

Project code

项目编号: 20181095

Guangdong Provincial Traditional Chinese Medicine Research Project

广东省中医药局科研项目

合 同 书

Contract

Study on Chang-An-Jun-Tai regulating the pathway of SCF/C-kit in the treatment of IBS-D from the perspective of brain-gut-microbiota axis

项目名称:

从“脑-肠-微生态轴”探讨肠安菌泰调控 SCF/C-kit 信号通路治疗 IBS-D 的机制

资助类别:

立项资助

项目起止时间:

2018-01-05 至 2020-01-04

管理单位(甲方):

广东省中医药局

承担单位(乙方):

广州中医药大学第一附属医院

通讯地址:

广东省广州市机场路 12 号广州中医药大学

邮政编码:

510405

单位电话:

36591109

项目负责人:

侯秋科 Qi u-ke Hou

联系电话:

13694241399

电子邮箱:

houqiuke@gzucm.edu.cn

手机:

18077220521

项目联系人:

侯秋科

联系电话:

13694241399

乙方主管部门(丙方):

广州中医药大学

广东省中医药局

二〇一六年制

一、项目实施内容（包括研究方案和技术路线，须与项目申报书相一致）

1 研究方案

1.1 肠安菌泰的组成和制备

按原方比例加 8 倍量体积的水，常规煎煮两次，每次 15min，过滤，合并两次滤液，浓缩成相当于含生药 2g/ml 的药液。给药时稀释成 0.5g/mL、1g/mL、2g/mL 三个浓度，依次对应为低剂量、中剂量、高剂量。

1.2 质量控制

运用高效液相色谱法（HPLC）对肠安菌泰进行指纹图谱分析，分析肠安菌泰主要成分。

1.3 动物模型的建立及分组

（1）动物模型的建立

用课题组已经成功建立并复制的 IBS-D 大鼠模型，造模结束后，通过粪便 Bristol 分型积分、腹壁回缩反射（AWR）及离体肠管运动实验评估模型是否成功。

（2）动物分组及给药

造模成功后，取雄性模型大鼠 60 只，分为正常组、模型组、肠安菌泰低剂量组、肠安菌泰中剂量组、肠安菌泰高剂量组，共 5 组，每组 12 只。动物造模后第 2d，正常组和模型组灌胃给予等体积灭菌水，肠安菌泰低中高三个剂量组分别给予肠安菌泰水煎液。共给药 14d，第 15d 取材进行实验。

1.4 口服肠安菌泰后肠道菌群结构变化研究

（1）菌群数量及组成

多种不同的培养基上，对生长出来的菌落进行菌种鉴定，并将每种细菌的数量与参考值进行比较，并计算 B/E 值，评估经口服肠安菌泰干预后大鼠肠道菌群数量及组成变化。

（2）PCR-DGGE 分析肠道菌群组成

PCR-DGGE（denaturing gradient gel electrophoresis）变性梯度凝胶电泳技术分析肠道菌群组成，Bionumerics 软件对 DGGE 分子指纹图谱进行相关性分析。

（3）荧光定量 PCR 定量分析肠道菌群数量的变化

粪便标本采集及 DNA 提取：以无菌方法收集大鼠的粪便 1g 左右于 2mL 的 EP 管中，按 DNA 提取试剂盒说明书提取粪便基因组 DNA。

PCR 引物设计：根据双歧杆菌、乳酸杆菌、大肠杆菌、拟杆菌、梭杆菌、链球菌 16S rDNA 基因序列，设计相应菌属 PCR 引物，并在 BLAST 基因库内比对引物序列的相应菌属的特异性。

标准曲线的制备：取对照组各细菌的 PCR 产物按 DNA 纯化试剂盒说明进行纯化，测定纯化产物吸光度（A 值）及浓度，换算为各标准品 1 μ l 的拷贝数用于标准曲线的制作。

