及免疫共沉淀进一步验证 GPX4 与 GSDMD 在蛋白水平的作用机制。

2.1.5 铁死亡与人急性肝衰竭临床相关性验证

正常人血清及肝组织标本（同 2.1.1），通过检测血清铁和活性氧含量及肝组织铁含量、铁死亡通路 SLC7A11、GPX4、ACSL4 蛋白相对表达量，分析铁死亡与急性肝衰竭临床相关性。

2.1.6 从细胞实验和动物实验探讨 P53/GPX4/GSDMD 介导的铁死亡-焦亡正反馈回路在急性肝衰竭中的作用及机制

细胞实验利用慢病毒感染外源性调节肝细胞 P53、GPX4、GSDMD 的表达水平，动物实验利用 P53 基因敲除小鼠、铁死亡特异性抑制剂 Liproxstatin-1 干预及 GSDMD 基因敲除小鼠，观察对三者的形成的正反馈回路的影响。



2.1.7 从细胞实验探讨 SIRT1 对 P53/GPX4/GSDMD 介导的铁死亡-焦亡正反馈回路的调控机制

慢病毒感染外源性上调与敲减肝细胞 SIRT1 表达水平,从基因、蛋白水平验证对 P53/GPX4/GSDMD 表达的影响。

2.1.8 从细胞实验和动物实验上进一步验证曲美他嗪对 SIRT1/P53 的调节作用

在前期完成的基础上进一步检测曲美他嗪低、中、高剂量组及还原型谷胱甘肽组干预的体外肝细胞损伤模型及小鼠急性肝衰竭模型肝组织 SIRT1、P53、GPX4 和 GSDMD 表达的影响。

2.2 研究目标

2.2.1 证明肝细胞铁死亡-焦亡正反馈信号通路在急性肝衰竭中的作用机制。

2.2.2 阐明 SIRT1 对 P53-GPX4-GSDMD 介导的铁死亡-焦亡正反馈信号回路的调控作用与机制。

2.2.3 阐明曲美他嗪减轻急性肝衰竭的效果及机制。

2.3 拟解决的关键科学问题

2.3.1 本课题需要解决的第一个关键科学问题为确定研究目标铁死亡、焦亡与人急性肝衰竭的关系

通过比较急性肝衰竭患者与健康对照肝组织样本中铁死亡通路与焦亡通路的蛋白表达差异数据进行相关的统计学分析。其中,规范的组织样本、完整的临床数据是重要的影响因素,申请者所在单位为三级甲等医院,肝胆外科每年开展肝移植手术 40-50 例,可以保证样本的获取。相关分子的检测均有成熟的方法,在方法学上并不存在困难。

2.3.2 本课题需要解决的第二个关键科学问题为验证 SIRT1 对 P53/GPX4/GSDMD 正反馈回路的调控作用

这一问题的解决依赖于课题组的前期工作基础,我们前期工作已证明了焦亡是急性肝衰竭时肝细胞死亡及炎症风暴的重要原因,并证明了铁死亡通路的 GPX4 与焦亡通路的 GSDMD 两个关键蛋白存在相互作用关系,在此基础上进行



机制研究是有理论及实验基础支持的。SIRT1 对 P53 及 P53 对铁死亡通路的调控机制均有文献支撑,进一步验证外源性调节 SIRT1、P53、GPX4、GSDMD 的表达对彼此的影响即可阐明相关的分子调控机制,所涉及的实验方法如慢病毒转染等也比较成熟,D-Galn/LPS 诱导的 AML12 肝细胞损伤模型及急性肝衰竭小鼠模型我们已成功建立,这方面的研究不会有太大的科学风险。

2.3.3 本课题需要解决的第三个关键科学问题进一步验证曲美他嗪对肝细胞损伤及急性肝衰竭的保护作用与机制

曲美他嗪对 D-Galn/LPS 诱导的 AML12 肝细胞损伤及急性肝衰竭小鼠模型具有保护作用我们前期工作已完成,相关药物浓度、作用时间等条件均已具备,其通过上调 GPX4 抑制焦亡通路的机制已明确,在此基础上进一步深入研究机制不会有太多阻碍。

3. 拟采取的研究方案及可行性分析(包括研究方法、技术路线、实验手段、关键技术等说明);

3.1 研究方法

3.1.1 人血清及肝组织标本收集

收集 2017.01 至 2019.06 期间贵州医科大学附属医院感染科住院 30 例急性肝衰竭患者及体检中心 30 例健康人血清标本。收集贵州医科大学附属医院肝胆外科 7 例急性肝衰竭肝组织标本(乙肝病毒感染所致)及 6 例健康肝组织标本(肝移植过程中自愿供体的正常人)(已完成)。

急性肝衰竭纳入标准:根据 2017 年 EASL《急性肝衰竭指南》^[1]中定义:既往无肝硬化者出现肝功能严重障碍伴凝血异常($\text{INR} \geq 1.5$ 或凝血酶原时间延长 4~6 秒),任何程度的意识改变(脑病),发病时间 <26 周;Wilson 病、母婴垂直感染的 HBV 患者及自身免疫性肝炎患者尽管有肝硬化的可能,若发病时间 <26 周,也可诊断为急性肝衰竭。

急性肝衰竭排除标准:①合并其他系统严重基础疾病;②酒精、非酒精性、自身免疫性等多种因素导致的肝硬化;③慢性肝衰竭;④原发性肝癌;⑤精神病。

本研究通过了贵州医科大学附属医院伦理委员会的批准(批件号:2018 伦审第 036 号),符合 1975 年赫尔辛基宣言的伦理准则。



3.1.2 细胞培养、D-Galn/LPS 诱导的肝细胞损伤模型建立

小鼠 AML12 正常肝细胞株，购自中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所，培养于含 10%胎牛血清、1%液体培养基添加剂（Liquid Media Supplement, ITS）、40ng/ml 地塞米松的 DMEM-F12 培养基中。

细胞汇合度至 80%左右更换为含 D-Galn15mmol/L+LPS100ug/ml 浓度的 DMEM/ F12 含药培养基，培养 24 小时建立损伤模型，其抑制率为 50%左右。

3.1.3 细胞瞬时转染及慢病毒感染

①瞬时转染

提前一天将 2×10^5 /ml的细胞悬液接种至6cm皿中，转染时细胞汇合度在 40-50%左右为宜；使用 OPTi-MEM培养基分别稀释Lipofectamine3000试剂、control shRNA及GSDMD shRNA充分混匀；将shRNA脂质体复合物滴加至细胞中，覆盖细胞，室温静置5-10分钟后加入适量OPTi-MEM培养基，前后移动培养皿，混合均匀；转染后6小时观察细胞状态，24小时后再更换为含血清完全培养基，继续培养24-48小时；荧光显微镜观察绿色荧光表达；收集、裂解细胞提取蛋白，Western blot分析GSDMD表达效果，转染效率 $>50\%$ 可进行下一步实验。

②慢病毒感染：

细胞转染所用慢病毒包装的 negative control (NC)、shRNA 干扰(SIRT1、p53)及过表达 cDNA 片段(SIRT1、p53)均由吉凯生物工程有限公司合成。转染前用胰酶消化细胞并以完全培养基制备密度为 2×10^5 /ml 的细胞悬液接种至 6cm 皿中，继续培养 24 小时。转染前，将原板中培养基弃去，根据分组加入用 DMEM/F12 培养基稀释好的不同慢病毒转染液，轻轻晃动培养皿使病毒分布均匀，做好标记后放入培养箱中培养 24 小时。次日更换为新鲜的完全培养基。培养 48h 后在倒置荧光显微镜下观察感染效率，用含 Puromycin（浓度为 1.5ug/ml）的培养基筛选，2-3 代后，qRT-PCR 检测 mRNA 水平，进行下一步实验。

3.1.4 CCK8法测定细胞抑制率

调整细胞浓度为 2×10^4 /ml，接种到96孔板，100ul/孔，放入37° C、5%CO₂、饱和湿度的恒温培养箱培养24小时。细胞汇合度为80%左右更换为含药基础培养基，每组设6个平行孔，放入培养箱继续培养24小时后取出，弃去培养板中含



药培养基,用排枪将已配置好的含CCK8的基础培养基(DMEM/F12:CCK8=9:1)按照每100ul贴孔壁小心加入孔中,尽量不要生成气泡。将培养板在37℃恒温培养箱内孵育1-2小时,酶标仪测定450 nm 处吸光度,按照公式计算:细胞抑制率(%)=(对照组OD-实验组OD)/(对照组OD-空白组OD)×100%。

3.1.5 实验动物及 D-Galn/LPS 诱导的急性肝衰竭模型

6-8 周龄 C57BL/6J 系雄性 P53 基因敲除及野生型雄性 C57BL/6 小鼠,购自第三军医大学实验动物中心(重庆)。GSDMD 基因敲除小鼠为北京生命科学研究院邵峰院士馈赠,已繁育成功并进行纯合子鉴定工作。所有小鼠安置于贵州医科大学附属医院临床医学研究中心 SPF 级动物实验室,标准实验室条件(层流,温度控制在 $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 12 h 光/暗循环),饲喂 SPF 级标准饲料,随意饮用高压灭菌纯水。所有动物饲养及其他实验操作均符合相关管理要求准则及实验动物伦理要求。铁死亡特异性抑制剂组根据参考文献给予 Liproxstatin-1 10 mg/kg 腹腔注射 2 周。D-Galn300mg/kg+LPS10ug/kg 一次性腹腔注射,6 小时后可建立急性肝衰竭模型,戊巴比妥麻醉,眼球取血,行门静脉灌流后留取肝组织。

3.1.6 ALT、TBIL、AMM、血清铁和凝血 INR、：全自动生化仪及凝血仪检测。

3.1.7 流式技术检测炎症因子 IL-1 β 、IL-18、TNF α 、MCP1、HMGB1

Bioplex 多因子检测试剂盒, BD FACS CantoII 流式细胞仪(BD Biosciences, 美国),按试剂说明书操作检测, LEGENDplex8.0 分析软件计算。

3.1.8 qRT-PCR 实验

细胞样本使用 TRIzol 试剂 (Invitrogen, USA) 冰上裂解,根据试剂盒说明书提取总 RNA。通过 NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc, USA) 进行定量后,用 200 ng 总 RNA 通过 ReverTra Ace qPCR RT Kit (Toyobo, Japan),根据说明书进行逆转录操作。逆转录所得产物采用 THUNDERBIRD SYBR® qPCR Mix (Toyobo, Japan) 进行 qRT-PCR 分析。每组样本在相同体系及条件下重复 3 孔。结果判定: GAPDH 为内参,比较目的基因与内参基因的 CT 值差异,以 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 公式对上述基因的表达进行相对定量。



3.1.9 Western blot 实验

细胞或肝组织样本中加入 RIPA 蛋白裂解液(Beyotime)、蛋白酶抑制剂, 干冰中研磨后 4℃离心 30 min, 取上清。BCA 检测试剂盒测定总蛋白浓度, 加入上样缓冲液煮沸变性。每孔加入 30-50ug 蛋白, 10%SDS-PAGE 预制凝胶

(Invitrogen, USA)上进行电泳分离蛋白, 转移到聚偏氟乙烯膜(Millipore, Bedford, MA, USA), 5%脱脂牛奶封闭 3h, 按 1: 1 000 的比例稀释一抗 4℃孵育过夜, 次日 TBST 3 遍洗涤后, 常温孵育山羊抗兔二抗 1h。蛋白条带通过增强发光显影液 (Millipore)显影, Chemi Doc MP 系统(Bio-Rad, Hercules, 美国)拍摄, Image J 软件测量灰度值(目的基因与内标 GAPDH 比较)。

3.1.10 小鼠肝组织 HE 染色及 ISHAK 炎症评分

小鼠肝右叶 4%多聚甲醛溶液 48 h, 石蜡包埋, 切成 4 mm 厚, 按常规程序进行 hematoxylin and eosin (H&E) 染色, 在 A12.1503 显微镜(Opto-Edu Co, Ltd, Beijing, China)下观察肝脏病理变化, 三名病理科高级职称医师根据 ISHAK 评分系统独立对小鼠肝组织炎症程度进行评分, 取均值作为最后统计数值。

3.1.11 免疫组织化学法检测小鼠肝组织特异性巨噬细胞 F4/80 蛋白的表达

F4/80 大鼠抗小鼠单克隆抗体 (abcam, 稀释为 10ug/ml) 4℃过夜, 次日生物素标记的羊抗大鼠 IgG (1:2000, abcam) 室温孵育 30 分钟, DAB 显色。奥林巴斯 BX41 显微镜拍照, Image J 计算 200×5 个随机视野的平均光密度面积百分比。

3.1.12 激光共聚焦显微镜观察 GPX4-GSDMD 蛋白质免疫荧光共定位

4%多聚甲醛室温固定, 0.5%Triton X-100处理细胞,使细胞膜通透, 上GPX4一抗孵育24小时, 次日Alexa Fluor 488绿色荧光二抗标记; 继续上GSDMD一抗孵育24小时, Alexa Fluor 455红色荧光二抗避光孵育2小时; DAPI染核3分钟, 于共聚焦荧光显微镜下观察。若两种标记MERGE后为黄色荧光, 可认为两种蛋白共定位, 提示可能存在相互作用。Image J软件分析, 计算皮尔森共定位相关系数—Pearson's correlation coefficient (PCC), 取值在1到-1之间。1表示完美相关 (有蛋白A的地方必有蛋白B), -1表示完全排除 (有蛋白A地方必定没有蛋白B), 零表示随机关系 (蛋白A和蛋白B随机分布, 无联系)。



3.1.13 免疫共沉淀 (CO-IP)

用加入 1:100 的蛋白酶磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液裂解细胞提取蛋白后将蛋白裂解液平均分为四份, 一份为 InPut 组, 一份为 IP-IgG 对照组, 一份为 IP-GSDMD 组, 一份为 IP-GPX4 组; IP 组分别加入对应的 normal mouse Ig 或 GSDMD 单克隆抗体或 GPX4 单克隆抗体, 4℃缓慢摇晃过夜; 次日取出, 每管加入 40ul 充分重悬的 Protein A+G 琼脂糖珠, 4℃缓慢摇晃 6h 后离心取上清, 加入 20ul 2×SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液, 煮沸变性 10min, 取上清进行 Western Blot 检测。

3.1.14 统计学方法

采用 Graphpad Prism5.0 (Graphpad Inc., LaJolla, CA, USA) 统计分析并绘图, 计量资料数据采用均数±标准误(Mean±SEM)表示。小鼠生存曲线采用 Log-Rank test 检验; 多组间均数比较采用 One way ANOVA 分析, 组间比较 t 检验; 分析前行方差齐性检验, 方差齐时用 LSD 法; 方差不齐时用 Tambane's 法, 以 P<0.05 为差异有统计学意义。

3.2 技术路线

3.2.1 细胞焦亡与人急性肝衰竭临床相关性 (已完成)

收集 30 例急性肝衰竭患者及 30 例健康人血清标本, 全自动生化仪检测 ALT、TBIL、血氨、凝血 INR; 流式技术检测炎症因子 IL-1 β 、IL-18 水平。

收集 7 例急性肝衰竭肝组织标本 (乙肝病毒感染所致) 及 6 例健康肝组织标本, Western blot 检测焦亡通路 Caspase1、Caspase4、GSDMD-FL、GSDMD-N 蛋白表达, 分析焦亡与急性肝衰竭临床相关性。

3.2.2 体内、外实验探讨肝细胞焦亡在急性肝衰竭中的作用机制 (已完成)

细胞实验: AML12 正常肝细胞, D-Galn15 μ mol/L+/LPS100 μ g/ml 诱导损伤 0, 6, 12, 24 小时, CCK8 检测细胞抑制率; 全自动生化仪检测上清液 LDH、ALT、MCP1; 共聚焦荧光显微镜观察 GSDMD 蛋白表达变化, qRT-PCR 及 Western 检测焦亡通路 Caspase1、Caspase11、GSDMD-FL、GSDMD-N 表达变化; lipo3000



瞬时转染 GSDMDshRNA, 48 小时后 D-Galn/LPS 诱导损伤, qRT-PCR 及 Western blot 检测 MCP1、CCR2 mRNA 及蛋白表达变化。

动物实验: 正常对照组、模型组、GSDMD 基因敲除 (GSDMD^{-/-}) 正常对照组, GSDMD^{-/-}模型组, 模型组均给予 D-Galn300mg/Kg/+LPS10ug/Kg 一次性腹腔注射建立急性肝衰竭小鼠模型。记录生存时间; 检测血清 ALT、血氨、凝血 INR、炎症因子 IL-1 β 、IL-18、MCP1 水平; 肝组织 HE 染色观察病理变化及 ISHAK 评分; F4/80 染色检测巨噬细胞表达; Western blot 检测肝组织 GSDMD-FL、GSDMD-N、MCP1、CCR2 蛋白表达。

3.2.3 体内、外实验探讨曲美他嗪的保护作用及机制 (已完成)

(1) 细胞实验: 正常对照组、模型组、曲美他嗪低、中、高剂量组 (50、100、200 μ mol/L)、还原型谷胱甘肽阳性药物对照组 (100 μ mol/L), D-Galn15 μ mol/L +/LPS100ug/ml 诱导损伤 24 小时, 检测上清液 LDH、ALT; CCK8 检测细胞抑制率; 细胞匀浆检测氧化应激指标 SOD、GSH-Px、CAT、MDA; qRT-PCR 及 Western 检测焦亡通路 Caspase1、Caspase11、GSDMD-FL、GSDMD-N 及抗氧化通路 Nrf2/GPX4 mRNA 及蛋白表达变化。

(2) 动物实验: 正常对照组、模型组、曲美他嗪低、中、高剂量组 (5、10、20mg/Kg)、还原型谷胱甘肽阳性药物对照组 (10mg/Kg), D-Galn300mg/Kg/+LPS10ug/Kg 一次性腹腔注射建立急性肝衰竭小鼠模型。记录生存时间; 检测血清 ALT、血氨、凝血功能 INR、炎症因子 IL-1 β 、IL-18、MCP1 水平; 肝组织 HE 染色观察病理变化及 ISHAK 评分; F4/80 染色检测巨噬细胞表达; Western blot 检测肝组织 GSDMD-FL、GSDMD-N、MCP1、CCR2 及抗氧化通路 Nrf2/GPX4 蛋白表达。

3.2.4 GPX4 与 GSDMD 相互作用机制 (已完成)

慢病毒转染过表达 GPX4, 特异性抑制剂 RSL3 浓度稀释为 10 μ mol/L 预先干预 24 小时。分为空载对照组、空载模型组、GPX4 过表达组、RSL3 组, 除空载对照组外, 其余组均给予 D-Galn15mmol/L+LPS100ug/ml 干预 24 小时, 镜下观察细胞形态学变化, 检测上清液 LDH、ALT; CCK8 检测细胞抑制率; qRT-PCR



及 Western blot 检测 GSDMD、GPX4 mRNA 及蛋白表达的影响, 免疫荧光共定位及免疫共沉淀验证 GPX4 与 GSDMD 蛋白相互作用关系。

3.2.5 SIRT1、P53、铁死亡与急性肝衰竭临床相关性验证

正常人血清及肝组织标本(同 3.2.1), 检测血清及肝组织铁含量, Western blot 检测肝组织 SIRT1、P53、SLC7A11、GPX4、ACSL4 的蛋白表达水平。

3.2.6 体内、外实验探讨 P53/GPX4/GSDMD 介导的铁死亡-焦亡正反馈回路在急性肝衰竭中的作用机制

(1) 细胞实验: 正常对照组、模型组、P53shRNA 组、P53 过表达组、RSL3 组、GPX4 过表达组、GSDMDshRNA 组、GSDMD 过表达组共 8 组。D-Galn15mmol/L+LPS100ug/ml 干预 24 小时后检测以下指标: 细胞抑制率; 上清液 LDH、ALT; 透射电镜观察线粒体形态; PGSK 探针检测铁含量; qRT-PCR 及 Western blot 检测 P53、GPX4、SLC7A11、ACSL4、Caspase1、Caspase11、GSDMD mRNA 及蛋白表达水平。

(2) 动物实验: 正常对照组、模型组、P53^{-/-}模型组、Lipoxstatin-1 模型组、GSDMD^{-/-}模型组共 5 组小鼠, 除正常对照组外, 其余组均给予 D-Galn300mg/Kg +LPS10ug/Kg 一次性腹腔注射建立小鼠模型。记录生存时间; 检测血清 ALT、血氨、凝血 INR、血清炎症因子 IL-1 β 、IL-18、MCP1; 血清及肝组织铁含量; 肝组织 HE 染色观察病理变化及 ISHAK 炎症评分; F4/80 染色检测巨噬细胞表达; Western blot 检测肝组织 SIRT1、P53、GPX4、GSDMD-FL、GSDMD-N、MCP1、CCR2 蛋白表达。

3.2.7 体外实验探讨 SIRT1 对 P53/GPX4/GSDMD 正反馈回路的调控机制

细胞实验: 慢病毒转染 SIRT1shRNA、过表达质粒, 分为空载对照组、空载模型组、SIRT1^{+/+}组、SIRT1shRNA 组, D-Galn15mmol/L+LPS100ug/ml 干预 24 小时: CCK8 检测细胞抑制率; 检测上清液 LDH、ALT; PGSK 探针检测铁含量; qRT-PCR 及 Western blot 检测 SIRT1、P53、GPX4、GSDMD-FL、GSDMD-N、mRNA 及蛋白表达。