粪便样品细菌 16S rDNA 定量分析：将待测粪便提取的 DNA 分别进行细菌的实时荧光定量 PCR 反应，根据溶解曲线分析 PCR 产物的特异性。

（4）宏基因组测序分析肠道菌群的变化

粪便标本采集及细菌基因组，以无菌方法收集大鼠的粪便 1g 左右于 2ml 的 EP 管中，按细菌基因组提取试剂盒说明书提取粪便基因组 DNA，交由华大基因研究院进行宏基因组测序分析。

1.5 口服肠安菌泰后菌群代谢产物变化研究

配置不同浓度的乙酸、丙酸、丁酸、2-乙基丁酸（内标）标准液后，进行气相色谱分析，根据标准曲线计算得出短链脂肪酸含量。

1.6 胃肠动力神经内分泌学相关检测

①胃排空及小肠推进比的测定

治疗疗程结束后，每组随机选取 5 只大鼠，灌服混有 99m 锝-二乙三胺五乙酸护（99mTc-DTPA）0.05 毫居(mCi)/10g 和少量亚甲兰的营养性半固体糊标准餐 20ml/g，胃内核素残留率(%)=(胃内核素残留值/基准值) x100%，小肠推进比(%)=(幽门括约肌至色素前端的距离(cm)/幽门括约肌至回盲部的距离(cm))x100%。

②胃动素、胃泌素、血管活性肠肽和生长抑素的变化

将治疗前后各组大鼠血浆、血清标本在测定前混匀，4 $^{\circ}$ C1500 转/min 离心 15 分钟，取上清液采用放射免疫分析法测定胃动素、胃泌素、血管活性肠肽和生长抑素的含量。

1.7 ICC细胞的数目及超微结构的测定：

分别切取大鼠食道下段、胃运动起搏区（胃体中部距贲门1/3处）、小肠、结肠组织共4块，在光学显微镜高倍镜(\times 400倍)计数每个视野的阳性ICC。另一部分采用醋酸双氧铀、枸橼酸铅双重电子染色，在透射电镜下观察ICC细胞的超微结构并照相存储。

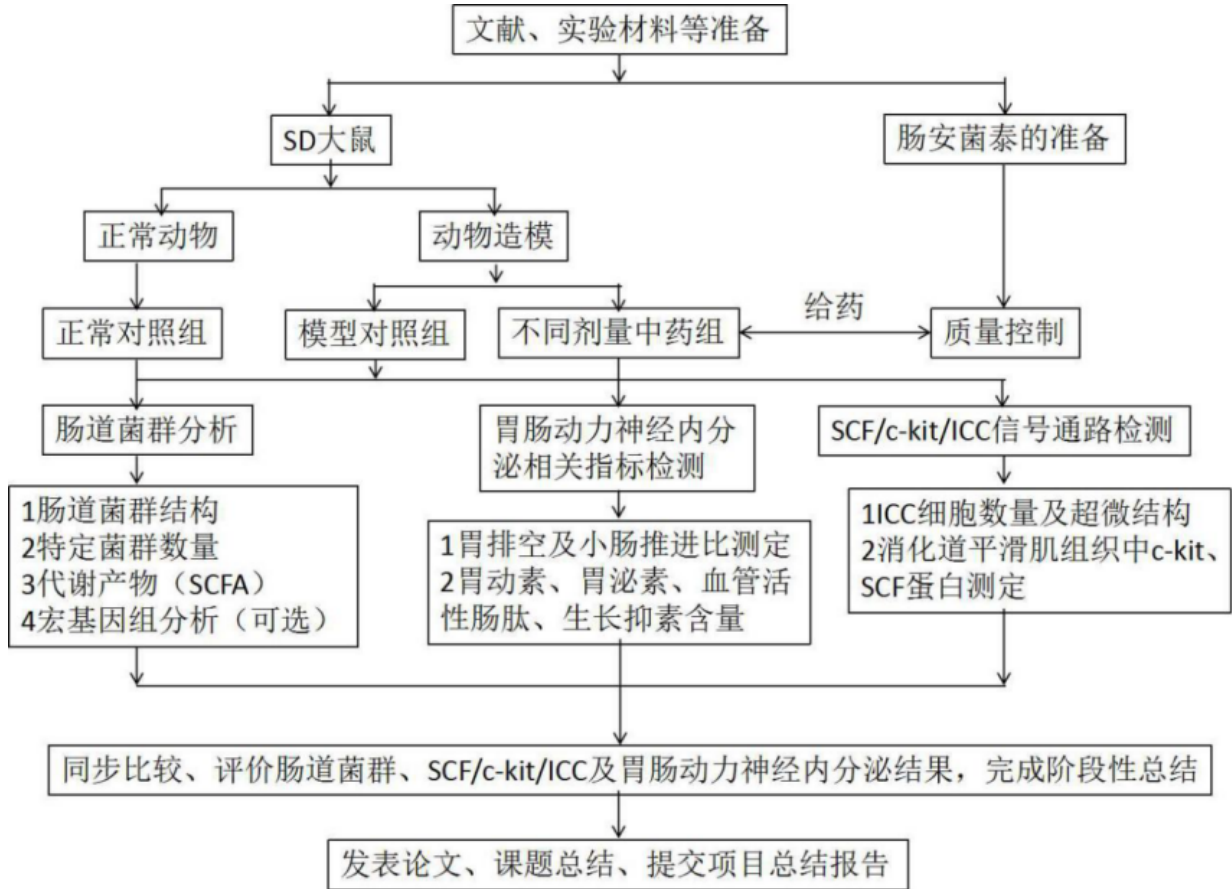
1.8 消化道平滑肌组织中c-kit蛋白、SCF蛋白质的测定

分别切取大鼠食道下段、胃运动起搏区（胃体中部距贲门1/3处）、小肠、结肠组织共4块（约 100mg），采用Western blot放射免疫法检测平滑肌组织中c-kit蛋白、SCF蛋白质的含量。

1.9 SCF/c-kit信号通路中SCF mRNA、c-kit mRNA的测定

标本选取方法同上，采用Trizol法提取总RNA，行常规逆转录聚合酶链反应(Real-time PCR)。采用SYBR Green I 法,按照TaKaRa公司试剂盒说明书进行。

2 技术路线图



二、项目考核指标

(一) 项目完成后提供的研究开发成果及形式 (须明确产品、专利、版权、标准等成果的类型及数量)				
成果形式		成果数量	成果形式	成果数量
发明专利	申请	0	培养人才 (人)	0
	授权	0	其中: 博士后	0
实用新型专利	申请	0	博士生	0
	授权	0	硕士生	0
外观设计专利	申请	0	软件著作权 (项)	0
	授权	0	论文论著 (篇)	2
国外专利	PCT 受理	0	SCI	1
	授权	0	EI	0
获得国家级科技奖项 (项)		0	CA	0
获得省级科技奖项 (项)		0	中文期刊	1
获得市级科技奖项 (项)		0	其中: 中文核心期刊	1
新产品 (或新材料、新设备)		0	新技术 (或新方法、新项目)	0
转让合同数 (项)		0	成果应用单位 (家)	0
已商品化成果数 (项)		0	转让合同额 (万元)	0
新增利税 (万元)		0	新增产值 (万元)	0
(二) 其他成果及形式说明:				
/				
(三) 其他主要技术经济指标及社会效益说明:				
/				