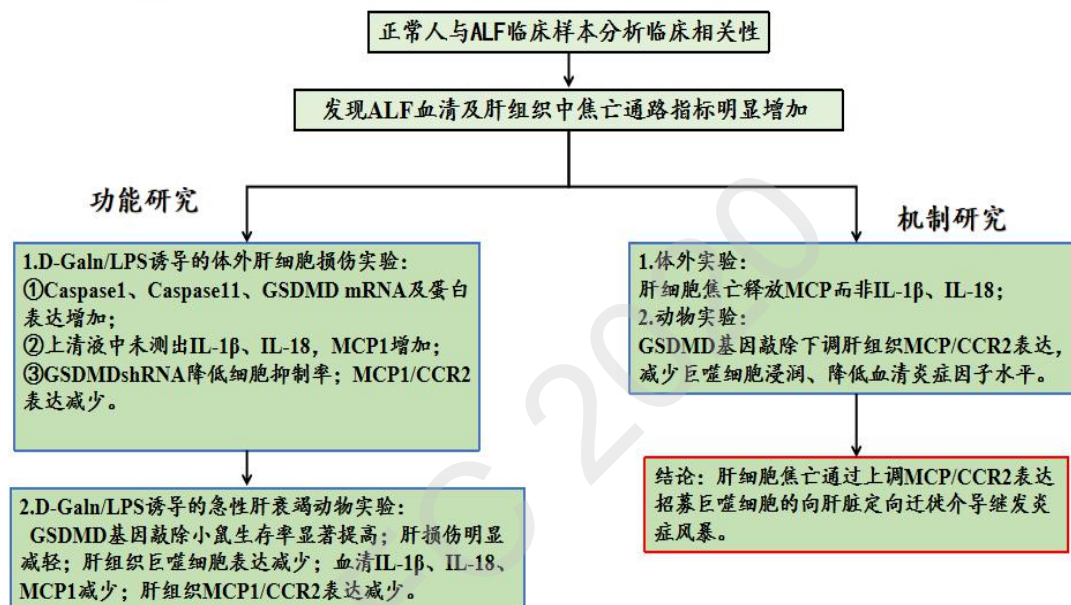


3.2.8 体外实验进一步验证曲美他嗪通过上调 SIRT1 抑制 P53/GPX4/GSDMD 通路的作用机制

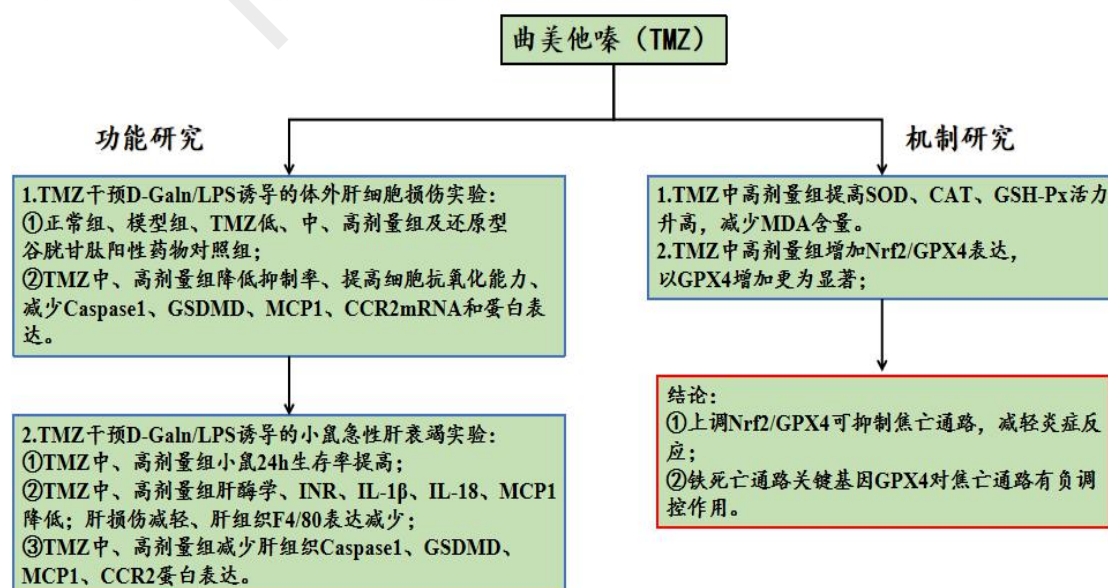
在前期完成的基础上进一步检测曲美他嗪低、高剂量组及还原型谷胱甘肽组对 SIRT1、P53、GPX4、GSDMD mRNA 及蛋白表达的影响。

技术路线（绿色为已完成部分）

1. 肝细胞焦亡在急性肝衰竭中的作用机制研究

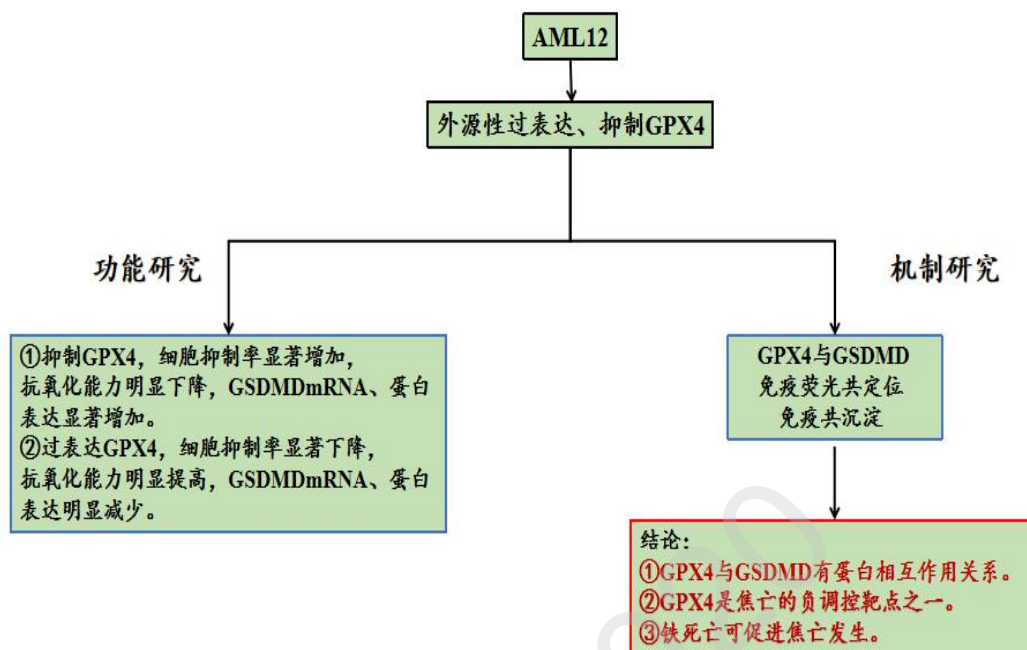


2. 曲美他嗪对急性肝衰竭的保护作用及机制研究





3. GPX4/GSDMD介导的铁死亡-焦亡作用关系

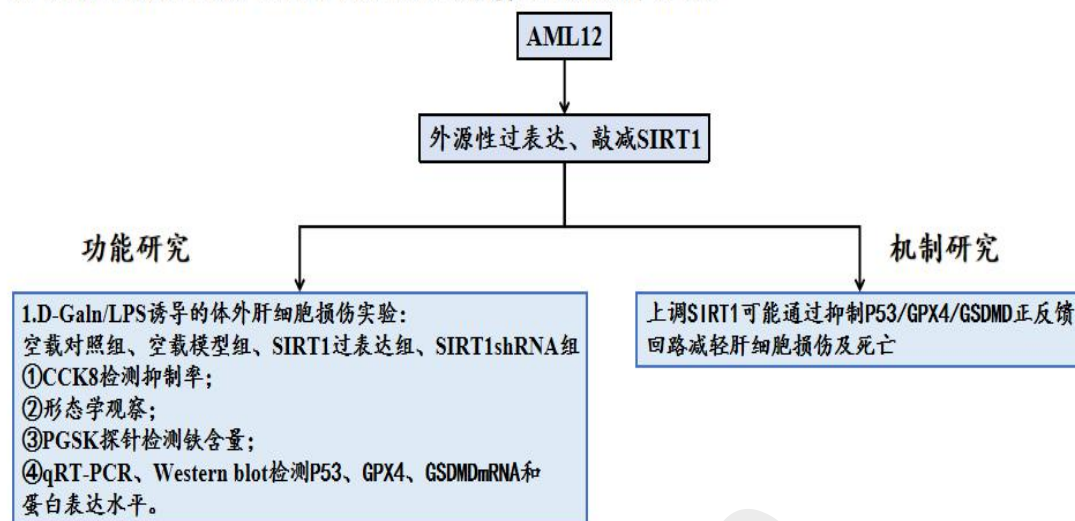


4. P53/GPX4/GSDMD正反馈回路在急性肝衰竭中的作用机制

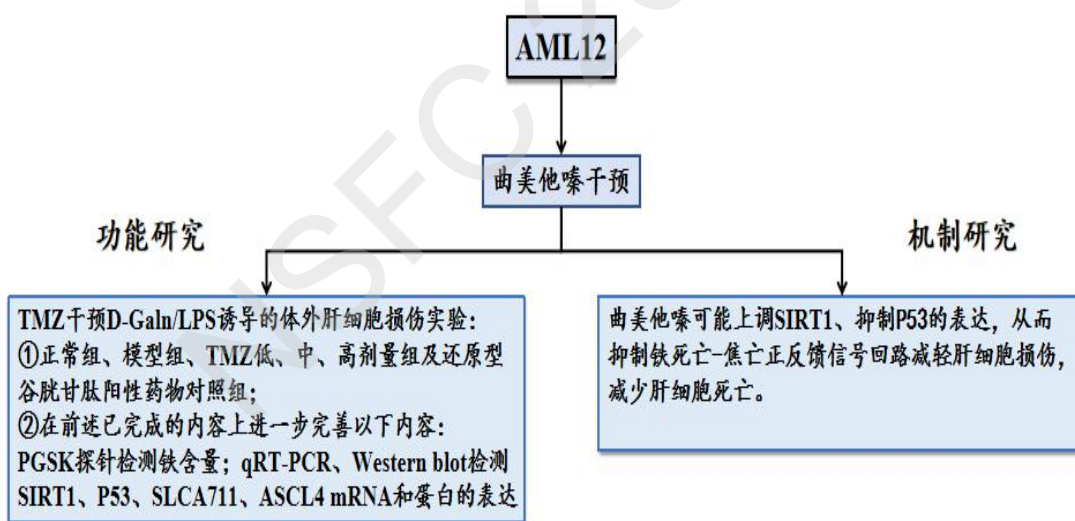




5. SIRT1调控P53/GPX4/GSDMD正反馈回路机制研究



6. 曲美他嗪对SIRT1/P53表达的影响



3.3 关键技术

- 1) 载体的构建及转染: 构建慢病毒表达载体, 并转染至 AML12 肝细胞中, 检测目标分子的表达水平及细胞的抑制率。
- 1) 急性肝衰竭小鼠模型的建立: 建立急性肝衰竭小鼠模型, 检测目标分子的表达变化, 结合细胞实验结果验证课题假说。急性肝衰竭小鼠模型我们根据前期实



验结果已确定给药剂量。小鼠门静脉灌流是获取理想病理切片的重要手段之一，穿刺难度较高，我们经过反复练习已熟练掌握(灌流效果见下图)。



灌流前



灌流后

急性肝衰竭小鼠门静脉灌流效果

Effect of Portal vein Perfusion in acute liver failure mice model

4.本项目的特色与创新之处；

- 1) 铁死亡与焦亡是近年新发现的细胞死亡方式，也是研究热点之一，但两者在急性肝衰竭中的作用机制尚不清楚。阐明两者作用关系有助于进一步深入研究急性肝衰竭的发病机制。
- 2) SIRT1 调控 P53/GPX4/GSDMD 介导的铁死亡-焦亡正反馈信号回路改善急性肝衰竭的科学假说未见报道，阐明铁死亡与焦亡的共同干预靶点可为进一步研发急性肝衰竭的特异性药物奠定理论基础。
- 3) 曲美他嗪在急性肝衰竭中的保护作用及机制尚不清楚，进一步阐明为其在临床应用奠定理论基础，对临床具有指导意义。

5.年度研究计划及预期研究结果（包括拟组织的重要学术交流活动、国际合作与交流计划等）。

5.1 年度研究计划

- (1) 2021.01—2021.03 完成所有准备工作，包括研究相关设备、材料、试剂的调试和准备，慢病毒细胞转染筛选稳转株以备后续实验等；
- (2) 2021.04—2022.08 完成 P53/GPX4/GSDMD 正反馈回路在急性肝衰竭中的作用机制体、内外实验部分；
- (3) 2022.09—2023.5 完成 SIRT1 调控 P53/GPX4/GSDMD 正反馈回路机制研



究细胞实验部分。

(4) 2023.06—2023.12 完成曲美他嗪对 SIRT1/P53 及铁死亡通路指标影响体外实验部分。

(5) 2024.1-2024.12 进行资料统计分析、论文撰写、发表，科研成果鉴定，结题。

5.2 预期研究成果

(1) 阐明 P53/GPX4/GSDMD 介导的铁死亡-焦亡正反馈信号回路在急性肝衰竭中的作用机制；

(2) 阐明 SIRT1 对 P53/GPX4/GSDMD 正反馈信号回路的调控机制；

(2) 进一步探讨曲美他嗪对急性肝衰竭的保护作用及机制。

(3) 在国内外有影响的专业期刊上发表论文 3 篇以上，其中 SCI 论文发表 1 篇以上。

(4) 培养 1-2 名研究生。

(二) 研究基础与工作条件

1. 研究基础（与本项目相关的研究工作积累和已取得的研究工作成绩）；

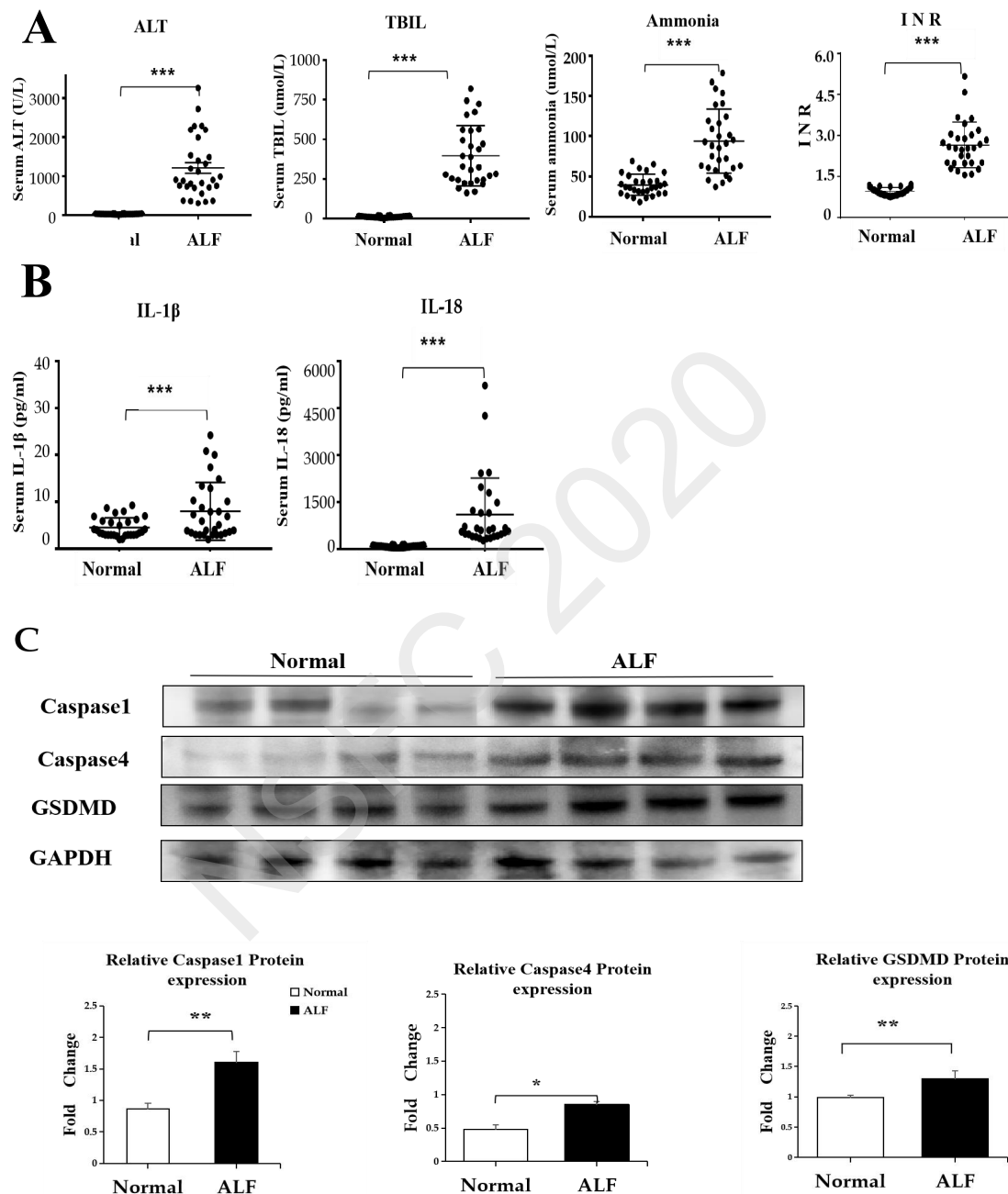
我们前期已成功建立了 D-氨基半乳糖/脂多糖联合诱导的体外 AML12 肝细胞损伤模型及小鼠急性肝衰竭模型，并完成了肝细胞焦亡在急性肝衰竭中的作用机制研究及 GPX4 与 GSDMD 相互作用关系蛋白水平的验证。前期工作的小部分结果已发表在 World J Gastroenterol 杂志，IF3.411：Gasdermin D-mediated hepatocyte Pyroptosis expands inflammatory responses that aggravate acute liver failure by upregulating monocyte chemotactic protein1/CC chemokine receptor-2 to recruit macrophages。以下是我们前期研究的一部分结果：

1.1 急性肝衰竭人血清中焦亡下游炎性细胞因子 IL-1 β 、IL-18 显著增加，肝组织中焦亡通路 Caspase、Caspase4 及 GSDMD 蛋白表达增加

与正常组相比，急性肝衰竭患者血清中 ALT、TBIL、血氨、INR、细胞焦亡下游炎性细胞因子 IL-1 β 、IL-18 显著增加肝组织中（图 1A， $P<0.001$ ）；



Western blot 检测发现,急性肝衰竭人肝组织中焦亡通路 Caspase1、GSDMD 蛋白表达较正常健康人明显增加 ($P<0.01$), Caspase4 蛋白表达增加 ($P<0.05$) (图 1B), 这些数据表明,细胞焦亡参与了急性肝衰竭的发病机制。



注: A: ALT、TBIL、血氨、INR、流式技术检测血清 IL-1 β 、IL-18; B: Western blot 检测肝组织 Caspase1、Caspase4、GSDMD 蛋白表达。与正常人比较, $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$

图 1 人血清 IL-1 β 、IL-18 及肝组织中细胞焦亡通路蛋白表达水平

Fig.1 The levels of IL-1 β 、IL-18 in serum and Pyroptosis-associated proteins in liver



2.D-Galn/LPS诱导的AML12肝细胞损伤模型的建立

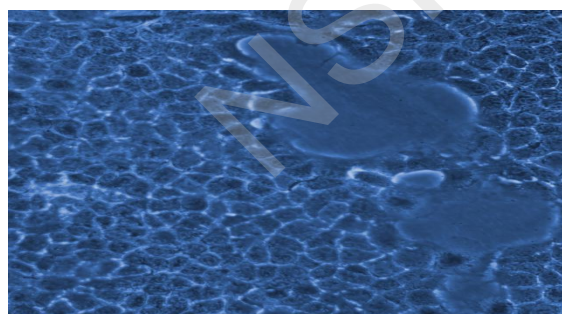
设置D-Galn不同浓度，固定LPS浓度为100ug/ml，干预AML12肝细胞24小时，选择抑细胞制率为50%左右，D-Galn15mmol/L+LPS100ug/ml浓度为后续实验细胞损伤药物浓度（详细见表1）。

正置普通光学显微镜×200倍镜下观察，D-Galn/LPS损伤24小时后细胞大量死亡，漂浮于培养基中，PBS清洗后镜下观察见残余细胞内出现圆形或椭圆形空泡样改变，多者聚集形成蜂窝状孔隙，重者细胞完全分解呈空泡状（图2）。

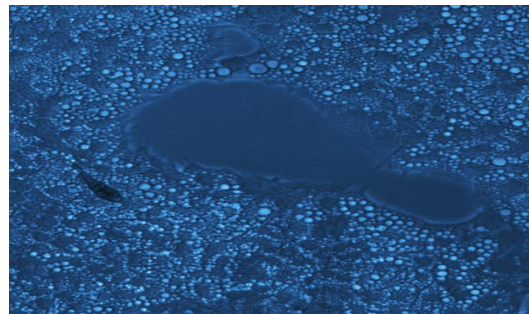
表1肝细胞损伤模型的建立

Table 1 Estabish hepatocyte injury model

组别	D-Galn (mmol/L)	LPS (ug/ml)	干预时间 (小时)	细胞抑制率 (%)
A	0	100	24	10.36±2.18
B	5	100	24	24.14±4.17
C	10	100	24	36.79±5.1
D	15	100	24	53.59±6.23
E	20	100	24	66.15±5.77
F	25	100	24	71.22±8.36



正常组对照组 (×200)



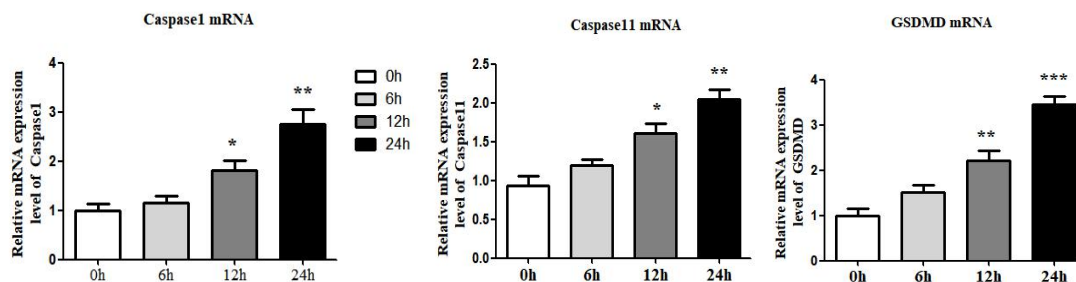
模型组 (×200)

图2 普通光学显微镜下细胞形态学变化，×200

Fig.2 Morphological changes by microscope, ×200

3 在 D-Galn/LPS 诱导的 AML12 细胞损伤模型中，焦亡通路 Caspase1、Caspase11 及 GSDMD 的 mRNA 随着损伤时间增加而表达增加

与 0h 比较，Caspase1、Caspase11 的 mRNA 表达在 12h 开始增加 ($P<0.05$)，24h 表达明显增加 ($P<0.01$)；与 0h 比较，GSDMD mRNA 表达在 12h 明显增加 ($P<0.01$)，24h 显著增加（图 3）。



注：与 0h 组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ，*** $P < 0.001$

图 3 qRT-PCR 检测 0h、6h、12h、24h Caspase1, Caspase11 及 GSDMD mRNA

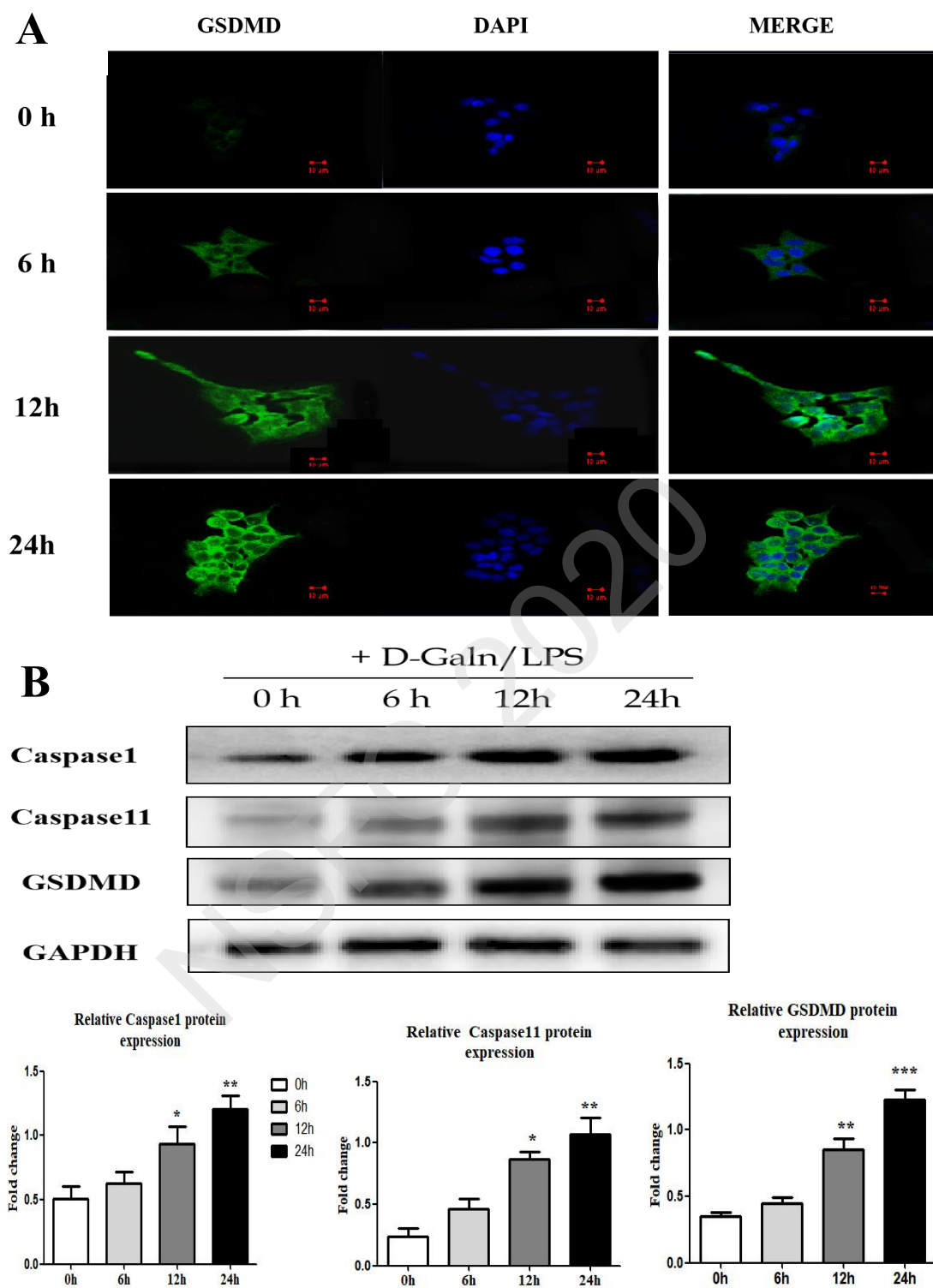
Fig.3.0,6,12,24h Caspase1, Caspase11 and GSDMD mRNA by qRT-PCR

4.在 D-Galn/LPS 诱导的损伤模型中，细胞焦亡通路 Caspase1、Caspase11 及 GSDMD 蛋白表达随着损伤时间增加而表达增加

共聚焦荧光显微镜观察 GSDMD 蛋白表达变化发现：0h 组细胞中极少量表达，6h 组可见散在表达于肝细胞浆，随着时间的延长，GSDMD 蛋白荧光表达逐渐增加，24h 组 GSDMD 蛋白明显增多，并聚集在肝细胞膜内侧，符合 GSDMD 活化后从胞浆移位至胞膜，并插入细胞膜内侧形成胞膜孔洞导致细胞死亡的特点（图 4A）。

Western blot 检测 Caspase1、Caspase11 及 GSDMD 蛋白表达，发现与 0h 比较，12h Caspase1、Caspase11 蛋白表达增加（图 4B， $P < 0.05$ ），至 24h 时表达明显增加（ $P < 0.01$ ）。GSDMD 蛋白增加较 Caspase1 及 Caspase11 更为明显，与 0h 比较，12h 表达已明显增加（ $P < 0.01$ ），24h 显著增加（ $P < 0.001$ ）。

这些数据说明，在 D-Galn/LPS 诱导的肝细胞损伤模型中，随着肝细胞抑制率的不断升高，细胞损伤加重、死亡增多，细胞焦亡通路表达逐渐上调，是肝细胞死亡的重要方式。但是我们并没有检测到焦亡下游炎性细胞因子 IL-1 β 、IL-18,说明肝细胞焦亡不同于免疫细胞焦亡通过释放 IL-1 β 及 IL-18 扩大炎症反应，可能存在其它机制。我们注意到，上清液中 MCP1 含量随着细胞焦亡通路的表达上调而增加，作为机体重要的巨噬细胞趋化因子，是否与肝细胞焦亡机制有关值得探索。



注：A：共聚焦荧光显微镜观察 GSDMD 蛋白表达；B：Western blot 检测细胞 Caspase1、Caspase11、GSDMD 蛋白表达。与 0h 组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ，*** $P < 0.001$

图 4 0, 6, 12, 24h Caspase1、Caspase11、GSDMD 蛋白表达

Fig.4 Relative protein expression of Caspase1、Caspase11、GSDMD in 0,6,12,24 h



5.GSDMD shRNA 降低 D-Galn/LPS 诱导的 AML12 损伤模型的细胞抑制率，降低了 MCP1/CCR2 炎症趋化通路 mRNA 及蛋白的表达

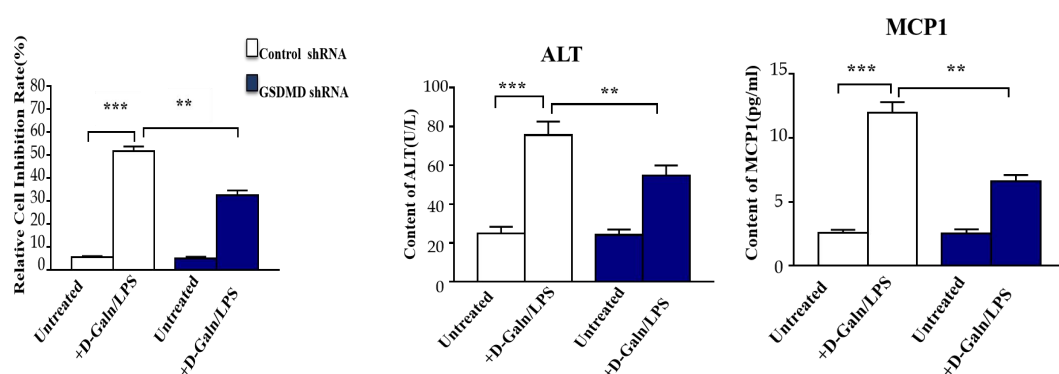
既往研究明确 MCP1/CCR2 信号通路可强烈趋化中性粒细胞聚集的作用介导肝脏免疫损伤参与急性肝衰竭的发病机制，前述实验结果发现 D-Galn/LPS 诱导的肝细胞焦亡并未释放焦亡下游炎症因子 IL-1 β 及 IL-18，但细胞上清液中 MCP1 含量却明显增加。为进一步明确肝细胞焦亡是否对 MCP1/CCR2 轴是否有调节作用，接下来，我们用 D-Galn/LPS 对 GSDMDshRNA 组及 Control 组进行损伤干预 24 小时，发现与 Control shRNA 组比较，GSDMDshRNA 组细胞抑制率、上清液 ALT 和 MCP1 均明显降低（图 5A，P 均<0.01）；

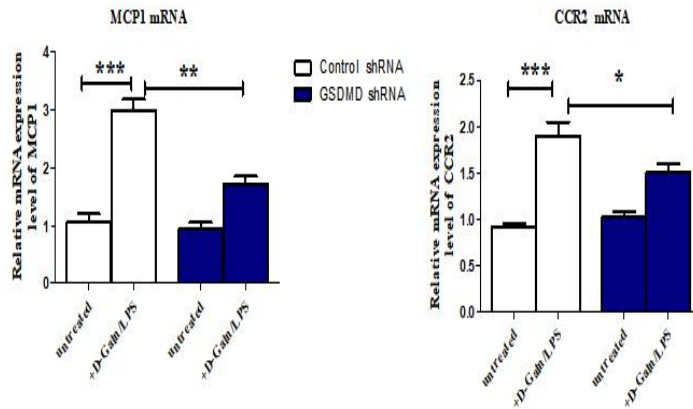
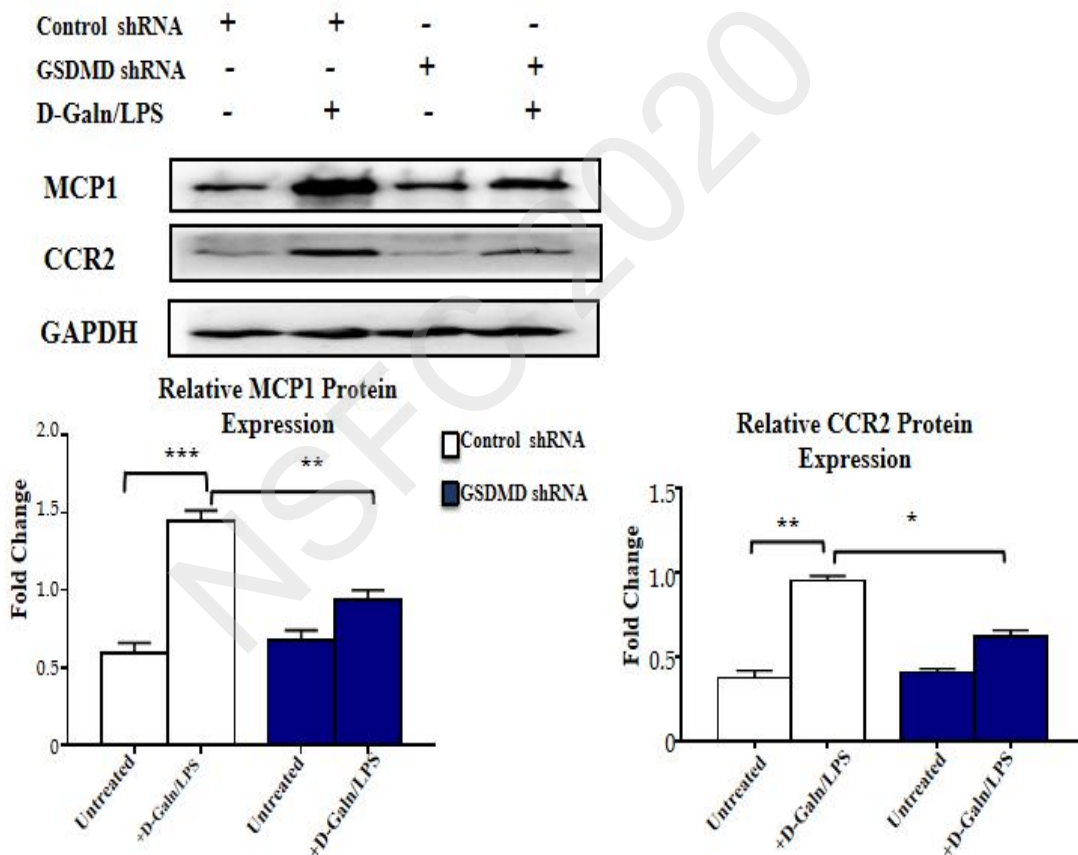
qRT-PCR 检测发现，与 Control shRNA 对照组比较，Control shRNA 模型组 MCP1 及 CCR2mRNA 均明显增加（图 5B，P<0.001，P<0.01）；与 Control shRNA 模型组比较，GSDMDshRNA 模型组 MCP1、CCR2mRNA 降低（P<0.01，P<0.05）。

Western blot 检测发现，与 Control shRNA 对照组比较，Control shRNA 模型组 MCP1 及 CCR2 蛋白表达明显增加（图 5C，P<0.001，P<0.01）；与 Control shRNA 模型组比较，GSDMDshRNA 模型组 MCP1、CCR2 蛋白表达降低（P<0.01，P<0.05）。

这些结果说明，通过抑制 GSDMD 减少细胞焦亡可以降低 MCP1/CCR2 的炎症放大信号作用。

A



**B****C**

注：A：细胞抑制率、上清液 ALT、LDH；B：qRT-PCR 检测 MCP1、CCR2 mRNA 表达；

C：Western blot 检测 MCP1、CCR2 蛋白表达。

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

图 5 GSDMD shRNA 减轻 D-Galn/LPS 诱导的 AML12 损伤，降低 MCP1/CCR2 表达

Fig.5 GSDMD shRNA decreased the expression of MCP1/CCR2 in AML12 injury model induced by D-Galn/LPS



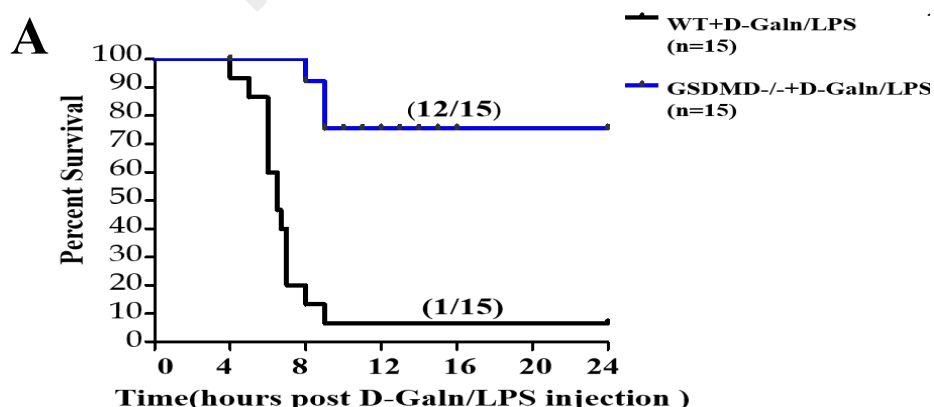
6. GSDMD 基因敲除显著减轻 D-Galn/LPS 诱导的急性肝衰竭小鼠肝损伤, 提高生存率

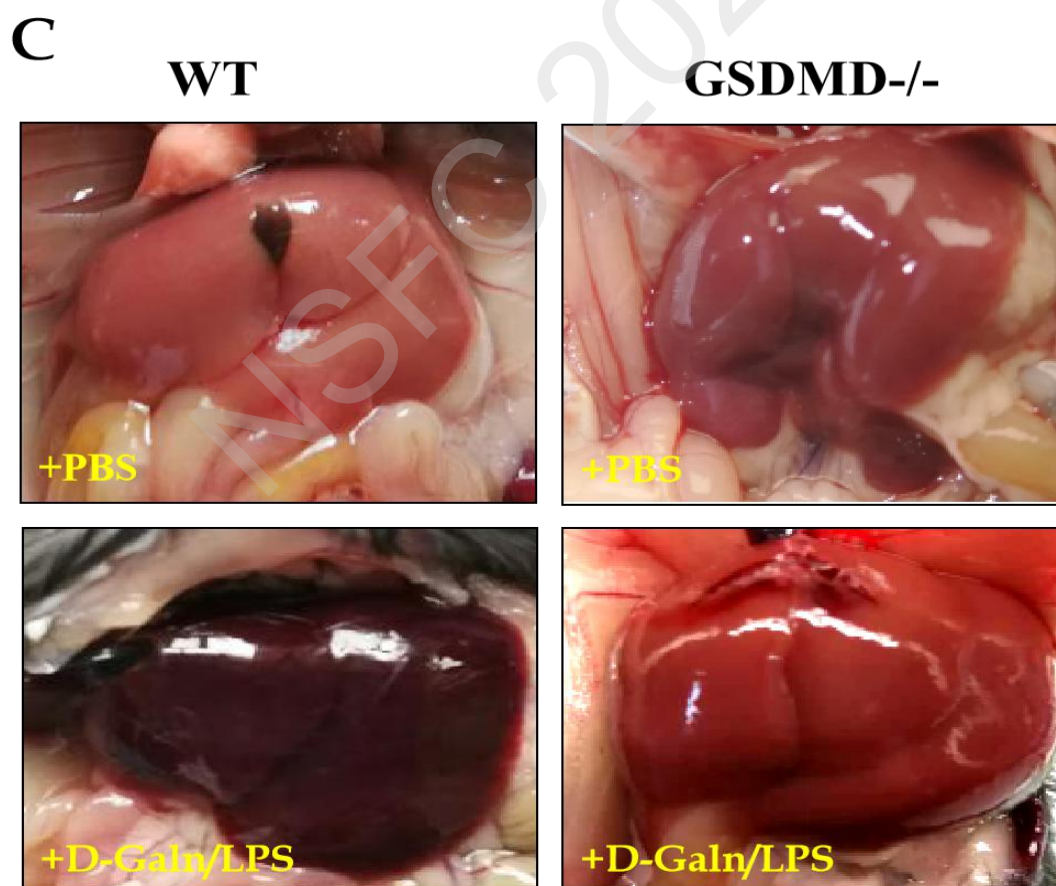
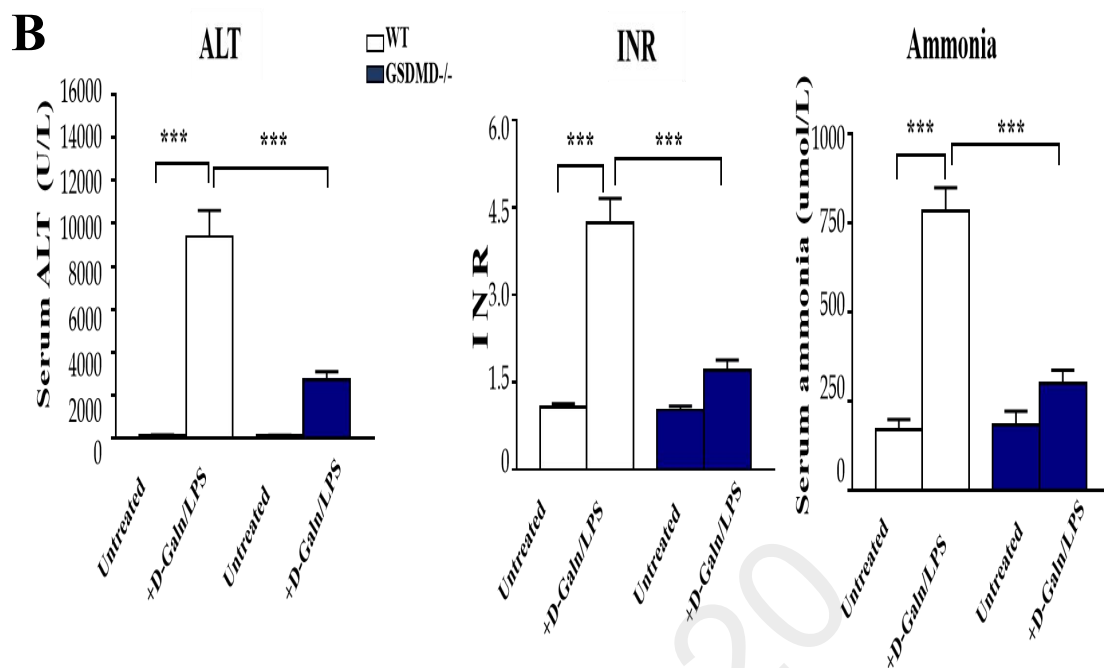
WT 小鼠和 GSDMD^{-/-}小鼠急性肝衰竭模型中, 6h 左右 WT 模型组小鼠出现死亡, 24 小时 15 只小鼠仅存活 1 只, GSDMD^{-/-}模型组 24 小时存活率大幅度提高, 15 只小鼠仅死亡 3 只 (图 6A, $P=0.0056$)。