项目负责人（签章）：

年 月 日

三、项目进度和阶段目标

（一）项目起止时间：2018年1月5日——2020年1月4日	
（二）项目进度、主要工作及阶段目标	
2018.01 至 2018.03	整理文献、订购试剂、相关实验条件准备，建立动物模型及预实验。
2018.04 至 2018.07	肠安菌泰的制备和质量控制，肠安菌泰对肠道菌群结构以及代谢的研究。
2018.08 至 2018.12	观察肠安菌泰对 SCF/c-ki 信号通路以及 ICC 数目及超微结构的影响。
2019.01 至 2019.04	阶段性工作总结，填写年度执行报告；撰写论文及投稿。
2019.05 至 2019.09	观察肠安菌泰对 IBS-D 模型大鼠 SCF/c-kit/ICC 信号通路的表达、胃肠动力神经内分泌学、肠道菌群结构三者之间的相关性。
2019.10 至 2020.01	实验数据的整理、统计分析；补充、完善实验研究；结题报告、研究论文的书写及投稿。

四、经费预算

序号	科目	金额（万元）		说明
1	收入合计	5		/
	（1）单位自筹	0		/
	（2）其他渠道资助	4		中国博士后基金面上资助经费补充
	（3）下达经费	1		/
2	支出预算	下达经费	单位自筹等	/
	（1）科研业务费	0.25	0	用于发表论文
	（2）实验材料费	0.7	0	用于购买相关实验试剂
	（3）协作费	0	0	/
	（4）管理费	0.05	0	按申请经费 5%计算
	（5）其他	0	0	/

	支出合计	1	0	/
--	------	---	---	---

附件 3

传承发展中医药事业专项资金项目绩效目标申报表
(2018年度)

专项名称		从“脑-肠-微生态轴”探讨肠安菌泰调控 SCF/C-kit 信号通路治疗 IBS-D 的机制					
省级财政部门		广东省财政厅		专项实施期		-	
地方财政部门		-		地方主管部门		-	
资金情况 (万元)	实施期金额:	1		年度金额:		1	
	其中: 省级专项	1		其中: 省级专项		1	
	地方资金	-		地方资金		-	
总体目标	实施期目标			年度目标			
	目标1: 整理文献、订购试剂、相关实验条件准备, 建立动物模型及预实验。			目标1: 证明研究假设: 以 IBS-D 公认的动物模型, 证明肠安菌泰通过调节肠道菌群的结构, 或改变肠道特定菌群的代谢功能, 影响 SCF/C-kit 信号启动“脑-肠-微生态轴”的调控作用, 从而起到治疗 IBS-D 的作用。			
	目标2: 肠安菌泰的制备和质量控制, 肠安菌泰对肠道菌群结构以及代谢的研究。			目标2: 通过项目的实施, 建立“脑-肠-微生态轴”的研究模式, 为以肠道菌群为靶点的 IBS-D 中药评价奠定基础, 且有助于进一步深刻认识肠道菌群与 IBS-D 的关系。			
	目标3: 观察肠安菌泰对 SCF/c-kit 信号通路以及 ICC 数目及超微结构的影响。						
	目标4: 阶段性工作总结, 填写年度执行报告; 撰写论文及投稿。						
	目标5: 观察肠安菌泰对 IBS-D 模型大鼠 SCF/c-kit/ICC 信号通路的表达、胃肠动力神经内分泌学、肠道菌群结构三者之间的相关性。						
绩效指标	一级指标	二级指标	三级指标	指标值	二级指标	三级指标	指标值
	产出指标	数量指标	指标1:		数量指标	指标1:	
			指标2:			指标2:	
			
		质量指标	指标1:		质量指标	指标1:	
			指标2:			指标2:	
			

		时效指标	指标1:		时效指标	指标1:	
			指标2:			指标2:	
			
		成本指标	指标1:		成本指标	指标1:	
			指标2:			指标2:	
			
				
	效益指标	经济效益指标	指标1:		经济效益指标	指标1:	
			指标2:			指标2:	
			
		社会效益指标	指标1:		社会效益指标	指标1:	
			指标2:			指标2:	
			
		生态效益指标	指标1:		生态效益指标	指标1:	
			指标2:			指标2:	
.....						
可持续影响指标		指标1:		可持续影响指标	指标1:		
		指标2:			指标2:		
			