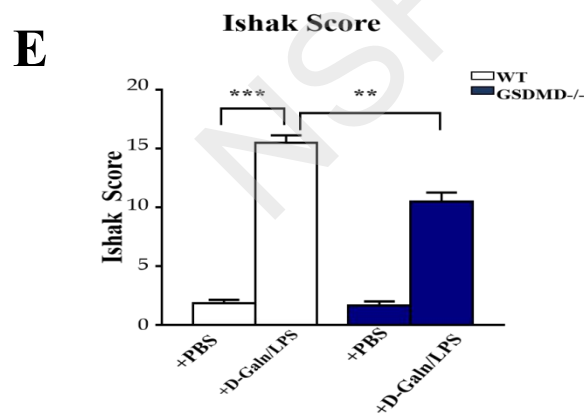
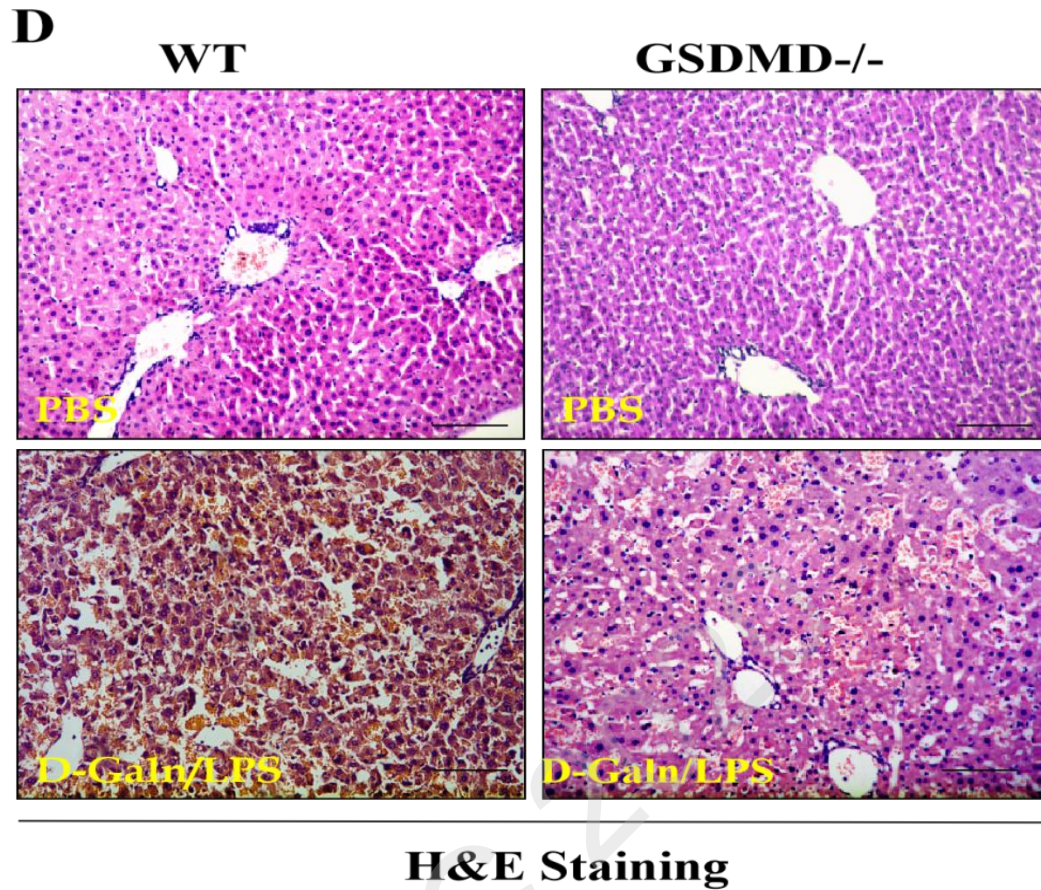
与 WT 正常组对比, WT 模型组小鼠血清 ALT、INR、血氨指标显著升高 (图 6B, $P<0.001$)。与 WT 模型组比较, GSDMD^{-/-}模型组小鼠上述指标显著下降 ($P<0.001$)。

解剖见 WT 正常组和 GSDMD^{-/-}正常组小鼠肝脏表面光滑细润、暗粉红色、边缘锐利、质地中等, WT 模型组小鼠肝脏充血肿胀严重, 体积增大呈暗褐色, 包膜紧张, GSDMD^{-/-}模型组小鼠肝脏充血肿胀程度较 WT 模型组显著减轻 (图 6C)。

肝组织病理切片 HE 染色 (图 6D) 见 WT 正常组及 GSDMD^{-/-}正常组肝细胞浆均匀红染, 细胞核大小正常, 肝窦清晰可见, 肝索排列整齐。WT 模型组见肝细胞大片状坏死, 大量肝细胞核碎裂, 肝小叶结构完全消失, 门静脉灌流术后肝窦内仍可见红细胞淤积, 汇管区及周围广泛炎症细胞浸润。GSDMD^{-/-}模型组小鼠肝组织 HE 染色见肝细胞肿胀变性, 点状坏死及灶状坏死, 部分桥接坏死, 肝小叶结构完整, 炎性细胞浸润明显减少。与 WT 模型组比较, GSDMD^{-/-}模型组肝脏 Ishak 炎症评分显著减轻降低 (图 6E, $P<0.01$)。







注：A：小鼠生存曲线；B：全自动生化仪及凝血仪检测血清 ALT、INR、AMM；C：肝脏外观；D：肝组织 HE 染色， $\times 200$ ；E：ISHAK 炎症评分。

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

图 6GSDMD 基因敲除显著减轻 D-Galn/LPS 诱导的肝损伤，提高小鼠生存率

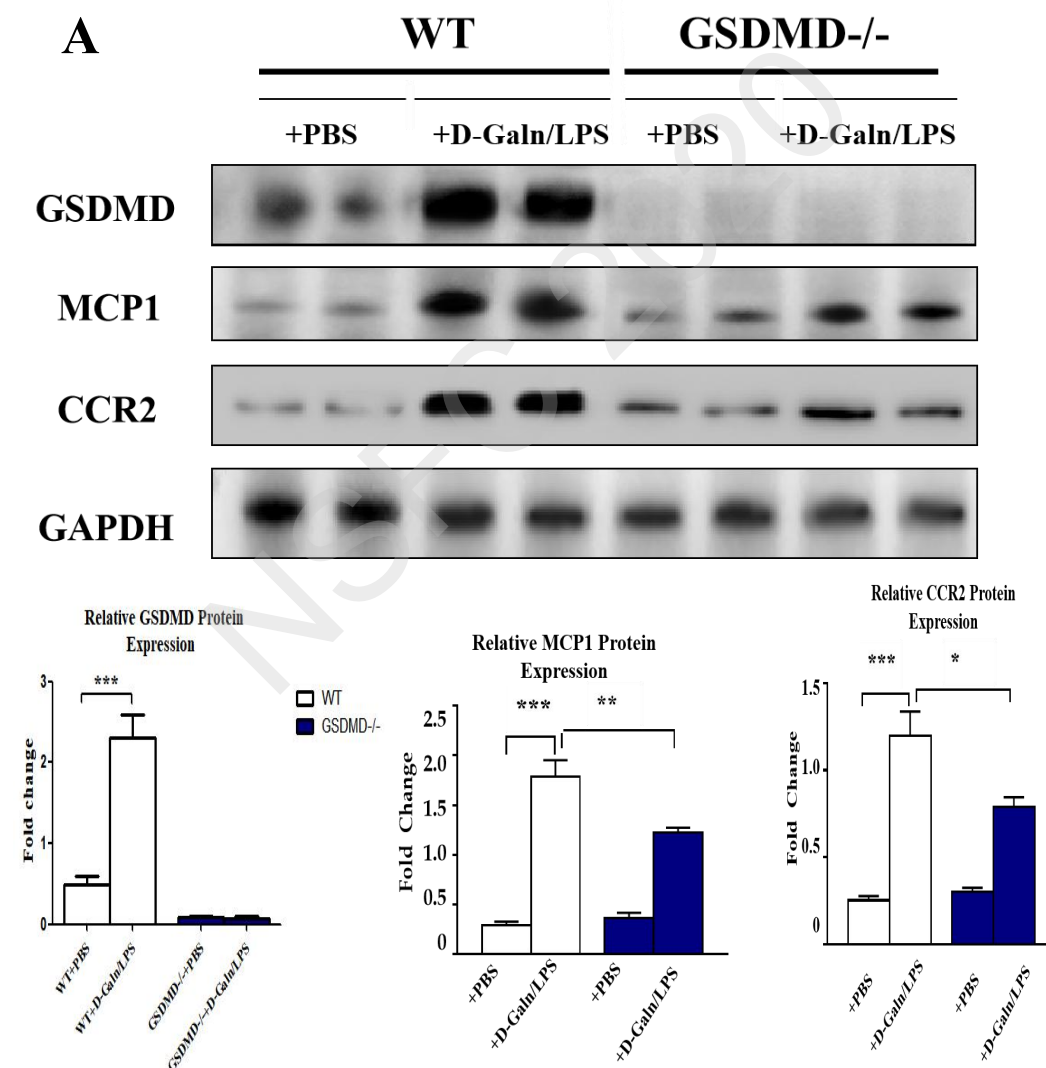
Fig.6 GSDMD knockout significantly alleviate liver injury induced by D-Galn/LPS and improved the survival rate

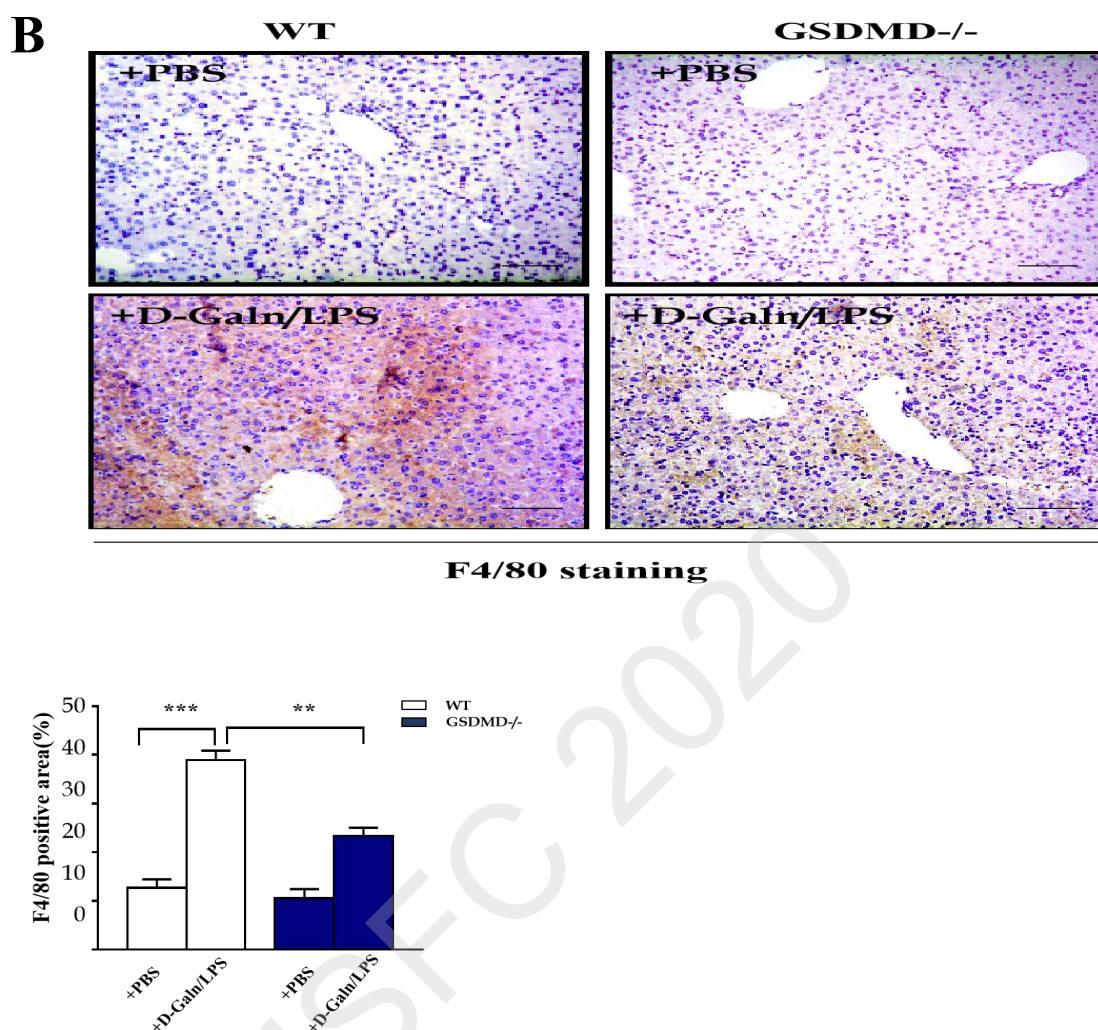


7. GSDMD 基因敲除降低 D-Galn/LPS 诱导的急性肝衰竭小鼠肝组织

MCP1/CCR2 蛋白表达水平，减少肝组织巨噬细胞浸润

Western blot 检测发现：与 WT 正常组比较，WT 模型小鼠肝组织中 GSDMD 蛋白表达显著增加（图 7A, $P < 0.001$ ），MCP1 及 CCR2 蛋白表达增加（ $P < 0.01$, $P < 0.05$ ）；与 WT 模型组比较，GSDMD^{-/-}模型组肝组织中 MCP1 及 CCR2 蛋白表达明显减少（ $P < 0.01$, $P < 0.05$ ）。小鼠巨噬细胞特异性蛋白 F4/80 免疫组化检测见表达明显减少（图 7B, $P < 0.01$ ）；这说明了 GSDMD 介导的细胞焦亡对 MCP1/CCR2 这一炎症趋化信号具有调控作用。





注：A：Western blot 检测 GSDMD、MCP1、CCR2 蛋白表达；B：免疫组化检测 F4/80 表达

*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001

图 7 GSDMD 基因敲除显著降低 D-Galn/LPS 诱导的急性肝衰竭小鼠肝组织 MCP1/CCR2 蛋白表达水平，减少肝组织巨噬细胞浸润

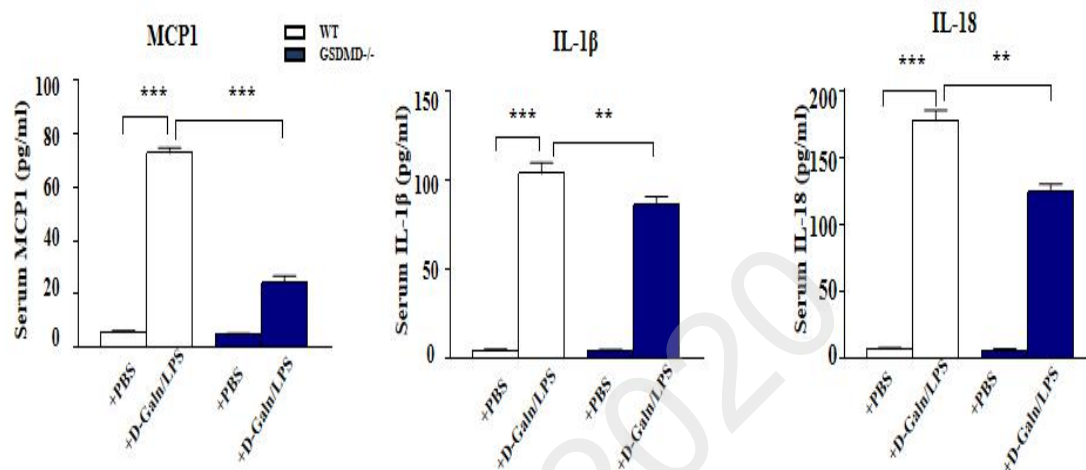
Fig.7 GSDMD knockout significantly decreased the expression of MCP1/CCR2 and macrophage infiltration in D-Galn/LPS-induced acute liver failure mice

8.GSDMD 基因敲除降低 D-Galn/LPS 诱导的急性肝衰竭小鼠血清炎症因子 MCP1、IL-1 β 及 IL-18 水平

与 WT 正常对照组比较，WT 模型组小鼠血清 MCP1、IL-1 β 及 IL-18 显著增加（图 8，P < 0.001），与 WT 模型组比较，GSDMD^{-/-}组血清 MCP1、IL-1 β



及 IL-18 显著降低 ($P<0.001$, $P<0.01$, $P<0.01$)。至此, 我们的实验证明了 GSDMD 介导的细胞焦亡通过上调 MCP1/CCR2 信号通路招募巨噬细胞迁移至肝脏, 释放炎症因子导致剧烈炎症风暴促进病情发展这一科学假设, 通过敲减或敲除细胞焦亡关键执行者 GSDMD 可以显著改善急性肝衰竭时的细胞焦亡及炎症反应, 进而减轻肝损伤, 提高存活率。



注: ELISA 检测血清 MCP1、IL-1β、IL-18。

** $P<0.01$, *** $P<0.001$

图 8 敲除 GSDMD 显著降低 D-GalN/LPS 诱导的急性肝衰竭小鼠血清 MCP1、IL-1β 及 IL-18

Fig. 8 GSDMD knockout significantly decreased the level of MCP1、IL-1β and IL-18

9. 过表达与抑制 GPX4 对 D-GalN/LPS 诱导的肝细胞损伤模型中 GSDMD 表达的影响

qRT-PCR 结果显示, 与空载阴性对照组比较, GPX4 特异性抑制剂 RSL3 组 GSDMD mRNA 表达上调三十多倍, 具有显著性差异 (图 9A, $P<0.001$)。

Western blot 检测显示, 与空载阴性对照组比较, 模型组 GSDMD 蛋白表达增加 (图 9B, $P<0.01$); RSL3 组 GSDMD 蛋白表达显著增加 ($P<0.001$)。与模型组比较, GPX4 过表达组 GSDMD 蛋白表达均显著减少 ($P<0.001$)。

上述实验结果说明: 抑制 GPX4 后 GSDMD 表达显著升高, 而过表达 GPX4 可显著降低 GSDMD 表达, 证明了我们的科学推测: GPX4-GSDMD 之间存在负向调控关系, 但两者间的作用机制还需进一步验证。

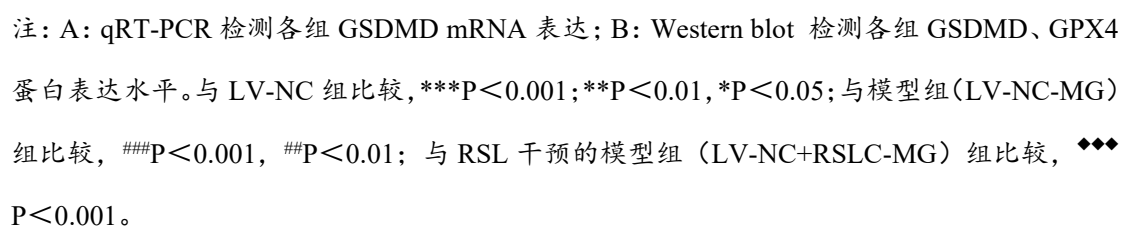


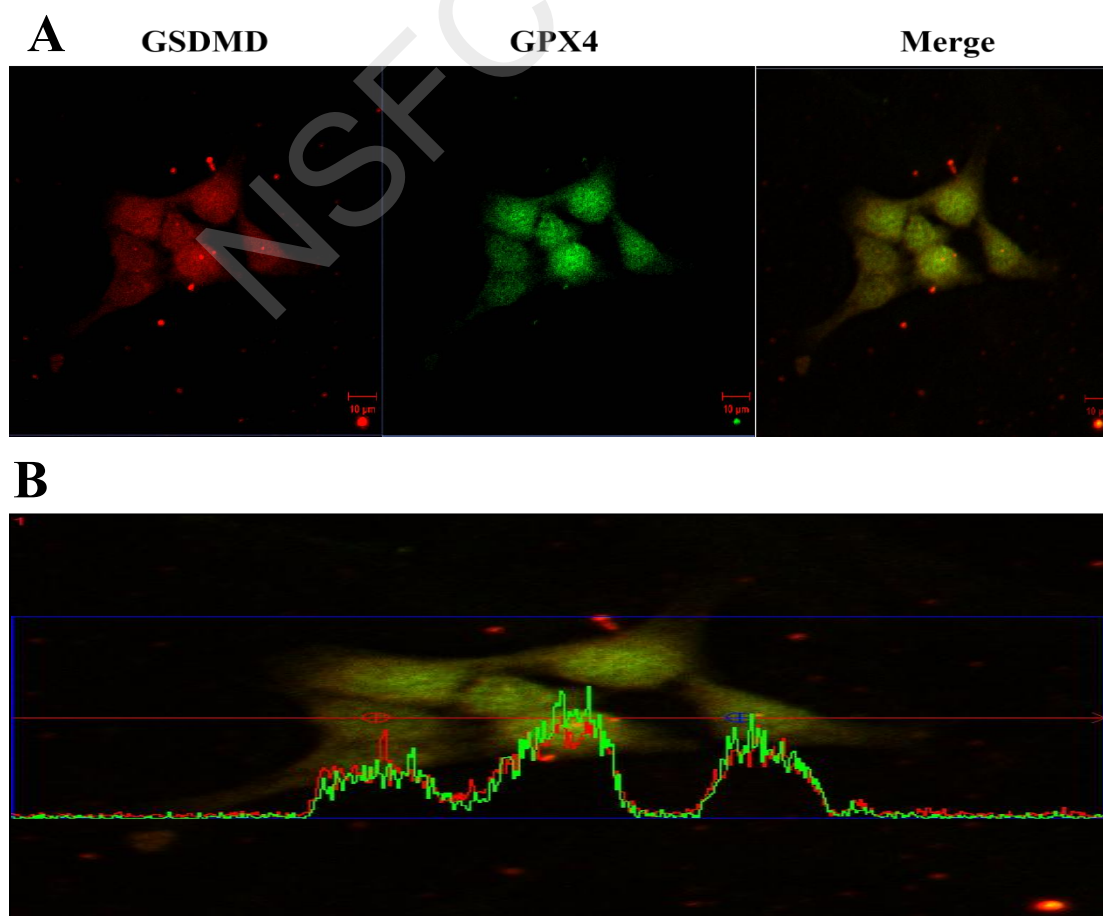
Fig.9 Effects of overexpression and inhibition of GPX4 on GSDMD

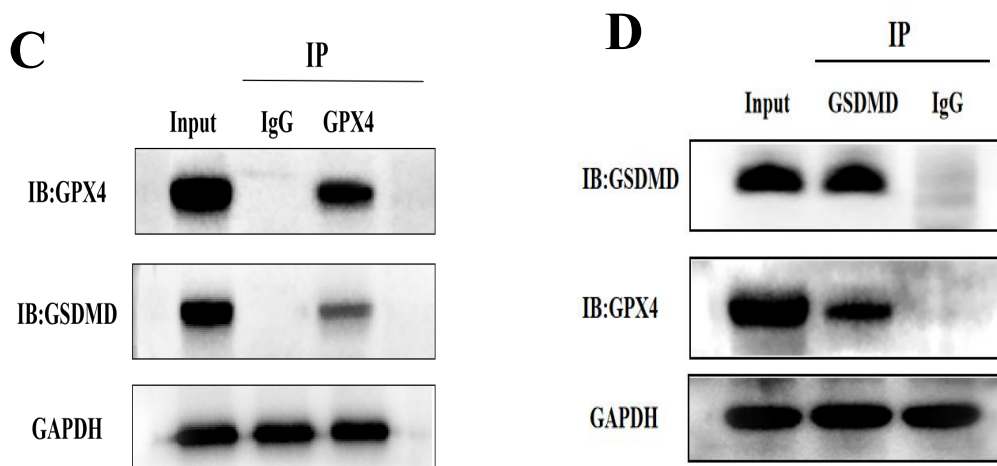


10.GPX4 与 GSDMD 蛋白水平相互作用机制研究

激光共聚焦荧光显微镜观察发现,带 EGFP 绿色荧光标记的 GPX4 蛋白和红色荧光标记的 GSDMD 蛋白均分布在胞浆中, MERGE 后见两个信号颜色重叠为黄色(图 10A), GPX4 光谱信号(绿)与 GSDMD 光谱信号(红)重合(图 10B)。Image J 软件进行共定位图像分析处理, 计算两者皮尔森相关系数 (Pearson's correlation) 为 0.8023 ± 0.0421 , 说明两种蛋白表达位置高度接近, 存在相互作用关系。

我们进一步用 D-Galn/LPS 干预 LV-GPX4 AML12 肝细胞株 24 小时以促进细胞 GSDMD 的表达, 收集样本裂解细胞处理后进行免疫共沉淀检测。发现在用 GSDMD 单克隆抗体下拉的蛋白中, Western blot 检测发现用 GPX4 一抗孵育后可见 22KD 处出现清晰条带(图 10C), 再用 GPX4 单克隆抗体下拉蛋白, Western blot 检测发现用 GSDMD 一抗孵育后可见 50KD 处出现清晰条带, 说明两者存在相互结合的作用关系(图 10D), 通过免疫荧光蛋白质共定位和蛋白质免疫共沉淀进一步验证了 GPX4 与 GSDMD 存在相互作用关系。





注：A 共聚焦荧光显微镜观察 GPX4（绿色荧光）与 GSDMD（红色荧光）蛋白表达位置；
B：GPX4（绿色荧光）与 GSDMD（红色荧光）波长光谱图；C：用 GPX4 单克隆一抗免疫共沉淀；D：用 GSDMD 单克隆一抗免疫共沉淀；IP：免疫共沉淀；IB 免疫印迹；Input：未做沉淀的蛋白；IgG：小鼠 IgG 抗体下拉的蛋白。

图 10 GPX4-GSDMD 蛋白质免疫荧光共定位 ($\times 400$)

Fig.10 Immunofluorescence co-localization of GPX4-GSDMD Protein ($\times 400$)

11. 曲美他嗪在 AML12 细胞的 IC₅₀ 检测

用含 TMZ 0.1、1、10、100、1000、10000 $\mu\text{mol/L}$ 不同浓度的 DMEM/F12 含血清培养基培养 AML12 细胞 24 小时，CCK8 法检测细胞抑制率，发现当浓度超过 1000 $\mu\text{mol/L}$ 时对细胞抑制率升高，经 GraPhadPrism5.0 软件计算 IC₅₀ 为 1179 $\mu\text{mol/L}$ （见图 11），根据预实验结果设置 TMZ 低中高浓度分别为 50 $\mu\text{mol/L}$ 、100 $\mu\text{mol/L}$ 、200 $\mu\text{mol/L}$ 进行后续试验。

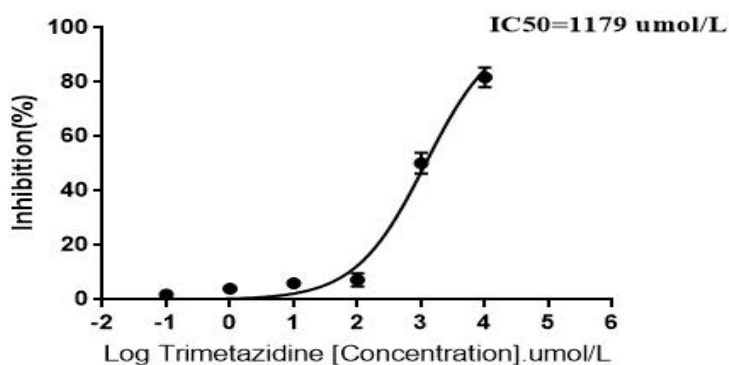


图 11 曲美他嗪 IC₅₀ 曲线

Fig.11 IC₅₀ curve of Trimetazidine



12.曲美他嗪对 D-Galn/LPS 诱导的肝细胞损伤模型形态学影响

正置光学显微镜×200 倍镜下观察细胞形态：正常组 AML12 细胞贴壁生长状态良好，排列成索状或相连成片，呈不规则多边形，细胞之间相互接触，贴壁良好；模型组较多死亡漂浮于培养基中，PBS 轻轻清洗后光镜下观察见残余贴壁细胞内出现气泡样改变，多者形成蜂窝状孔隙，重者细胞完全分解呈空泡或簇团状；还原型谷胱甘肽组也可见细胞内气泡样改变，但较模型组稍少；曲美他嗪低剂量组（50umol/L）、中剂量组（100umol/L）及高剂量组（200umol/L）细胞内均未见明显空泡样改变，细胞贴壁比例增加，死亡比例减少（见图 12）。

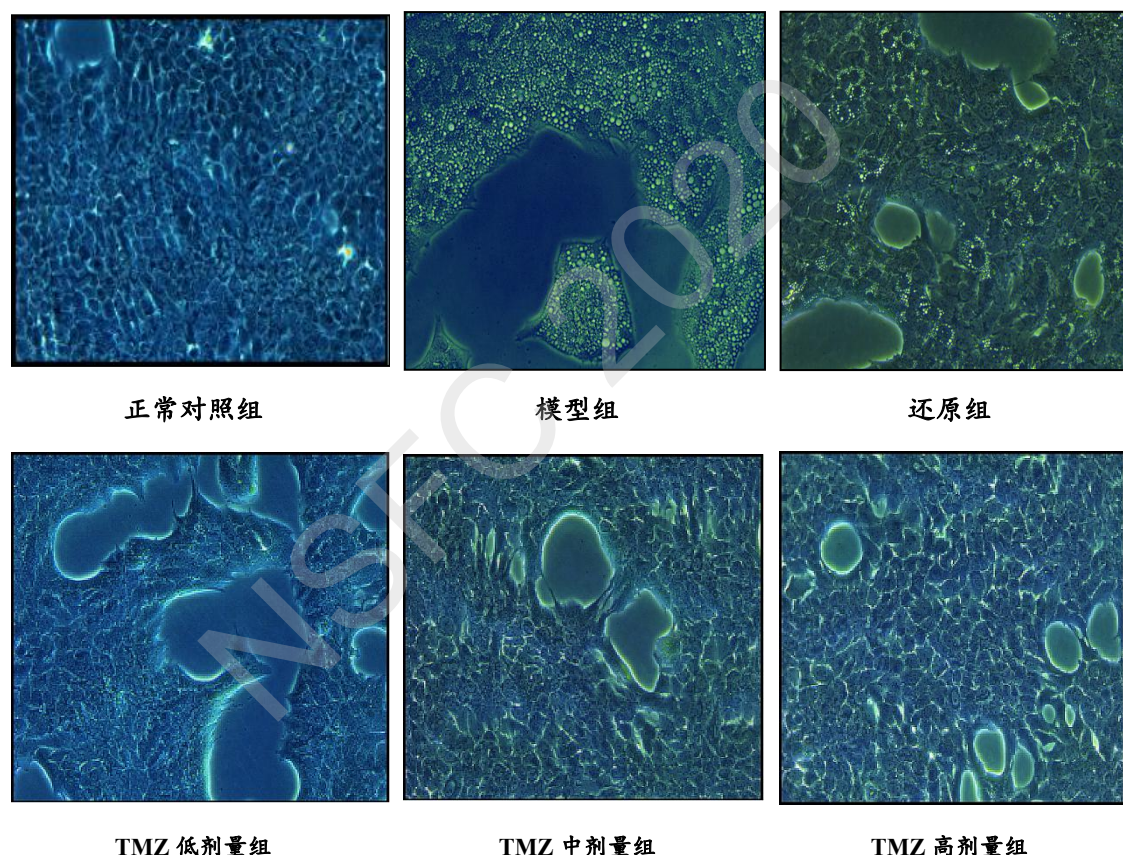


图 12 光学显微镜下各组细胞形态学变化，×200

Fig.12 The change of cell morphology by microscop, ×200

13.曲美他嗪对 D-Galn/LPS 诱导的 AML12 损伤模型细胞抑制率、上清液 ALT 和 LDH 的影响

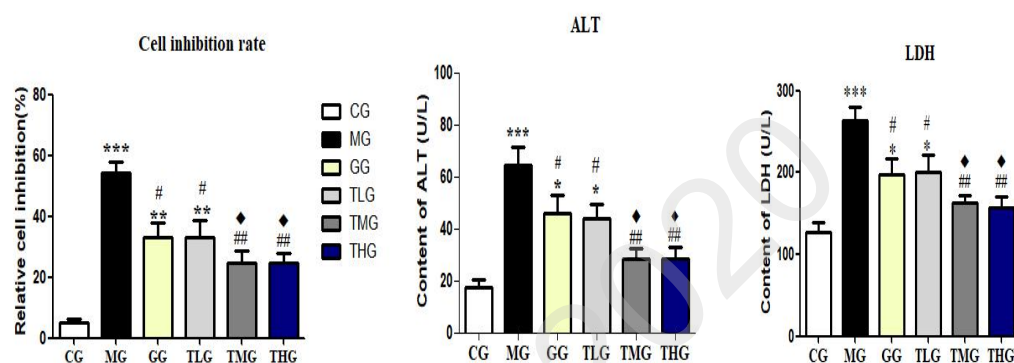
与正常对照组比较，模型组细胞抑制率明显升高，上清液 ALT、LDH 显著增加（图 13，P 均<0.001）；TMZ 低剂量组及还原型谷胱甘肽组细胞抑制率升



高 ($P<0.01$)，上清液 ALT、LDH 增加 ($P<0.05$)；TMZ 中、高剂量组上述指标与正常对照组无统计学差异 ($P>0.05$)。

与模型组比较，TMZ 低剂量组及还原型谷胱甘肽组细胞抑制率降低 ($P<0.05$)，上清液 ALT、LDH 减少 (P 均 <0.05)；TMZ 中、高剂量组细胞抑制率明显降低，上清液 ALT、LDH 明显减少 (P 均 <0.01)。

与还原型谷胱甘肽组比较，TMZ 中、高剂量组细胞抑制率降低，ALT、LDH 减少 (P 均 <0.05)。



注：CG：正常对照组，MG：模型组，GG：还原型谷胱甘肽组，TLG：TMZ 低剂量组，TMG：TMZ 中剂量组，THG：TMZ 高剂量组。与正常组比较，*** $P<0.001$ ，** $P<0.01$ ，* $P<0.05$ ；与模型组比较，## $P<0.01$ ；# $P<0.05$ ；与还原型谷胱甘肽组比较，◆ $P<0.05$

图 13 各组细胞抑制率及上清液 ALT、LDH

Fig.13 Cell inhibition rate, supernatant ALT and LDH in each group

14. 曲美他嗪对 D-Galn/LPS 诱导的 AML12 损伤模型中细胞内 ATP 的影响

ATP 作为细胞最重要的能量分子在各种生理、病理状态下起着重要的作用，其能量的高低反映了细胞的功能及损伤后自我修复的可能性。

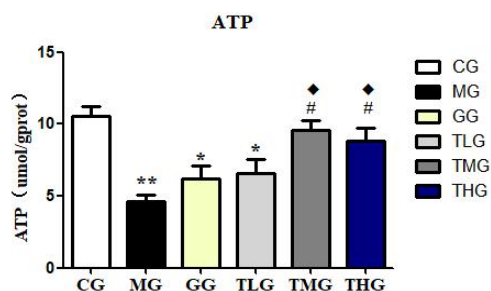
与正常对照组比较，模型组细胞内 ATP 含量明显降低（图 14， $P<0.01$ ）；还原型谷胱甘肽组及 TMZ 低剂量组细胞 ATP 亦有所降低 ($P<0.05$)；TMZ 中高剂量组与正常对照组无统计学差异 ($P>0.05$)。

与模型组及还原型谷胱甘肽组比较，TMZ 中、高剂量组细胞内 ATP 含量增加 ($P<0.05$)，还原型谷胱甘肽组及 TMZ 低剂量组 ATP 含量较模型组也有升高趋势，但无统计学意义 ($P>0.05$)。

说明除心肌细胞外，TMZ 同样可调节肝细胞在缺氧或缺血情况下的能量代



谢, 阻止细胞内 ATP 水平的下降, 从而保证了离子泵的正常功能和透膜 $\text{Na}^+\text{-K}^+$ 电流的正常运转, 维持细胞内环境的稳定。



注: CG: 正常对照组, MG: 模型组, GG: 还原型谷胱甘肽组, TLG: TMZ 低剂量组, TMG: TMZ 中剂量组, THG: TMZ 高剂量组。与正常组比较, ** $P<0.01$, * $P<0.05$; 与模型组比较, # $P<0.05$; 与还原型谷胱甘肽组比较, ♦ $P<0.05$

图 14 各组细胞 ATP 含量

Fig.14ATP contents in each group

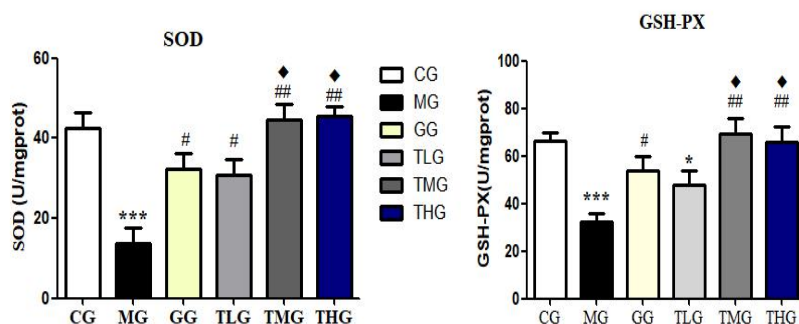
15. 曲美他嗪对 D-Galn/LPS 诱导的 AML12 损伤模型中细胞 SOD、CAT、GSH-Px 活力及 MDA 含量的影响

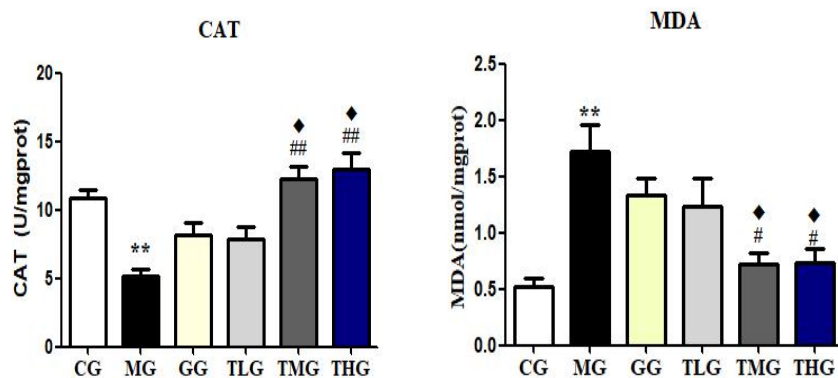
与正常对照组比较, 模型组细胞 SOD、GSH-Px、CAT 活性显著下降 (图 15, $P<0.001$, $P<0.001$, $P<0.01$), MDA 含量增加 ($P<0.01$);

与模型组比较, 还原型谷胱甘肽组及 TMZ 低剂量组 SOD 活性稍增高 (P 均 <0.05), CAT 及 MDA 无统计学差异 ($P>0.05$); TMZ 中、高剂量组 SOD、GSH-Px 及 CAT 活性明显升高 (P 均 <0.01), MDA 含量减少 ($P<0.05$)。

与还原型谷胱甘肽组比较, TMZ 中、高剂量组 SOD、GSH-Px、CAT 活性增加 (P 均 <0.05), MDA 含量减少 ($P<0.05$)。

TMZ 中、高剂量组间上述指标无统计学差异。





注: CG: 正常对照组, MG: 模型组, GG: 还原型谷胱甘肽组, TLG: TMZ 低剂量组, TMG: TMZ 中剂量组, THG: TMZ 高剂量组。与正常组比较, *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$; 与模型组比较, ## $P < 0.01$; # $P < 0.05$; 与还原型谷胱甘肽组比较, ◆ $P < 0.05$ 。

图 15 各组细胞 SOD、GSH-PX、CAT 活性及 MDA 含量

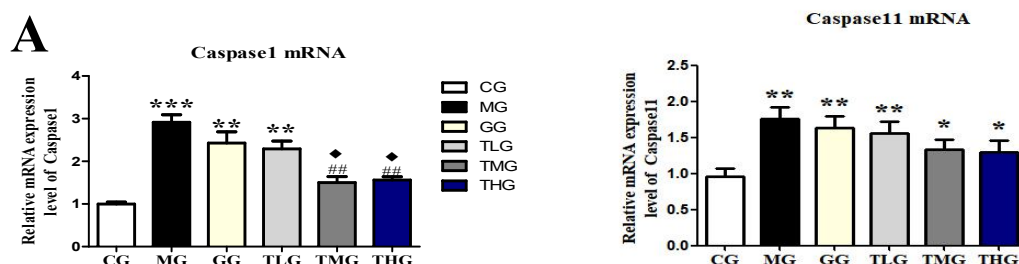
Fig.15 SOD,GSH-PX,CAT and MDA in each group

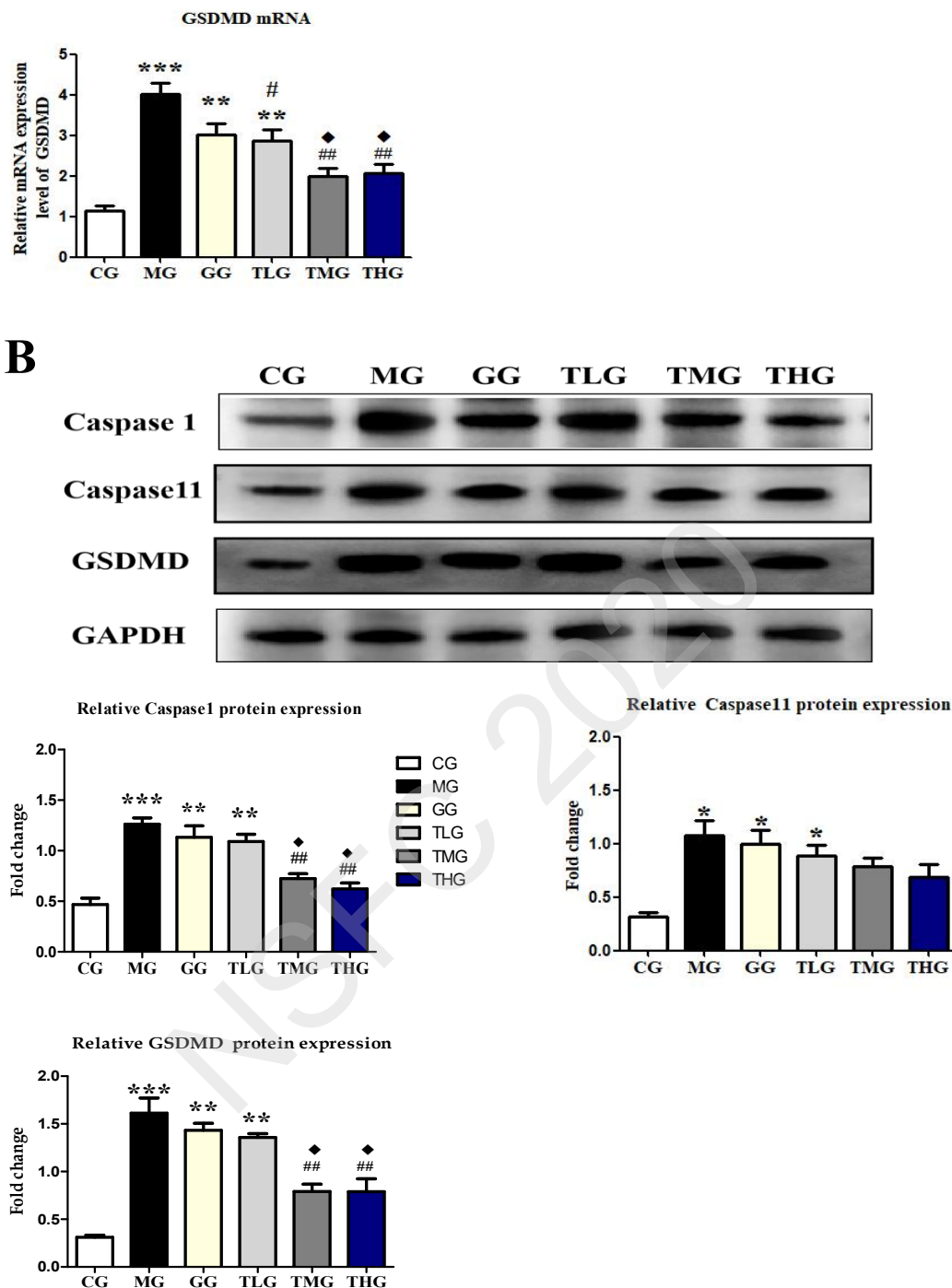
16. 曲美他嗪对 D-Galn/LPS 诱导的 AML12 损伤模型焦亡通路 Caspase1、Caspase11、GSDMD 的 mRNA 及蛋白表达的影响