.....						
满意度指标	服务对象满意度指标	指标1:		服务对象满意度指标	指标1:		
		指标2:			指标2:		
			
				

六、合同条款

第一条 甲方与乙方根据《中华人民共和国合同法》及国家有关法规和规定，为顺利完成2018年广东省中医药局科研项目（文件编号：粤中医（2018）1号）经协商一致，特订立本合同，作为甲乙双方在项目实施管理过程中共同遵守的依据。

第二条 甲方权利义务：1.按合同书规定进行经费核拨的有关工作协调。2.根据甲方需要，在不影响乙方工作的前提下，定期或不定期对乙方项目的实施情况和经费使用情况进行检查或抽查。

第三条 乙方权利义务：1.确保落实自筹经费及有关保障条件。2.按合同书规定，对甲方核拨的经费实行专款专用，单独列账，并随时配合甲方进行监督检查。3.使用财政资金采购设备、原材料等，按照《广东省实施〈中华人民共和国招标投标法〉办法》有关规定，符合招标条件的须进行招标。4.项目实施完成或实施到一定程度，须按照有关规定提出验收或终止结题的申请，并按甲方要求做好项目结题工作。5.按照国家和省有关规定，提交科技报告及其他材料。

第四条 在履行本合同的过程中，如出现广东省相关政策法规重大改变等不可抗力情况，甲方有权对所核拨经费的数量和时间进行相应调整。

第五条 在履行本合同过程中，需要对项目起止时间、项目经费使用（包括自筹经费、经费分配及经费支出预算等）、项目内容（包括研发内容、技术指标、经济指标及成果指标等）、项目名称、项目承担单位（包括承担单位更名、承担单位替换）、参与单位、项目负责人和成员等进行变更的，甲乙双方按照有关规定执行。

第六条 在履行本合同的过程中，当事人一方发现可能导致项目整体或部分失败的情形时，应及时通知另一方，并采取适当措施减少损失，没有及时通知并采取适当措施，致使损失扩大的，应当就扩大的损失承担责任。

第七条 本项目技术成果的归属、转让和实施技术成果所产生的经济利益的分享，除双方另有约定外，按国家和广东省有关法规执行。

第八条 属技术保密的项目，甲乙双方应另行订立技术保密条款，作为本合同正式内容的一部分，与本合同具有同等效力。

第九条 项目申报书所附“项目可行性报告”，作为本合同正式内容一部分，与本合同具有同等效力。

第十条 根据项目具体情况，经双方另行协商订立的附加条款，作为本合同正式内容的一部分，与本合同具有同等效力。

第十一条 本合同的争议应由双方本着协商一致的原则解决，如双方协商不成的，则应向甲方所在地法院提起诉讼。

第十二条 保密条款：

1. 本合同保密内容范围为：_____。
2. 本合同保密期限为：_____。
3. 乙方应与可能知悉保密内容的人员签订技术秘密保护协议。
4. 各方应建立技术秘密保护制度。
5. 属技术保密项目必须经省负责技术保密部门审查后，确定可否发表或用于国际合作和交流。

第十三条 甲方可根据具体情况决定乙方是否需要单位担保，若需要保证单位，应订立担保条款，作为本合同正式内容一部分。当乙方不履行或不完全履行本合同，以及没有或没有完全承担违约责任时，乙方的保证单位承担连带保证责任。

第十四条 本合同一式四份，各份具有同等效力。甲方存一份，乙方存二份，丙方存一份，本合同自签字之日起生效，有效期至项目结题后一年内。各方均应负合同的法律责任，不应受机构、人事变动的影响。

说明：本合同书中，凡是当事人约定无需填写的内容，应在空白处划（/）。

七、本合同签约各方

管理单位（甲方）：广东省中医药局

（盖章）

年 月 日

承担单位（乙方）：

（盖章）

年 月 日

乙方主管部门（丙方）：

（盖章）

年 月 日