与正常对照组比较, 模型组 Caspase1、Caspase11、GSDMD mRNA 表达升高 (图 16A, $P < 0.001$, $P < 0.01$, $P < 0.001$), 与模型组比较, TMZ 中、高剂量组 Caspase1、GSDMD mRNA 表达减少 (P 均 < 0.01), Caspase11 mRNA 表达减少, 但无统计学差异。

与正常对照组比较, 模型组 Caspase1、Caspase11、GSDMD 蛋白表达升高 (图 16B, $P < 0.001$, $P < 0.05$, $P < 0.001$)。与还原型谷胱甘肽组比较, TMZ 中、高剂量组 Caspase1、GSDMD 蛋白表达减少 (P 均 < 0.05), Caspase11 蛋白表达无统计学差异。

中高剂量组上述指标均无统计学差异。





注：A:qRT-PCR 检测 Caspase1、Caspase11 及 GSDMDmRNA 表达；B：Western blot 检测 Caspase1、Caspase11 及 GSDMD 蛋白表达。

CG：正常对照组，MG：模型组，GG：还原型谷胱甘肽组，TLG：TMZ 低剂量组，TMG：TMZ 中剂量组，THG：TMZ 高剂量组。与正常组比较，*** $P < 0.001$ ，** $P < 0.01$ ，* $P < 0.05$ ；与模型组比较，## $P < 0.01$ ；# $P < 0.05$ ；与还原型谷胱甘肽组比较，◆ $P < 0.05$

图 16 各组 Caspase1、Caspase11、GSDMDmRNA 及蛋白表达

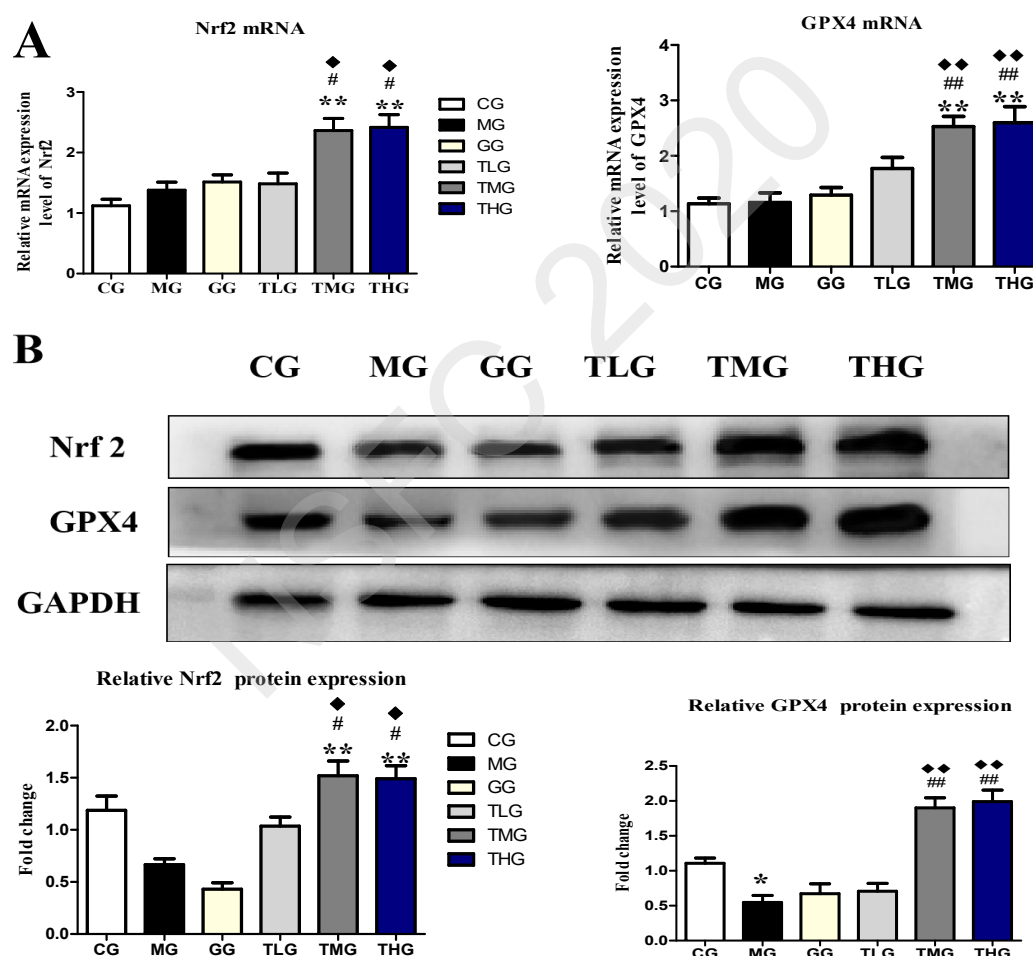
Fig.16 Relative mRNA and protein expression of Caspase1,Caspase11,GSDMD

17. 曲美他嗪对 D-Galn/LPS 诱导的 AML12 损伤模型 Nrf2/GPX4

mRNA 及蛋白表达的影响

与正常对照组比较, 模型组 Nrf2、GPX4 mRNA 有升高趋势, 但无统计学意义 (图 17A, $P > 0.05$), 但蛋白表达减少 (图 17B, $P < 0.05$); TMZ 中、高剂量组 Nrf2 及 GPX4 mRNA 明显升高 (P 均 < 0.01), 蛋白表达增加, 但无统计学差异。

与模型组及还原型谷胱甘肽比较, TMZ 中、高剂量组 Nrf2、GPX4 mRNA 及蛋白表达增加 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。



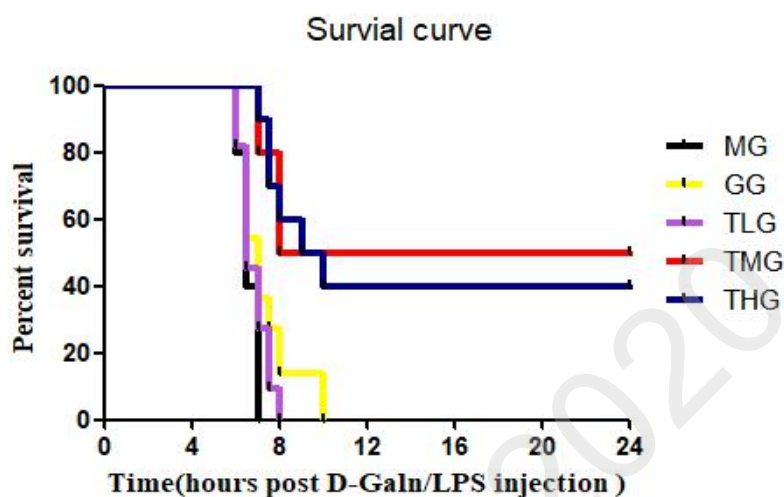
注: A: qRT-PCR 检测 mRNA 表达; B: Western blot 检测蛋白表达。CG: 正常对照组, MG: 模型组, GG: 还原型谷胱甘肽组, TLG: TMZ 低剂量组, TMG: TMZ 中剂量组, THG: TMZ 高剂量组。与正常组比较, $**P < 0.01$, $*P < 0.05$; 与模型组比较, $###P < 0.01$, $#P < 0.05$; 与还原型谷胱甘肽组比较, $♦♦P < 0.01$, $♦P < 0.05$

图 17 各组 Nrf2、GPX4 mRNA 及蛋白表达

Fig.17 Relative mRNA and protein expression levels of Nrf2, GPX4

18. 曲美他嗪对 D-Galn/LPS 诱导的急性肝衰竭小鼠生存率的影响

注射 D-Galn/LPS 6 小时后观察 24 小时，模型组、还原型谷胱甘肽组、TMZ 低剂量组小鼠开始出现死亡，10 小时内三组小鼠全部死亡。曲美他嗪中剂量组 24 小时死亡 5 只（死亡率 50%），高剂量组死亡 6 只（死亡率 60%），生存率较模型组、还原型谷胱甘肽组及 TMZ 低剂量组明显提高（图 18）。



注：MG：模型组；GG：还原型谷胱甘肽组；TLG：TMZ 低剂量组；TMG：TMZ 中剂量组；THG：TMZ 高剂量组。

图 18 小鼠生存曲线

Fig.18 Survival curves of mice

19. 曲美他嗪对 D-Galn/LPS 诱导的急性肝衰竭小鼠肝脏外观的影响

正常组小鼠肝脏表面光滑细润、暗粉红色、边缘锐利、质地中等；模型组、还原型谷胱甘肽组及 TMZ 低剂量组小鼠肝脏见明显充血肿胀，体积增大，呈黑褐色，包膜紧张，TMZ 中、高剂量组小鼠肝脏充血肿胀程度明显减轻（图 19）。

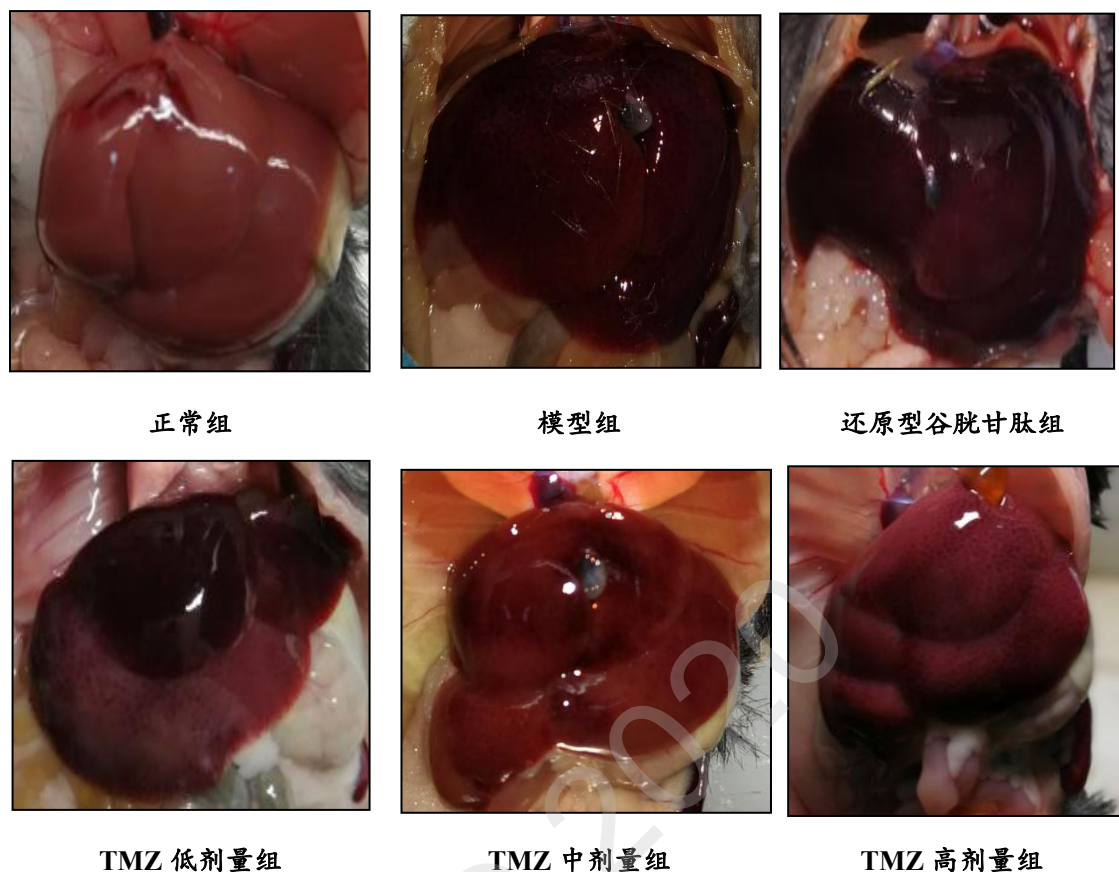


图 19 各组小鼠肝脏外观

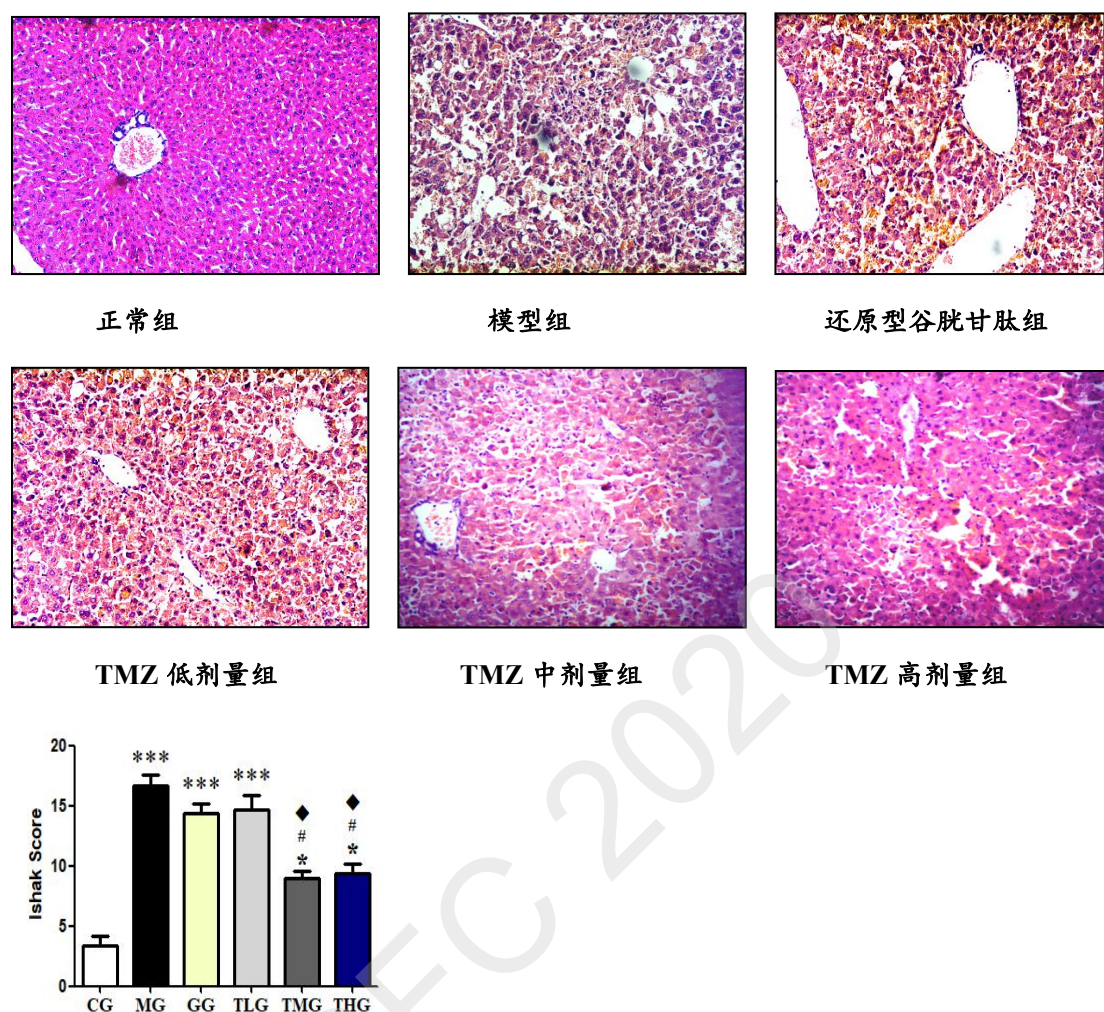
Fig.19 The appearance of liver in each group

20. 曲美他嗪对 D-Galn/LPS 诱导的急性肝衰竭小鼠病理损伤程度及 ISHAK 评分的影响

正常组小鼠肝组织病理切片肝细胞浆均匀红染，细胞核大小正常，肝窦清晰可见，肝索排列整齐。

模型组肝细胞大面积坏死，细胞核崩解，肝小叶支架结构塌陷，汇管区及周围广泛炎症细胞浸润。还原型谷胱甘肽组及 TMZ 低剂量组见大片肝细胞坏死，少数可见肝小叶结构尚存。

TMZ 中、高剂量组肝细胞呈片状、灶状坏死，坏死面积较模型组、还原型谷胱甘肽在组及 TMZ 低剂量组明显减小，肝小叶结构完整。ISHAK 炎症评分示与模型及 Glu 组比较，TMZ 中、高剂量组小鼠肝组织炎症明显减轻（图 20， $P < 0.05$ ）。



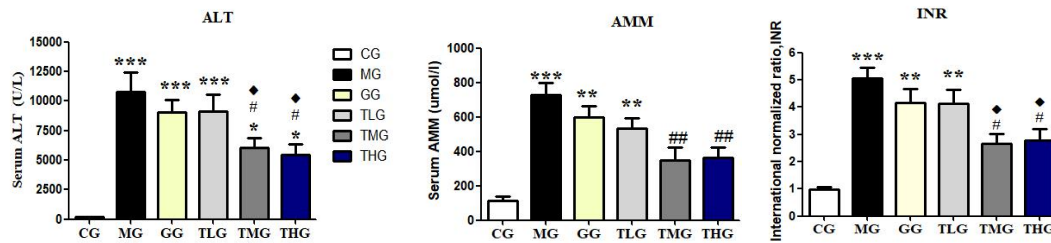
注：CG：正常对照组，MG：模型组，GG：还原型谷胱甘肽组，TLG：TMZ 低剂量组，TMG：TMZ 中剂量组，THG：TMZ 高剂量组。与正常组比较，*** $P<0.001$ ，* $P<0.05$ ；与模型组比较，# $P<0.05$ ；与还原型谷胱甘肽组比较，◆ $P<0.05$

图 20 肝组织 HE 染色病理检查及 ISHAK 评分

Fig.20 HE staining and ISHAK score

21. 曲美他嗪对 D-Galn/LPS 诱导的急性肝衰竭小鼠血清 ALT、AMM 及 INR 的影响

与正常组比较，模型组小鼠血清 ALT、AMM、INR 均显著升高（图 21， $P<0.001$ ）。与模型组比较，TMZ 中、高剂量组 ALT、INR 明显下降（ $P<0.05$ ），血氨降低（ $P<0.05$ ）。与还原型谷胱甘肽组比较，TMZ 中、高剂量组 ALT、INR 降低（ $P<0.05$ ），AMM 无统计学差异（ $P>0.05$ ）。



注: CG: 正常对照组, MG: 模型组, GG: 还原型谷胱甘肽组, TLG: TMZ 低剂量组, TMG: TMZ 中剂量组, THG: TMZ 高剂量组。与正常组比较, *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, ## $P < 0.01$; # $P < 0.05$; 与还原型谷胱甘肽组比较, ◆ $P < 0.05$

图 21 血清 ALT、AMM 及 INR

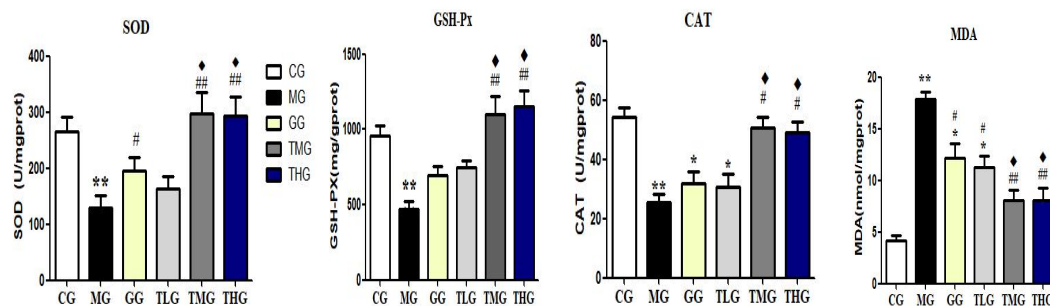
Fig.21 Serum ALT, AMM and INR in each group

22. 曲美他嗪对 D-Galn/LPS 诱导的急性肝衰竭小鼠肝组织抗氧化酶 SOD、GSH-Px、CAT 活性及脂质过氧化物 MDA 含量的影响

与正常对照组比较, 模型组小鼠肝组织 SOD、GSH-Px、CAT 活性明显下降, MDA 含量增加 (图 22, P 均 < 0.01)。

与模型组比较, TMZ 中、高剂量组 SOD、GSH-Px、CAT 活性升高 ($P < 0.01$, $P < 0.01$, $P < 0.05$), MDA 含量明显减少 ($P < 0.01$), 中、高剂量组间上述指标无统计学差异。

与还原型谷胱甘肽组比较, TMZ 中、高剂量组 SOD、GSH-Px、CAT 活性升高 ($P < 0.05$), MDA 减少 ($P < 0.05$)。



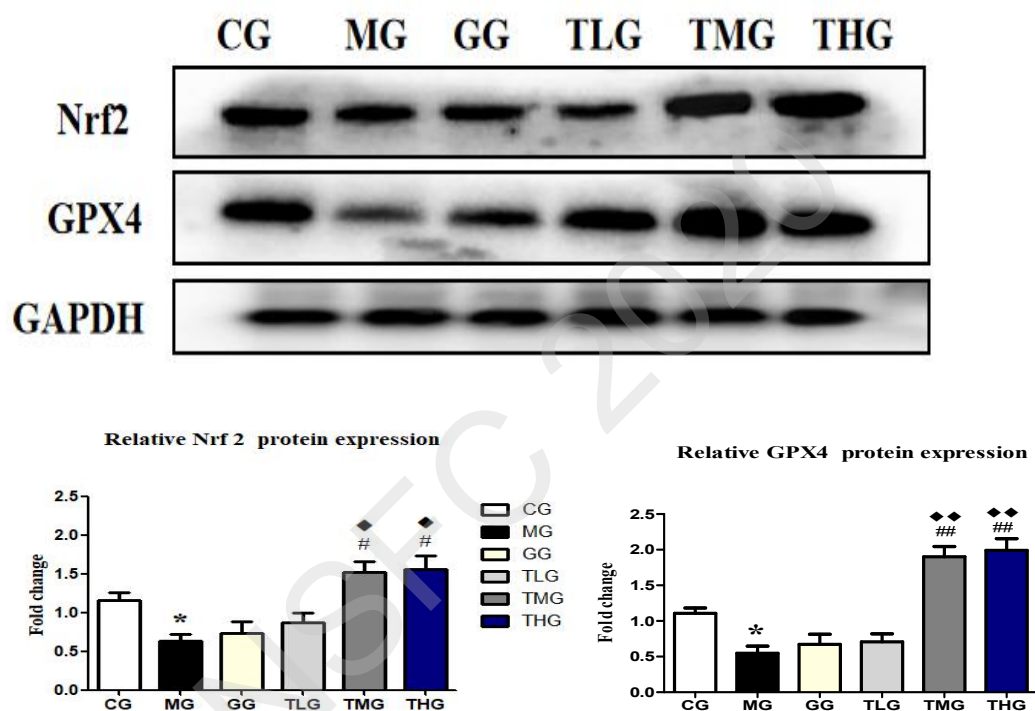
注: 与正常组比较, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$; 与模型组比较, ## $P < 0.01$, # $P < 0.05$; 与还原型谷胱甘肽组比较, ◆ $P < 0.05$ 。

图 22 小鼠肝组织 SOD、GSH-Px、CAT 活性及 MDA 含量

Fig.22 Activity of SOD, GSH-Px, CAT and content of MDA in liver tissue

23.曲美他嗪对 D-Galn/LPS 诱导的 ALF 小鼠肝组织 Nrf2、GPX4 蛋白表达的影响

与正常对照组相比，模型组小鼠肝组织 GPX4 蛋白表达减少（图 23， $P < 0.05$ ），Nrf2 蛋白表达也有减少，但无统计学差异（ $P > 0.05$ ）。与模型组相比，TMZ 中、高剂量组小鼠肝组织 Nrf2 蛋白表达增加（ $P < 0.05$ ），GPX4 蛋白明显增加（ $P < 0.01$ ）。与还原型谷胱甘肽组比较，TMZ 中、高剂量组 Nrf2 蛋白表达增加（ $P < 0.05$ ），GPX4 蛋白表达明显增加（ $P < 0.01$ ）。



注：CG：正常对照组，MG：模型组，GG：还原型谷胱甘肽组，TLG：TMZ 低剂量组，TMG：TMZ 中剂量组，THG：TMZ 高剂量组。与模型组比较，## $P < 0.01$ ，# $P < 0.05$ ；与还原型谷胱甘肽组比较，* $P < 0.05$ 。

图 23 小鼠肝组织 Nrf2、GPX4 蛋白表达

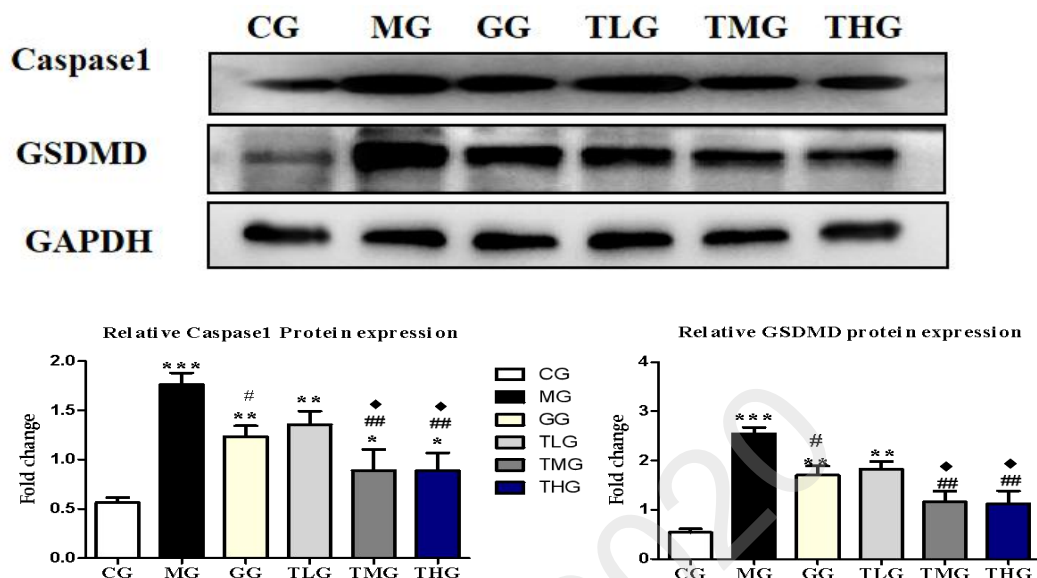
Fig.23 Relative protein expression of Nrf2,GPX4 in liver tissue

24.曲美他嗪对 D-Galn/LPS 诱导的急性肝衰竭小鼠肝组织焦亡通路 Caspase 1、GSDMD 蛋白表达的影响

与正常对照组比较，模型组小鼠肝组织 Caspase1、GSDMD 蛋白表达均明显增加（图 24， $P < 0.001$ ）；还原型谷胱甘肽组及 TMZ 低剂量组 Caspase1、GSDMD 蛋

白表达增加 ($P<0.05$, $P<0.01$)。

与模型组及还原型谷胱甘肽组比较, 曲美他嗪中、高剂量组小鼠肝组织 Caspase1、GSDMD 蛋白表达明显减少 (P 均 <0.01)。



注: CG: 正常对照组, MG: 模型组, GG: 还原型谷胱甘肽组, TLG: TMZ 低剂量组, TMG: TMZ 中剂量组, THG: TMZ 高剂量组。与正常组比较, *** $P<0.001$, ** $P<0.01$, * $P<0.05$; 与模型组比较, ## $P<0.01$; # $P<0.05$; 与还原型谷胱甘肽组比较, ◆ $P<0.05$ 。

图 24 肝组织 Caspase1、GSDMD 蛋白表达

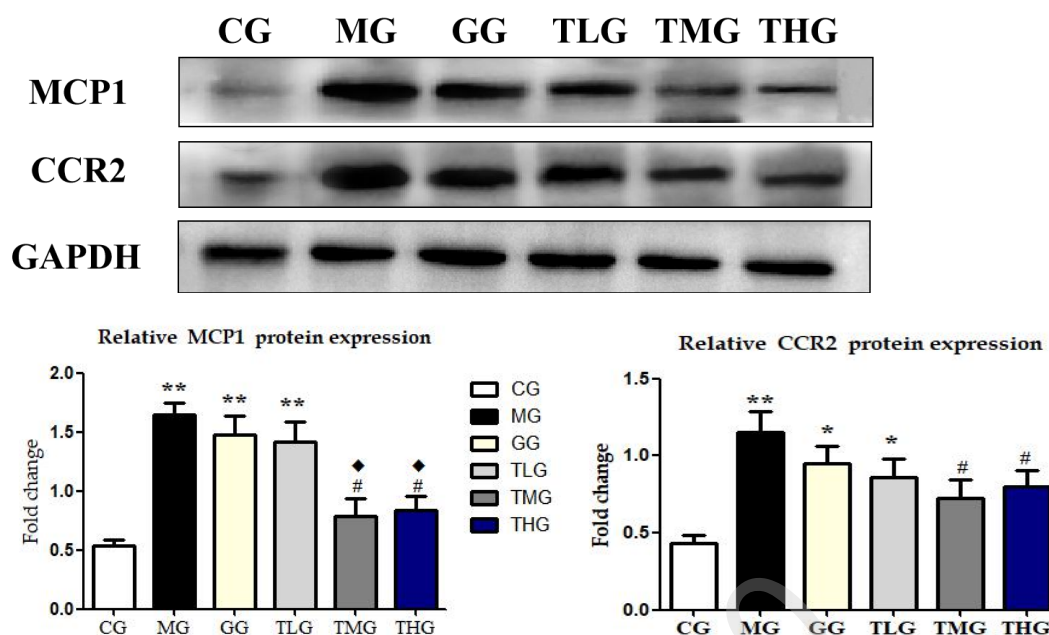
Fig.24 Relative protein expression of Caspase1,GSDMD in liver tissue

25. 曲美他嗪对 D-Galn/LPS 诱导的 ALF 小鼠肝组织炎症趋化信号 MCP1/CCR2 蛋白表达的影响

与正常对照组比较, 模型组小鼠肝组织 MCP1、CCR2 蛋白表达均明显增加 (图 25, $P<0.001$, $P<0.01$); 还原型谷胱甘肽组及 TMZ 低剂量组 MCP1、CCR2 蛋白表达增加 ($P<0.01$, $P<0.05$)。

与模型组比较, 曲美他嗪中、高剂量组小鼠肝组织 MCP1、CCR2 蛋白表达减少 (P 均 <0.05)。

与还原型谷胱甘肽组比较, 曲美他嗪中、高剂量组小鼠肝组织 MCP1 蛋白表达减少 ($P<0.05$), CCR2 蛋白表达有减少, 但无统计学差异。



注：与正常对照组比较，** $P < 0.01$ ，* $P < 0.05$ ，与模型组比较，# $P < 0.05$ ；与还原型谷胱甘肽组比较，♦ $P < 0.05$ 。

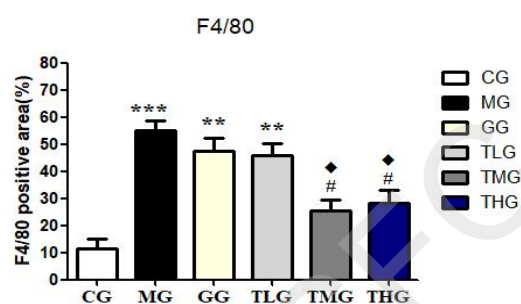
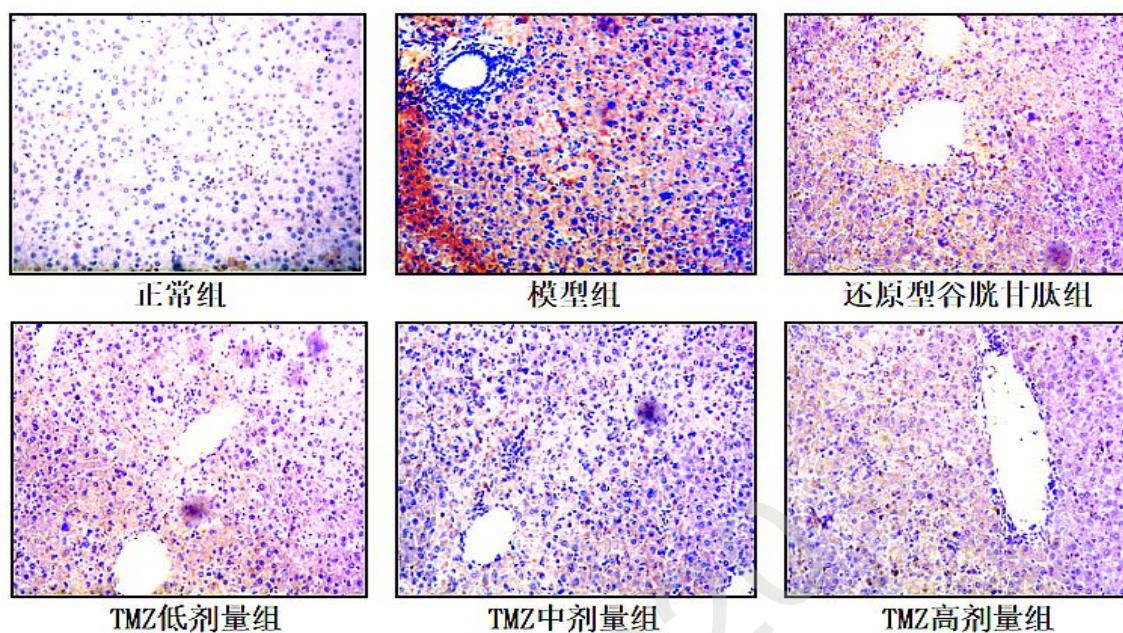
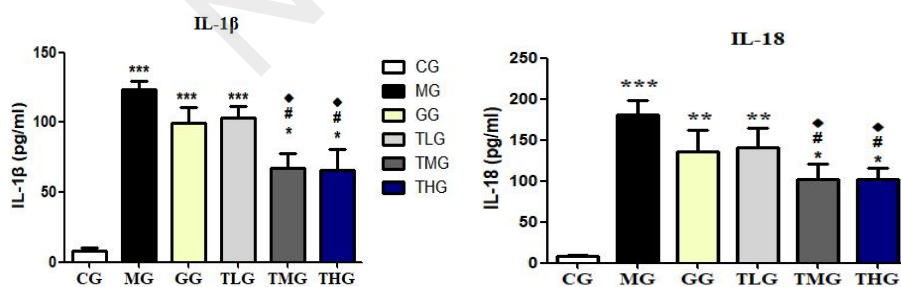
图 25 小鼠肝组织 MCP1、CCR2 蛋白表达

Fig.25 Relative protein expression of MCP1,CCR2 in liver tissue

26. 曲美他嗪对 D-Galn/LPS 诱导的急性肝衰竭小鼠肝组织巨噬细胞的表达及血清炎症性细胞因子 IL-1 β 、IL-18 的影响

F4/80 蛋白在正常组小鼠肝组织呈低水平表达，与正常组比较，其余各组 F4/80 染色均较正常组增加，以模型组尤为显著（图 26A， $P < 0.001$ ）；与模型及还原型谷胱甘肽组比较，TMZ 中、高剂量组小鼠肝组织 F4/80 表达减少（ $P < 0.05$ ）。

与正常组比较，模型组小鼠血清 IL-1 β 、IL-18 水平显著升高（图 26B， P 均 < 0.001 ），还原型谷胱甘肽组及 TMZ 低剂量组 IL-1 β 、IL-18 水平也明显升高（ $P < 0.001$ ， $P < 0.01$ ），但较模型组稍下降；与模型组及还原型谷胱甘肽组比较，TMZ 中、高剂量组 IL-1 β 、IL-18 下降明显（ P 均 < 0.05 ）。

**A****B**

注：A：肝组织 F4/80 免疫组化染色， $\times 200$ 倍；B：ELISA 检测血清 IL-1 β ，IL-18。

CG：正常对照组；MG：模型组；GG：还原型谷胱甘肽组；TLG：TMZ 低剂量组；TMG：TMZ 中剂量组；THG：TMZ 高剂量组。与正常组比较，*** $P < 0.001$ ，** $P < 0.01$ ；与模型组比较，# $P < 0.05$ ；与还原型谷胱甘肽组比较， $\diamond P < 0.05$ 。

图 26 小鼠肝组织巨噬细胞 F4/80 表达及血清 IL-1 β 、IL-18 水平

Fig.26 F4/80 Immunohistochemistry and Serum levels of IL-1 β ，IL-18



2. 工作条件（包括已具备的实验条件，尚缺少的实验条件和拟解决的途径，包括利用国家实验室、国家重点实验室和部门重点实验室等研究基地的计划与落实情况）；

申请者所在贵州医科大学附属医院感染科是“中医药防治传染病国家重点研究室”，“贵州省科技创新团队——肝病防治团队”，国务院批准博士、硕士授予点，SFDA 批准的临床药物试验基地，团队成员长期致力于肝纤维化、肝衰竭的基础研究与临床工作，积累了丰富的科研及临床工作经验。科室每年收治病人总数约 4500 人次，可以保证临床血清样本的收集。我院肝胆外科每年开展肝移植手术约 40-50 例，保证了慢加急性肝衰竭患者病变肝组织样本的收集。

本项目依托实验室——贵州医科大学附属医院多功能开放性中心实验室及临床医学研究中心设备先进齐全，技术力量雄厚。是贵州医科大学投资 3000 万元于 2013 年建成的面积约 2000 平方米，达到国际先进水平，西南领先水平的实验基地。临床研究中心在功能设置上，涵盖了包括临床组织样品库，临床医学实验动物中心，生物安全 II 级传染性疾病预防区，组织细胞培养平台，细胞功能检测平台，分子生物学功能区及蛋白组学功能区等多个实验平台。中心配置仪器包括流式细胞分析及分选仪，小动物活体成像系统，生物辐照仪，DNA 质谱仪，冰冻切片机，荧光共聚焦显微镜，活细胞工作站等，能满足本课题的需要。

本项目依托动物中心——贵州医科大学实验动物中心，贵州省省级重点实验中心，具有 SPF 级、清洁级和普通级的实验动物生产和饲养能力，设有细胞实验室、转基因实验室、分子生物学实验室，因此，本项目研究所需要的标准化实验动物及标准化动物实验技术已经具备。上述研究平台和实验条件为本项目的顺利完成提供了可靠的保证。

3. 正在承担的与本项目相关的科研项目情况（申请人和项目组主要参与者正在承担的与本项目相关的科研项目情况，包括国家自然科学基金的项目和国家其他科技计划项目，要注明项目的名称和编号、经费来源、起止年月、与本项目的关系及负责的内容等）；

1. 贵州省科技厅基础项目（黔科合基础[2020]1Y299），题目：GPX4 抑制 GSDMD



减轻急性肝衰竭时细胞焦亡及炎症反应的作用机制。2020.01-2023.12，主持。

2. 贵州省卫健委（gzwj2019-1-082），NLRP3/Caspase4/GSDMD 通路介导的肝细胞焦亡在慢加急性肝衰竭中的作用机制研究，2019.10-2022.12，主持。

4. 完成国家自然科学基金项目情况（对申请人负责的前一个已结题科学基金项目（项目名称及批准号）完成情况、后续研究进展及与本申请项目的关系加以详细说明。另附该已结题项目研究工作总结摘要（限 500 字）和相关成果的详细目录）。

无

（三）其他需要说明的问题

1. 申请人同年申请不同类型的国家自然科学基金项目情况（列明同年申请的其他项目的项目类型、项目名称信息，并说明与本项目之间的区别与联系）。

无

2. 具有高级专业技术职务（职称）的申请人或者主要参与者是否存在同年申请或者参与申请国家自然科学基金项目的单位不一致的情况；如存在上述情况，列明所涉及人员的姓名，申请或参与申请的其他项目的项目类型、项目名称、单位名称、上述人员在该项目中是申请人还是参与者，并说明单位不一致原因。

无

3. 有高级专业技术职务（职称）的申请人或者主要参与者是否存在与正在承担的国家自然科学基金项目的单位不一致的情况；如存在上述情况，列明所涉及人员的姓名，正在承担项目的批准号、项目类型、项目名称、单位名称、起止年月，并说明单位不一致原因。

无



李宏 简历

贵州医科大学，附属医院，副主任医师

教育经历（从大学本科开始，按时间倒序排序；请列出攻读研究生学位阶段导师姓名）：

- (1) 2017-9 博士在读，贵州医科大学，病理学与病理生理学，导师：程明亮
- (2) 2007-9至2011-7，贵阳医学院，病理学与病理生理学，硕士，导师：杨勤
- (3) 1996-9至2001-7，贵阳医学院，临床医学，学士

科研与学术工作经历（按时间倒序排序：如为在站博士后研究人员或曾有博士后研究经历，请列出合作导师姓名）：

- (1) 2017-9至现在，贵州医科大学，病理学与病理生理学，博士在读
- (2) 2017-5至2017-9，贵州医科大学，附属医院，感染科，副主任医师
- (3) 2013-9至2017-5，贵阳医学院，附属医院，感染科，副主任医师
- (4) 2008-9至2013-9，贵阳医学院，附属医院，感染科，主治医师
- (5) 2001-9至2008-9，贵阳医学院，附属医院，感染科，住院医师

曾使用其他证件信息（申请人应使用唯一身份证件申请项目，曾经使用其他身份证件作为申请人或主要参与者获得过项目资助的，应当在此列明）

主持或参加科研项目（课题）（按时间倒序排序）：

1. 贵州省科技厅，基础项目，黔科合基础[2020]1Y299，GPX4抑制GSDMD减轻急性肝衰竭时细胞焦亡及炎症反应的作用机制，2020-01至2023-12，10万元，在研，主持
2. 贵州省卫健委，大健康项目，gzwjk2019-1-082，NLRP3/Caspase4/GSDMD通路介导的肝细胞焦亡在慢加急性肝衰竭中的作用机制研究，2019-10至2022-12，2万元，在研，主持
3. 贵州省科技厅，科技支撑计划项目，黔科合支撑[2018]2761，贵州地区乙肝母婴传播阻断的队列研究，2018-03至2021-12，32万元，在研，参加

代表性研究成果和学术奖励情况

（请注意：①投稿阶段的论文不要列出；②对期刊论文：应按照论文发表时作者顺序列出全部作者姓名、论文题目、期刊名称、发表年代、卷（期）及起止页码（摘要论文请加说明）；③对会议论文：应按照论文发表时作者顺序列出全部作者姓名、论文题目、会议名称（或会议论文集名称及起止页码）、会议地址、会议时间；④应在论文作者姓名后



注明第一/通讯作者情况：所有共同第一作者均加注上标“#”字样，通讯作者及共同通讯作者均加注上标“*”字样，唯一第一作者且非通讯作者无需加注；⑤所有代表性研究成果和学术奖励中本人姓名加粗显示。）

按照以下顺序列出：

一、代表性论著（包括论文与专著，合计5项以内）

(1) **Hong Li**; Xueke Zhao; Yiju Cheng; Quan Zhang; Jun Wu; Wei Zhang; Mingliang Cheng^{*}; Gasdermin D-mediated hepatocyte pyroptosis expands inflammatory responses that aggravate acute liver failure by upregulating monocyte chemotactic protein 1/CC chemokine receptor-2 to recruit macrophages, *World Journal of Gastroenterology*, 2019, 25(44): 6527-6540. (期刊论文)

(2) **李宏**; 杨勤; 程明亮^{*}; 陆爽; 吴君; 蓝莓对免疫性肝纤维化大鼠肝组织TLR4, TLR9表达的影响, *世界华人消化杂志*, 2012, (18): 1609-1615. (期刊论文)

(3) **李宏**; 汪娅; 隋建美^{*}; 谢静; 2例顽固多发性脑囊尾蚴病患者采用胸腺肽联合阿苯达唑与吡喹酮治疗效果观察, *寄生虫病与感染性疾病*, 2019, (03): 177-180. (期刊论文)

(4) 余蕾; 赵雪珂^{*}; **李宏**; 丹芍化纤胶囊通过上调ALK2、p-Smad1 / 5 / 8所致大鼠肝纤维化, *重庆医学*, 2016, 45(35): 4904-4910. (期刊论文)



除非特殊说明，请勿删除或改动简历模板中蓝色字体的标题及相应说明文字

参与者 简历

程明亮，贵州医科大学，附属医院，感染科，主任医师，教授

教育经历（从大学本科开始，按时间倒序排序；请列出攻读研究生学位阶段导师姓名）：

1978-03至1982-12，贵阳医学院，临床医学，学士

科研与学术工作经历（按时间倒序排序；如为在站博士后研究人员或

曾有博士后研究经历，请列出合作导师姓名）：

2017.05至现在，贵州医科大学，附属医院，教授

1983-03至2017-05，贵阳医学院，附属医院，教授

曾使用其他证件信息（应使用唯一身份证件申请项目，曾经使用其他身份证件作为申请人或主要参与者获得过项目资助的，应当在此列明）

无

主持或参加科研项目（课题）情况（按时间倒序排序）：

1. 国家自然科学基金，面上项目，81570543，Tβ4通过PI3K介导的信号通路抑制肝纤维化发生的作用及分子机制研究，2016-01至2019-12，68万元，已结题，主持。
2. 2011年度引进国外技术管理人才项目，贵州省人事厅外专局 s20115200018，已结题，主持。
3. 贵州省科技厅社会攻关项目(黔科合SY[2010]3017)，蓝莓对肝硬化、肝纤维化的实验研究，2012 年-2015 年，118 万，已结题，主持。
4. 国家 973 基础研究专项（2011CB512114）、茅台酒对肝脏影响作用的分子机制研究，2011-01至2013-12，56 万，已结题，主持。

代表性研究成果和学术奖励情况

（请注意：①投稿阶段的论文不要列出；②对期刊论文：应按照论文发表时作者顺序列出全部作者姓名、论文题目、期刊名称、发表年代、卷（期）及起止页码（摘要论文请加以说明）；③对会议论文：应按照论文发表时作者顺序列出全部



作者姓名、论文题目、会议名称（或会议论文集名称及起止页码）、会议地址、会议时间；④应在论文作者姓名后注明第一/通讯作者情况：所有共同第一作者均加注上标“#”字样，通讯作者及共同通讯作者均加注上标“*”字样，唯一第一作者且非通讯作者无需加注；⑤所有代表性研究成果和学术奖励中本人姓名加粗显示。）

按照以下顺序列出：

一、代表性论著（包括论文与专著，合计5项以内）

- (1) Lili Zhu;Mingliang Cheng*;Thymosin- β 4 Mediates Hepatic Stellate Cell Activation by Interfering with CircRNA-0067835/miR-155/FoxO3 Signaling Pathway,*Cellular Physiology and Biochemistry*, 2018.11.27,51(3): 1389-1398.
- (2) Tingting R;Juanjuan Z;Mingliang Cheng*;The Combination of Blueberry Juice and Probiotics Ameliorate Non-Alcoholic Steatohepatitis (NASH) by Affecting SREBP-1c/PNPLA-3 Pathway via PPAR- α , *Nutrients*,2017, 9(3):198-203.
- (3)程明亮;江滢;人类病原生物学图传：发现、形态及其致病性,中国科学技术出版社, 390千字,2019.
- (4)Zhu J ;Zhou M;Mingliang Cheng*;Blueberry, combined with probiotics, alleviates non-alcoholic fatty liver disease via IL-22-mediated JAK1/STAT3/BAX signaling,*Food & Function*, 2018,9:231-237.
- (5)Zixin Zhu;Lili Zhu;Mingliang Cheng*; Cellular mechanism of T β 4 intervention in liver fibrosis by regulating NF- κ B signaling pathway,*European review for medical and pharmacological sciences*,2019,3(23):1279-1290.



除非特殊说明，请勿删除或改动简历模板中蓝色字体的标题及相应说明文字

参与者 简历

韩民，贵州医科大学，附属医院，肝胆外科，副主任医师

教育经历（从大学本科开始，按时间倒序排序；请列出攻读研究生学位阶段导师姓名）：

1990-09至1995-07，遵义医学院，临床医学，本科，学士

科研与学术工作经历（按时间倒序排序；如为在站博士后研究人员或曾有博士后研究经历，请列出合作导师姓名）：

（1）2017-05至现在，贵州医科大学，附属医院，肝胆外科，副主任医师

（2）2010-07至2017-05，贵阳医学院，附属医院，肝胆外科，副主任医师

（3）2005-07至2010-07，贵阳医学院，附属医院，肝胆外科，主治医师

（4）1995-08至2005-07，解放军四十四医院，肝胆外科，医师

曾使用其他证件信息（应使用唯一身份证件申请项目，曾经使用其他身份证件作为申请人或主要参与者获得过项目资助的，应当在此列明）

无

主持或参加科研项目（课题）情况（按时间倒序排序）：

贵州省科技厅、贵州医科大学联合基金资助项目，黔科合LH字[2015]7428号，ERCP胆道细胞刷检-胆汁肿瘤标志物检测对胆管恶性肿瘤诊断价值的研究，2015/09-2017/12，7万元，已结题，主持

代表性研究成果和学术奖励情况

（请注意：①投稿阶段的论文不要列出；②对期刊论文：应按照论文发表时作者顺序列出全部作者姓名、论文题目、期刊名称、发表年代、卷（期）及起止页码（摘要论文请加以说明）；③对会议论文：应按照论文发表时作者顺序列出全部作者姓名、论文题目、会议名称（或会议论文集名称及起止页码）、会议地址、会议时间；④应在论文作者姓名后注明第一/通讯作者情况：所有共同第一作者均加注上标“#”字样，通讯作者及共同通讯作者均加注上标“*”字样，唯一第一作者且非通讯作者无需加注；⑤所有代表性研究成果和学术奖励中本人姓名加粗显示。）

按照以下顺序列出：



一、代表性论著（包括论文与专著，合计 5 项以内）

1. 乔振宇; **韩民***; 王健; 吕晓业; 依维莫司和 MK-2206 联合用药协同抑制肝癌细胞增殖, *中国药理学与毒理学杂志*, 2017, 31(8): 793-799. (期刊论文)
2. **韩民**; 孙诚谊; 秦建国*; 内镜下逆行胰胆管造影术 3881 例回顾分析, *中国内镜杂志*, 2013, 19(10): 1090-1094. (期刊论文)
3. **韩民**; 庞家芳; 秦建国*; 电子十二指肠镜腹腔镜联合治疗胆囊及胆总管结石 20 例临床体会, *西南国防医药*, 2003, 13(1): 43-44. (期刊论文)
4. **韩民**; 庞家芳; 秦建国*; 肝门部胆管癌 43 例临床分析, *贵州医药*, 2003, 27(2): 145-146. (期刊论文)

二、论著之外的代表性研究成果和学术奖励（包括专利、会议特邀报告等其他成果和学术奖励，请勿在此处再列论文和专著；合计10项以内）

无



除非特殊说明，请勿删除或改动简历模板中蓝色字体的标题及相应说明文字

参与者 简历

乔里，贵州医科大学，附属医院，技师

教育经历（从大学本科开始，按时间倒序排序；请列出攻读研究生学位阶段导师姓名）：

（1）2011-09至2014-06，贵阳医学院（现贵州医科大学），药剂学，硕士，导师:王永林

（2）2006-09至2010-06，中国药科大学，生命科学与技术学院生物工程专业，学士

科研与学术工作经历（按时间倒序排序；如为在站博士后研究人员或曾有博士后研究经历，请列出合作导师姓名）：

（1）2015-06至现在，贵州医科大学，附属医院，技师

（2）2014-08至2015-06，贵阳医学院，附属医院，技师

曾使用其他证件信息（应使用唯一身份证件申请项目，曾经使用其他身份证件作为申请人或主要参与者获得过项目资助的，应当在此列明）

无

主持或参加科研项目（课题）情况（按时间倒序排序）：

国家自然科学基金委员会，地区项目，81560266，IgG免疫复合物交联Fc gamma受体介导非打细胞凋亡在过敏原特异性免疫疗法机制中的作用, 2016-01至2019-12，39万元，已结题，参加

代表性研究成果和学术奖励情况

（请注意：①投稿阶段的论文不要列出；②对期刊论文：应按照论文发表时作者顺序列出全部作者姓名、论文题目、期刊名称、发表年代、卷（期）及起止页码（摘要论文请加以说明）；③对会议论文：应按照论文发表时作者顺序列出全部作者姓名、论文题目、会议名称（或会议论文集名称及起止页码）、会议地址、会议时间；④应在论文作者姓名后注明第一/通讯作者情况：所有共同第一作者均加注上标“#”字样，通讯作者及共同通讯作者均加注上标“*”字样，唯一第一作者且非通讯作者无需加注；⑤所有代表性研究成果和学术奖励中本人姓名加粗显示。）



按照以下顺序列出：

一、代表性论著（包括论文与专著，合计5项以内）

- (1) Zhao-Yang Ye*; Erik Broströmer; Jie Nan; Xiao-fang Cao; Xiang Liu; **Li Qiao**; Zhong-Jing Liu; Xiao-Dong Su*. Protein crystallization benefits from the rough well surface of a 48-well polystyrene microplate, *Journal of Crystal Growth*, 2020, 532(2):125425.
- (2) 乔里; 汪石丽; 关焕玉; 廖尚高; 刘丽娜; 李勇军*, HPLC法同时测定山梔茶中的3种苷类成分, *中成药*, 2015, 37(11):2448-2451.
- (3) 乔里; 汪石丽; 李勇军; 刘俊宏; 王永林; 刘丽娜*, 山梔茶化学成分的研究, *贵阳医学院学报*, 2015, 40(5):447-449.
- (4) 李靖; 刘佳; 乔里; 汪石丽; 郑林; 董莉; 李勇军*, 高效液相色谱法同时测定蜘蛛香中3种活性成分的含量, *中国药理学杂志*, 2014, 49(20):1840-1844.
- (5) 李勇军; 乔里; 陈青凤; 张桂青; 沈国华; 许祖超; 王永林*, 金莲花中5种主要成分含量的高效液相色谱法同时测定, *时珍国医国药*, 2014, 25(02):322-324.

二、论著之外的代表性研究成果和学术奖励（包括专利、会议特邀报告等其他成果和学术奖励，请勿在此处再列论文和专著；合计10项以内）

无



除非特殊说明，请勿删除或改动简历模板中蓝色字体的标题及相应说明文字

参与者 简历

申晓旭， 贵州医科大学，附属医院，感染科，医师

教育经历（从大学本科开始，按时间倒序排序；请列出攻读研究生学位阶段导师姓名）：

（1）2014-09至2017-06，贵州医科大学，传染病学专业，硕士，导师：吴亚云

（2）2009-09至2014-06，贵州医科大学，临床医学系，学士

科研与学术工作经历（按时间倒序排序；如为在站博士后研究人员或曾有博士后研究经历，请列出合作导师姓名）：

2017-05至现在，贵州医科大学附属医院，感染科，医师

曾使用其他证件信息（应使用唯一身份证件申请项目，曾经使用其他身份证件作为申请人或主要参与者获得过项目资助的，应当在此列明）

无

主持或参加科研项目（课题）情况（按时间倒序排序）：

国家自然科学基金地区基金，81460642，贵州苗药“消疤草”抗肝纤维化的活性成分及作用机制研究，2015/01-2018/12，45 万元，在研，参与

代表性研究成果和学术奖励情况

（请注意：①投稿阶段的论文不要列出；②对期刊论文：应按照论文发表时作者顺序列出全部作者姓名、论文题目、期刊名称、发表年代、卷（期）及起止页码（摘要论文请加以说明）；③对会议论文：应按照论文发表时作者顺序列出全部作者姓名、论文题目、会议名称（或会议论文集名称及起止页码）、会议地址、会议时间；④应在论文作者姓名后注明第一/通讯作者情况：所有共同第一作者均加注上标“#”字样，通讯作者及共同通讯作者均加注上标“*”字样，唯一第一作者且非通讯作者无需加注；⑤所有代表性研究成果和学术奖励中本人姓名加粗显示。）

按照以下顺序列出：

一、代表性论著（包括论文与专著，合计5项以内）

期刊论文



申晓旭;吴亚云*;腹膜假性粘液瘤误诊为肝硬化腹水两例报告, *临床肝胆病杂志*, 2017, 35(5):937-939. (期刊论文)

会议论文

申晓旭;吴亚云*;腹膜假性粘液瘤误诊为肝硬化腹水两例报告, *2017年全国肝胆并学术年会暨第二十六次全国中西医结合肝病学术会议*, 中国, 福州, 2017-06-01至 2017-06-03.

二、论著之外的代表性研究成果和学术奖励(包括专利、会议特邀报告等其他成果和学术奖励, 请勿在此处再列论文和专著; 合计10项以内)

无

NSFC 2020



除非特殊说明，请勿删除或改动简历模板中蓝色字体的标题及相应说明文字

参与者 简历

赵文静，贵州医科大学，附属医院，感染科，医师

教育经历（从大学本科开始，按时间倒序排序；请列出攻读研究生学位阶段导师姓名）：

（1）2014-09至2017-06，贵州医科大学，传染病学，硕士，导师：陆爽

（2）2009-09至2014-06，滨州医学院，临床医学，学士

科研与学术工作经历（按时间倒序排序；如为在站博士后研究人员或曾有博士后研究经历，请列出合作导师姓名）：

2017-09 至现在，贵州医科大学附属医院，感染科，医师

曾使用其他证件信息（应使用唯一身份证件申请项目，曾经使用其他身份证件作为申请人或主要参与者获得过项目资助的，应当在此列明）

无

主持或参加科研项目（课题）情况（按时间倒序排序）：

无

代表性研究成果和学术奖励情况

（请注意：①投稿阶段的论文不要列出；②对期刊论文：应按照论文发表时作者顺序列出全部作者姓名、论文题目、期刊名称、发表年代、卷（期）及起止页码（摘要论文请加以说明）；③对会议论文：应按照论文发表时作者顺序列出全部作者姓名、论文题目、会议名称（或会议论文集名称及起止页码）、会议地址、会议时间；④应在论文作者姓名后注明第一/通讯作者情况：所有共同第一作者均加注上标“#”字样，通讯作者及共同通讯作者均加注上标“*”字样，唯一第一作者且非通讯作者无需加注；⑤所有代表性研究成果和学术奖励中本人姓名加粗显示。）

按照以下顺序列出：

一、代表性论著（包括论文与专著，合计5项以内）

赵文静;陆爽*; IL-33 及 ST2 与纤维化疾病的研究进展, 贵州医药, 2017(9):9999-1001.



附件信息

序号	附件名称	备注	附件类型
1	导师同意函		导师同意函
2	推荐信1		同行专家推荐信
3	推荐信2		同行专家推荐信
4	动物伦理		伦理审查声明
5	人体伦理		伦理审查声明
6	Gasdermin D-mediated hepatocyte pyroptosis expands	SCI文章（IF：3.411）	代表性论著
7	蓝莓对免疫性肝纤维化大鼠肝组织TLR4，TLR9表达的影响	核心期刊	代表性论著
8	顽固多发性脑囊尾蚴病治疗效果观察	普通期刊	代表性论著
9	丹芍化纤胶囊通过上调ALK2、p-Smad1%2f5%2f8改善四氯化碳所致大鼠肝纤维化	核心期刊	代表性论著



项目名称: SIRT1调控P53/GPX4/GSDMD介导的铁死亡-焦亡正反馈回路在急性肝衰竭中的作用机制及曲美他嗪的干预研究

资助类型: 地区科学基金项目

申请代码: H0318. 肝再生、肝保护、肝衰竭、人工肝

国家自然科学基金项目申请人和参与者科研诚信承诺书

本人**在此郑重承诺**: 严格遵守中共中央办公厅、国务院办公厅《关于进一步加强科研诚信建设的若干意见》规定, 所申报材料和相关内容真实有效, 不存在违背科研诚信要求的行为; 在国家自然科学基金项目申请、评审和执行全过程中, 恪守职业规范和科学道德, 遵守评审规则和工作纪律, 杜绝以下行为:

- (一) 抄袭、剽窃他人科研成果或者伪造、篡改研究数据、研究结论;
- (二) 购买、代写、代投论文, 虚构同行评议专家及评议意见;
- (三) 违反论文署名规范, 擅自标注或虚假标注获得科技计划等资助;
- (四) 购买、代写申请书; 弄虚作假, 骗取科技计划项目、科研经费以及奖励、荣誉等;
- (五) 在项目申请书中以高指标通过评审, 在项目计划书中故意篡改降低相应指标;
- (六) 以任何形式探听尚未公布的评审专家名单及其他评审过程中的保密信息;

(七) 本人或委托他人通过各种方式及各种途径联系有关专家进行请托、游说, 违规到评审会议驻地游说评审专家和工作人员、询问评审或尚未正式向社会公布的信息等干扰评审或可能影响评审公正性的活动;

(八) 向评审工作人员、评审专家等提供任何形式的礼品、礼金、有价证券、支付凭证、商业预付卡、电子红包, 或提供宴请、旅游、娱乐健身等任何可能影响评审公正性的活动;

- (九) 其他违反财经纪律和相关管理规定的行为。

如违背上述承诺, 本人愿接受国家自然科学基金委员会和相关部门做出的各项处理决定, 包括但不限于撤销科学基金资助项目, 追回项目资助经费, 向社会通报违规情况, 取消一定期限国家自然科学基金项目申请资格, 记入科研诚信严重失信行为数据库以及接受相应的党纪政纪处理等。

申请人签字:

编号	参与者姓名 / 工作单位名称 (应与加盖公章一致) / 证件号码	签字
1	程明亮 / 贵州医科大学 / 5*****8	
2	韩民 / 贵州医科大学 / 5*****6	
3	乔里 / 贵州医科大学 / 5*****3	
4	申晓旭 / 贵州医科大学 / 5*****3	
5	赵文静 / 贵州医科大学 / 3*****4	
6	汪娅 / 贵州医科大学 / 5*****6	
7		
8		
9		



项目名称: SIRT1调控P53/GPX4/GSDMD介导的铁死亡-焦亡正反馈回路在急性肝衰竭中的作用机制及曲美他嗪的干预研究
资助类型: 地区科学基金项目
申请代码: H0318. 肝再生、肝保护、肝衰竭、人工肝

国家自然科学基金项目申请单位科研诚信承诺书

本单位依据国家自然科学基金项目指南的要求, 严格履行法人负责制, **在此郑重承诺:** 本单位已就所申请材料内容的真实性和完整性进行审核, 不存在违背中共中央办公厅、国务院办公厅《关于进一步加强科研诚信建设的若干意见》规定和其他科研诚信要求的行为, 申请材料符合《中华人民共和国保守国家秘密法》和《科学技术保密规定》等相关法律法规, 在项目申请和评审活动全过程中, 遵守有关评审规则和工作纪律, 杜绝以下行为:

(一) 采取贿赂或变相贿赂、造假、剽窃、故意重复申报等不正当手段获取国家自然科学基金项目申请资格;

(二) 以任何形式打听未公开的项目评审信息、评审专家信息及其他评审过程中的保密信息, 干扰评审专家的评审工作;

(三) 组织或协助项目团队向评审工作人员、评审专家等提供任何形式的礼品、礼金、有价证券、支付凭证、商业预付卡、电子红包等; 宴请评审组织者、评审专家, 或向评审组织者、评审专家提供旅游、娱乐健身等任何可能影响科学基金评审公正性的活动;

(四) 包庇、纵容项目团队虚假申报项目, 甚至骗取国家自然科学基金项目;

(五) 包庇、纵容项目团队, 甚至帮助项目团队采取“打招呼”等方式, 影响科学基金项目评审的公正性;

(六) 在申请书中以高指标通过评审, 在计划书中故意篡改降低相应指标;

(七) 其他违反财经纪律和相关管理规定的行为。

如违背上述承诺, 本单位愿接受国家自然科学基金委员会和相关部门做出的各项处理决定, 包括但不限于停拨或核减经费, 追回项目经费, 取消一定期限国家自然科学基金项目申请资格, 记入科研诚信严重失信行为数据库以及主要责任人接受相应党纪政纪处理等。

依托单位公章:

日期: 年 月 日

合作研究单位公章:

日期: 年 月 日

合作研究单位公章:

日期: 年 月 日